UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT
DROIT D'AUTEUR

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. Toute contrefaçon, plagiat ou reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
34 COURS LÉOPOLD — CS 25233
54052 NANCY CEDEX
TÉL : 03 54 50 54 00
CONTACT@UNIV-LORRAINE.FR
WWW.UNIV-LORRAINE.FR






École doctorale IAEM

Institut Jean Lamour, UMR 7198 CNRS-Université de Lorraine

Thèse

présentée et soutenue publiquement le 28/11/2025

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : Systèmes électroniques

par Agathe LEMÉE

Modèle ex-vivo des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Membres du jury :

Directeurs de thèse	Halima ALEM-MARCHAND	Professeure des Universités à l'Université de Lorraine
	Julien CLAUDEL	Maître de Conférences à l'Université de Lorraine
Rapporteurs	Christophe LALLEMENT	Professeur des Universités à l'Université de Strasbourg
	Gaëlle LISSORGUES	Professeure ESIEE Paris à l'Université Gustave Eiffel
Examinateurs	Jean-François GANGHOFFER *Président du jury*	Professeur des Universités à l'Université de Lorraine
	Anthony TREIZEBRÉ	Maître de Conférences à l'Université de Lille

Sommaire

Sommaire I
Remerciements IV
Index des Figures XIV
Index des Tableaux XXII
Index des Équations XXIII
Index des logiciels utilisés XXIV
Abréviations XXVIII
Introduction générale 1

Chapitre I : Contexte scientifique et état de l'art 5
I.1 - Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin 6
I.1.A - Définition et caractéristiques générales 6
I.1.B - Étiologie et physiopathologie des MICI 8
I.1.C - Impact de la maladie sur la vie du patient 9
I.1.D - Impact socio-économique mondial 10
I.2 - Organisation anatomique et fonctionnelle de l'intestin 13
I.2.A - Intestin grêle et gros intestin 14
I.2.B - Architecture générale 15
I.2.C - Fonctions de la barrière intestinale 16
I.3 - Modèles expérimentaux d'études des MICI 20
I.3.A - Cultures 2D 20
I.3.B - Modèles animaux 23
I.3.C - Les modèles innovants 26
I.4 - Microfluidique au service de l'intestin-sur-puce 28
I.4.A - Émergence des intestins-sur-puce 28
I.4.B - Reproduction des fonctions intestinales clés 31
I.4.C - Intestin-sur-puce spécifique aux MICI 49
I.5 - Caractérisation électrique des cellules 50
I.5.A - TEER : mesure électrique de référence 50
I.5.B - Applications biologiques de la spectroscopie d'impédance 51
I.5.C - Intégration de la spectroscopie d'impédance dans des intestins-sur-puce 57
I.6 - Conclusion 63

Chapitre II : Positionnement scientifique du projet et design conceptuel du dispositif 67
II.1 - Verrous scientifiques 68
II.1.A - Cloisonnement disciplinaire 70
II.1.B - Limites microphysiologiques 71

II.1.C - Limites instrumentales 73
II.1.D - Limites biologiques 76
II.1.E - Vue d'ensemble des verrous 81
II.2 - Positionnement du projet de recherche 82
II.2.A - Modéliser la barrière intestinale 82
II.2.B - Recréer un micro-environnement biomimétique 84
II.2.C - Suivre l'intégrité de la barrière 86
II.3 - Conception de l'intestin-sur-puce 89
II.3.A - Description du design retenu 89
II.3.B - Justification du choix d'une chambre cylindrique 91
II.3.C - Analyse hydraulique 94
II.4 - Conclusion 112

Chapitre III : Développement technologique de l'intestin-sur-puce instrumenté 113
III.1 - Fabrication et assemblage de la puce microfluidique 114
III.1.A - Fabrication 114
III.1.B - Itérations d'amélioration 129
III.1.C - Caractérisation de la fonctionnalisation de la membrane 144
III.2 - Développement des électrodes 154
III.2.A - Conception 154
III.2.B - Procédé de fabrication 156
III.2.C - Intégration des électrodes microfabriquées dans l'environnement de mesure 160
III.3 - Conclusion 167

Chapitre IV : Applications biologiques de l'intestin-sur-puce instrumenté 169
IV.1 - Cultures de cellules épithéliales intestinales dans l'intestin-sur-puce 170
IV.1.A - De la culture standard à l'intestin-sur-puce : comparaison des conditions de coculture 171
IV.1.B - Production de mucus 183
IV.2 - Suivi par spectroscopie d'impédance 186
IV.2.A - Caractérisation intrinsèque des électrodes interdigitées microfabriquées 186
IV.2.B - Évaluation de la profondeur de pénétration des IDT et mise en relation avec la hauteur des tapis cellulaires 193
IV.2.C - Détermination du facteur de forme 199
IV.2.D - Application de la spectroscopie d'impédance pour le suivi de cultures cellulaires intestinales 202
IV.3 - Conclusion 220

Conclusion générale et perspectives 223
Liste des productions scientifiques 227

Annexe A : Principes fondamentaux de la microfluidique 228
Annexe B : Procédés de fabrication et matériaux des membranes poreuses 232
Annexe C : Techniques usuelles de caractérisation de cellules épithéliales 235
Annexe D : Fondements microscopiques de la réponse électrique des milieux biologiques 239
Annexe E : Modèles théoriques de la réponse biologique 246
Annexe F : Préparation histologique des échantillons membranaires 249
Annexe G : Modélisation et évaluation des effets parasites du banc de mesure 250
Annexe H : Détermination du facteur de forme par simulations par éléments finis 257
Annexe I : Signature fréquentielle caractéristique des milieux électrolytiques et biologiques 259
Annexe J : Compensation électrochimique appliquée aux mesures cellulaires 260
Annexe K : Perspectives d'automatisation du protocole de mesure 263
Références bibliographiques 265
Résumé de la thèse en anglais 287
Résumé de la thèse en français 288

Remerciements

I. Encadrement doctoral

I.1. Membres du jury

Je souhaite tout d'abord adresser mes sincères remerciements aux membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail, ainsi que pour la qualité de leurs remarques et la richesse des échanges scientifiques qui ont accompagné la soutenance. Je remercie tout particulièrement les rapporteurs, Gaëlle LISSORGUES et Christophe LALLEMENT, pour la lecture approfondie de ce manuscrit et pour leurs retours précis et constructifs, qui ont permis d'en améliorer la clarté et la rigueur. Je suis également très reconnaissante envers Christophe LALLEMENT pour son investissement de longue date dans la formation d'ingénieurs en Technologies de l'Information pour la Santé à Télécom Physique Strasbourg, où j'ai effectué ma formation d'ingénieure, étape essentielle dans mon orientation vers la recherche scientifique. Je remercie également les examinateurs, Anthony TREIZEBRÉ et Jean-François GANGHOFFER, pour la qualité des échanges scientifiques.

I.2. Direction de thèse

Je remercie ma direction de thèse pour l'accompagnement de ce travail doctoral et pour la confiance accordée tout au long de ce parcours. Je souhaite remercier Halima ALEM-MARCHAND, ma directrice de thèse, en faisant écho à une idée qu'elle a souvent exprimée au fil de ces années : la thèse ne se limite pas à un projet scientifique, elle constitue également une aventure humaine et personnelle. Ce temps long de recherche, fait d'apprentissages, de remises en question et de progression continue, m'a permis d'évoluer, de gagner en maturité, d'affiner ma pratique scientifique et de construire progressivement mon identité de chercheuse. Je remercie également Julien CLAUDEL, mon co-directeur de thèse, pour son accompagnement tout au long de ce travail. Il m'a notamment initiée à la spectroscopie d'impédance, en me transmettant des bases solides et des clés de compréhension essentielles à la conduite de ce projet. Sa disponibilité ainsi que la pertinence de ses conseils ont constitué un appui précieux. Je lui suis par ailleurs très reconnaissante pour l'opportunité qu'il m'a offerte de m'investir dans l'enseignement au sein du cursus de master, expérience particulièrement formatrice qui enrichit mon parcours académique.

II. Institut Jean Lamour

Je souhaite adresser mes remerciements à l'ensemble de l'Institut Jean Lamour (UMR 7198 CNRS-Université de Lorraine) pour son accueil et pour l'environnement scientifique particulièrement stimulant dans lequel ce travail de thèse a pu se développer. J'y ai trouvé un cadre de recherche bienveillant et propice aux échanges et à l'apprentissage.

II.1. Équipe 403 « Nanomatériaux et Santé »

Je remercie l'équipe 403 « Nanomatériaux et Santé », au sein de laquelle s'inscrit ce travail de thèse, pour son accueil au sein de ses activités de recherche à l'interface entre la microfluidique et les applications en santé. Les thématiques développées autour des organes-sur-puce et des approches expérimentales innovantes offrent le cadre scientifique dans lequel ce projet doctoral se construit.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Cyril NOIREL, dont la disponibilité, l'écoute et la bienveillance ont représenté un soutien important au quotidien. Sa présence attentive, aussi bien sur les aspects scientifiques qu'humains, a contribué à instaurer un climat de confiance et a apporté un équilibre précieux tout au long de cette thèse.

Parmi les doctorants et anciens doctorants de l'équipe, je remercie tout particulièrement Cyprien BERTHÉLEMY et Daniele PEDRONI, dont les travaux doctoraux s'inscrivent parallèlement au mien sous une même direction. Le fait de traverser ensemble les différentes étapes de la thèse, depuis les premiers questionnements jusqu'aux phases plus abouties du travail de recherche, a créé une relation de travail et humaine particulièrement enrichissante. Le partage de nos doutes m'a permis de prendre du recul, de relativiser les moments plus complexes et de progresser avec davantage de confiance. Je vous remercie d'avoir contribué à donner à cette thèse une dimension profondément humaine. Je suis particulièrement fière du chemin que nous avons parcouru ensemble, en ayant débuté ce doctorat tous les trois au même moment et en l'achevant également ensemble.

Je remercie chaleureusement Claire GODIER pour son accompagnement lors de mes premiers pas en culture cellulaire et pour la transmission généreuse de ses connaissances, qui ont facilité mon entrée dans ce domaine expérimental. Toujours disponible, à l'écoute et profondément bienveillante, elle a su m'apporter une aide précieuse à chaque étape, dans un climat de confiance particulièrement appréciable. Son investissement exemplaire et son énergie de travail impressionnante témoignent de son engagement et je lui adresse tous mes vœux d'épanouissement pour la suite, qu'elle mérite amplement. Je remercie également Siwar HACHANA pour les moments de convivialité partagés au bureau, qui m'ont apporté légèreté et cohésion au quotidien. Les échanges chaleureux, les gourmandises tunisiennes qu'elle m'a fait découvrir ainsi que l'atmosphère qu'elle a su créer, notamment grâce à une attention toute particulière portée au confort olfactif de notre espace de travail, ont largement contribué à faire du bureau un lieu agréable. Je remercie aussi Nicolas POTIER, avec qui nous avons partagé le bureau, pour sa bonne humeur et ses nombreuses attentions gourmandes, souvent annoncées avec humour par ses célèbres « tu veux du diabète ? » ou « tu veux des maladies cardiovasculaires ? », qui ont rythmé la vie quotidienne. Je lui souhaite beaucoup de réussite pour la suite de son parcours doctoral. Je remercie enfin Lucas SYLLOS MEYER, ancien stagiaire devenu doctorant au sein de l'équipe, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et l'énergie

positive qu'il apporte au quotidien. Son enthousiasme communicatif et sa présence toujours bienveillante donnent l'impression qu'il a su ramener avec lui un peu du soleil du Brésil au laboratoire. Je lui adresse tous mes vœux de réussite pour la suite de sa thèse et pour les projets scientifiques à venir.

Enfin, je remercie Anthony BIGET pour les échanges que nous partageons au cours de la thèse, toujours constructifs et enrichissants.

II.2. Équipe 406 « Mesures et Architectures Électroniques »

Mon travail de thèse s'inscrit à l'interface de plusieurs disciplines, ce qui me conduit à intégrer également l'équipe 406 « Mesures et Architectures Électroniques », que je remercie pour son accueil. L'environnement de travail qu'elle propose favorise les échanges et la transversalité des compétences, contribuant pleinement à la richesse de ce parcours doctoral. Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe pour leur disponibilité et leur bienveillance, qui instaurent un climat propice au dialogue scientifique et humain.

Je tiens tout d'abord à remercier Patrick SCHWEITZER, dont la présence bienveillante et les échanges simples et sincères instaurent une atmosphère conviviale et apaisante au sein de l'équipe. Je remercie ensuite Étienne TISSERAND et Serge WEBER pour leur bonne humeur communicative et leur capacité à apporter légèreté et recul dans les moments de travail, contribuant ainsi à renforcer la convivialité de l'équipe. Je remercie également Philippe POURE pour ses conseils avisés et sa disponibilité, qui m'ont aidée à avancer avec davantage de clarté dans les moments de questionnement. Aussi, j'ai eu beaucoup de plaisir à échanger avec Djamaleddine DJELDJLI, dont la bienveillance et l'humanité marquent profondément le quotidien de l'équipe. Nos discussions, qu'elles soient scientifiques ou tournées vers les perspectives de l'après-thèse, s'inscrivent toujours dans un esprit d'écoute et de soutien. Enfin, je tiens également à exprimer ma gratitude à Patrice ROTH, dont l'humour et la bonne humeur apportent une énergie précieuse au quotidien et participent largement à l'atmosphère chaleureuse de l'équipe.

Je tiens à remercier les membres non-permanents de l'équipe pour les échanges qui ont accompagné cette période doctorale. Je remercie tout particulièrement Rémi BETTENFELD, dont l'expertise expérimentale, notamment autour des procédés de lithographie en salle blanche, a constitué une source d'apprentissage précieuse, en particulier au début de cette thèse. Sa rigueur, son sens pratique et sa disponibilité ont largement contribué à enrichir mon approche expérimentale. Je lui souhaite le meilleur pour la suite de son parcours professionnel, convaincue que ses compétences et son savoir-faire seront des atouts majeurs dans ses futurs projets. Je remercie également MohammadMahdi DERAMGOZIN pour la bonne humeur et la sérénité qu'il a apporté au bureau, contribuant à créer un climat de travail agréable. Je lui adresse également tous mes vœux de bonheur, en lui souhaitant une belle continuité tant sur le

plan professionnel que personnel. Je souhaite également beaucoup de réussite à Florent DERUE, Niloufar DIZANGIAN, Mashiul HUQ, Abdelhak MAOUKOUF et Mengxi ZHOU, dont je souhaite voir les projets se développer avec succès. Enfin, je remercie Merlin LIMON pour son engagement auprès des non-permanents de l'équipe et sa capacité à créer des moments de convivialité.

II.3. Centres de compétences

Je souhaite exprimer ma reconnaissance envers les centres de compétences et les personnels techniques de l'Institut Jean Lamour, dont l'accompagnement sur le plan expérimental constitue un appui essentiel à la réalisation de ce travail.

Au sein du centre de compétences MiNaLor en micro- et nanotechnologies, je remercie Laurent BADIE, Sébastien GEISKOPF, Demba BA et Sophie BRAVETTI-PLONEIS pour leur disponibilité, leur rigueur et la qualité de leur accompagnement technique. Je tiens à les remercier pour l'attention délicate qu'ils m'ont témoignée lors de ma soutenance, en m'offrant un souvenir réalisé en salle blanche. Ce geste m'a profondément touché : je l'expose fièrement chez moi ! Je remercie tout particulièrement Laurent BADIE, dont l'excellence scientifique, la pédagogie exigeante et la rigueur méthodologique structurent profondément mon apprentissage de la microfabrication. Par la précision de ses explications, par l'attention portée aux gestes comme au raisonnement expérimental, il m'a transmis des savoir-faire déterminants pour la réalisation de ce travail.

Je remercie également le centre de compétences Emmanuel Héré pour son soutien en découpe laser et en impression 3D et tout particulièrement Christophe BONNET et Cyril SCHLAUDER pour leur disponibilité et leur accompagnement. Au-delà de l'aide technique apportée, je tiens à souligner la richesse des échanges humains partagés avec Cyril SCHLAUDER, dont l'ouverture d'esprit et la profondeur des discussions offrent un recul précieux sur le travail de recherche et sur le sens que l'on donne à son engagement professionnel. Ces moments ont constitué une véritable respiration dans le quotidien de la thèse et ont largement contribué à rendre ce parcours plus équilibré et plus humain.

III. NGERE

Je remercie le laboratoire NGERE (UMR_S INSERM 1256) pour l'expertise biologique apportée à ce travail de thèse. L'inscription de ce projet dans un environnement spécialisé dans les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) constitue un apport scientifique essentiel, tant pour la mise en perspective biologique des approches développées que pour l'interprétation des résultats. Je remercie à ce titre Laurent PEYRIN-BIROULET, Djésia ARNONE, Marie BOUDAUD et Nina TOULY pour l'expertise mobilisée autour des MICI et pour les échanges scientifiques ayant contribué à orienter et enrichir ce projet. Je remercie également Amandine DEPP pour son implication concrète dans ce travail. Je souhaite enfin

remercier l'IHU INFINY pour les opportunités d'ouverture scientifique qu'il offre autour des MICI. Les échanges et la découverte des travaux menés par les différentes équipes lorraines, notamment dans le domaine de l'imagerie, me permettent d'acquérir une vision plus globale et complémentaire des approches développées contre la maladie, au-delà du seul cadre de ce projet doctoral.

IV. Projets transversaux

En complément du travail de recherche mené au laboratoire, cette thèse s'inscrit également dans un ensemble de projets transversaux mêlant médiation scientifique, enseignement et engagement associatif. Ces activités complètent le parcours doctoral en ouvrant la recherche vers l'extérieur, en favorisant les échanges entre étudiants, doctorants et chercheurs et en participant à la vie collective du laboratoire et de l'université. J'ai beaucoup apprécié ces expériences, qui constituent des moments importants de cette thèse, tant sur le plan humain que dans la construction d'une vision plus large du monde académique.

IV.1. Médiation scientifique : club étudiants-chercheurs

J'ai cocréé le club étudiants-chercheurs ORION « What Health? » avec Magali TIRADO, sous l'encadrement d'Halima ALEM-MARCHAND et d'Astrid PINZANO, avec l'objectif de promouvoir la recherche pour la santé et d'offrir aux étudiants l'opportunité de découvrir concrètement des laboratoires. À travers des moments d'échanges et d'apprentissages, ce club vise à rendre la recherche plus accessible et plus tangible, en mettant en lumière la diversité des parcours et des thématiques scientifiques. Cette activité de médiation scientifique constitue un prolongement naturel de mon parcours doctoral. Elle m'a permis de partager mon intérêt pour la recherche, de transmettre et de contribuer au dialogue entre étudiants et chercheurs, dans un cadre ouvert et stimulant. Je remercie le noyau opérationnel ORION, composé de Mounir TAREK, Tsvetelina NESHOVA, Laurence HUNG et Aude ANGSTER, dont l'implication et le soutien rendent possible la mise en place et le développement de ce projet. Je remercie également les doctorants qui ont accepté de s'impliquer dans cette initiative : Walid BOUZID, Arnaud BUZON, Martin DOGUET, Rémi HATTAT, Antoine KNEIB et Ghita SEKKAT. Leur engagement contribue pleinement à la richesse des échanges et à la dynamique du club. Je remercie enfin l'ensemble des étudiants participant aux actions du club, dont la curiosité, les questions et l'enthousiasme donnent tout son sens à cette démarche de médiation scientifique. Nous passons désormais le flambeau à Nicolas POTIER et Lucas SYLLOS MEYER, à qui je souhaite le meilleur pour la suite de cette aventure, convaincue qu'ils sauront poursuivre et faire évoluer cette dynamique autour de la recherche pour la santé.

IV.2. Enseignements

Je remercie le personnel d'ATELA (Atelier d'Électronique et d'Automatique) de la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine pour la confiance accordée en me permettant d'enseigner. J'ai eu l'opportunité d'assurer les travaux pratiques d'introduction aux capteurs intelligents du Master 1 EEA (Électronique, Énergie Électrique et Automatique) ainsi que le tutorat de remise à niveau en électronique analogique et électronique numérique destiné aux étudiants extracommunautaires entrant en Master.

Me retrouver en situation d'enseignante alors que, l'année précédente encore, j'étais assise du côté des étudiants constitue une transition marquante. Cette nouvelle posture m'amène à comprendre autrement les difficultés rencontrées par les étudiants, à adapter mes explications et à réfléchir à la manière de transmettre des notions parfois complexes de façon accessible. Je termine cette expérience avec beaucoup de satisfaction et de reconnaissance et je remercie sincèrement qu'elle m'ait été proposée au cours de cette thèse.

IV.3. Engagement associatif

Je remercie l'association des non-permanents du laboratoire, le Cénacle de l'Institut Jean Lamour, structure associative constituée sous le régime de la loi 1901, pour l'espace de dialogue, de représentation et de convivialité qu'elle offre aux doctorants et jeunes chercheurs. Cette association joue un rôle essentiel dans la vie du laboratoire, en favorisant les échanges entre disciplines, en portant la voix des non-permanents et en créant des moments de cohésion particulièrement précieux au cours de la thèse. Je remercie également la direction du laboratoire pour le soutien apporté à cette initiative. J'ai eu la chance de m'y investir en tant que trésorière lors du mandat 2022–2023, puis en tant que présidente lors du mandat 2023–2024, expériences particulièrement formatrices et riches humainement. Je remercie chaleureusement les autres membres des bureaux pour leur implication, leur esprit d'équipe et le travail accompli ensemble au service de cette communauté doctorale.

V. Amis

V.1. « Pause IJL » : des collègues et, avant tout, des amis

Au-delà des discussions scientifiques et des pauses café, ce groupe a constitué une présence précieuse tout au long de mon parcours, mêlant entraide professionnelle et amitié sincère. Je souhaite ici exprimer toute ma gratitude à celles et ceux qui ont fait de « Pause IJL » bien plus qu'un simple groupe de discussion.

- Maxence ANTOINE, merci de hard carry mes takes douteux sur le lore caché de tout le monde. Merci également de m'avoir appris la seule vraie patch note importante de League of Legends, à savoir que Caps a subi un nerf capillaire massif, digne d'un hotfix en pleine saison. Aussi, je tiens à te rendre un énorme respect pour ton run de respo fun

du Cénacle, qui a ressemblé à une saison MVP avec une macro parfaite, zéro throw et aucun remake. Nous attendons d'ailleurs toujours que le labo pose officiellement la ward permanente « foyer Maxence ANTOINE » pour sécuriser définitivement la zone. Enfin, pour rassurer les casters du plateau, ce n'est pas une blessure, mais simplement le DLC genou en early access, légèrement buggué en early game, tandis que le gameplay reste S tier en late game.

- Théo BÉQUET, merci de nous avoir fait découvrir l'Ardèche dans la vraie vie et Ultimate Chicken Horse dans la fausse vie. Et puisqu'il est question de grands déplacements, comment ne pas remarquer cette étrange « coïncidence » : traverser toute la France pour venir à l'IJL, alors que la dernière mine de sel encore en activité du pays se trouve justement à deux pas de Nancy ? Coïncidence ? Je ne crois pas.

- Cyprien BERTHÉLEMY, merci d'avoir été un compagnon d'infortune et un mécène involontaire du marché noir du vélo nancéien : les voleurs te remercient pour trois ans de croissance économique locale.

- Nathan BOULANGEOT, merci t'es un vrai pote — toi. (Et on sait que ça, ce n'est pas donné à tout le monde.) Puisque j'ai évoqué la plaque qu'attend Maxence, il serait injuste de ne pas mentionner celle que tu mérites largement de voir installée au quatrième étage.

- Romain BOURDAIS, merci pour les soirées ciné, si possible nous nous en tiendrons aux versions classiques, et non aux versions extra longues qui durent plus longtemps que la cicatrisation des bleus que j'ai eus à cause des glissades dans les rivières ardéchoises.
  PS : mon setup reste objectivement supérieur.

- Niamh CLARKE, merci d'incarner à toi seule la diversité d'une équipe entière de recherche : une femme, une Irlandaise et surtout un atout marketing soigneusement mis en avant. Forte de tant d'atouts, je suis sûre que tu conduiras le Cénacle vers de glorieux horizons à bord de la légendaire Ford Nouba.

- Clélia COUCHET, merci pour ton énergie sportive inépuisable, qui donne presque envie de s'y mettre aussi. Depuis ton installation dans les montagnes, j'espère que tu continues sur cette belle lancée et que mon raccommodage improvisé de ton jean tient toujours bon.

- Sébastien GEISKOPF, merci de nous avoir raconté comment c'était avant la construction des bâtiments, toi qui es devenu un peu notre dinosaure à tous. Désormais, te voici le petit nouveau dans un autre labo, prêt à vivre à ton tour l'expérience de la dinosaurisation.

- Thomas GIRARDET, merci Monsieur le Président. Je suis ravie de te voir désormais Maître, même si tu étais déjà bien assez autoritaire avant.

- Killian HENRY, merci de m'avoir fait découvrir la madeleine liquide, même si à première vue, ça n'a pas l'air d'être très bon pour le poignet, ni pour notre flow une fois tous habillés en marcels empruntés.

- Roua KADDAH, merci d'avoir complimenté mon houmous fait maison, je n'aurais pas pu rêver meilleure validation culinaire. Tu peux te fier sans crainte à mes préparations, ce qui n'est malheureusement pas un principe universel, notamment lorsqu'il s'agit des boissons proposées par Loris !

- Merlin LIMON, merci d'avoir orchestré la grande fuite de mes compagnons de cantine vers le restaurant CNRS, établissement visiblement réservé à une élite à laquelle je n'appartiens pas, ce qui rend la trahison d'autant plus douloureuse.

- Guillaume LO-CASCIO, (pas forcément) merci pour ton éclectisme musical contagieux qui frappe souvent sans prévenir et pour cette anecdote historiquement traumatisante sur Charles VIII, qui s'est littéralement cognée une place permanente dans ma tête.

- Mariam MARTIROSYAN, merci pour cette tournée exhaustive des restaurants à volonté du Grand Nancy, aventure gastronomique qui aurait déjà suffi à remplir nos week-ends. Et pourtant, tu as réussi à organiser en deux heures la meilleure soirée d'anniversaire jamais vécue. Installés en place VIP dans un gymnase au charme douteux, cette sortie au gala de catch atteignait un tel niveau culturel qu'elle a provoqué le rage quit de PA. L'inoubliable show de Monster Truck est venu compléter cette apothéose du divertissement et l'a presque aussitôt talonnée dans mon cœur. Dit comme ça, on pourrait croire que nos activités se résument à des escapades d'un raffinement discutable, et à vrai dire, ce n'est pas totalement faux.

- Loris RASPADO, merci pour ton impressionnante fidélité au fromage, une constance qui force le respect autant qu'elle embaume les environs. Sans toi, sans le Cénacle, je n'aurais jamais rencontré tous ces loustics que je remercie. Alors finalement, merci à toi de m'avoir permis de les remercier eux : une sorte de parrain des remerciements, en somme, même s'il laisse parfois derrière lui un léger parfum de reblochon.

- Timothée ROUYER, merci de t'être porté volontaire pour devenir le nom d'usage officiel de Pierrickounet, une tâche lourde à porter.

- Pierre-Antoine TOSTIVINT, merci d'être un fervent défenseur de l'Ouest ! (… Même si Nantes n'est toujours pas en Bretagne.) Au passage, tu claqueras la bise à Xavier quand tu le reverras. D'ailleurs, rétrospectivement, cela donne l'impression que

certaines tragédies du voisinage pourraient peut-être avoir une origine plus odorante qu'on ne l'imagine.

- Alan VAISSIÈRE, merci de m'avoir initiée à Donjons et Dragons, ce traquenard qui remplace les soirées dehors par des jets de dés frénétiques, tout en boostant mes facultés de calcul mental et me rendant apte à comprendre Stranger Things.

- Justine ZINNI, merci de m'avoir initiée à l'étrange généalogie des canards-bananes, cet univers parallèle dont je suis désormais persuadée que tu finiras par reconstituer l'arbre complet, génération après génération, autour de Gary.

V.2. Amis étoilés

Je remercie très sincèrement Béatrice BERGER DE NOMAZY, Thomas BIGNON, Daniel DANG, Anaïs GUILLOU, Julia LESACHER, Théodore TALBOT, Killian TIROIR et Marc-Élie VERLINDE. Nous nous sommes rencontrés en classe préparatoire au lycée Chateaubriand à Rennes et notre amitié n'a cessé de se renforcer au fil des années. Malgré l'éloignement géographique et nos parcours respectifs aux quatre coins de la France, nous avons su préserver un lien solide et précieux. Nos retrouvailles annuelles en vacances sont devenues un rendez-vous presque sacré, toujours attendu avec beaucoup de joie et j'aime à croire qu'elles continueront encore longtemps : quand nous comparerons nos vies d'adultes responsables (ou ce qui s'en rapprochera le plus), quand certains arriveront avec des enfants, d'autres avec des anecdotes de boulot invraisemblables, mais toujours avec la même complicité. J'espère sincèrement que cette tradition traversera les années, les déménagements, les agendas surchargés, bref toutes les nouvelles étapes de nos vies et qu'on continuera à se retrouver comme si rien n'avait changé.

Je souhaite adresser un merci tout particulier à Béa et à MEV : votre présence à ma soutenance m'a profondément touchée. Vous voir dans la salle, c'était me sentir entourée et soutenue, et ça, ça compte plus que vous ne l'imaginez.

V.3. Pierrick

Pierrick, merci d'avoir fait de moi la partie duo de ton abonnement UGC illimité. Des comédies françaises interminables aux vrais bijoux du cinéma, nous avons finalement tout vu, ou presque ! Dans tous les cas, notre débrief en sortie de salle est devenu mon rituel incontournable, généralement très rapide puisque nous sommes bien souvent d'accord. Ensuite, l'instant presque sacré de la notation vient et, avec lui, ce petit bonheur coupable de mettre une mauvaise note après avoir survécu à un nanar. Et au fond, peu importe ce que nous regardons : bon ou mauvais, c'est toujours un plaisir de partager tout ça avec toi.

Pierrick, merci d'être le meilleur teammate Fortnite, celui qui est tombé dans la marmite à cause de moi, mais qui a manifestement absorbé dix fois plus de talent que prévu, au point

d'être désormais beaucoup trop fort. Malgré tout, j'ai un immense plaisir à enchaîner avec toi les passes de combat, entre stratégies de complétion des quêtes et farming d'EXP dans ce qui devrait clairement être des jeux mobiles. Et quand nous faisons une pause d'écrans, nous nous retrouvons autour d'une partie de Seven Wonders Duel, où là encore, ton talent dépasse le mien, à l'exception d'une fois : mon unique victoire à mon actif que je tiens à rappeler pour la postérité !

Pierrick, merci d'être un fin gourmet. Je ne pourrais rêver meilleur compagnon de dégustation. Grâce à toi, j'ai découvert les restaurants étoilés ! Mais ce que j'aime par-dessus tout, c'est ton enthousiasme pour toutes les formes de gastronomie, des grandes tables aux churros de la foire, en passant par le très noble restaurant local. Je suis ravie d'avoir trouvé quelqu'un qui, comme moi, se laisse complètement happer par la nourriture quand elle est vraiment bonne, comme si plus rien d'autre n'existait à cet instant précis.

Pierrick, merci de vouloir me faire découvrir le monde. Je n'ai pas toujours eu le réflexe du voyage, mais tu m'emmènes doucement vers de nouvelles découvertes. Bien sûr, je ne vais pas me transformer du jour au lendemain en globe-trotteuse intrépide : je continuerai de consulter attentivement les recommandations du site de France Diplomatie ! Mais nous avons déjà commencé l'exploration, entre escapades dans les villes du Nord-Est, road trip dans le Sud-Est et virée sur la côte est de l'Espagne. Ce n'est pas encore très exotique mais je suis sûre que ce n'est que le début de nombreuses aventures à venir.

Et surtout, Pierrick, merci d'être toujours là pour moi, même quand je suis un véritable mulet, même quand la casse d'un ongle prend des proportions dramatiques, même quand je m'enlise dans la technique de l'autruche. Merci d'être mon coéquipier de cinéma, de jeu, de repas et de vie, celui avec qui tout est plus simple, plus drôle et infiniment mieux.

Index des Figures

Figure I-1 : Les différentes parties du tractus gastro-intestinal [1]. Traduit. 6

Figure I-2 : Représentation des facteurs de risque MICI [8]. 8

Figure I-3 : Carte mondiale de la prévalence des MICI normalisée selon l'âge en 2017 [15]. 11

Figure I-4 : Répartition mondiale des stades épidémiologiques des MICI [16]. Traduit. 12

Figure I-5 : Modèle épidémiologique en quatre stades de l'évolution des MICI selon le niveau de développement [16]. Traduit. 12

Figure I-6 : Comparaison des coûts directs moyens annuels par patient et par an comparé à personnes supposées saines [17]. Traduit. 13

Figure I-7 : Organisation anatomique de l'intestin humain dans la cavité abdominale [19]. Traduit. 14

Figure I-8 : Organisation histologique de la paroi digestive [20]. 15

Figure I-9 : Organisation histologique de la muqueuse de l'intestin grêle [2]. 17

Figure I-10 : Organisation de la barrière intestinale en conditions homéostatiques et inflammatoires. 19

Figure I-11 : Schéma d'un insert Transwell® utilisé pour la culture cellulaire [35]. Traduit. 21

Figure I-12 : Schéma du poumon-sur-puce développé par Donald E. Ingber [127]. 29

Figure I-13 : Représentation schématique des principaux organes-sur-puce [129]. Traduit. 29

Figure I-14 : Évolution du nombre annuel de publications sur les organes-sur-puce entre 2003 et 2022 [146]. Traduit. 30

Figure I-15 : Répartition géographique et types d'organes modélisés dans les recherches sur les organes-sur-puce à l'échelle mondial [143]. 30

Figure I-16 : Architecture standard des intestins-sur-puce à deux canaux microfluidiques, séparés par une membrane poreuse [125]. Traduit. 31

Figure I-17 : Architecture des intestins-sur-puce à deux canaux microfluidiques, séparés par une membrane poreuse, à structure villiforme [125]. Traduit. 32

Figure I-18 : Microstructures villiformes en hydrogel synthéthique comme support de culture de cellules éptihéliales [106]. 33

Figure I-19 : Intestin-sur-puce intégrant une structure villiforme en hydrogel sur sa membrane poreuse [151]. 33

Figure I-20 : Intestin-sur-puce intégrant hydrogel villiforme parallèle au substrat [149]. 34

Figure I-21 : Comparaison des capacités de formation de jonctions serrées et de sécrétion de mucus entre lignées Caco-2, HT29-MTX et leur coculture au ratio 90:10 [43], [155], [156]. 36

Figure I-22 : Influence des conditions dynamiques (écoulement laminaire) sur les propriétés de barrière et la différenciation des cellules Caco-2 dans un intestin-sur-puce [153]. 38

Figure I-23 : Systèmes permettant l'application d'un péristaltisme hydraulique dans un intestin-sur-puce [154], [160]. 39

Figure I-24 : Effet combiné du flux laminaire et du péristaltisme mécanique sur la différenciation et la fonction de barrière d'un épithélium intestinal dans un intestin-sur-puce [164]. 40

Figure I-25 : Intestins-sur-puce à péristaltisme pneumatique [164], [165], [166]. 41

Figure I-26 : Intestin-sur-puce à 3 canaux permettant une coculture épithélium-microbiote [168]. 42

Figure I-27 : Quantification de la concentration en dioxygène dans un canal microfluidique à l'aide d'un optode luminescente [174]. 43

Figure I-28 : Organisation cellulaire sécrétant du mucus, réalisée dans un Transwell® [178], [179] 44

Figure I-29 : Intestin-sur-puce ayant 3 canaux microfluidiques distincts et contenant un hydrogel à base de fibroblastes complexe [149] 45

Figure I-30 : Puce microfluidique pour la coculture de sphéroïdes tumoraux épithéliaux et de fibroblastes [180]. 46

Figure I-31 : Intégration compartimentée de cellules immunitaires dans des intestins-sur-puce [181], [182], [183]. 47

Figure I-32 : Effets combinés de la perte d'intégrité épithéliale et de la stimulation microbienne sur la réponse immunitaire dans un intestin-sur-puce [186]. 48

Figure I-33 : Intestin-sur-puce dérivé de patients reproduisant des signatures majeures des MICI [187]. 50

Figure I-34 : Mesure de la TEER. 51

Figure I-35 : Structure de la membrane cellulaire. 52

Figure I-36 : Réprésentation de la réponse fréquentiele des cellules. 52

Figure I-37 : Evolution fréquentielle de la résistance et capacité lors de la formation d'une monocouche cellulaire suivie par spectrosocpie d'imépdance [192]. 53

Figure I-38 : Suivi temporel par spectroscopie d'impédance de la formation, de la stabilisation puis de la dégradation d'un tapis cellulaire [193]. 54

Figure I-39 : Détection précoce de l'apoptose par spectroscopie d'impédance [194]. 54

Figure I-40 : Étude de la cytotoxicité de l'arsénite de sodium sur des fibroblastes par spectroscopie d'impédance [195]. 56

Figure I-41 : Discrimination électrique entre cellules normales et cancéreuses par spectroscopie d'impédance [196]. 57

Figure I-42 : Intestin-sur-puce instrumenté par spectroscopie d'impédance pour le suivi multiparamétrique de la barrière épithéliale [198]. 59

Figure I-43 : Stratégies d'intégration d'électrodes pour la spectroscopie d'impédance dans un intestin-sur-puce [197], [198], [199], [200]. 62

Figure I-44 : Suivi de la différenciation villositaire dans un intestin-sur-puce par spectrométrie d'impédance [197]. 63

Figure II-1 : Diagramme de Venn représentant le positionnement interdisciplinaire du projet à l'interface de trois domaines scientifiques. 71

Figure II-2 : Influence de la géométrie des électrodes pour le suivi de cellules adhérentes en spectroscopie d'impédance [209]. 74

Figure II-3 : Paramètres géométriques d'un capteur à IDT. 75

Figure II-4 : Profondeur de pénétration du champ électrique et paramètres géométriques d'électrodes interdigitées [215]. 75

Figure II-5 : Adaptation des dimensions des électrodes interdigitées au diamètre de la cellule adhérente [209]. 76

Figure II-6 : Évolution au cours du temps de l'index cellulaire mesuré par spectroscopie d'impédance dans deux configurations de coculture. 77

Figure II-7 : Schéma de complexification progressive de l'intestin-sur-puce pour l'étude des MICI. 80

Figure II-8 : Récapitulatif des verrous au développement d'un intestin-sur-puce à spectroscopie d'impédance pour l'étude des MICI. 81

Figure II-9 : Stratégies d'évolution du modèle cellulaire intestinal dans le dispositif développé. 83

Figure II-10 : Vue éclatée de l'architecture de la puce microfluidique. 84

Figure II-11 : Configurations de mesure électrique par IDT dans l'intestin-sur-puce. 88

Figure II-12 : Vue en plan et en coupe du dispositif microfluidique. 90

Figure II-13 : Mécanismes de piégeage des bulles d'air dans les dispositifs microfluidiques [244]. 92

Figure II-14 : Première version rectiligne des chambres microfluidiques, présentant une surface de culture limitée. 93

Figure II-15 : Représentation des sections pour l'analyse hydrodynamique de la chambre. 95

Figure II-16 : Géométrie du compartiment simulé et conditions aux limites appliquées. 104

Figure II-17 : Maillage du compartiment simulé. 104

Figure II-18 : Cartographie de la pression simulée dans un plan médian de la chambre (z=0,75 mm). 106

Figure II-19 : Distribution de la vitesse dans le compartiment. 107

Figure II-20 : Zoom sur la distribution de vitesse à l'entrée de la chambre. 108

Figure II-21 : Distribution de la contrainte de cisaillement pariétal dans le plan de culture (z = 0 mm). 109

Figure II-22 : Profil de la contrainte de cisaillement pariétal le long d'une ligne de coupe. 110

Figure III-1 : Représentation du microenvironnement d'une cellule sur différentes membranes poreuses, observées en microscopie électronique à balayage (grossissements respectifs x156 et x22090). 117

Figure III-2 : Plan global du procédé de fabrication du dispositif microfluidique. 120

Figure III-III-3 : Protocole de moulage du PDMS. 121

Figure III-4 : Protocole de fonctionnalisation de la membrane en PET avec de la fibronectine. 123

Figure III-5 : Mécanisme chimique du collage plasma du PDMS. 125

Figure III-6 : Protocole d'assemblage du dispositif par collage plasma. 125

Figure III-7 : Moule hybride PMMA/PC et moulage d'un demi-dispositif en PDMS. 127

Figure III-8 : Piégeage de bulles d'air lié aux bords irréguliers au niveau de la jonction PMMA/PC [244]. 127

Figure III-9 : Moule monobloc obtenu par impression 3D résine et dispositif microfluidique en PDMS. 128

Figure III-10 : Plis de la membrane en PET après assemblage dans la puce microfluidique en PDMS. 130

Figure III-11 : Observation de la membrane poreuse après découpe au LASER. 132

Figure III-12 : Intégration sans plis d'une membrane en PET dans la chambre de culture microfluidique. 133

Figure III-13 : Alignements correct et incorrect des orifices poinçonnés avec les canaux inférieurs. 134

Figure III-14 : Modèle numérique 2D de la 2e génération de design intégrant des zones de poinçonnage pour moule hybride PMMA/PC. 136

Figure III-15 : Modèle numérique 3D de la 2e génération de design intégrant des zones de poinçonnage adapté à un moule monobloc résine. 136

Figure III-16 : Image (en haut) et schéma (en bas) de la perfusion de la puce microfluidique. 138

Figure III-17 : Image de la perfusion de trois puces microfluidiques en boucle fermée. 139

Figure III-18 : Direction de connexion des aiguilles dans les puces microfluidiques. 140

Figure III-19 : Caractérisation MEB d'un orifice de connexion réalisé par poinçonnage dans le PDMS. 141

Figure III-20 : Modèle numérique 2D de la 3e génération de design intégrant un prolongement en canal étroit. 142

Figure III-21 : Modèle numérique 3D de la 3e génération de design intégrant un prolongement en canal étroit. 142

Figure III-22 : Schéma en vue éclatée de l'assemblage du dispositif de 3e génération. 143

Figure III-23 : Comparaison par observation MEB des trous obtenus par les deux méthodes : poinçon et design de 3e génération. 144

Figure III-24 : Mesure de l'angle de contact. 146

Figure III-25 : Mesure de l'angle de contact des membranes à chaque étape de la fonctionnalisation. 147

Figure III-26 : Imagerie AFM de la surface des membranes en PET aux différentes étapes de la fonctionnalisation. 149

Figure III-27 : Profils de hauteur extraits des cartographies AFM de membranes en PET aux différentes étapes de la fonctionnalisation. 150

Figure III-28 : Segmentation et détection des pores par le logiciel Fiji sur les images MEB. 152

Figure III-29 : Évolution du diamètre et de la circularité des pores avant et après hydrolyse basique de la membrane en PET. 153

Figure III-30 : Conception des électrodes interdigitées (IDT) : quatre géométries à taux de métallisation constant. 155

Figure III-31 : Masque de photolithographie pour l'intégration d'une passivation sélective des pistes de connexion. 156

Figure III-32 : Procédé de fabrication des électrodes. 157

Figure III-33 : Observation au microscope optique des IDT1 à IDT4 après microfabrication. 159

Figure III-34 : Effet de la casquette sur les dimensions de l'IDT1. 160

Figure III-35 : Comparaison de l'environnement de mesure dans l'intestin-sur-puce et dans un puits de culture. 161

Figure III-36 : Contraintes géométriques imposant les dimensions du puits. 162

Figure III-37 : Moules en résine pour la fabrication des puits en PDMS : (a) moule monobloc et (b) moule en deux éléments. 163

Figure III-38 : Protocole de moulage des puits en PDMS. 164

Figure III-39 : Observations macroscopiques du puits en PDMS positionné sur les électrodes. 164

Figure III-40 : Moule, intégrant directement le wafer en silicium, pour la fabrication des puits en PDMS. 165

Figure III-41 : Circuit imprimé conçu pour l'interface électrique entre les électrodes microfabriquées et les équipements de mesure. 166

Figure III-42 : Support imprimé en 3D en trois parties pour le maintien des échantillons sur le circuit imprimé. 166

Figure IV-1 : Stratégie expérimentale. 172

Figure IV-2 : Viabilité et confluence de la coculture Caco-2 : HT29-MTX en condition de référence. 174

Figure IV-3 : Viabilité et confluence de la coculture Caco-2 : HT29-MTX sur membrane fonctionnalisée. 175

Figure IV-4 : Viabilité et confluence de la coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) en puce microfluidique statique. 177

Figure IV-5 : Hétérogéinité en culture en puce statique. 178

Figure IV-6 : Répartition des cellules en conditions dynamiques dans l'intestin-sur-puce. 179

Figure IV-7 : Dispositifs externes de débullage microfluidique basés sur des membranes hydrophobes [282], [283]. 181

Figure IV-8 : Méthodes (a) mécaniques et (b) magnétiques de clamping de puces microfluidiques. 182

Figure IV-9 : Modèle numériques 3D des inserts personnalisés. 184

Figure IV-10 : Observations de cocultures Caco-2 : HT29-MTX (9:1) colorées au bleu alcian et à l'hématoxyline (grossissement ×40). 185

Figure IV-11 : Coupes transversales de cocultures Caco-2 : HT29-MTX (9:1) colorées au bleu alcian et à l'hématoxyline (grossissement ×100). 185

Figure IV-12 : Défauts typiques des IDT après microfabrication. 187

Figure IV-13 : Diagramme de Bode des IDT à vide. 188

Figure IV-14 : Capacité apparente des IDT à vide. 189

Figure IV-15 : Capacité à vide des électrodes interdigitées (gauche) et rapports de capacité entre géométries successives (droite). 189

Figure IV-16 : Représentation schématique de la réponse fréquentielle d'une solution électrolytique en spectroscopie d'impédance. 190

Figure IV-17 : Réponse fréquentielle des IDT en présence d'EDI. 191

Figure IV-18 : Capacités extraites en présence d'EDI et comparaison avec la configuration à vide. 192

Figure IV-19 : Diagramme de Bode des IDT avec du milieu de culture. 192

Figure IV-20 : Modèle numérique 2D pour la détermination de la profondeur de pénétration, cas de l'IDT4. 194

Figure IV-21 : Densité de courant moyenne transversale et cartographies associées pour les IDT. 195

Figure IV-22 : Répartition cumulée du courant injecté de chaque IDT. 196

Figure IV-23 : Caractérisation topographique des tapis cellulaires HT29-MTX par microscopie à force atomique. 198

Figure IV-24 : Évolution du facteur de forme expérimental en fonction de la concentration en NaCl et comparaison avec les valeurs simulées. 201

Figure IV-25 : Principe du suivi de la sédimentation des levures boulangères. 204

Figure IV-26 : Évolution temporelle de l'impédance complexe au cours de la sédimentation de levures boulangères sur l'ensemble des IDT. 205

Figure IV-27 : Identification des plateaux caractéristiques l'impédance complexe au cours de la sédimentation de levures boulangères sur IDT3 et IDT4. 206

Figure IV-28 : Dynamique temporelle de la phase normalisée à f_2. 207

Figure IV-29 : Visualisation 3D de la variation temporelle relative du module et de variation absolue de la phase de l'impédance lors du suivi d'une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) sur l'IDT1 pendant 65 h. 210

Figure IV-30 : Évolution fréquentielle de l'impédance et de la conductivité apparente lors du suivi d'une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) sur l'IDT1 pendant 65 h. 212

Figure IV-31 : Évolution temporelle de la conductivité apparente normalisée et du module de l'impédance normalisé aux fréquences caractéristiques lors du suivi d'une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) sur l'IDT1. 213

Figure IV-32 : Évolution temporelle de l'impédance normalisée de cellules Caco-2 et corrélation avec la formation de dômes tridimensionnels [297]. 215

Figure IV-33 : Observation en contraste de phase de la coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) recouvrant la zone active des électrodes interdigitées après 65 h de culture sur IDT1. 216

Figure IV-34 : Effet de la densité d'ensemencement sur l'évolution temporelle de la conductivité normalisée des cultures de HT29-MTX. 219

Index des Tableaux

Tableau II-1 : Analyse des intestins-sur-puce à spectroscopie d'impédance dans la littérature. 69

Tableau II-2 : Estimation de la contrainte de cisaillement pariétale τw dans intestins-sur-puce à spectroscopie d'impédance de la littérature. 72

Tableau II-3 : Paramètres géométriques des électrodes interdigitées définies pour l'optimisation dimensionnelle. 87

Tableau II-4 : Paramètres géométriques des chambres et canaux de la puce microfluidique. 91

Tableau II-5 : Densité volumique et viscosité dynamique des milieux de cultures standards [246]. 96

Tableau III-1 : Membranes commerciales utilisées [247]. 115

Tableau III-2 : Comparaison des paramètres caractéristiques des membranes Transwell à pores de 0,4 µm en PET en PC. 115

Tableau III-3 : Paramètres géométriques et propriétés de diffusion des membranes commerciales (référence 1 et référence 2). 119

Tableau III-4 : Comparaison des deux approches de fabrication de moules microfluidiques. 129

Tableau III-5 : Rugosité RMS des membranes en PET aux différentes étapes de la fonctionnalisation. 150

Index des Équations

Équation I-1 : Débit volumique à appliquer en fonction de la contrainte de cisaillement pariétale désirée dans un canal microfluidique rectangulaire [160]. 37

Équation II-1 : Estimation du nombre de cellules en culture dans une chambre circulaire à confluence. 93

Équation II-2 : Calcul du débit volumique cible. 96

Équation II-3 : Calcul de la vitesse moyenne dans la chambre. 97

Équation II-4 : Calcul du diamètre hydraulique de la chambre. 97

Équation II-5 : Calcul du nombre de Reynolds dans la chambre. 97

Équation II-6 : Calcul de la vitesse moyenne dans les canaux. 98

Équation II-7 : Calcul du diamètre hydraulique des canaux. 98

Équation II-8 : Calcul du nombre de Reynolds dans les canaux. 99

Équation II-9 : Loi de Poiseuille. 101

Équation II-10 : Vitesse moyenne dans un pore cylindrique. 101

Équation II-11 : Vitesse surfacique transmembranaire. 102

Équation II-12 : Débit volumique transmembranaire. 102

Équation II-13 : Détermination du temps caractéristique de convection. 105

Équation II-14 : Obtention de la contrainte de cisaillement à partir des grandeurs calculée par COMSOL Multiphysics®. 108

Équation III-1 : Détermination de la densité de pores minimale. 116

Équation III-2 : Perméabilité de Fick à travers une membrane poreuse. 118

Équation III-3 : Temps caractéristique de diffusion à travers une membrane poreuse. 119

Équation III-4 : Incertitude élargie sur l'angle de contact. 146

Équation IV-1 : Capacité apparente. 188

Équation IV-2 : Rapport des capacités en présence d'EDI et à vide. 191

Équation IV-3 : Conductivité apparente. 211

Index des logiciels utilisés

Les travaux présentés dans ce manuscrit mobilisent plusieurs outils logiciels couvrant la conception assistée par ordinateur, l'acquisition instrumentale, l'analyse d'images et le traitement numérique de données expérimentales. Cet index recense ces logiciels afin d'assurer la traçabilité méthodologique.

I. Analyses et traitements des images

I.1. Gwyddion

Gwyddion est un logiciel libre et open-source développé par le Czech Metrology Institute (République Tchèque), largement utilisé dans la communauté de la microscopie à sonde locale, en particulier pour l'analyse de données de microscopie à force atomique (AFM). Il est reconnu pour sa richesse d'outils de traitement topographique, sa compatibilité avec de nombreux formats de fichiers instrumentaux et sa capacité à effectuer des analyses quantitatives normalisées de surface. Ses principaux avantages résident dans sa gratuité, sa transparence algorithmique et sa grande flexibilité d'analyse. Le logiciel est disponible sur le site officiel du projet : https://gwyddion.net/.

Dans ce travail, Gwyddion est utilisé pour corriger l'inclinaison éventuelle des échantillons, remettre à zéro la valeur minimale des hauteurs et extraire la rugosité quadratique moyenne (RMS). Il permet également de réaliser des analyses surfaciques quantitatives reproductibles selon des protocoles standards.

I.2. Fiji (ImageJ)

Fiji est une distribution enrichie du logiciel ImageJ développée par le National Institutes of Health (NIH, États-Unis) et constitue l'un des outils de référence pour l'analyse d'images en sciences du vivant. Il est largement adopté pour sa modularité, son écosystème étendu de plugins et sa compatibilité avec de nombreux formats d'images microscopiques. Ses avantages majeurs résident dans sa gratuité, sa communauté active et sa grande adaptabilité aux besoins expérimentaux variés. Le logiciel est disponible sur le site officiel du projet : https://fiji.sc/.

Dans ce manuscrit, Fiji est utilisé pour le traitement d'images de microscopie optique et de fluorescence, la segmentation de régions d'intérêt, la mesure de surfaces et d'épaisseurs, ainsi que la visualisation d'images au sens large.

II. Acquisition et instrumentation

II.1. LabVIEW

LabVIEW (National Instruments®, États-Unis) est un environnement de programmation graphique largement utilisé en instrumentation scientifique et industrielle pour le pilotage d'appareils de mesure et l'acquisition de données. Il est reconnu pour sa robustesse,

sa compatibilité avec un grand nombre d'instruments et sa capacité à gérer des systèmes complexes en temps réel. Ses principaux avantages sont la fiabilité de l'acquisition, la visualisation instantanée des signaux et la possibilité de concevoir des interfaces personnalisées. En revanche, son caractère propriétaire et son coût de licence constituent des contraintes. Le logiciel est disponible sur le site officiel de l'éditeur : https://www.ni.com/fr/shop/labview.html.

Dans ce travail, LabVIEW pilote l'analyseur d'impédance E4990A (Keysight Technologies®, États-Unis) pour les mesures réalisées hors incubateur, assurant la configuration fréquentielle, l'acquisition automatisée et l'enregistrement structuré des données.

II.2. LabOne

LabOne® (Zurich Instruments®, Suisse) est l'environnement logiciel propriétaire associé aux instruments de la gamme MFIA et s'impose comme une interface standard pour les mesures d'impédance de haute précision. Il offre une visualisation en temps réel des signaux, une configuration avancée des paramètres expérimentaux et une grande stabilité d'acquisition. Ses avantages résident dans son intégration matérielle optimisée et sa précision de mesure élevée, tandis que sa limitation principale est sa dépendance aux instruments du constructeur. Le logiciel est disponible sur le site officiel de l'éditeur : https://www.zhinst.com/europe/fr/labone-software.

Dans ce manuscrit, LabOne est utilisé pour les mesures d'impédance en incubateur, permettant le suivi dynamique des signaux et l'export structuré des données brutes.

II.3. AutoHotkey

AutoHotkey est un langage de script libre et open-source pour Windows dédié à l'automatisation d'interactions avec des interfaces logicielles. Il permet de reproduire de manière programmée des séquences d'actions utilisateur telles que des clics, saisies clavier et déclenchements de commandes, en l'absence d'outils d'automatisation intégrés aux logiciels propriétaires. Le logiciel est disponible sur le site officiel du projet : https://www.autohotkey.com/.

Dans ce travail, AutoHotkey automatise les acquisitions d'impédance périodiques, assurant une régularité temporelle des mesures et réduisant l'intervention manuelle.

II.4. ZEN

ZEN (ZEISS, Allemagne) est le logiciel propriétaire de pilotage et d'acquisition associé aux systèmes de microscopie du constructeur. Il permet le contrôle complet des paramètres d'imagerie (mise au point, illumination, temps d'exposition, canaux spectraux), l'acquisition automatisée de séries d'images (z-stack, time-lapse, mosaïques) ainsi que l'export des données

dans des formats compatibles avec les logiciels d'analyse scientifique. Le logiciel est disponible sur le site officiel de l'éditeur : https://www.zeiss.com/microscopy/fr/produits/logiciel/zeiss-zen.html.

Dans ce manuscrit, ZEN est utilisé pour l'acquisition d'images de microscopie optique et de fluorescence, le réglage des paramètres instrumentaux et l'enregistrement structuré des données brutes avant traitement sous Fiji.

III. Traitement numérique des données

III.1. MATLAB

MATLAB (MathWorks®, États-Unis) est un environnement de calcul scientifique largement répandu dans les domaines de l'ingénierie, de la physique et des sciences du vivant pour l'analyse de données et la modélisation numérique. Il est reconnu pour sa puissance de calcul, sa bibliothèque étendue de fonctions mathématiques et ses capacités de visualisation avancées. Le logiciel est disponible sur le site officiel de l'éditeur : https://www.mathworks.com/products/matlab.html.

Dans ce projet, MATLAB constitue l'outil central de traitement des données expérimentales. Il permet l'importation des fichiers bruts, l'analyse fréquentielle, l'organisation des bases de données, la génération de figures et l'automatisation des traitements par scripts personnalisés.

III.2. Python

Python est un langage de programmation open-source utilisé en calcul scientifique, en analyse de données et en automatisation expérimentale. Il s'appuie sur un écosystème étendu de bibliothèques spécialisées telles que NumPy, SciPy ou Matplotlib, qui en font un outil particulièrement adapté au traitement numérique et à la visualisation de données. Ses principaux avantages résident dans sa gratuité, sa flexibilité, sa portabilité et sa forte communauté scientifique. Le langage est disponible sur le site officiel du projet : https://www.python.org/.

Dans ce travail, Python est utilisé pour le traitement de données expérimentales.

IV. Conception assistée par ordinateur

IV.1. KLayout

KLayout est un logiciel open-source largement utilisé dans le domaine de la microfabrication pour la conception de masques photolithographiques et de motifs microstructurés 2D. Il est reconnu pour sa précision géométrique, sa compatibilité avec les formats industriels et sa capacité à gérer des structures complexes à l'échelle micrométrique. Le logiciel est disponible sur le site officiel du projet : https://www.klayout.de/.

Dans ce manuscrit, KLayout sert à concevoir les géométries bidimensionnelles des moules microfluidiques et à générer les fichiers de fabrication.

IV.2. FreeCAD

FreeCAD est un logiciel open-source de modélisation paramétrique tridimensionnelle utilisé dans de nombreux domaines de l'ingénierie et du prototypage. Il permet une conception paramétrique flexible, favorisant les itérations rapides de design et le contrôle précis des dimensions. Ses avantages principaux sont sa gratuité, sa modularité et sa capacité de modélisation avancée. Le logiciel est disponible sur le site officiel du projet : https://www.freecad.org/.

Dans ce travail, FreeCAD est utilisé pour la modélisation 3D des moules microfluidiques, l'ajustement paramétrique des dimensions et l'export des modèles pour fabrication.

V. Modélisation par éléments finis

COMSOL Multiphysics® (COMSOL AB, Suède) est un logiciel propriétaire de simulation numérique basé sur la méthode des éléments finis, largement utilisé pour la modélisation multiphysique en ingénierie et en sciences appliquées. Il permet de coupler différents phénomènes physiques tels que la conduction électrique, la mécanique des fluides, les transferts thermiques ou les phénomènes électrochimiques au sein d'un même environnement de calcul. Il est reconnu pour son interface graphique intuitive, sa robustesse numérique et sa capacité à traiter des géométries complexes. Le logiciel est disponible sur le site officiel de l'éditeur : https://www.comsol.com/comsol-multiphysics.

Dans ce manuscrit, COMSOL Multiphysics® est utilisé pour la modélisation numérique du dispositif microfluidique, l'analyse des champs électriques et la simulation des phénomènes de transport, afin de soutenir l'interprétation des résultats expérimentaux.

Abréviations

Sigles liés aux pathologies

CI	Colite Inclassée
DOHaD	Development Origins of Health and Diseases (ou, en français : Origines précoces de la santé et des maladies)
IOIBD	International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Disease (ou, en français : Organisation internationale pour l'étude des MICI)
MC	Maladie de Crohn
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
NAMs	Nouvelles Approches Méthodologiques
RCH	Rectocolite Hémorragique

Sigles liés aux matériaux

ITO	Oxyde d'indium-étain
PA	Polyacrylate
PC	Polycarbonate
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PET	Polyéthylène Téréphtalate
PMMA	Polyméthacrylate de Méthyle
PS	Polystyrène

Sigles liés aux modèles et dispositifs expérimentaux

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (milieu de culture cellulaire)
DSS	Dextran Sulfate Sodique, agent d'induction de colite
EDI	Eau déionisée
IDT	Électrodes interdigitées
NaCl	Chlorure de sodium
PBS	Tampon phosphate salin (phosphate-buffered saline)
SVF	Sérum de Veau Fœtal (complément de milieu de culture cellulaire)
TEER	Résistance électrique transépithéliale

TNBS	Trinitrobenzène sulfonique, agent d'induction de colite	
MTX	Méthotrexate	

Grandeurs physiques en microfluidique

D_h	Diamètre hydraulique du canal	[m]
$\vec{g}$	Accélération gravitationnelle	$[m.s^{-2}]$
η	Viscosité dynamique du fluide	[Pa. s]
p	Pression	[Pa]
ρ	Masse volumique du fluide	$[kg.m^{-3}]$
Re	Nombre de Reynolds	
t	Temps	[s]
τ_w	Contrainte de cisaillement pariétale	[Pa]
$\vec{v}$	Vecteur vitesse	$[m.s^{-1}]$
V	Vitesse caractéristique de l'écoulement	$[m.s^{-1}]$
(x, y, z)	Axes spatiaux du repère	[m]

Grandeurs physiques en électronique

α	Taux de métallisation d'une IDT	
C	Capacité	[F]
p	Profondeur de pénétration du champ électrique d'une IDT	[m]
$\vec{E}$	Champ électrique	$[V.m^{-1}]$
ϵ_0	Permittivité du vide	$[F.m^{-1}]$
ϵ_r	Permittivité relative d'une solution	
f	Fréquence	[Hz]
G	Espacement entre deux doigts consécutifs d'une IDT	[m]
$G(\omega, t)$	Conductance	[S]
j	Nombre imaginaire, tel que $j^2 = -1$	
$\vec{J}$	Densité de courant électrique	$[A.m^{-2}]$
k	Facteur de forme	$[m^{-1}]$
L	Longueur des doigts d'une IDT	[m]

λ	Période spatiale d'une IDT, tel que $\lambda = 2(W + G)$	[m]
μ	Mobilité ionique	$[m^2.V^{-1}.s^{-1}]$
n	Densité volumique de porteurs de charge	$[m^{-3}]$
N	Nombre de doigts dans une IDT	
ω	Pulsation angulaire, tel que $\omega = 2\pi f$	$[rad.s^{-1}]$
R	Résistance	[Ω]
ρ	Résistivité d'un matériau	[Ω m]
S	Surface	$[m^2]$
$\sigma(\omega, t)$	Conductivité apparente	$[S.m^{-1}]$
σ	Conductivité intrinsèque	$[S.m^{-1}]$
$\theta(\omega, t)$	Phase de l'impédance	[rad] ou [°]
τ	Temps caractéristique	[s]
W	Largeur des doigts d'une IDT	[m]
$X(\omega, t)$	Réactance	[Ω]
$\underline{Y}(\omega, t)$	Admittance complexe	[S]
$\underline{Z}(\omega, t)$	Impédance complexe	[Ω]
$\lvert\underline{Z}(\omega, t)\rvert$	Module de l'impédance	[Ω]

Introduction générale

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), comprenant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, représentent aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique. Ces pathologies, incurables à ce jour, résultent d'interactions complexes entre prédispositions génétiques et facteurs environnementaux, conduisant à une inflammation chronique du tractus gastro-intestinal. Leur incidence et leur prévalence sont en constante augmentation, notamment dans les pays industrialisés et engendrent un impact médico-socio-économique majeur, lié au coût croissant des traitements, aux hospitalisations et interventions répétées, ainsi qu'aux comorbidités qui accentuent la dégradation de la qualité de vie des patients.

Sur le plan physiopathologique, les MICI se caractérisent par une rupture de l'homéostasie intestinale reposant sur plusieurs altérations interdépendantes. L'intégrité de la barrière épithéliale est compromise : la cohésion intercellulaire s'affaiblit, augmentant la perméabilité et favorisant le passage incontrôlé de composants antigéniques du contenu luminal. Le mucus, produit par les cellules caliciformes, présente des modifications de composition et d'organisation qui altèrent sa fonction protectrice vis-à-vis des agents pathogènes. Ces perturbations s'accompagnent d'une dérégulation de la réponse immunitaire innée et adaptative, responsable d'une activation inflammatoire chronique et auto-entretenue. Enfin, les interactions avec le microbiote, essentielles à la physiologie digestive et immunitaire, sont perturbées par une diminution de la diversité microbienne et une expansion de populations pro-inflammatoires. L'ensemble de ces anomalies alimente un cercle vicieux inflammatoire dont la compréhension demeure partielle, en raison des limites des modèles expérimentaux actuels qui peinent à restituer la complexité de ces interactions multifactorielles.

Les cultures cellulaires bidimensionnelles, largement répandues pour leur simplicité et leur reproductibilité, restent insuffisantes : leur architecture plane ne permet pas de reproduire la complexité structurale et dynamique de la muqueuse intestinale. Les modèles animaux, bien qu'ils aient permis d'importants progrès dans la compréhension des MICI, présentent des divergences biologiques majeures avec l'homme qui limitent leur transposabilité. Ils posent en outre des contraintes éthiques et réglementaires de plus en plus strictes, ce qui restreint leur utilisation à grande échelle. Ces limites expliquent le taux d'échec élevé du développement thérapeutique, où plus de 90 % des candidats-médicaments échouent lors des phases cliniques faute de modèles prédictifs fiables.

Ainsi, de nouveaux modèles in vitro se développent, parmi lesquels les organes-sur-puce apparaissent comme des alternatives particulièrement prometteuses. Fondés sur des dispositifs microfluidiques, ils recréent des microenvironnements biomimétiques dynamiques en intégrant des flux, des gradients et des contraintes mécaniques proches des conditions

physiologiques. L'intestin-sur-puce se distingue par sa capacité à modéliser la barrière épithéliale et la production de mucus, tout en permettant d'explorer de manière contrôlée les interactions avec le microbiote et les cellules immunitaires. Il constitue une plateforme pertinente pour l'étude des mécanismes physiopathologiques des MICI et l'évaluation de stratégies thérapeutiques innovantes.

Un verrou central dans le développement des intestins-sur-puce réside dans l'absence de mesures fonctionnelles continues, sensibles et non invasives. Aujourd'hui, l'évaluation repose encore majoritairement sur des approches terminales et destructives qui, bien qu'informatives, ne permettent pas de suivre la dynamique tissulaire en continu. L'ajout de capteurs directement dans le dispositif représente une avancée : elle offre un suivi instantané de l'état de la barrière et des réponses cellulaires, tout en renforçant la robustesse expérimentale grâce à l'acquisition continue des données. Parmi les différentes stratégies, la spectroscopie d'impédance s'impose comme un outil sensible et non destructif pour sonder l'intégrité épithéliale. Contrairement aux mesures ponctuelles de résistance électrique transépithéliale (TEER), elle fournit une signature fréquentielle qui distingue les phénomènes extracellulaires, paracellulaires et transmembranaires offrant une vision multidimensionnelle de la barrière. Couplée à la microfluidique, cette approche ouvre la voie à des modèles instrumentés capables de reproduire et de mesurer de manière prédictive les conditions physiopathologiques des MICI, tout en facilitant le criblage et la validation de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Afin de dépasser ces limites, ce travail de thèse vise à développer un modèle d'intestin-sur-puce instrumenté spécifiquement dédié à l'étude des MICI. Le dispositif repose sur une coculture épithéliale Caco-2 : HT29-MTX, choisie pour sa capacité à reproduire simultanément la fonction de barrière et la sécrétion de mucus, deux paramètres centraux de la physiopathologie intestinale. Cette coculture est mise en place dans une architecture microfluidique soumise à un flux contrôlé, reproduisant des contraintes hydrodynamiques représentatives. L'originalité de l'approche réside dans l'instrumentation du système par des électrodes interdigitées associées à la spectroscopie d'impédance, permettant un suivi en continu, non invasif et sensible de la barrière intestinale.

Le manuscrit s'organise de la manière suivante :

- Le Chapitre I établit les bases théoriques et conceptuelles du travail. Il présente la physiopathologie des MICI et leurs conséquences cliniques, décrit l'organisation anatomique et fonctionnelle de l'intestin et analyse les modèles expérimentaux existants. Enfin, il introduit les approches émergentes basées sur la microfluidique et la caractérisation électrique, en soulignant leur potentiel et leurs limites actuelles.

- Le Chapitre II identifie les principaux verrous scientifiques, techniques et biologiques qui limitent la modélisation in vitro des MICI. Il précise ensuite les choix

méthodologiques retenus pour ce travail et décrit le design conceptuel de l'intestin-sur-puce développé, en détaillant les considérations hydrodynamiques et architecturales guidant sa conception.

- Le Chapitre III détaille la réalisation pratique du dispositif. Il décrit la fabrication et l'assemblage de la puce microfluidique, ainsi que les itérations mises en œuvre pour améliorer sa robustesse et son étanchéité. Il présente ensuite la sélection et la fonctionnalisation de la membrane poreuse, suivies de sa caractérisation physico-chimique. Enfin, il aborde le développement des électrodes interdigitées, depuis leur conception et leur procédé de fabrication jusqu'à leur mise en place dans l'environnement de mesure.

- Le Chapitre IV met en œuvre l'intestin-sur-puce instrumenté dans un contexte biologique. Il évalue le comportement de cultures épithéliales intestinales placées dans le dispositif, en analysant l'effet des conditions microfluidiques sur l'organisation cellulaire et la sécrétion de mucus. Ce chapitre examine également l'apport de la spectroscopie d'impédance comme outil de suivi non invasif en temps réel, en caractérisant la réponse électrique des électrodes et en montrant sa capacité à refléter l'évolution de l'intégrité de la barrière épithéliale et de l'organisation des monocouches intestinales au cours de leur culture.

Enfin, une conclusion générale propose une synthèse des résultats obtenus et ouvre des perspectives pour le développement futur de modèles plus complets et pour leur valorisation dans des contextes applicatifs, notamment en médecine personnalisée.

Chapitre I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET ETAT DE L'ART

Ce chapitre vise à établir le contexte scientifique et l'état de l'art. D'abord, une synthèse structurée des connaissances actuelles sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) est proposée, en abordant successivement leur définition, leurs mécanismes physiopathologiques, leur impact clinique et épidémiologique. Puis, l'anatomie et les fonctions de la barrière intestinale sont décrites afin de situer les altérations observées dans les MICI. Ensuite, les principaux modèles expérimentaux mobilisés pour l'étude de ces pathologies sont présentés, allant des cultures cellulaires aux organes-sur-puce. Enfin, les outils de caractérisation électrique des tissus biologiques, notamment la spectroscopie d'impédance, sont présentés en tant qu'approche non invasive pour l'étude fonctionnelle de la barrière intestinale.

I.1 - LES MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES DE L'INTESTIN

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) constituent un ensemble de pathologies inflammatoires touchant le tractus gastro-intestinal, lequel s'étend de la cavité buccale jusqu'à l'anus, comme le montre la Figure I-1 [1]. Ces affections, incurables à ce jour, sont incommodantes pour les patients. Leur prise en charge constitue un enjeu médico-socio-économique croissant à l'échelle mondiale.

Cette section présente un état de l'art synthétique sur les MICI, en abordant leur définition, leur physiopathologie, les principaux facteurs de risque identifiés, ainsi que leurs répercussions cliniques et socio-économiques. Il pose ainsi les fondements nécessaires à la compréhension des problématiques explorées dans les sections ultérieures.

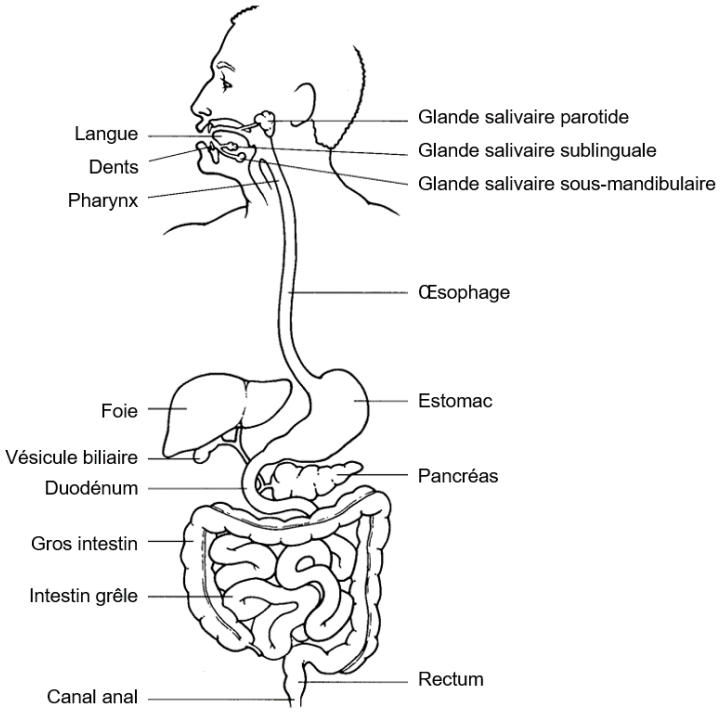


Figure I-1 : Les différentes parties du tractus gastro-intestinal [1]. Traduit.

I.1.A - DEFINITION ET CARACTERISTIQUES GENERALES

Maladie inflammatoire

Les MICI regroupent des pathologies caractérisées par une inflammation persistante et récidivante du tractus gastro-intestinal [1], [2]. Contrairement à une réponse inflammatoire normale, celle observée dans les MICI est persistante et auto-entretenue, sans agent pathogène identifié [3]. Ces affections se manifestent typiquement par une évolution en cycles, alternant entre des phases de poussée inflammatoire aiguë et des périodes de rémission.

Classification des MICI

Les MICI comprennent principalement deux entités : la Maladie de Crohn (MC) et la RectoColite Hémorragique (RCH). Leur distinction repose sur la localisation anatomique et la nature de leur atteinte inflammatoire.

La MC est une inflammation chronique du tube digestif, touchant surtout l'iléon terminal et le côlon [4]. Son évolution est marquée par des lésions inflammatoires segmentaires, c'est-à-dire entrecoupées de zones intestinales saines. L'inflammation est transmurale : elle atteint de l'ensemble des couches de la paroi intestinale. Cette profondeur favorise des complications comme les sténoses, fistules et abcès [5]. À l'inverse de la MC, la RCH est une inflammation continue et superficielle, limitée au rectum et au côlon. [4]. Elle débute toujours au rectum et reste confinée à la muqueuse colique, ce qui permet de la distinguer de la MC [3], [6].

Dans environ 10 à 15 % des cas, en particulier lors de formes initiales ou atypiques, la distinction entre MC et RCH ne peut être formellement établie [7], [4]. Ces situations sont appelées Colite Inclassée (CI), reflétant la complexité du diagnostic des MICI.

Diagnostic des MICI

Le diagnostic des MICI repose sur une approche intégrée combinant données cliniques, biologiques, endoscopiques, radiologiques et histologiques [4]. Aucun examen seul n'est suffisant.

Les manifestations cliniques des MICI dépendent du type de maladie et l'étendue des lésions. Dans la MC, les symptômes les plus fréquents sont des douleurs abdominales, une diarrhée non sanglante, une fatigue persistante et un amaigrissement progressif, parfois associés à des complications comme des fistules ou des sténoses [4]. La RCH se manifeste généralement par des diarrhées sanglantes, des douleurs abdominales basses et une sensation d'urgence défécatoire [3].

La mise en évidence de signes cliniques évocateurs conduit à la réalisation d'examens complémentaires, qui permettent de confirmer l'atteinte inflammatoire, d'en préciser l'extension et la sévérité et d'exclure d'autres pathologies. L'endoscopie, souvent associée à des biopsies, permet une observation directe des lésions et une analyse histologique fine [4]. Elle peut être complétée par une entéro-IRM ou une vidéocapsule pour explorer l'intestin grêle [5]. Le dosage de marqueurs biologiques, comme la calprotectine fécale, reflètent l'activité inflammatoire intestinale [4]. Le diagnostic repose sur la combinaison de ces données, essentielle pour guider la prise en charge et le suivi des patients.

I.1.B - ÉTIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DES MICI

Les MICI sont des maladies complexes, dont l'origine ne peut être attribuée à un facteur unique, Elles résultent d'une interaction dynamique entre plusieurs composantes, comme le montre la Figure I-2 : une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux influençant l'exposome tout au long de la vie [8].

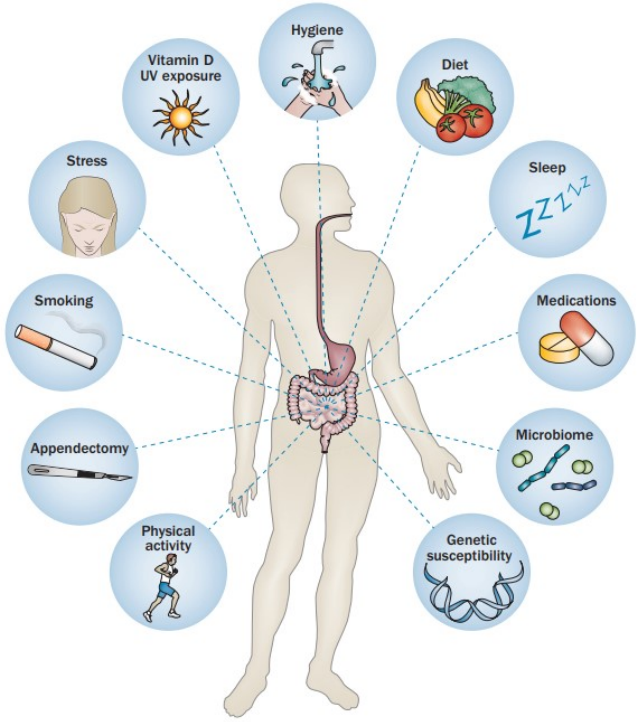


Figure I-2 : Représentation des facteurs de risque MICI [8].

Prédispositions génétiques

Les MICI présentent une composante génétique : avoir un proche atteint augmente le risque de contracter la maladie, estimé entre 2 % et 14 % pour la MC, et entre 8 % et 14 % pour la RCH [8]. Ce lien a été confirmé par des études chez les jumeaux, avec un risque nettement plus élevé chez les monozygotes [8]. Depuis les années 2000, plusieurs variants génétiques ont été identifiés, influençant la réponse immunitaire au microbiote. Toutefois, ils n'expliquent qu'environ 25 % du risque global [9], soulignant l'importance des facteurs environnementaux.

Facteurs environnementaux et exposome

Les facteurs environnementaux jouent un rôle déterminant dans l'apparition et la progression des MICI. Parmi les plus impliqués figurent certains médicaments, le stress chronique, la sédentarité et la pollution atmosphérique [10]. L'alimentation influence également l'inflammation intestinale. L'International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD) recommande de limiter les aliments ultra-transformés, les graisses saturées et les additifs, au profit d'un régime riche en fibres et en oméga-3 [11].

Ces facteurs s'intègrent dans le cadre du concept d'exposome, qui regroupe l'ensemble des expositions environnementales intervenant tout au long de la vie, de la période prénatale à l'âge adulte [12]. Les 1 000 premiers jours constituent une période de vulnérabilité accrue, durant laquelle les expositions précoces, notamment nutritionnelles ou microbiennes, peuvent influencer durablement le développement immunitaire et intestinal, augmentant ainsi le risque de MICI selon l'hypothèse Development Origins of Health and Diseases (DOHaD) [5]. L'exposome induit des modifications épigénétiques, c'est-à-dire des modifications réversibles de l'expression des gènes sans modification de la séquence d'ADN pouvant être transmises aux générations suivantes. Les modifications ciblent notamment des gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation et l'intégrité de la barrière intestinale [12].

I.1.C - IMPACT DE LA MALADIE SUR LA VIE DU PATIENT

Au-delà des atteintes digestives, les MICI peuvent impacter de nombreux organes et altérer de façon importante la qualité de vie des patients. Environ 50 à 60 % des patients présentent au moins une manifestation extra-intestinale avec un retentissement notable sur leur qualité de vie [4].

Comorbidités associées aux MICI

Les MICI s'accompagnent fréquemment de comorbidités, définies comme des affections coexistant avec la maladie principale et pouvant en compliquer la prise en charge.

Parmi les manifestations extra-intestinales, les plus fréquentes sont les atteintes ostéo-articulaires, observées chez environ 30 % des patients. D'autres localisations, telles que les atteintes dermatologiques (érythème noueux, pyoderma), oculaires (uvéite, épisclérite) et hépatiques (notamment la cholangite sclérosante associée à la RCH) sont également décrites [3], [4]. De plus, les troubles psychiatriques, en particulier l'anxiété et la dépression, sont plus fréquents chez les patients atteints de MICI, avec un risque relatif estimé à 150 % par rapport à la population générale, indépendamment de l'âge, du sexe ou du type de MICI [3]. Une relation bidirectionnelle a également été mise en évidence : la dépression précède parfois l'apparition de la maladie [13]. Enfin, l'inflammation chronique du côlon observée dans les MICI, en particulier dans la RCH, augmente significativement le risque de cancer colorectal [14].

L'ensemble des comorbidités associées souligne le caractère systémique des MICI et justifie une prise en charge globale, au-delà des seules atteintes digestives. Cette approche est d'autant plus essentielle que les MICI restent des maladies incurables à ce jour.

Maladie incurable à faible mortalité

Malgré les progrès thérapeutiques, les MICI restent des maladies chroniques incurables : aucun traitement curatif n'est disponible pour la MC ou la RCH [5]. Les prises en charge actuelles visent la rémission, la prévention des complications et la réduction du recours à la chirurgie. La mortalité globale des patients atteints de RCH ou de MC est proche de celle de la population générale, surtout en cas de prise en charge adaptée [5].

Prise en charge et traitements actuels

Le caractère chronique et incurable des MICI impose une prise en charge centrée sur le contrôle de l'inflammation, la prévention des complications et la qualité de vie [5]. Ainsi, la prise en charge repose sur une approche progressive. Alors que les formes légères peuvent être traitées par des médicaments anti-inflammatoires ciblés, les formes plus sévères ou résistantes exigent des thérapies plus puissantes visant à moduler la réponse immunitaire [3]. En cas d'échec ou de complications, la chirurgie peut être nécessaire [5]. De plus, des approches complémentaires, incluant une nutrition adaptée, une activité physique régulière et un soutien psychologique, contribuent à améliorer la qualité de vie des patients [11].

Malgré les avancées, la prise en charge reste complexe, avec un impact significatif sur les patients et les systèmes de santé.

I.1.D - IMPACT SOCIO-ECONOMIQUE MONDIAL

Tendances épidémiologiques mondiales

L'évaluation de la progression des MICI repose sur deux indicateurs fondamentaux : la prévalence et l'incidence. La prévalence correspond au nombre total de cas (anciens et nouveaux) présents dans une population à un moment donné. L'incidence désigne le nombre de nouveaux cas apparaissant sur une période déterminée, dans une population définie. Ces deux paramètres complémentaires permettent d'apprécier l'évolution des MICI et d'orienter les stratégies de santé publique.

À l'échelle mondiale, la prévalence a fortement augmenté depuis les années 1990, atteignant 6,8 millions de cas en 2017 [15]. En France, des projections épidémiologiques estiment une augmentation de 214 % de la prévalence des MICI sur vingt ans, portant ainsi le nombre de patients atteints à environ 695 000 en 2030 [16]. Cette dynamique est très hétérogène selon les régions du monde. La Figure I-3 cartographie la prévalence mondiale des MICI normalisée selon l'âge en 2017. Les prévalences les plus élevées sont observées en Amérique du Nord, en Europe de l'Ouest et en Chine. À l'inverse, les prévalences restent faibles en Afrique, en Asie centrale et en Amérique du Sud [15].

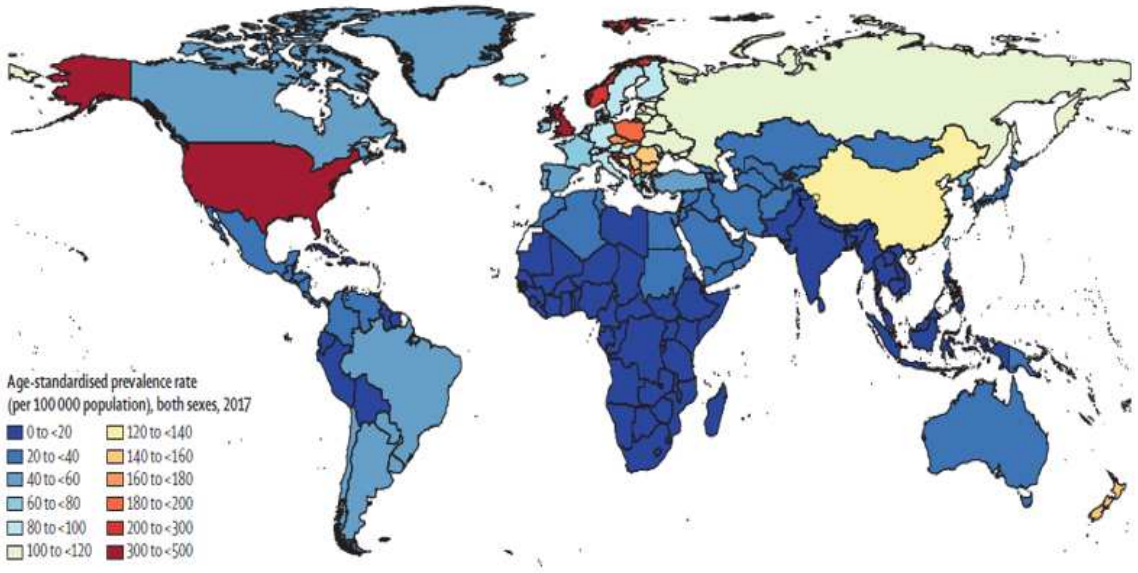


Figure I-3 : Carte mondiale de la prévalence des MICI normalisée selon l'âge en 2017 [15].

Cette carte représente la prévalence des MICI par région, exprimée en nombre de cas pour 100 000 habitants. Les zones en rouge indiquent les régions à forte prévalence (> 500 cas pour 100 000 habitants), tandis que les zones bleues correspondent à des prévalences faibles (< 50 cas pour 100 000 habitants).

Ces variations d'incidence et de prévalence peuvent être interprétées à l'échelle globale à travers un modèle épidémiologique en quatre stades, en fonction du niveau de développement socio-économique des pays, tel qu'illustré aux Figure I-4 et Figure I-5 [16].

1. Tout d'abord, le stade d'émergence correspond à l'apparition de cas isolés dans des régions précédemment non touchées, comme certains pays d'Afrique ou d'Asie du Sud.

2. Ensuite, le stade d'accélération de l'incidence se caractérise par une augmentation rapide des nouveaux cas, en lien avec la westernisation des modes de vie. Il concerne actuellement plusieurs pays nouvellement industrialisés, notamment en Amérique du Sud, au Moyen-Orient et en Asie.

3. Puis, le troisième stade, dit d'aggravation de la prévalence, se traduit par une stabilisation de l'incidence mais une accumulation de cas, liée au caractère chronique et incurable des MICI, ainsi qu'à leur faible mortalité. Ce stade concerne aujourd'hui la majorité des pays industrialisés, notamment en Amérique du Nord, en Europe et en Océanie.

4. Enfin, le quatrième stade, encore théorique, correspond à une stabilisation de la prévalence, résultant d'un équilibre entre incidence et vieillissement de la population atteinte. Il pourrait être atteint dans certaines régions industrialisées d'ici 2050.



Figure I-4 : Répartition mondiale des stades épidémiologiques des MICI [16]. Traduit.

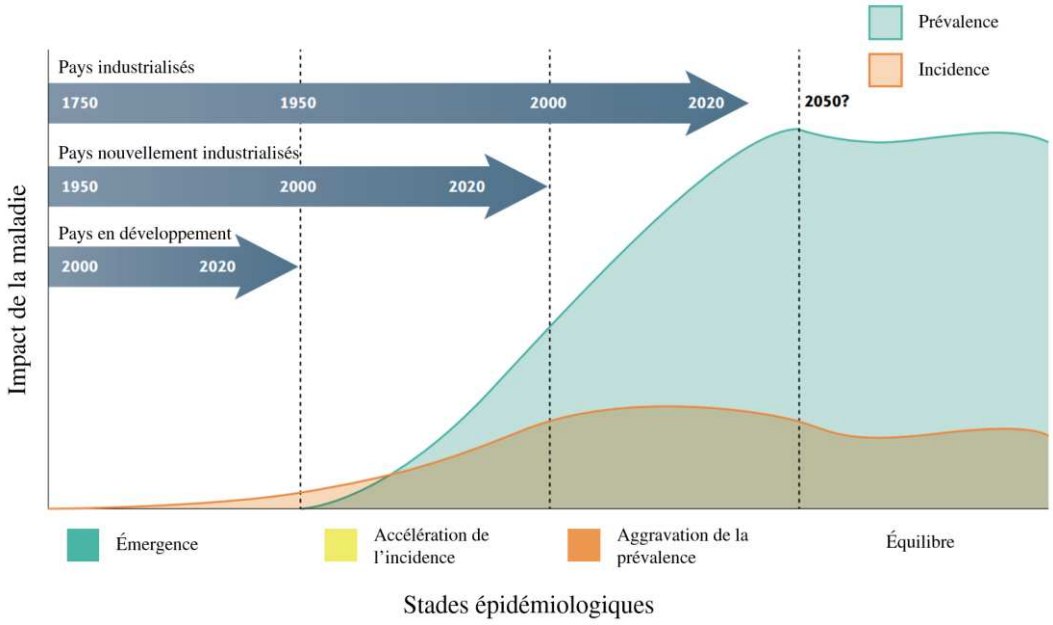


Figure I-5 : Modèle épidémiologique en quatre stades de l'évolution des MICI selon le niveau de développement [16]. Traduit.

Conséquences économiques

Les MICI représentent également un enjeu économique majeur, tant pour les systèmes de santé que pour les patients eux-mêmes [15], [17]. Les personnes atteintes de MICI engendrent des coûts de santé annuels nettement supérieurs à ceux de la population générale. Comme l'illustre la Figure I-6, aux États-Unis, les dépenses annuelles moyennes sont estimées à 22 987 $ par patient, contre 6 956 $ chez les témoins non atteints, soit plus du triple [17]. Ces

dépenses couvrent les consultations médicales, les hospitalisations, les traitements, ainsi que le suivi des complications et des comorbidités associées [17].

Au-delà des coûts directs, les MICI ont un impact économique indirect non négligeable. La réduction de la productivité professionnelle constitue une perte de revenu significative. L'étude européenne WORK-IBD menée entre 2017 et 2019 a mis en évidence que plus de la moitié des patients en emploi déclaraient une perte d'efficacité au travail, représentant un coût moyen de plus de 6 500 € par an et par patient [18].

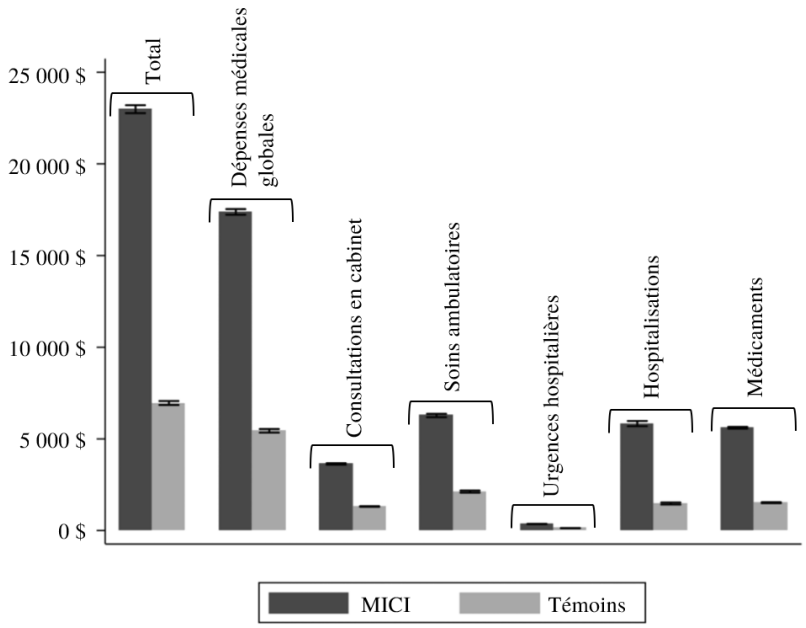


Figure I-6 : Comparaison des coûts directs moyens annuels par patient et par an comparé à personnes supposées saines [17]. Traduit.

Cette étude réalisée aux Etats-Unis porte sur 52 782 patients (29 062 RCH, 23 720 MC), montrant des dépenses de santé trois fois plus élevées chez les patients atteints de MICI. Le graphique détaille les principaux postes de dépenses : consultations en cabinet, soins ambulatoires, hospitalisations, urgences et traitements médicamenteux. La catégorie « dépenses médicales globales » regroupe l'ensemble des coûts de soins hors médicaments.

I.2 - ORGANISATION ANATOMIQUE ET FONCTIONNELLE DE L'INTESTIN

Comprendre les mécanismes des MICI nécessite d'abord une connaissance claire de l'anatomie et des fonctions normales de cet organe. L'intestin assure des rôles essentiels dans la digestion, l'absorption et la protection contre les agents extérieurs. Cette section présente d'abord les caractéristiques de l'intestin grêle et du côlon, puis décrit l'organisation tissulaire de la paroi intestinale. Elle se concentre ensuite sur les fonctions assurées par la barrière intestinale, notamment la motricité, l'absorption des nutriments et la défense contre les agressions.

I.2.A - INTESTIN GRELE ET GROS INTESTIN

Les MICI touchent principalement deux segments du tube digestif : l'intestin grêle et le gros intestin [4], [3]. Ces deux organes occupent la majeure partie de la cavité abdominale, comme illustré à la Figure I-7 [19].

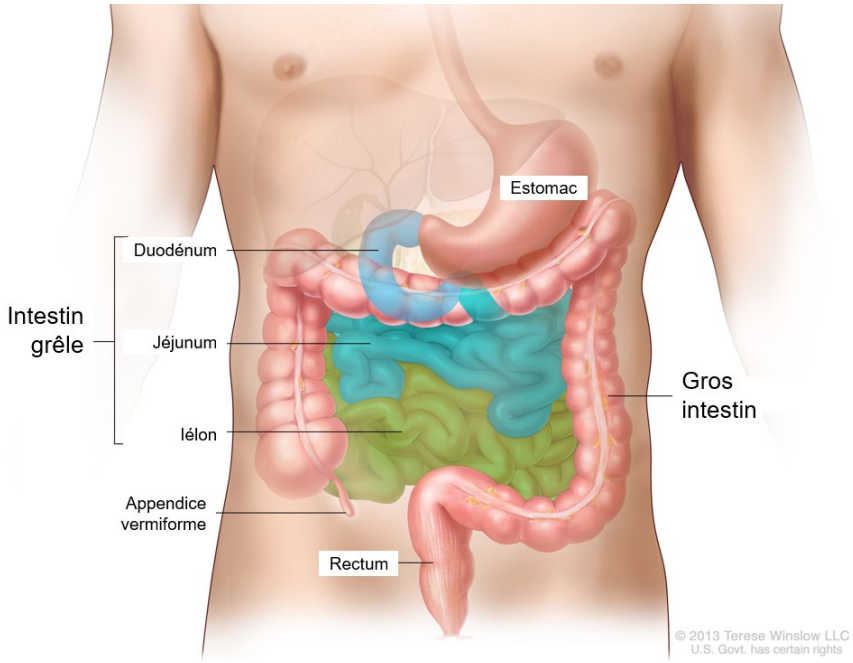


Figure I-7 : Organisation anatomique de l'intestin humain dans la cavité abdominale [19]. Traduit.

Ce schéma représente les segments principaux du tube digestif situés dans la cavité absominale : incluant l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon) et le gros intestin (cæcum, côlon, rectum). L'image montre leur disposition relative dans la cavité abdominale ainsi que les transitions anatomiques entre chaque segment.

L'intestin grêle constitue le segment du tube digestif situé entre l'estomac et le gros intestin. Il mesure environ 5 à 6 mètres de long chez l'adulte et se subdivise en trois parties. Le duodénum, situé immédiatement en aval de l'estomac, mesure environ 25 centimètres. Il est suivi par le jéjunum, long d'environ 2 mètres, puis par l'iléon d'environ 3 mètres [2]. L'iléon terminal constitue une localisation importante des lésions inflammatoires observées dans la MC [4].

Le gros intestin mesure environ 1,5 m. Il débute par le cæcum, une poche dans laquelle se déverse le contenu de l'iléon. Le côlon se poursuit ensuite en quatre portions : ascendant, transverse, descendant et sigmoïde, avant de se terminer par le rectum [2].

I.2.B - ARCHITECTURE GENERALE

La paroi du tube digestif, depuis l'œsophage jusqu'au rectum, présente une organisation structurale commune, composée de quatre couches. Ces quatre couches, classées de la lumière intestinale vers les tissus périphériques, sont : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et enfin le péritoine [2]. La Figure I-8 illustre cette organisation structurale typique à travers différents segments, en montrant l'évolution progressive de la morphologie de la paroi digestive de l'œsophage jusqu'au rectum [20].

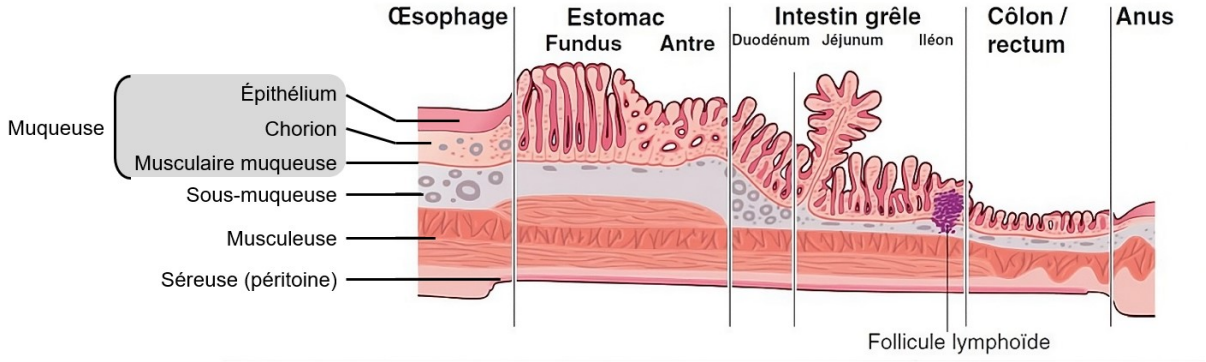


Figure I-8 : Organisation histologique de la paroi digestive [20].

Ce schéma met en évidence les quatre couches histologiques principales : muqueuse, sous-muqueuse, musculeuse et séreuse (péritoine). Il montre également les différences d'aspect entre les segments, comme les plis du jéjunum, les cryptes du côlon ou encore l'épaisseur variable de la musculeuse.

Muqueuse

La muqueuse est la couche la plus interne de la paroi intestinale, en contact direct avec la lumière digestive. Spécialisée dans les échanges avec le milieu intestinal, elle se divise en trois sous-couches principales. Tout d'abord, l'épithélium est la couche la plus superficielle. Il forme un revêtement cellulaire continu composé majoritairement d'entérocytes, responsables de l'absorption et de cellules caliciformes, sécrétrices de mucus. Ensuite, le chorion, aussi appelé lamina propria, est un tissu conjonctif lâche riche en vascularisation et en cellules immunitaires. Il abrite divers types cellulaires, comme des lymphocytes, des macrophages ou des cellules dendritiques, qui peuvent être isolés ou regroupés en structures organisées. Enfin, la musculaire muqueuse est la couche la plus profonde de la muqueuse. Elle est constituée de fibres musculaires lisses disposées en fines couches [2].

Sous-muqueuse

La sous-muqueuse est constituée d'un tissu conjonctif dense, c'est-à-dire un tissu de soutien formé de fibres, principalement du collagène, qui assurent la cohésion et la solidité de la paroi. Elle contient un réseau vasculaire, composé de vaisseaux sanguins de moyen calibre, un réseau lymphatique, composé de fins vaisseaux assurant le transport de la lymphe et la

circulation des cellules immunitaires, ainsi qu'un réseau nerveux appelé plexus sous-muqueux de Meissner, constitué de petites structures nerveuses réparties dans le tissu [2].

Musculeuse

La musculeuse est une couche épaisse de la paroi intestinale composée principalement de muscle lisse. Cette couche musculaire s'organise en deux couches superposées : une couche circulaire interne, dont les fibres entourent le tube digestif selon un plan perpendiculaire à son axe et une couche longitudinale externe, dont les fibres suivent l'orientation générale du tube. Entre ces deux couches musculaires se trouve un réseau nerveux interne, appelé plexus myentérique d'Auerbach, formé de ganglions c'est-à-dire de petits regroupements de cellules nerveuses [21], [2].

Péritoine

Le péritoine est une fine membrane qui enveloppe partiellement ou totalement les organes digestifs. Il comporte deux feuillets : un pariétal, fixé à la paroi abdominale, et un viscéral, qui recouvre les organes. Quand l'intestin est entièrement entouré, ce feuillet forme une couche appelée séreuse, faite d'un épithélium plat appelé mésothélium. Dans les segments non recouverts, comme le rectum, cette couche est remplacée par une adventice, un tissu conjonctif qui fixe l'intestin aux structures voisines [2].

I.2.C - Fonctions de la barriere intestinale

La barrière intestinale ne se limite pas à une structure anatomique : elle joue un rôle fonctionnel essentiel dans le maintien de l'équilibre entre l'organisme et l'environnement intestinal. Elle régule les échanges entre le contenu de l'intestin et les tissus profonds, assurant à la fois l'absorption des éléments utiles et la protection contre les agents extérieurs, grâce au mouvement péristaltique, à l'absorption sélective, à la barrière physique et au rôle immunitaire.

Mouvement péristaltique

Le péristaltisme désigne les contractions coordonnées des muscles lisses de la paroi intestinale, permettant la progression et le brassage du contenu digestif. Il est assuré par les muscles lisses de la musculeuse et contrôlé par le système nerveux entérique, en lien avec les cellules interstitielles de Cajal, qui synchronisent l'activité musculaire [22].

Dans l'intestin grêle, le transit est lent : le bol alimentaire met en moyenne 2 à 6 heures pour parcourir les 5 à 6 mètres de longueur, ce qui correspond à une vitesse estimée entre 1 et 2 cm par minute. Dans le côlon, les mouvements sont encore plus lents et discontinus : le transit peut durer entre 12 et 48 heures, rythmé par des contractions qui surviennent quelques fois par jour et permettent de déplacer rapidement le contenu vers le rectum [23].

Dans les MICI, l'inflammation peut altérer les cellules musculaires, nerveuses et les cellules de Cajal, entraînant un péristaltisme désorganisé, responsable de troubles digestifs tels que douleurs, diarrhée ou constipation [24].

Absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes

L'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes se fait essentiellement dans l'intestin grêle, au niveau de l'épithélium. Pour optimiser cette fonction, la surface d'échange est considérablement amplifiée par une organisation structurée à trois niveaux, comme le montre la Figure I-9 [2], [25] :

- Les plis circulaires, ou de Kerckring, sont des repliements transversaux permanents de la muqueuse et de la sous-muqueuse qui mesurent jusqu'à 10 mm de hauteur. Ils sont particulièrement nombreux dans le duodénum et le jéjunum et disparaissent progressivement dans l'iléon terminal.

- Les villosités intestinales, en forme de doigts, mesurent entre 0,5 et 1 mm de hauteur. Elles recouvrent les plis circulaires et diminuent en taille et en densité du duodénum à l'iléon. Entre elles, les cryptes de Lieberkühn forment des invaginations épithéliales.

- À la surface des entérocytes, on retrouve des microvillosités très fines, d'environ 1,0 à 1,4 µm de hauteur, portées par les entérocytes. Chaque entérocyte peut porter plusieurs milliers de microvillosités, augmentant encore la surface d'absorption.

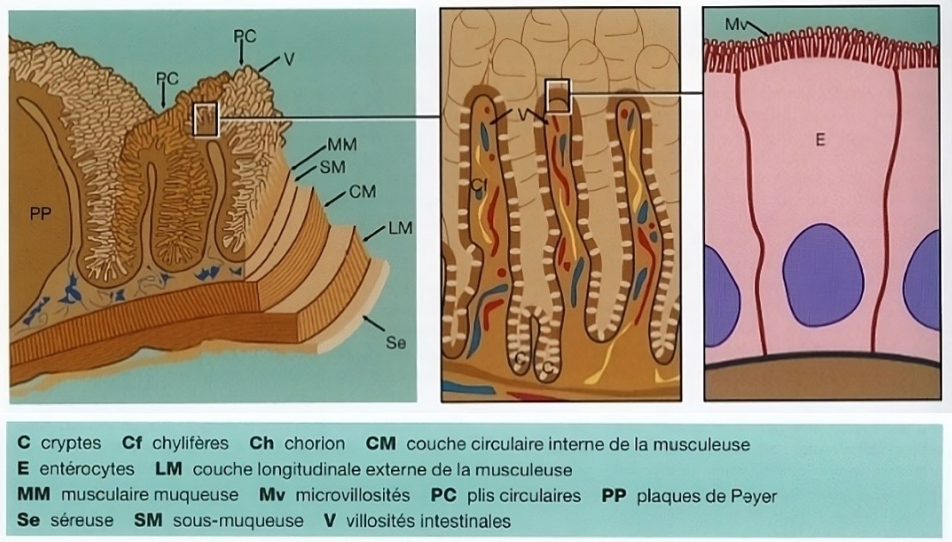


Figure I-9 : Organisation histologique de la muqueuse de l'intestin grêle [2].

Schéma en trois niveaux de zoom illustrant la structure de la muqueuse intestinale. (à gauche) Plis circulaires macroscopiques. (au centre) Villosités intestinales. (à droite) Entérocytes et leurs microvillosités.

Grâce à ces structures macroscopiques et microscopiques, les échanges entre la lumière intestinale et les tissus sous-jacents sont optimisés. Les entérocytes, cellules absorbantes de l'épithélium, transfèrent les nutriments, l'eau et les électrolytes vers les capillaires sanguins et lymphatiques situés dans le chorion. Plus de 90 % de l'eau et l'essentiel des nutriments sont absorbés dans l'intestin grêle [26]. Dans les MICI, l'inflammation altère cette structure, réduit l'absorption et augmente les pertes, contribuant à la diarrhée et à la malnutrition [26].

Rôle barrière

La paroi intestinale constitue une barrière essentielle entre le contenu de la lumière intestinale, riche en micro-organismes, et les tissus profonds de l'organisme. Ce rôle de barrière repose sur trois composantes interdépendantes : une barrière physique, une barrière microbienne et une barrière immunitaire.

Barrière physique : épithélium et mucus

Cette barrière physique repose principalement sur deux éléments complémentaires : un épithélium cellulaire et une couche de mucus protectrice. Les cellules de l'épithélium sont étroitement reliées entre elles par des structures appelées jonctions serrées, qui assurent l'étanchéité de la paroi. Ces structures permettent un contrôle sélectif de la perméabilité : les nutriments essentiels peuvent passer, tandis que les agents pathogènes sont bloqués [27], [28].

En surface, le mucus forme une couche supplémentaire de protection. Cet hydrogel structuré, riche en mucines, principalement MUC2, est sécrété par les cellules caliciformes. Il limite le contact direct entre les bactéries et l'épithélium [28], [29]. Dans le gros intestin, le mucus est organisé en deux couches : une couche interne, dense et généralement exempte de bactéries et une couche externe plus diffuse, colonisée par des bactéries. À l'inverse, dans l'intestin grêle, le mucus est plus mince et plus perméable [28].

Dans les MICI, cette organisation est altérée : les jonctions serrées se désorganisent, la production de mucus diminue ou devient anormale, et la perméabilité intestinale augmente, facilitant la translocation de micro-organismes et l'inflammation [28], [30].

Barrière microbienne

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble des micro-organismes présents dans le tube digestif, principalement au niveau du côlon. Il comprend bactéries, virus, champignons et archées et joue un rôle essentiel dans l'équilibre du système digestif et immunitaire [3]. En conditions normales, les interactions entre le microbiote, le mucus et l'épithélium sont finement régulées et permettent de maintenir un équilibre stable appelé homéostasie. Cet équilibre repose notamment sur une grande diversité microbienne et des relations bénéfiques entre l'hôte et son microbiote [28], [29], [30].

Dans le contexte des MICI, cet équilibre est perturbé. On observe un état de dysbiose, caractérisé par une perte de diversité ou un déséquilibre fonctionnel. En parallèle, l'inflammation altère la structure des autres composantes de la barrière : la production de mucus diminue et la barrière devient plus perméable. La Figure I-10 illustre ce contraste entre un état sain et un état inflammatoire [27], [28], [29], [30].

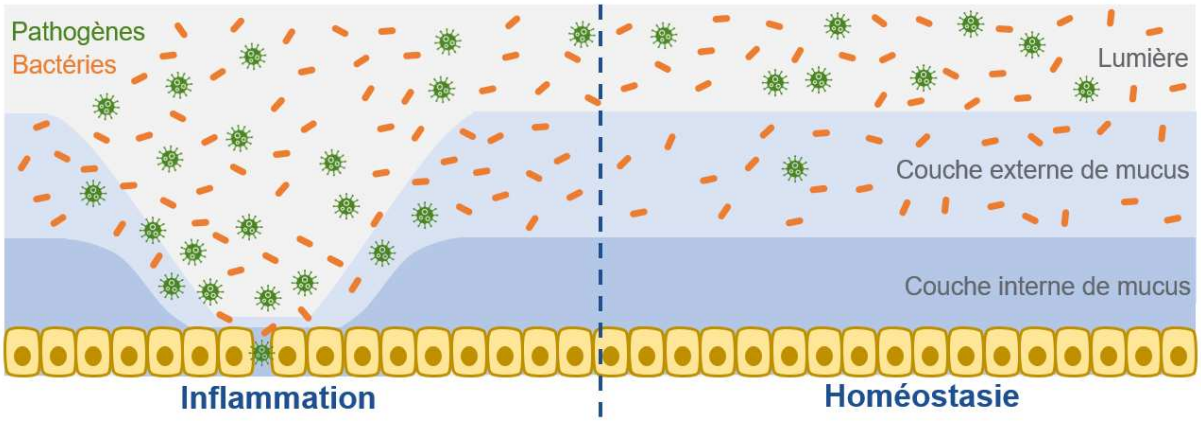


Figure I-10 : Organisation de la barrière intestinale en conditions homéostatiques et inflammatoires.

Ce schéma compare la barrière intestinale en situation homéostatique (à gauche) et lors d'une inflammation (à droite). En homéostasie, le mucus forme une double couche structurée qui limite le contact entre les bactéries et l'épithélium. En contexte inflammatoire, cette organisation est altérée : la production de mucus diminue, les jonctions serrées se désorganisent et la perméabilité de la barrière augmente, facilitant la pénétration de micro-organismes.

Barrière immunitaire

La barrière immunitaire constitue la dernière ligne de défense. Elle repose sur deux grands types de réponse : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

L'immunité innée agit rapidement grâce à des cellules sentinelles (cellules dendritiques, macrophages, cellules épithéliales ou cellules de Paneth) capables de détecter les agents infectieux via des récepteurs spécialisés. Ces cellules peuvent libérer des médiateurs inflammatoires et des peptides antimicrobiens pour contenir l'infection [31].

L'immunité adaptative est plus spécifique et mobilise les lymphocytes T et B, organisés dans des structures comme les plaques de Peyer. Les lymphocytes T régulateurs limitent les réactions excessives contre le microbiote, tandis que les lymphocytes B produisent des anticorps, qui neutralisent les agents pathogènes sans provoquer d'inflammation [32].

En cas de dérèglement de cette barrière, comme dans les MICI, le système immunitaire peut réagir de manière excessive à des composants normalement tolérés du microbiote, ce qui contribue à l'inflammation chronique et à l'altération de la barrière [33].

I.3 - MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDES DES MICI

Les modèles expérimentaux jouent un rôle central dans l'étude des MICI. Ils permettent de reproduire en laboratoire certains aspects de la physiopathologie observée chez l'humain, d'explorer les mécanismes impliqués et de tester des stratégies thérapeutiques. Cette section présente les principales approches utilisées en recherche : les cultures cellulaires en deux dimensions, les modèles animaux et des modèles innovants, plus récents.

I.3.A - CULTURES 2D

Les modèles cellulaires en deux dimensions (2D) sont des systèmes in vitro, c'est-à-dire réalisés en dehors d'un organisme vivant, dans un environnement artificiel contrôlé. Ils sont largement utilisés pour étudier les MICI. Ces modèles reposent sur la culture de cellules en monocouche sur un support plat.

Ces systèmes offrent des conditions standardisées, une mise en œuvre simple, un faible coût et une bonne reproductibilité, ce qui en fait une plateforme de criblage couramment utilisée. Cependant, leur architecture simplifiée présente des limites importantes. Le modèle repose généralement sur une lignée cellulaire unique, cultivée sans organisation tridimensionnelle, sans interactions mécaniques, immunitaires ou microbiennes. Par conséquent, ces systèmes ne permettent pas de reproduire complètement l'environnement physiologique de l'intestin humain. Leur utilisation se limite donc à l'étude de fonctions isolées ou à des essais pharmacologiques préliminaires, avant validation sur des modèles plus complexes [34].

Systèmes de cultures standards

Dans les cultures 2D, les cellules sont généralement cultivées en monocouche sur des plaques multi-puits, dont le fond est constitué de polystyrène (PS) traité. Ce polymère, chimiquement stable, transparent et compatible avec l'imagerie optique, est modifié pour favoriser l'adhésion cellulaire. Ce support est privilégié pour sa facilité d'utilisation, sa compatibilité avec l'imagerie et son adaptabilité aux criblages à haut débit [35].

Toutefois, la culture sur surface plane ne permet pas aux cellules d'adopter une polarité fonctionnelle ni de reproduire les échanges directionnels caractéristiques de l'épithélium intestinal. Pour surmonter cette limitation, des dispositifs compartimentés comme les inserts Transwell® (Corning Inc., États-Unis) ont été développés. Illustré en Figure I-11, il consiste en une membrane microporeuse, généralement en polycarbonate (PC) ou en polyéthylène téréphtalate (PET), inséré dans un support en polystyrène (PS). Cette membrane sépare deux compartiments distincts, l'un apical, représentant la lumière intestinale, et l'autre basolatéral, correspondant au compartiment tissulaire sous-jacent. Les pores de la membrane permettent le

passage de molécules solubles, tout en maintenant les cellules épithéliales strictement au niveau de la surface apicale [35].

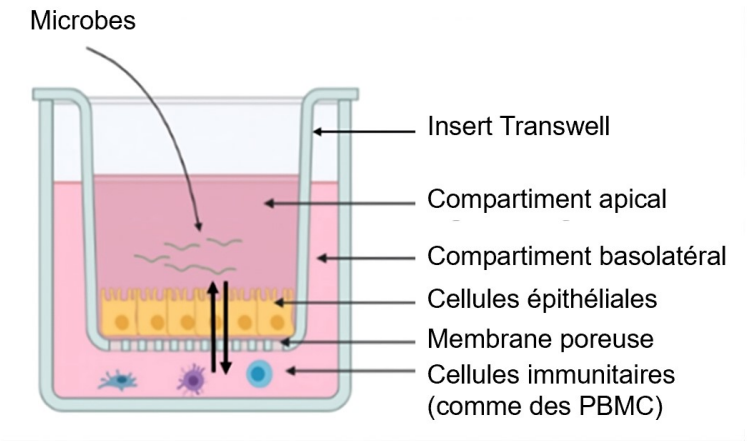


Figure I-11 : Schéma d'un insert Transwell® utilisé pour la culture cellulaire [35]. Traduit.

Lignées épithéliales standards

Les lignées épithéliales sont les modèles cellulaires les plus fréquemment utilisés dans les systèmes 2D pour reproduire la barrière intestinale. Issues majoritairement de tumeurs colorectales humaines, elles présentent l'avantage d'une croissance stable, d'une manipulation aisée et d'une bonne reproductibilité expérimentale [36], [37], [38], [39].

Parmi ces modèles, la lignée Caco-2 est bien établie. Dérivée d'un adénocarcinome colique humain, elle acquiert spontanément des caractéristiques d'entérocytes différenciés après environ 21 jours de culture post-confluence. Cette différenciation s'accompagne de la mise en place d'un épithélium polarisé présentant des jonctions serrées, des microvillosités, des enzymes digestives, ainsi que des transporteurs membranaires caractéristiques de l'intestin grêle [36], [37]. Ces propriétés lui confèrent le rôle de barrière physique sélective, intéressante pour explorer la diffusion de nutriments ou de candidats-médicaments [36]. Malgré ses avantages, la lignée Caco-2 présente des limites notables : elle ne produit pas de mucus, ce qui empêche de reproduire fidèlement la couche muqueuse protectrice de l'intestin. De plus, son origine cancéreuse induit une prolifération continue et une certaine dérégulation de la signalisation cellulaire, ce qui peut altérer la réponse physiopathologique aux stimuli inflammatoires ou microbiens [37]. Malgré ces limites, Caco-2 demeure le modèle in vitro de référence [36], [37].

La lignée cellulaire HT29, également issue d'un adénocarcinome colorectal humain, reste faiblement différenciée en conditions de culture standard. Une exposition prolongée au méthotrexate (MTX) permet d'isoler le sous-clone HT29-MTX, dont la différenciation se stabilise en phénotype caliciforme. Ces cellules sécrètent en continu une couche de mucus

homogène, riche en mucines, notamment MUC2 et MUC5AC, tout en conservant une organisation épithéliale polarisée, avec jonctions serrées fonctionnelles et un bord apical à microvillosités [38], [39]. Grâce à la combinaison d'un épithélium différencié et d'une couche de mucus stable, le modèle HT29-MTX permet d'étudier de manière intégrée la perméabilité intestinale ainsi que les interactions entre le mucus et des agents pathogènes ou pro-inflammatoires [40].

D'autres lignées sont parfois employées. Les cellules HIEC, d'origine intestinale fœtale humaine, se rapprochent du tissu sain mais restent instables et dépourvues de jonctions serrées [41]. Les cellules IEC-18, isolées de cryptes iléales de rat, présentent une différenciation partielle et sont utilisées pour l'étude du transport paracellulaire de composés hydrophiles [42].

Cocultures

Les modèles de coculture sont développés afin de pallier les limites des monocultures en intégrant des interactions intercellulaires essentielles dans la physiopathologie des MICI telles que celles entre les cellules épithéliales, immunitaires, stromales ou microbiennes.

Parmi les associations les plus répandues, le modèle Caco-2 : HT29-MTX permet de reconstituer simultanément une couche épithéliale polarisée et une production stable de mucus, deux composantes clés de la barrière intestinale [43]. Le ratio entre les deux lignées influence fortement les propriétés globales du modèle. Une proportion de 90 : 10 (Caco-2 : HT29-MTX) est souvent considérée comme optimale, permettant de maintenir à la fois une intégrité épithéliale satisfaisante et une production stable de mucus [44].

L'inflammation chronique étant une caractéristique centrale des MICI, plusieurs modèles de coculture ont été développés pour intégrer des cellules immunitaires et étudier leur interaction avec l'épithélium intestinal. Les cocultures avec des cellules immunitaires telles que des macrophages, des monocytes THP-1 ou des cellules dendritiques sont utilisées pour mesurer la production de cytokines pro-inflammatoires et les variations de perméabilité épithéliale [45], [46]. Elles offrent ainsi un cadre pertinent pour modéliser in vitro la dynamique des réponses immunitaires locales dans les MICI [47].

L'intégration de fibroblastes humains améliore la différenciation et la polarisation épithéliales et participe au remodelage tissulaire observé dans les MICI [48], [49]. L'association avec des cellules endothéliales humaines de type HUVEC permet de reproduire l'interface épithélio-endothéliale et d'étudier le transport bidirectionnel de molécules ou la toxicité vasculaire, sous réserve de conditions de culture adaptées [50].

Les MICI étant associées à une dysbiose, plusieurs modèles in vitro ont été développés pour étudier les interactions entre cellules intestinales humaines et bactéries vivantes. Ces cocultures permettent d'explorer l'impact de souches commensales ou pathogènes sur la

perméabilité épithéliale, la production de mucus ou la réponse immunitaire, dans des conditions contrôlées. Leur mise en œuvre reste cependant limitée par les contraintes liées à la cohabitation entre cellules épithéliales aérobies et bactéries majoritairement anaérobies [51], [52], [53].

Enfin, certaines configurations multicellulaires intègrent trois types cellulaires ou davantage, afin de recréer une organisation fonctionnelle proche du tissu intestinal. Ces systèmes, bien que techniquement exigeants, constituent une approche pertinente pour l'étude des MICI [54], [55], [56].

Lignées dérivées de tissus primaires

En raison de leur origine tumorale ou immortalisée, les lignées cellulaires standards reproduisent imparfaitement le tissu sain. Pour mieux représenter la physiopathologie des MICI, des modèles issus de biopsies intestinales humaines sont développés. Ces cellules primaires offrent une fidélité physiologique accrue et permettent de prendre en compte la variabilité interindividuelle, notamment pour comparer tissus sains et inflammés chez un même patient. Bien qu'elles soient prometteuses pour des approches personnalisées, leur utilisation reste limitée par des contraintes techniques : obtention difficile, culture délicate, courte durée de vie et forte variabilité [49], [57].

I.3.B - Modeles animaux

Malgré les avancées des modèles cellulaires 2D, leur nature simplifiée limite la compréhension globale des mécanismes impliqués dans les MICI. Au contraire, les modèles animaux en permettent une approche globale de la maladie. Cette section présente leur intérêt, les principaux types utilisés ainsi que les limites associées à leur usage.

Intérêts

L'étude des MICI exige des modèles capables de reproduire la barrière intestinale et les multiples interactions qui la régulent. Dans ce contexte, les modèles animaux in vivo, c'est-à-dire développés dans un organisme vivant, sont un standard. Ils permettent d'observer l'inflammation dans un organisme fonctionnel, d'en suivre l'évolution temporelle et de mesurer ses répercussions extra-intestinales dans un contexte physiologique complet [58]. Grâce à des protocoles adaptés, il est possible de reproduire les formes chroniques et les rechutes caractéristiques observées chez les patients [58], [59]. Ces modèles offrent aussi un moyen d'étudier les effets délétères de facteurs environnementaux, notamment d'une alimentation riche en lipides, en sucres ou en émulsifiants [60], [61].

Par ailleurs, la validation d'un candidat-médicament passe par l'expérimentation animale avant toute administration chez l'humain [59]. L'encadrement réglementaire reflète

cette nécessité : avant un essai clinique de phase I, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) requiert un dossier incluant des études sur une ou deux espèces animales, conformément à la directive européenne 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques [62].

Modèles expérimentaux

Les rongeurs, en particulier la souris mais aussi le rat, constituent les espèces privilégiées pour la modélisation des MICI. Le coût modéré d'élevage, la disponibilité d'outils génétiques sophistiqués et la standardisation des protocoles d'induction de colite en font un système expérimental hautement reproductible. Trois familles de protocoles, l'induction chimique, la manipulation immunitaire et la modification génétique, sont classiquement utilisées :

- Les modèles par induction chimique, largement utilisés pour leur simplicité et leur reproductibilité, reposent sur l'administration de sulfate de dextran sodique (DSS) dans l'eau de boisson, induisant une colite aiguë ou chronique selon la dose et la durée, et mimant certains aspects de la colite ulcéreuse [63], [64]. Une autre technique est l'administration rectale de trinitrobenzène sulfonique (TNBS), provoquant une inflammation transmurale proche de la MC [65], [66]. Les lésions obtenues sont comparables à celles observées chez l'humain [67].

- Les modèles immunitaires reposent sur le transfert de cellules immunitaires pathogènes. L'injection de lymphocytes T $CD4^+$ naïfs dans des souris immunodéficientes induit une colite progressive et permet d'analyser les mécanismes de dérégulation de la réponse immunitaire [68], [69], [70].

- Les modèles génétiques reposent sur des altérations ciblées de gènes impliqués dans le contrôle immunitaire ou la barrière intestinale. Par exemple, la souris IL-$10^{-/-}$, déficiente en interleukine-10, développe spontanément une colite chronique en conditions non stériles, mais nécessite une maintenance coûteuse et rigoureuse [71], [72].

Autres modèles animaux

Bien que la souris constitue le modèle de référence, d'autres espèces sont utilisées pour des besoins spécifiques [58]. Le porc, dont la physiologie digestive est proche de celle de l'humain, sert à l'évaluation de dispositifs endoscopiques et d'interventions nutritionnelles [73], [74]. Le chien peut présenter des colites spontanées analogues à celles observées chez l'homme, mais son emploi reste limité par le coût et les contraintes éthiques [75], [76]. Le lapin, historiquement employé, est aujourd'hui abandonné en raison de son régime strictement herbivore et de divergences anatomiques réduisant la transposabilité des résultats. Des modèles

non mammifères sont également mobilisés : le zebrafish, dont la transparence facilite le criblage génétique des voies inflammatoires [77], et la drosophile, utilisée comme modèle économique pour l'étude des mécanismes immunologiques et nutritionnels [78], [79]. Le choix de l'espèce relève ainsi d'un compromis entre proximité physiologique avec l'humain, faisabilité technique et contraintes éthiques, chaque modèle répondant à des questions que la souris ne couvre pas nécessairement.

Critères d'évaluation

L'activité de la colite expérimentale est appréciée par une combinaison de données cliniques, macroscopiques et histologiques. Chez la souris, le suivi in-vivo repose sur le Disease Activity Index (DAI), calculé à partir de la perte de poids, de l'aspect des selles et de la présence de sang, avec un score de 0 (absence d'atteinte) à 4 (colite sévère) [58]. Dans certains laboratoires, une endoscopie permet un suivi hebdomadaire des lésions [80]. Après euthanasie, les marqueurs macroscopiques incluent le raccourcissement du côlon, l'étendue des ulcérations et un score lésionnel global. L'analyse histologique repose sur l'évaluation de l'infiltration immunitaire, de la destruction épithéliale et de l'architecture cryptique. La somme des sous-scores fournit une mesure standardisée et comparable entre études [81].

Limites et considérations éthiques

L'utilisation de modèles animaux requiert des moyens logistiques et financiers importants. L'entretien de lignées génétiquement modifiées, telles que la souris IL-10$^{-/-}$, implique des installations stériles, un personnel qualifié et un suivi sanitaire strict [82]. À ces contraintes s'ajoute un surcoût notable : un test in-vivo revient en moyenne 1,5 à plus de 30 fois le prix d'une étude in-vitro [83]. Une étude toxicologique sur rongeurs peut prolonger le développement d'un candidat-médicament de quatre à cinq ans et majorer le budget de 2 à 4 millions de dollars [84].

Les divergences physiopathologiques entre les modèles animaux, notamment les rongeurs, et l'humain restent le principal obstacle à la transposabilité des données précliniques [85]. Dans les MICI, ces écarts concernent l'architecture tissulaire, les voies immunitaires et la composition du microbiote, tous sensiblement différents entre la souris et l'humain. Plusieurs composés prometteurs chez la souris se sont ainsi révélés inefficaces, voire toxiques, une fois testés en clinique [86], [87], [88]. La valeur prédictive positive des études animales n'excède pas 55 % [89], et près de 90 % des candidats validés chez l'animal échouent ensuite en essai clinique [90].

Enfin, des considérations éthiques majeures encadrent leur utilisation. En Europe, à la suite de la directive européenne 2010/63/UE, les travaux impliquant des animaux doivent répondre aux principes des 3R : Remplacer l'animal dès que possible, Réduire le nombre d'animaux utilisés et Raffiner les protocoles pour minimiser la douleur et le stress [62], [91].

Dans cette continuité, le Parlement Européen a adopté en 2021 la résolution 2021/2784(RSP), appelant à l'élaboration d'un plan d'action en faveur de l'élimination progressive de l'expérimentation animale [92]. Cette initiative vise à accélérer la transition vers des approches innovantes.

I.3.C - LES MODELES INNOVANTS

Les modèles expérimentaux classiques utilisés dans l'étude des MICI, comme les cultures 2D et les modèles animaux, souffrent de limites importantes en matière de représentativité physiologique, de pertinence clinique et de considérations éthiques. L'émergence de Nouvelles Approches Méthodologiques (NAMs) répond à ces limites en proposant des alternatives plus complexes, en s'appuyant sur des avancées biotechnologiques [93].

Cette section présente les principaux modèles innovants : sphéroïdes reproduisant en trois dimensions des interactions cellulaires simples, organoïdes dérivés de cellules souches imitant l'architecture intestinale, bio-impression 3D permettant une organisation spatiale contrôlée, modèles in silico simulant les dynamiques inflammatoires et organes-sur-puce intégrant des cellules humaines dans des dispositifs microfluidiques. Pour chacun, les principes, les apports aux MICI ainsi que les avantages et limites seront examinés.

Sphéroïdes

Les sphéroïdes intestinaux sont des structures tridimensionnelles obtenues par auto-agrégation de cellules en suspension dans des conditions de faible adhérence, le plus souvent à partir de lignées épithéliales comme Caco-2 ou HT29 [94], [95]. Cette organisation rétablit partiellement la polarité et les interactions intercellulaires, contrairement aux cultures bidimensionnelles. Dans le cadre des MICI, ils sont utilisés pour modéliser la fonction de barrière et tester des composés anti-inflammatoires [96], [97]. Ils présentent l'avantage d'une production simple, d'un coût réduit, d'une standardisation aisée et d'une compatibilité avec les criblages à haut débit. Leur principal inconvénient est d'être constitué d'un seul type cellulaire, sans cryptes ni villosités et dépourvus de microbiote, de cellules immunitaires et de stroma, ce qui limite leur pertinence pour l'étude des interactions complexes des MICI [98].

Organoïdes

Les organoïdes intestinaux sont des structures tridimensionnelles dérivées de cellules souches adultes ou pluripotentes, cultivées dans une matrice extracellulaire telle que le Matrigel et en présence de facteurs de croissance spécifiques. Ils reproduisent les principales propriétés de l'épithélium intestinal in vivo et sont utilisés dans les MICI pour l'étude de l'inflammation chronique [99] et de la perte d'intégrité de la barrière [100]. Ils conservent le profil génétique

du tissu d'origine, ce qui permet d'analyser les variations interindividuelles [101] et peuvent être modifiés génétiquement pour explorer l'impact de mutations associées aux MICI [102]. Compatibles avec des criblages pharmacologiques à haut débit [101], ils constituent une plateforme adaptée à l'évaluation personnalisée de la réponse aux traitements [103]. Cependant, leur culture reste techniquement exigeante et variable selon les conditions expérimentales [104]. Leur organisation fermée limite l'accès aux surfaces cellulaires et complique l'étude des interactions avec des bactéries, tandis que leur stabilité décroît au fil du temps, ce qui réduit leur pertinence pour des analyses prolongées ou des formes aiguës de la maladie [105].

Bio-impression 3D

La bio-impression 3D consiste à déposer successivement des bio-encres contenant des cellules vivantes afin de fabriquer des structures tissulaires. Dans le cadre des MICI, cette approche permet de reproduire des éléments architecturaux tels que villosités et cryptes [106] ou d'intégrer des bactéries commensales pour modéliser le microbiote [107]. Elle offre l'avantage de recréer avec précision l'architecture intestinale dans une organisation tridimensionnelle compatible avec des tests fonctionnels [108], [109]. Ses limites résident dans la complexité technique, la nécessité d'équipements spécialisés, la possible altération de la viabilité cellulaire liée au stress mécanique et le temps de maturation requis avant fonctionnalité complète [110], [111].

Modèles in-silico

Les modèles in-silico reposent sur des approches mathématiques ou informatiques permettant de simuler des processus biologiques. Dans les MICI, ils servent à analyser les mécanismes pathologiques [112], à optimiser le design de candidats-médicaments et à prédire efficacité ou toxicité de composés [113], [114]. Ils se distinguent par leur rapidité et leur faible coût, autorisant le test virtuel de milliers d'hypothèses ou de molécules [113]. Néanmoins, ces simulations reposent sur des hypothèses simplifiées et nécessitent une validation expérimentale par des approches in-vitro ou in-vivo [115].

Organes-sur-puce

Selon la définition de l'EUROoCS (European Organ-on-Chip Society), « un organe-sur-puce est un dispositif microfluidique, contenant des sous-structures vivantes d'organes intégrées dans un microenvironnement contrôlé. Ce système recrée un ou plusieurs aspects de la dynamique, de la fonctionnalité et de la réponse physiopathologique de l'organe in-vivo, sous surveillance en temps réel » [116]. Ces dispositifs ex-vivo simulent les fonctions spécifiques d'organes humains en intégrant des cellules vivantes dans des architectures tridimensionnelles.

Les organes-sur-puce permettent une reproduction fine du microenvironnement intestinal en intégrant des paramètres tels que l'irrigation de milieu de culture, les gradients chimiques et les contraintes mécaniques [117], [118], [119]. Grâce à ce contrôle, ils constituent

une plateforme adaptée au criblage pharmacologique [120], [121] et peuvent être personnalisés avec des cellules dérivées de patients, ouvrant la voie à des approches de médecine personnalisée [122]. Plusieurs limitations restreignent néanmoins leur adoption. La diversité des conceptions, matériaux et protocoles nuit à la reproductibilité et complique les comparaisons entre études [123]. Leur mise en œuvre requiert en outre des compétences en microfabrication, culture cellulaire avancée et ingénierie microfluidique, ce qui limite leur accessibilité aux laboratoires disposant d'équipements spécialisés [124].

Dans le cadre des MICI, les modèles d'intestin-sur-puce représentent une application spécifique [125], détaillée dans la section suivante.

I.4 - MICROFLUIDIQUE AU SERVICE DE L'INTESTIN-SUR-PUCE

L'intestin-sur-puce constitue une déclinaison spécifique des organes-sur-puce. Il associe culture cellulaire et technologie microfluidique afin de modéliser la barrière intestinale dans un environnement biomimétique contrôlé. Ces dispositifs associent un écoulement contrôlé, des contraintes mécaniques et une structuration tridimensionnelle pour reproduire des fonctions physiologiques telles que la perméabilité, le transport, l'interaction avec le microbiote et la réponse immunitaire locale. Dans le contexte des MICI, ils constituent un outil pertinent pour l'étude des perturbations de l'homéostasie intestinale.

I.4.A - ÉMERGENCE DES INTESTINS-SUR-PUCE

Origines des organes-sur-puce

La microfluidique émerge dans les années 1970, au croisement de plusieurs avancées scientifiques et technologiques. Quatre facteurs principaux en motivent le développement : le besoin de miniaturiser les dispositifs d'analyse, les progrès en chimie analytique et en biologie moléculaire, les enjeux liés à la bio-défense, ainsi que les innovations en microfabrication issues du domaine de la microélectronique [126]. Ces développements aboutissent aux premiers laboratoires-sur-puce, destinés à l'analyse de fluides biologiques. Progressivement, ces systèmes évoluent vers la reproduction de fonctions physiologiques humaines, donnant naissance au concept d'organe-sur-puce.

En 2010, l'équipe de D. Ingber à Harvard conçoit le premier poumon-sur-puce, simulant mouvements respiratoires et réponse tissulaire à des agents toxiques. Présenté à la Figure I-12, il constitue la première preuve de concept fonctionnelle d'un organe-sur-puce [127].

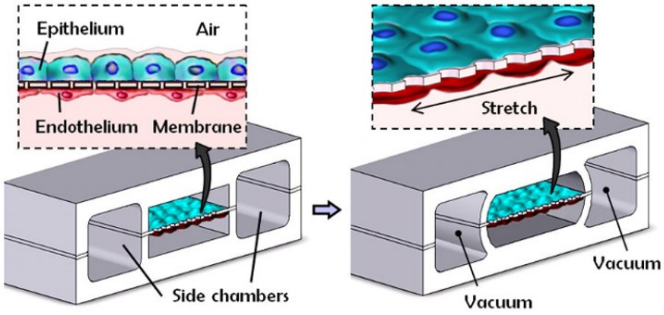


Figure I-12 : Schéma du poumon-sur-puce développé par Donald E. Ingber [127].

Par la suite, d'autres organes ont été modélisés selon le même principe, comme l'illustre la Figure I-13 [128], [129], [130] : barrière hémato-encéphalique [131], [132], cœur [133], [134], tubule rénal [135], [136] et foie [137], [138], [139]. Ces dispositifs convergent vers le concept de systèmes multi-organes interconnectés ou body-on-a-chip [140], [129], [141].

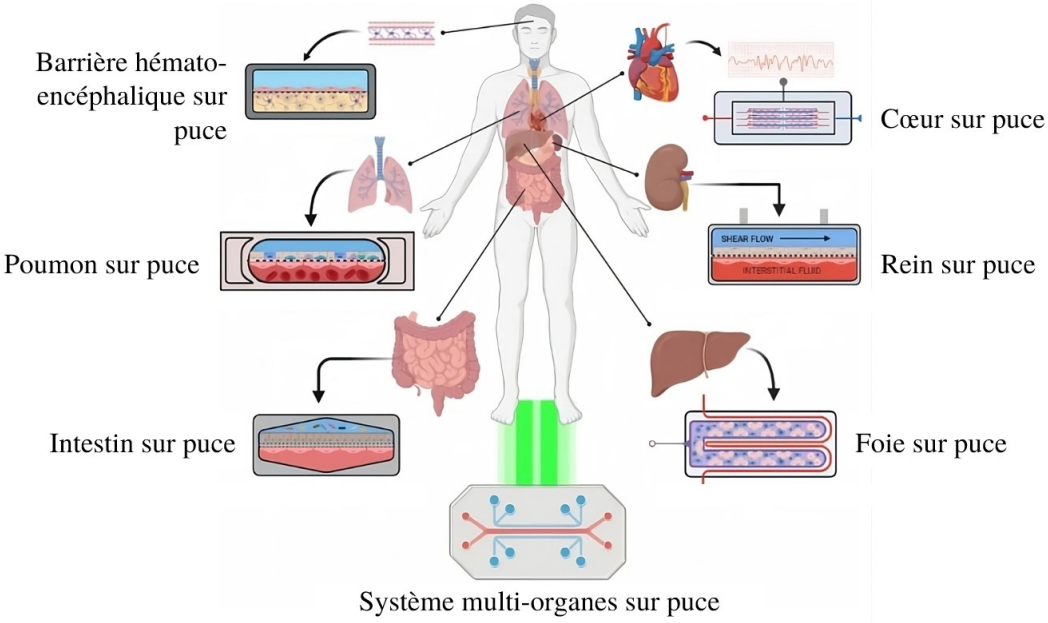


Figure I-13 : Représentation schématique des principaux organes-sur-puce [129]. Traduit.

Intérêt croissant de la recherche mondiale

Depuis 2010, l'intérêt pour ces technologies croît rapidement. Le nombre annuel de publications atteint près de 4000 en 2022, comme le montre la Figure I-14 [142]. Parmi les modèles développés, l'intestin-sur-puce figure parmi les plus étudiés. L'analyse géographique des publications, présentée en Figure I-15, confirme cet intérêt croissant, tout en révélant une forte concentration des efforts de recherche en Amérique du Nord, en Europe occidentale et en Asie de l'Est [143].

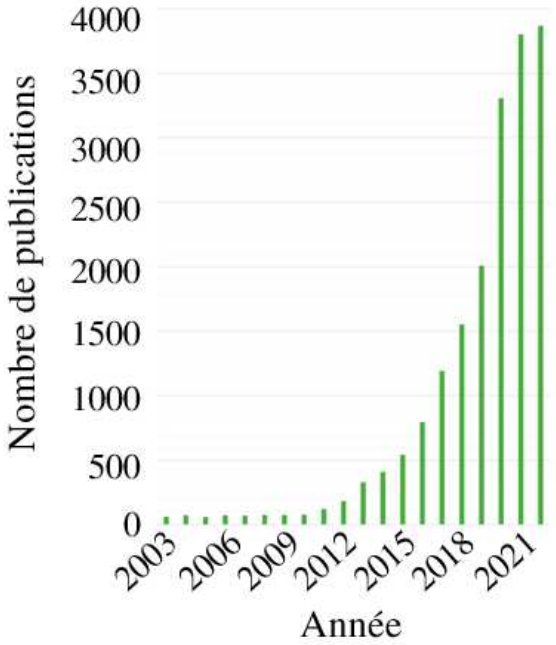


Figure I-14 : Évolution du nombre annuel de publications sur les organes-sur-puce entre 2003 et 2022 [146]. Traduit.

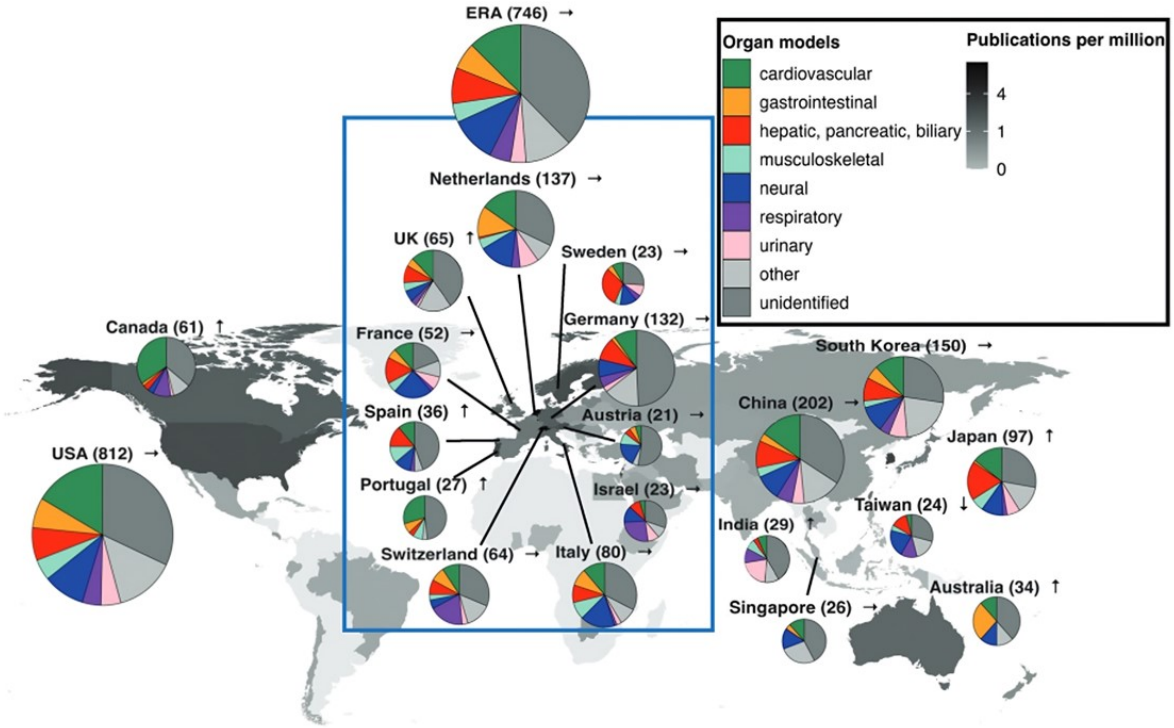


Figure I-15 : Répartition géographique et types d'organes modélisés dans les recherches sur les organes-sur-puce à l'échelle mondial [143].

Cette carte représente le nombre de publications sur les organes-sur-puce et la répartition des modèles d'organes étudiés (systèmes cardiovasculaire, gastro-intestinal, hépatique, musculosquelettique, neural, respiratoire, urinaire, autres ou non spécifiés). La couleur du fond de carte indique le nombre de publications par million d'habitants. On observe une forte activité de recherche aux États-Unis, en Chine et en Europe de l'Ouest.

Architecture standard à deux microcanaux séparés par une membrane

Les intestins-sur-puce reposent sur une ingénierie microfluidique sophistiquée visant à reproduire les caractéristiques clés de l'environnement intestinal humain. Les propriétés des fluides utilisés ainsi que les lois physiques régissant leurs écoulements sont rappelées en Annexe A.

L'architecture standard des intestins-sur-puce repose sur une modélisation structurale de la barrière intestinale. Comme illustré à la Figure I-16, cette architecture comprend deux microcanaux parallèles, superposés verticalement et séparés par une membrane poreuse [125]. Le canal apical représente la lumière intestinale, tandis que le canal basolatéral accueille d'autres types cellulaires tels que des cellules endothéliales, immunitaires ou des fibroblastes [144]. La puce microfluidique est généralement réalisée en polydiméthylsiloxane (PDMS). La membrane, présentant des pores de 0,4 à 10 µm, module le passage de cellules ou biomolécules [145]. Son épaisseur réduite, généralement inférieure à 10 µm, favorise les échanges diffusifs rapides entre les deux compartiments du dispositif [146]. Les matériaux les plus utilisés sont le polycarbonate (PC), le polyéthylène téréphtalate (PET) et le PDMS, dont les procédés de fabrication et les propriétés comparées sont détaillés en Annexe B.

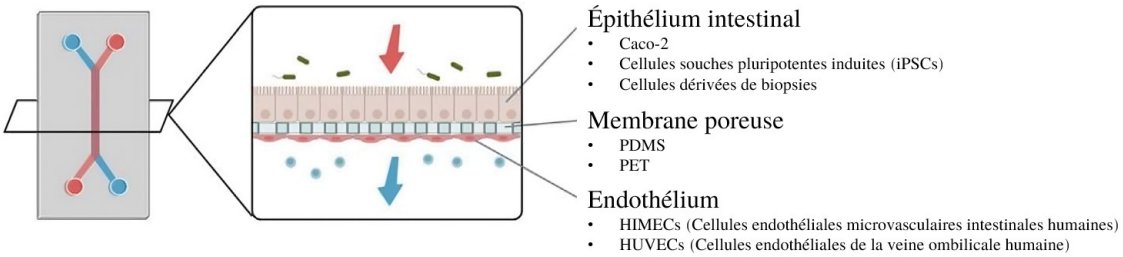


Figure I-16 : Architecture standard des intestins-sur-puce à deux canaux microfluidiques, séparés par une membrane poreuse [125]. Traduit.

I.4.B - REPRODUCTION DES FONCTIONS INTESTINALES CLES

Sur cette base architecturale, les intestins-sur-puce sont utilisés pour reproduire, dans un environnement contrôlé, les principales fonctions physiologiques de l'intestin humain : formation de villosités, établissement d'une barrière épithéliale sécrétrice de mucus, interaction avec le microbiote, reconstitution du tissu conjonctif et intégration de la réponse immunitaire locale.

I.4.B.a - Villosités intestinales et structuration tridimensionnelle

Comme illustré à la Figure I-17, certains dispositifs intègrent des structures tridimensionnelles dans le canal apical afin de reproduire la topographie villiforme de la muqueuse intestinale. Inspirés des villosités et cryptes de l'intestin grêle, ces reliefs visent à augmenter la surface fonctionnelle d'échange et à recréer un environnement morphologique plus proche des conditions in vivo [125].

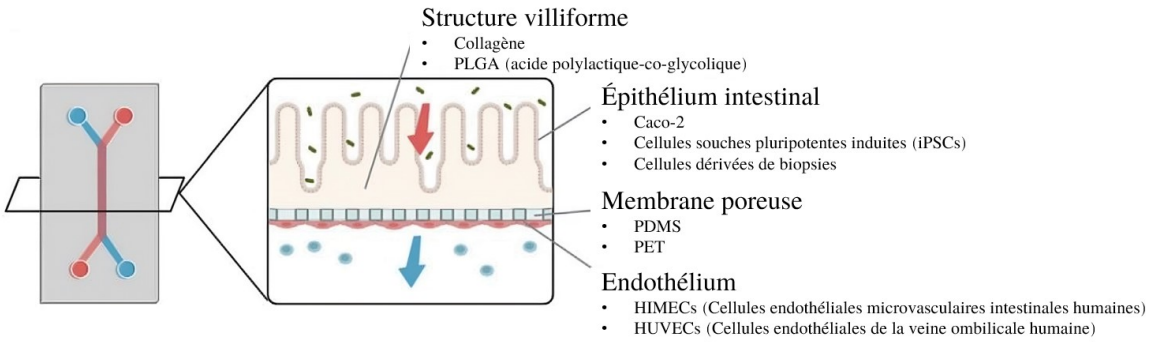


Figure I-17 : Architecture des intestins-sur-puce à deux canaux microfluidiques, séparés par une membrane poreuse, à structure villiforme [125]. Traduit.

Structuration tridimensionnelle

Les hydrogels structurés constituent une stratégie courante, combinant géométrie modulable et propriétés analogues à la matrice extracellulaire. Les hydrogels biologiques, tels que le collagène I, favorisent l'adhérence et la différenciation [147], mais leur faible résistance mécanique limite leur usage en conditions dynamiques prolongées [148]. Les hydrogels synthétiques offrent un meilleur contrôle et une reproductibilité accrue, au prix d'une bioactivité moindre [149], [150], [148]. La Figure I-18 illustre des structures villiformes photopolymérisées en PEGDA permettant la culture prolongée de cellules Caco-2 sur des micropiliers mimant la géométrie villositaire [106]. En conditions dynamiques, ces structures améliorent métabolisme et absorption, comme montré en Figure I-19 pour un hydrogel villiforme structuré sur membrane [151].

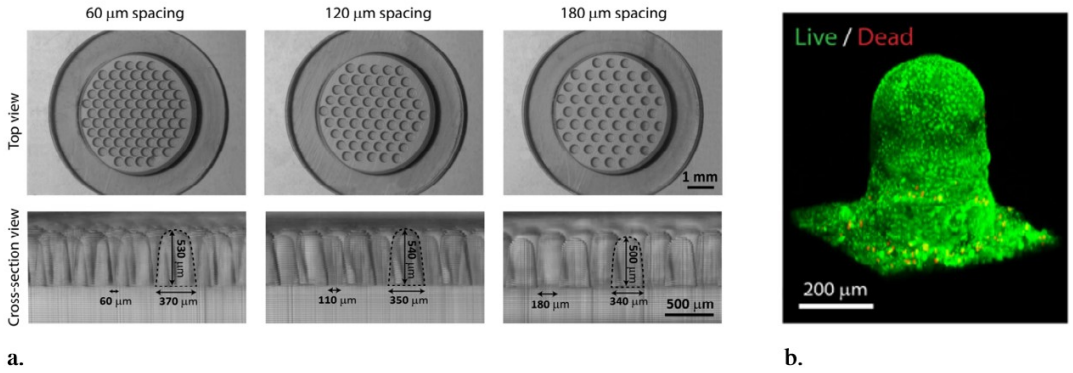


Figure I-18 : Microstructures villiformes en hydrogel synthéthique comme support de culture de cellules éptihéliales [106].

(a) Microscopie optique, vu de dessus (rangée supérieure) et en coupe transversale (rangée inférieure) de structures villiformes en poly(éthylène glycol) diacrylate (PEGDA), présentant des espacements inter-piliers de 60, 120 et 180 µm. (b) Représentation tridimensionnelle par microscopie d'un pilier recouvert par une monocouche de cellules Caco-2 après 21 jours de culture. La viabilité cellulaire est représentée en vert (calcein AM) pour les cellules vivantes et en rouge (iodure de propidium) pour les cellules mortes, montrant une colonisation uniforme de la surface.

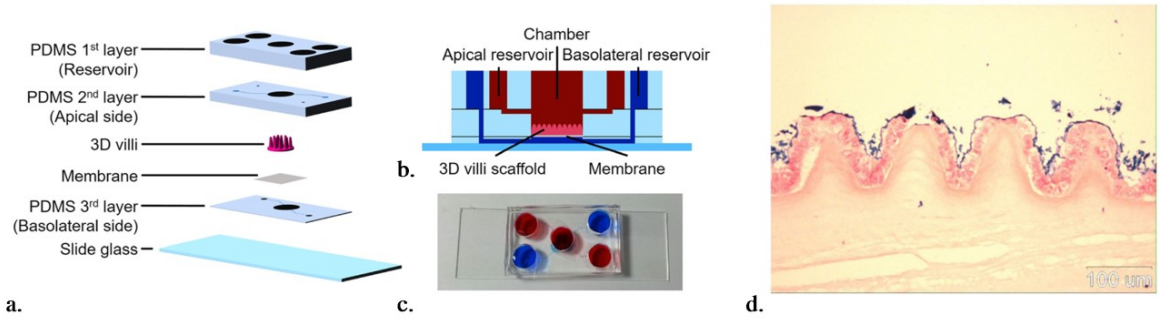


Figure I-19 : Intestin-sur-puce intégrant une structure villiforme en hydrogel sur sa membrane poreuse [151].

(a) Détail des couches constituant la puce microfluidique, comprenant une structure tridimensionnelle en hydrogel imitant les villosités intestinales, placée sur une membrane poreuse entre les compartiments apical et basolatéral. (b) Vue en coupe illustrant la disposition des chambres apicale et basolatérale de part et d'autre de la membrane, avec la structure villiforme au sein du canal supérieur. (c) Image réelle du dispositif microfluidique présentant deux jeux de réservoirs correspondant aux compartiments apical (rouge) et basolatéral (bleu). (d) Image en microscopie optique (coloration H&E) de cellules Caco-2 cultivées sur la structure villiforme, révélant une croissance cellulaire suivant le relief de l'hydrogel positionné sur la membrane.

Configurations géométriques

Les structures peuvent être :orientées verticalement, perpendiculaires à la membrane, ce qui favorise polarisation cellulaire et architecture biomimétique, mais rend la fabrication plus complexe [106], [151]. Les structures horizontales, plus faciles à produire, prennent souvent la forme d'ondulations parallèles au substrat et guident l'organisation cellulaire [149], [152]. La Figure I-20 illustre un canal central en hydrogel microstructuré horizontalement [149].

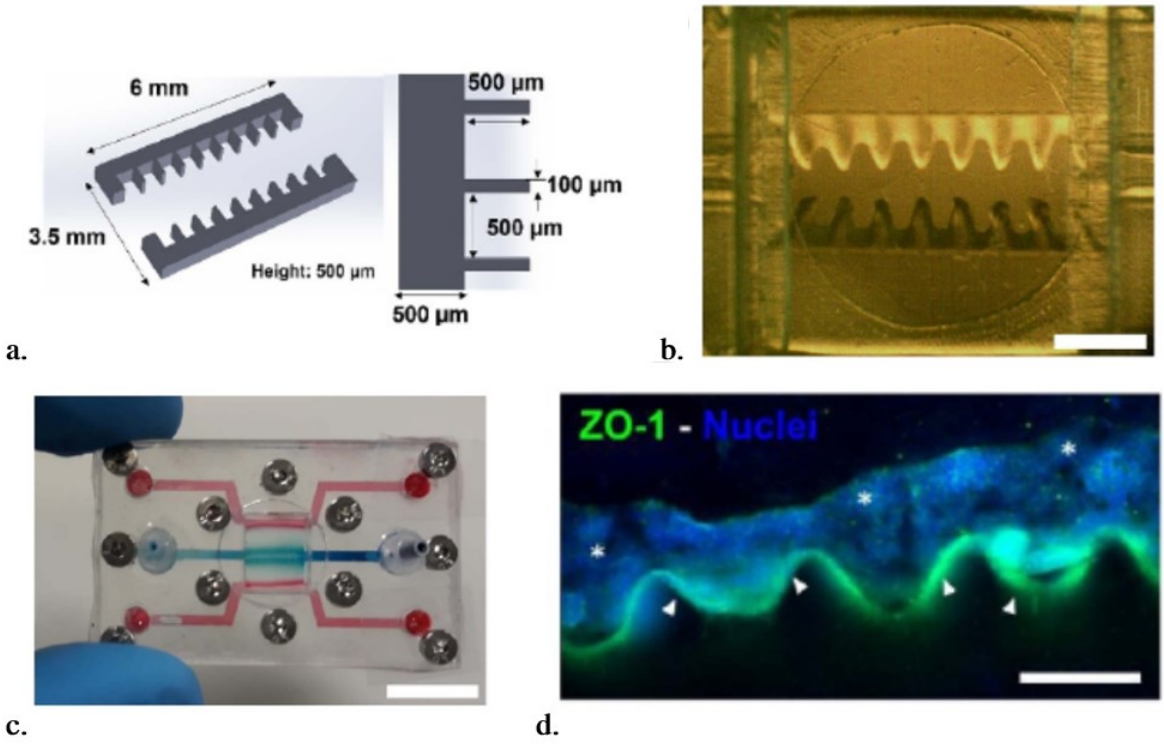


Figure I-20 : Intestin-sur-puce intégrant hydrogel villiforme parallèle au substrat [149].

(a) Modélisation du canal central imprimé en hydrogel, présentant des microstructures latérales reproduisant l'architecture des villosités intestinales (dimensions : 500 µm de hauteur, 100 µm d'espacement). (b) Microscopie optique du canal en hydrogel après impression, montrant les structures villiformes latérales (barre d'échelle : 2 mm). (c) Photographie du dispositif microfluidique final à trois canaux, avec le canal central structuré et perfusé (barre d'échelle : 10 mm). (d) Image de fluorescence montrant le marquage des jonctions serrées (ZO-1, vert) et des noyaux (DAPI, bleu) des cellules Caco-2 cultivées pendant 14 jours sur les parois microstructurées du canal en hydrogel (barre d'échelle : 500 µm). Les pointes de flèches indiquent la monocouche épithéliale sur les structures latérales, tandis que les astérisques (*) marquent la couche située dans le fond.

Modélisation épithéliale sans structuration tridimensionnelle

La présence de structures villiformes n'est pas indispensable. Une membrane plane permet aux Caco-2 de se polariser en 10 jours, avec formation de microvillosités et de jonctions serrées [153], [154]. Cette configuration simple est suffisante pour des études de perméabilité, de transport ou de toxicologie.

I.4.B.b - Intégrité de la barrière épithéliale

L'intestin assure une barrière étanche mais sélective entre la lumière et les tissus sous-jacents. Cette fonction repose sur une monocouche épithéliale dotée de jonctions serrées et sécrétant du mucus. Dans les intestins-sur-puce, sa reconstitution constitue un critère central de validation du modèle, dont l'évaluation repose sur des techniques détaillées en Annexe C.

Choix des lignées cellulaires

Les cellules Caco-2, largement utilisées, forment des jonctions serrées (ZO-1) et présentent une faible perméabilité paracellulaire, mais se différencient en entérocytes et ne produisent pas de mucus. À l'inverse, les cellules HT29-MTX conservent un phénotype caliciforme sécrétant des mucines (MUC2, MUC5AC), avec une cohésion plus faible. Des cocultures Caco-2 : HT29-MTX, au ratio 90:10, associent ces propriétés et offrent une résistance électrique transépithéliale élevée, reflétant plus fidèlement la physiologie de la barrière, comme illustré en Figure I-21 [43], [155], [156].

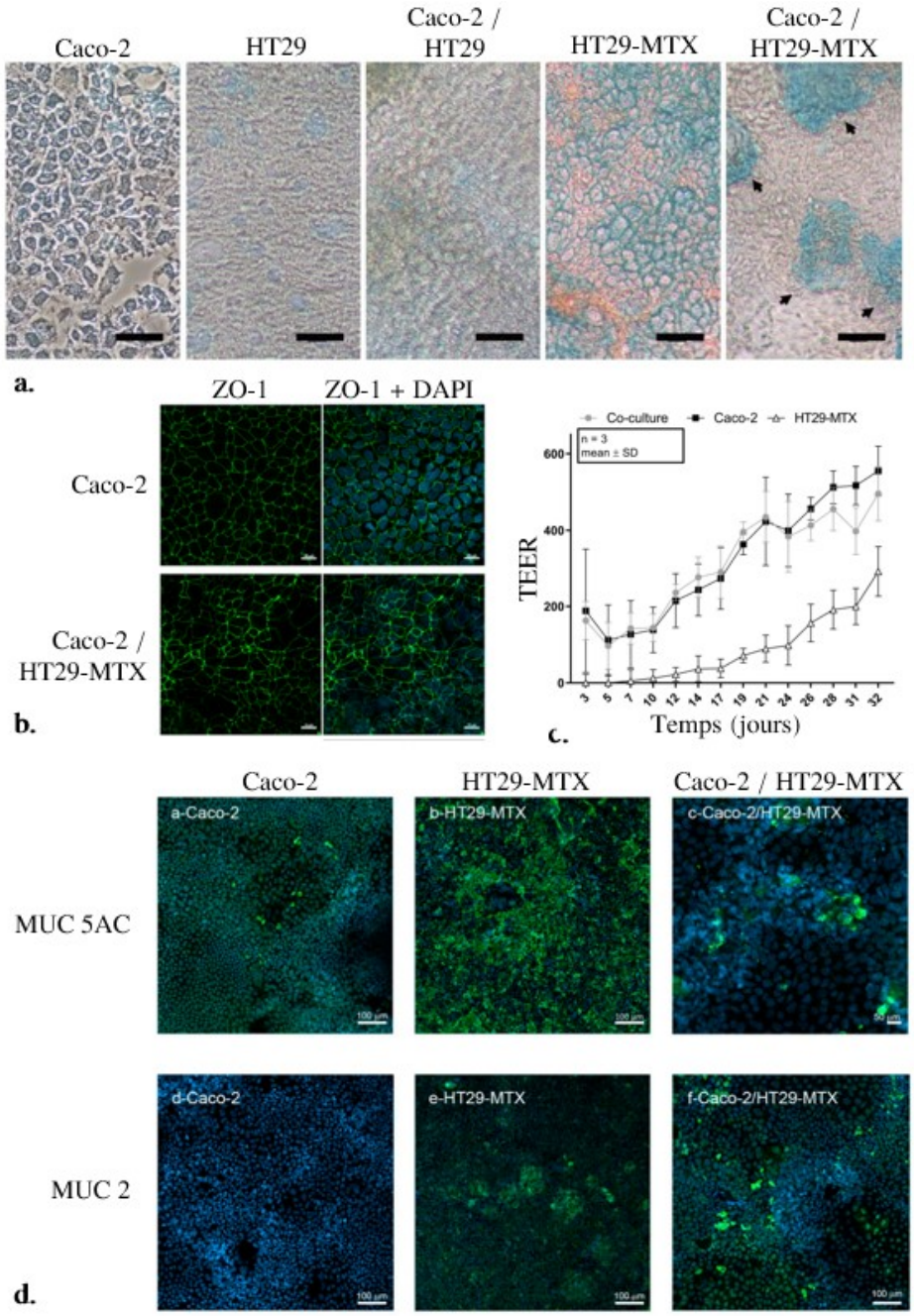


Figure I-21 : Comparaison des capacités de formation de jonctions serrées et de sécrétion de mucus entre lignées Caco-2, HT29-MTX et leur coculture au ratio 90:10 [43], [155], [156].

(a) Microscopie optique après coloration au bleu d'Alcian de cultures de Caco-2, HT29, HT29-MTX, et de cocultures Caco-2 : HT29 et Caco-2 : HT29-MTX (ratio 90:10), mettant en évidence la production de mucus (en bleu, flèches) [155]. (b) Marquage en immunofluorescence de la protéine de jonction serrée ZO-1 (vert) et contre-coloration nucléaire au DAPI (bleu), montrant une cohésion cellulaire plus marquée chez les Caco-2 et les cocultures. (c) Évolution de la résistance électrique transépithéliale (TEER) sur 32 jours, comparant les cultures de Caco-2, HT29-MTX et leur coculture (ratio 90:10) [43]. (d) Marquage des mucines MUC5AC (en vert, en haut) et MUC2 (en vert, en bas), indiquant une forte production de mucus chez les HT29-MTX et une sécrétion intermédiaire dans la coculture avec Caco-2 [156].

Conditions dynamiques

L'environnement mécanique de l'intestin joue un rôle central dans la régulation des fonctions de l'épithélium, notamment par la contrainte de cisaillement générée par le flux luminal. In vivo, cette contrainte est estimée entre 0,002 et 3 dyn·cm^{-2} [157], [153], [158], avec un consensus à 0,02 dyn·cm^{-2} [159], [160] dans des conditions physiologiques de base. Ces valeurs varient selon l'état physiologique, augmentant en phase postprandiale en réponse à l'élévation du débit intestinal. À titre de comparaison, d'autres systèmes biologiques, comme le système vasculaire, sont soumis à des contraintes de cisaillement beaucoup plus élevées : les cellules endothéliales vasculaires subissent des contraintes de l'ordre de 10 à 20 dyn. cm^{-2} dans les artères, et de 1 à 2 dyn·cm^{-2} dans les veines [161]. Dans les intestins-sur-puce, cette stimulation est reproduite par des flux laminaires et des mouvements péristaltiques.

Contrainte de cisaillement due à un écoulement laminaire

Dans un intestin-sur-puce, le canal microfluidique qui accueille l'épithélium est irrigué par un écoulement laminaire de milieu de culture : les cellules épithéliales subissent ainsi une contrainte de cisaillement pariétale, notée τ_w. Dans le cas d'un canal rectangulaire, de hauteur h et de largeur w, la valeur du débit volumique Q de milieu de culture peut être calculée en fonction de τ_w, comme à l'Équation I-1 [160].

$$Q = \frac{\tau_w h^2 w}{6\eta}$$

Équation I-1 : Débit volumique à appliquer en fonction de la contrainte de cisaillement pariétale désirée dans un canal microfluidique rectangulaire [160].

Avec :

Q	le débit volumique de milieu de culture à appliquer, en [$m^3.s^{-1}$]
τ_w	la contrainte de cisaillement pariétale, en [Pa]
h	la hauteur du canal microfluidique rectangulaire, en [m]
w	la largeur du canal microfluidique rectangulaire, en [m], tel que $h \ll w$
η	la viscosité dynamique, en [Pa. s]

Par exemple, un canal de 1 mm de large et 200 µm de haut parcouru par un débit de 60 µL.h^{-1} génère un cisaillement d'environ 0,02 dyn·cm^{-2}, ce qui correspond aux conditions physiologiques intestinales. Ainsi, il est possible de reproduire de manière contrôlée les contraintes de cisaillement observées in vivo par modulation du débit [160].

L'application d'un cisaillement modéré améliore nettement la physiologie épithéliale, comme illustré en Figure I-22. Par rapport aux cultures statiques, les cellules exposées à un flux laminaire présentent une polarisation apico-basale renforcée, une organisation structurée des noyaux, une redistribution des jonctions serrées et une orientation fonctionnelle des

membranes. Cette polarisation s'accompagne d'une sécrétion accrue de mucus, d'un allongement des microvillosités et d'une régulation des transporteurs membranaires, traduisant une différenciation fonctionnelle avancée [162], [153], [160].

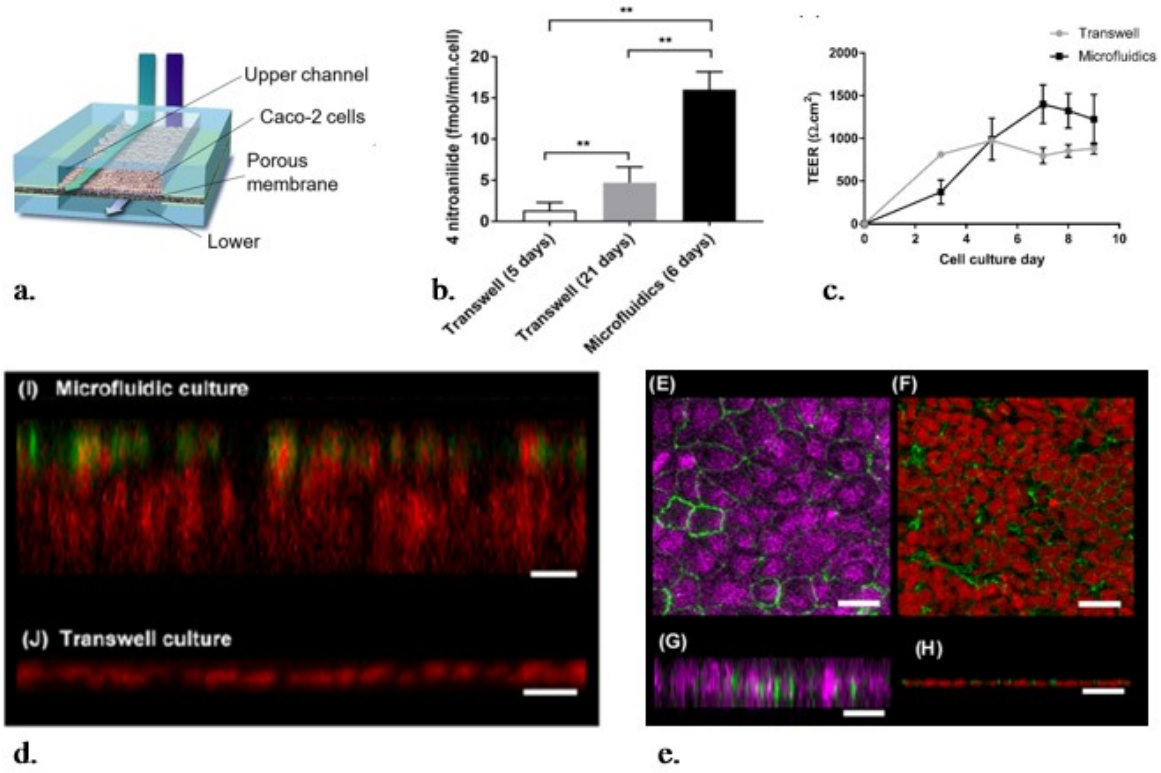


Figure I-22 : Influence des conditions dynamiques (écoulement laminaire) sur les propriétés de barrière et la différenciation des cellules Caco-2 dans un intestin-sur-puce [153].

(a) Schéma du dispositif microfluidique à double canal séparé par une membrane poreuse, permettant la culture de cellules Caco-2 exposées à un flux de milieu. (b) Activité enzymatique mesurée après culture dans une puce microfluidique ou sur insert Transwell® : les résultats indiquent une différenciation plus rapide et fonctionnelle dans la condition dynamique. (c) Évolution de la résistance électrique transépithéliale (TEER), montrant une formation plus rapide et plus intègre de la barrière épithéliale sous flux. (d) Coloration immunofluorescente du mucus (MUC2, vert) et des noyaux (rouge), révélant une polarisation cellulaire accrue et la formation de structures évoquant des villosités en condition dynamique, absentes en Transwell®. (e) Marquages des jonctions serrées (ZO-1, vert) et des noyaux (magenta ou rouge selon condition), mettant en évidence une meilleure intégrité de la barrière en présence de flux.

La géométrie du canal modifie la distribution du cisaillement : une membrane microporeuse perturbe les lignes de courant et peut générer un cisaillement jusqu'à 15 fois supérieur à celui d'une surface plane [163].

Contrainte de cisaillement due à un péristaltisme hydraulique

Dans l'intestin, les contractions péristaltiques génèrent des variations rythmiques de pression et de débit du contenu luminal, entraînant un cisaillement mécanique cyclique à la

surface de l'épithélium. Reproduire ces fluctuations dans un système microfluidique modélise fidèlement l'environnement intestinal in vitro.

Un débit oscillant permet d'appliquer ce type de contrainte. Ce flux non stationnaire génère une contrainte pariétale $\tau_w(t)$ variable dans le temps, dont la fréquence est généralement comprise entre 0,1 et 1 Hz. Bien que la valeur moyenne du cisaillement reste comparable à celle d'un flux continu, soit environ 0,02 dyn·cm^{-2}, les variations temporelles introduisent une composante dynamique qui modifie la stimulation mécanique perçue par les cellules : elles favorisent l'organisation des jonctions serrées, la polarisation des cellules, la production de mucus, et l'acquisition d'un épithélium fonctionnel et différencié [160], [154].

Deux stratégies sont couramment utilisées pour appliquer un débit oscillant dans les intestins-sur-puce. La première repose sur une pompe péristaltique externe assurant le renouvellement contrôlé du milieu à travers le canal cellulaire, comme illustré en Figure I-23.a [160]. La seconde intègre une micropompe directement dans la puce, comme le montre la Figure I-23.b [154].

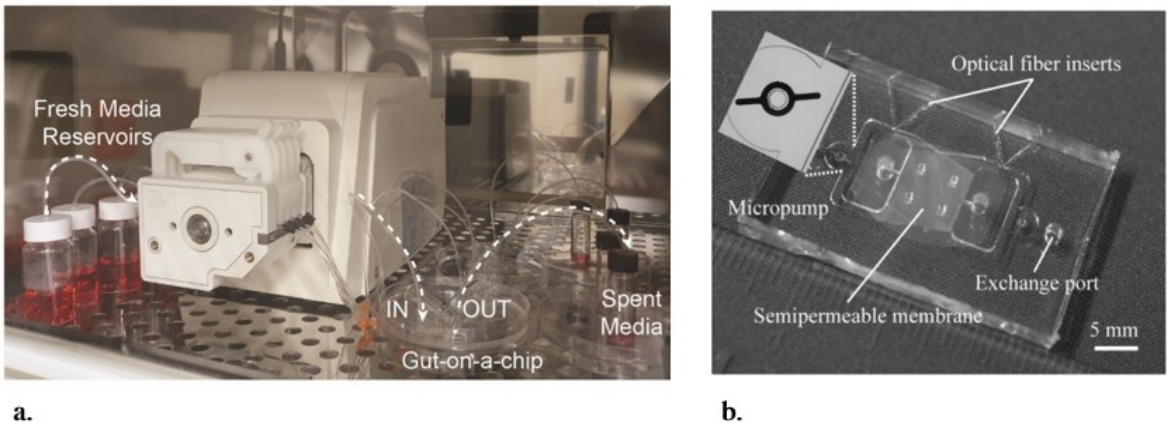


Figure I-23 : Systèmes permettant l'application d'un péristaltisme hydraulique dans un intestin-sur-puce [154], [160].

(a) Dispositif intestin-sur-puce couplé à une pompe péristaltique externe. Le circuit fermé inclut un réservoir de milieu frais, une puce microfluidique à un canal rectangulaire simple, dans lequel les cellules sont cultivées, et un collecteur de milieu usé. Ce montage permet d'imposer un écoulement oscillant via une modulation du débit, afin de reproduire les variations de cisaillement induites par le péristaltisme intestinal. (b) Exemple de puce microfluidique avec micropompe embarqué. La cellule de culture est séparée en deux compartiments (apical / basolatéral) par une membrane semi-perméable sur laquelle les cellules épithéliales sont cultivées. L'intégration de la pompe permet une perfusion dynamique maîtrisée sans dispositif externe.

Contrainte de cisaillement due à un péristaltisme mécanique

Certains intestins-sur-puce reproduisent le péristaltisme grâce à des membranes flexibles, sur lesquelles sont cultivées des cellules épithéliales intestinales, mises en mouvement par aspiration pneumatique, comme illustré en Figure I-25 [164], [165], [166]. L'aspiration

cyclique modifie ainsi la géométrie du canal à chaque cycle, reproduisant un étirement uniaxial de 10 %, à une fréquence de 0,15 Hz [164], [165]. Combinée au flux laminaire, cette stimulation mécanique triple la contrainte de cisaillement pariétale [165] et induit prolifération, polarisation, expression accrue des jonctions serrées, faible perméabilité et formation de villosités tridimensionnelles, aboutissant à une barrière fonctionnelle, comme le montre la Figure I-24 [167].

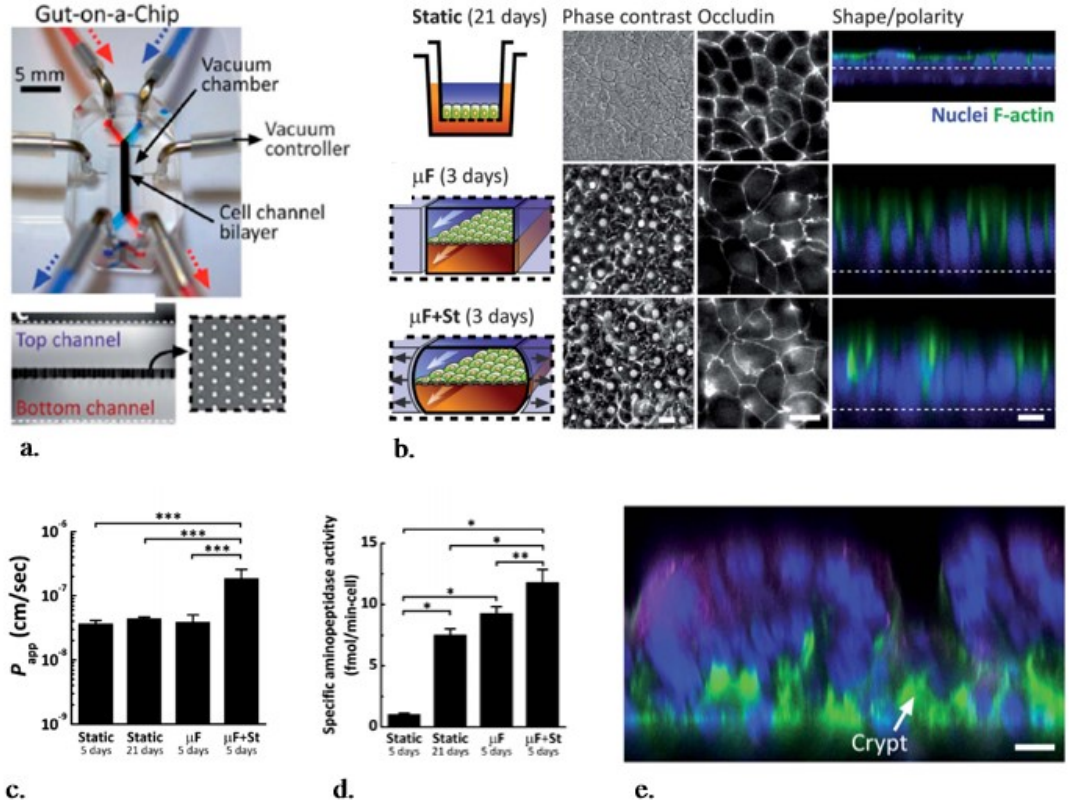


Figure I-24 : Effet combiné du flux laminaire et du péristaltisme mécanique sur la différenciation et la fonction de barrière d'un épithélium intestinal dans un intestin-sur-puce [164].

(a) Images macroscopique et microscopique de l'intestin-sur-puce en PDMS, composé de deux microcanaux séparés par une membrane microporeuse (pores de 10 µm espacés de 25 µm). Des chambres latérales sous vide permettent l'application d'un étirement mécanique cyclique simulant le péristaltisme intestinal. (b) Comparaison des conditions statiques (Transwell®, 21 jours), sous flux seul (µF, 3 jours) ou avec flux et étirement (µF+St, 3 jours). Les images montrent : de gauche à droite : un schéma des conditions de culture, une observation en microscopie à contraste de phase, un marquage de l'occludine marquant les jonctions serrées (en blanc) puis des coupes confocales verticales montrant la polarisation cellulaire (noyaux en bleu, cytosquelette en vert). (c) Quantification de la perméabilité paracellulaire en fonction des conditions de culture : l'ajout du flux et de l'étirement réduit significativement la perméabilité, traduisant une barrière plus hermétique (ANOVA, *** $p < 0,001$). (d) Mesure de l'activité enzymatique, indicateur de différenciation fonctionnelle. L'activité enzymatique est significativement plus élevée après culture sous µF+St, comparée aux autres conditions (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). (e) Image confocale en coupe verticale montrant la formation spontanée de structures villosités avec cryptes dans la condition µF+St, avec une polarisation marquée (F-actine pour le cytosquelette en vert, noyaux en bleu, mucine en magenta).

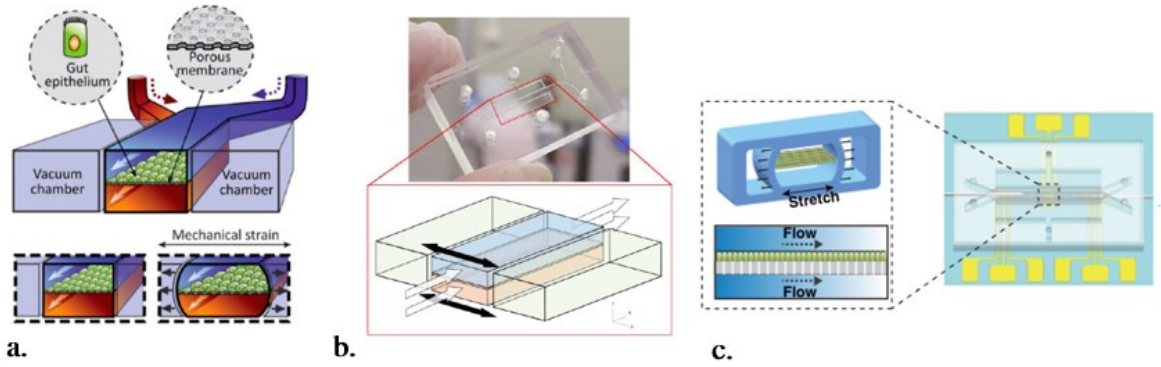


Figure I-25 : Intestins-sur-puce à péristaltisme pneumatique [164], [165], [166].

(a) Schéma de principe de la plateforme commercialisée par Emulate Inc. : deux microcanaux séparés par une membrane microporeuse et attenante à chambres latérales sous vide. L'aspiration cyclique impose un étirement programmable de la membrane et engendre une contrainte de cisaillement variable sur les cellules épithéliales [164]. (b) Dispositif PDMS à deux canaux (bleu et orange) séparés par une membrane poreuse intégrant deux chambres latérales sous vide (vert) et micro-canaux superposés ; les flèches blanches matérialisent la perfusion, les flèches noires la direction de la déformation induite [165]. (c) Représentation conceptuelle d'un intestin-sur-puce bi-canal muni d'un système pneumatique et d'électrodes de suivi in situ ; l'étirement périodique de la membrane médiane synchronise un cisaillement physiologique et une sollicitation de traction contrôlée [166].

I.4.B.c - Interactions avec le microbiote

Le microbiote intestinal joue un rôle central dans l'homéostasie digestive et la physiopathologie des MICI. Son intégration dans les modèles sur puce est essentielle mais demeure complexe, notamment en raison des conditions spécifiques requises par les bactéries anaérobies strictes.

Protection nécessaire entre l'épithélium et les bactéries

La coculture avec un microbiote vivant impose de maintenir l'intégrité de l'épithélium tout en permettant l'interaction. Deux niveaux de protection, illustrés en Figure I-26, sont utilisés :

- Le premier repose sur une compartimentation physique. Une membrane microporeuse sépare canal bactérien et canal épithélial [168], [169]. Dans certaines variantes, cette fonction est assurée par des clapets pneumatiques permettant une exposition contrôlée [170].

- Le second niveau de protection est biomimétique : une couche de mucus est reconstituée soit par coculture d'entérocytes et de cellules caliciformes [164] soit par dépôt expérimental [168]. Ce mucus limite l'adhésion bactérienne, stabilise le pH et constitue un filtre diffusif supplémentaire.

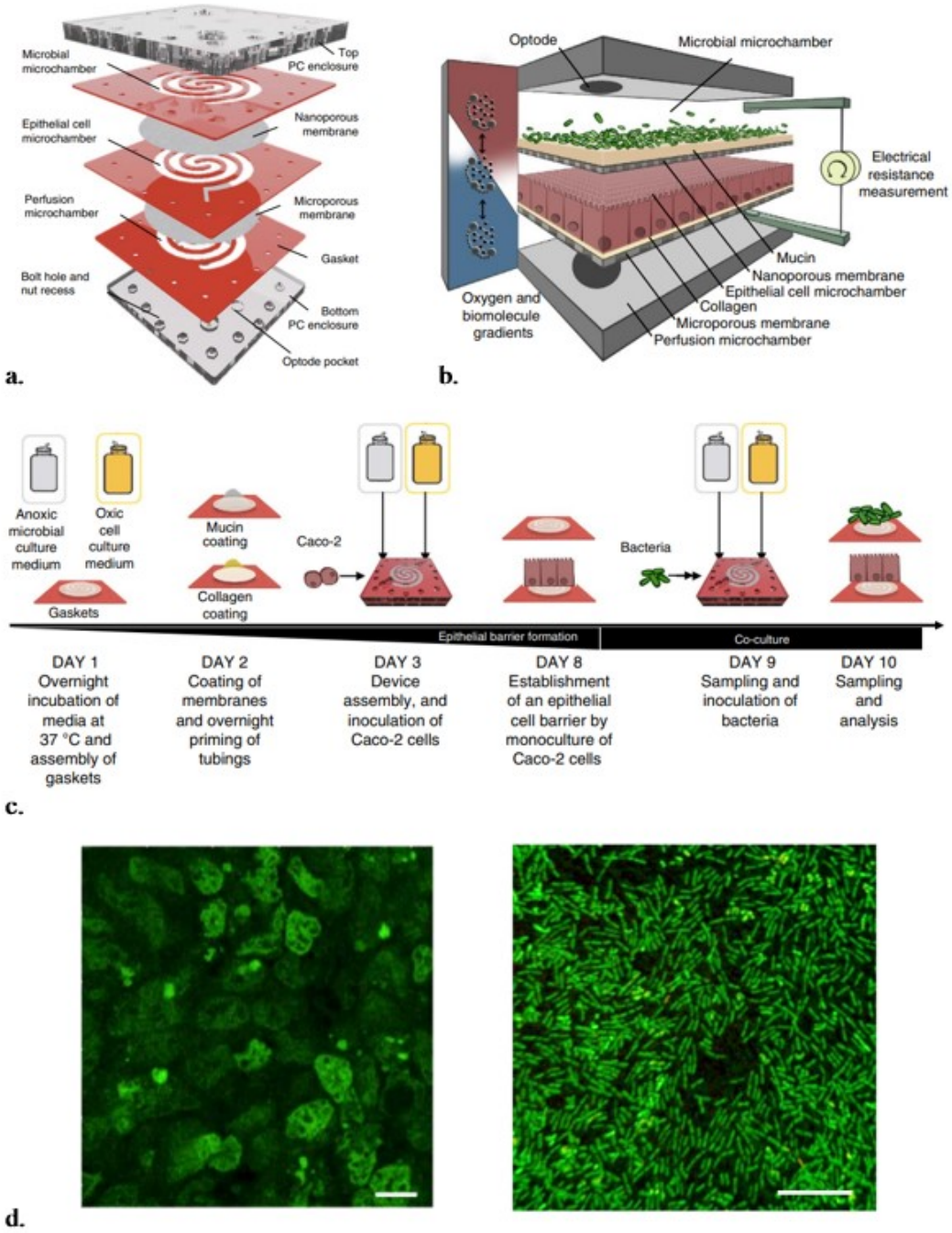


Figure I-26 : Intestin-sur-puce à 3 canaux permettant une coculture épithélium-microbiote [168].

(a) Vision éclatée du modèle HuMiX se focalisant sur la conception de la puce microfluidique. trois microchambres spirales empilées sont délimitées par des joints élastomères et séparées par deux membranes semi-perméables. La membrane microporeuse (1 µm) assure la perfusion nutritive de l'épithélium, tandis que la membrane nanoporeuse (50 nm) isole physiquement la chambre microbienne tout en autorisant la diffusion de métabolites et la création de gradients d'oxygène. (b) Vue éclatée annotée présentant les aspects biologiques et physico-chimiques de l'intestin-sur-puce. (c) Chronologie expérimentale illustrant, du revêtement des membranes à l'inoculation bactérienne, les étapes clés de la formation de la barrière épithéliale puis de la coculture. (d) Images de viabilité (vert = vivant et rouge = mort) 24 h après l'inoculation des bactéries : à gauche, Caco-2 et à droite, prolifération d'un biofilm de Lactobacillus rhamnosus GG.

Les matériaux de la puce microfluidiques doivent être adaptés aux gradients d'oxygène. La plupart des bactéries coliques se développent en condition hypoxique, contrairement aux entérocytes. La perméabilité élevée du PDMS compromet ces conditions, tandis que des polymères peu diffusifs comme le polycarbonate (PC) ou le polyamide (PA) maintiennent des concentrations en dioxygène < 1 %, assurant la viabilité de bactéries strictement anaérobies [168], [169]. Le PDMS reste toutefois adapté aux espèces aérobies ou facultativement anaérobies [171].

Quantification des paramètres physico-chimiques du micro-environnement

La création d'un environnement microbien stable passe également par la surveillance fine du micro-environnement, notamment concentration en dioxygène [172], [173]. La mesure locale d'O_2 permet de suivre la consommation cellulaire et d'identifier d'éventuelles zones anaérobies, pertinentes pour les cocultures avec des bactéries strictement anaérobies [173]. Deux types de capteurs sont utilisés : les optodes luminescentes, intégrées sous forme de films pour une mesure optique continue, dont un exemple est présenté en Figure I-27 [174], [175], et les microélectrodes de type Clark, qui enregistrent un signal électrique proportionnel à la concentration, avec une sensibilité élevée mais une intégration plus complexe [176], [177].

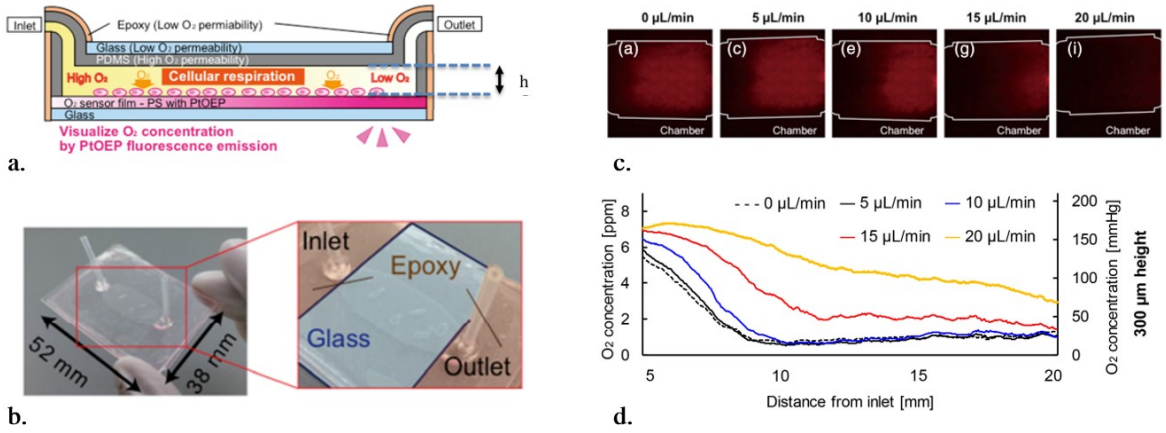


Figure I-27 : Quantification de la concentration en dioxygène dans un canal microfluidique à l'aide d'un optode luminescente [174].

(a) Schéma du principe de fonctionnement du dispositif, illustrant la formation d'un gradient de concentration en dioxygène induit par la consommation cellulaire. (b) Photographie du dispositif microfluidique utilisé, montrant les entrées/sorties et les matériaux utilisés. (c) Images de fluorescence du capteur d'oxygène intégré, après culture cellulaire et perfusion à différents débits de milieu de culture (0 à 20 µL/min). (d) Concentration en dioxygène mesurée le long du canal à différents débits.

I.4.B.d - Modélisation du tissu conjonctif intestinal

Le chorion intestinal, riche en matrice extracellulaire (collagène, fibronectine) et en fibroblastes, assure support mécanique et régulation de signaux cellulaires. Sa reconstitution

dans un intestin-sur-puce renforce la pertinence physiologique et permet l'étude d'échanges épithélio-stromaux ou de processus pathologiques comme la fibrose, observée chez les patients atteints de MICI.

La matrice extracellulaire est mimée par des hydrogels colonisés par des fibroblastes, intercalés entre membrane et épithélium. Les hydrogels biologiques (Matrigel, collagène I) offrent un environnement natif mais variable, tandis que les hydrogels synthétiques (PEGDA/GelMA) assurent une standardisation au prix d'une moindre bioactivité [149], [178], [179]. Les fibroblastes (CCD-18Co, NIH-3T3, HIF) y sont intégrés à des densités ajustées selon l'adhésivité du gel. Viables, ils sécrètent fibronectine et laminine, remodelant la matrice jusqu'à une rigidité proche de 500 Pa, ce qui favorise polarisation et jonctions serrées épithéliales [178], [179].

Initialement développés en Transwell®, ces modèles sont désormais adaptés à la microfluidique, comme illustré aux Figure I-28 et Figure I-29. Dans cette version, l'hydrogel villiforme en PEGDA/GelMA, imprimé en 3D, abrite des fibroblastes 3T3 tandis que des cellules épithéliales Caco-2 colonisent sa surface sous flux continu. Cette configuration apporte trois avantages majeurs. La topographie en villosités et le cisaillement reproduisent le micro-environnement intestinal naturel. La barrière se forme plus vite et atteint une résistance électrique trans-épithéliale physiologique. Enfin, la perméabilité paracellulaire chute nettement, signe d'une étanchéité accrue [149].

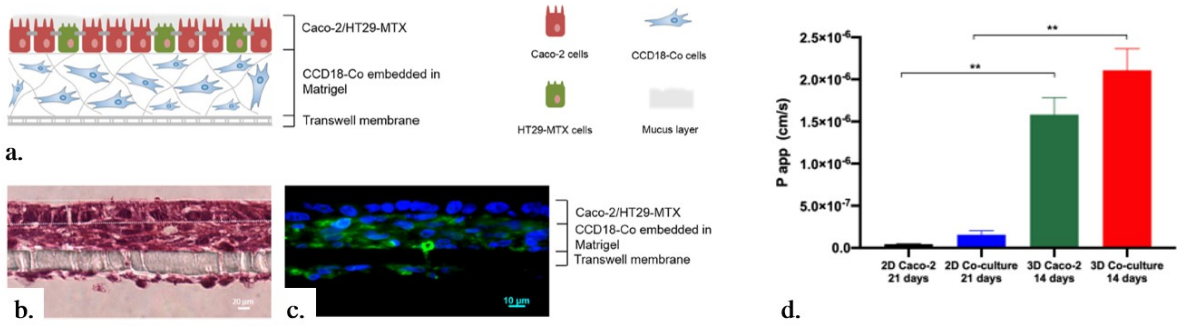


Figure I-28 : Organisation cellulaire sécrétant du mucus, réalisée dans un Transwell® [178], [179]

(A) Schéma général : représentation du dispositif dans lequel des fibroblastes inclus dans un hydrogel forment une couche de soutien pour la coculture de llignées épithéliales intestinales, Caco-2 et HT29-MTX [179]. (B) Coupe histologique H&E : section en paraffine illustrant la stratification des trois compartiments : sur la membrane, les fibroblastes (bas) maintiennent les cellules épithéliales (haut) [179]. (C) Marquage par immunofluorescence de la fibronectine (vert, Alexa-Fluor 488), les noyaux sont contre-colorés au DAPI (bleu) [179]. (D) Performance fonctionnelle : comparaison quantitative entre modèles avec fibroblastes, dits 3D, (après 14 jours de culture) et cultures classiques, dites 2D (après 21 jours). Les différences statistiques sont indiquées : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ [178].

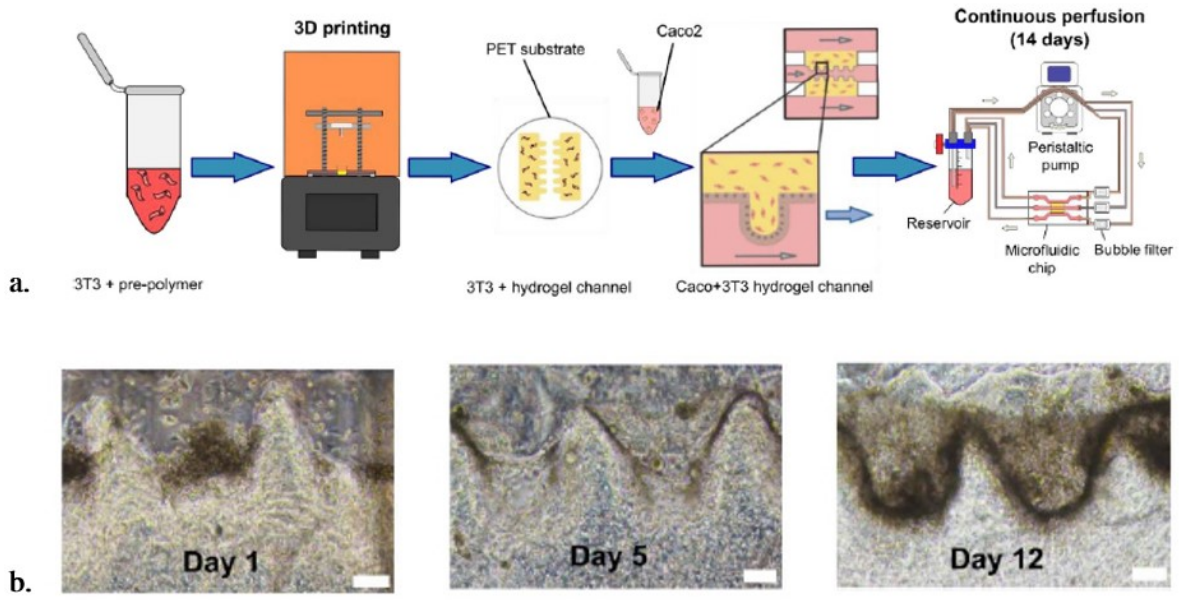


Figure I-29 : Intestin-sur-puce ayant 3 canaux microfluidiques distincts et contenant un hydrogel à base de fibroblastes complexe [149]

(a) Schéma du procédé de coculture : des fibroblastes 3T3 sont tout d'abord encapsulés dans un pré-polymère PEGDA/GelMA puis photopolymérisés par impression 3D pour former un canal central en forme de villosités. Ce canal hydrogel est scellé et relié à deux canaux latéraux de perfusion. Des cellules épithéliales intestinales Caco-2 sont ensuite ensemencées à la surface du gel, puis l'ensemble est soumis à une perfusion continue pendant 14 jours au moyen d'une pompe péristaltique. (b) Évolution de la barrière épithéliale : images en champ clair montrant la colonisation progressive des parois latérales en forme de villosités par les Caco-2, depuis le jour 1 jusqu'au jour 12 (barre d'échelle : 200 µm).

Des designs plus complexes alternent canaux de perfusion et d'hydrogels, permettant cocultures de sphéroïdes tumoraux HT29 et de fibroblastes CCD-18Co, comme illustré à Figure I-30. Les échanges diffusifs sans contact direct déclenchent une activation croisée, réduisant la pénétration de médicaments et reproduisant la chimiorésistance observée in vivo [180].

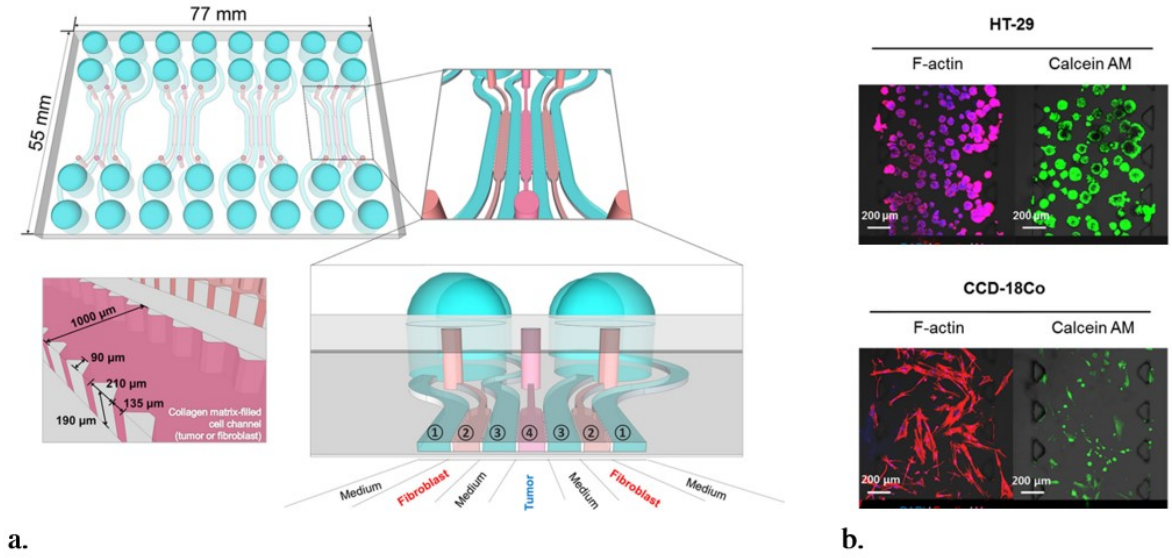


Figure I-30 : Puce microfluidique pour la coculture de sphéroïdes tumoraux épithéliaux et de fibroblastes [180].

(a) Schéma de la puce : chaque dispositif (77 mm × 55 mm) regroupe quatre unités identiques. Une unité se compose de sept canaux parallèles. Les canaux 4 et 2 servent au chargement respectif des sphéroïdes de cellules cancéreuses du côlon (HT-29) et des fibroblastes normaux (CCD-18Co), tandis que les autres canaux (1, 3, 5–7) sont remplis de milieu pour assurer la diffusion bidirectionnelle des facteurs solubles sans contact cellulaire direct.
(b) Images confocales montrant, à gauche, le marquage des filaments d'actine (F-actine, magenta pour HT-29, rouge pour CCD-18Co) et, à droite, la viabilité (Calcein AM, vert). Les HT-29 forment des sphéroïdes compacts tandis que les fibroblastes adoptent une morphologie allongée dans l'hydrogel (barre d'échelle = 200 µm).

I.4.B.e - Intégration de la réponse immunitaire

L'intestin joue un rôle central dans l'immunité, agissant comme une barrière active et dynamique entre l'organisme et son environnement. Pour reproduire fidèlement cette complexité immunologique, l'intégration de cellules immunitaires dans les intestins-sur-puce est un enjeu du développement de modèles microphysiologiques pertinents.

Pour reproduire cette complexité, les intestins-sur-puce intègrent des cellules immunitaires, introduites dans le canal basal sous l'épithélium comme illustré en Figure I-31 [181], [182]. En effet, les cellules immunitaires, non adhérentes par nature, restent en suspension dans le milieu de culture [181]. Cette compartimentalisation permet des interactions directionnelles et peut être complétée par un endothélium microvasculaire afin d'étudier le recrutement cellulaire [182].

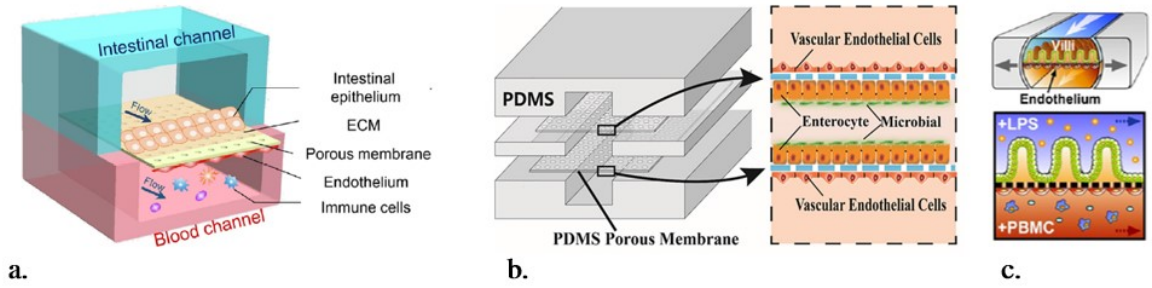


Figure I-31 : Intégration compartimentée de cellules immunitaires dans des intestins-sur-puce [181], [182], [183].

(a) Un canal apical contenant un épithélium intestinal cultivé sur une membrane poreuse est superposé à un canal sanguin simulant la microvascularisation. Ce canal basal contient un endothélium vasculaire et des cellules immunitaires. (b) La structure en PDMS comprend deux canaux microfluidiques séparés par une membrane poreuse. Les entérocytes exposés à des stimuli bactériens interagissent avec des cellules endothéliales vasculaires. (c) L'achitecture est composée de 2 canaux superposés : dans le canal apical des cellules épithéliales et bactéries sont introduites, alors le canal basolatéral est ensemencé de cellules endothéliales et immunitaires.

Les cellules immunitaires intégrées dans les intestins-sur-puce sont sélectionnées en fonction des objectifs expérimentaux. Les macrophages, en raison de leur rôle clé dans la surveillance immunitaire, la phagocytose et la régulation de l'inflammation, sont les cellules les plus couramment utilisées [184], [182], [185]. D'autres modèles emploient des cellules mononucléées du sang périphérique, introduisant des monocytes ainsi que des lymphocytes T et B et permettant de reproduire des réponses immunitaires plus complexes [184], [183].

L'activation immunitaire dépend directement de l'état de la barrière épithéliale. Tant que celle-ci demeure intacte, les signaux microbiens restent contenus. En cas d'altération, ces signaux traversent l'épithélium, déclenchent l'activation des cellules immunitaires et conduisent à une réponse inflammatoire mesurable [186]. La barrière joue ainsi un rôle de filtre immunologique dont la perturbation permet de modéliser les mécanismes précoces de l'inflammation intestinale, comme illustré en Figure I-32.

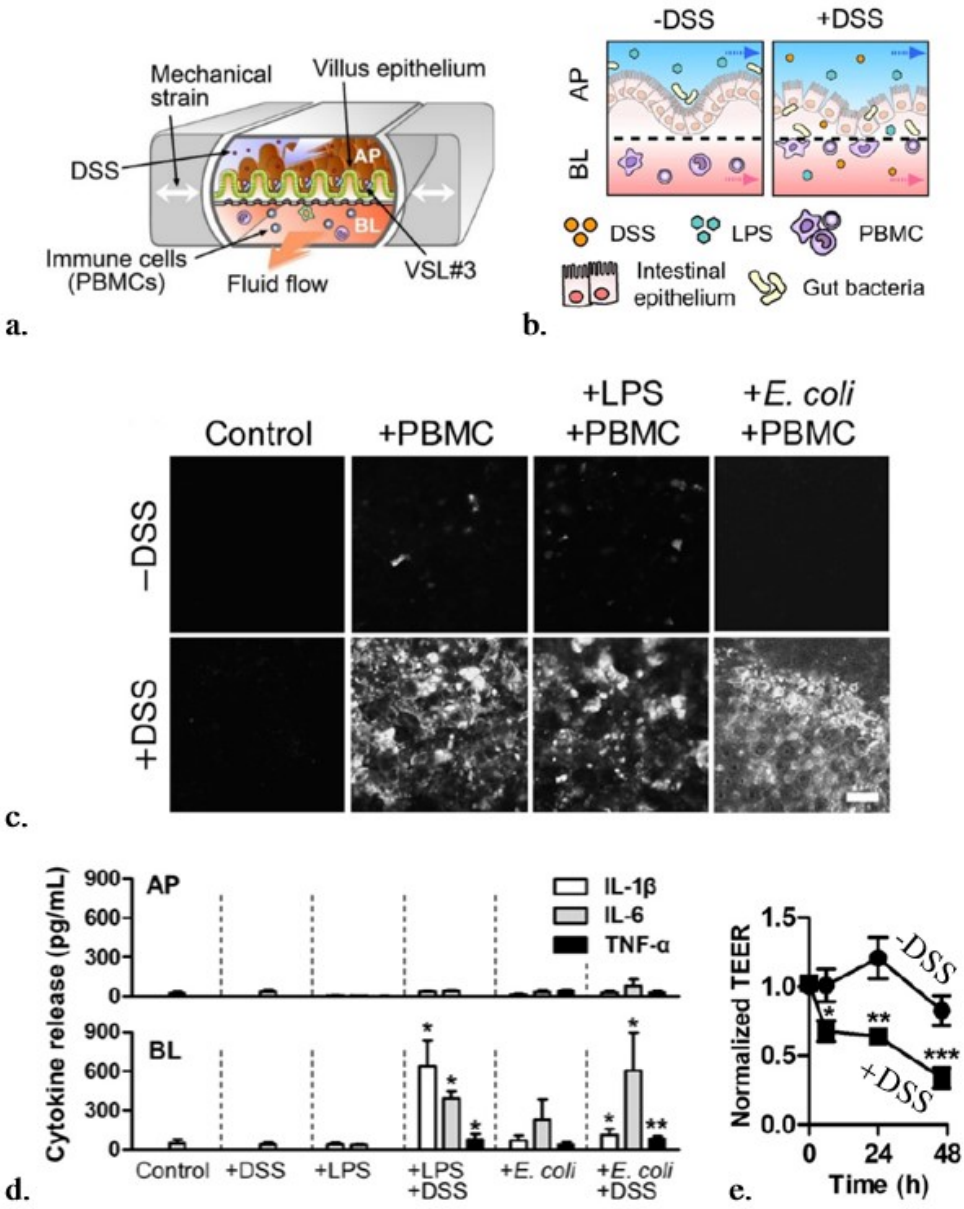


Figure I-32 : Effets combinés de la perte d'intégrité épithéliale et de la stimulation microbienne sur la réponse immunitaire dans un intestin-sur-puce [186].

(a) Schéma du dispositif à deux canaux séparés par une membrane poreuse. (b) Représentation schématique des conditions expérimentales : à gauche, un intestin en état homéostatique (-DSS), où l'épithélium intact empêche la transmigration microbienne et immunitaire ; à droite, un intestin en condition pathologique (+DSS), où la rupture de barrière permet la traversée de bactéries et l'activation des PBMC. (c) Visualisation du stress oxydatif intracellulaire à l'aide du marqueur fluorescent CellROX, 24 h après introduction des PBMC. Une augmentation nette du signal est observée uniquement dans les conditions combinant DSS, PBMC, et stimulation microbienne (LPS ou E. coli), indiquant une activation immunitaire dépendante de la perméabilité de la barrière. (d) Sécrétion directionnelle de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α). La production significative de cytokines n'est observée que dans le compartiment basal, et uniquement dans les conditions combinant DSS, PBMC et un stimulus microbien. (e) Mesure de la résistance électrique transépithéliale au cours du temps, montrant une baisse significative de l'intégrité de la barrière intestinale après exposition au DSS ($n = 10$, $p < 0.01$ à < 0.001).

I.4.C - INTESTIN-SUR-PUCE SPECIFIQUE AUX MICI

Les intestins-sur-puce décrits précédemment reposent majoritairement sur des lignées cellulaires (Caco-2, HT29-MTX) ou sur des cocultures standardisées, qui offrent une bonne reproductibilité et permettent d'étudier des mécanismes généraux de fonction barrière. Toutefois, les MICI se caractérisent par une forte hétérogénéité interindividuelle, tant dans l'expression clinique que dans les mécanismes sous-jacents, ce qui limite la capacité des modèles génériques à reproduire certaines signatures patient-spécifiques. Dans ce contexte, l'utilisation de cellules dérivées de patients (sains ou atteints de MICI) constitue une approche prometteuse pour rapprocher les modèles microphysiologiques des conditions humaines, en capturant une partie de la variabilité intrinsèque liée à la maladie.

L'approche patient-dérivée s'appuie sur l'idée que certaines altérations de la barrière intestinale ne sont pas uniquement induites par le micro-environnement, mais peuvent être en partie portées par les cellules elles-mêmes, via des états de différenciation, des profils de sécrétion ou des sensibilités différentes aux stimuli mécaniques et inflammatoires. La microfluidique offre alors un cadre particulièrement adapté, car elle permet de comparer des tissus reconstitués dans un environnement contrôlé, tout en conservant une architecture compartimentée et des lectures fonctionnelles directes.

Un exemple d'intestin-sur-puce, dérivé de cellules de patients sains ou atteints de MICI, est présenté en Figure I-33. Le dispositif repose sur une organisation épithéliale comprenant des entérocytes et des cellules caliciformes, associée à un compartiment stromal et séparée par une membrane poreuse. Dans ce modèle, trois phénotypes majeurs associés aux MICI sont reproduits de manière concomitante. Premièrement, une augmentation de la perméabilité paracellulaire est observée dans les conditions dérivées de patients MICI, traduisant une altération de l'intégrité de la barrière. Deuxièmement, une diminution de l'épaisseur du mucus est mesurée, cohérente avec une capacité réduite de protection luminale et une fragilisation de la couche mucineuse. Enfin, l'ajout de cellules immunitaires au compartiment basolatéral conduit à une activation de la réponse inflammatoire, mise en évidence par une augmentation de cytokines pro-inflammatoires [187].

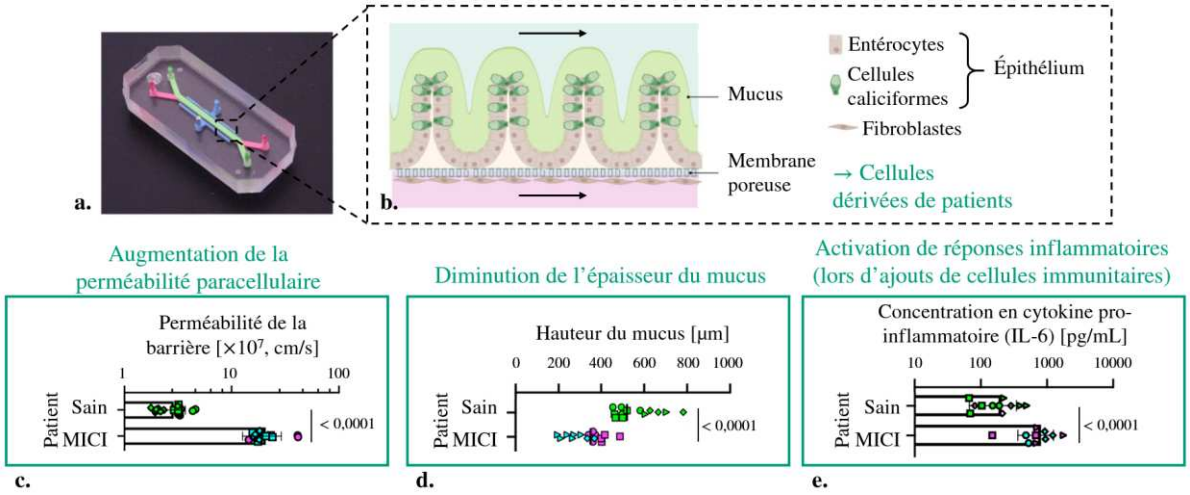


Figure I-33 : Intestin-sur-puce dérivé de patients reproduisant des signatures majeures des MICI [187].

(a) Photographie du dispositif microfluidique. (b) Schéma de l'organisation tissulaire : épithélium (entérocytes, cellules caliciformes) sécrétant du mucus, compartiment stromal/fibroblastique, séparés par une membrane poreuse. (c–e) Reproduction de trois phénotypes caractéristiques chez des cellules de patients MICI comparées à des cellules de sujets sains : augmentation de la perméabilité de barrière, diminution de l'épaisseur du mucus et augmentation de la sécrétion d'IL-6 après ajout de cellules immunitaires.

Ces résultats illustrent l'intérêt des intestins-sur-puce dérivés de patients pour reproduire, au sein d'un même système microphysiologique, des altérations de barrière, de mucus et d'inflammation, signatures fréquemment associées aux MICI. Au-delà de l'étude mécanistique, cette stratégie ouvre la voie à des modèles plus proches des profils cliniques, pertinents pour l'évaluation de réponses à des traitements dans un cadre contrôlé.

I.5 - CARACTERISATION ELECTRIQUE DES CELLULES

Les MICI se traduisent par une altération de la barrière intestinale, dont l'analyse repose sur des modèles in vitro qui reproduisent fidèlement l'épithélium. Dans ce contexte, la caractérisation électrique s'impose comme un outil privilégié, car elle est sensible, non destructive et capable de fournir un suivi dynamique de la fonction barrière.

I.5.A - TEER : MESURE ELECTRIQUE DE REFERENCE

La résistance électrique transépithéliale (TEER) constitue la technique standard pour évaluer l'intégrité des barrières formées par des monocouches épithéliales [153], [155], [188]. Elle mesure la capacité du tissu à limiter le passage ionique, paramètre directement lié à la perméabilité paracellulaire et à l'état des jonctions serrées. Une valeur élevée reflète une barrière fonctionnelle, tandis qu'une diminution traduit une perturbation de l'homéostasie,

qu'elle résulte d'une inflammation, d'une cytotoxicité ou d'une perte de confluence. La TEER sert ainsi à suivre la différenciation et la maturation cellulaires, mais aussi à évaluer l'effet de traitements expérimentaux. Elle présente l'avantage d'être rapide, non invasive et simple à interpréter, ce qui en fait un outil de routine.

La mise en œuvre de la TEER repose sur un dispositif standardisé. La monocouche est cultivée sur une membrane poreuse de type Transwell® (Corning Inc., États-Unis), entre deux électrodes disposées de part et d'autre du support [189]. Comme schématisé à la Figure I-34, une première mesure s'effectue à vide afin d'isoler la résistance du support et du milieu. La valeur obtenue en présence des cellules est ensuite corrigée de cette contribution puis normalisée par la surface de culture pour donner la TEER exprimée en $\Omega.\,cm^2$ [190].

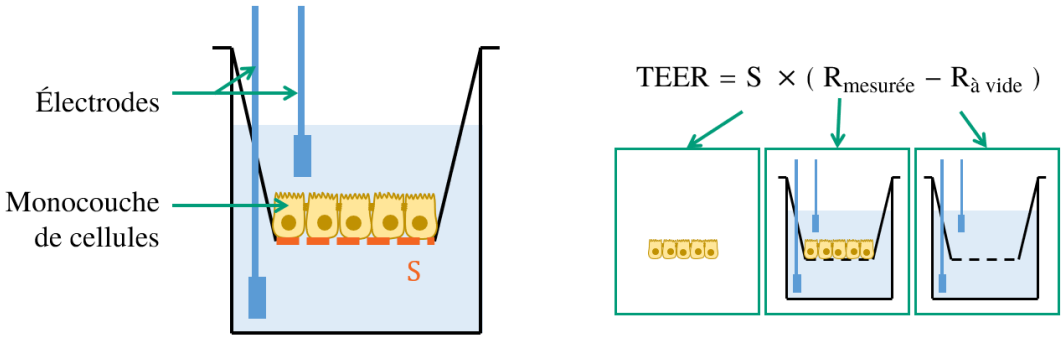


Figure I-34 : Mesure de la TEER.

La mesure s'effectue à une fréquence unique, généralement 12,5 Hz [189]. À cette basse fréquence, les membranes cellulaires se comportent comme des isolants, ce qui contraint le courant à emprunter exclusivement la voie paracellulaire. La TEER rend donc compte uniquement de l'intégrité des jonctions serrées, sans fournir d'information sur les propriétés capacitives des membranes ou sur le cytoplasme. Pour compléter cette lecture et accéder à d'autres paramètres électriques, la spectroscopie d'impédance constitue une approche plus adaptée.

I.5.B - APPLICATIONS BIOLOGIQUES DE LA SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE

La spectroscopie d'impédance repose sur l'application d'un courant alternatif de faible amplitude sur une large gamme de fréquences. La réponse mesurée, exprimée sous forme complexe, combine une composante résistive et une composante capacitive. Elle permet d'accéder à la dynamique des tissus biologiques.

Chaque cellule est constituée d'un cytoplasme conducteur séparé du milieu extracellulaire par une membrane lipidique isolante, qui se comporte électriquement comme un

condensateur plan de capacité surfacique de 0,8 $\mu F.cm^{-2}$ [191]. Ce comportement apparent résulte de phénomènes microscopiques fondamentaux tels que la polarisation des dipôles, la mobilité ionique et la formation de doubles couches interfaciales, présentés en Annexe D. La Figure I-35 illustre cette organisation membranaire.

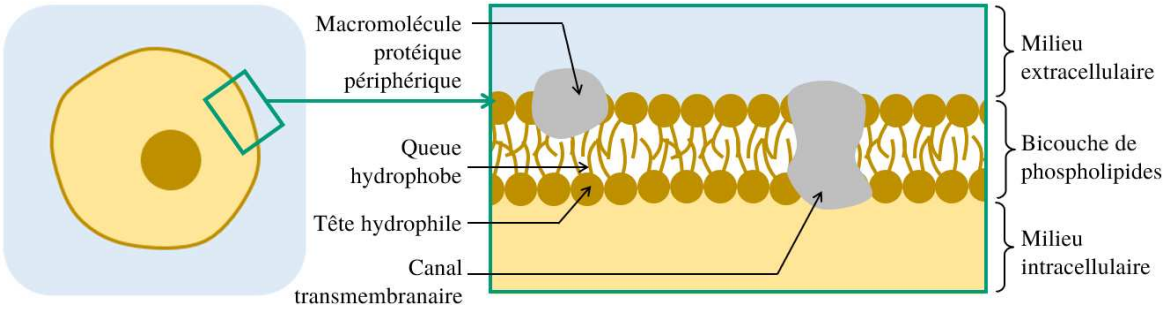


Figure I-35 : Structure de la membrane cellulaire.

À basse fréquence, la membrane bloque le passage du courant, qui circule principalement par la voie paracellulaire. À mesure que la fréquence augmente, la contribution capacitive de la membrane devient prépondérante. À haute fréquence, le courant traverse les membranes et sonde directement le cytoplasme. Ce comportement, représenté à la Figure I-36, reflète la structure interne des tissus biologiques et trouve une formalisation dans différents modèles électriques équivalents, détaillés en Annexe E.

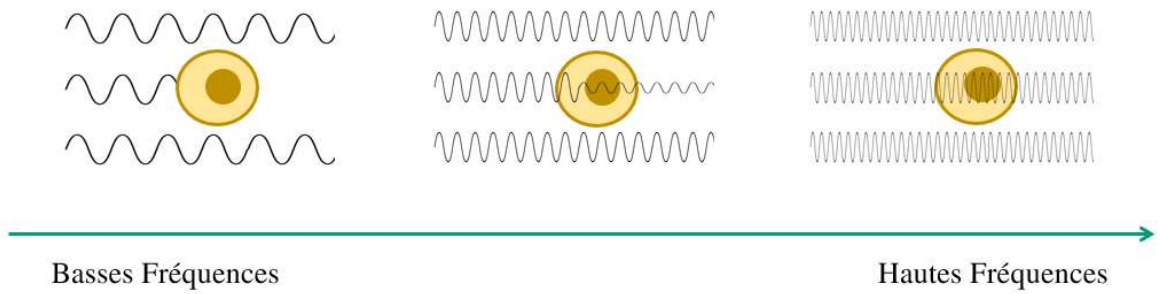


Figure I-36 : Réprésentation de la réponse fréquentiele des cellules.

La spectroscopie d'impédance exploite cette approche pour caractériser les barrières épithéliales. La réponse fréquentielle d'une monocouche cellulaire se traduit par une courbe en deux paliers successifs. Le premier plateau, observé à basse fréquence, correspond à une forte impédance liée à l'effet isolant des membranes qui forcent le courant à circuler par voie paracellulaire. Le second plateau, atteint à haute fréquence, reflète la conductivité combinée du cytoplasme et du milieu extracellulaire. La transition entre ces deux régimes définit la dispersion β, signature électrique des tissus biologiques.

Ainsi, la spectroscopie d'impédance ne se limite pas à une description théorique des propriétés électriques des tissus. La capacité de la spectroscopie d'impédance à distinguer les

contributions paracellulaires et transcellulaires en fait un outil puissant pour l'étude de systèmes cellulaires vivants. Ces principes trouvent des applications directes dans le suivi dynamique des monocouches, depuis leur formation jusqu'à leur dégradation, ouvrant la voie à une analyse non invasive de la croissance et de la viabilité cellulaire.

I.5.B.a - Suivi de la croissance et de la viabilité cellulaire

La spectroscopie d'impédance permet un suivi continu et non invasif de la formation et de la dégradation d'un tapis cellulaire. Deux phases principales sont distinguées : l'établissement progressif d'une monocouche confluente, puis sa désorganisation, généralement associée à l'apoptose.

Pendant la phase de croissance, les cellules adhèrent au substrat, s'étalent, forment des jonctions intercellulaires et finissent par occuper toute la surface disponible. Ces étapes se traduisent par une augmentation progressive de l'impédance. Comme le montre la Figure I-37, cette évolution se traduit par une hausse de la résistance et une diminution progressive de la capacité mesurée, corrélées à l'augmentation de la surface de contact cellule-substrat. Une fois la monocouche stabilisée, l'impédance atteint un plateau, témoin d'un état confluant et fonctionnel [192], [193], [194].

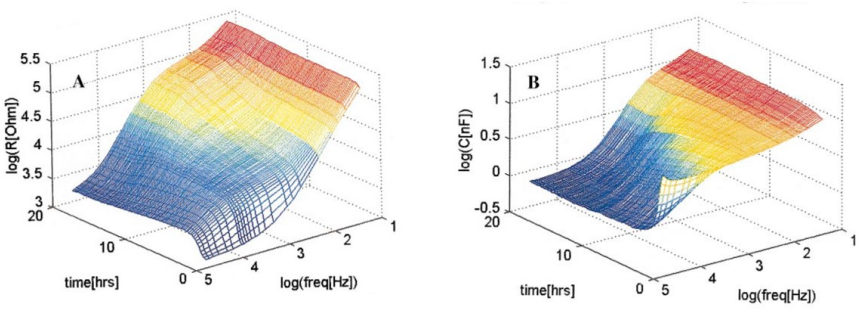


Figure I-37 : Evolution fréquentielle de la résistance et capacité lors de la formation d'une monocouche cellulaire suivie par spectrosocpie d'imépdance [192].

Représentation 3D des variations temporelles de la résistance (à gauche) et de la capacité (à droite) mesurées par spectroscopie d'impédance (10 Hz à 100 kHz) au cours de l'adhésion et de l'étalement de cellules épithéliales MDCK sur des électrodes circulaires (Ø 250 µm). On observe une augmentation progressive de la résistance et une diminution de la capacité.

En présence d'un agent cytotoxique, la désorganisation survient plus rapidement. La dégradation du tapis cellulaire se traduit par une chute d'impédance liée à la perte d'adhésion, à la rupture des jonctions et à la désintégration membranaire [193], [194]. La Figure I-38 illustre ce cycle complet, de la colonisation initiale à l'apoptose [193].

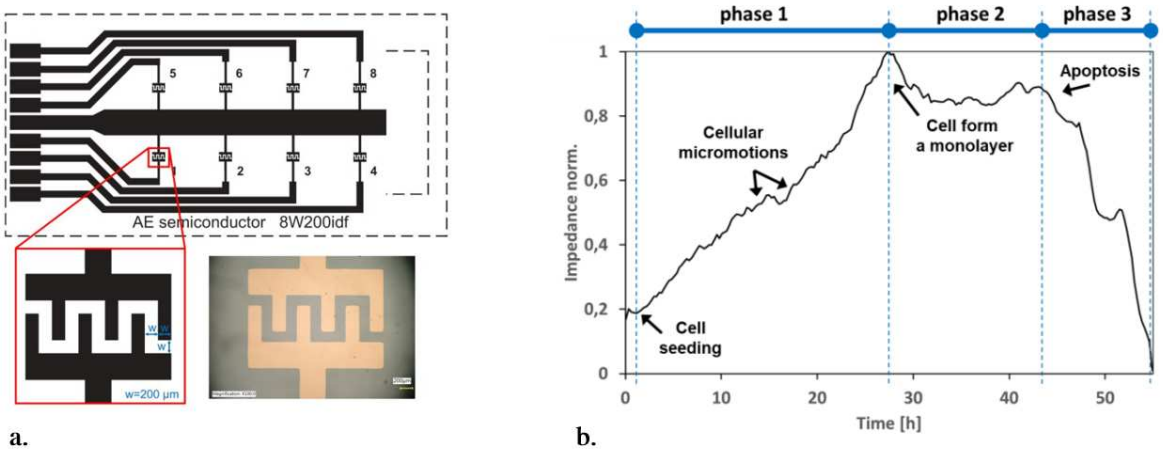


Figure I-38 : Suivi temporel par spectroscopie d'impédance de la formation, de la stabilisation puis de la dégradation d'un tapis cellulaire [193].

(a) Observation au microscope et schéma du réseau d'électrodes interdigitées utilisé (200 µm × 200 µm). (b) Courbe d'impédance normalisée en fonction du temps à 16 kHz. Phase 1 : adhésion et micromouvements cellulaires. Phase 2 : formation de la monocouche. Phase 3 : chute de l'impédance liée à l'apoptose spontanée ou à un stress environnemental. Mesures réalisées sur des fibroblastes L929.

Comme le montre la Figure I-39, les variations sont détectables avant l'apparition de marqueurs biochimiques, conférant à la spectroscopie d'impédance une sensibilité précoce pour l'évaluation de la viabilité cellulaire [194].

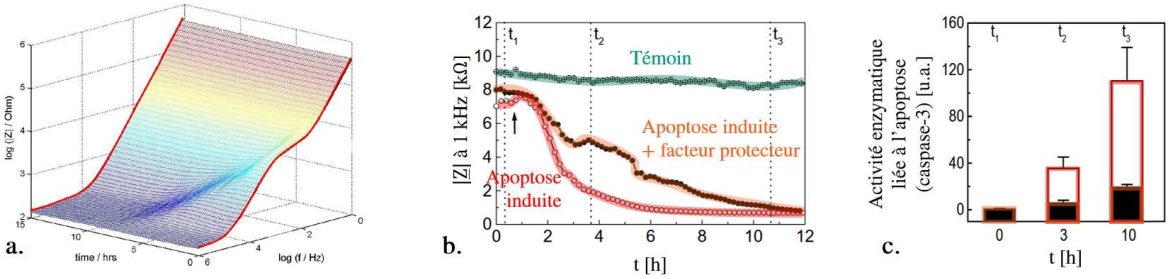


Figure I-39 : Détection précoce de l'apoptose par spectroscopie d'impédance [194].

(a) Évolution temporelle du module d'impédance sur une large gamme fréquentielle après ajout de cycloheximide (25 µM) à une monocouche confluente de cellules endothéliales cérébrales. (b) Courbe d'impédance à 1 kHz montrant une chute rapide (t_1 = initiation, t_2 = décroissance, t_3 = saturation) en condition d'apoptose chimiquement induite, même avec ajout de facteur protecteur, en comparaison avec le témoin. (c) Activité de la caspase-3 mesurée par dosage enzymatique, aux mêmes temps t_1, t_2 et t_3 : la baisse d'impédance précède significativement l'activation maximale de la voie apoptotique.

I.5.B.b - Étude de cytotoxicité

La spectroscopie d'impédance électrique permet de quantifier les effets de composés chimiques sur des cellules adhérentes. Contrairement aux tests biochimiques classiques, elle assure un suivi continu, sans marquage, ni interruption de la culture et renseigne directement sur l'état fonctionnel de la couche cellulaire. Lorsqu'un agent toxique agit, l'adhésion au substrat se relâche, les contacts intercellulaires se désorganisent et l'intégrité membranaire diminue. Ces altérations modifient les paramètres électriques mesurés, comme illustré en Figure I-40 [195].

La spectroscopie d'impédance permet ainsi de capturer, avec une résolution temporelle fine, la dynamique de réponse à une substance, en révélant des effets différenciés selon la dose et le temps d'exposition. La quantification de l'effet peut s'exprimer via des courbes dose-réponse et des valeurs de concentration inhibitrice IC_{50}, qui correspond à la concentration d'un agent qui réduit une réponse mesurée de 50 par rapport à un témoin non traité. La détermination de l'IC_{50} électrique offre une information comparable aux approches standards, tout en évitant leurs contraintes analytiques [195]. En résumé, la spectroscopie d'impédance constitue un outil sensible et dynamique pour l'analyse quantitative de la cytotoxicité cellulaire.

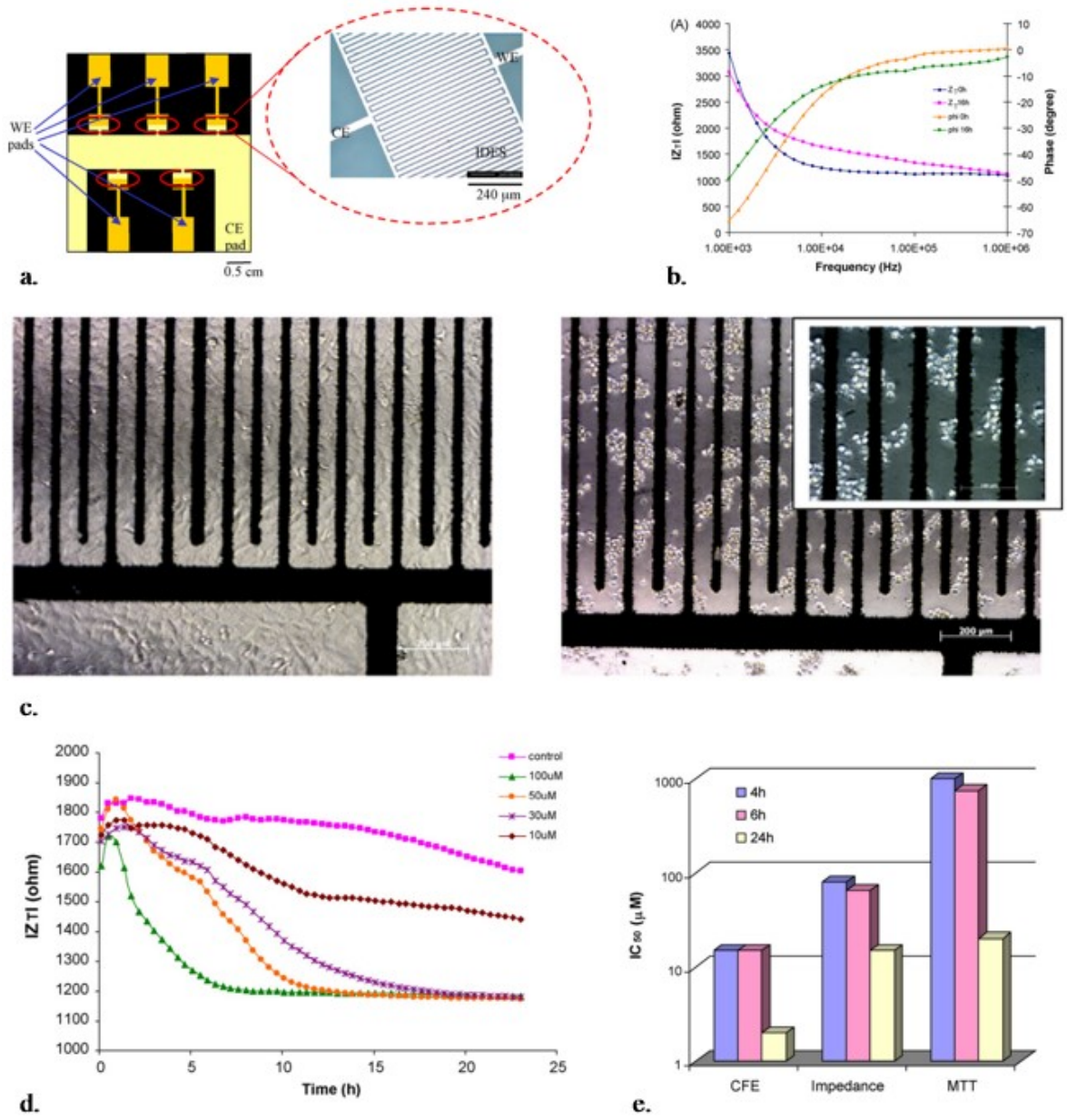


Figure I-40 : Étude de la cytotoxicité de l'arsénite de sodium sur des fibroblastes par spectroscopie d'impédance [195].

(a) Schéma du dispositif : une puce en verre intègre cinq paires d'électrodes interdigitées coplanaires (WE : working electrode) connectées à un pad central commun (CE : counter electrode). Chaque paire comprend des doigts d'or de 23 µm de large, espacés de 23 µm. (b) Courbes de réponse fréquentielle (module et phase) enregistrées à différents temps (0h : bleu et orange, et 16h : rose et vert). (c) Observation au microscope optique d'une électrode recouverte d'une monocouche confluente de fibroblastes témoin (à gauche) et d'une électrode exposée à 100 µM d'arsénite pendant 24 h (à droite). (d) Cinétique de décroissance du module d'impédance à 10 kHz pour différentes concentrations d'arsénite (10, 30, 50, 100 µM), comparées à un témoin sans traitement (rose). La chute est rapide (≤ 6 h) pour les doses les plus élevées, et plus progressive pour les plus faibles. Cette tendance dose-dépendante permet d'identifier une IC_{50} électrique. (e) Comparaison de l'IC_{50} obtenue par trois méthodes : clonogenicité (CFE), impédance, et test colorimétrique MTT, à 4, 6 et 24 h. La mesure d'impédance est plus sensible que le MTT mais légèrement moins que le test de clonogénicité. Elle permet néanmoins un suivi temps réel, sans marquage, et intégrable à des dispositifs multipuits.

I.5.B.c - Détection de cellules cancéreuses

L'analyse fréquentielle par spectroscopie d'impédance permet d'identifier des signatures propres à différents types cellulaires, y compris entre cellules saines et cancéreuses. Comme le montre la Figure I-41, à densité cellulaire équivalente, les cellules cancéreuses génèrent une impédance 3 à 5 fois plus élevée que les cellules saines, en particulier dans la gamme de fréquence intermédiaire (10–100 kHz). Ce contraste s'explique par des différences de morphologie et de contact cellule-substrat, caractéristiques du phénotype tumoral [196].

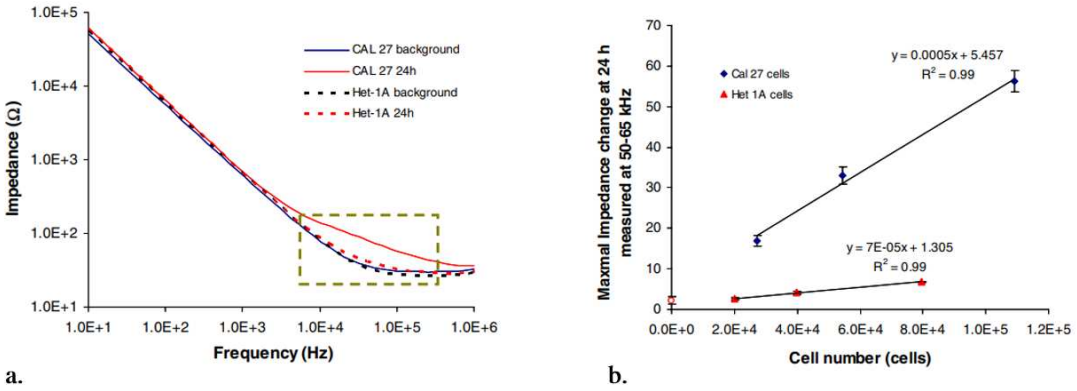


Figure I-41 : Discrimination électrique entre cellules normales et cancéreuses par spectroscopie d'impédance [196].

(a) Courbes du module d'impédance en fonction de la fréquence pour deux types cellulaires (24 h après ensemencement). Les cellules cancéreuses orales CAL-27 (ligne rouge) présentent une impédance plus élevée dans la zone intermédiaire (rectangle vert en pointillé) que les cellules épithéliales normales Het-1A (ligne pointillée noire), à densité égale. (b) Relation entre le nombre de cellules ensemencées et la variation d'impédance à 24 h, mesurée à 50–65 kHz. Une corrélation linéaire est observée dans les deux cas ($R^2 = 0,99$), avec une pente plus élevée pour les cellules cancéreuses, indiquant une réponse impédancemétrique différente. Les mesures ont été réalisées sur une puce microfabricquée en verre, intégrant des électrodes interdigitées à 50 doigts coplanaires (largeur d'électrode : 15 µm ; interstice : 15 µm), dans un milieu de culture standard.

Cette approche permet de discriminer différentes populations cellulaires en exploitant leur réponse électrochimique intrinsèque, sans nécessiter de marquage, ce qui en fait une solution prometteuse en cancérologie.

I.5.C - INTEGRATION DE LA SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE DANS DES INTESTINS-SUR-PUCE

L'intégration d'électrodes dédiées à la spectroscopie d'impédance dans les intestins-sur-puce répond à un besoin central des modèles microphysiologiques : suivre en continu, in situ et de manière non destructive l'état fonctionnel de la barrière épithéliale dans un environnement dynamique. Contrairement à la TEER, généralement réalisée à une fréquence unique et

principalement sensible à la voie paracellulaire, la spectroscopie d'impédance permet une lecture fréquentielle multiparamétrique, capable de distinguer des contributions liées aux jonctions serrées, à la membrane cellulaire, au cytoplasme et au micro-environnement ionique. À ce jour, quatre modèles d'intestins-sur-puce micrométriques instrumentés par spectroscopie d'impédance ont été décrits [197], [198], [199], [200]. Ils se distinguent par les matériaux employés, la géométrie des canaux microfluidiques et l'emplacement des électrodes, reflétant des choix d'architecture conditionnant le couplage champ–tissu, la sensibilité locale ainsi que la compatibilité avec l'imagerie.

I.5.C.a - Intérêt de l'apport de la spectroscopie d'impédance au-delà de la TEER

Parmi les dispositifs existants, l'intestin-sur-puce instrumenté présenté en Figure I-42 constitue un démonstrateur particulièrement représentatif de l'intérêt de la spectroscopie d'impédance pour l'étude fonctionnelle de la barrière intestinale. Le dispositif repose sur une architecture microfluidique compartimentée, dans laquelle une monocouche de cellules épithéliales intestinales est cultivée sur une membrane poreuse séparant compartiments apical et basolatéral. L'instrumentation est assurée par l'intégration d'électrodes interdigitées permettant de mesurer la réponse électrique de la monocouche sur une large bande de fréquences.

Le premier apport de ce modèle réside dans sa capacité à suivre l'établissement progressif d'une barrière épithéliale. L'évolution du module d'impédance au cours des jours de culture traduit l'organisation progressive du tapis cellulaire. La structuration de la barrière est corroborée par l'immunomarquage des noyaux et des jonctions serrées, confirmant que la signature électrique mesurée reflète un processus biologique de maturation et de cohésion tissulaire. Cette lecture dynamique est particulièrement adaptée aux intestins-sur-puce, où la perfusion, le cisaillement et les cocultures rendent difficile l'usage systématique de tests destructifs.

Au-delà de la formation de barrière, ce dispositif met en évidence un deuxième apport majeur, crucial pour le positionnement méthodologique : la spectroscopie d'impédance permet de détecter des phénomènes non détectables par TEER. Lorsqu'un traitement pharmacologique inducteur de sénescence, tel que la doxorubicine, est appliqué de manière prolongée, les cellules basculent dans un état de vieillissement caractérisé par une hypertrophie, une modification des échanges ioniques et une altération de la conductivité intracellulaire. Ces changements se traduisent par une variation significative du module d'impédance à une fréquence caractéristique de l'analyse transcellulaire (≈ 20 kHz dans cet exemple). Le signal électrique met alors en évidence une altération fonctionnelle et structurale du tissu (sénescence/hypertrophie) sans nécessairement induire une baisse concomitante de TEER.

Cette observation souligne une limite intrinsèque de la TEER : en tant que mesure essentiellement paracellulaire, elle demeure peu sensible aux remaniements transcellulaires (morphologie, cytoplasme, conductivité intracellulaire) tant que l'intégrité globale des jonctions serrées reste partiellement préservée.

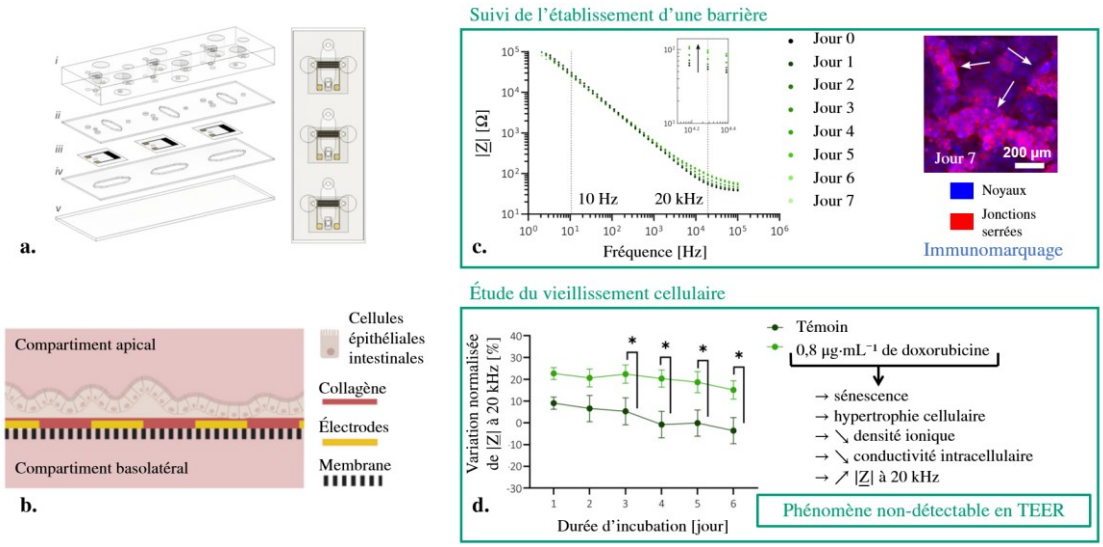


Figure I-42 : Intestin-sur-puce instrumenté par spectroscopie d'impédance pour le suivi multiparamétrique de la barrière épithéliale [198].

Architecture microfluidique intégrant une membrane poreuse supportant une monocouche de cellules épithéliales intestinales et des électrodes interdigitées pour la mesure in situ de l'impédance électrique. (a) Vue éclatée des différentes couches du dispositif. (b) Coupe schématique montrant la compartimentation apicale et basolatérale ainsi que l'emplacement des électrodes au contact de l'épithélium. (c) Évolution du module d'impédance |Z| en fonction de la fréquence au cours des jours de culture, illustrant l'établissement progressif de la barrière, corrélé à l'immunomarquage des noyaux et des jonctions serrées. (d) Variation de |Z| à 20 kHz lors d'un traitement inducteur de sénescence (doxorubicine), traduisant des altérations transcellulaires associées à l'hypertrophie et à la modification de la conductivité intracellulaire, phénomène non détectable par TEER.

Ce focus illustre donc le rôle de la spectroscopie d'impédance comme capteur multiparamétrique : elle ne se limite pas à quantifier une perméabilité ionique globale, mais permet d'accéder à une signature plus riche de l'état physiologique des cellules, incluant des processus subtils de différenciation, de maturation, de stress ou de vieillissement. Dans le contexte des MICI, où l'altération de la barrière peut s'accompagner de remaniements tissulaires et cellulaires complexes, cette capacité à révéler des modifications non strictement paracellulaires constitue un avantage déterminant.

I.5.C.b - Modalités d'intégration des électrodes : architectures décrites dans la littérature

Les modèles instrumentés publiés reposent sur des modalités d'implantation des électrodes qui conditionnent le couplage du champ électrique avec la monocouche. Trois configurations principales sont décrites et se différencient par la distance au tissu, l'homogénéité du champ et la sensibilité aux hétérogénéités locales, comme illustré en Figure I-43 et développé en Annexe F.

Dans l'architecture dite opposée, les électrodes sont placées de part et d'autre du dispositif. Le champ traverse successivement le milieu, la membrane poreuse puis la monocouche, fournissant une lecture globale de la barrière et préservant l'accès optique [197], [200]. En revanche, l'intégration des contributions du milieu et de la membrane réduit la sensibilité aux variations locales.

À l'inverse, la configuration coplanaire sur membrane, généralement sous forme d'électrodes interdigitées, place les électrodes au contact immédiat des cellules. Le champ confiné accroît la sensibilité aux variations de morphologie, d'adhésion et de densité cellulaire, facilitant une lecture multiparamétrique [198], au prix de contraintes de microfabrication et d'une possible interférence avec l'imagerie.

Une troisième approche consiste à positionner des électrodes coplanaires dans le compartiment basolatéral sous la membrane. Le couplage est moins direct, mais l'intégration est simplifiée tout en restant compatible avec un suivi fonctionnel [199]. Ces options reflètent des choix différents en termes de couplage champ-tissu, de facilité de fabrication et de compatibilité avec l'observation microscopique.

Ces architectures traduisent des compromis entre mesure globale ou locale, sensibilité et facilité d'intégration, tout en visant une caractérisation in situ de la barrière en environnement microfluidique.

I.5.C.c - Informations biologiques accessibles : lecture multiparamétrique et signatures fonctionnelles

La spectroscopie d'impédance fournit une lecture multiparamétrique de l'état cellulaire : la composante résistive est principalement liée aux jonctions intercellulaires, tandis que la composante capacitive reflète la morphologie, l'adhésion et la polarisation membranaire [201]. Leur analyse conjointe permet d'associer des signatures électriques à des processus biologiques dynamiques.

Dans certains modèles, la maturation et la différenciation de l'épithélium s'accompagnent d'une augmentation progressive de la capacité dans la bande intermédiaire ($\approx 10 – 100$ kHz) et d'une diminution modérée de la résistance à basse fréquence (< 1 kHz), corrélées à la formation de structures villositaires, comme illustré en Figure I-44 [197].

L'intégration de la spectroscopie d'impédance dans les intestins-sur-puce permet ainsi un suivi fonctionnel in situ de la barrière épithéliale, offrant une lecture plus riche que les mesures mono-fréquentielles classiques. Les travaux existants démontrent sa capacité à suivre la formation de barrière et à détecter des altérations transcellulaires subtiles non détectables par TEER.

Le domaine demeure toutefois émergent, avec un nombre limité de dispositifs et une diversité biologique restreinte, principalement centrée sur des monocultures de Caco-2. Ces limites feront l'objet d'une analyse critique au Chapitre II afin d'identifier les verrous scientifiques et technologiques à lever pour développer des modèles plus robustes et plus physiologiques pour l'étude dynamique des MICI.

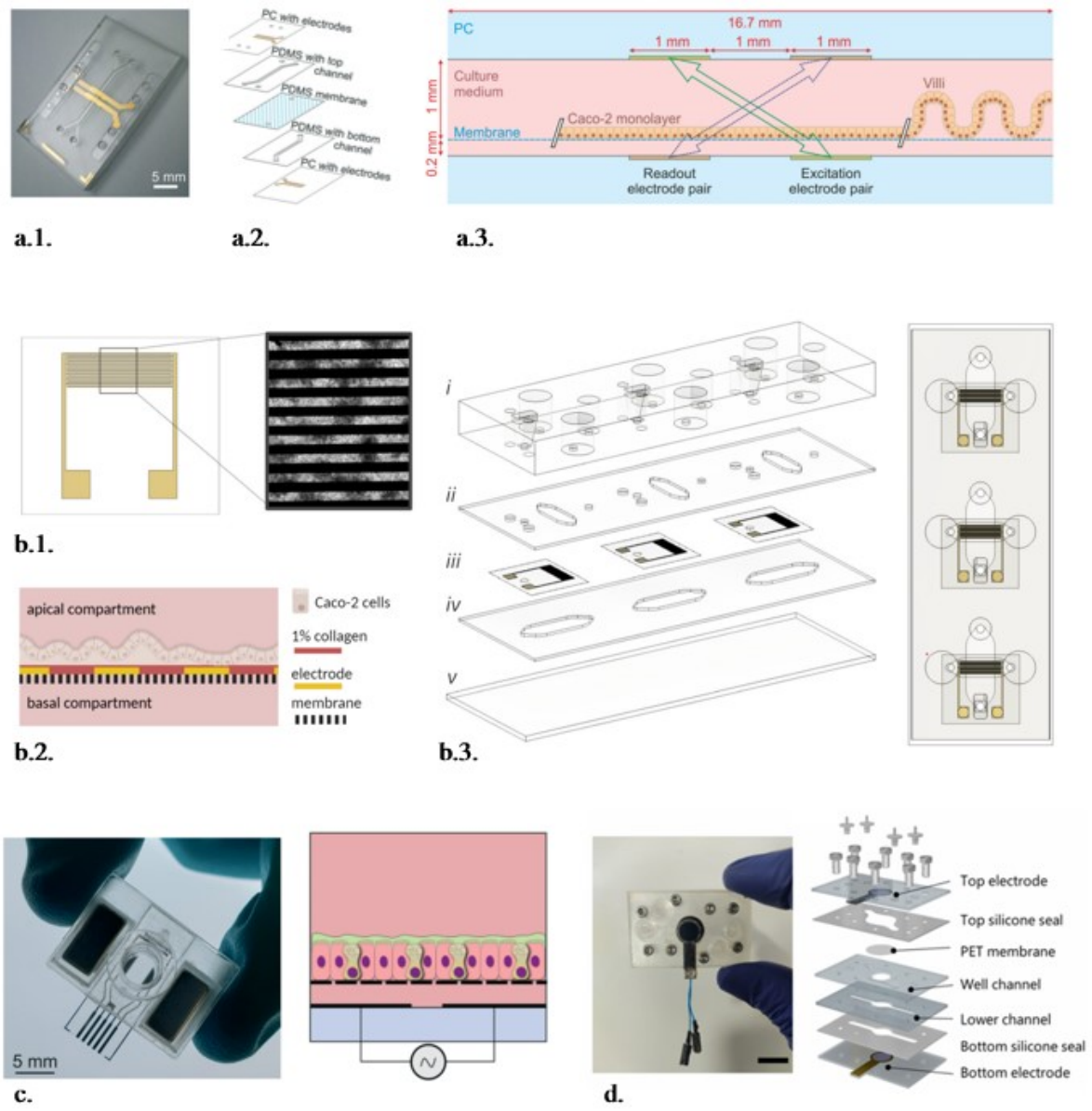


Figure I-43 : Stratégies d'intégration d'électrodes pour la spectroscopie d'impédance dans un intestin-sur-puce [197], [198], [199], [200].

(a) Électrodes placées de part et d'autre de la culture [197]. (a.1) Photographie de la puce microfluidique (16 mm × 8 mm). (a.2) Coupe longitudinale : deux paires d'électrodes Cr/Au (70 nm) sont déposées sur un substrat en polycarbonate (PC) transparent ; une paire sert à l'excitation, l'autre à la lecture différentielle. Les lignes obliques matérialisent le trajet du champ à travers la monocouche de cellules Caco-2. (a.3) Vue éclatée des couches.

(b) Électrodes interdigitées sur membrane poreuse [198]. (b.1) Electrodes interdigitées (22 µm/22 µm, 57 % de la surface membrane). (b.2) Schéma de principe : les électrodes sont déposées sur une membrane PET qui supporte la monocouche Caco-2. (b.3) À gauche, structure de l'intestin-sur-puce : (i) couvercle, (ii) chambres fluidiques, (iii) membranes à électrodes, (iv) chambres fluidiques, (v) substrat verre. À droite, vue d'ensemble d'une puce regroupant trois unités.

(c) Électrodes coplanaires dans le compartiement basolatéral [198]. À gauche, photographie du dispositif. À droite, vue en coupe.

(d) Électrodes opposées macroscopiques situées de part et d'autre de la culture épithéliale [200].

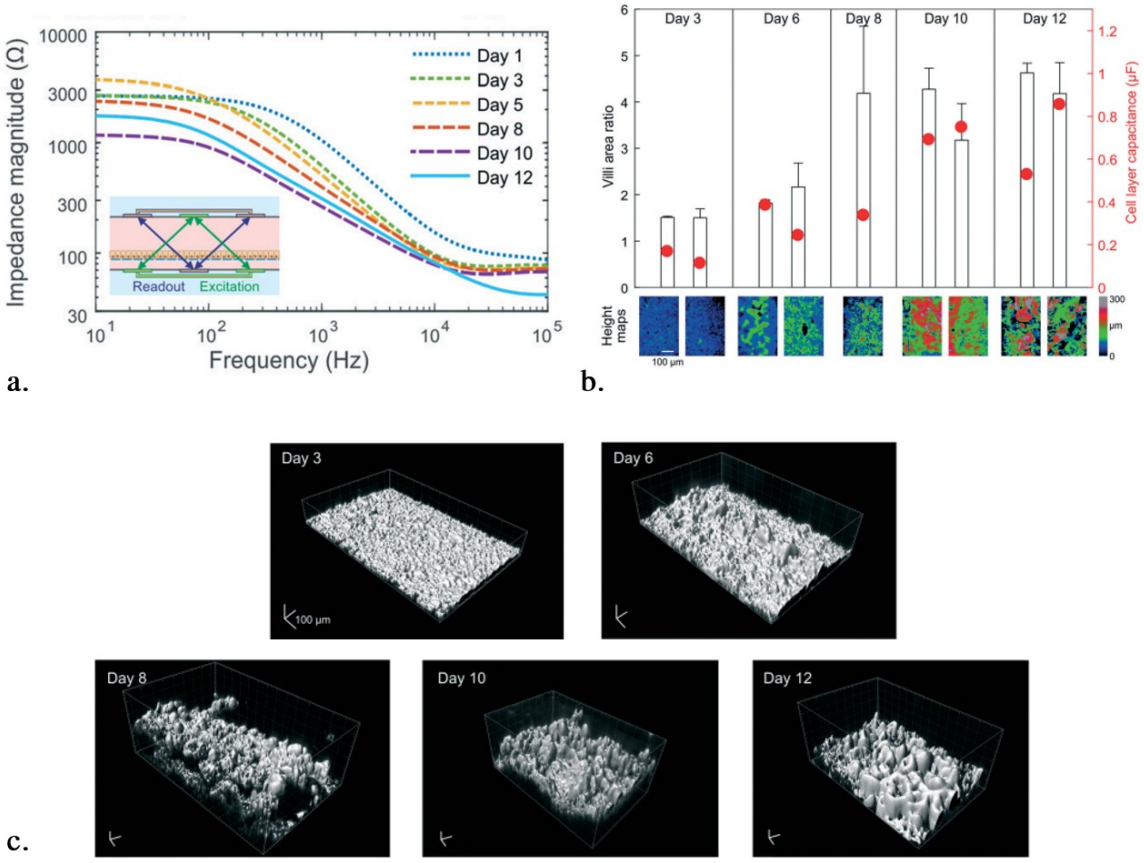


Figure I-44 : Suivi de la différenciation villositaire dans un intestin-sur-puce par spectrométrie d'impédance [197].

(a) Evolution du module de l'impédance au cours de la culture d'un épithélium intestinal (cellules Caco-2) dans une puce microfluidique. L'augmentation progressive du module d'impédance, en particulier dans la gamme intermédiaire (10^3–10^4 Hz), reflète la maturation morphologique et fonctionnelle de la monocouche, associée à la formation de structures villositaires. (b) Corrélation entre la capacité de la couche cellulaire et le ratio villsoités / surface (histogrammes) obtenu par cartographie topographique (images de hauteur en fausse couleur, en bas (c) Reconstructions 3D de la surface apicale de l'épithélium intestinal à différents jours de culture (J3 à J12), obtenues par microscopie à profilométrie optique. Les images illustrent la formation progressive de villosités.

I.6 - Conclusion

Les MICI constituent un enjeu majeur de santé publique, en raison de leur caractère incurable, de leur incidence et prévalence croissantes et de leur impact multifactoriel sur le tractus gastro-intestinal. Ces pathologies résultent d'interactions complexes entre des facteurs génétiques, environnementaux, immunitaires et microbiens. Leur prise en charge demeure limitée, ce qui justifie la nécessité de mieux comprendre leurs mécanismes physiopathologiques pour développer des approches diagnostiques et thérapeutiques plus efficaces.

La compréhension des MICI repose en grande partie sur l'étude de l'anatomie et de la physiologie de l'intestin, en particulier des mécanismes assurant l'homéostasie intestinale. La

barrière intestinale, composée d'un épithélium polarisé, d'une couche de mucus protectrice, d'un microbiote diversifié et d'un système immunitaire local, joue un rôle central dans la régulation des échanges entre l'organisme et son environnement luminal. Les altérations de cette barrière observées dans les MICI, notamment la désorganisation des jonctions serrées, la dysbiose microbienne et l'hyperactivation immunitaire, soulignent l'importance de disposer de modèles permettant de reproduire fidèlement ces interactions complexes.

Les modèles expérimentaux actuellement disponibles, bien qu'indispensables, présentent des limites notables. Les cultures cellulaires bidimensionnelles, bien que faciles à manipuler et reproductibles, ne reproduisent que partiellement la complexité architecturale et fonctionnelle de l'intestin humain. Les modèles animaux, quant à eux, permettent une approche systémique de la pathologie, mais se heurtent à des divergences interespèces, à des contraintes réglementaires croissantes, ainsi qu'à des considérations éthiques. Ces limites ont conduit à l'émergence de modèles alternatifs plus représentatifs, tels que les organes-sur-puce.

Parmi ceux-ci, l'intestin-sur-puce s'impose comme une technologie innovante, alliant microfluidique, cocultures cellulaires et contrôle spatio-temporel précis de l'environnement cellulaire. Ce type de dispositif permet de reproduire les caractéristiques clés de l'intestin, telles que le flux laminaire, la contrainte de cisaillement, le péristaltisme mécanique, ainsi que les interactions entre cellules épithéliales, immunitaires et microbiennes. Par rapport aux approches traditionnelles, ce modèle présente une pertinence physiologique accrue, l'opportunité d'un suivi quantitatif en temps réel grâce à l'intégration de capteurs et une diminution du recours aux modèles animaux. En revanche, il reste contraint par une complexité de mise en œuvre, un coût élevé et un manque de standardisation. De telles plateformes offrent néanmoins des conditions expérimentales adaptées à l'étude des MICI, notamment pour évaluer la perméabilité de la barrière, la réponse inflammatoire et l'effet de composés thérapeutiques.

Enfin, l'intégration de techniques de caractérisation électrique, telles que la TEER ou la spectroscopie d'impédance, constitue un atout majeur. Ces approches non invasives permettent un suivi en temps réel de l'état fonctionnel des monocouches cellulaires. L'application de ces techniques dans les dispositifs microfluidiques représente une perspective prometteuse pour la modélisation dynamique des MICI, en apportant des données quantitatives sur la fonction barrière dans un contexte biomimétique. Ces méthodes présentent néanmoins certaines limites. Les mesures reflètent souvent une réponse globale et macroscopique de la monocouche, rendant difficile l'observation des hétérogénéités locales. Les gammes de fréquences utilisées demeurent réduites et limitent la capacité à distinguer les contributions cellulaires. Ces mesures restent sensibles à divers paramètres expérimentaux tels que la conductivité du milieu ou la température, ce qui affecte leur robustesse et leur comparabilité. L'usage de ces approches demeure limité. Ces éléments soulignent la nécessité de renforcer l'intégration des mesures

électriques dans les intestins-sur-puce, afin d'en accroître la portée et d'en faire une approche plus robuste pour l'étude dynamique des MICI.

Malgré les avancées récentes en matière de modélisation intestinale, plusieurs verrous scientifiques et technologiques persistent. Ces limitations entravent encore la capacité des dispositifs actuels à reproduire fidèlement la complexité des MICI. Le chapitre suivant se propose d'identifier ces obstacles et d'en analyser les implications pour la recherche et le développement de modèles plus représentatifs.

Chapitre II : Positionnement scientifique du projet et design conceptuel du dispositif

Les intestins-sur-puce instrumentés par spectroscopie d'impédance constituent une approche émergente pour la modélisation fonctionnelle de la barrière intestinale. En reproduisant certains aspects clés du microenvironnement intestinal et en permettant un suivi continu, non invasif et multiparamétrique de l'intégrité de la barrière cellulaire, ces dispositifs ouvrent des perspectives intéressantes pour l'étude des MICI.

Ce chapitre a pour objectif d'ancrer le projet de recherche dans un positionnement scientifique clair au regard de l'état de l'art. Dans un premier temps, une analyse critique des travaux existants est proposée afin d'identifier les principaux verrous à lever. Dans un second temps, une démarche conceptuelle est développée pour définir un design adapté de l'intestin-sur-puce, en s'appuyant sur les contraintes biologiques, microphysiologiques et instrumentales. Cette étape constitue une transition essentielle entre la réflexion scientifique et la mise en œuvre technologique décrite dans le chapitre suivant.

II.1 - VERROUS SCIENTIFIQUES

La spectroscopie d'impédance représente un outil prometteur pour l'évaluation de l'intégrité des barrières épithéliales dans les modèles d'intestins-sur-puce. Pourtant, son intégration dans ce domaine reste encore limitée, avec seulement quatre dispositifs micrométriques instrumentés par spectroscopie d'impédance publiés à ce jour, ce qui souligne à la fois l'intérêt d'une telle approche et le caractère encore exploratoire des travaux menés.

Le Tableau II-1 propose une analyse comparative des études existantes. Il rassemble les principales caractéristiques des dispositifs, en considérant à la fois la conception microfluidique, les modalités de caractérisation électrique et les modèles cellulaires employés. Cette synthèse met en évidence la diversité des approches développées, fournit un état des lieux des solutions actuellement mises en œuvre et révèle les verrous techniques récurrents. Ces derniers concernent d'abord le cloisonnement disciplinaire, qui rend difficile l'articulation entre ingénierie, biologie et instrumentation, mais aussi les conditions microphysiologiques imposées par la microfluidique, la pertinence biologique des modèles cellulaires utilisés et l'adéquation des architectures instrumentales mises en œuvre pour le suivi fonctionnel.

Tableau II-1 : Analyse des intestins-sur-puce à spectroscopie d'impédance.

Référence			Brandauer, 2025. [198]	van der Helm, 2019. [197]	Fernandes, 2022. [199]	Marrero, 2023. [200]
Microfluidique	Description de la puce microfluidique		Deux chambres	Deux canaux rectilignes	Structures en compartiments	Deux canaux menant à une chambre circulaire
	Matériau de la puce		PDMS	PDMS	PMMA et verre	COP
	Canal apical	Taille	(3 mm x 11,8 mm x 0,5 mm) (l x L x h)	(1 mm x 1 mm) (d x h)	(0,5 mm x 10 mm) (d x h)	(2,6 mm x 1 mm) (d x h)
		Flux	Statique	Dynamique 30 µL/h	Statique	Dynamique 500 µL à 20 µL/min toutes les 3h
	Canal baso-latéral	Taille	(5,2 mm x 15,5 mm x 0,5 mm) (l x L x h)	(1 mm x 0,2 mm) (d x h).	(0,5 mm x 0,275 mm) (d x h)	(2,6 mm x 1 mm) (d x h)
		Flux	Statique	Dynamique 30 µL/h	Dynamique 30 µL/h	Dynamique 20 µL/min
	Membrane poreuse	Diamètre des pores	3 µm	7 µm	0,4 µm	0,4 µm
		Densité	8.10^5 pores. cm^{-2}	8.10^4 pores. cm^{-2}	10^8 pores. cm^{-2}	Non précisé
		Épaisseur	9 µm	50 µm	Non précisé	Non précisé
	Mouvement péristaltique		Non	Non	Non	Non
Caractérisation électrique	Suivi de la barrière par spectroscopie d'impédance		Oui	Oui	Oui	Oui
	Plage de fréquence		0,1 Hz à 1 MHz	10 Hz à 100 kHz	0,1 Hz à 100 kHz	0,1 Hz à 100 kHz
	Signal excitateur		Tension de 10 mV	Courant de 10 µA	Tension de 100 mV	Tension de 10 mV
	Échelle des électrodes		Microscopique	Macroscopique	Macroscopique	Macroscopique
	Électrodes : coplanaires ou opposées		Coplanaires	Opposées	Coplanaires	Opposées
	Localisation		Sur la membrane poreuse	De part et d'autre de la membrane	Au fond du canal basolatéral	De part et d'autre de la membrane
	Description et dimension du design		IDT à 7 paires de doigts (80 µm de large, espacés de 60 µm)	2 paires d'électrodes (excitation et mesure) de 1 mm	Deux paires : soit uniquement milieu de culture, soit sous les cellules (en forme de demi-cercles)	Circulaire de 6,5 mm de diamètre
	Matériau des électrodes		Au	Ti / Au	Ti / Pt / Ti / RuOx	Au / PEDOT:PSS
Biologie des MICI	Lignée(s) cellulaire(s) utilisée(s)		Caco-2 Et, mentionné dans le supplément : coculture directe Caco-2 : HT29 (7:3) et indirecte Caco-2 : HUVEC.	Caco-2	Caco-2 16HBE14o- (épithélium bronchial humain)	Caco-2
	Modélisation des MICI		Non (vieillissement intestinal)	Non (barrière intestinale classique)	Non (modélisation des barrières épithéliales en général pour tests de candidats-médicaments)	Non (modélisation des barrières épithéliales en général, avec étude de l'altération et la récupération)

Analyse comparative des dispositifs recensés dans la littérature, incluant leurs caractéristiques microfluidiques, électriques et biologiques. Le code couleur indique le niveau de correspondance des caractéristiques étudiées avec les objectifs de modélisation : vert pour une correspondance élevée, jaune pour une correspondance intermédiaire, orange pour une correspondance faible.

II.1.A - CLOISONNEMENT DISCIPLINAIRE

Les MICI résultent d'interactions complexes entre épithélium, microbiote, système immunitaire, génétique et environnement. Leur modélisation in vitro suppose donc la combinaison d'une culture cellulaire pertinente, d'un environnement fluidique biomimétique et d'une instrumentation. Pourtant, l'analyse de la littérature montre que ces disciplines sont souvent mobilisées deux à deux, mais très rarement en synergie complète :

- **Biologie et microfluidique.** Plusieurs travaux associent ces deux domaines pour reproduire des fonctions intestinales comme la formation de mucus [155], [156], la structuration villositaire [149], [151], [152] les interactions avec le microbiote [168], [169], [170] ou l'intégration partielle d'éléments immunitaires [181], [182]. Ces dispositifs constituent aujourd'hui une base solide pour la modélisation de l'intestin sain ou pathologique.

- **Biologie et instrumentation.** Dans la recherche préclinique, l'association se traduit surtout par des mesures TEER sur Transwell®, référence pour évaluer la perméabilité paracellulaire [43]. En clinique, elle s'incarne dans les endoscopes vidéo, qui permettent le diagnostic direct de l'inflammation et l'orientation des biopsies grâce à une instrumentation optique et électronique [202], [203].

- **Microfluidique et instrumentation.** Enfin, certaines études exploitent ces deux dimensions pour suivre des paramètres physico-chimiques en temps réel, par exemple la concentration en dioxygène [174], ou pour des applications de cytométrie [204], [205] et d'électro-perméabilisation [206], [207].

- **Cependant, la convergence de ces trois axes reste peu explorée.** Aucun modèle in vitro ne combine encore de manière aboutie coculture intestinale pertinente pour l'étude de la physiopathologie des MICI, structuration microfluidique dynamique et instrumentation par spectroscopie d'impédance dédiée au suivi de la barrière. Ce cloisonnement freine la conception de plateformes réellement capables de reproduire les altérations intestinales observées dans les MICI.

Le projet de recherche présenté ici s'inscrit dans cette lacune, avec l'ambition de développer un intestin-sur-puce instrumenté intégrant ces trois dimensions. Le positionnement scientifique est illustré en Figure II-1, qui met en évidence l'intersection encore largement inexplorée entre biologie des MICI, microfluidique et instrumentation électronique.

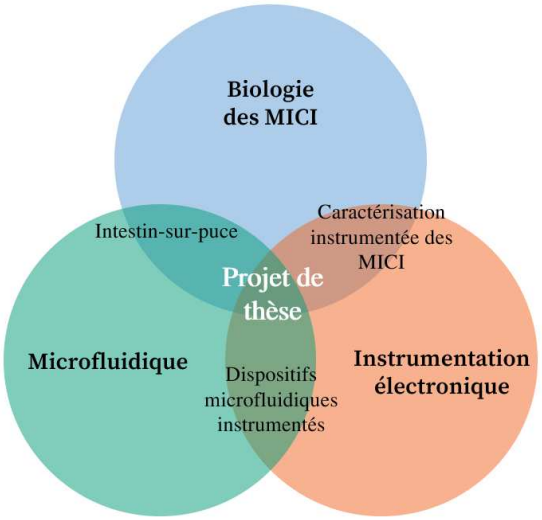


Figure II-1 : Diagramme de Venn représentant le positionnement interdisciplinaire du projet à l'interface de trois domaines scientifiques.

II.1.B - LIMITES MICROPHYSIOLOGIQUES

Réalisme de la contrainte de cisaillement pariétale

La contrainte de cisaillement pariétale est un paramètre essentiel pour reproduire l'environnement intestinal car elle influence la morphologie apicale, la polarisation, les jonctions serrées et la production de mucus [162], [153], [160]. Son intégration est donc nécessaire pour obtenir un comportement représentatif.

À partir des géométries et des débits indiqués dans les publications analysées, il est possible d'estimer la contrainte de cisaillement pariétale τ_w à l'aide de l'Équation A-1, disponible en Annexe A. Ces calculs ont été réalisés pour chaque dispositif à partir des valeurs disponibles. Les résultats sont présentés dans le Tableau II-2.

Tableau II-2 : Estimation de la contrainte de cisaillement pariétale τ_w dans intestins-sur-puce à spectroscopie d'impédance de la littérature.

Référence		Hauteur du canal [m]	Largeur du canal [m]	Débit volumique [$m^3.s^{-1}$]	Viscosité dynamique [Pa. s]	τ_w calculé [$dyn.cm^{-2}$]	Variation relative par rapport à 0,02 $dyn{\cdot}cm^{-2}$
Brandauer, 2025. [198]		Statique					
van der Helm, 2019. [197]	Apical	1,0E-03	1,0E-03	8,3E-12	6,9E-04	3,5E-04	98 %
	Baso-latéral	2,0E-04	1,0E-03	8,3E-12	6,9E-04	8,7E-03	57 %
Fernandes, 2022. [199]	Apical	Statique					
	Baso-latéral	2,8E-04	5,0E-04	8,3E-12	6,9E-04	9,2E-03	54 %
Marrero, 2023. [200]		1,0E-03	2,6E-03	3,3E-10	6,9E-04	5,3E-03	74 %

Calcul de la contrainte de cisaillement pariétale τ_w exercée sur les parois des canaux microfluidiques à partir des dimensions géométriques et des débits volumétriques rapportés dans la littérature. Les valeurs sont obtenues à l'aide de l'Équation A-1, en supposant que la viscosité dynamique du liquide en perfusion est celle de l'eau à 37°C (soit 0,69 mPa.s). Calculs réalisés avec deux chiffres significatifs.

Parmi les dispositifs recensés, les systèmes de Brandauer et Fernandes présentent un environnement totalement statique, sans aucun écoulement dans le canal apical. Cette configuration s'éloigne des conditions physiologiques intestinales et compromet la capacité du modèle à reproduire la physiopathologie intestinale [198], [199].

D'autres dispositifs intègrent un flux contrôlé de milieu de culture. Les dispositifs de van der Helm et Marrero appliquent un flux conduisant à des contraintes de cisaillement pariétales de 0,009 et 0,005 $dyn{\cdot}cm^{-2}$ dans le compartiment apical [197], [200], alors que la valeur de référence est de 0,02 $dyn{\cdot}cm^{-2}$ [159], [160]. Ces valeurs plus faibles traduisent une stimulation mécanique réduite des cellules épithéliales, susceptible d'influencer leur différenciation.

De plus, aucun de ces dispositifs n'intègre de stimulation péristaltique, alors que cette composante mécanique est déterminante pour la physiologie intestinale, en participant à l'organisation des jonctions serrées, à la polarisation cellulaire, à la sécrétion de mucus et à la différenciation épithéliale [160], [154]. Dans le contexte des MICI, ce mécanisme présente un intérêt particulier : l'inflammation peut affecter les cellules musculaires lisses et conduire à des altérations du péristaltisme [24]. Les modèles recensés ne prennent donc pas en compte ces aspects dynamiques du microenvironnement intestinal, qui jouent pourtant un rôle central dans la physiopathologie des MICI.

L'absence ou l'insuffisance de l'écoulement et l'absence de stimulation péristaltique limitent donc la capacité de ces modèles à reproduire le microenvironnement intestinal. Dans le cadre d'applications ciblées sur les MICI, où la dynamique mécanique de la barrière est

déterminante, l'intégration conjointe de contraintes de cisaillement proches des conditions in vivo et de stimulations périodiques simulant le péristaltisme apparaît comme un axe d'amélioration important.

Migration cellulaire possible entre compartiments apical et basolatéral

Un autre paramètre critique est la membrane séparant les compartiments. Bien que les Caco-2 mesurent 10–20 µm, elles peuvent migrer à travers des pores de 2 µm : seules des membranes submicroniques (< 1 µm) garantissent une séparation stricte [208]. Le choix des dimensions des pores de la membrane représente ainsi un paramètre de conception déterminant. Parmi les dispositifs analysés, Brandauer et van der Helm s'appuient sur des membranes à pores relativement large, de 3 µm et 7 µm de diamètre respectivement, favorisant la migration des Caco-2 [198], [197]. À l'inverse, les systèmes de Fernandes et Marrero ont des membranes à pores de 0,4 µm de diamètre, mieux adaptées à la compartimentalisation cellulaire [199], [200]. La littérature rapporte des pores de dimensions variées, mais seules les membranes submicroniques garantissent une compartimentalisation stricte des lignées cellulaires.

II.1.C - LIMITES INSTRUMENTALES

L'instrumentation repose sur des électrodes intégrées dans la puce microfluidique, dont la géométrie les dimensions, le nombre et le placement déterminent directement les propriétés de mesure. L'électrode constitue une composante fonctionnelle du capteur : elle contrôle la distribution spatiale du champ électrique appliqué au système biologique [209].

Électrodes macroscopiques ou microscopiques

Les modèles de van der Helm, Fernandes et Marrero utilisent des électrodes macroscopiques [197], [199], [200]. Leur fabrication est simple, mais leur taille est largement supérieure aux structures cellulaires de 10 à 20 µm. Le volume interrogé inclut une fraction importante de milieu extracellulaire, ce qui dilue la contribution cellulaire et réduit la résolution spatiale. La miniaturisation constitue donc un levier essentiel pour restreindre le volume sondé et renforcer la sensibilité aux phénomènes cellulaires.

Électrodes opposées ou coplanaires

La disposition des électrodes conditionne la direction du champ. Les configurations opposées, caractéristiques des dispositifs TEER et utilisées par van der Helm [197] et Marrero [200], génèrent un champ vertical. Pour des cellules adhérentes, ce champ les contourne partiellement, ce qui limite la variation d'impédance. À l'inverse, les électrodes coplanaires produisent un champ latéral confiné aux couches superficielles, particulièrement sensible aux interactions cellule-substrat, comme illustré en Figure II-2 [209]. Pour des cellules non adhérentes, le constat s'inverse : les électrodes opposées deviennent plus adaptées [209], [210],

[211]. Le choix de la configuration dépend donc du caractère adhérent ou non des cellules étudiées. Dans le cas de l'épithélium intestinal, organisé en monocouche adhérente, la configuration coplanaire est la plus appropriée.

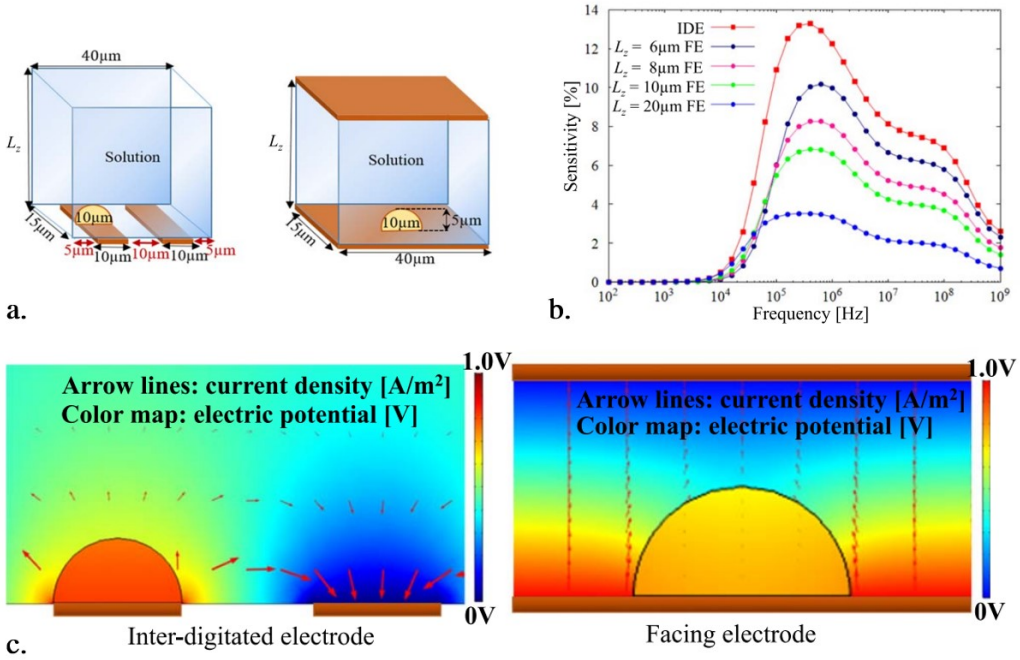


Figure II-2 : Influence de la géométrie des électrodes pour le suivi de cellules adhérentes en spectroscopie d'impédance [209].

(a) Géométries simulées : à gauche, électrodes coplanaires; à droite, électrodes opposées (b) Courbes de sensibilité (% de variation d'impédance) en fonction de la fréquence ; la configuration coplanaire (courbe rouge) permet une meilleure sensibilités que les configurations opposées, quelque soit l'écartement des deux plaques parallèles (de 6 µm à 20 µm, sachant que la cellule est modélisée comme étant épaisse de 5 µm). (c) Cartes de potentiel (code couleur) et lignes de densité de courant (flèches) pour 1 V appliqué : à gauche, le courant se concentre le long des arêtes des électrodes coplanaires et contourne la cellule, d'où une forte perturbation dès qu'elle recouvre ces zones ; à droite, le champ des électrodes opposées reste quasi uniforme et traverse la cellule de façon plus homogène, ce qui réduit la variation d'impédance.

Électrodes interdigitées microscopiques

Le dispositif de Brandauer intègre des électrodes interdigitées microscopiques [198]. Les électrodes interdigitées (IDT) sont constituées de deux électrodes coplanaires en forme de peigne, déposées sur un substrat isolant, comme illustré en en Figure II-3 [212], [213], [214]. Chaque peigne est composé de N doigts conducteurs de largeur W et de longueur L, séparés d'un espacement G. Les IDT sont particulièrement adaptées aux mesures d'impédance en surface, notamment pour l'étude de monocouches de cellules adhérentes [195].

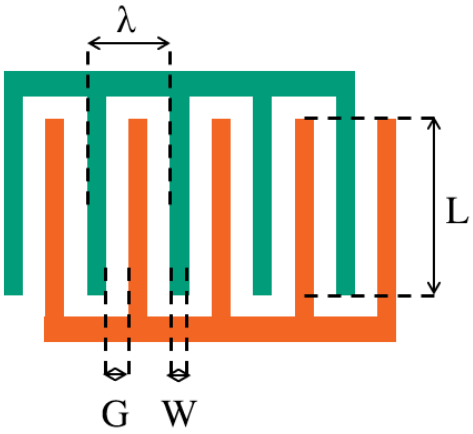


Figure II-3 : Paramètres géométriques d'un capteur à IDT.

La période spatiale des IDT, notée λ, vaut 2(W + G) [215]. Comme illustré en Figure II-4, elle contrôle la profondeur de pénétration du champ électrique, proportionnelle à λ [212], [215], [216]. Cette profondeur correspond à l'épaisseur de milieu effectivement sondée par le capteur. Comme montré en Figure II-5, lorsque λ est de l'ordre du diamètre cellulaire, la cellule recouvre une arête conductrice où le champ est maximal, ce qui entraîne une variation d'impédance mesurable. Si λ est très supérieur à l'épaisseur de la zone à caractériser, le champ se diffuse dans le milieu extracellulaire et la contribution cellulaire diminue ; en dessous de la taille cellulaire, le gain reste marginal et la fabrication devient contraignante [209]. Pour une monocouche, la densité cellulaire intervient également : un tapis confluent contraint le courant à traverser les cellules et accroît la sensibilité, tandis qu'un tapis clairsemé laisse circuler une part importante du champ dans le milieu extracellulaire [209], [217].

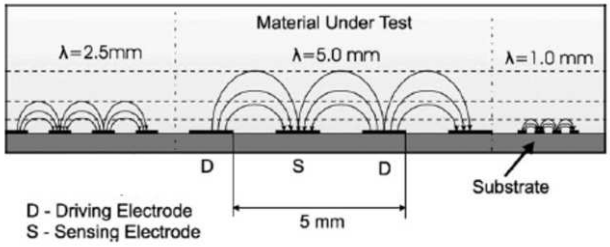


Figure II-4 : Profondeur de pénétration du champ électrique et paramètres géométriques d'électrodes interdigitées [215].

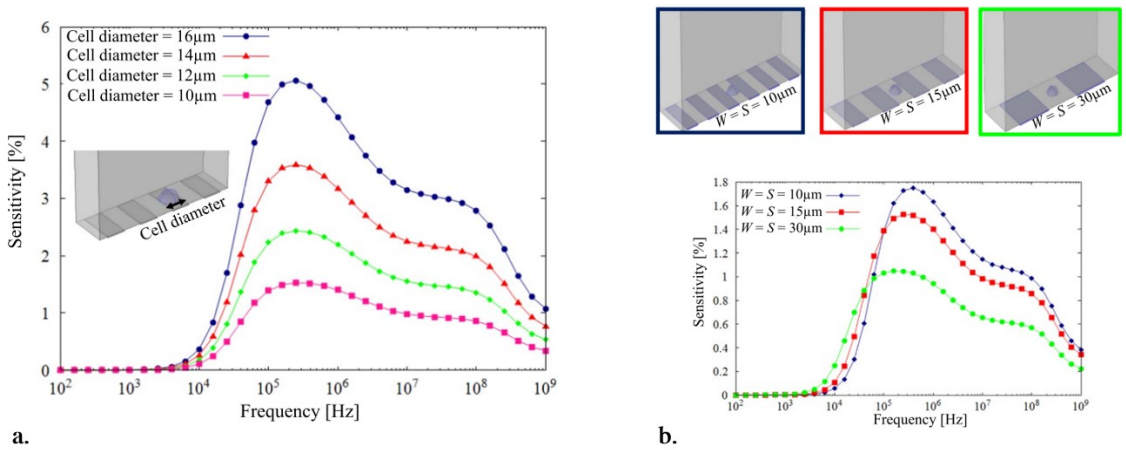


Figure II-5 : Adaptation des dimensions des électrodes interdigitées au diamètre de la cellule adhérente [209].

Résultats de la littérature obtenus par simulations numériques [209]. (a) Courbes de sensibilité en fonction de la fréquence pour des cellules adhérentes de diamètres croissants (10 à 16 µm), positionnées sur une paire d'électrodes interdigitées (W = S = 10 µm). L'augmentation du diamètre cellulaire améliore le recouvrement des arêtes actives, ce qui amplifie la perturbation du champ électrique et la variation d'impédance. (b) Effet de la géométrie des électrodes (W = S de 10 à 30 µm) pour une cellule de taille constante (10 µm). Lorsque les dimensions des doigts électrodes sont ajustées à la taille cellulaire (W = S ≈ d_{cell}), la sensibilité est maximale. Un désajustement, notamment un surdimensionnement, entraîne une dilution du champ dans le milieu environnant et une baisse significative de la réponse.

Les électrodes utilisées par Brandauer présentent une période spatiale de 280 µm, soit environ dix fois le diamètre moyen des cellules intestinales [198]. Cette valeur conduit à un champ distribué sur un volume plus large que celui effectivement occupé par les cellules, ce qui réduit la sensibilité aux phénomènes localisés. Une réduction de λ vers des valeurs proches du diamètre cellulaire permettrait de concentrer le champ au voisinage immédiat de la monocouche et d'accroître la résolution des mesures [209].

II.1.D - LIMITES BIOLOGIQUES

La modélisation microfluidique de l'intestin a pour objectif de reproduire la complexité structurale et fonctionnelle de la muqueuse digestive. Toutefois, les intestins-sur-puce instrumentés par spectroscopie d'impédance recensés au Tableau II-1 s'appuient principalement sur des monocultures de Caco-2 cultivées sur des membranes planes, ce qui permet un suivi électrique de l'intégrité de la barrière. D'autres dimensions peuvent également être prises en compte, telles que la diversité et l'origine cellulaire, la production de mucus, la structuration tridimensionnelle de la muqueuse ou encore l'intégration d'interactions avec le microbiote, le tissu conjonctif et le compartiment immunitaire.

Diversité et origine cellulaire

Les intestins-sur-puce intégrant la spectroscopie d'impédance décrits au Tableau II-1 reposent majoritairement sur la lignée Caco-2. Ce modèle, issu d'un adénocarcinome colorectal, est largement utilisé pour les études de perméabilité en raison de sa capacité à se polariser et à former des jonctions serrées, caractéristiques essentielles de la barrière épithéliale [36], [37]. Son emploi offre l'avantage d'une culture robuste et reproductible [36]. Toutefois, utilisé seul, ce modèle ne restitue pas la diversité cellulaire de l'épithélium intestinal in vivo.

Le dispositif de Brandauer explore des cocultures, soit de manière directe avec des cellules HT29, soit indirecte avec des cellules endothéliales HUVEC [198]. Ces approches démontrent la faisabilité technique de l'intégration de plusieurs types cellulaires dans un même dispositif, mais ne sont accompagnées que de données limitées sur leur impact biologique, comme développé en Figure II-6 : le suivi par spectroscopie d'impédance suit l'établissement de la barrière cellulaire sans fournir de caractérisation complémentaire des propriétés fonctionnelles de l'épithélium.

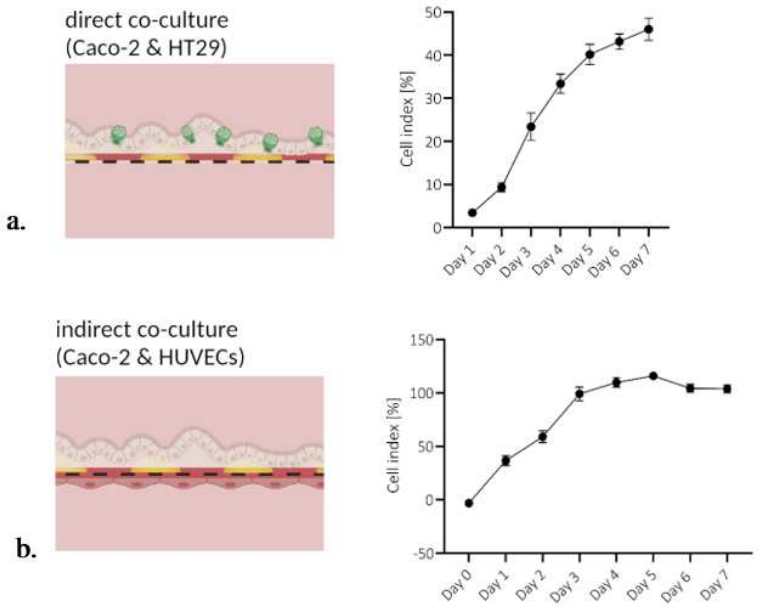


Figure II-6 : Évolution au cours du temps de l'index cellulaire mesuré par spectroscopie d'impédance dans deux configurations de coculture.

Le cell index est défini comme le ratio entre le signal d'impédance de fond (background) et celui mesuré en présence de cellules, à 20 kHz. Il constitue un indicateur indirect de l'intégrité et de la densité cellulaire à l'interface électrode-cellule. A titre de comparaison, le cell index des Caco-2 seules cultivées pendant 14 jours est de 60 %. (a) Coculture directe de Caco-2 et de HT29, au ratio 70:30. Le cell index augmente de manière progressive au fil du temps, traduisant l'établissement progressif de la barrière cellulaire, pour atteindre un plateau à environ 45 % au septième jour. (b) Coculture indirecte entre des Caco-2 et cellules endothéliales HUVECs, cultivées dans des compartiments séparés. Dans ce cas, le cell index augmente rapidement au cours des quatre premiers jours, atteignant un plateau à environ 110 %, suggérant l'établissement de deux barrières distinctes et bien différenciées, reflétant la présence simultanée d'un compartiment épithélial et d'un compartiment endothélial fonctionnels.

Par ailleurs, le recours à des lignées tumorales, y compris en coculture, limite la transposabilité à des pathologies non cancéreuses comme les MICI. Des alternatives plus représentatives incluent les lignées non tumorales ou les cellules primaires issues de biopsies, capables de restituer un épithélium différencié et hétérogène, voire pathologique, ouvrant la voie à des applications en médecine personnalisée.

Production et rôle du mucus

Le mucus constitue une composante essentielle de la barrière intestinale, intervenant à la fois dans la protection mécanique et chimique de l'épithélium et dans la régulation des échanges avec le microbiote [28], [29]. Dans le dispositif de Brandauer, une coculture Caco-2 : HT29 est utilisée au ratio 7:3 [198]. Or, les HT29 présentent une faible capacité de sécrétion de mucines et ne reproduisent que partiellement la fonction des cellules caliciformes, contrairement à la lignée dérivée HT29-MTX qui est classiquement utilisée pour modéliser la couche de mucus [218], [219]. De plus, la proportion cellulaire retenue s'écarte des conditions généralement décrites dans la littérature, où un ratio de 9:1 entre Caco-2 et HT29-MTX est considéré comme plus représentatif de la distribution cellulaire observée in vivo. Ce rapport permet de maintenir à la fois la fonction barrière et une sécrétion de mucus compatible avec la physiologie intestinale [43], [155], [156]. Ainsi, l'adoption d'une coculture Caco-2 : HT29-MTX au ratio 9:1 apparaît comme une piste d'amélioration pour renforcer la pertinence physiologique des modèles.

Représentation morphologique

La structuration tridimensionnelle de la muqueuse intestinale constitue un aspect déterminant encore peu pris en compte dans les dispositifs recensés, où les épithéliums sont cultivés sur des membranes planes. Or, l'architecture en villosités et cryptes, caractéristique de l'intestin, intervient à plusieurs niveaux :

- Elle accroît fortement la surface d'échange grâce à une organisation hiérarchique comprenant les plis circulaires, les villosités et les microvillosités, optimisant l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes, dont plus de 90 % sont absorbés au niveau de l'intestin grêle [26].

- Elle organise aussi la répartition cellulaire : les cryptes abritent les cellules responsables du renouvellement et de la défense antimicrobienne, tandis que les villosités regroupent surtout des cellules d'absorption, de sécrétion de mucus et de régulation hormonale.

- Elle conditionne la colonisation microbienne : les cryptes, zones profondes et peu exposées aux flux luminal, présentent une concentration en oxygène plus faible, créant un microenvironnement favorable aux bactéries anaérobies strictes. À l'inverse, la surface des villosités, recouverte d'une couche de mucus en renouvellement permanent

et directement soumise aux variations mécaniques et chimiques du lumen, est colonisée par une flore plus abondante, dominée par des bactéries anaérobies facultatives capables de tolérer des concentrations plus élevées en oxygène [220], [221].

L'absence de structuration tridimensionnelle se traduit par une simplification morphologique qui réduit la capacité des modèles actuels à reproduire certains aspects essentiels de la physiologie intestinale, comme l'absorption des nutriments, la spécialisation cellulaire ou encore les interactions avec le microbiote. Pour dépasser cette limite, des structures tridimensionnelles, notamment sous forme d'hydrogels microstructurés, peuvent servir de support de culture [147], [106]. Soumis à des conditions dynamiques, ces dispositifs permettent une amélioration du métabolisme cellulaire et une augmentation de la capacité d'absorption [151].

Les modèles intégrant des structures tridimensionnelles, bien que plus proches de l'architecture physiologique, présentent plusieurs limites. Leur fabrication est techniquement complexe, leur reproductibilité reste limitée et leur maintien à long terme, en particulier sous flux dynamique, demeure complexe [222], [223]. De plus, leur intérêt dans l'étude des MICI demeure relatif, dans la mesure où l'altération de la barrière épithéliale constitue un mécanisme central, tandis que la structuration en villosités et cryptes ne joue qu'un rôle secondaire dans les processus inflammatoires [224]. Ce travail se concentre donc sur des modèles plans, plus adaptés à l'analyse directe de l'intégrité de la barrière épithéliale dans les MICI. L'absence de structuration tridimensionnelle reste néanmoins un verrou à lever pour renforcer la pertinence physiologique de l'intestin-sur-puce.

Microenvironnement et interactions tissulaires

La modélisation cellulaire dans les intestins-sur-puce instrumentés repose le plus souvent sur des monocouches de cellules Caco-2, parfois associées à des lignées sécrétrices de mucus, comme évoqué précédemment. Si ces modèles permettent d'examiner des fonctions fondamentales telles que la perméabilité ou la différenciation, ils demeurent limités pour aborder la complexité des MICI. À l'inverse, les dispositifs non instrumentés intègrent déjà une diversification des environnements tissulaires [168], [181], [182]. Cette complexification peut être abordée de façon progressive, comme illustré en Figure II-7. Une première approche de complexification consiste à introduire des bactéries, commensales ou pathogènes, en surface apicale. Cette configuration permet d'analyser les interactions directes entre le microbiote et l'épithélium intestinal, notamment la sécrétion de médiateurs inflammatoires [225], [226]. Cette dimension est particulièrement pertinente dans le cadre des MICI : la dysbiose étant reconnue comme un facteur clé de déséquilibre de l'homéostasie intestinale [227].

Dans le compartiment basolatéral, plusieurs stratégies de modélisation sont possibles. Le dispositif de Brandauer explore une coculture indirecte avec des cellules endothéliales

HUVEC [198], afin de représenter la composante vasculaire. D'autres approches visent à intégrer des fibroblastes, en raison de leur rôle dans les interactions épithélio-mésenchymateuses, la régulation de l'inflammation et la réparation tissulaire. Leur implication dans la fibrose intestinale, notamment dans la maladie de Crohn, est bien établie, les rendant particulièrement pertinents pour modéliser les sténoses liées aux MICI [228], [229]. Malgré leur importance dans la physiopathologie des MICI, leur intégration dans les modèles in vitro reste encore marginale

Enfin, l'intégration de cellules immunitaires permet de reconstituer partiellement le compartiment immunitaire de la muqueuse. Ce compartiment est indispensable à l'étude des réponses inflammatoires : il permet d'étudier la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires [230] et les déséquilibres de la tolérance immunitaire [231], qui sont au cœur de la physiopathologie des MICI. Les cellules épithéliales et les stimulis microbiens participent activement à la modulation de l'immunité, renforçant la pertinence de modèles mimant l'axe microbiote–épithélium–immunité [232].

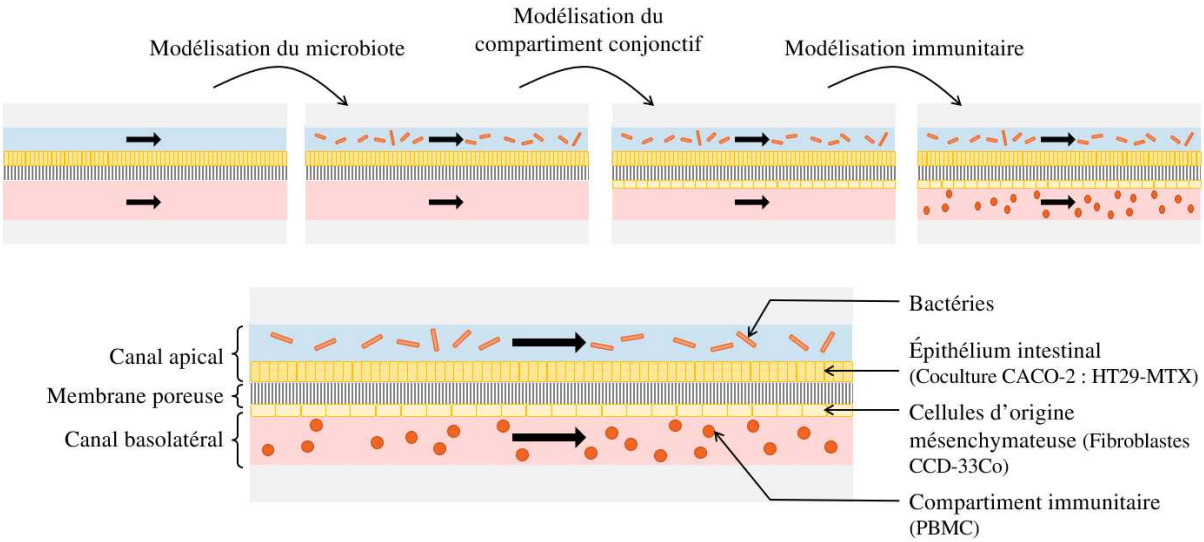


Figure II-7 : Schéma de complexification progressive de l'intestin-sur-puce pour l'étude des MICI.

Le modèle de base repose sur une monocouche épithéliale cultivée sur membrane poreuse. La complexification peut être introduite selon plusieurs axes : ajout d'un microbiote intestinal au niveau apical, incorporation d'un compartiment mésenchymateux basal (fibroblastes CCD-33Co) et intégration d'un compartiment immunitaire (cellules mononuclées du sang périphérique, PBMC).

En résumé, les modèles instrumentés actuels reposent principalement sur des monocultures de Caco-2, qui ne reflètent qu'une partie de la complexité intestinale. L'enrichissement des modèles peut passer par l'introduction de cocultures plus diversifiées, par la prise en compte de la production de mucus, par la reproduction d'une structuration tridimensionnelle de la muqueuse, ainsi que par l'ajout progressif de compartiments

microbiens, conjonctifs ou immunitaires pour mieux appréhender la physiopathologie des MICI.

II.1.E - VUE D'ENSEMBLE DES VERROUS

La conception d'un intestin-sur-puce adapté aux MICI et instrumenté par impédance repose sur la cohérence entre conditions microphysiologiques, représentativité cellulaire, pertinence fonctionnelle et intégration interdisciplinaire. L'analyse des dispositifs existants met en évidence plusieurs pistes d'optimisation, synthétisées en quatre catégories dans la Figure II-8. Une meilleure articulation entre disciplines renforcerait la cohérence physiopathologique et technique. Sur le plan microphysiologique, l'introduction de contraintes mécaniques pertinentes et d'une séparation compartimentale stricte améliorerait la fidélité du modèle. Biologiquement, des cocultures complexes permettraient de mieux reproduire l'organisation intestinale. Enfin, des électrodes microstructurées, adaptées à l'échelle cellulaire, affineraient la détection des variations locales d'impédance. La combinaison de ces leviers ouvre la voie à des dispositifs plus représentatifs et robustes pour l'étude des MICI.

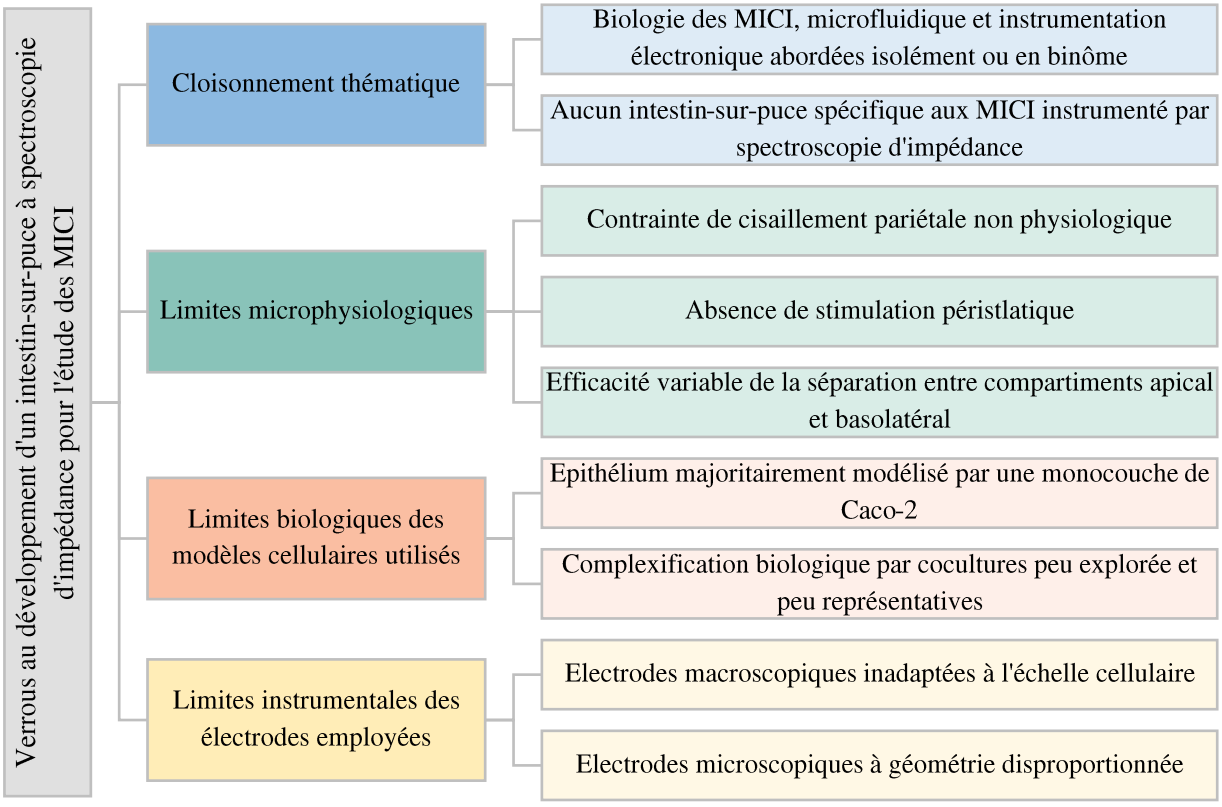


Figure II-8 : Récapitulatif des verrous au développement d'un intestin-sur-puce à spectroscopie d'impédance pour l'étude des MICI.

II.2 - POSITIONNEMENT DU PROJET DE RECHERCHE

Face aux limites des modèles existants, ce projet vise à développer un intestin-sur-puce instrumenté par spectroscopie d'impédance, spécifiquement adapté à l'étude des altérations de la barrière dans les MICI. Il adopte une démarche interdisciplinaire pensée dès la conception, associant modélisation biologique, microfluidique et instrumentation électronique. Contrairement aux approches séquentielles, la plateforme est conçue comme un système cohérent, assurant l'adéquation entre contraintes biologiques, matériaux et exigences de mesure, pour aboutir à un modèle à la fois représentatif des MICI et expérimentalement exploitable.

II.2.A - MODELISER LA BARRIERE INTESTINALE

Afin de dépasser les limites des monocouches homogènes de Caco-2, ce projet utilise une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1), modèle in vitro reconnu pour l'étude de la fonction barrière. Les Caco-2 assurent la polarisation et les jonctions serrées, tandis que les HT29-MTX produisent du mucus, reproduisant ainsi les composantes physique et chimique de l'intestin [43], [44]. Ce modèle, robuste et reproductible, est compatible avec la microfluidique et le suivi par spectroscopie d'impédance [43], [155], [156].

Bien que ce modèle constitue une amélioration par rapport à la littérature, il reste limité pour représenter la complexité tissulaire de l'intestin humain. Il ne prend pas en compte les interactions avec le compartiment immunitaire, les cellules mésenchymateuses ou le microbiote. De plus, l'origine tumorale des lignées réduit sa transposabilité aux MICI. Pour anticiper ces limites, la plateforme a été conçue dès l'origine comme un système modulaire, capable d'évoluer vers des configurations plus représentatives. Son architecture microfluidique, sa compartimentation et ses matériaux adaptés offrent cette marge d'adaptation sans modification structurelle. Comme illustré en Figure II-9, deux axes d'évolution sont envisagés :

- Le premier concerne l'enrichissement fonctionnel : ajout de fibroblastes ou de cellules endothéliales sous la membrane pour reproduire le soutien mésenchymateux, introduction de cellules immunitaires dans le canal basolatéral pour étudier l'activation immunitaire et apport de bactéries dans le canal apical une fois la couche de mucus fonctionnelle.

- Le second concerne l'origine cellulaire : le remplacement des lignées par des cellules primaires issues de biopsies de patients atteints de MICI permettrait d'accroître la fidélité physiologique et la pertinence clinique. Malgré des contraintes techniques en culture et approvisionnement, cette évolution ouvre la voie à des approches personnalisées.

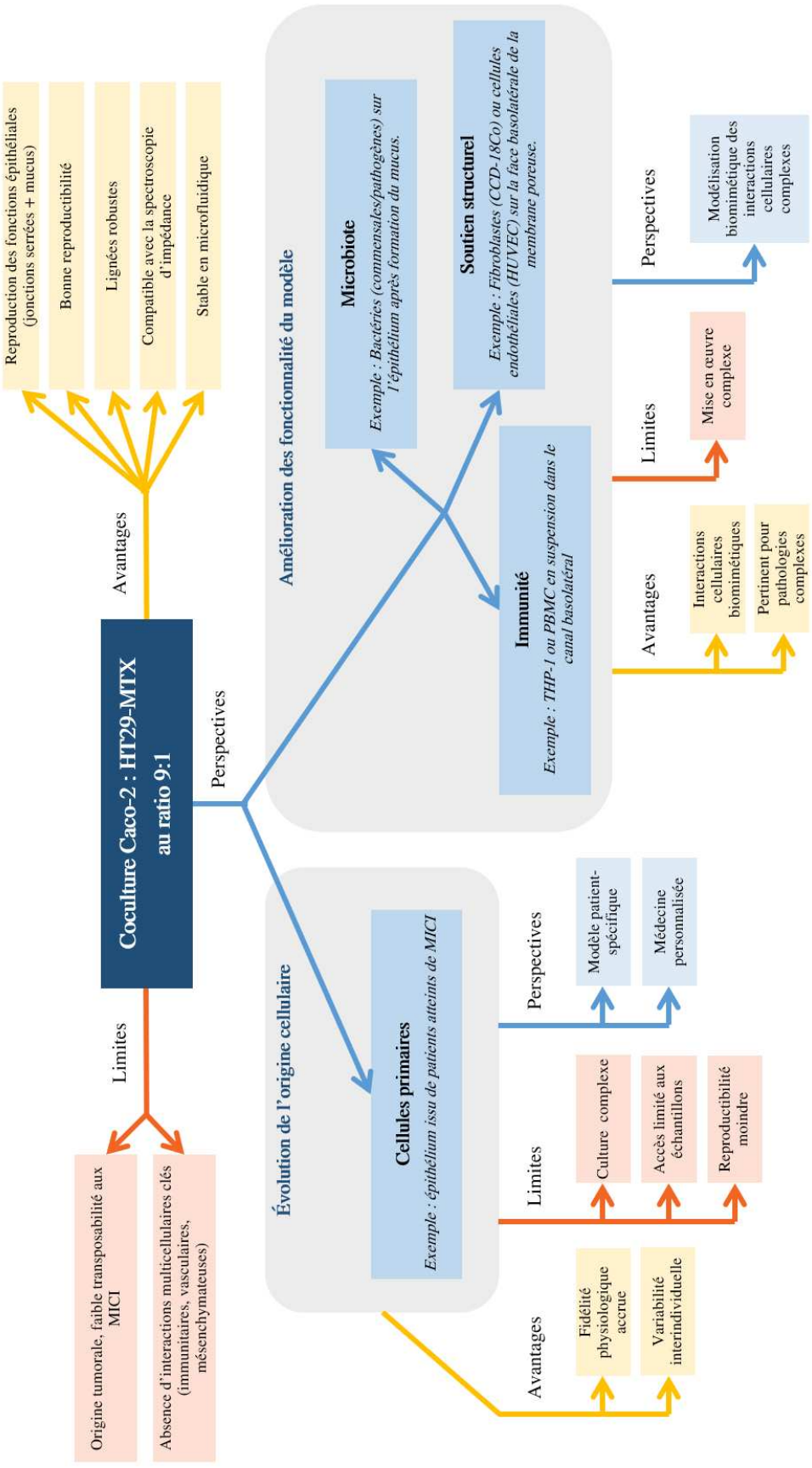


Figure II-9 : Stratégies d'évolution du modèle cellulaire intestinal dans le dispositif développé.

II.2.B - RECREER UN MICRO-ENVIRONNEMENT BIOMIMETIQUE

La fidélité d'un modèle in vitro repose en grande partie sur sa capacité à reproduire les conditions physiologiques du tissu cible. Dans le cas de l'intestin, cela implique de recréer non seulement l'architecture physique de la barrière, mais aussi les contraintes mécaniques qui structurent son micro-environnement.

Architecture microfluidique

Le dispositif développé dans le cadre de ce travail repose sur une architecture microfluidique constituée de deux canaux superposés séparés par une membrane microporeuse, comme illustré en Figure II-10. Ce choix s'appuie sur la littérature : cette géométrie constitue le standard des intestins-sur-puce [125] et est compatible avec les mesures par spectroscopie d'impédance [198], [197], [199], [200].

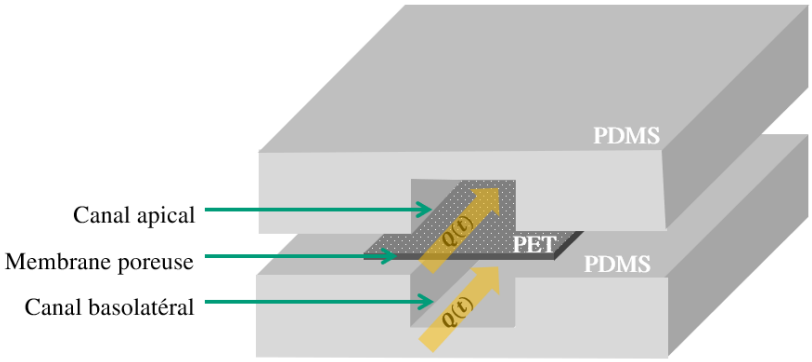


Figure II-10 : Vue éclatée de l'architecture de la puce microfluidique.

La puce est composée de deux canaux en PDMS séparés par une membrane poreuse en PET. Les flèches jaunes indiquent les directions du flux de milieu de culture dans les canaux apical et basolatéral. Ce flux est pulsé, de type péristaltique, et varie dans le temps selon un débit volumique Q(t).

Il est à noter que des architectures plus complexes, en particulier des dispositifs à trois canaux sont mentionnées dans la littérature. Ces dispositifs impliquent une complexité technologique accrue, alors que des approches fonctionnellement équivalentes peuvent être mises en œuvre dans une géométrie à deux canaux. Par exemple, la coculture indirecte de cellules endothéliales et épithéliales en présence de microbiote a été réalisée avec succès aussi bien dans des dispositifs à trois canaux [182] que dans des systèmes bicouche [181]. De même, les interactions hôte-microbiote, parfois modélisées dans des configurations tri-compartimentées [168], peuvent être reproduites dans un format à deux compartiments [164]. La géométrie retenue permet donc d'accueillir des modèles cellulaires avancés et constitue une

base évolutive, adaptée à une complexification progressive sans modification structurelle du dispositif.

Le PDMS a été retenu comme matériau pour la fabrication de la puce microfluidique, en raison de ses nombreux avantages. Il permet une réalisation rapide, précise et peu coûteuse, ce qui en fait un support souple et adaptable, particulièrement approprié aux phases de prototypage et d'optimisation. Sa transparence facilite l'imagerie par microscopie optique et sa perméabilité aux gaz (CO_2 et O_2) favorise l'oxygénation des cellules épithéliales [233], [234], [235], [236], [237]. Cette propriété constitue toutefois une limite car elle complique la culture de bactéries strictement anaérobies. Le PDMS reste néanmoins compatible avec de nombreuses souches aérobies et anaérobies facultatives [171].

Le dispositif intègre une membrane commerciale en PET à pores de 0,4 µm, couramment utilisée dans les intestins-sur-puce [238]. Ce matériau est compatible avec les mesures électriques [153], accepte divers traitements de surface, peut être facilement découpé et inséré dans des supports et présente une bonne stabilité mécanique en conditions de flux [239], [240]. Ses pores submicroniques empêchent la migration cellulaire entre compartiments [208]. Ces atouts s'accompagnent de contraintes. L'intégration de la membrane requiert un assemblage spécifique et l'imagerie optique en temps réel de la barrière cellulaire peut être limitée. En effet, la transparence du PET dépend de la taille et de la densité des pores : lorsque les pores sont fins et nombreux, la diffusion lumineuse augmente, réduisant la transmission optique et rendant la membrane translucide [241], [242].

Le dispositif repose sur une surface plane, sans structuration tridimensionnelle. Certains modèles de la littérature intègrent des reliefs 3D pour reproduire les villosités intestinales, mais ces structures complexifient la fabrication, réduisent la compatibilité avec les mesures électriques et compliquent l'imagerie optique [106], [151], [149], [152]. Or, une surface plane suffit à induire une organisation fonctionnelle : les cellules forment spontanément un épithélium polarisé avec microvillosités et jonctions serrées [153], [154]. Le choix d'une géométrie plane répond ainsi à une logique de simplification, garantissant une fabrication accessible et des mesures reproductibles sans compromettre la pertinence biologique du modèle.

Simulation des contraintes physiologiques

Pour reproduire les contraintes mécaniques clés du microenvironnement intestinal, le dispositif utilise une perfusion de milieu de culture assurée par une pompe péristaltique externe. Ce système génère un flux rythmé non stationnaire dans les canaux, mimant partiellement la dynamique péristaltique. La contrainte de cisaillement visée est de 0,02 $dyn.cm^{-2}$, valeur physiologique de référence pour simuler le flux luminal intestinal [159], [160].

L'utilisation d'une pompe péristaltique externe présente plusieurs avantages. D'un point de vue technique, elle permet une application stable, reproductible et contrôlée du cisaillement

visé, à travers un seul système, tout en induisant des effets biologiques notables sur la barrière épithéliale [162], [153], [154], [160]. En comparaison, la stimulation péristaltique pneumatique latérale, bien que plus biomimétique sur le plan mécanique, présente plusieurs limitations dans le contexte de ce projet. Ce type de configuration repose sur une architecture multicouche complexe, sensible aux défauts d'assemblage et difficile à mettre en œuvre [164], [165], [166]. Sur le plan instrumental, ces déformations latérales sont incompatibles avec l'intégration stable d'électrodes au contact de la couche cellulaire. Les variations de pression perturbent la géométrie locale et le champ électrique, compromettant ainsi la stabilité de l'interface cellule-électrode et la fiabilité des mesures d'impédance, sensibles aux changements structurels du microenvironnement. Ainsi, la pompe péristaltique externe constitue un choix de simplification et de robustesse, permettant d'introduire des sollicitations mécaniques pertinentes tout en restant compatible avec les objectifs expérimentaux du projet.

II.2.C - SUIVRE L'INTEGRITE DE LA BARRIERE

Caractérisation électrique des cellules par spectroscopie d'impédance

L'étude des MICI requiert un suivi continu et non destructif des altérations dynamiques de la barrière intestinale. La spectroscopie d'impédance répond à cet objectif, à condition que la géométrie électrode–échantillon soit précisément adaptée. Le projet se concentre sur l'optimisation d'électrodes interdigitées (IDT) microscopiques, particulièrement pertinentes pour l'analyse de monocouches adhérentes et compatibles avec une intégration directe dans des dispositifs microfluidiques [195], [193], [209], [210], [211].

Les IDT concentrent le champ électrique au niveau de l'interface cellule-substrat. Lorsque la période spatiale des électrodes est de l'ordre du diamètre cellulaire, la variation d'impédance mesurée est maximisée [212], [215], [216]. Cette focalisation du champ constitue un atout majeur pour la détection de perturbations locales de la barrière, notamment dans des contextes inflammatoires [195], [193].

Afin de quantifier l'effet de la géométrie, plusieurs IDT sont comparées, avec des périodes comprises entre 25 et 200 µm, comme détaillé au Tableau II-3. Cette gamme couvre à la fois des dimensions proches de celles des cellules et des géométries plus larges, similaires à celles déjà rapportées dans la littérature (jusqu'à 280 µm chez Brandauer [198]).

Tableau II-3 : Paramètres géométriques des électrodes interdigitées définies pour l'optimisation dimensionnelle.

Référence	Largeur des doigts W	Espacement entre deux doigts adjacents G	Période spatiale $\lambda = 2(W + G)$	Nombre de doigts
IDT 1	7,5 µm	5 µm	25 µm	40 paires
IDT 2	15 µm	10 µm	50 µm	20 paires
IDT 3	30 µm	20 µm	100 µm	10 paires
IDT 4	60 µm	40 µm	200 µm	5 paires

Le choix de tester différentes périodicités se justifie tout d'abord par l'impact direct de cette dimension sur la distribution du champ électrique et donc sur la sensibilité de la mesure. Des périodes proches du diamètre cellulaire, comme celles des électrodes IDT1 et IDT2, concentrent le champ à l'interface cellule–substrat. L'impédance reflète alors principalement l'adhésion et l'intégrité des jonctions serrées, ce qui rend cette configuration adaptée à la détection précoce de perturbations locales de la barrière épithéliale, notamment en contexte inflammatoire associé aux MICI. À l'inverse, des périodes plus larges, telles que celles des électrodes IDT3, IDT4 et celles rapportées par Brandauer [198] sondent un volume plus important et reflètent davantage le milieu extracellulaire. À mesure que la période augmente, la contribution relative de la monocouche s'atténue, au profit d'une interaction plus marquée avec l'environnement immédiat, qui peut inclure le milieu de culture ou le mucus sécrété par les cellules.

L'exploration de plusieurs périodicités s'inscrit également dans une réflexion plus large sur la position optimale des électrodes dans l'intestin-sur-puce. En effet, dans ce dispositif, les cellules sont cultivées sur une membrane poreuse en PET séparant deux compartiments microfluidiques. Placer des électrodes directement sur la membrane offrirait une sensibilité maximale en rapprochant le champ électrique des cellules, mais cette approche est écartée pour deux raisons technologiques :

- D'une part, le protocole de fabrication des électrodes requiert des températures de recuit pouvant atteindre 150 °C, valeur nettement supérieure à la température de transition vitreuse du PET [243], entraînant une déformation irréversible de la membrane et la fermeture des pores.

- D'autre part, le dépôt métallique obstrue mécaniquement les pores situés sous les électrodes, ce qui perturbe la perméabilité locale et crée des hétérogénéités de l'environnement cellulaire.

Les électrodes doivent donc être placées à distance, dans les canaux microfluidiques, comme dans les dispositifs de van der Helm [197], Fernandes [199] et Marrero [200]. Ce

positionnement impose un compromis géométrique : la période spatiale doit être ajustée à la distance électrodes–membrane afin de maintenir un couplage efficace, ce qui justifie l'exploration de plusieurs périodicités. De plus, le placement d'électrodes de part et d'autre de la membrane, comme illustré en Figure II-11, ouvre la possibilité de deux configurations de mesure distinctes : une mesure transmembranaire, où le champ traverse l'ensemble du dispositif et de ses cultures cellulaires, et une mesure monocouche, limitée à un canal unique.

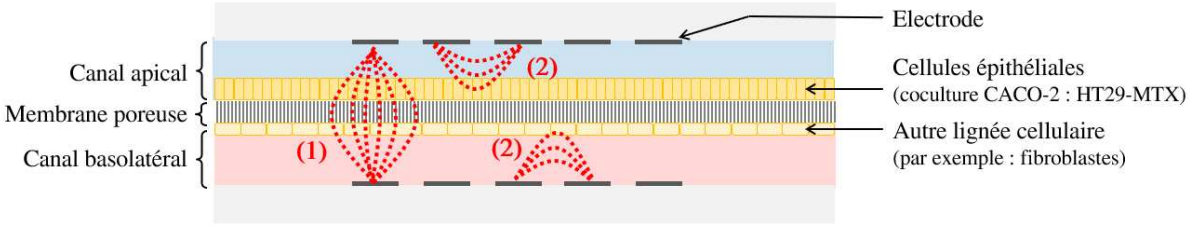


Figure II-11 : Configurations de mesure électrique par IDT dans l'intestin-sur-puce.

Représentation en coupe transversale de l'intestin-sur-puce. Des cellules adhérentes sont cultivées de part et d'autre d'une membrane poreuse. Des IDT sont intégrées dans les parois des canaux. Deux configurations de mesure sont possibles : (1) la mesure transmembranaire, où le champ électrique traverse la membrane et les deux monocouches en vis-à-vis ; (2) la mesure monocouche, limitée à un canal unique et sensible aux altérations locales.

Ces électrodes sont d'abord caractérisées hors puce, sur supports indépendants, afin de valider leur réponse électrique et d'optimiser les protocoles de mesure. Une fois les dimensions optimales identifiées, elles pourront être intégrées dans les canaux microfluidiques pour permettre le suivi de la monocouche cellulaire dans des conditions biomimétiques.

Caractérisation morphologique et validation biologique

La validation du modèle développé s'appuie sur des méthodes faciles à implémenter et non destructives, destinées à compléter les mesures d'impédance. Dans la littérature, les intestins-sur-puce sont souvent caractérisés par des techniques lourdes, telles que l'immunomarquage couplé à la microscopie confocale ou la microscopie électronique, offrant une résolution fine mais incompatibles avec un suivi dynamique sous flux. Ces techniques sont détaillées en Annexe C.

Dans ce projet, trois approches complémentaires sont retenues. La microscopie optique en contraste de phase permet un suivi direct de la confluence, de la morphologie et d'éventuelles altérations macroscopiques. Une coloration ponctuelle LIVE/DEAD fournit une estimation rapide de la viabilité cellulaire directement sur puce. Enfin, la microscopie à force atomique (AFM) apporte une caractérisation locale à haute résolution de la topographie des cellules. L'association de ces indicateurs morphologiques et biologiques garantit une validation robuste des mesures électriques et une évaluation de l'état de la barrière.

II.3 - CONCEPTION DE L'INTESTIN-SUR-PUCE

La conception de la puce constitue une étape centrale dans le développement de l'intestin-sur-puce. Cette section présente d'abord le design retenu et l'organisation générale du dispositif. Ensuite les choix de conception sont détaillés, en particulier la géométrie des chambres et la sélection de la membrane poreuse. Enfin, une analyse hydraulique est proposée, combinant approches analytiques et simulations numériques, afin de caractériser les conditions d'écoulement et les contraintes de cisaillement appliquées aux cellules.

II.3.A - DESCRIPTION DU DESIGN RETENU

La puce microfluidique développée repose sur une organisation bicouche constituée de deux compartiments fluidiques distincts, disposés en vis-à-vis et séparés par une membrane poreuse. Cette architecture reproduit de manière simplifiée la polarité d'un épithélium, avec une interface apicale exposée au flux luminal et communiquant avec le compartiment basolatéral.

Chaque chambre présente une géométrie circulaire de 10 mm de diamètre et 1,5 mm de hauteur. Elles sont superposées de part et d'autre de la membrane poreuse. Afin de permettre l'alimentation et l'évacuation des milieux, chaque chambre est reliée à des canaux d'entrée et de sortie rectangulaires, de 15 mm de longueur, 10 mm de largeur et 1,5 mm de hauteur. Ces canaux assurent la circulation du milieu de culture et garantissent la stabilité des conditions hydrodynamiques. La Figure II-12 illustre la disposition générale du dispositif, avec une vue en plan et une vue en coupe. La vue supérieure met en évidence l'agencement symétrique des chambres circulaires et leur connexion aux canaux d'entrée et de sortie. La vue en coupe montre la superposition des deux compartiments et la position centrale de la membrane poreuse.

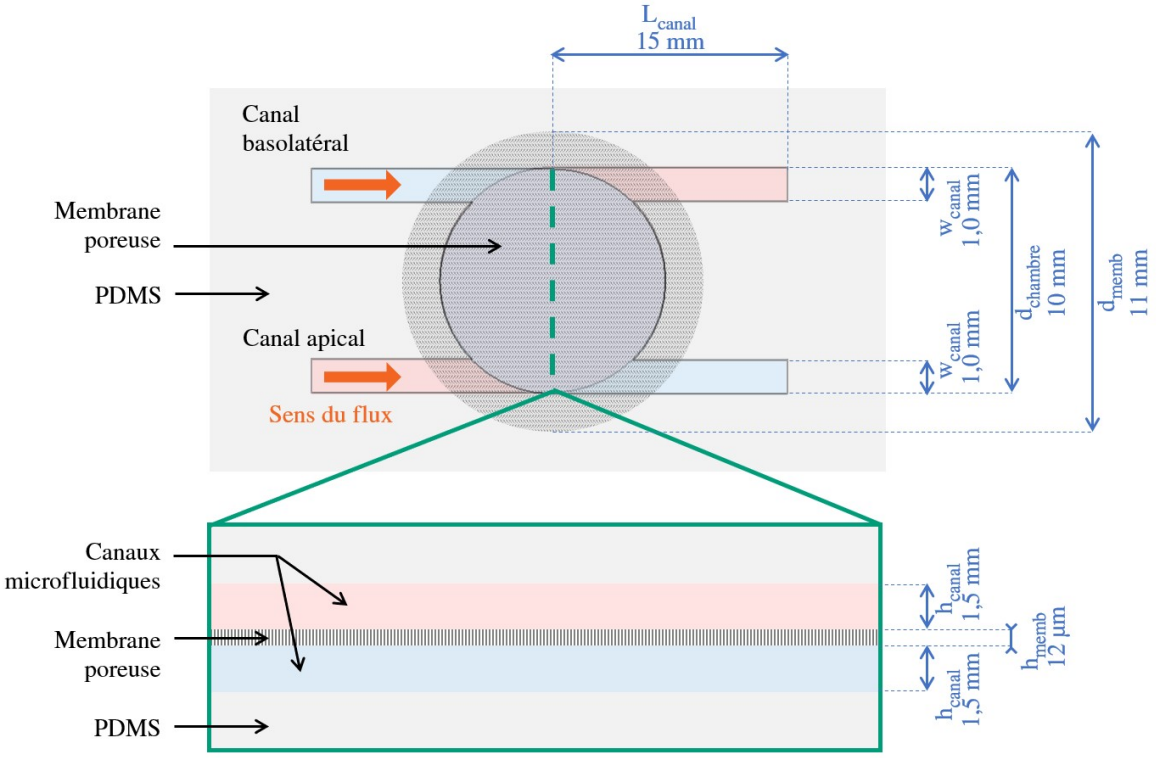


Figure II-12 : Vue en plan et en coupe du dispositif microfluidique.

Vue de dessus et coupe de la puce microfluidique composée de deux chambres circulaires, de diamètre 10 mm et de hauteur 1,5 mm. Elles sont séparées par une membrane poreuse circulaire de diamètre 11 mm et d'épaisseur 12 µm. Chaque chambre est connectée à un canal d'entrée et un canal de sortie rectangulaires, de longueur 15 mm, de largeur 10 mm et de hauteur 1,5 mm. Le canal apical (rouge) et le canal basolatéral (bleu) permettent l'alimentation et la recirculation des milieux de culture de part et d'autre de la membrane. La vue en coupe (en bas) met en évidence la position centrale de la membrane entre les deux canaux microfluidiques, permettant les échanges entre les compartiments.

Les dimensions caractéristiques de l'ensemble de la puce sont récapitulées dans le Tableau II-4. Les volumes internes ont été déterminés, en considérant les chambres comme des cylindres et les canaux comme des parallélépipèdes. Ainsi, le volume interne total, en négligeant le volume des pores de la membrane, est $V_{total} = 2\,V_{chambre} + 4\,V_{canal} = 3{,}3 \times 10^2$ µL.

Tableau II-4 : Paramètres géométriques des chambres et canaux de la puce microfluidique.

Zone	Paramètre	Notation	Valeur
Canal rectiligne	Longueur	L_{canal}	15 mm
	Largeur	w_{canal}	1,0 mm
	Hauteur	h_{canal}	1,5 mm
	Volume	$V_{canal} = L_{canal} \times w_{canal} \times h_{canal}$	23 µL
Chambre circulaire	Diamètre	$d_{chambre}$	10 mm
	Hauteur	$h_{chambre} = h_{canal}$	1,5 mm
	Volume	$V_{chambre} = \pi \left(\frac{d_{chambre}}{2}\right)^2 \times h_{canal}$	$1{,}2 \times 10^2$ µL
	Surface du disque de la chambre	$S_{chambre} = \pi \left(\frac{d_{chambre}}{2}\right)^2$	79 mm^2

II.3.B - JUSTIFICATION DU CHOIX D'UNE CHAMBRE CYLINDRIQUE

Le choix d'une géométrie circulaire pour les compartiments fluidiques constitue un élément fondamental de la conception du dispositif. Cette configuration répond à plusieurs objectifs qui concernent à la fois la dynamique des fluides, la qualité du microenvironnement cellulaire et la fiabilité des expériences.

Limiter les bulles d'air

Sur le plan hydrodynamique, la formation de bulles d'air constitue l'un des problèmes majeurs rencontrés dans les systèmes microfluidiques, en particulier lorsqu'ils sont utilisés pour la culture cellulaire dynamique. Ces bulles apparaissent fréquemment lors des étapes de remplissage, en raison du dégazage des matériaux ou encore de variations de température et de pression. Leur présence au sein d'un canal ou d'une chambre perturbe profondément l'écoulement. L'interface air-liquide engendre des contraintes de cisaillement localement très élevées, susceptibles d'endommager la monocouche cellulaire. Lorsqu'une bulle entre en contact avec les cellules, elle peut induire un décollement partiel ou une destruction irréversible de l'épithélium. En outre, les bulles compartimentent artificiellement l'espace de culture, ce qui altère la diffusion homogène des nutriments et favorise l'accumulation locale de déchets métaboliques [244], [245].

La géométrie des chambres influence directement la probabilité de piégeage et la stabilité des bulles. Les configurations rectangulaires présentent des coins abrupts qui agissent

comme des pièges, favorisant la rétention durable de bulles dans ces zones protégées du flux. À l'inverse, les géométries circulaires suppriment ces niches angulaires et réduisent significativement le risque de stabilisation des bulles, comme le montre la Figure II-13 [244].

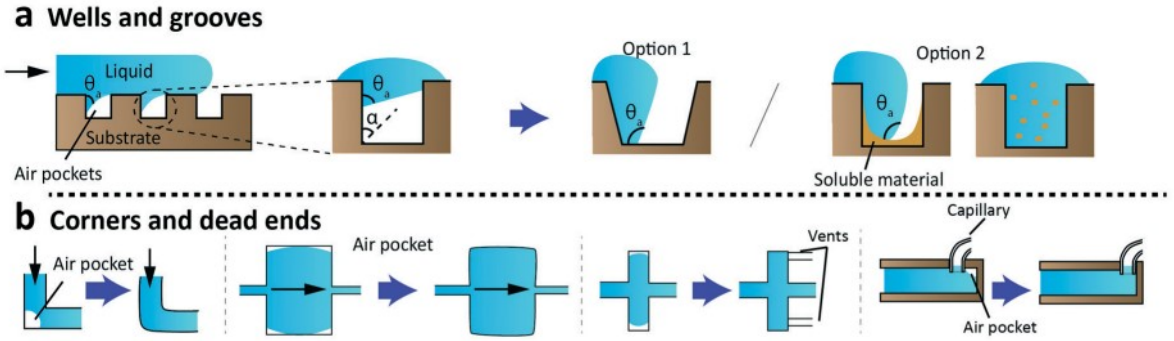


Figure II-13 : Mécanismes de piégeage des bulles d'air dans les dispositifs microfluidiques [244].

(a) Les puits et rainures constituent des zones favorables à l'accumulation de poches d'air en raison de l'angle de contact du liquide avec le substrat. Deux solutions sont envisageables pour limiter ce phénomène : le remplissage par un matériau soluble ou l'adaptation de l'angle de mouillage. (b) Les coins et extrémités fermées représentent des zones de piégeage récurrentes, où des poches d'air persistent après remplissage. L'ajout de conduits de ventilation ou la modification de la géométrie permettent de réduire leur stabilité.

En adoptant une géométrie circulaire, le dispositif développé ici élimine donc les discontinuités géométriques propices à l'ancrage gazeux. Ce choix réduit considérablement la probabilité d'apparition de bulles stables, limite les perturbations hydrodynamiques et contribue à préserver l'intégrité et la viabilité de la culture épithéliale.

Augmenter la surface de culture

Les premières itérations du dispositif adoptent une géométrie rectiligne pour les zones de culture, comme illustré en Figure II-14. Ce choix initial repose sur la simplicité de conception et de fabrication. Cependant, cette configuration se révèle rapidement insuffisante en pratique. Sa surface utile de culture faible : pour un canal de 1 cm de long et de 1 mm de largeur, la surface vaut 10 mm², soit l'équivalent d'un puits de plaque 384 puits. Une telle aire limite fortement le nombre de cellules pouvant être cultivées et compromet la représentativité statistique des analyses. Afin de surmonter cette contrainte, la géométrie de la zone de culture évolue vers une configuration circulaire.

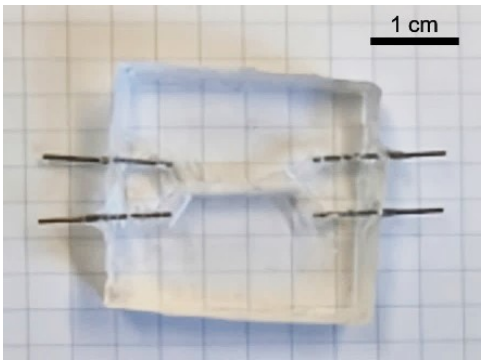


Figure II-14 : Première version rectiligne des chambres microfluidiques, présentant une surface de culture limitée.

La forme circulaire optimise la surface disponible pour la culture cellulaire. Avec un diamètre de 10 mm et une hauteur de 1,5 mm, chaque compartiment offre une surface de 78,5 mm² pour un volume de 118 µL. Cette valeur place la chambre dans une gamme intermédiaire entre un puits de plaque 96 puits, dont la surface moyenne est de 33 mm², et un puits de plaque 48 puits, qui atteint environ 95 mm². Cette position intermédiaire constitue un compromis particulièrement intéressant. Elle assure une surface suffisante pour établir une monocouche représentative, tout en maintenant un volume limité qui facilite le contrôle des gradients de concentration et le renouvellement efficace du milieu.

Ces dimensions permettent d'accueillir un nombre de cellules pertinent au regard des standards de culture. En considérant un diamètre moyen $d_{cellule} \approx 15\,\mu m$ pour une cellule épithéliale intestinale et une culture à confluence recouvrant l'entièreté de la surface, l'ordre de grandeur du nombre de cellules peut être estimé par l'Équation II-1.

$$N_{cellules} = \frac{\text{Surface totale}}{\text{Surface d'une cellule}} = \frac{S_{chambre}}{\pi \left(\frac{d_{cellule}}{2}\right)^2} \approx 4 \times 10^5 \text{ cellules}$$

Équation II-1 : Estimation du nombre de cellules en culture dans une chambre circulaire à confluence.

Avec :

$N_{cellules}$	le nombre total de cellules en culture, sans unité.
$S_{chambre}$	la surface de la chambre de culture, en [m3].
$d_{cellule}$	le diamètre cellulaire, en [m].

Cet ordre de grandeur est en accord avec les densités de culture classiquement utilisées dans les systèmes standards et garantit la possibilité de conduire des analyses quantitatives fiables.

Faciliter l'intégration d'électrodes

Au-delà des considérations hydrodynamiques et biologiques, la géométrie circulaire présente également des atouts notables pour l'intégration d'électrodes. En effet, dans une chambre rectangulaire, la présence d'angles vifs introduit des hétérogénéités locales de champ et complique l'interprétation des signaux enregistrés. À l'inverse, une géométrie circulaire réduit ces effets de bords.

II.3.C - ANALYSE HYDRAULIQUE

Le contrôle des écoulements constitue un paramètre critique pour le fonctionnement du dispositif car il conditionne à la fois l'homogénéité de l'environnement cellulaire et la stabilité des conditions expérimentales. La caractérisation hydraulique est d'abord menée à l'aide de calculs analytiques puis est complétée par des simulations numériques offrant une description plus détaillée. L'association de ces approches permet ainsi d'évaluer de manière cohérente et hiérarchisée les performances hydrauliques du dispositif.

II.3.C.a - Approche analytique : contraintes hydrodynamiques cibles

Les sollicitations mécaniques luminales auxquelles sont soumises les cellules intestinales in vivo, la contrainte de cisaillement pariétale cible est fixée à $\tau_w = 0{,}02\ \mathrm{dyn.cm^{-2}} = 2 \times 10^{-3}\ \mathrm{Pa}$ [159], [160]. Cette valeur correspond aux contraintes physiologiques rapportées dans la littérature, jouant un rôle essentiel dans la polarisation de l'épithélium intestinal, le renforcement des jonctions serrées et la stimulation de la sécrétion de mucus [159], [160].

Le but de la modélisation est donc de déterminer les grandeurs hydrodynamiques permettant d'atteindre ce niveau de cisaillement dans le dispositif. Dans un premier temps, l'analyse se concentre sur la chambre de culture car c'est la zone où les cellules sont exposées directement aux forces de cisaillement. Dans un second temps, le raisonnement est étendu aux canaux d'entrée et de sortie, dont la géométrie modifie l'écoulement.

Dans la chambre de culture

La chambre circulaire constitue la zone principale d'intérêt, puisqu'elle correspond à la surface de culture des cellules épithéliales intestinales.

D'un point de vue géométrique, la chambre est un cylindre de diamètre $d_{chambre}$ et de hauteur $h_{chambre}$. Pour des considérations hydrodynamiques, sa section peut être assimilée à une

section rectangulaire de hauteur constante $h_{chambre}$ et de largeur variable $w_{chambre}(x, y)$, dépendant de la position dans l'espace. Comme illustré en Figure II-15, la largeur est minimale est située à l'interface avec les canaux d'entrée et de sortie, où elle correspond à la largeur du canal $w_{chambre,min} = d_{canal}$. Elle atteint sa valeur maximale au centre de la chambre, égale au diamètre du cylindre : $w_{chambre,max} = d_{chambre}$.

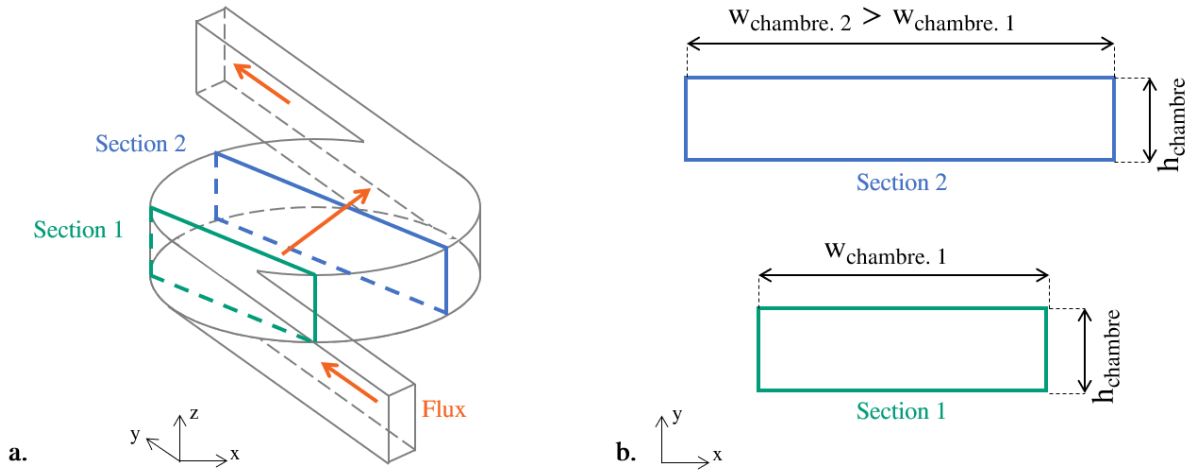


Figure II-15 : Représentation des sections pour l'analyse hydrodynamique de la chambre.

(a) Schéma 3D de la puce microfluidique montrant deux sections, l'une bleue et l'autre verte, dans la chambre. Le flux est représenté par les flèches orange. (b) Représentation 2D des sections transversales rectangulaire, mettant en évidence leur hauteur constante et leur largeur variable.

Dans la suite du raisonnement, la situation la plus défavorable à l'établissement d'une contrainte de cisaillement élevée est volontairement choisie : il s'agit de la configuration où la largeur est maximale. En effet, pour un débit donné, l'augmentation de la largeur de la section diminue la vitesse moyenne de l'écoulement et, par conséquent, diminue la contrainte de cisaillement appliquée. Ce choix garantit que le débit cible déterminé sera suffisant pour imposer la contrainte souhaitée dans toute la chambre.

Le fluide circulant dans le dispositif est un milieu de culture cellulaire maintenu à 37 °C, et non de l'eau pure. Ses propriétés diffèrent de celles de l'eau et dépendent notamment de la concentration en sérum de veau fœtal (SVF). Le

Tableau II-5 présente les valeurs de densité volumique et de viscosité dynamique pour plusieurs milieux de culture standards [246].

Tableau II-5 : Densité volumique et viscosité dynamique des milieux de cultures standards [246].

	Density (g/cm³)		Dynamic Viscosity (mPa.s)	
%FBS (v/v)	DMEM (high glucose)	RPMI-1640	DMEM (high glucose)	RPMI-1640
0	1.000 ± 0.001	0.999 ± 0.003	0.731 ± 0.015	0.733 ± 0.006
5	1.002 ± 0.003	1.002 ± 0.002	0.862 ± 0.029	0.848 ± 0.021
10	1.009 ± 0.003	1.007 ± 0.002	0.930 ± 0.034	0.958 ± 0.032
20	1.023 ± 0.005	1.020 ± 0.005	1.050 ± 0.027	1.089 ± 0.044
Water		0.995 ± 0.002	0.659 ± 0.017	
PBS		0.998 ± 0.002	N/A	
NCI-H460 spent medium		1.015 ± 0.003	0.954 ± 0.070	
HN6 spent medium		1.013 ± 0.003	1.086 ± 0.073	

La densité volumique est exprimée en g·cm⁻³ et la viscosité dynamique en mPa·s. Le pourcentage de FBS correspond au sérum de veau fœtal noté SVF et exprimé en fraction volumique. DMEM high glucose désigne le milieu de culture Dulbecco modifié enrichi en glucose à forte concentration, environ 4,5 g·L⁻¹, tandis que RPMI-1640 est un milieu de culture cellulaire standard. PBS correspond à une solution saline tamponnée au phosphate.

Dans le cas étudié, les cellules Caco-2 et HT29-MTX sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) high glucose, c'est-à-dire un milieu enrichi en glucose à forte concentration (environ 4,5 g·L⁻¹), supplémenté avec 10 % de SVF. La viscosité dynamique adoptée est donc : $\eta_{culture} = 0{,}93$ mPa. s, soit 59 % plus élevée que celle de l'eau à 37 °C. Cette différence souligne l'importance d'utiliser les propriétés physico-chimiques réelles du fluide expérimental. Aussi, la densité volumique de ce milieu de culture est : $\rho_{culture} = 1{,}009$ g. cm^{-3} [246].

Il est possible de calculer le débit volumique nécessaire pour obtenir la contrainte de cisaillement pariétale cible dans la chambre de culture, comme cela est fait à l'Équation II-2 :

$$Q_{cible} = \frac{\tau_w \times w_{chambre,max} \times (h_{chambre})^2}{6\,\eta_{culture}} = 4{,}8 \times 10^2\ \mu L.\ min^{-1} = 8{,}0\ \mu L.\ s^{-1}$$

Équation II-2 : Calcul du débit volumique cible.

Avec :

- Q_{cible} le débit volumique du milieu de culture, en [m^3. s^{-1}].
- τ_w la contrainte de cisaillement pariétale, en [Pa].
- $w_{chambre,max}$ la largeur de la chambre de culture, en [m].
- $h_{chambre}$ la hauteur de la chambre de culture, en [m].
- $\eta_{culture}$ la viscosité dynamique du milieu de culture, en [Pa.s].

Ce débit est compatible avec les capacités des pompes péristaltiques standards, assurant ainsi la faisabilité expérimentale du dispositif. La vitesse moyenne de l'écoulement dans la chambre peut être déduite du débit volumique cible. Pour une section rectangulaire de largeur $w_{chambre,max}$ et de hauteur $h_{chambre}$, la relation est donnée à l'Équation II-3 :

$$V_{cible,chambre} = \frac{\text{débit volumique}}{\text{section traversée}} = \frac{Q_{cible}}{w_{chambre,max} \times h_{chambre}} = 5{,}4 \times 10^{-4}\ \text{m.s}^{-1}$$

Équation II-3 : Calcul de la vitesse moyenne dans la chambre.

Avec :

$V_{cible,chambre}$	la vitesse du fluide dans la chambre, en $[m \cdot s^{-1}]$.
Q_{cible}	le débit volumique du milieu de culture, en $[m^3.s^{-1}]$.
$w_{chambre,max}$	la largeur de la chambre de culture, en [m].
$h_{chambre}$	la hauteur de la chambre de culture, en [m].

Afin de caractériser l'écoulement en déterminant le nombre de Reynolds, il est nécessaire d'introduire le diamètre hydraulique associé, développé en Annexe A, pour une section rectangulaire, qui est calculé à l'Équation II-4 :

$$D_{h,chambre} = \frac{2\, w_{chambre,max} \times h_{chambre}}{w_{chambre,max} + h_{chambre}} = 2{,}6\ \text{mm}$$

Équation II-4 : Calcul du diamètre hydraulique de la chambre.

Avec :

$D_{h,chambre}$	le diamètre hydraulique équivalent, en [m].
$w_{chambre,max}$	la largeur de la chambre de culture, en [m].
$h_{chambre}$	la hauteur de la chambre de culture, en [m].

Le nombre de Reynolds associé à l'écoulement dans la chambre est déterminé à l'Équation II-5 :

$$Re_{cible,chambre} = \frac{\rho_{culture} \times V_{cible,chambre} \times D_{h,chambre}}{\eta_{culture}} = 1{,}5$$

Équation II-5 : Calcul du nombre de Reynolds dans la chambre.

Avec :

$Re_{cible,chambre}$	le nombre de Reynolds dans la chambre de culture, sans unité.
$\rho_{culture}$	la masse volumique du milieu de culture, en $[kg \cdot m^{-3}]$.
$V_{cible,chambre}$	la vitesse du fluide dans la chambre, en $[m \cdot s^{-1}]$.
$D_{h,chambre}$	le diamètre hydraulique équivalent, en [m].
$\eta_{culture}$	la viscosité dynamique du milieu de culture, en [Pa.s].

Ainsi, $Re_{cible,chambre} \ll 2000$ confirme que l'écoulement se situe en régime laminaire. Dans ces conditions, l'écoulement stable, prévisible et dépourvu de turbulences, garantissant que les cellules sont exposées à une contrainte homogène et reproductible.

Dans les canaux d'entrée et de sortie

Après avoir dimensionné l'écoulement dans la chambre de culture, il convient d'analyser les conditions hydrodynamiques dans les canaux d'entrée et de sortie. Ces canaux, bien qu'ils n'accueillent pas de cellules, conditionnent l'alimentation hydrodynamique de la chambre et la stabilité de l'écoulement imposé.

Le débit volumique Q_{cible}, défini précédemment pour atteindre la contrainte pariétale cible dans la chambre, est identique dans les canaux. En considérant la section rectangulaire de largeur w_{canal} et de hauteur h_{canal}, la vitesse moyenne d'écoulement des canaux est calculée à l'Équation II-6 :

$$V_{cible,canal} = \frac{Q_{cible}}{w_{canal} \times h_{canal}} = 5{,}3 \times 10^{-3}\ \mathrm{m.\,s^{-1}}$$

Équation II-6 : Calcul de la vitesse moyenne dans les canaux.

Avec :

$V_{cible,canal}$	la vitesse du fluide dans le canal, en $[m \cdot s^{-1}]$.
Q_{cible}	le débit volumique du milieu de culture, en $[m^3.s^{-1}]$.
w_{canal}	la largeur du canal, en [m].
h_{canal}	la hauteur du canal, en [m].

La vitesse moyenne est environ dix fois plus élevée dans les canaux que dans la chambre, ce qui est attendu du fait de leur section réduite.

Le diamètre hydraulique associé, adapté aux sections non circulaires, est donné à l'Équation II-7 :

$$D_{h,canal} = \frac{2\, w_{canal} \times h_{canal}}{w_{canal} + h_{canal}} = 1{,}2\ \mathrm{mm}$$

Équation II-7 : Calcul du diamètre hydraulique des canaux.

Avec :

$D_{h,canal}$	le diamètre hydraulique équivalent du canal, en [m].
w_{canal}	la largeur du canal, en [m].
h_{canal}	la hauteur du canal, en [m].

En considérant toujours du DMEM supplémenté à 10% de SVF, le nombre de Reynolds peut alors être calculé, disponible à l'Équation II-8 :

$$Re_{cible,canal} = \frac{\rho_{culture} \times V_{cible,canal} \times D_{h,canal}}{\eta_{culture}} = 6{,}9$$

Équation II-8 : Calcul du nombre de Reynolds dans les canaux.

Avec :

$Re_{cible,canal}$	le nombre de Reynolds dans le canal, sans unité.
$\rho_{culture}$	la masse volumique du milieu de culture, en $[kg.m^{-3}]$.
$V_{cible,canal}$	la vitesse du fluide dans le canal, en $[m \cdot s^{-1}]$.
$D_{h,canal}$	le diamètre hydraulique équivalent du canal, en [m].
$\eta_{culture}$	la viscosité dynamique du milieu de culture, en [Pa.s].

Ici encore, $Re_{cible,canal} \ll 2000$, confirmant le régime laminaire. Bien qu'ils n'hébergent pas de cellules, ces conduits assurent une distribution stable du milieu et conditionnent la reproductibilité des sollicitations appliquées à l'épithélium intestinal dans la chambre.

Discussion

Les calculs réalisés montrent que l'obtention d'une contrainte de cisaillement pariétale de $\tau_w = 0{,}02$ dyn. cm^{-2} nécessite un débit de 8,0 µL. s^{-1}. Ce débit est compatible avec les capacités des pompes péristaltiques commerciales, mais implique un volume de milieu de culture très important. En effet, ce débit correspond à 6,9 L. j^{-1}. Un tel volume constitue une contrainte expérimentale significative, à la fois en termes de coûts et de logistique d'alimentation et impose souvent la mise en place de systèmes de recirculation.

Une première approche pour réduire cette consommation serait de diminuer les dimensions du dispositif, en particulier la hauteur du compartiment, actuellement fixé à 1,5 mm. Une réduction de cette dimension abaisserait le débit nécessaire tout en maintenant la valeur cible de cisaillement. Toutefois, ce type d'optimisation doit être mis en regard du choix assumé d'une conception millifluidique. Contrairement aux systèmes microfluidiques, qui permettent de travailler avec de très faibles volumes, la millifluidique offre une hauteur de compartiment comparable à celle de la lumière intestinale et laisse un espace suffisant pour le développement de structures tridimensionnelles comme les villosités. Ces caractéristiques sont essentielles pour obtenir un modèle biologiquement pertinent.

Ainsi, le débit relativement élevé requis dans la configuration actuelle ne reflète pas une limitation du système, mais plutôt la conséquence directe du dimensionnement millifluidique. Ce choix représente à la fois une contrainte technique, liée à la consommation accrue de milieu et un atout biologique, garantissant un microenvironnement plus proche de la physiologie intestinale. Ces résultats mettent en évidence le compromis central de la conception : fournir une stimulation mécanique réaliste pour les cellules tout en préservant une architecture adaptée au développement morphologique et fonctionnel du tissu épithélial intestinal.

Les équations analytiques permettent de dimensionner le système à l'échelle globale. Néanmoins, l'étude des gradients locaux de vitesse et de cisaillement, déterminants pour le comportement cellulaire, nécessite l'utilisation d'une approche numérique, qui est l'objet de la section suivante.

II.3.C.b - Approche numérique : simulations par éléments finis

Les simulations par éléments finis sont réalisées à l'aide de COMSOL Multiphysics® (COMSOL AB, Suède), qui permet de résoudre numériquement les équations de la mécanique des fluides dans des géométries complexes.

La simulation numérique offre un cadre contrôlé pour analyser l'influence des conditions aux limites et accéder à des grandeurs difficilement mesurables expérimentalement, comme la contrainte de cisaillement pariétal. Elle constitue aussi un outil prédictif reliant les conditions opératoires aux contraintes effectivement perçues par les cellules. Ses limites résident dans les hypothèses de simplification adoptées et dans la dépendance des résultats à la qualité du maillage et aux paramètres numériques.

Les simulations effectuées visent avant tout à valider les hypothèses théoriques formulées précédemment. Pour cela, les distributions de pression, de vitesse et de contrainte de cisaillement pariétal sont caractérisées au sein du dispositif microfluidique.

Hypothèses de modélisation

Les deux compartiments de la puce microfluidique sont géométriquement identiques (chambres circulaires de 10 mm de diamètre et 1,5 mm de hauteur, disposées de part et d'autre d'une membrane poreuse) et reliés à des canaux d'entrée/sortie de mêmes dimensions. Aussi, en considérant que les deux compartiments sont alimentés en milieu de culture de façon identique, conduisent à des champs de pression quasi identiques de part et d'autre de la membrane. La différence de pression transmembranaire reste donc proche de zéro en régime laminaire stationnaire, de sorte que tout flux convectif à travers les pores est fortement limité.

Pour quantifier l'effet d'un léger déséquilibre éventuel, le flux normal à travers la membrane peut être estimé. En effet, en considérant un écoulement laminaire stationnaire et incompressible dans un pore cylindrique de diamètre d_{pore} et de longueur $h_{membrane}$, la vitesse moyenne de l'écoulement dans le pore est donnée par la loi de Poiseuille, donné à l'Équation II-9.

$$Q_{pore} = \frac{\pi \times \left(\frac{d_{pore}}{2}\right)^4}{8\,\eta_{culture} \times h_{membrane}} \Delta P_{membrane}$$

Équation II-9 : Loi de Poiseuille.

Avec :

Q_{pore}	le débit volumique traversant un pore, en $[m^3.s^{-1}]$.
d_{pore}	le diamètre d'un pore de la membrane, en [m].
$h_{membrane}$	l'épaisseur de la membrane poreuse, en [m].
$\eta_{culture}$	la viscosité dynamique du milieu de culture, en [Pa.s].
$\Delta P_{membrane}$	la différence de pression de part et d'autre de la membrane, en [Pa].

En divisant le débit volumique par la section du pore, la vitesse moyenne de l'écoulement dans le pore cylindrique est obtenue, comme indiqué à l'Équation II-10 :

$$V_{pore} = \frac{Q_{pore}}{\pi \times \left(\frac{d_{pore}}{2}\right)^2} = \frac{\left(\frac{d_{pore}}{2}\right)^2}{8\,\eta_{culture} \times h_{membrane}} \times \Delta P_{membrane}$$

Équation II-10 : Vitesse moyenne dans un pore cylindrique.

Avec :

V_{pore}	la vitesse moyenne du fluide dans un pore, en $[m.\,s^{-1}]$.
Q_{pore}	le débit volumique traversant un pore, en $[m^3.s^{-1}]$.
d_{pore}	le diamètre d'un pore de la membrane, en [m].
$h_{membrane}$	l'épaisseur de la membrane poreuse, en [m].
$\eta_{culture}$	la viscosité dynamique du milieu de culture, en [Pa.s].
$\Delta P_{membrane}$	la différence de pression de part et d'autre de la membrane, en [Pa].

La vitesse moyenne surfacique transmembranaire s'obtient en multipliant par la fraction surfacique de pores ε_{pore}, comme donné à l'Équation II-11 :

$$V_{membrane} = V_{pore} \times \varepsilon_{pore} = \frac{\varepsilon_{pore} \times \left(\frac{d_{pore}}{2}\right)^2}{8\,\eta_{culture} \times h_{membrane}} \times \Delta P_{membrane}$$

Équation II-11 : Vitesse surfacique transmembranaire.

Avec :

$V_{membrane}$	la vitesse moyenne surfacique du flux transmembranaire, en $[m.s^{-1}]$.
ε_{pore}	la fraction surfacique occupée par les pores de la membrane, sans unité.
V_{pore}	la vitesse moyenne du fluide dans un pore, en $[m.s^{-1}]$.
d_{pore}	le diamètre d'un pore de la membrane, en [m].
$h_{membrane}$	l'épaisseur de la membrane poreuse, en [m].
$\eta_{culture}$	la viscosité dynamique du milieu de culture, en [Pa.s].
$\Delta P_{membrane}$	la différence de pression de part et d'autre de la membrane, en [Pa].

Le débit volumique traversant la membrane s'obtient en multipliant la vitesse surfacique par la surface de la chambre $S_{chambre}$, comme indiqué l'Équation II-12 :

$$Q_{membrane} = V_{membrane} \times S_{chambre} = \frac{\varepsilon_{pore} \times \left(\frac{d_{pore}}{2}\right)^2 \times S_{chambre}}{8\,\eta_{culture} \times h_{membrane}} \times \Delta P_{membrane}$$

Équation II-12 : Débit volumique transmembranaire.

Avec :

$Q_{membrane}$	le débit volumique total à travers la membrane, en $[m^3.s^{-1}]$.
$V_{membrane}$	la vitesse moyenne surfacique du flux transmembranaire, en $[m.s^{-1}]$.
$S_{chambre}$	la surface de la chambre de culture, en [m²].
ε_{pore}	la fraction surfacique occupée par les pores de la membrane, sans unité.
d_{pore}	le diamètre d'un pore de la membrane, en [m].
$h_{membrane}$	l'épaisseur de la membrane poreuse, en [m].
$\eta_{culture}$	la viscosité dynamique du milieu de culture, en [Pa.s].
$\Delta P_{membrane}$	la différence de pression de part et d'autre de la membrane, en [Pa].

En considérant une différence de pression $\Delta P_{membrane} = 10$ Pa, choisie de manière arbitraire comme ordre de grandeur volontairement élevé, la valeur du débit volumique est de $Q_{membrane} = 2{,}7\ \mu L.min^{-1}$. En comparaison avec le débit volumique imposé dans la chambre $Q_{cible} = 4{,}8 \times 10^2\ \mu L.min^{-1}$, la fuite transmembranaire représente 0,6 % du flux et est donc négligeable.

Ainsi, dans le cadre des simulations numériques, l'effet de la membrane séparant les deux compartiments est négligée. Aucun écoulement n'est considéré au travers des pores : la membrane est assimilée à une paroi imperméable. Alors, la puce microfluidique est équivalente

à deux compartiments identiques n'interagissant pas. En conséquence, l'analyse peut se limiter à un seul compartiment.

Cette hypothèse permet de s'affranchir d'une modélisation multi-échelle dans laquelle chaque pore de la membrane serait représenté. Une telle approche conduirait à des maillages gigantesques et à des temps de calcul très longs. En revanche, l'assimilation de la membrane à une paroi imperméable limite l'analyse aux seuls champs hydrodynamiques. Les phénomènes de transport à travers la membrane ne peuvent pas être décrits dans ce cadre et nécessiteraient l'introduction d'un modèle de perméabilité équivalente.

Paramètres de la modélisation

Compte tenu des hypothèses de modélisation, un seul compartiment est considéré. Celui-ci comprend une chambre circulaire et deux canaux d'entrée et de sortie. Les caractéristiques géométriques utilisées dans la simulation sont celles décrites au Tableau II-4. Ce compartiment est considéré comme rempli de milieu de culture, assimilé à un fluide newtonien incompressible de densité volumique $\rho_{culture}$ et de viscosité dynamique $\eta_{culture}$.

L'écoulement est modélisé avec le module Laminar Flow (spf) de COMSOL Multiphysics®, qui résout les équations de Navier–Stokes pour un fluide newtonien incompressible. En effet, le caractère laminaire du régime d'écoulement est confirmé par les valeurs du nombre de Reynolds dans les canaux $Re_{cible,canal} = 6{,}9$ et dans la chambre $Re_{cible,chambre} = 1{,}5$.

Une condition de non-glissement est appliquée aux parois solides : la vitesse du fluide est nulle au contact, ce qui reflète l'adhérence du fluide et permet de calculer la contrainte de cisaillement pariétal, grandeur d'intérêt pour les cellules. À l'entrée, une vitesse normale uniforme est imposée, égale à $V_{cible,canal}$. Cette condition correspond au débit expérimental voulu. À la sortie, une pression nulle est imposée. Cette condition définit simplement une référence de pression et permet au fluide de s'évacuer librement, sans influencer artificiellement l'écoulement en amont. Ces conditions sont illustrées en Figure II-16.

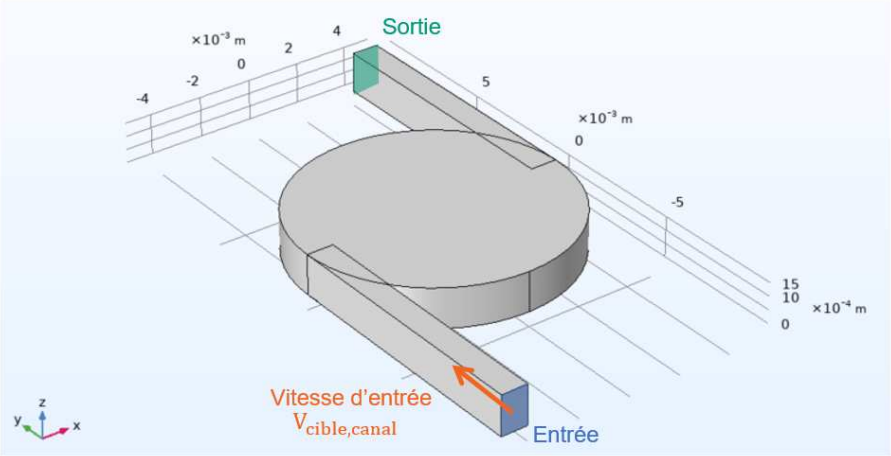


Figure II-16 : Géométrie du compartiment simulé et conditions aux limites appliquées.

Le maillage est généré automatiquement par l'algorithme de raffinement contrôlé par la physique proposé par COMSOL Multiphysics®. Cette stratégie permet de raffiner localement la discrétisation dans les zones où de forts gradients de vitesse et de pression sont attendus, en particulier au voisinage des parois et dans les canaux d'entrée et de sortie, tout en limitant le nombre total d'éléments. Le maillage final, illustré en Figure II-17, comporte 232 000 éléments volumiques, 23 564 éléments de surface et 1158 éléments d'arête. Ce niveau de discrétisation assure un compromis satisfaisant entre précision numérique et temps de calcul.

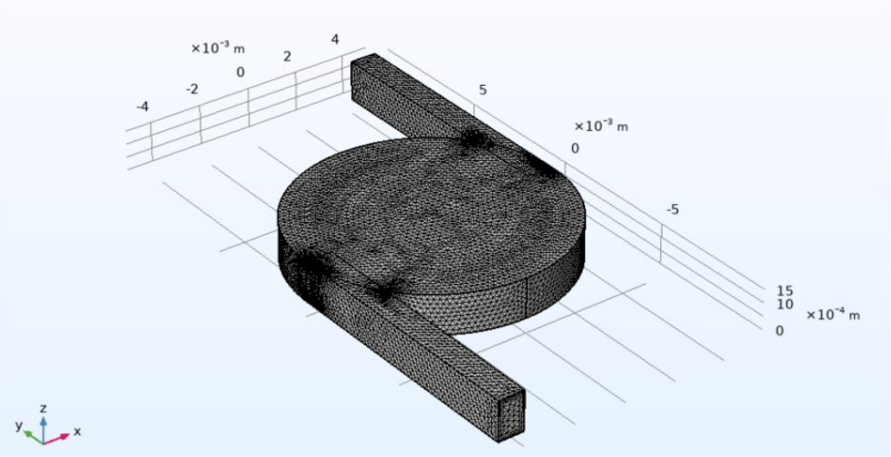


Figure II-17 : Maillage du compartiment simulé.

Choix d'une étude stationnaire

Les simulations sont réalisées en régime stationnaire, c'est-à-dire seules les solutions correspondant à l'état permanent de l'écoulement sont recherchées, sans tenir compte de la phase transitoire qui précède.

Ce choix est justifié par les caractéristiques du dispositif. En effet, l'écoulement est laminaire : il ne présente pas de fluctuations temporelles, ce qui permet de décrire correctement

le système par une solution permanente. De plus, le temps caractéristique de convection, défini par l'Équation II-13, fournit une estimation de la durée nécessaire à l'établissement du régime stationnaire :

$$\tau_{canal} \sim \frac{L_{canal}}{V_{cible,canal}} = 2{,}8 \text{ s}$$

Équation II-13 : Détermination du temps caractéristique de convection.

Avec :

τ_{canal}	le temps caractéristique de convection, en [s].
L_{canal}	la longueur du canal, en [m].
$V_{cible,canal}$	la vitesse moyenne de l'écoulement dans le canal, en $[m.s^{-1}]$.

Ainsi, ce temps caractéristique de l'ordre de quelques secondes reste négligeable au regard de la durée des expériences, qui s'étend sur plusieurs dizaines de minutes à plusieurs heures. La phase transitoire est donc négligeable à l'échelle des phénomènes étudiés, ce qui justifie le recours à une étude stationnaire.

Distribution de la pression

La Figure II-18 présente la cartographie de la pression simulée dans un plan médian du compartiment, en $z = 0{,}75$ mm. Le champ de pression est maximal au niveau de la section d'entrée et décroît de manière continue le long du canal et de la chambre jusqu'à atteindre la valeur de référence nulle à la sortie, conformément à la condition aux limites imposée. Ce gradient de pression est le moteur de l'écoulement laminaire : il entraîne le fluide des zones d'entrée, où la pression est plus élevée, vers la sortie, où la pression est fixée à la référence. Ainsi, la décroissance régulière observée confirme la cohérence du modèle numérique et l'adéquation entre les conditions imposées et le comportement simulé.

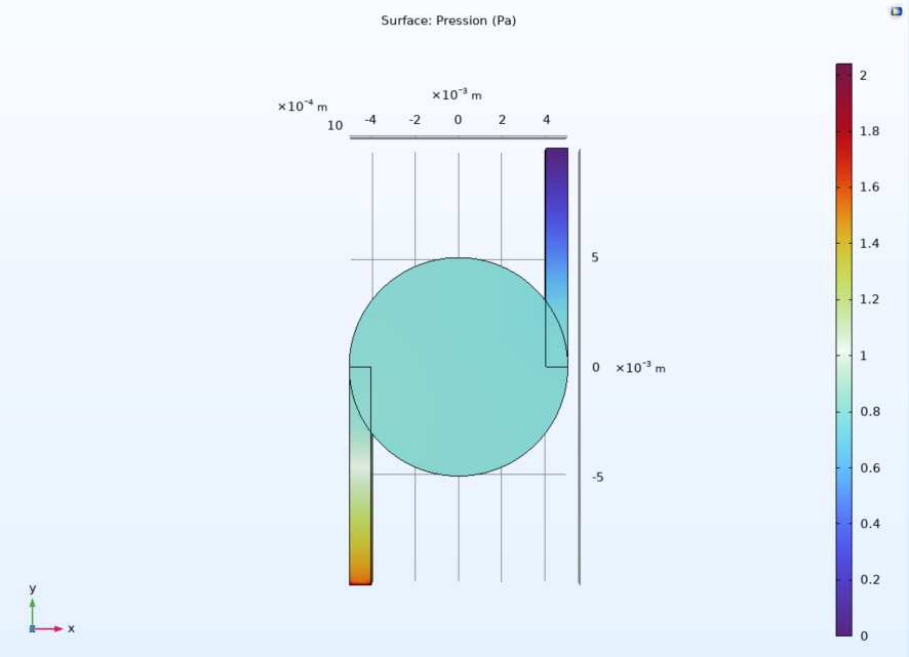


Figure II-18 : Cartographie de la pression simulée dans un plan médian de la chambre (z=0,75 mm).

Distribution de la vitesse

La Figure II-19 illustre la norme du champ de vitesse dans un plan médian du compartiment, en z = 0,75 mm, superposée aux lignes de courant du champ de vitesse.

Les zones de forte vitesse sont localisées dans les canaux d'entrée et de sortie, où la section réduite des canaux impose une accélération du fluide par conservation du débit volumique. À l'inverse, dans la chambre circulaire, la vitesse moyenne chute fortement en raison de l'élargissement brutal de la section.

La distribution spatiale des lignes de courant confirme cette observation. Celles-ci divergent radialement depuis l'entrée, parcourent la chambre en se répartissant dans tout le volume, puis convergent à nouveau vers la sortie. Cette organisation reflète le caractère incompressible de l'écoulement et illustre l'adaptation progressive du fluide à la géométrie imposée.

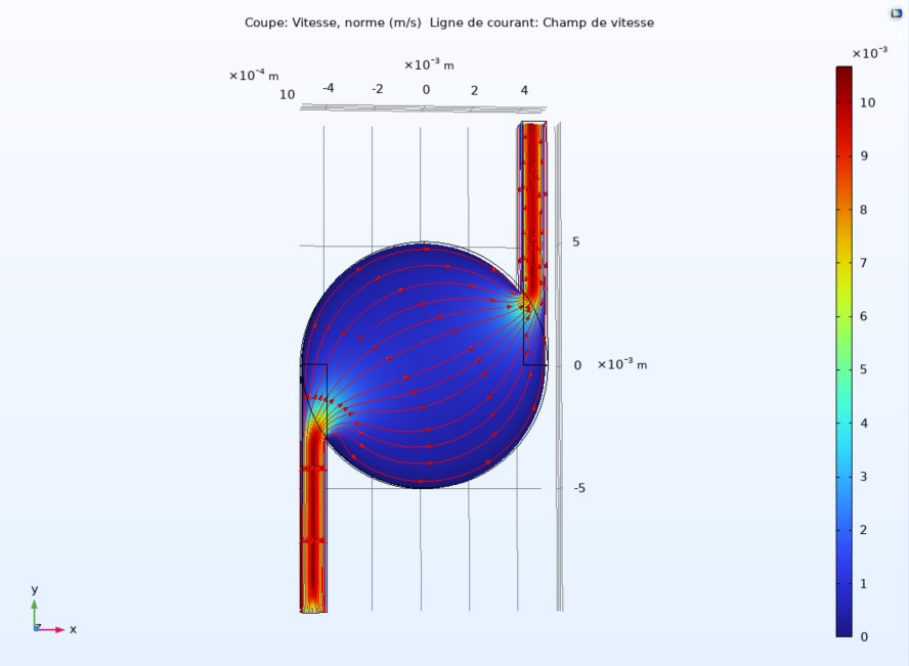


Figure II-19 : Distribution de la vitesse dans le compartiment.

Cartographie de la norme de la vitesse dans le plan médian horizontal du compartiment, en z = 0,75 mm. Les lignes de courant du champ de vitesse sont représentées en rouge, avec des flèches régulièrement espacées selon la longueur d'arc et dont la taille est proportionnelle au logarithme de la vitesse locale.

Un agrandissement présenté en Figure II-20 met en évidence une limite du dispositif actuel : la transition abrupte entre le canal et la chambre crée une zone de faible vitesse au niveau de l'angle inférieur droit. Dans un contexte expérimental, cette hétérogénéité hydraulique peut conduire à une irrigation non uniforme de la chambre, limitant localement l'apport en nutriments et en oxygène et induisant une répartition hétérogène des contraintes mécaniques appliquées aux cellules. L'adoption d'une transition plus progressive entre le canal et la chambre constituerait une amélioration pertinente pour réduire ces zones stagnantes et favoriser une homogénéisation de l'écoulement. Toutefois, la mise en œuvre de cette amélioration impliquerait une modification du design géométrique du dispositif afin d'intégrer une zone de raccordement plus douce entre ces deux volumes.

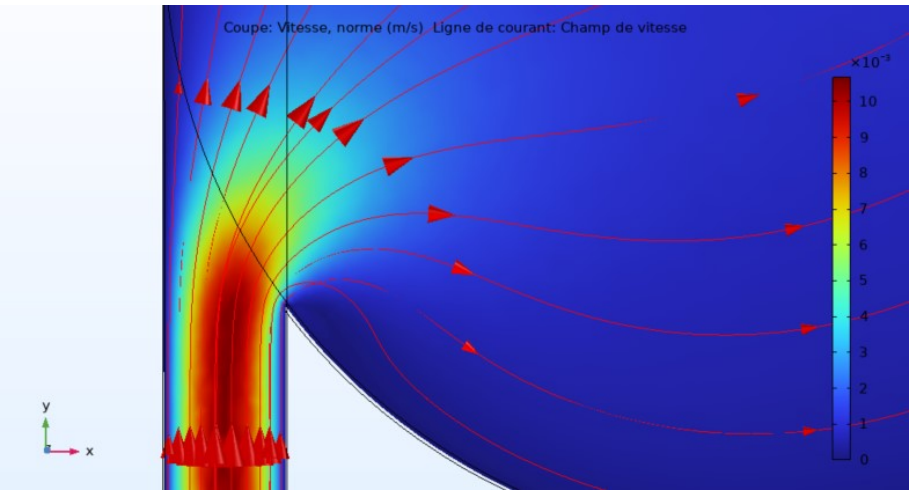


Figure II-20 : Zoom sur la distribution de vitesse à l'entrée de la chambre.

Agrandissement de la cartographie présentée à la Figure II-19 au niveau de l'entrée du compartiment, dans le même plan médian, en z = 0,75 mm. Les lignes de courant en rouge mettent en évidence la transition entre le canal d'entrée et la chambre circulaire.

Contrainte de cisaillement pariétale

L'analyse se concentre désormais sur la contrainte de cisaillement appliquée aux parois du compartiment, paramètre clé pour caractériser les sollicitations mécaniques imposées aux cellules adhérentes. Cette grandeur n'étant pas directement fournie par COMSOL Multiphysics®, elle est calculée à partir du produit entre la viscosité dynamique du fluide η_{fluide}, en Pa. s, et le taux de cisaillement γ_{fluide}, en s^{-1}, comme :

$$\tau_w = \eta_{fluide} \times \gamma_{fluide}$$

Équation II-14 : Obtention de la contrainte de cisaillement à partir des grandeurs calculée par COMSOL Multiphysics®.

Avec :

τ_w	la contrainte de cisaillement pariétale, en [Pa].
η_{fluide}	la viscosité dynamique du fluide, en [Pa.s].
γ_{fluide}	le taux de cisaillement local du fluide, en [s^{-1}].

La Figure II-21 présente la cartographie de la contrainte de cisaillement pariétal, évaluée à la base du compartiment en z = 0 mm, correspondant à la surface de culture cellulaire. Une forte hétérogénéité spatiale est observée. Dans les canaux d'entrée et de sortie, les valeurs sont les plus élevées, comprises entre 10^{-2} et 10^{-1} Pa, en raison de la vitesse accrue et de la section réduite. Au centre de la chambre, les contraintes présentent néanmoins une distribution relativement homogène se situant autour de 10^{-3} à 10^{-2} Pa, ce qui correspond à un ordre de grandeur typique du microenvironnement biologique recherché. Enfin, aux abords des parois latérales de la chambre, des zones de très faible cisaillement apparaissent, avec des valeurs de

l'ordre de 10^{-5} à 10^{-3} Pa, traduisant une irrigation insuffisante et une stimulation mécanique minimale des cellules.

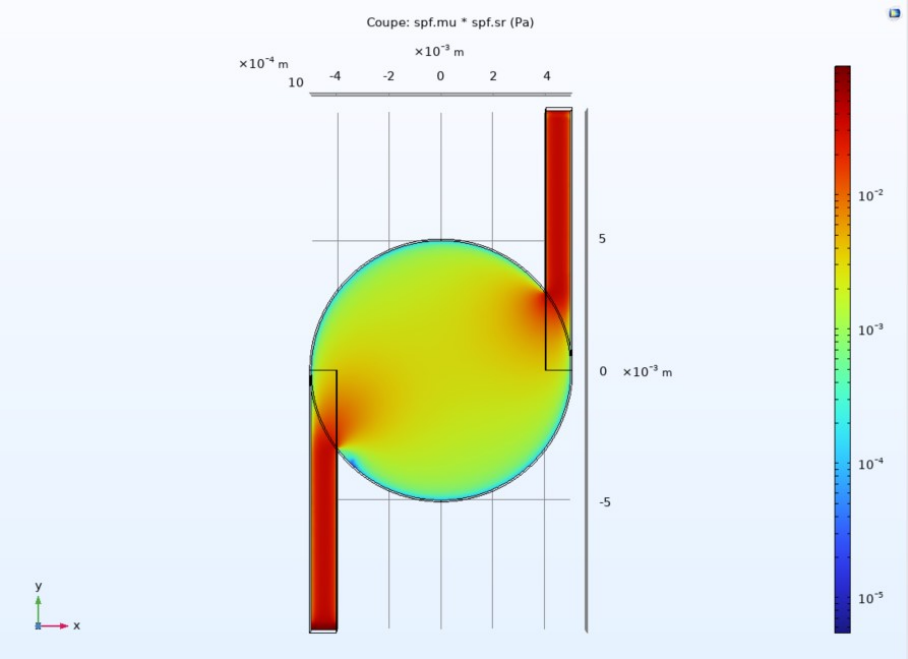


Figure II-21 : Distribution de la contrainte de cisaillement pariétal dans le plan de culture (z = 0 mm).

La cartographie présente la valeur simulée de τ_w la surface pariétale du compartiment. L'échelle colorimétrique, en échelle logarithmique, met en évidence les variations couvrant plusieurs ordres de grandeur, depuis les zones de fort cisaillement dans les canaux jusqu'aux régions de faible sollicitation en périphérie de la chambre.

Afin de quantifier plus finement ces observations, une extraction des données est réalisée suivant une ligne de coupe, entre les coordonnées $(0, -5{,}0)$mm et $(0{,}5{,}0)$mm, comme présenté en Figure II-22.

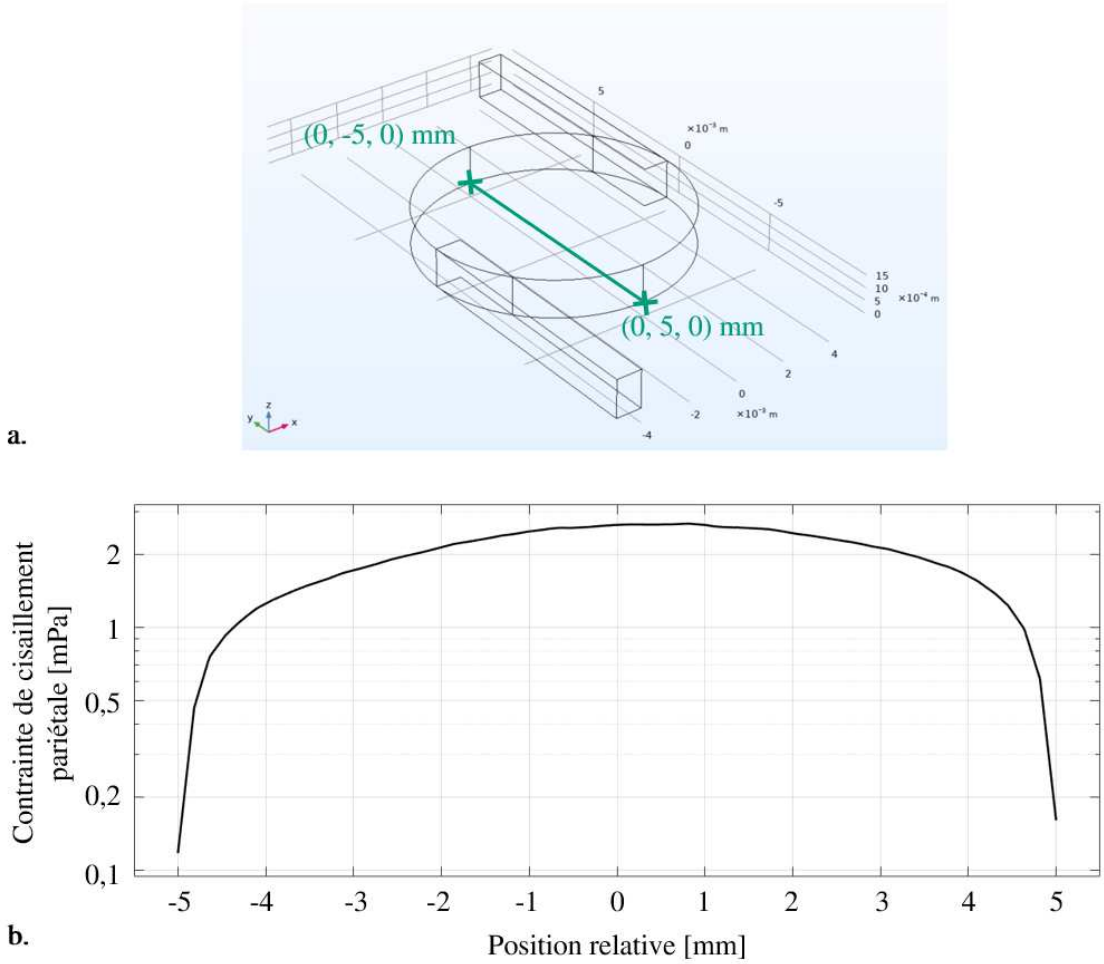


Figure II-22 : Profil de la contrainte de cisaillement pariétal le long d'une ligne de coupe.

(a) Localisation de la ligne de coupe entre les points (0, −5, 0) mm et (0, 5, 0) mm. (b) Évolution de la contrainte de cisaillement pariétal τ_w en fonction de la position relative dans la chambre suivant la ligne de coupe.

Le profil extrait montre que la contrainte de cisaillement pariétal atteint un maximum de 2,68 mPa au centre de la chambre, en $y = 0$ mm, soit 134 % de la valeur cible de $\tau_w = 2$ mPa. Ce sur-cisaillement central suggère une légère focalisation de l'écoulement au cœur de la chambre, qui pourrait induire localement des conditions plus stimulantes pour les cellules.

En revanche, un sous-cisaillement marqué apparaît en périphérie : $\tau_{w,simulé} < 1{,}0$ mPa pour $y < -4{,}5$ mm et $y > 4{,}6$ mm. Ainsi, à moins de 0,5 mm des parois, les conditions hydrodynamiques ne reproduisent plus le cisaillement physiologique attendu, ce qui devra être pris en compte dans l'interprétation des résultats expérimentaux.

Enfin, dans la zone utile de la chambre, définie comme l'intervalle $y \in [-4{,}5; 4{,}6]$mm afin d'exclure les bordures latérales peu irriguées, la contrainte de cisaillement pariétale vaut $\tau_{w,simulé} = 2{,}11 \pm 0{,}49$ mPa. En considérant uniquement un chiffre significatif, cette valeur moyenne correspond à la contrainte de cisaillement pariétale cible $\tau_w = 2$ mPa. Cette

concordance confirme que le dispositif atteint le niveau de stimulation mécanique recherché, situé dans la plage physiologique classiquement rapportée pour les cellules épithéliales intestinales. L'écart-type relativement limité reflète une bonne homogénéité spatiale de la contrainte au sein de la chambre centrale, garantissant que la majorité des cellules sont exposées à des sollicitations comparables. Une telle uniformité constitue un atout majeur pour réduire les biais expérimentaux liés aux gradients locaux de microenvironnement et améliorer la représentativité biologique du modèle.

Discussion

Les simulations numériques menées avec COMSOL Multiphysics® apportent une compréhension approfondie des conditions hydrodynamiques au sein du dispositif. Contrairement aux calculs analytiques, limités à des géométries idéalisées, la modélisation par éléments finis prend en compte la géométrie réelle, incluant les transitions entre canaux et chambre ainsi que les effets de bord.

Les simulations confirment que la contrainte de cisaillement pariétale cible $\tau_w = 2$ mPa est atteinte dans la zone utile de la chambre : $\tau_{w,simulé} = 2{,}11 \pm 0{,}49$ mPa. L'écart-type modéré indique une stimulation mécanique homogène, garantissant que les cellules soient soumises à des contraintes comparables.

Toutefois, les résultats révèlent également des zones de sous-cisaillement à proximité des parois. Ces régions faiblement irriguées pourraient induire une stimulation mécanique insuffisante, compromettant localement la polarisation ou la différenciation cellulaire.

De plus, une piste d'amélioration serait de concevoir une transition plus progressive entre le canal et la chambre, afin de réduire les pertes hydrodynamiques liées à l'angle abrupt actuel et de favoriser une distribution plus uniforme de l'écoulement.

Enfin, plusieurs limites doivent être mentionnées. Dans un premier temps, la modélisation présentée néglige l'effet des pores de la membrane. Or, la littérature montre que la présence et la distribution de ces pores influencent la transmission de la contrainte de cisaillement pariétale aux cellules [163]. Des simulations spécifiques intégrant explicitement la porosité membranaire constitue donc une perspective pertinente. Par ailleurs, la croissance progressive des cellules au cours de la culture, qui réduit progressivement la section d'écoulement et modifie localement les champs de vitesse et de contrainte, représente un autre facteur important à considérer dans de futurs travaux.

En conclusion, les simulations valident la capacité du dispositif à reproduire des conditions hydrodynamiques physiologiquement pertinentes, tout en mettant en évidence des marges d'optimisation pour améliorer l'homogénéité de l'environnement mécanique perçu par les cellules.

II.4 - Conclusion

L'analyse de l'état de l'art en évidence quatre catégories majeures de verrous freinant le développement d'un intestin-sur-puce instrumenté par spectroscopie d'impédance pour l'étude des MICI :

- Cloisonnement thématique : les dispositifs existants n'intègrent que partiellement la biologie des MICI, la microfluidique et l'instrumentation. Le projet y répond par une approche interdisciplinaire dès la conception, assurant la cohérence entre contraintes biologiques, microphysiologiques et instrumentales.

- Limites microphysiologiques : certains modèles ne reproduisent pas la contrainte de cisaillement physiologique, restent dépourvus de stimulation dynamique et utilisent des membranes à pores trop larges favorisant la migration cellulaire. Le dispositif proposé impose un cisaillement réaliste via un flux pulsé, introduit une stimulation péristaltique et intègre une membrane à pores submicroniques garantissant une stricte compartimentalisation.

- Limites biologiques : les monocultures tumorales dominantes limitent la représentativité physiopathologique. Le projet adopte une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1), reproduisant barrière physique et couche de mucus, dans une plateforme modulaire conçue pour évoluer vers des modèles plus complexes intégrant d'autres types cellulaires ou des cellules primaires.

- Limites instrumentales : les électrodes présentent un manque de résolution spatiale et une sensibilité réduite aux phénomènes locaux. Le dispositif intègre des microélectrodes interdigitées coplanaires à l'échelle cellulaire et associe aux mesures électriques des validations morphologiques et biologiques.

Ces éléments permettent de définir le design du dispositif. Celui-ci repose sur une architecture à deux canaux superposés séparés par une membrane poreuse, configuration qui permet de recréer l'organisation compartimentale de la barrière intestinale et de faciliter la mise en coculture de différents types cellulaires dans des conditions contrôlées. La chambre est conçue selon une géométrie circulaire, choix guidé par plusieurs considérations pratiques et fonctionnelles : limiter le piégeage de bulles d'air lors de la mise en culture, maximiser la surface de croissance disponible pour les cellules, et permettre une intégration reproductible des électrodes. L'analyse hydraulique, combinant calculs analytiques et simulations 3D, établit les conditions d'écoulement et de cisaillement compatibles avec la physiologie intestinale. Elle définit le débit nécessaire à l'application d'une contrainte de cisaillement pariétale physiologique. La conception théorique ainsi définie sert désormais de base au développement technologique présenté dans le chapitre suivant.

Chapitre III : DEVELOPPEMENT TECHNOLOGIQUE DE L'INTESTIN-SUR-PUCE INSTRUMENTE

Le design conceptuel défini au chapitre précédent constitue la base du développement technologique présenté dans le chapitre. La fabrication et l'assemblage de la puce microfluidique sont détaillés, en insistant sur les procédés employés et sur les itérations mises en œuvre afin d'améliorer la reproductibilité, la robustesse et l'étanchéité du dispositif. La sélection et la caractérisation de la membrane poreuse sont ensuite présentées, en lien avec ses propriétés structurales et fonctionnelles. Enfin, le développement des électrodes interdigitées microfabriquées et leur intégration dans un environnement de mesure adapté sont exposés, afin de constituer un système compatible avec la culture cellulaire et l'instrumentation électrique.

Ainsi, ce chapitre décrit l'ensemble des étapes qui permettent de transformer un design conceptuel en un prototype technologique opérationnel, ouvrant la voie à son exploitation dans des applications biologiques présentées au chapitre suivant.

III.1 - FABRICATION ET ASSEMBLAGE DE LA PUCE MICROFLUIDIQUE

La conception de la puce microfluidique doit être complétée par la mise au point de protocoles de fabrication fiables et reproductibles, permettant d'obtenir un dispositif fonctionnel. Les demi-dispositifs sont obtenus par moulage du PDMS, la membrane en PET est fonctionnalisée puis caractérisée et l'ensemble est assemblé par collage plasma. Des itérations d'amélioration portant sur le design des moules et de poinçonnage des orifices permettent d'améliorer l'étanchéité, la robustesse et la reproductibilité du dispositif.

III.1.A - FABRICATION

III.1.A.a - Sélection de la membrane poreuse

La membrane poreuse occupe une position centrale dans l'architecture du dispositif. Elle assure la séparation physique entre les deux compartiments fluidiques tout en autorisant des échanges contrôlés de biomolécules. Ses propriétés structurales conditionnent directement l'efficacité des échanges et la reproductibilité des mesures.

Dans cette section, plusieurs membranes commerciales sont analysées en vue d'identifier la configuration la plus adaptée au dispositif. Trois aspects principaux sont considérés : la densité de pores, le diamètre des pores et l'efficacité du transfert de biomolécules. L'ensemble de ces analyses conduit à la sélection finale de la membrane la plus pertinente pour assurer des échanges entre les compartiments du système.

Membranes commerciales

Les membranes employées dans ce travail sont d'origine commerciale, ce qui garantit des propriétés bien caractérisées et une qualité de fabrication reproductible. Leurs paramètres structuraux sont spécifiquement définis par les fabricants : l'épaisseur est contrôlée avec précision et la distribution des pores est homogène, autant en taille qu'en densité.

Les membranes utilisées dans ce travail proviennent de la gamme ipCELLCULTURE™ (it4ip, Belgique), conçue pour la culture cellulaire. Trois références distinctes ont été testées au cours du projet : 2000M23 / 510M803 / 00, 2000M12 / 810N403 / A4 et 2000M12 / 810N403 / A4. Leurs caractéristiques sont disponibles dans le Tableau III-1 [247].

Tableau III-1 : Membranes commerciales utilisées [247].

Paramètres	Référence 1 : 2000M23 / 510M803 / 00	Référence 2 : 2000M12 / 810N403 / A4	Référence 3 : 2000M12 / 810N403 / A4
Matériau	PET	PET	PET
Diamètre des pores, d_{pore}	8 µm	0,4 µm	Non-poreux
Densité des pores, n_{pore}	$1{,}00 \times 10^{5}$ pores. cm^{-2}	$1{,}00 \times 10^{8}$ pores. cm^{-2}	
Porosité surfacique $\varepsilon_{pore} = n_{pore} \times \pi \times \left(\frac{d_{pore}}{2}\right)^2$	5,0 %	13 %	
Épaisseur $h_{membrane}$	16 µm	12 µm	12 µm
Opacité	Transparent	Translucide	Transparent

La référence 3 correspond à l'analogue non poreux de la référence 2. Elle a été utilisée dans un second temps pour les caractérisations de fonctionnalisation de surface, présentés ultérieurement. Ainsi, seules les références 1 et 2 sont considérées dans la suite de cette section.

Rôle de la densité des pores

La densité des pores constitue un paramètre déterminant car elle définit l'homogénéité des échanges à l'échelle du microenvironnement cellulaire. En effet, la densité conditionne non seulement la distribution spatiale des flux entre les compartiments, mais également l'uniformité des contraintes perçues par chaque cellule cultivée sur la membrane.

Constats issu des membranes Transwell®

Les inserts Transwell® (Corning Inc., États-Unis) représentent un standard de comparaison pour la culture cellulaire in-vitro. Ils sont constitués d'une membrane microporeuse, dont la densité de pores varient suivant le matériau, comme présenté dans le Tableau III-2.

Tableau III-2 : Comparaison des paramètres caractéristiques des membranes Transwell à pores de 0,4 µm en PET en PC.

Paramètres	Membrane Transwell® en PET à pores de 0,4 µm [247]	Membrane Transwell® en PC à pores de 0,4 µm [247]
Densité de pores, $n_{Transwell}$	4×10^{6} pores. cm^{-2}	1×10^{8} pores. cm^{-2}
Diamètre des pores, d_{pore}	0,4 µm	0,4 µm
Nombre de pores moyen sous une cellule : $N_{pore} = n_{Transwell} \times \pi \times \left(\frac{d_{pore}}{2}\right)^2$	7 pores. $cellule^{-1}$	177 pores. $cellule^{-1}$

La différence de densité de pores entre PET et PC se traduit directement dans le microenvironnement cellulaire. Pour une cellule épithéliale typique de 15 µm de diamètre, le nombre moyen de pores situés sous la cellule est d'environ 7 sur PET contre 177 sur PC. Sur PET, certaines cellules se retrouvent presque sans contact avec les pores, ce qui limite leurs échanges. Sur PC, chaque cellule recouvre plusieurs dizaines de pores, assurant une

connectivité homogène et reproductible. L'exemple des Transwell® illustre ainsi que des densités trop faibles entraînent des échanges hétérogènes, tandis que des densités élevées uniformisent les flux mais restent plus contraignantes à fabriquer.

Définition d'un seuil minimal théorique

Afin de dépasser ce simple constat qualitatif, il est nécessaire d'établir un critère quantitatif définissant la densité minimale assurant un environnement homogène. Un seuil arbitraire de 20 pores recouverts par cellule apparaît comme un compromis réaliste garantissant un lissage statistique suffisant. La densité de pores correspondante peut être formalisée par la relation disponible à l'Équation III-1 :

$$n_{min} = \frac{\text{Nombre de pores par cellule}}{\text{Surface d'une cellule}} = \frac{20}{\pi \left(\frac{d_{cellule}}{2}\right)^2} = 1 \times 10^7 \text{ pores.cm}^{-2}$$

Équation III-1 : Détermination de la densité de pores minimale.

Avec :

n_{min} la densité surfacique minimale de pores, en [pores·m⁻²].
$d_{cellule}$ le diamètre cellulaire, en [m].

Ce calcul permet ainsi de définir une valeur seuil universelle, indépendante des matériaux, directement applicable à la conception des dispositifs microfluidiques.

Validation expérimentale par microscopie électronique

Les membranes commerciales sont caractérisées par microscopie électronique à balayage (MEB) afin d'évaluer leur morphologie de surface, la taille et la répartition des pores. Les observations sont réalisées à l'aide d'un microscope GeminiSEM 360 (Zeiss, Allemagne). Les échantillons sont découpés en coupons de quelques millimètres carrés, fixés sur des stubs métalliques à l'aide d'un ruban carbone conducteur, puis introduits directement dans la chambre d'observation. Afin de préserver l'intégrité des membranes en polymère, aucune métallisation n'est appliquée et les images sont acquises en mode basse tension. Les observations sont conduites sous un vide de colonne de l'ordre de 3×10^{-6}mbar, avec une tension d'accélération fixée à 1,0 kV. Les images sont obtenues en mode détection d'électrons secondaires (SE), avec l'option ESB Grid pour améliorer le contraste de surface. Un filtrage de réduction du bruit est appliqué lors de l'acquisition. La distance de travail moyenne est de 5 mm.

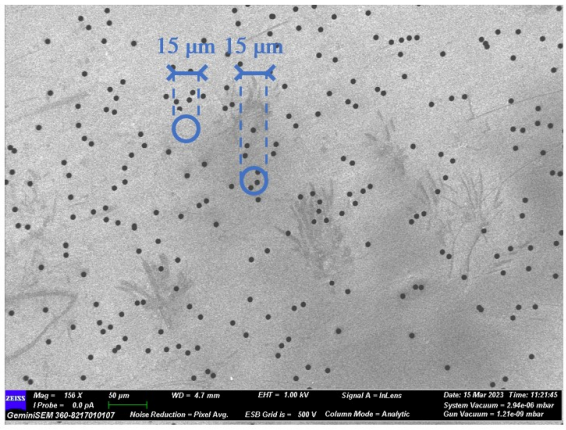
L'analyse MEB, présentée en Figure III-1, met en évidence l'impact majeur de la densité des pores sur le microenvironnement perçu par une cellule unique et permet de confronter les observations au critère défini précédemment :

- Avec une densité de $1{,}00 \times 10^5$ pores.cm^{-1} $< n_{min}$, la référence 1 présente de larges zones dépourvues de pores. Ainsi, une cellule de 15 µm peut ne recouvrir aucun pore ou

seulement quelques-uns, ce qui entraîne une forte variabilité locale et limite les échanges entre les compartiments apical et basolatéral.

- À l'inverse, la référence 2, avec une densité de $1{,}00 \times 10^8$ pores. cm^{-1} > n_{min}, garantit que chaque cellule recouvre plusieurs dizaines de pores. Cela assure une distribution homogène des flux à travers la membrane, réduisant les hétérogénéités entre cellules d'une même culture.

Référence 1 : 2000M23 / 510M803 / 00
$d_{pore,\ ref1} = 8\ \mu m$
$n_{pore,\ ref1} = 1{,}00 \times 10^5\ cm^{-1}$



Référence 2 : 2000M12 / 810N403 / A4
$d_{pore,\ ref2} = 0{,}4\ \mu m$
$n_{pore,\ ref2} = 1{,}00 \times 10^8\ cm^{-1}$

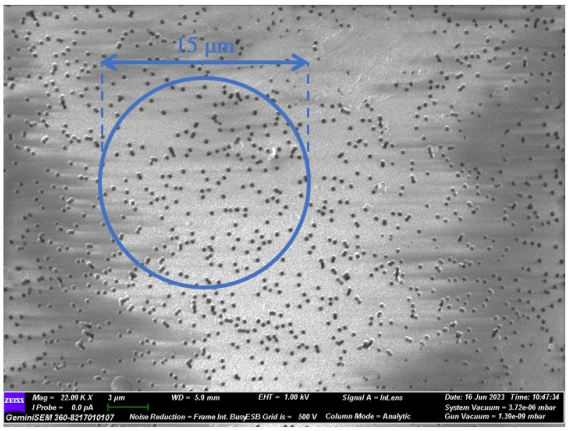


Figure III-1 : Représentation du microenvironnement d'une cellule sur différentes membranes poreuses, observées en microscopie électronique à balayage (grossissements respectifs x156 et x22090).

(a) Membrane présentant des pores de 8 µm de diamètre : la surface d'une cellule épithéliale typique (15 µm, schématisée par un cercle bleu) recouvre un nombre aléatoire de pores, induisant une forte hétérogénéité. (b) Membrane présentant des pores de 0,4 µm de diamètre : la même cellule recouvre plusieurs dizaines de pores, garantissant un environnement homogène et reproductible.

Considérations en spectroscopie d'impédance

Cette différence de densité a également des implications directes sur les mesures électrophysiologiques, comme l'impédance. À l'échelle du microenvironnement des électrodes, dont la dimension caractéristique est du même ordre que celle d'une cellule, à savoir quelques micromètres, une faible densité de pores conduit à une surface de conduction discontinue et hétérogène. Cela peut introduire un bruit de fond non biologique dans les mesures et masquer les signaux d'intérêt. À l'inverse, une densité élevée assure que chaque électrode, quel que soit son positionnement relatif par rapport aux cellules, interagit avec une membrane présentant des propriétés électriques homogènes. La membrane adopte ainsi un comportement quasi-uniforme du point de vue électrique, ce qui garantit la fiabilité et la reproductibilité des données acquises.

En conclusion, une membrane à forte densité de pores constitue le support le plus adapté, en assurant à la fois l'homogénéité des échanges et la reproductibilité des mesures. La référence 2 est donc retenue.

Influence de la taille des pores

La taille des pores de la membrane est un paramètre déterminant dans la conception d'un modèle d'intestin-sur-puce. Sur le plan biologique, ils doivent rester submicroniques afin d'empêcher la migration cellulaire [208]. Dans cette perspective, la référence 1 ne satisfait pas ce critère, tandis que la référence 2 y répond pleinement.

Évaluation du transfert de biomolécules

L'efficacité des échanges à travers la membrane dépend principalement de deux paramètres : son épaisseur $h_{membrane}$ et sa porosité surfacique ε_{pore}. Une membrane mince et fortement poreuse offre une résistance minimale au transport, favorisant un échange rapide entre les compartiments.

Le comportement diffusif peut être décrit par la perméabilité apparente, dérivée de la loi de Fick, selon l'Équation III-2 :

$$P_{Fick} = \frac{\varepsilon_{pore} \times D_{soluté}}{h_{membrane}}$$

Équation III-2 : Perméabilité de Fick à travers une membrane poreuse.

Avec :

P_{Fick}	la perméabilité de Fick, en $[m.s^{-1}]$.
ε_{pore}	la porosité surfacique, sans unité.
$D_{soluté}$	la diffusivité du soluté, en $[m^2.s^{-1}]$.
$h_{membrane}$	l'épaisseur de la membrane, en [m].

À partir de la perméabilité apparente, il est possible de déterminer un temps caractéristique d'équilibrage $\tau_{équilibrage}$ entre deux compartiments identiques de volume $V_{chambre}$, séparés par une aire d'échange $S_{chambre}$. Cette relation formalise la cinétique globale du couplage entre compartiments : plus la perméabilité est élevée, plus l'équilibrage est rapide. Ce temps est donné à l'Équation III-3 :

$$\tau_{\text{équilibrage}} = \frac{V_{\text{chambre}}}{S_{\text{chambre}} \times P_{\text{Fick}}}$$

Équation III-3 : Temps caractéristique de diffusion à travers une membrane poreuse.

Avec :

$\tau_{\text{équilibrage}}$	le temps caractéristique d'équilibrage diffusif, en [s].
V_{chambre}	le volume de la chambre de culture, en [m³].
S_{chambre}	la surface d'échange entre compartiments, en [m²].
P_{Fick}	la perméabilité apparente définie à l'Équation III-2, en $[\text{m.s}^{-1}]$.

Pour illustrer cela, deux molécules aux propriétés différentes sont considérées. Tout d'abord, le glucose, dont la diffusivité en solution aqueuse vaut $D_{\text{glucose}} \approx 7 \times 10^{-10}\ \text{m}^2.\text{s}^{-1}$, est choisi pour représenter une petite molécule hautement diffusible. À l'opposé, l'albumine sérique, $D_{\text{albumine}} \approx 6 \times 10^{-11}\ \text{m}^2.\text{s}^{-1}$, modélise une macromolécule de masse élevée à diffusion lente.

L'application des équations précédentes aux membranes commerciales, référence 1 et référence 2, conduit aux valeurs reportées dans le Tableau III-3.

Tableau III-3 : Paramètres géométriques et propriétés de diffusion des membranes commerciales (référence 1 et référence 2).

Paramètres		Référence 1 : 2000M23 / 510M803 / 00	Référence 2 : 2000M12 / 810N403 / A4
Épaisseur de la membrane, h_{membrane}		16 µm	12 µm
Porosité surfacique, $\varepsilon_{\text{pore}}$		5,0 %	13 %
Glucose	Perméabilité apparente, P_{Fick}	$2{,}2 \times 10^{-6}\ \text{m.s}^{-1}$	$7{,}4 \times 10^{-6}\ \text{m.s}^{-1}$
	Temps caractéristique de diffusion, $\tau_{\text{équilibrage}}$	11 min	3 min
Albumine	Perméabilité apparente, P_{Fick}	$1{,}9 \times 10^{-7}\ \text{m.s}^{-1}$	$6{,}3 \times 10^{-7}\ \text{m.s}^{-1}$
	Temps caractéristique de diffusion, $\tau_{\text{équilibrage}}$	2 h 05 min	40 min

Ces résultats soulignent deux points essentiels. Premièrement, la réduction de l'épaisseur et l'augmentation de la porosité surfacique entre la référence 1 et la référence 2 entraînent une multiplication par un facteur 3 de la perméabilité apparente, quel que soit le soluté, ce qui réduit les temps d'équilibrage. Deuxièmement, le contraste entre les deux solutés met en évidence l'effet déterminant de la diffusivité moléculaire. Les petites molécules, comme le glucose, atteignent un équilibre en quelques minutes, ce qui correspond à des cinétiques quasi

instantanées à l'échelle expérimentale. En revanche, pour des molécules plus importantes, comme l'albumine, la diffusion est bien plus lente.

En résumé, une membrane mince et fortement poreuse constitue la configuration la plus favorable pour assurer des échanges rapides entre compartiments apical et basolatéral. La référence 2 apparaît ainsi comme le choix le plus adapté.

Sélection de la membrane

L'ensemble des analyses précédentes permet de justifier le choix de la membrane de référence 2. D'une part, sa densité de pores assure un microenvironnement homogène à l'échelle cellulaire, évitant les hétérogénéités locales observées pour des membranes moins denses. D'autre part, la taille submicronique des pores empêche la migration cellulaire, tout en garantissant le passage de solutés à travers l'interface. Enfin, la combinaison d'une faible épaisseur et d'une porosité élevée confère à cette membrane une perméabilité largement suffisante pour permettre des échanges rapides de molécules. La référence 2 sera donc retenue pour la conception et l'utilisation de l'intestin-sur-puce.

III.1.A.b - Protocoles de fabrication de la puce microfluidique

Le procédé de fabrication suit une séquence en quatre étapes complémentaires présentées en Figure III-2. Dans un premier temps, deux demi-dispositifs microstructurés en PDMS sont réalisés par moulage. Parallèlement, la membrane en PET subit une modification chimique de surface permettant l'introduction de groupes réactifs aux protéines. Ces éléments sont ensuite assemblés par collage plasma, qui assure une liaison covalente et étanche. Enfin, la fibronectine est greffée sur la membrane, conférant des propriétés bioactives indispensables à l'adhésion et la différenciation cellulaires. Les sections suivantes détaillent successivement chacune des étapes du procédé de fabrication.

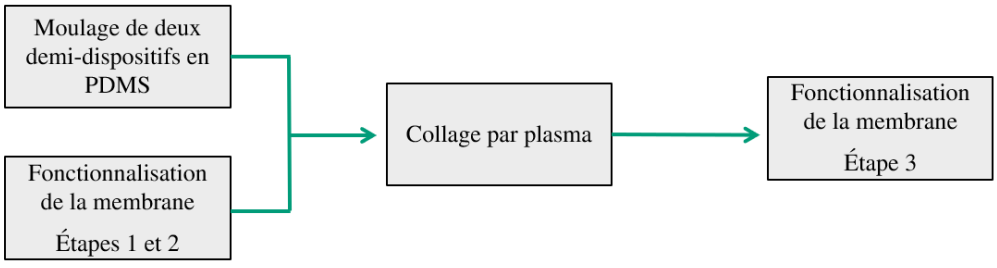


Figure III-2 : Plan global du procédé de fabrication du dispositif microfluidique.

Moulage des demi-dispositifs en PDMS

La mise en forme des couches microstructurées composant le dispositif est réalisée par moulage en PDMS, commercialisé sous la référence Sylgard® 184 (Dow Corning, États-Unis).

Le protocole adopté, décrit ci-après et illustré en Figure III-III-3, est composé de plusieurs étapes :

1. Le polymère est préparé en mélangeant la base, appelé prépolymère, et l'agent de réticulation dans un rapport massique de 10:1. Le mélange est soigneusement homogénéisé pendant 2 min afin d'assurer une réticulation uniforme.

2. Puis il est placé dans une cloche à vide jusqu'à disparition complète des bulles, soit environ vingt minutes. Cette étape de dégazage est essentielle pour éliminer les inclusions d'air issues du mélange, susceptibles de perturber la qualité des canaux microfluidiques moulés.

3. Le moule, préalablement nettoyé et séché, est passé sous un flux d'azote afin d'éliminer toute particule résiduelle. Le PDMS dégazé est alors versé dedans.

4. Un second dégazage de quelques minutes est effectué après coulée, afin de supprimer les bulles piégées aux interfaces et aspérités du moule.

5. Le moule rempli est alors placé dans une étuve. La polymérisation est réalisée à 40 °C pendant 24 h. Ce choix de basse température permet d'obtenir un matériau sans contraintes mécaniques et viscoélastiques lors de sa future utilisation à 37 °C. En effet, la littérature montre que des conditions de polymérisation trop éloignées de la température d'utilisation entraînent une instabilité des propriétés ou des déformations [248], [249], [250].

6. Après refroidissement à température ambiante, la couche de PDMS est démoulée avec précaution afin de préserver l'intégrité des microcanaux. Les excédents de matière sont retirés au scalpel si nécessaire. Les demi-dispositifs ainsi obtenus peuvent être stockés dans une boîte stérile et dépoussiérée, en attente des étapes d'assemblage.

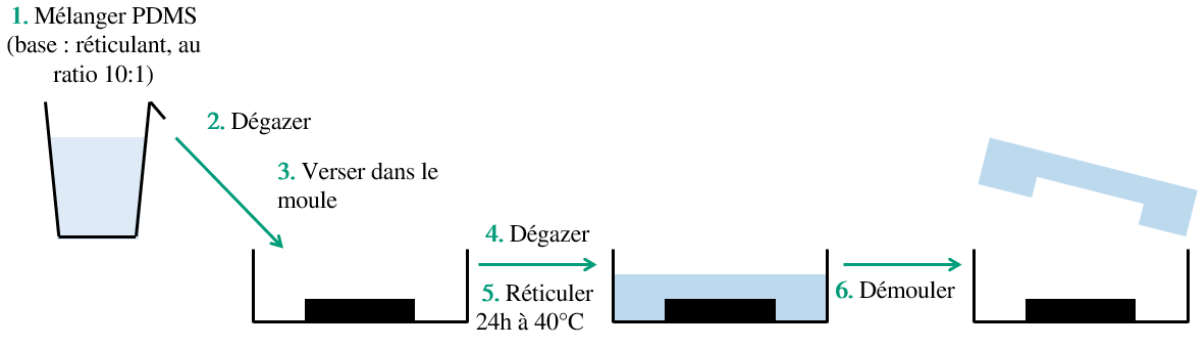


Figure III-III-3 : Protocole de moulage du PDMS.

Après homogénéisation du mélange base/réticulant (10:1), le PDMS est dégazé, coulé dans le moule puis dégazé à nouveau. La polymérisation est réalisée à 40 °C pendant 24 h avant le démoulage de la pièce.

Des orifices d'entrée et de sortie doivent être créés afin de permettre la connexion des canaux microfluidiques aux systèmes de perfusion externe. Dans ce travail, le poinçonnage a été réalisé manuellement à l'aide d'un poinçon cylindrique de 1,0 mm de diamètre externe (Darwin Microfluidics, France). Ce diamètre a été choisi en cohérence avec les aiguilles creuses de type 18G utilisées pour le raccordement fluidique, qui possèdent un diamètre externe de 1,27 mm et un diamètre interne de 0,84 mm. Le choix d'un poinçon légèrement inférieur permet une insertion ajustée, garantissant étanchéité et bonne stabilité mécanique du raccord. Un poinçon de diamètre trop grand conduirait à des fuites au niveau de l'interface entre le PDMS et l'aiguille, tandis qu'un poinçon trop petit pourrait endommager la structure en provoquant des fissures ou des déformations lors de l'insertion.

Fonctionnalisation de la membrane

À l'état natif, la surface du PET est hydrophobe, ce qui limite l'adhérence cellulaire et compromet la formation d'un épithélium stable et fonctionnel. Pour pallier cette limitation, il est nécessaire de modifier la surface de la membrane par une fonctionnalisation chimique, afin d'y greffer des protéines d'adhésion de la matrice extracellulaire.

Parmi celles-ci, la fibronectine est couramment utilisée : cette protéine favorise l'attachement des cellules épithéliales, leur étalement et leur différenciation. Pour que la fibronectine puisse être immobilisée de façon stable, la surface du PET doit au préalable être activée chimiquement afin de générer des groupements réactifs capables de former des liaisons covalentes avec la protéine. Le protocole adopté repose sur une succession de traitements illustrés en Figure III-4 :

1. Une solution basique d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0,5 M est préparée dans de l'eau ultrapure Milli-Q et stérilisée par filtration sur membrane de 0,22 µm (Merck, Allemagne). Cette solution est versée dans les puits d'une plaque stérile à 12 puits. Ensuite, une membrane est placée dans chaque puits et est incubée pendant 20 min. L'utilisation d'une plaque multi-puits présente plusieurs avantages : elle permet de travailler en conditions stériles, d'éviter tout contact entre membranes, garantissant ainsi une exposition homogène de leurs deux faces, et de réaliser plusieurs traitements en parallèle. Ce traitement induit une hydrolyse des groupements ester caractéristiques du PET, générant en surface des fonctions carboxylates ($–COO^-$). Après cette étape, la membrane est rincée en l'immergeant, à deux répétitions, dans un bain d'eau Milli-Q pendant 2 min pour éliminer l'excès de base. La membrane est ensuite transférée dans une solution d'acide acétique (CH_3COOH) à 0,5 M, préparée avec de l'eau Mili-Q et stérilisée par filtration sur membrane de 0,22 µm. Cette neutralisation acide de 5 min permet de protoner les carboxylates formés et de stabiliser la surface sous forme de groupes carboxyles (–COOH). Enfin, la membrane est soumise à deux lavages successifs dans de l'eau Milli-Q, chaque bain durant 10 minutes. Ces lavages rigoureux

garantissent l'élimination complète des résidus ioniques et limitent le risque de réactions parasites lors des étapes ultérieures.

2. Les membranes sont ensuite placées dans des puits contenant une solution de EDC (N-(3-diméthylaminopropyl)-N′-éthylcarbodiimide hydrochloride) à 0,2 M et de NHS (N-hydroxysuccinimide) à 0,05 M dans de l'eau Milli-Q. Les solutions sont préalablement stérilisées par filtration sur membrane 0,22 µm afin de prévenir toute contamination. L'incubation est réalisée à température ambiante, dans l'obscurité, pendant 4 heures. Puis, la membrane est lavée dans deux bains d'eau Milli-Q de 10 min successifs. Ce rinçage est très important car ni l'EDC ni le NHS ne sont biocompatibles : leur présence résiduelle pourrait non seulement compromettre la viabilité cellulaire lors des cultures ultérieures, mais aussi altérer la qualité du greffage protéique.

3. La membrane est placée dans une solution de fibronectine (25 µg·mL^{-1}) préparée dans un tampon PBS (tampon phosphate salin) stérile et filtrée sur membrane 0,22 µm. L'incubation est réalisée pendant 24 heures afin de permettre aux groupes amines de la fibronectine de réagir avec les esters de surface afin de former des liaisons covalentes entre la membrane et la protéine. Enfin, la membrane est rincée dans du PBS stérile afin d'éliminer toute protéine non liée. Elle doit être utilisée rapidement, car une conservation prolongée favorise la dénaturation de la fibronectine, c'est-à-dire la perte de sa structure tridimensionnelle et donc la dégradation de sa capacité biologique à favoriser l'adhésion cellulaire.

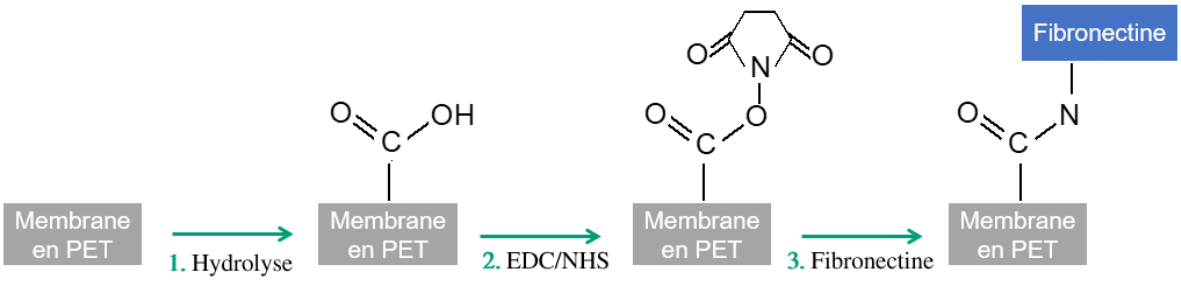


Figure III-4 : Protocole de fonctionnalisation de la membrane en PET avec de la fibronectine.

Le protocole de fonctionnalisation de la membrane en PET a été scindé en deux séquences distinctes pour la fabrication de l'intestin-sur-puce. Les étapes 1 et 2 sont effectuées en amont de l'assemblage du dispositif, tandis que l'étape 3 est réalisée directement après l'assemblage, au sein de la puce microfluidique. La fonctionnalisation hors puce lors de l'étape 2 permet d'éviter toute présence résiduelle de réactifs potentiellement toxiques dans le dispositif final. Cette précaution s'inscrit également dans les limites connues du PDMS, qui tend à adsorber puis relarguer les composés hydrophobes, perturbant ainsi les conditions expérimentales [251], [252], [253], [254]. Enfin, la fibronectine utilisée à l'étape 3 présente une

forte sensibilité aux conditions de traitement, en particulier au plasma d'oxygène et à l'exposition prolongée à l'air, ce qui pourrait entraîner sa dénaturation et compromettre ainsi son efficacité biologique.

Collage par plasma

L'assemblage des demi-dispositifs en PDMS est réalisé par collage irréversible après traitement plasma, appelé collage moléculaire, un procédé standard en microfabrication. Le mécanisme du collage peut être décrit en deux étapes successives, correspondant d'abord à l'activation des surfaces par le plasma, puis à leur mise en contact pour sceller le dispositif :

1. Activation des surfaces. Le traitement est effectué dans un générateur de plasma commercial Tucano (Gambetti Kenologia, Italie). Un plasma d'oxygène est produit dans une chambre sous vide par application d'un champ électrique RF, avec des paramètres réglés à une puissance de 50 W, une durée d'exposition de 40 secondes et une pression de 5×10^{-1} Torr. Ce plasma, gaz partiellement ionisé, contient des ions, des électrons libres, des radicaux et des photons énergétiques. Les molécules de dioxygène y sont dissociées, générant des espèces réactives telles que les ions et surtout les radicaux libres O•. Comme illustré en Figure III-5, ces espèces attaquent la surface du PDMS, initialement constituée de groupements méthyle hydrophobes (–Si–CH_3), et les transforment en groupes silanol (–Si–OH). Cette oxydation rend la surface hydrophile et hautement réactive. L'effet reste toutefois transitoire : exposées à l'air, les surfaces tendent rapidement à redevenir hydrophobes par réorganisation des chaînes polymériques et adsorption de contaminants.

2. Mise en contact et collage. Pour éviter ce retour à l'état hydrophobe, l'assemblage doit être réalisé immédiatement après l'activation. Les deux demi-dispositifs sont alors alignés, une membrane poreuse est insérée entre eux, puis l'ensemble est mis en contact, comme illustré en Figure III-6. Les groupes silanol présents sur les interfaces réagissent entre eux par condensation pour former des liaisons covalentes siloxane (–Si–O–Si–), comme montré en Figure III-5. Ce mécanisme assure un collage irréversible, mécaniquement robuste et étanche.

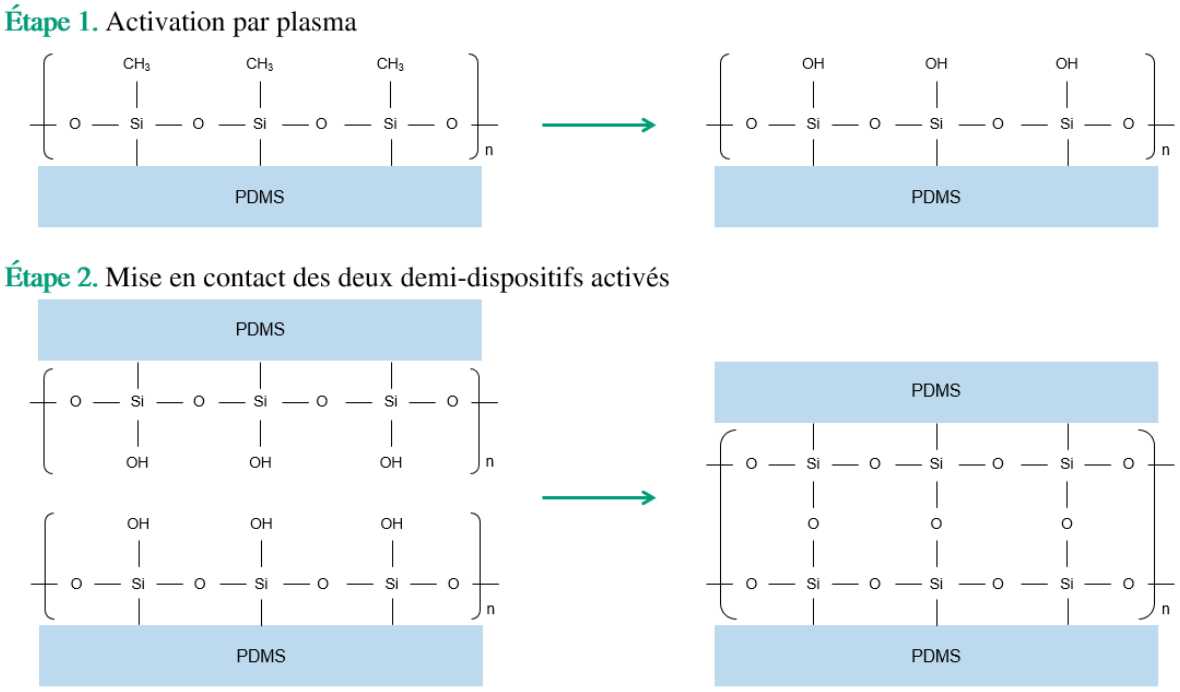


Figure III-5 : Mécanisme chimique du collage plasma du PDMS.

(1) Avant activation, la surface du PDMS porte des groupements méthyle (–CH_3). Le traitement plasma d'oxygène les remplace par des groupements hydroxyle (–OH), plus réactifs et hydrophiles. (2) Lorsque deux surfaces activées sont mises en contact, les –OH réagissent entre eux pour former des liaisons siloxane (Si–O–Si). Ce mécanisme assure un collage permanent et robuste entre les deux couches de PDMS.

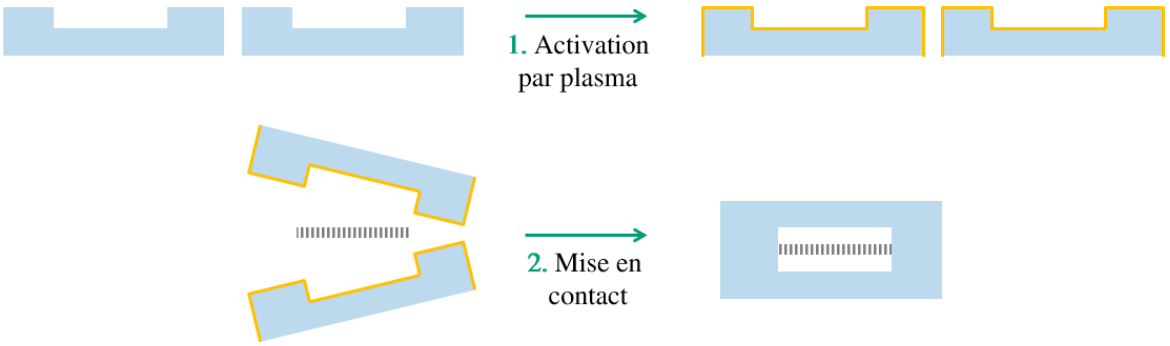


Figure III-6 : Protocole d'assemblage du dispositif par collage plasma.

(1) Le traitement plasma active les surfaces des deux couches de PDMS (en bleu), représentées avec un contour orange, en les rendant réactives et hydrophiles. (2) Après alignement des demi-dispositifs et insertion d'une membrane poreuse, leur mise en contact permet d'obtenir un assemblage irréversible.

III.1.A.c - Fabrication du moule

La fabrication du moule constitue une étape clé du procédé car il définit l'empreinte négative du dispositif microfluidique. Sa conception et sa réalisation conditionnent directement la qualité des dispositifs produits. Dans ce travail, deux approches successives ont été explorées.

La première repose sur l'usinage et l'assemblage de matériaux disponibles dans le commerce. La seconde met en œuvre l'impression 3D en résine photopolymérisable pour obtenir un moule monobloc. Ces deux stratégies sont présentées ci-dessous, suivies d'une discussion comparative de leurs avantages et inconvénients.

Moule hybride PMMA/PC

Le design du premier moule est élaboré avec le logiciel libre de conception assistée par ordinateur KLayout (open-source développé par M. Köfferlein, Allemagne), utilisé pour la conception de motifs 2D en microfabrication. Le design est exporté au format .dxf, compatible avec la découpe LASER. Une plaque de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) de 1,5 mm d'épaisseur est ensuite usinée sur G-1309 (ENGRAV, France) au Centre de Compétence Emmanuel Héré (CC Héré, IJL, Nancy), plateforme spécialisée dans la fabrication mécanique, par Cyril Schlauder. Ce procédé permet d'obtenir rapidement des formes précises et reproductibles. La pièce de PMMA est ensuite collée au fond d'une boîte de Pétri en PC à l'aide d'une colle forte Loctite Super Glue-3 (Henkel, Allemagne). Après assemblage, l'ensemble est nettoyé à l'isopropanol afin d'éliminer les résidus de découpe et les excès de colle, puis séché sous flux d'azote, ce qui limite la présence de contaminants susceptibles d'altérer le moulage du PDMS et de générer des défauts de surface.

Cette première approche présente plusieurs avantages. Elle utilise des matériaux peu coûteux et facilement accessibles. La fabrication est simple et rapide. L'usinage dans du PMMA confère une bonne rigidité au moule, assurant sa stabilité lors du moulage. La surface lisse du PMMA et du PC offre par ailleurs un état de surface de qualité, favorable à la reproduction fidèle des canaux en PDMS et au collage par plasma d'oxygène.

Cependant, cette méthode comporte également plusieurs limites. Le collage du PMMA au fond de la boîte de Pétri entraîne fréquemment des débordements de colle, à l'origine de bords irréguliers, comme illustré en Figure III-7. Ces débordements peuvent conduire à des fuites. Dans d'autres cas, ces discontinuités favorisent le piégeage de bulles d'air, ce qui perturbe l'écoulement au sein de la puce et compromet la fiabilité expérimentale [244], comme illustré en Figure III-8. Enfin, la géométrie reste limitée à des motifs plans découpés, ce qui ne permet pas la réalisation de structures complexes ou tridimensionnelles.

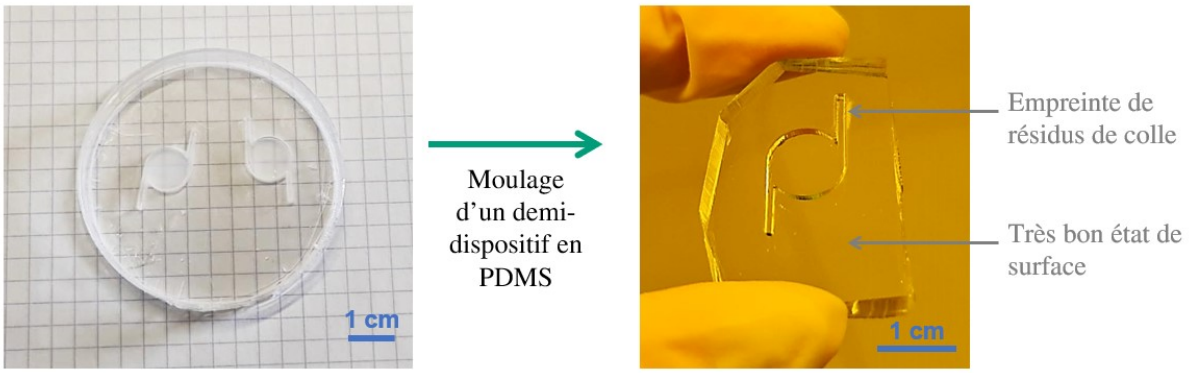


Figure III-7 : Moule hybride PMMA/PC et moulage d'un demi-dispositif en PDMS.

À gauche : moule hybride en PMMA/PC. À gauche : demi-dispositif en PDMS obtenu dans ce moule, présentant un état de surface lisse, mais des empreintes liées aux résidus de colle.

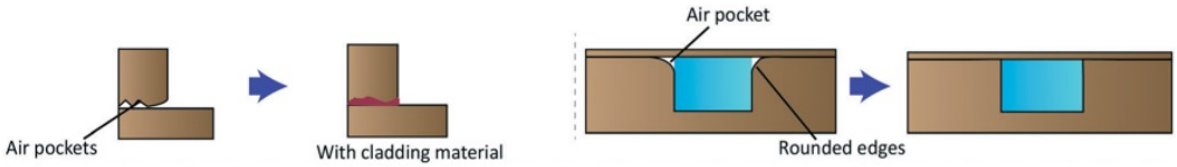


Figure III-8 : Piégeage de bulles d'air lié aux bords irréguliers au niveau de la jonction PMMA/PC [244].

Les discontinuités générées par un collage imparfait favorisent la formation de poches d'air aux interfaces, ce qui perturbe l'écoulement et compromet l'étanchéité du dispositif.

Moule monobloc obtenu par impression 3D résine

Pour dépasser les limites du premier moule, un second prototype est conçu en résine par impression 3D, sous la forme d'un monobloc exempt de jonctions.

Comme représenté en Figure III-9, le design du moule est élaboré avec le logiciel libre de conception assistée par ordinateur FreeCAD (FreeCAD Project Association, Allemagne), dédié à la modélisation paramétrique tridimensionnelle. Après finalisation du modèle numérique et export au format .stl, le moule est produit par impression 3D résine selon un procédé de photopolymérisation UV couche par couche au Centre de Compétence Emmanuel Héré (CC Héré, IJL, Nancy) par Cyril Schlauder. L'impression est réalisée sur une Form 3+ (Formlabs, États-Unis), avec une résine Tough 2000 (Formlabs, États-Unis). L'imprimante présente une résolution latérale de 25 µm et une épaisseur de couche réglable entre 25 et 300 µm, adaptées à la précision dimensionnelle requise pour le dispositif. Après impression, les pièces sont lavées dans une enceinte Form Wash (Formlabs, États-Unis) par immersion dans un bain agité d'isopropanol afin d'éliminer les résidus de résine non polymérisée. Elles subissent ensuite un post-traitement thermique dans une enceinte Form Cure (Formlabs, États-Unis) à 60 °C pendant 15 minutes. Cette post-polymérisation améliore les propriétés

mécaniques de la résine : elle augmente sa rigidité et réduit l'adhérence de surface, facilitant le démoulage [255].

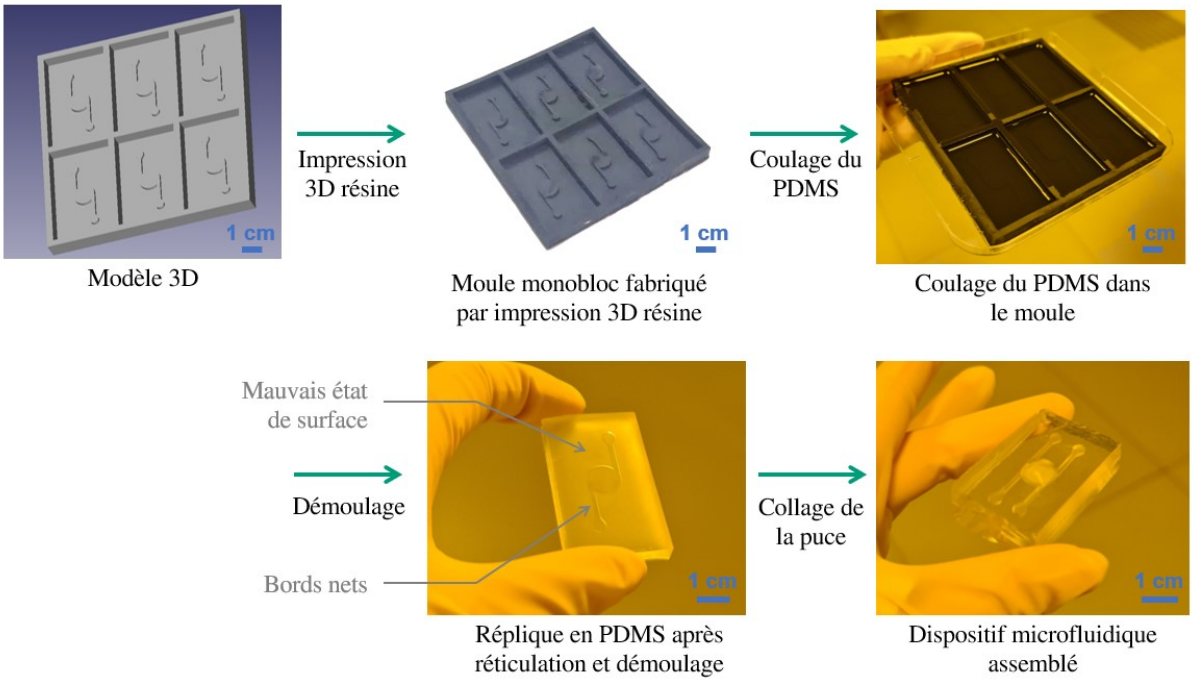


Figure III-9 : Moule monobloc obtenu par impression 3D résine et dispositif microfluidique en PDMS.

De gauche à droite et de haut en bas : modèle numérique du moule (FreeCAD), moule obtenu par impression 3D résine, coulée du PDMS, réplique en PDMS après réticulation et démoulage, et dispositif microfluidique assemblé. Les arêtes du PDMS présentent une bonne définition géométrique, mais la rugosité de surface liée au procédé d'impression altère la transparence et peut compromettre le collage plasma.

Cette architecture monobloc élimine les défauts liés aux collages, présents avec le moule hybride PMMA/PC. L'impression 3D offre en outre une grande liberté de conception, permettant de générer rapidement des géométries variées et d'ajuster les dimensions des canaux en fonction des contraintes expérimentales. En revanche, l'impression 3D présente certaines limites. La rugosité inhérente au procédé, liée à l'empilement successif des couches lors de la photopolymérisation, dégrade l'état de surface du moule. Ces irrégularités se répercutent sur les pièces en PDMS, qui perdent leur transparence et présentent un aspect de verre dépoli. Cette rugosité peut compromettre le collage plasma, lequel nécessite des surfaces parfaitement lisses pour garantir une adhésion optimale.

Comparaison des deux stratégies de fabrication

Les deux approches de fabrication présentent des caractéristiques distinctes, résumées dans le Tableau III-4. Le moule hybride PMMA/PC se distingue par sa simplicité de mise en œuvre, son faible coût et son excellent état de surface, favorable au collage plasma. En revanche, sa reproductibilité reste limitée en raison du collage manuel, et les interstices générés

peuvent entraîner des fuites ou le piégeage de bulles. Le moule monobloc obtenu par impression 3D résine offre quant à lui une grande liberté de conception et une reproductibilité élevée, mais la rugosité de surface inhérente à l'impression compromet la qualité du collage plasma.

Tableau III-4 : Comparaison des deux approches de fabrication de moules microfluidiques.

Critère	Moule hybride PMMA/PC	Moule monobloc obtenu par impression 3D résine
Matériaux	PMMA, PC, colle cyanoacrylate	Résine photopolymérisable Tough 2000
Coût	Très faible	Faible
Temps de fabrication	Très court	Court
Liberté de conception	Limitée aux formes planes uniquement	Large, possibilité de géométries 3D complexes
Reproductibilité	Faible, dépend du collage manuel	Élevée, liée à l'automatisation de l'impression
État de surface	Très bon : lisse et homogène grâce au PMMA et au PC	Mauvais : rugosité liée à l'impression
Compatibilité collage plasma	Bonne : surfaces lisses favorisant l'adhésion	Réduite ; rugosité compromettant le collage
Risque de bulle, une fois le dispositif collé plasma	Élevé, dû aux interstices et aux débordements de colle	Faible, grâce à la géométrie monobloc

Ainsi, le moule hybride PMMA/PC apparaît, à ce stade, comme la solution la plus pertinente pour la fabrication de dispositifs microfluidiques, son état de surface lisse garantissant un collage plasma fiable et donc l'étanchéité des dispositifs. Néanmoins, la rugosité encore marquée des moules issus de l'impression 3D pourrait être réduite par différentes stratégies, telles que l'utilisation de résines à plus haute résolution, l'intégration de procédés de polissage ou l'application de revêtements lissants. De telles améliorations offriraient la possibilité de tirer pleinement parti de la flexibilité de conception et de la reproductibilité qu'apporte l'impression 3D.

III.1.B - ITERATIONS D'AMELIORATION

Au-delà de la conception initiale, l'évaluation expérimentale des puces met en évidence trois défaillances majeures : l'apparition de plis membranaires, les défauts d'alignement liés au poinçonnage et les fuites aux interfaces. L'analyse de ces verrous conduit à une série d'ajustements progressifs du design et du procédé de fabrication. Cette approche itérative aboutit à un dispositif plus robuste et reproductible.

III.1.B.a - Comportement mécanique des membranes et apparition de plis

Le PEt le PDMS présentent des propriétés mécaniques très contrastées qui conditionnent leur comportement lorsqu'ils sont intégrés dans un même dispositif microfluidique. Le PET est un polymère thermoplastique dont le module d'Young est de l'ordre de 2 à 3 GPa [256], associé à un allongement à la rupture faible, d'environ 8 % [257]. Il se comporte ainsi comme un matériau rigide et stable, capable de résister à des sollicitations mécaniques importantes mais peu tolérant aux contraintes locales. Le PDMS, à l'inverse, est un élastomère viscoélastique dont le module d'Young est mille fois plus faible, de l'ordre de 1 MPa [258], et dont l'allongement à la rupture atteint environ 170 % [259]. Ce matériau possède donc une grande capacité de déformation élastique et peut s'adapter à des contraintes mécaniques importantes sans rupture.

Lors de l'assemblage des dispositifs, les surfaces sont activées par plasma d'oxygène puis mises en contact sous une légère pression afin d'assurer l'adhésion. Les différences mécaniques entre le PET et le PDMS deviennent alors particulièrement visibles : le PDMS se déforme localement, tandis que le PET, beaucoup plus rigide et faiblement extensible, oppose une résistance à la déformation. La littérature montre que ce type de contraste mécanique entre un film mince rigide contraint sur un substrat souple induit des contraintes différentielles à l'interface, qui sont souvent relâchées par l'apparition d'instabilités mécaniques hors du plan, typiquement sous la forme de flambement [260], [261]. Ce comportement est directement transposable aux membranes PET assemblées sur PDMS, pour lesquelles l'apparition de plis, illustrée en Figure III-10, peut être interprétée comme une manifestation de ce mécanisme d'instabilité mécanique.

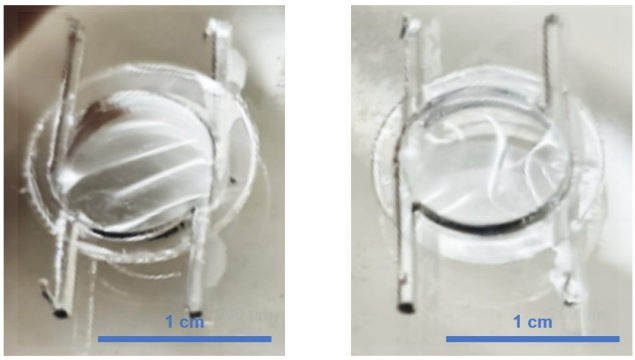


Figure III-10 : Plis de la membrane en PET après assemblage dans la puce microfluidique en PDMS.

Exemples de membranes en PET, non-poreuses, présentées sous la référence 3 dans le Tableau III-1, intégrées dans des dispositifs PDMS. Des plis apparaissent sur la surface de la membrane après mise en contact sous pression, traduisant une instabilité mécanique hors plan. Ces déformations illustrent le flambement typique des films minces rigides contraints sur un substrat souple.

L'ampleur de cette instabilité est fortement influencée par la géométrie de la membrane. D'une part, la surface libre de PET exposée joue un rôle déterminant : une membrane de faible aire est stabilisée par ses bords et tend à rester plane, tandis qu'une membrane de grande surface présente une rigidité surfacique plus faible et devient plus sujette au flambement [262]. Dans le dispositif étudié, cette aire libre correspond à la surface de culture $S_{chambre}$ et reste donc fixée par la conception. D'autre part, l'épaisseur de la membrane conditionne directement sa rigidité en flexion : une membrane épaisse résiste mieux aux instabilités, alors qu'une membrane mince, beaucoup plus flexible, est davantage sujette au flambement [263], [264]. Ici, l'épaisseur est volontairement réduite afin de permettre des échanges rapides de biomolécules entre les compartiments apical et basolatéral, ce qui limite les possibilités d'optimisation de ce paramètre. Pour limiter ce phénomène, plusieurs stratégies peuvent être envisagées :

- Une première consiste à améliorer la préparation des membranes : le recours à une découpe au LASER plutôt qu'à une découpe manuelle permet d'obtenir des bords plus réguliers et reproductibles, réduisant les micro-défauts et les contraintes résiduelles qui fragilisent la membrane. De plus, cette technique permet de réaliser des formes circulaires, une géométrie connue pour répartir plus uniformément les contraintes et réduire la probabilité de flambement par rapport à des géométries carrées [265]. Cette approche est effectivement mise en œuvre.

- Une autre piste, également mise en œuvre, concerne le procédé d'assemblage : la pression appliquée lors du collage après activation plasma est réduite au minimum nécessaire afin de limiter les contraintes initiales.

- Enfin, une alternative plus radicale consisterait à remplacer le PET par une membrane en PDMS, supprimant ainsi le désaccord mécanique entre les deux matériaux et réduisant fortement le risque de plis.

Les membranes en PET sont ainsi préparées par découpe LASER à partir de films commerciaux. La réalisation est effectuée sur machine G-1309 (ENGRAV, France) au CC Héré (IJL, Nancy) par Cyril Schlauder. Ce procédé permet d'obtenir une géométrie circulaire de 1,1 cm de diamètre, régulière et reproductible, difficilement atteignable par découpe manuelle. Il assure également des bords nets et homogènes, limitant la formation de micro-défauts susceptibles de fragiliser la membrane.

Toutefois, l'échauffement local induit par le faisceau peut endommager partiellement les bords de la membrane, générant des zones fondues et fragilisées. L'observation microscopique optique, disponible à la Figure III-11, montre que ces altérations restent confinées à une bande périphérique d'environ 400 µm de large. Étant donné que la membrane découpée au LASER mesure 1,1 cm de diamètre alors que la chambre de culture n'en occupe que 1,0 cm, une marge d'environ 500 µm subsiste de chaque côté. Ainsi, les zones

endommagées par le LASER ne sont pas en contact avec la surface exposée aux cellules, ce qui garantit l'intégrité fonctionnelle de la membrane pour les expériences de culture.

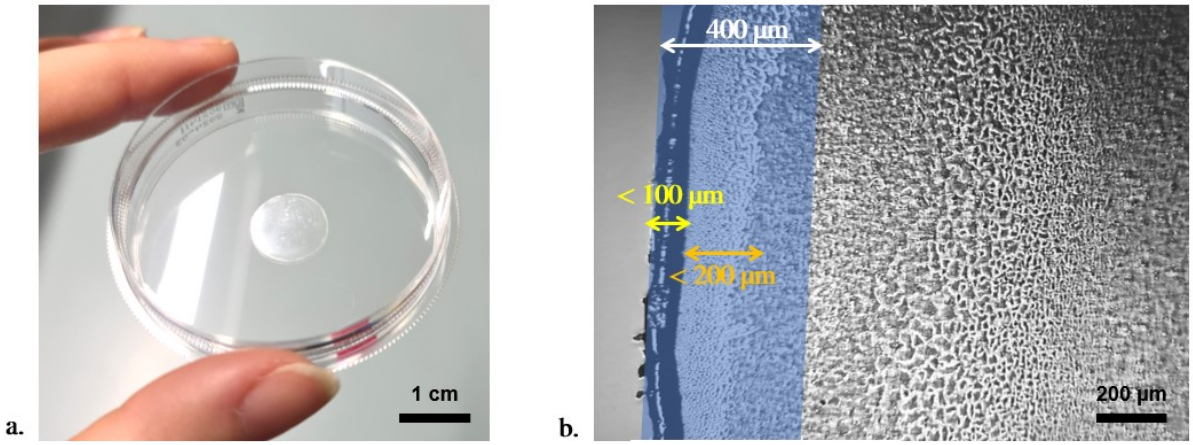


Figure III-11 : Observation de la membrane poreuse après découpe au LASER.

Membrane poreuse sous la référence 2 dans le Tableau III-1 découpée au LASER par le CC Héré (IJL, Nancy). (a) Photographie macroscopique de la membrane circulaire, de 1,1 cm de diamètre, découpée au LASER. (b) Observation au microscope optique du bord de la membrane montrant une zone périphérique endommagée par l'échauffement local (largeur < 400 µm). Cette zone altérée reste confinée en dehors de la surface utile de culture.

L'application conjointe de ces stratégies permet d'obtenir des membranes correctement intégrées, exemptes de plis visibles, comme illustré en Figure III-12. Cette planéité présente un double intérêt. Sur le plan mécanique, elle garantit une géométrie de chambre constante et une distribution homogène des flux, conditions nécessaires pour éviter la formation de zones stagnantes ou de turbulences locales. Sur le plan biologique, elle assure un environnement de culture uniforme, où les cellules sont soumises à des contraintes mécaniques et à des échanges reproductibles sur l'ensemble de la surface. L'absence de défauts topographiques limite également les hétérogénéités de polarisation et de différenciation cellulaire qui pourraient résulter d'un substrat irrégulier. Ainsi, la maîtrise de l'intégration des membranes contribue directement à la fiabilité expérimentale et constitue un prérequis essentiel à l'élaboration de l'intestin-sur-puce.

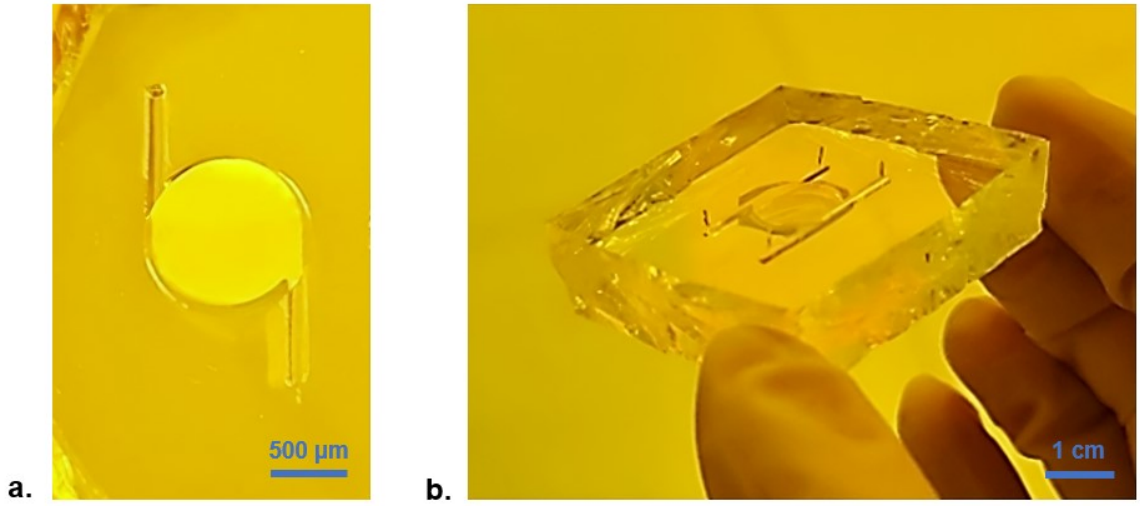


Figure III-12 : Intégration sans plis d'une membrane en PET dans la chambre de culture microfluidique.

(a) Vue rapprochée de la chambre de culture, montrant une membrane parfaitement plane et sans plis. (b) Vue macroscopique du dispositif complet intégrant la membrane. L'absence de défauts topographiques garantit la reproductibilité des conditions hydrodynamiques et biologiques, en assurant un environnement homogène pour la culture cellulaire.

III.1.B.b - Limitation des défauts d'alignement liés au poinçonnage

La fiabilité de la fabrication constitue un paramètre central dans le développement du dispositif. Bien que le protocole présente une reproductibilité globale satisfaisante, certaines étapes restent sensibles et génèrent un taux d'échec élevé. L'assemblage final des demi-dispositifs en fait partie. Cette opération intervient en toute fin de séquence de fabrication. La perte d'un dispositif à ce stade entraîne une dépense importante en temps et en ressources, puisque la quasi-totalité du protocole est déjà réalisée et qu'aucune récupération n'est possible. Le poinçonnage et l'alignement représentent donc des étapes critiques de la chaîne de fabrication, dont l'optimisation conditionne le rendement et la reproductibilité.

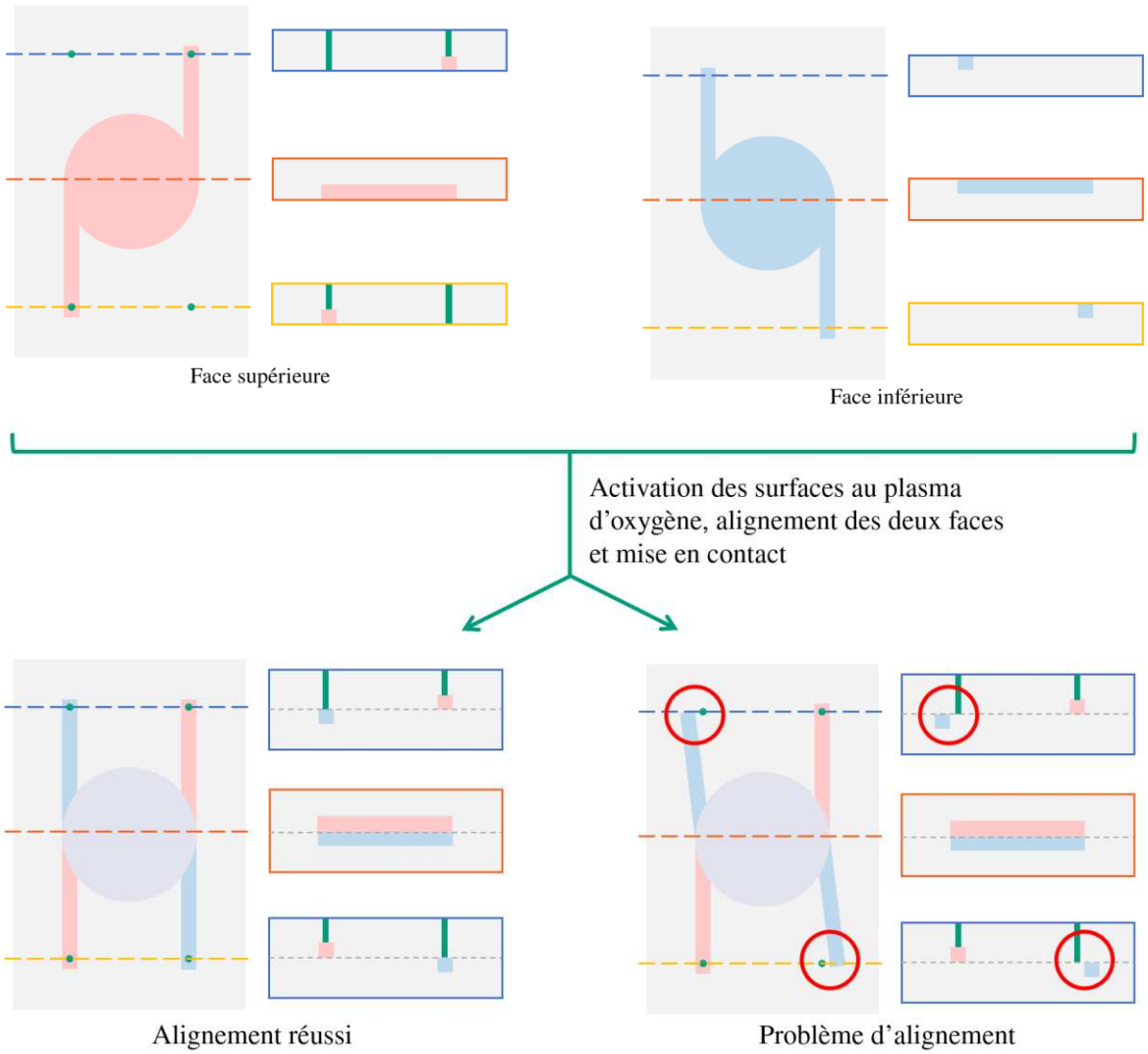


Figure III-13 : Alignements correct et incorrect des orifices poinçonnés avec les canaux inférieurs.

Principe d'assemblage des couches supérieure et inférieure après activation au plasma d'oxygène. La couche supérieure contient les poinçons, qui doivent être alignés avec précision avec les canaux de la couche inférieure. L'alignement correct permet la connexion hydraulique entre compartiments (à gauche). En cas de décalage latéral ou angulaire, les orifices ne coïncident pas avec les canaux, entraînant une obstruction (à droite).

La Figure III-13 met en évidence la contrainte majeure liée à l'étape d'assemblage. La puce microfluidique est constituée de deux faces superposées. L'alimentation en milieu de culture requiert la création d'un accès aux quatre canaux d'entrée et de sortie au moyen d'un poinçon cylindrique (Darwin Microfluidics, France). Il est préférable, d'un point de vue expérimental, de regrouper l'ensemble des connexions fluidiques sur une seule face. En effet, une configuration avec des entrées et sorties réparties sur les deux côtés du dispositif impliquerait un branchement simultané par le dessus et par le dessous, ce qui compliquerait l'installation dans l'incubateur et l'observation microscopique. Ainsi, il est préférable de regrouper l'ensemble des connexions fluidiques sur une seule face : les orifices destinés à

rejoindre les canaux basolatéraux sont donc réalisés dans la couche supérieure. Après activation des surfaces au plasma d'oxygène, cette couche supérieure, comportant tous les orifices, doit être positionnée avec une précision élevée afin d'aligner les poinçons et les canaux inférieurs. Le collage entraîne la formation de liaisons covalentes irréversibles, ce qui empêche tout ajustement après contact. Dans ces conditions, la tolérance d'alignement est très faible : un décalage latéral faible suffit à obstruer partiellement ou totalement les entrées, compromettant la fonctionnalité hydraulique du dispositif.

Une correction du défaut d'alignement pourrait a priori être envisagée en réalisant un poinçonnage supplémentaire sur le dispositif déjà assemblé. Cette approche présente cependant deux limitations majeures. La première correspond à la formation d'une carotte de PDMS qui reste emprisonnée dans le canal. Cette particule macroscopique perturbe l'écoulement et peut conduire à une obstruction complète des canaux. La seconde limitation est liée aux contraintes mécaniques générées par deux perforations adjacentes dans un matériau élastomère. La paroi perd alors sa stabilité structurale, ce qui se traduit par l'apparition de déchirures et de fissures radiales. Les orifices obtenus ne conservent pas une géométrie cylindrique régulière, ce qui compromet l'étanchéité et conduit à des fuites rendant le dispositif non fonctionnel.

Afin de prévenir les problèmes d'alignement observés lors de l'assemblage, la géométrie des zones de poinçonnage est modifiée. Des réservoirs circulaires de 4 mm de diamètre sont intégrés à l'extrémité des canaux afin d'augmenter la surface disponible pour l'alignement. La transition entre un canal rectiligne et une zone circulaire génère normalement un angle abrupt, susceptible de créer une discontinuité d'écoulement et de favoriser l'apparition de bulles. Pour éviter ce problème, les contours sont adoucis par des transitions arrondies, ce qui supprime les angles vifs. Ainsi, cette deuxième génération de design accroît la tolérance aux imprécisions latérales lors du collage, tout en maintenant la stabilité hydraulique du dispositif. Le design a été décliné sous deux formes : un modèle bidimensionnel adapté aux moules hybrides en PMMA/PC, présent en Figure III-14, et un modèle tridimensionnel adapté à la fabrication de moules monoblocs résine, présenté en Figure III-15.

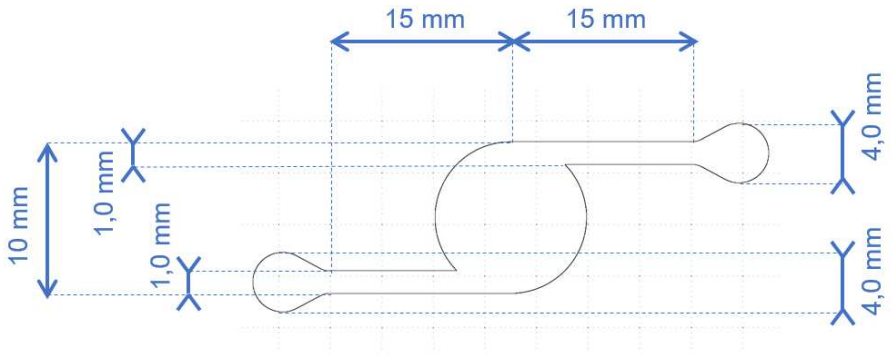


Figure III-14 : Modèle numérique 2D de la 2e génération de design intégrant des zones de poinçonnage pour moule hybride PMMA/PC.

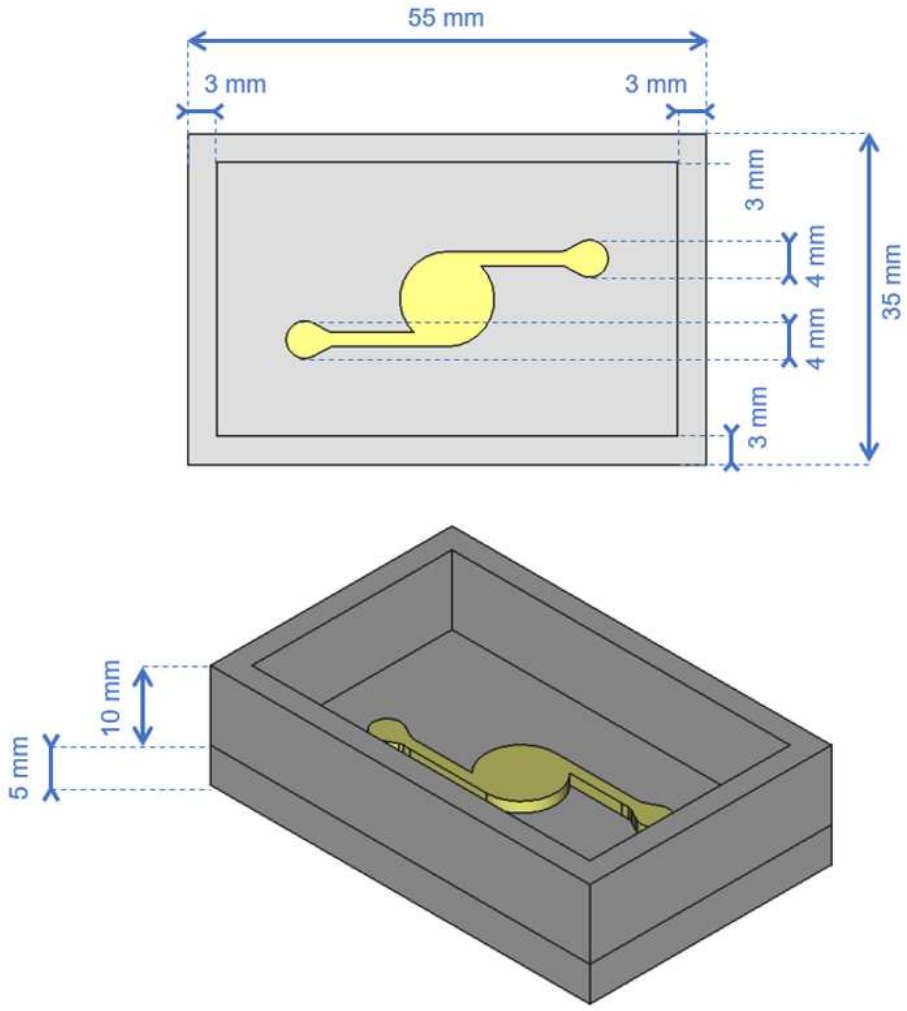


Figure III-15 : Modèle numérique 3D de la 2e génération de design intégrant des zones de poinçonnage adapté à un moule monobloc résine.

III.1.B.c - Amélioration de l'étanchéité par modification des orifices d'entrée et sortie

Avant leur utilisation avec des cultures cellulaires, les puces microfluidiques sont soumises à une phase de validation. Cette étape consiste à les tester en conditions expérimentales réelles pour vérifier leur étanchéité.

Description du protocole de perfusion

Pour réaliser ces essais de validation, le système de perfusion repose sur une pompe péristaltique G100-2J (LongerPump, Royaume-Uni), équipée d'une tête DG-6 comportant six galets et permettant l'utilisation simultanée de six tubulures. Les tubulures utilisées sont des tubes flexibles en silicone durcis au platine (Darwin Microfluidics, France) de dimensions 1 mm × 1 mm, correspondant à un diamètre interne de 1,0 mm, une épaisseur de paroi de 1,0 mm et un diamètre externe de 3 mm. Des aiguilles creuses de type 18G (Darwin Microfluidics, France), présentant un diamètre externe de 1,27 mm et un diamètre interne de 0,84 mm, sont utilisées pour le raccordement fluidique entre la puce microfluidique et les tubulures.

Avant toute expérimentation, le matériel est nettoyé. Les aiguilles et tubulures sont rincées, tant sur leurs surfaces internes qu'externes, à l'éthanol 70 % pour assurer une désinfection. Un rinçage à l'eau désionisée (EDI) élimine l'éthanol résiduel et prévient toute interaction cytotoxique. Un passage au tampon phosphate salin (PBS) rétablit ensuite une composition ionique compatible avec la viabilité cellulaire et supprime les traces d'EDI. Enfin, l'ensemble du système est exposé à une irradiation UV pendant 15 minutes, ce qui constitue une stérilisation complémentaire destinée à limiter le risque de contamination microbiologique. La pompe est nettoyée séparément par application d'éthanol à 70 % sur l'ensemble de ses surfaces externes.

Le montage est ensuite installé dans un incubateur réglé à 37 °C et 5 % de CO_2. Les tubulures d'alimentation sont insérées dans la cassette de la pompe péristaltique. Une extrémité est immergée dans un réservoir contenant le milieu de culture, tandis que l'autre est connectée à une aiguille creuse insérée à l'entrée du système microfluidique. En sortie, une seconde aiguille relie une tubulure collectrice qui achemine le fluide vers un réservoir de récupération, comme illustré en Figure III-16.

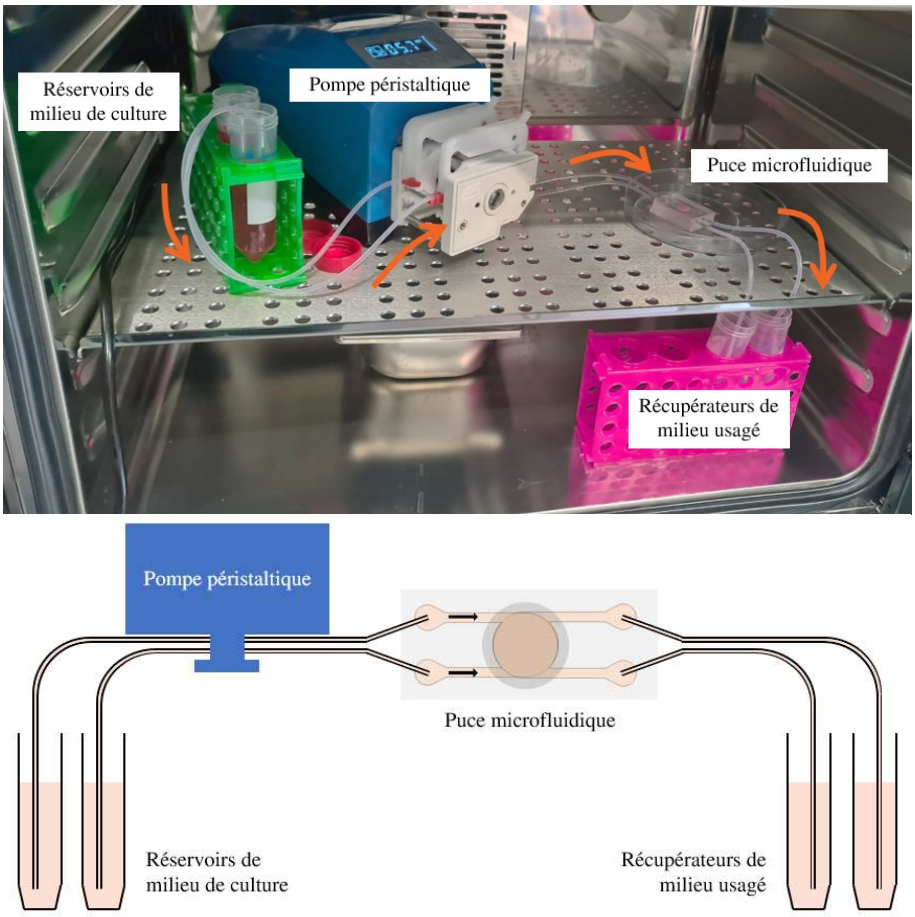


Figure III-16 : Image (en haut) et schéma (en bas) de la perfusion de la puce microfluidique.

En raison des volumes importants requis pour atteindre un débit correspondant à une contrainte de cisaillement pariétale physiologique, précédemment détaillés, l'utilisation d'un circuit ouvert s'avère peu pratique, car elle impose un remplacement fréquent des réservoirs. Une alternative consiste à faire circuler le milieu en boucle fermée, comme illustré en Figure III-17.

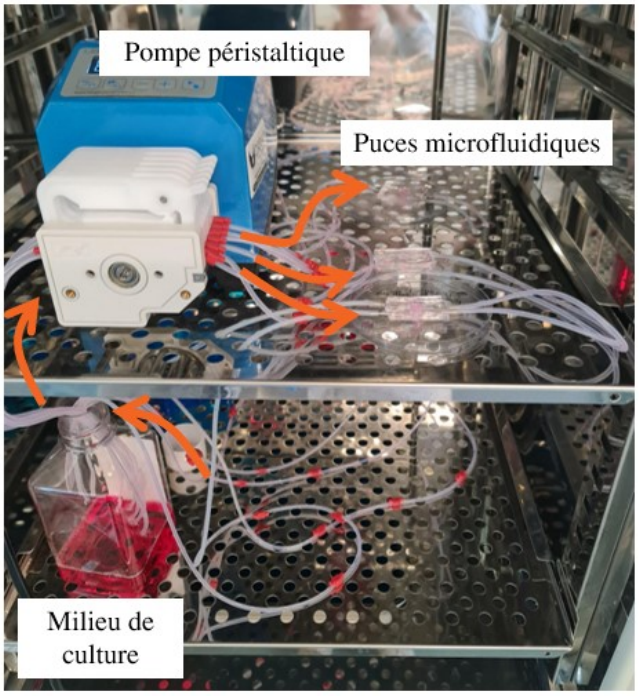


Figure III-17 : Image de la perfusion de trois puces microfluidiques en boucle fermée.

Le réglage de la pompe est effectué conformément aux spécifications du constructeur. Dans cette configuration (tête DG-6, tube 1 mm × 1 mm), le débit dans la tubulure Q [mL. min^{-1}] est proportionnel à la vitesse de rotation r [rpm] selon la relation : $Q = 0{,}08 \cdot r_{pompe}$ [266]. Ainsi, pour obtenir $Q_{cible} = 480$ mL. min^{-1}, une consigne de $r_{pompe} = 6{,}0$ rpm est appliquée. La perfusion est ensuite démarrée et maintenue en flux pendant 24 h. En cas de fuite, la circulation est immédiatement interrompue.

À la fin de l'expérience, le matériel est nettoyé. Les tubulures et aiguilles sont successivement rincées au PBS pour éliminer le milieu de culture, à l'EDI pour retirer les sels résiduels, puis à l'éthanol 70 % pour assurer une désinfection. L'ensemble est ensuite purgé par injection d'air afin d'assurer une vidange complète. Enfin, le dispositif est de nouveau exposé à une irradiation UV de 15 minutes afin de réduire les risques de contamination lors du stockage.

Comparaison entre poinçonnages vertical et horizontal

Ces essais ont mis en évidence des défauts d'étanchéité se traduisant par des fuites localisées au niveau des interfaces d'entrée et de sortie. Ce phénomène est directement lié au poinçonnage vertical des orifices de connexion dans le PDMS, comme illustré en Figure III-18.a. Sur le plan mécanique, l'insertion perpendiculaire des aiguilles génère un effet de levier qui provoque une déformation du PDMS et un élargissement progressif des orifices, compromettant l'étanchéité. Cette fragilité est accentuée lorsque l'épaisseur de PDMS est réduite, condition pourtant nécessaire pour l'observation en microscopie optique. Selon la

littérature, les connexions verticales augmentent le risque de fuites, en raison des contraintes mécaniques exercées au niveau des orifices et de l'apparition de zones de stagnation à l'entrée du canal. À l'inverse, les connexions horizontales offrent une meilleure stabilité mécanique et hydrodynamique, assurant ainsi un fonctionnement plus robuste et reproductible du dispositif [267], [268]. En conséquence, les connexions sont désormais réalisées par orifices horizontaux, comme illustré en Figure III-18.b.

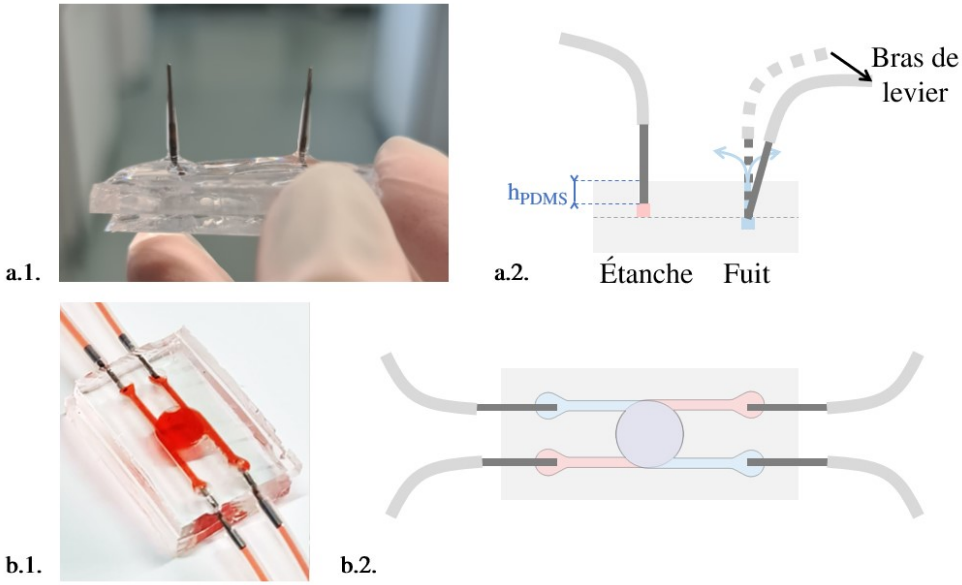


Figure III-18 : Direction de connexion des aiguilles dans les puces microfluidiques.

(a) Connexion verticale, image (a.1) et schéma (a.2) : l'aiguille est insérée perpendiculairement dans le PDMS. L'étanchéité initiale dépend de l'épaisseur h_{PDMS}. Un effet de levier se produit lorsque la tubulure est sollicitée, entraînant une déformation du PDMS et l'agrandissement du trou, ce qui conduit à des fuites. (b) Connexion horizontale, image (b.1) et schéma (b.2) : l'aiguille est insérée dans le plan du canal microfluidique. Cette configuration limite l'effet de levier et améliore l'étanchéité.

En pratique, le poinçonnage horizontal présente un inconvénient supplémentaire : les carottes de PDMS générées lors du perçage restent fréquemment piégées dans les canaux, perturbant l'écoulement.

Défauts liés au poinçonnage

De plus, des défauts intrinsèques au procédé de poinçonnage subsistent, indépendamment de l'orientation adoptée. Les orifices réalisés dans le PDMS sont caractérisés par MEB par Cyril Noirel, technicien d'appui à la recherche de l'équipe Nanomatériaux et Santé (403, IJL). Les observations portent sur des trous obtenus avec un poinçon en acier inoxydable de 1,0 mm de diamètre. L'analyse, disponible à la Figure III-19, indique que le diamètre n'est pas constant sur la profondeur du trou et se réduit progressivement de 0,98 mm à 0,53 mm. Aussi, la circularité est imparfaite et conduit à un contour irrégulier. De plus, les parois

présentent des défauts, notamment des débris micrométriques de PDMS et des déchirures longitudinales. Ainsi, ces irrégularités compromettent l'étanchéité des entrées et sorties et réduisent la reproductibilité des raccordements fluidiques de la puce.

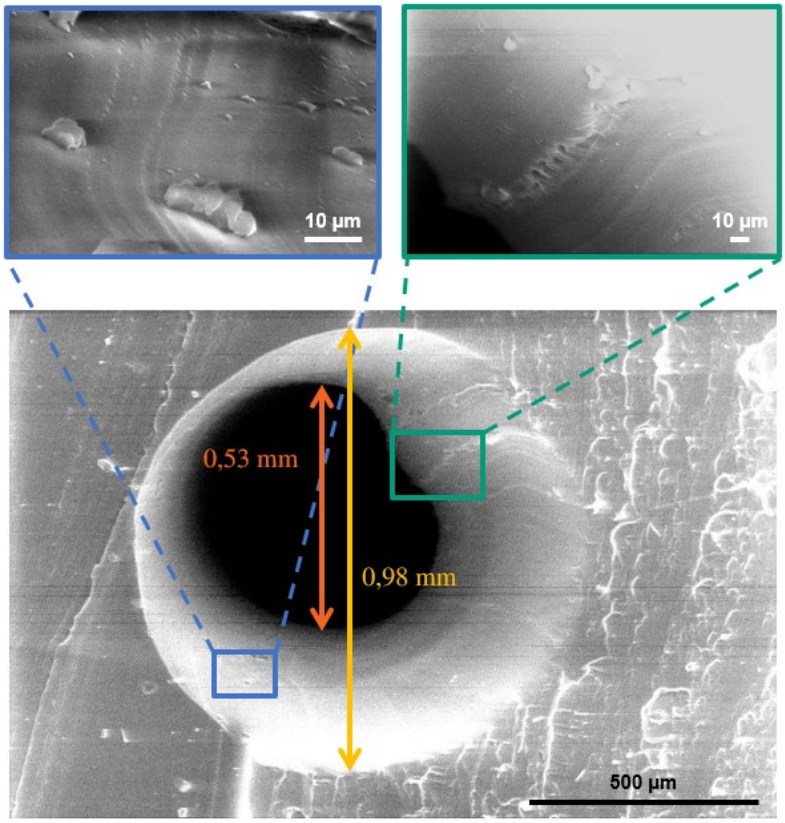


Figure III-19 : Caractérisation MEB d'un orifice de connexion réalisé par poinçonnage dans le PDMS.

Trou obtenu avec un poinçon de 1,0 mm. Le diamètre se rétrécit de 0,98 mm à 0,53 mm, traduisant une géométrie conique. Les agrandissements montrent des débris micrométriques (bleu) et des déchirures longitudinales (vert).

Troisième génération de design : intégration de canaux rétrécis

Afin de surmonter les limites associées au poinçonnage du PDMS, une troisième génération de design est développée. Dans cette configuration, les extrémités des canaux d'entrée et de sortie intègrent directement un rétrécissement de section, conçu pour jouer le rôle de poinçon intégré. Chaque canal étroit présente une largeur de 0,5 mm. transition entre le canal principal et le canal rétréci est assurée par une géométrie trapézoïdale, limitant les discontinuités angulaires et les risques de perturbation de l'écoulement.

Le dispositif est disponible en deux formats complémentaires : un modèle 2D, disponible à la Figure III-20, adaptés aux moules hybrides PMMA/PC, et un modèle 3D, présent en Figure III-21, conçu pour les moules obtenus par impression 3D résine.

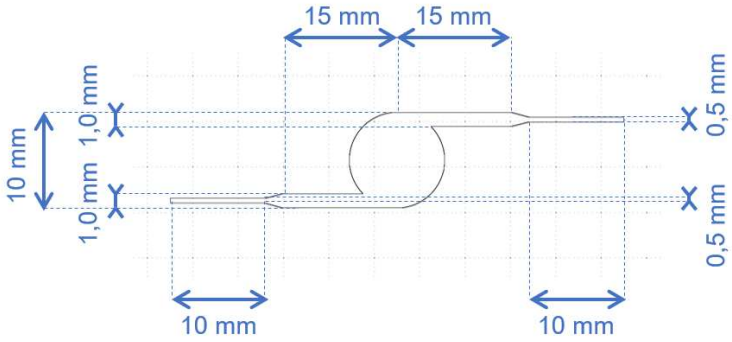


Figure III-20 : Modèle numérique 2D de la 3e génération de design intégrant un prolongement en canal étroit.

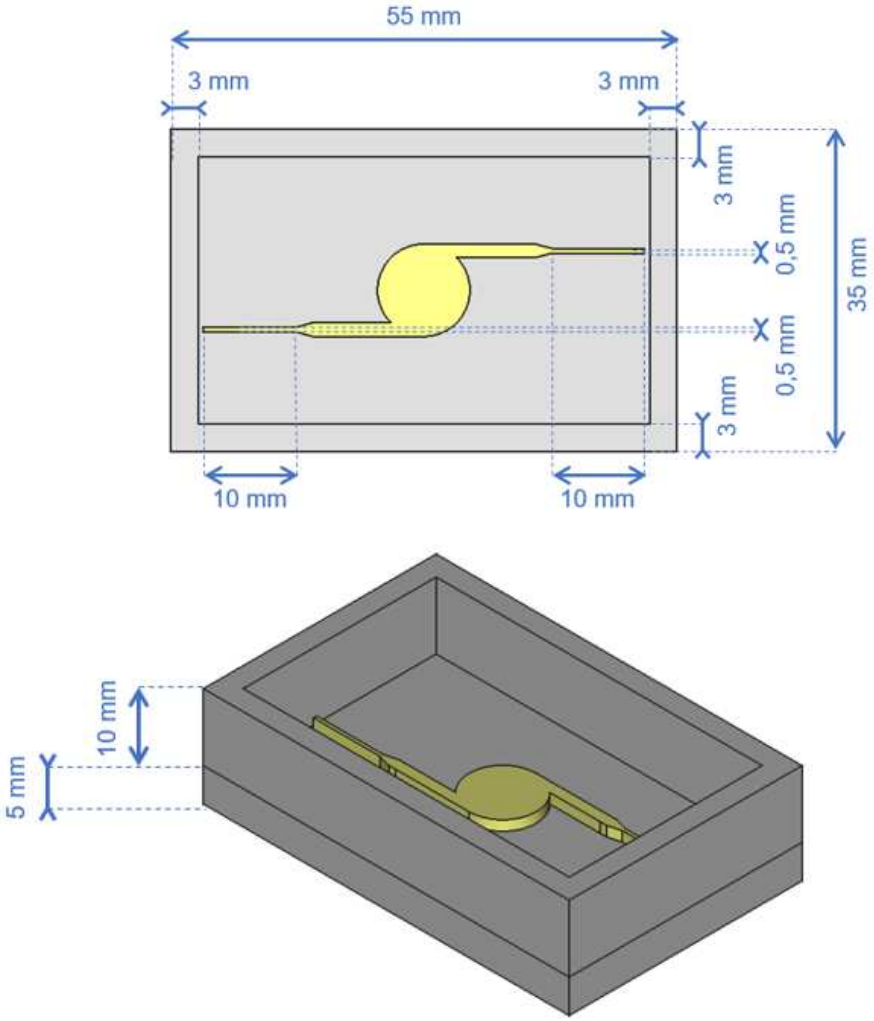


Figure III-21 : Modèle numérique 3D de la 3e génération de design intégrant un prolongement en canal étroit.

Le principe de fabrication consiste à mouler séparément les deux demi-dispositifs, à les assembler par collage plasma, puis à réaliser une découpe nette au scalpel dans la zone rétrécie,

comme illustré en Figure III-22. Cette opération génère l'orifice d'entrée ou de sortie sans recourir au poinçonnage.

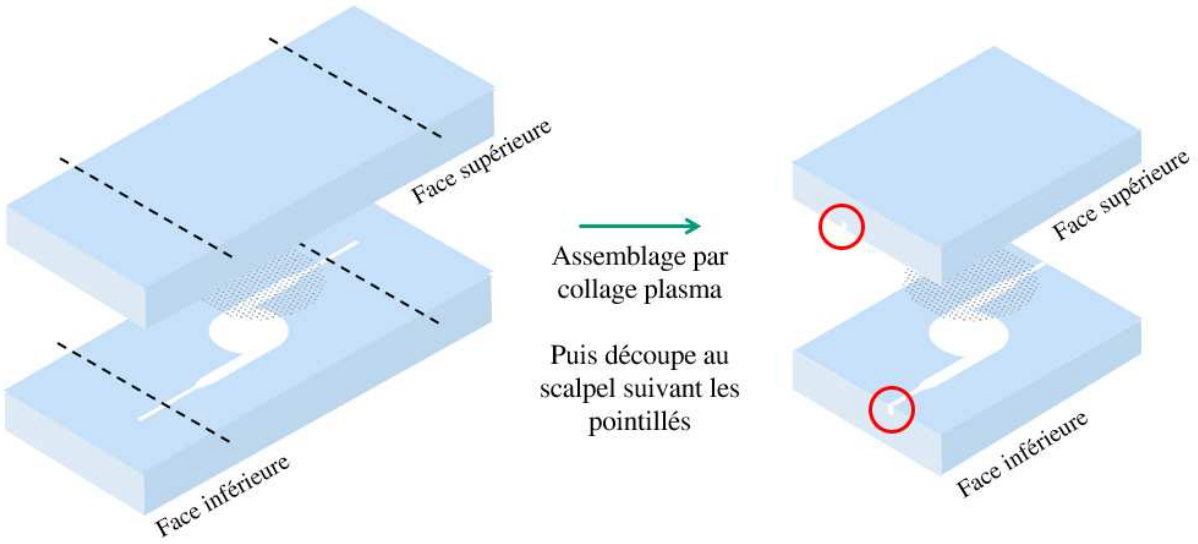


Figure III-22 : Schéma en vue éclatée de l'assemblage du dispositif de 3e génération.

Schéma du procédé d'assemblage des deux demi-dispositifs par collage plasma, suivi d'une découpe au scalpel dans la zone rétrécie, symbolisée par des pointillés noirs et mis en évidence par des cercles rouges.

La qualité des orifices générés par la troisième génération de design est vérifiée par MEB. Les observations, également réalisées par Cyril Noirel, montrent que les dimensions obtenues correspondent aux valeurs attendues, c'est-à-dire à une section rectangulaire de 1,5 mm x 0,5 mm. Les bords apparaissent nets, sans débris ni déchirures, contrastant avec les irrégularités observées dans les orifices obtenus par poinçonnage. Une différence est néanmoins visible entre les faces supérieure et inférieure : la face supérieure présente un angle droit arrondi, conforme au moule, tandis que la face inférieure, issue du collage plasma des deux demi-dispositifs, présente un léger fléchissement lié à la pression d'assemblage. Cette déformation reste localisée et n'affecte pas l'étanchéité. Ces résultats confirment un meilleur contrôle géométrique et une reproductibilité accrue du procédé, assurant des interfaces régulières et étanches.

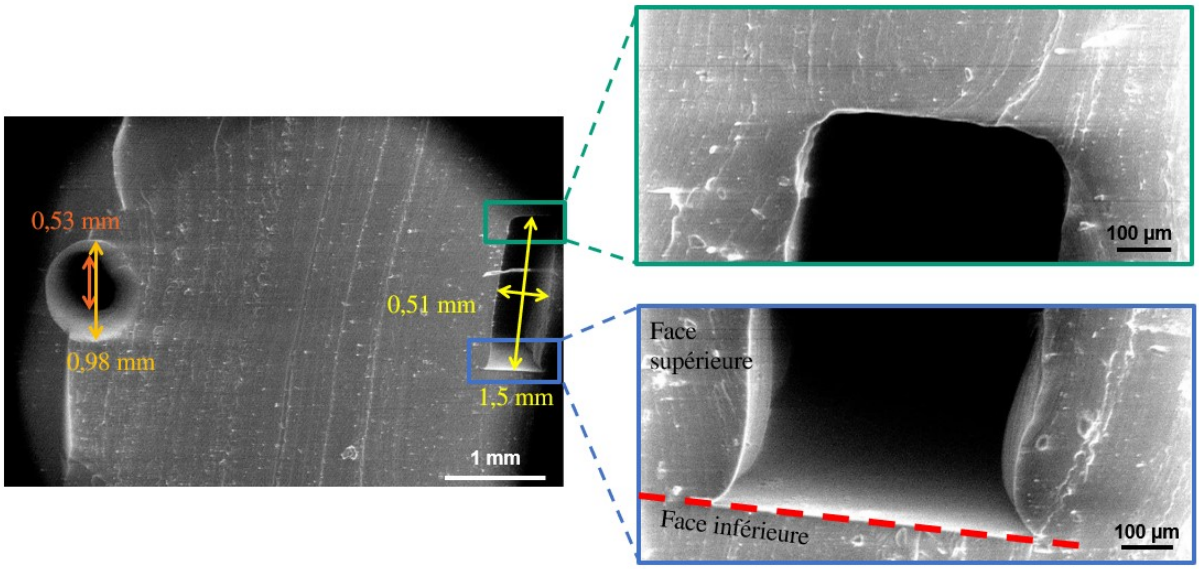


Figure III-23 : Comparaison par observation MEB des trous obtenus par les deux méthodes : poinçon et design de 3e génération.

Perspectives d'amélioration

Malgré cette amélioration, la géométrie des orifices présente encore des limites. La section rectangulaire obtenue est peu adaptée à l'insertion d'aiguilles cylindriques. Pour garantir l'étanchéité, le diamètre de l'aiguille doit excéder la plus grande dimension de l'orifice. Dans le cas présent (1,5 mm × 0,5 mm), l'anisotropie marquée entre hauteur et largeur concentre les contraintes mécaniques le long de la plus petite dimension. Cette configuration accroît le risque de déchirement du PDMS lors de l'insertion de l'aiguille. Une section carrée constituerait une alternative plus robuste. En équilibrant les dimensions, elle répartit les efforts de manière plus homogène, limitant ainsi les zones de concentration de contraintes. Toutefois, la section circulaire représente la solution la plus adaptée à l'insertion d'aiguilles cylindriques. Le contact est alors continu sur tout le pourtour, garantissant une étanchéité optimale et une meilleure résistance mécanique à la déformation. Néanmoins, cette configuration pose des verrous technologiques lors de la fabrication. La réalisation de géométries circulaires précises par moulage en PDMS nécessite l'emploi de moules spécifiques, plus complexes à mettre en œuvre.

III.1.C - CARACTERISATION DE LA FONCTIONNALISATION DE LA MEMBRANE

La caractérisation de la fonctionnalisation des membranes en PET représente une étape clé pour valider la pertinence du protocole chimique développé. Afin d'évaluer de manière rigoureuse les modifications de surface obtenues, trois approches complémentaires sont mises en œuvre. La première consiste en la mesure de l'angle de contact, une méthode

particulièrement sensible aux variations de chimie de surface et permettant de quantifier l'évolution du caractère hydrophile de la membrane. La deuxième repose sur la microscopie à force atomique (AFM), qui offre de visualisation topographique à l'échelle nanométrique. Enfin, la troisième étude concerne de l'élargissement éventuel des pores suite à l'hydrolyse de la membrane.

III.1.C.a - Mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle de contact est une méthode de référence pour caractériser les propriétés interfaciales d'un matériau. Elle renseigne sur sa mouillabilité, c'est-à-dire la capacité d'une surface solide à interagir avec une phase liquide. Ici, la surface considérée est celle des membranes et la phase liquide est l'eau ultrapure Milli-Q, ce qui permet d'évaluer directement l'évolution de leur caractère hydrophile au cours de la fonctionnalisation.

Les échantillons analysés sont des membranes en PET homogène, sans pore, présentées dans le Tableau III-1 sous la référence 3. Elles ont été fonctionnalisées immédiatement avant la mesure, afin de préserver son état chimique de surface. Avant leur mise en place, les membranes ont été séchées sous flux d'azote pour éliminer toute humidité résiduelle. Les mesures ont été réalisées avec le DigiDrop Contact Angle Meter (GBX Scientific Instruments, France), équipé d'une caméra et d'un éclairage latéral. Les membranes sont posées à plat sur la platine et immobilisées par un cadre de maintien pour éviter tout gauchissement. La surface analysée est exempte de particules (soufflage N_2 sec à faible débit) et n'est pas manipulée après fonctionnalisation afin de préserver son état chimique. Une goutte d'eau ultrapure Milli-Q de volume contrôlé est déposée à la surface du substrat, et une image latérale est acquise. Comme illustré en Figure III-24, trois points caractéristiques sont alors identifiés : le point de contact gauche, le point de contact droit et le sommet de la goutte. À partir de ces repères, les angles de contact gauche et droit sont déterminés, puis l'angle effectif est calculé comme la moyenne des deux valeurs.

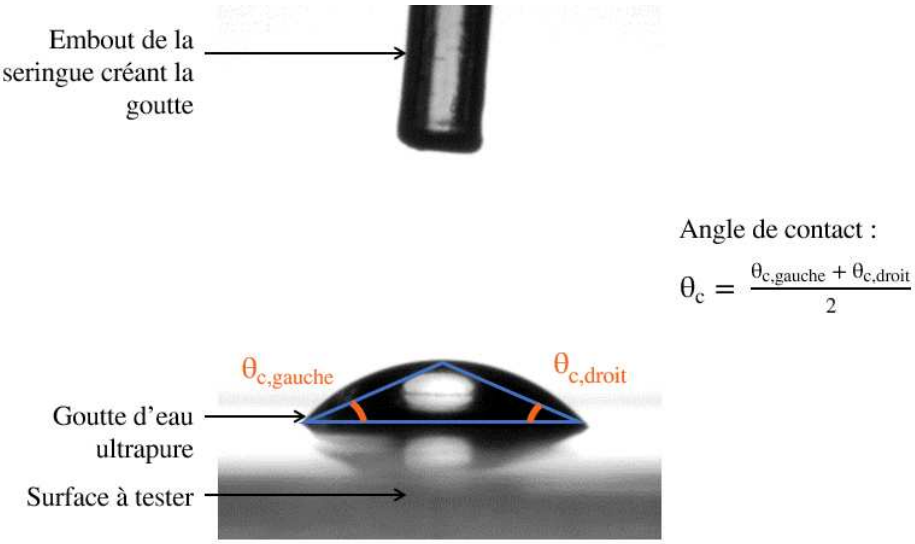


Figure III-24 : Mesure de l'angle de contact.

Afin d'assurer la représentativité statistique des résultats, au moins trois acquisitions successives sont réalisées sur une même zone de la membrane, dans un délai inférieur à 1 min. Cette contrainte temporelle vise à limiter l'évaporation de la goutte, qui réduit progressivement son volume et entraîne une diminution artificielle de l'angle de contact. La procédure est ensuite répétée sur au moins trois zones distinctes de la membrane, afin de prendre en compte l'éventuelle hétérogénéité spatiale de la surface. Cette répétition garantit une estimation fiable de l'état hydrophile global.

Le logiciel associé à l'appareil extrait automatiquement les angles gauche $\theta_{c,gauche}$ et droit $\theta_{c,droit}$, qui sont exportés dans un tableur. Les données sont ensuite traitées sous Python, avec calcul de l'angle moyen θ_c et de l'incertitude élargie $\Delta\theta_c$. Cette dernière est déterminée selon l'expression donnée à l'Équation III-4 :

$$\Delta\theta_c = t_{95\%} \times \frac{s_c}{n_{échantillons}}$$

Équation III-4 : Incertitude élargie sur l'angle de contact.

Avec :

$\Delta\theta_c$	l'incertitude élargie sur l'angle de contact, en [°]
$t_{95\%}$	le facteur de Student pour un intervalle de confiance de 95 %, sans unité
s_c	l'écart-type des mesures d'angle de contact, en [°]
$n_{échantillons}$	le nombre d'échantillons, sans unité

Les résultats, disponibles à la Figure III-25, montrent une décroissance progressive de l'angle de contact : 71,4 ± 1,1°à l'état initial, 70,3 ± 1,6°après hydrolyse, 64,7 ± 1,4°après traitement EDC/NHS et 49,5 ± 0,9°après greffage de la fibronectine. Cette évolution traduit l'introduction progressive de groupements fonctionnels polaires à la surface du PET :

l'hydrolyse basique induit la formation de fonctions carboxyles, l'EDC/NHS génère des esters et le greffage de la fibronectine enrichit l'interface en chaînes polaires issues de la protéine. L'accumulation de ces fonctions polaires accroît la capacité de la surface à interagir avec l'eau, ce qui se traduit macroscopiquement par une augmentation de l'hydrophilie et une diminution progressive de l'angle de contact. Ces résultats confirment ainsi, de manière indirecte mais robuste, la bonne réalisation des différentes étapes de fonctionnalisation chimique de la membrane.

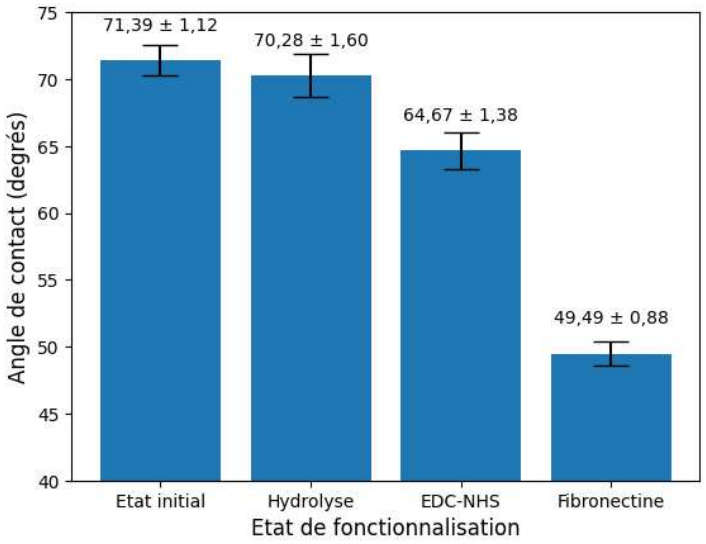


Figure III-25 : Mesure de l'angle de contact des membranes à chaque étape de la fonctionnalisation.

Ces observations sont en accord avec les données de la littérature, où l'angle de contact mesuré sur des membranes en PET non fonctionnalisées est d'environ 74,1 ± 2,6°et chute à 56,7 ± 2,0°après greffage de fibronectine [269]. Dans notre étude, l'angle mesuré après greffage est légèrement plus faible (49,4 ± 0,9°contre 56,7 ± 2,0°dans la littérature). Cette différence peut être attribuée à plusieurs paramètres, notamment à des protocoles de fonctionnalisation différents, qui influencent la densité et la conformation des protéines immobilisées, ainsi qu'aux conditions expérimentales de mesure, telles que la cinétique d'acquisition ou encore l'humidité et la température ambiantes. Néanmoins, cette variation reste dans la plage attendue et confirme le greffage de la fibronectine.

III.1.C.b - Imagerie au microscope à force atomique

La Microscopie à Force Atomique (AFM) est une technique de caractérisation de surface permettant d'atteindre une résolution nanométrique. Son principe repose sur l'interaction entre une pointe extrêmement fine, montée à l'extrémité d'un cantilever flexible, et la surface de l'échantillon. En mode non-contact, la pointe est maintenue à quelques nanomètres de la surface et son oscillation, proche de la fréquence de résonance du cantilever,

est modulée par les interactions électrostatiques établies avec la surface. Ces variations sont mesurées par un système optique basé sur la réflexion d'un faisceau LASER sur le cantilever et leur détection par un photodétecteur de position. Le balayage de la pointe au-dessus de l'échantillon permet ainsi de reconstruire une cartographie tridimensionnelle de la surface, renseignant avec une grande précision sur sa rugosité et sa morphologie [270].

Dans ce travail, l'AFM est employée pour caractériser la topographie des membranes en PET au cours des différentes étapes de fonctionnalisation, afin de suivre l'évolution de la rugosité et de mettre en évidence la présence de dépôts protéiques liés au greffage de la fibronectine. Les mesures sont réalisées avec un AFM (Park Systems, Corée du Sud) en mode non-contact. Les membranes sont soigneusement séchées à température ambiante pour éviter toute influence de l'humidité résiduelle, puis fixées sur un support rigide à l'aide d'un adhésif double face qui assure la stabilité mécanique lors du balayage. L'imagerie est conduite en maintenant la pointe à proximité immédiate de la surface. Le balayage ligne par ligne permet de recueillir les variations d'interaction entre la pointe et l'échantillon, traduites en une cartographie tridimensionnelle. Les images obtenues sont ensuite traitées avec le logiciel libre et open-source Gwyddion (Czech Metrology Institute, République Tchèque), qui corrige l'inclinaison éventuelle de l'échantillon et remet à zéro la valeur minimale des hauteurs.

Les résultats AFM sont présentés à la Figure III-26, sous forme d'images bidimensionnelles et tridimensionnelles, et à la Figure III-27 sous forme de profils de hauteur extraits des cartographies. L'évolution quantitative de la rugosité RMS, calculée avec le logiciel Gwyddion, est rassemblée dans le Tableau III-5. Cette rugosité quadratique moyenne correspond à la racine carrée de la moyenne des carrés des écarts de hauteur par rapport au plan moyen. Elle constitue un indicateur statistique robuste de l'irrégularité de surface et permet de comparer objectivement différentes conditions. L'analyse conjointe des images, des profils et des valeurs de rugosité permet de décrire la transformation morphologique des membranes en PET au cours des différentes étapes de la fonctionnalisation.

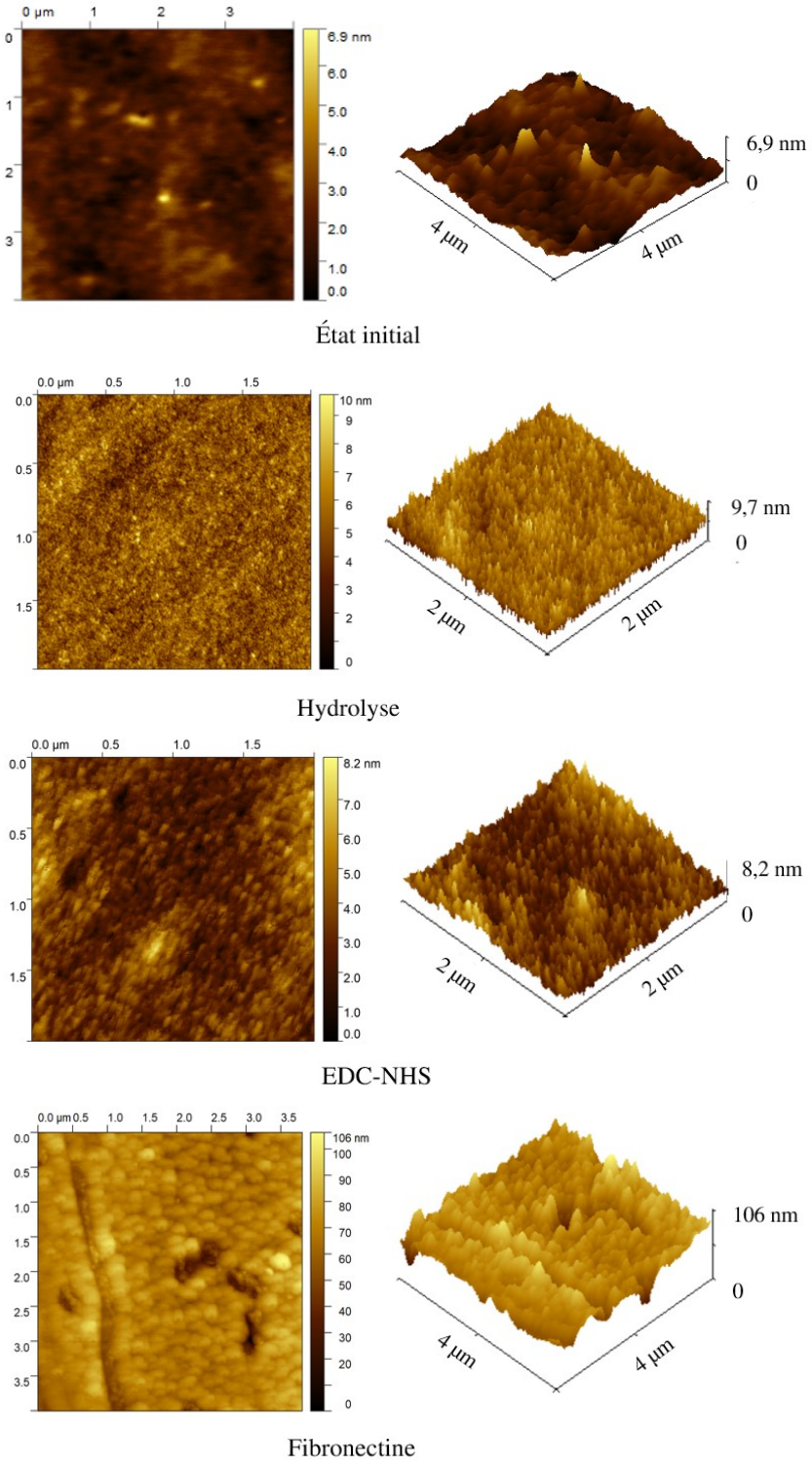


Figure III-26 : Imagerie AFM de la surface des membranes en PET aux différentes étapes de la fonctionnalisation.

Les vues bidimensionnelles (à gauche) et tridimensionnelles (à droite) illustrent l'évolution de la topographie de la surface à l'état initial, après hydrolyse, après activation chimique par EDC/NHS et après greffage de la fibronectine. Les dimensions latérales x et y sont exprimées en micromètres, tandis que l'échelle de hauteur z est donnée en nanomètres.

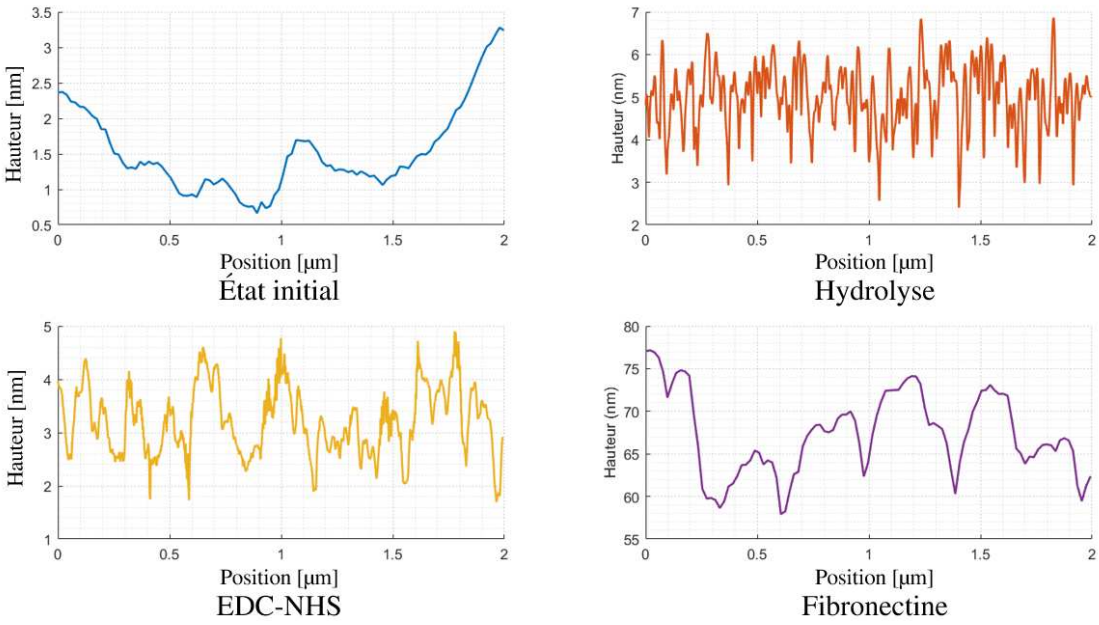


Figure III-27 : Profils de hauteur extraits des cartographies AFM de membranes en PET aux différentes étapes de la fonctionnalisation.

Les profils mettent en évidence l'évolution progressive de la rugosité : variations limitées à l'état initial, fluctuations accrues après hydrolyse et EDC-NHS et apparition de reliefs de plusieurs dizaines de nanomètres après greffage de la fibronectine.

Tableau III-5 : Rugosité RMS des membranes en PET aux différentes étapes de la fonctionnalisation.

État de fonctionnalisation	État initial	Hydrolyse	EDC-NHS	Fibronectine
Rugosité	0,68 nm	0,97 nm	0,95 nm	9,5 nm

La rugosité est calculée avec le logiciel Gwyddion comme la racine carrée de la moyenne des carrés des écarts de hauteur par rapport au plan moyen. Les valeurs reflètent l'augmentation progressive de l'irrégularité de surface, avec une hausse marquée après greffage de la fibronectine.

À l'état initial, la surface du PET apparaît lisse et homogène. Les images révèlent une topographie régulière et les profils montrent des variations limitées à quelques nanomètres seulement. La rugosité RMS est de 0,68 nm, ce qui traduit une surface plane et caractéristique du polymère non modifié.

Après hydrolyse, la surface présente des reliefs plus marqués. Les profils de hauteur mettent en évidence des fluctuations plus importantes, atteignant localement 7 nm, et la rugosité RMS augmente à 0,97 nm. Ces résultats indiquent une modification de la texture associée à l'introduction de groupements fonctionnels et à une légère dégradation de la surface.

L'activation par EDC-NHS conduit à une topographie comparable à celle observée après hydrolyse. La rugosité RMS reste inchangée, ce qui suggère que cette étape modifie principalement la chimie de surface sans entraîner de réorganisation morphologique notable.

Enfin, après greffage de la fibronectine, les images AFM mettent en évidence l'apparition de structures globulaires nanométriques et la rugosité RMS atteint 9,5 nm, soit une augmentation d'un ordre de grandeur par rapport aux étapes précédentes. La littérature rapporte que la fibronectine adopte, lorsqu'elle est fixée à une surface, une conformation étendue dont la longueur peut atteindre 120 à 160 nm [271], [272], tandis que la forme compacte en solution ne dépasse pas 25 nm [273], [274]. Les observations réalisées sont cohérentes avec cette conformation étendue, bien que l'AFM, limitée à la topographie, ne permette pas d'en confirmer directement la nature chimique.

Ainsi, la microscopie à force atomique révèle une augmentation progressive de la rugosité et une modification nette de la morphologie de la surface au fil des étapes de fonctionnalisation. L'apparition de structures nanométriques compatibles avec la fibronectine constitue un indice fort du succès du greffage. L'AFM apporte donc une confirmation morphologique de la modification de surface et fournit des indices solides en faveur de l'efficacité de la stratégie de fonctionnalisation mise en œuvre.

III.1.C.c - Étude de l'élargissement des pores

L'hydrolyse basique, première étape de la fonctionnalisation de la membrane en PET, est susceptible de modifier non seulement la chimie de surface mais aussi la morphologie des pores. Elle consiste à exposer la membrane à une solution de NaOH à 0,5 M. L'hydrolyse basique des groupements ester entraîne une coupure des chaînes polymériques et la formation de groupes carboxyles (–COOH). Ce processus affecte à la fois la surface externe et les parois internes des pores, en contact direct avec la solution. Cette dégradation locale du polymère peut se traduire par une augmentation du diamètre effectif des pores.

Afin de vérifier cette hypothèse, les membranes sont caractérisées par microscopie électronique à balayage (MEB). Les échantillons sont séchés, fixés sur des stubs métalliques à l'aide d'un ruban carbone conducteur puis introduits directement dans la chambre d'observation d'un GeminiSEM 360 (Zeiss, Allemagne). Aucune métallisation n'est appliquée afin de préserver l'intégrité du polymère. Les acquisitions sont réalisées en mode basse tension, avec une tension d'accélération fixée à 1,0 kV pour limiter les charges électriques sur les échantillons isolants. Le vide de colonne est maintenu autour de 3×10^{-6} mbar. Les images sont enregistrées en détection d'électrons secondaires, avec l'option ESB Grid permettant d'améliorer le contraste de surface, et un filtrage de réduction du bruit est appliqué lors de l'acquisition.

Les images obtenues sont ensuite traitées avec le logiciel Fiji (NIH, États-Unis), afin d'isoler de manière reproductible les pores. Un prétraitement est appliqué pour supprimer le bandeau d'acquisition généré par le MEB. Un seuillage local selon la méthode de Phansalkar ajuste ensuite automatiquement le seuil d'intensité à chaque zone de l'image, ce qui permet une détection robuste des pores même en cas de variations de contraste. Pour chaque pore identifié, trois paramètres géométriques sont extraits : l'aire, le périmètre et le diamètre de Féret. Les données obtenues sont ensuite traitées avec MATLAB (MathWorks, États-Unis). Un filtrage reposant sur la circularité, illustré à la Figure III-28, est appliqué. Seuls les pores présentant une circularité supérieure ou égale à 0,7 sont retenus, ce seuil permettant d'exclure les artefacts de segmentation ainsi que les cas de pores fusionnés.

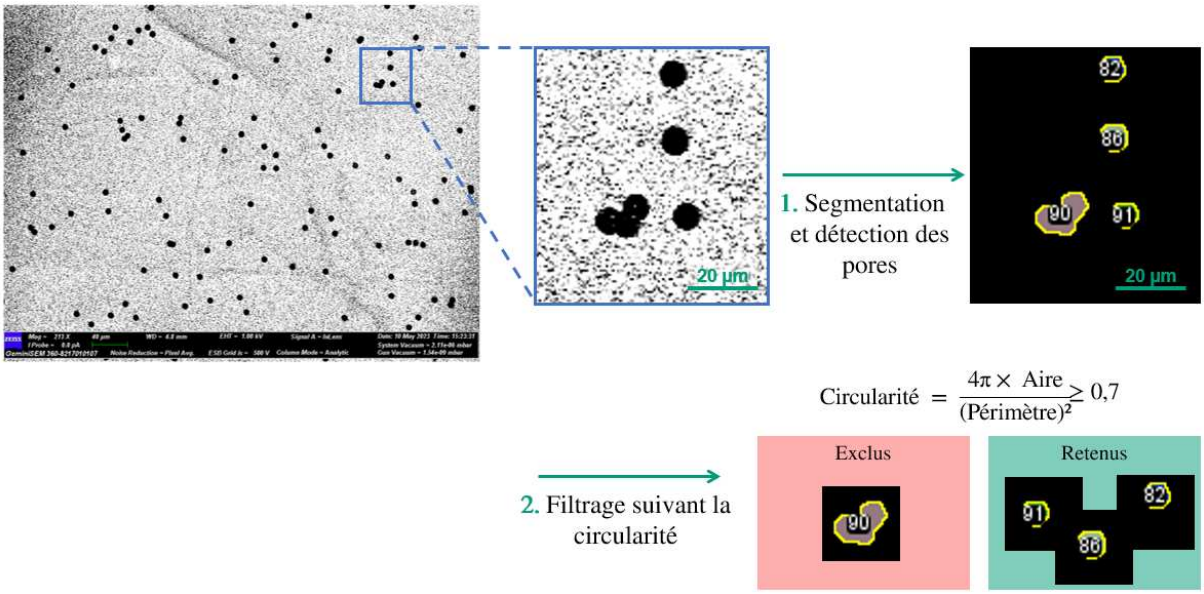


Figure III-28 : Segmentation et détection des pores par le logiciel Fiji sur les images MEB.

À gauche : image brute MEB de la membrane en PET. Au centre : zoom sur une zone montrant plusieurs pores. À droite : segmentation réalisée sous Fiji, illustrant la détection automatique des pores (contours jaunes). Ici, 4 zones ont été détectées : 82, 86 et 91 sont des pores uniques tandis que 90 correspond à trois pores fusionnés. Le filtrage, réalisé sous MATLAB, permet d'exclure ces pores fusionnés grâce à un critère de circularité.

L'analyse statistique est ensuite réalisée sur l'ensemble des données filtrées. Pour chaque condition, la moyenne du diamètre équivalent et de la circularité est calculée, assortie de leurs intervalles de confiance à 95 %. Les différentes étapes de fonctionnalisation sont comparées entre elles à l'aide de tests statistiques (p-values). Les résultats sont représentés sous forme de diagrammes en barres, permettant de visualiser directement l'évolution du diamètre et de la circularité des pores au cours du processus.

La Figure III-29 met en évidence des variations quantifiables du diamètre équivalent et de la circularité des pores. Après hydrolyse, le diamètre moyen augmente légèrement, de 7,64 ± 0,12 µm à 7,77 ± 0,08 µm (+1,7 %), tandis que la circularité diminue de 0,984 ± 0,005 à

0,947 ± 0,003 (−3,8 %). L'analyse statistique réalisée sur plusieurs centaines de pores confirme la significativité de ces différences.

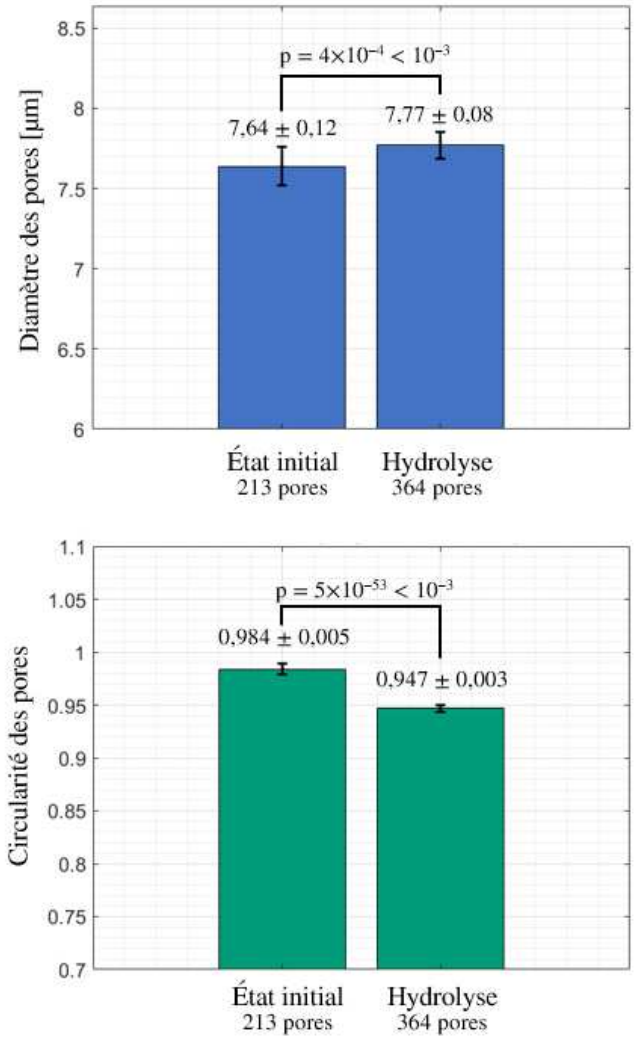


Figure III-29 : Évolution du diamètre et de la circularité des pores avant et après hydrolyse basique de la membrane en PET.

Le graphique supérieur illustre les diamètres moyens des pores mesurés sur 213 pores à l'état initial et 364 pores après hydrolyse, représentés avec leurs intervalles de confiance à 95 %. Le graphique inférieur montre la circularité moyenne des pores pour les mêmes populations, également assortie de ses intervalles de confiance à 95 %. Les valeurs de p indiquées correspondent aux tests statistiques réalisés entre les deux conditions.

Ces résultats doivent néanmoins être replacés dans leur contexte. L'augmentation de 1,7 % du diamètre reste très faible au regard des tolérances du fabricant, qui considère conformes des pores compris entre 6,4 et 8,0 µm [247]. L'écart mesuré demeure donc largement inférieur à la variabilité de production attendue. De même, bien que la circularité diminue, elle reste supérieure à 0,9, valeur généralement retenue pour qualifier une géométrie circulaire. Les pores conservent ainsi une morphologie régulière et homogène.

En conclusion, l'hydrolyse basique n'induit pas d'altération morphologique significative des pores. Le diamètre équivalent et la circularité demeurent dans les marges de variabilité attendues pour ce type de membranes, attestant que le traitement n'affecte pas les pores de la membrane.

L'étude conduite sur des pores de 8 µm fournit une indication robuste de la stabilité morphologique de la membrane. En pratique, les dispositifs utilisent des pores de 0,4 µm, présentée sous la référence 2 dans le Tableau III-1. Ces dimensions n'ayant pas été étudiées directement, seule une extrapolation est possible. Elle met en évidence un écart très limité par rapport aux tolérances de fabrication, ce qui laisse penser que l'hydrolyse n'affecte pas non plus la morphologie des pores plus fins, même si une validation expérimentale ciblée reste indispensable pour l'affirmer.

III.2 - DEVELOPPEMENT DES ELECTRODES

Le développement des électrodes interdigitées comprend la définition de géométries optimisées, leur réalisation par microfabrication en salle blanche et leur intégration dans un environnement de mesure adapté.

III.2.A - CONCEPTION

La conception des électrodes interdigitées est effectuée sous KLayout (open-source développé par M. Köfferlein, Allemagne). Quatre géométries distinctes sont définies, notées IDT1 à IDT4. Les dimensions, disponibles au Tableau II-3 sont rappelées à la Figure III-30. Dans chaque configuration, la surface active totale est fixée à 1 mm × 1 mm. La largeur des doigts W et leur espacement G doublent d'un design à l'autre, ce qui réduit le nombre de doigts de 80 pour IDT1 à 10 pour IDT4, tout en maintenant un taux de métallisation constant $\alpha = \frac{W}{W+G} = 60\ \%$.

Ce paramètre détermine la fraction de surface métallique exposée à l'électrolyte et donc la capacité de double couche. Un α trop élevé accroît la contribution capacitive et réduit la profondeur d'investigation, tandis qu'un α trop faible diminue la sensibilité. La valeur retenue, $\alpha = 60\ \%$, correspond à un compromis optimal rapporté dans la littérature [212].

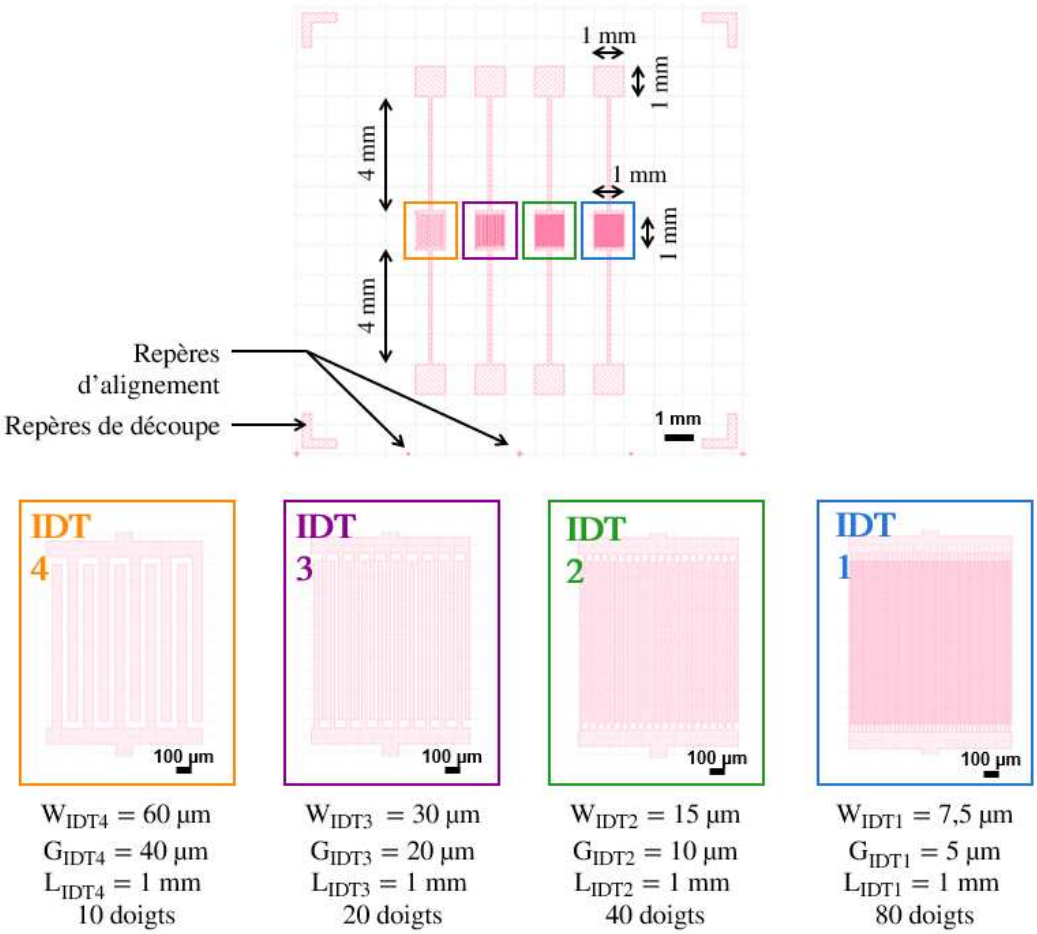


Figure III-30 : Conception des électrodes interdigitées (IDT) : quatre géométries à taux de métallisation constant.

Le masque regroupe quatre motifs (IDT1 à IDT4) différant par la largeur des doigts W et leur espacement G, doublés d'un design au suivant. La surface active est fixée à 1 mm × 1 mm, le taux de métallisation à $\alpha = 60\ \%$ et les doigts font tous 1 mm de long.

Les électrodes sont réalisées en platine (Pt), matériau présentant une excellente stabilité électrochimique en milieu aqueux, une faible impédance d'interface avec l'électrolyte et une biocompatibilité reconnue. Ces propriétés assurent une bonne sensibilité des mesures tout en limitant les phénomènes de corrosion ou de dérive du signal au cours du temps. Par ailleurs, les procédés de dépôt et de structuration du platine étant bien maîtrisés au laboratoire, ce choix garantit une fabrication reproductible et fiable. Le dispositif est élaboré sur substrat de verre, sélectionné pour sa forte résistivité électrique, sa stabilité mécanique et sa compatibilité avec les procédés de microfabrication. Sa transparence constitue également un avantage majeur pour l'observation optique des cultures cellulaires lors des expérimentations.

Pour limiter les effets parasites liés aux pistes de connexion, une couche de passivation en dioxyde de silicium (SiO_2) est intégrée à l'aide d'un second masque de photolithographie, comme illustré en Figure III-31. Le SiO_2 constitue un excellent isolant électrique et présente une biocompatibilité élevée, ce qui permet d'isoler efficacement les zones métalliques non

actives du milieu électrolytique. Cette passivation limite les couplages capacitifs indésirables et garantit que la réponse électrique mesurée provient essentiellement de la surface active des électrodes, améliorant ainsi la précision et la robustesse des résultats expérimentaux [275].

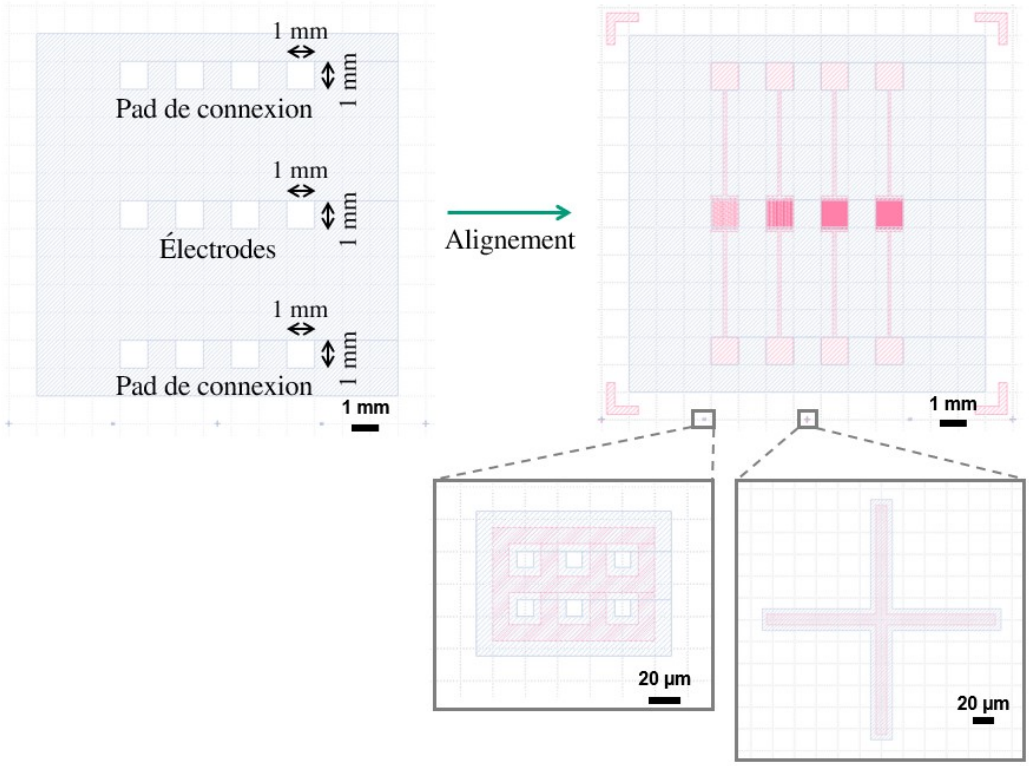


Figure III-31 : Masque de photolithographie pour l'intégration d'une passivation sélective des pistes de connexion.

À gauche, schéma du masque comprenant trois ouvertures par électrode : deux pour les pads de connexion et une pour la zone active des électrodes. À droite, superposition des motifs après alignement avec la première lithographie. En bas, vues agrandies illustrant deux repères d'alignement.

III.2.B - PROCEDE DE FABRICATION

Le procédé de microfabrication a été réalisé en salle blanche au Centre de Compétences en Micro et Nanotechnologies (CC MiNaLor, IJL). Le substrat est un wafer en verre, dont la transparence permet une observation directe au microscope optique, y compris après intégration dans l'intestin-sur-puce. La fabrication repose sur deux étapes consécutives, détaillées ci-dessous et schématisées en Figure III-32.

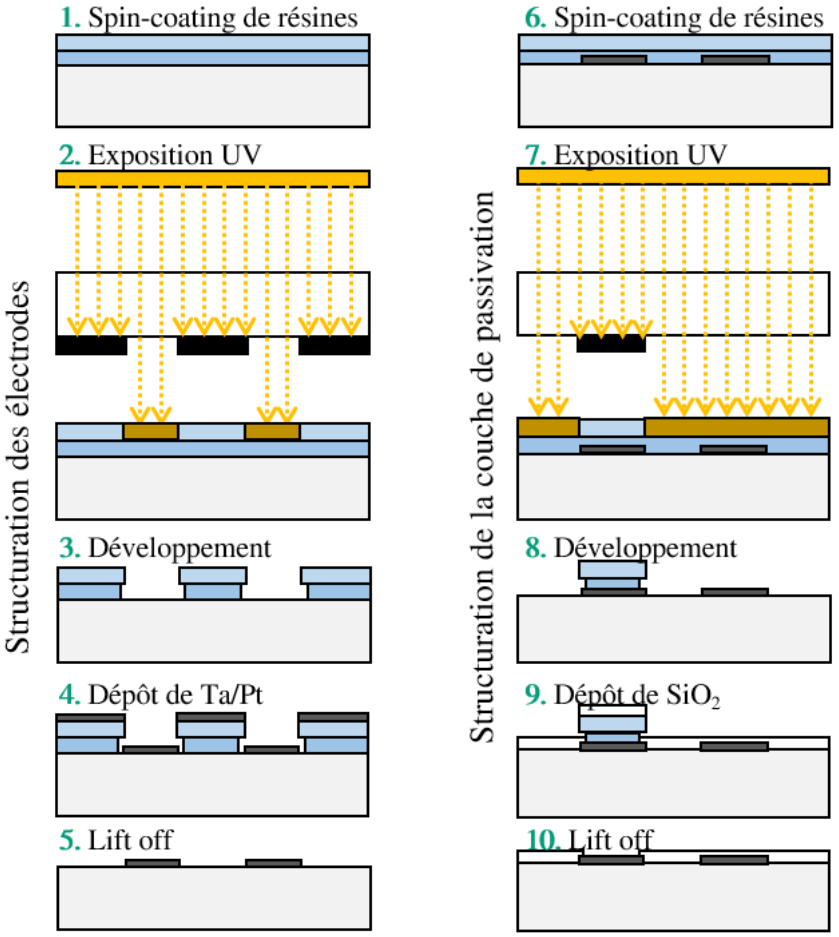


Figure III-32 : Procédé de fabrication des électrodes.

Première étape : structuration des électrodes

1. Spin-coating de résines.

   - Le wafer en verre subit un nettoyage à l'acétone et à l'isopropanol, avant d'être séché sous flux d'azote puis déshydraté sur plaque chauffante (150 °C, 10 min).

   - Un primer d'accroche d'hexaméthyldisilazane (HMDS) est appliqué (pré-étalement à 250 rpm pendant 15 s, accélération 50 rpm/s, puis étalement à 7000 rpm pendant 40 s, accélération 3500 rpm/s). Un recuit de 3 min à 115 °C fixe la couche. Le HMDS rend la surface hydrophobe, ce qui améliore fortement l'adhérence de la première résine qui va être utilisée.

   - Ensuite, une résine LOR3A est déposée avec les mêmes paramètres de spin-coating et recuite 5 min à 150 °C. Cette couche sert à générer un profil de résine en undercut lors du développement, qui est adapté pour une étape de dépôt.

- Enfin, une résine positive photosensible S1813 est déposée (pré-étalement à 200 rpm pendant 15 s, accélération 50 rpm/s, puis étalement à 10000 rpm pendant 40 s, accélération 4000 rpm/s). La résine est recuite 3 min à 115 °C.

2. **Exposition UV.** L'exposition est réalisée sur un aligneur de masques MJB4 (Suss MicroTec, Allemagne), en mode vacuum contact. Le masque en chrome est nettoyé à l'acétone, au RBS et à l'eau déionisée (EDI), puis séché sous flux d'azote. La durée d'insolation est de 15 s à 365 nm, ce qui correspond à une dose de 120 mJ/cm².

3. **Développement.** Après exposition, le wafer est plongé dans un bain de développeur MF-319 (hydroxyde de tétraméthylammonium, TMAH) pendant 60 s, avec agitation douce. Le développement est stoppé par un rinçage abondant à l'EDI et est contrôlé au microscope optique (Leica, Allemagne) : formation de l'undercut caractéristique de la LOR3A est vérifié à cette étape.

4. **Dépôt métallique.** À l'aide de la KS400 HR (Kenosistec, Italie), une couche de tantale (10 nm) est déposée par pulvérisation cathodique. Le Ta est utilisé comme couche d'accroche, améliorant l'adhérence du platine au verre. Une couche de platine (100 nm) est ensuite déposée pour former les électrodes.

5. **Lift off.** Le wafer est plongé dans un bain de remover 1165 (N-methyl-2-pyrrolidone, NMP) chauffé à 80 °C pendant 45 min, puis rincé abondamment à l'EDI. Lors du lift-off, la résine gonfle et se dissout, ce qui entraîne le retrait sélectif du métal déposé sur les zones non développées. L'observation au microscope optique confirme la fidélité des motifs métalliques.

Deuxième étape : structuration de la couche de passivation

6. **Spin-coating de résines.** Dépôt identique à la première étape : HDMS, LOR3A puis S1813, avec les mêmes paramètres.

7. **Exposition UV.** L'exposition est réalisée dans les mêmes conditions. Un alignement précis avec les motifs de la première lithographie est nécessaire : il est réalisé grâce aux repères d'alignement, ajustés en translation et en rotation.

8. **Développement.** Le développement est effectué dans le MF-319 et stoppé par EDI.

9. **Dépôt de SiO_2.** Le dioxyde de silicium est déposé par pulvérisation cathodique RF. Les conditions de dépôt sont : épaisseur 100 nm, cible de silicium polarisée à 200 W, atmosphère argon/oxygène (20/20 sccm), pression 3×10^{-3} mbar.

10. **Lift off.** Le lift-off est réalisé dans le remover 1165 à 80 °C pendant 45 min, permettant l'élimination de la résine et du SiO_2 excédentaire.

Les électrodes réalisées sont disponibles en Figure III-33, permettant d'identifier distinctement les régions recouvertes par la couche de passivation.

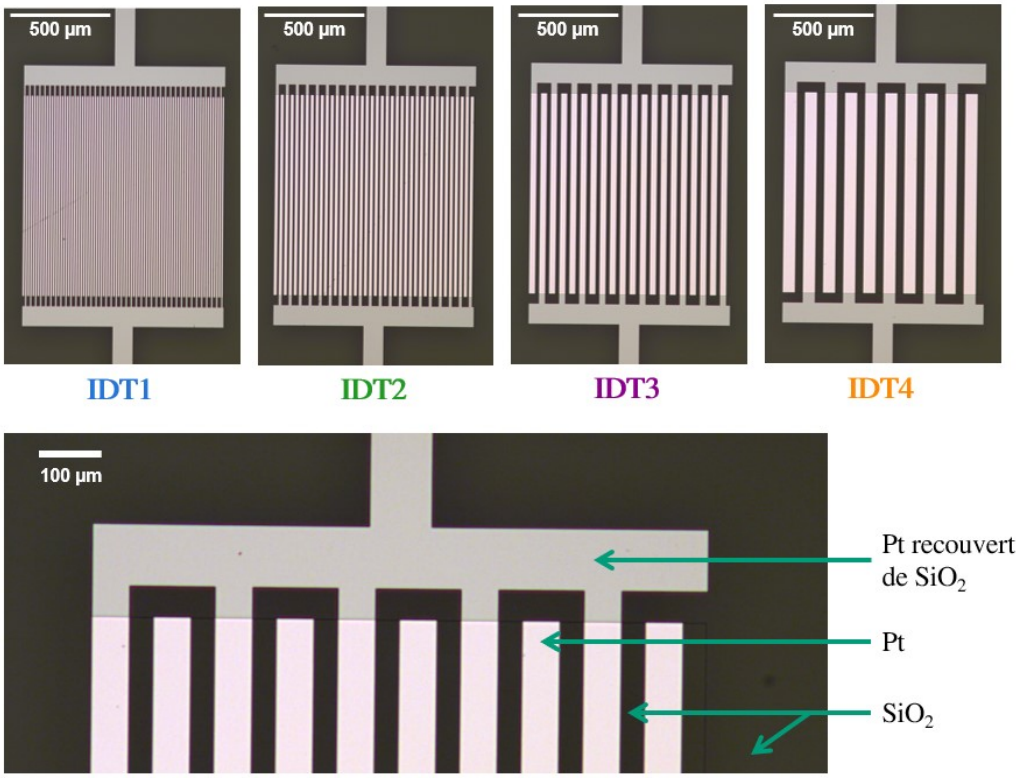


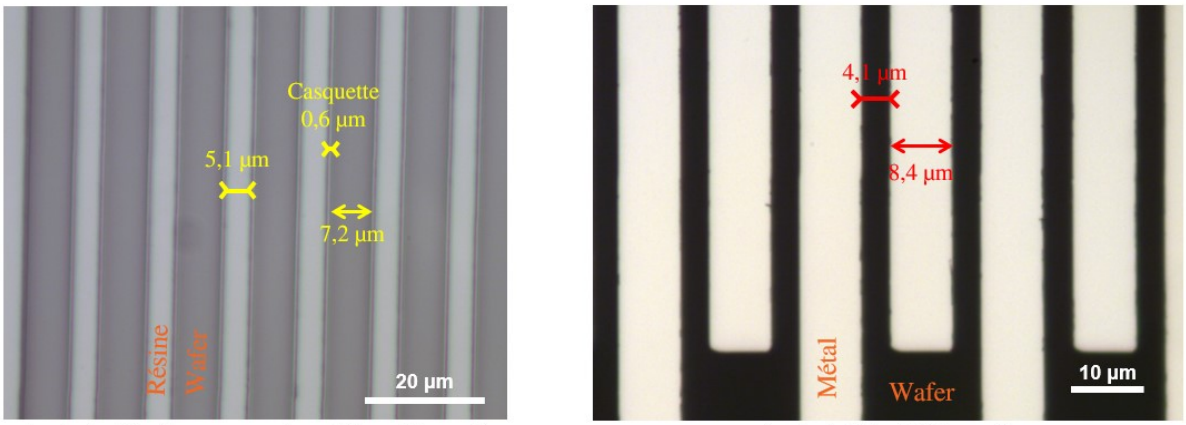
Figure III-33 : Observation au microscope optique des IDT1 à IDT4 après microfabrication.

Effet d'un dépôt par pulvérisation sur la lithographie casquette

Le procédé de lithographie basé la bicouche LOR3A et S1813 génère volontairement un profil de résine en casquette. Lors du dépôt métallique par pulvérisation cathodique, la faible directivité du flux incident entraîne un recouvrement non seulement les zones non recouvertes de résine mais également les flancs formés par le surplomb de résine. Après lift-off, la métallisation latérale déjà déposée conduit à un élargissement permanent des doigts et à une diminution de l'espacement interdigité.

L'exemple de l'IDT1, présenté en Figure III-34, illustre ce phénomène. Le masque est conçu pour des électrodes de $W_{IDT1} = 7{,}5\ \mu m$ séparées par $G_{IDT1} = 5\ \mu m$. Après métallisation et lift-off, les dimensions effectives atteignent $W_{IDT1,exp} = 8{,}4\ \mu m$ et $G_{IDT1,exp} = 4{,}1\ \mu m$. Cet effet est plus marqué lorsque les dimensions sont réduites : pour IDT1, la variation relative atteint +12 % sur la largeur et -18 % sur l'espacement. À l'inverse, pour IDT4, conçu avec des dimensions plus grandes ($W_{IDT4} = 60\ \mu m$, $G_{IDT4} = 40\ \mu m$), l'écart reste inférieur à 2 %. Sur le plan fonctionnel, la période spatiale $\lambda = 2(W + G)$ reste inchangée, ce qui garantit que la profondeur de pénétration du champ électrique n'est pas modifiée. En revanche, le taux de métallisation est modifié : pour des électrodes conçues avec un taux de métallisation de 60

%, les valeurs expérimentales s'échelonnent entre $\alpha_{IDT4} = 61$ % et $\alpha_{IDT1} = 67$ %, reflétant directement l'effet du dépôt latéral. Cet impact reste limité pour l'interprétation des mesures d'impédance, les valeurs obtenues demeurant proches des optima rapportés dans la littérature [212]. Néanmoins, deux pistes d'amélioration permettraient de limiter ce phénomène : anticiper ces variations dès la conception des masques en ajustant les dimensions nominales pour compenser l'élargissement attendu ou recourir à un dépôt physique en phase vapeur (PVD) par évaporation assistée par canon à électrons (évaporateur e-beam), dont la forte directivité du flux réduit significativement le recouvrement latéral.



Après le développement des résines (étape 3) Après le lift off (étape 5)

Figure III-34 : Effet de la casquette sur les dimensions de l'IDT1.

Découpe

La séparation des échantillons est réalisée à l'aide d'une scie circulaire diamantée Brillant 220 (QATM, Allemagne). Afin de protéger le wafer lors de la découpe, une couche épaisse de résine S1813 est déposée par spin-coating. Le wafer est ensuite fixé sur une plaque métallique avec de la colle, garantissant une bonne stabilité mécanique pendant l'usinage. La découpe est effectuée à une vitesse de 0,15 mm/s, permettant d'obtenir des échantillons individuels de 1,5 × 1,5 cm, chacun intégrant quatre dispositifs interdigités de géométries distinctes (IDT1 à IDT4). Après découpe, un chauffage ramollit l'adhésif et facilite le décollement des échantillons. La résine protectrice est ensuite éliminée par immersion dans un bain d'acétone, ce qui assure une surface propre.

III.2.C - INTEGRATION DES ELECTRODES MICROFABRIQUEES DANS L'ENVIRONNEMENT DE MESURE

Après la microfabrication, les électrodes doivent être intégrées dans un environnement expérimental afin de devenir pleinement fonctionnelles. Cette intégration repose sur des éléments complémentaires : un puits en PDMS pour le confinement du milieu liquide et

l'immersion de la zone active, un circuit imprimé assurant l'interfaçage électrique et le maintien mécanique des échantillons et la connexion à des analyseurs d'impédance.

Conception et fabrication de puits en PDMS

Dans un premier temps, le choix s'est porté sur l'intégration des électrodes dans des puits de culture plutôt que directement au sein de la puce microfluidique. En effet, comme illustré en Figure III-35, l'environnement d'un intestin-sur-puce présente une forte complexité, combinant écoulements péristaltiques, interfaces multiples, membranes poreuses et couches cellulaires, susceptibles d'influencer la distribution du champ électrique et d'introduire des artefacts de mesure. À l'inverse, la configuration en puits offre un milieu expérimental plus simple et mieux contrôlé, dans lequel les électrodes sont directement en contact avec une monocouche cellulaire ou une solution électrolytique homogène. Cette approche permet ainsi de valider les performances du dispositif et d'interpréter plus aisément les signaux mesurés avant d'envisager une intégration dans un environnement microfluidique plus complexe.

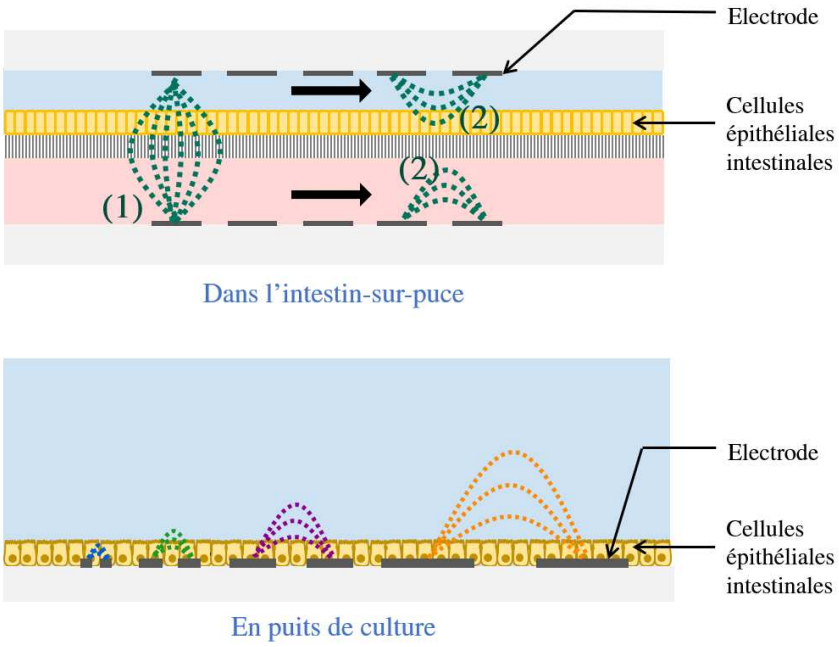


Figure III-35 : Comparaison de l'environnement de mesure dans l'intestin-sur-puce et dans un puits de culture.

Dans la configuration intestin-sur-puce (haut), les électrodes sont intégrées dans un environnement multicouche comprenant des canaux microfluidiques, une membrane poreuse et des monocouches cellulaires, induisant une distribution complexe du champ électrique et des interactions multiples avec les écoulements. Les lignes de champ illustrent la propagation du signal à travers les différentes couches biologiques et fluidiques. Dans la configuration en puits de culture (bas), les électrodes sont directement en contact avec une monocouche de cellules épithéliales dans un milieu homogène, conduisant à une distribution du champ plus simple et localisée. Cette géométrie permet une interprétation facilitée des mesures et constitue une étape de validation préalable avant l'intégration en environnement microfluidique complexe.

La géométrie des électrodes impose de placer le puits dans l'espace limité compris entre la zone active et les pads de connexion, comme illustré en Figure III-36.

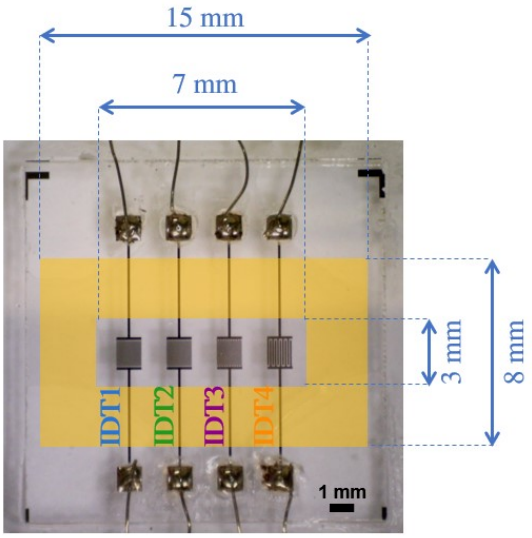


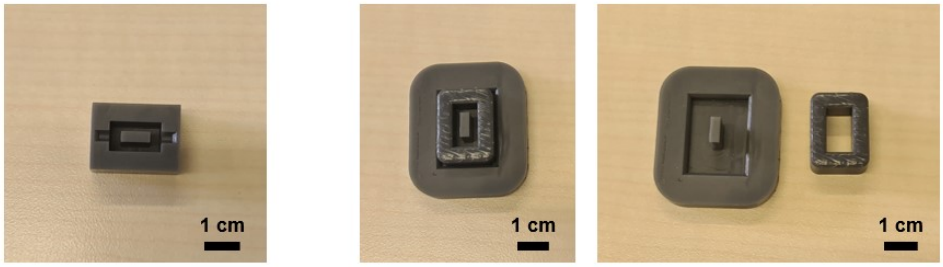
Figure III-36 : Contraintes géométriques imposant les dimensions du puits.

Le design de puits retenu correspond à des dimensions extérieures de 8 mm × 15 mm et intérieures de 3 mm × 7 mm. Sa hauteur est fixée à 10 mm, ce qui correspond à un volume interne de 210 µL. Ce volume est suffisant pour assurer l'immersion complète de la zone active des électrodes et maintenir une quantité adéquate de liquide pour des mesures prolongées. Il reste toutefois relativement réduit, ce qui rend le système sensible à l'évaporation. Le puits est fabriqué en PDMS, un polymère biocompatible, perméable aux gaz (O_2 et CO_2), transparent et facilement microstructurable par moulage. Ce matériau, également constitutif de l'intestin-sur-puce dans lequel les électrodes interdigitées seront intégrées à terme, permet dès cette étape de valider l'intégration mécanique et la compatibilité avec des conditions proches de l'environnement final.

La fabrication du moule destiné à structurer le puits en PDMS est réalisée au CC Héré (IJL, Nancy) par Cyril Schlauder par impression 3D sur une Form 3+ (Formlabs, États-Unis) avec la résine Tough 2000 (Formlabs, États-Unis). Après impression, les pièces sont lavées à l'isopropanol puis post-polymérisées à 60 °C pendant 15 min pour améliorer la rigidité de la résine et réduire son adhérence de surface, facilitant ainsi le démoulage.

Un premier moule est conçu en une seule pièce, comme illustré en Figure III-37.a. Bien que simple à réaliser, cette configuration se révèle inadaptée : le démoulage du PDMS réticulé est difficile et entraîne fréquemment la fissuration des structures. Cette difficulté provient du rapport élevé entre la surface de contact et le faible volume du puits, qui accroît l'adhérence du PDMS aux parois du moule. La rugosité propre à la résine imprimée en 3D accentue encore ce phénomène, rendant l'extraction quasi impossible sans endommagement. Pour surmonter cette limitation, un moule en deux éléments est développé, disponible en Figure III-37.b. Il associe

une base à des parois amovibles, ce qui réduit significativement les contraintes mécaniques lors du démoulage. Cette conception assure une extraction plus fiable et reproductible.



a. Moule monobloc **b.** Moule en deux éléments

Figure III-37 : Moules en résine pour la fabrication des puits en PDMS : (a) moule monobloc et (b) moule en deux éléments.

Le protocole de fabrication repose sur l'utilisation de PDMS Sylgard® 184 (Dow Corning, États-Unis). La base et l'agent réticulant sont mélangés dans un rapport massique de 10:1 puis homogénéisés. Le mélange est dégazé sous vide afin d'éliminer les bulles d'air, versé dans le moule, puis soumis à un second dégazage. La réticulation est effectuée pendant 24 h à 40 °C. Après polymérisation complète, les puits sont démoulés et, si nécessaire, des corrections mineures des bords sont réalisées manuellement au scalpel.

Cependant, le moulage direct dans une pièce imprimée en 3D ne permet pas d'obtenir un état de surface satisfaisant. Comme schématisé en Figure III-38.a, la rugosité de la résine issue de l'impression 3D est directement reproduite dans le PDMS lors du moulage. Les aspérités ainsi générées à la surface inférieure du puits compromettent l'adhésion par effet ventouse sur le substrat en verre. Lors des essais d'étanchéité, l'apparition de fuites confirme que l'état de surface hérité de l'impression 3D ne permet pas de garantir une adhérence fiable. C'est pourquoi, le protocole est modifié : le moule est retourné de sorte que la base du puits soit polymérisée directement au contact d'un wafer de silicium, dont la surface présente une rugosité sub-nanométrique, comme illustré en Figure III-38.b. Le PDMS ainsi obtenu présente une face inférieure parfaitement plane et homogène, ce qui lui permet d'adhérer au substrat en verre par simple effet ventouse, sans nécessiter de collage. Pour vérifier l'efficacité de ce mécanisme, des essais expérimentaux sont réalisés : les puits en PDMS sont soigneusement appliqués sur du verre préalablement nettoyé, remplis avec 200 µL de milieu de culture, puis placés dans un incubateur (37 °C, 5 % de CO_2). Aucune fuite n'est observée après 48 h, ce qui confirme la fiabilité de cette approche.

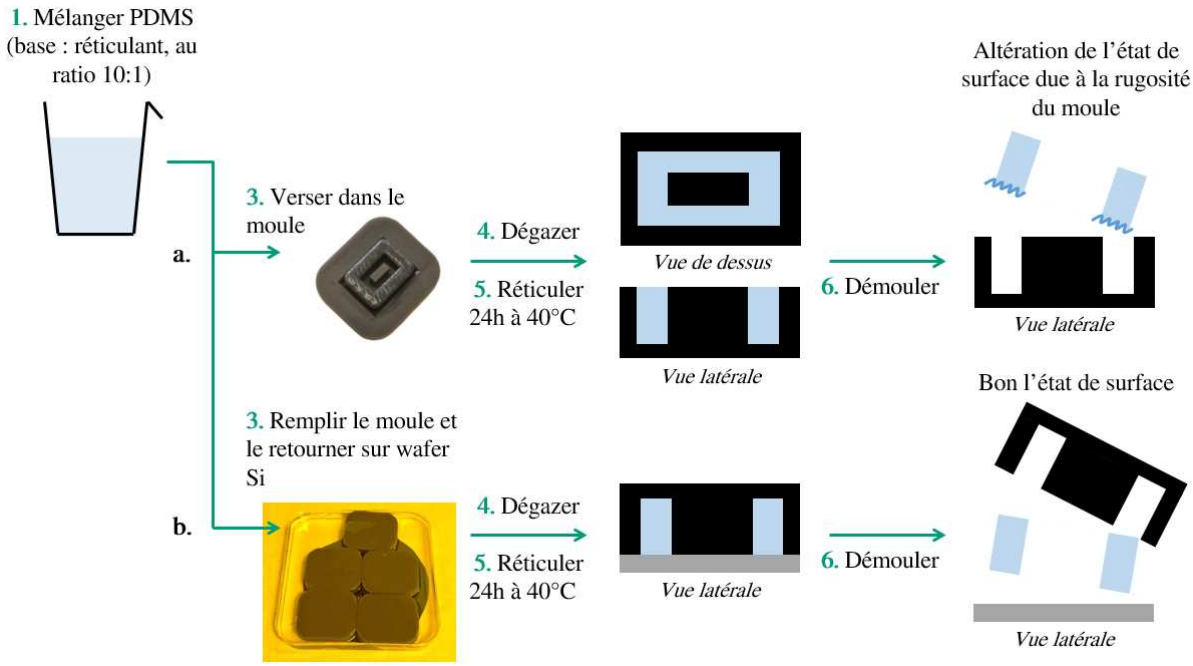


Figure III-38 : Protocole de moulage des puits en PDMS.

(a) Schéma du procédé classique, où le moulage direct sur un moule en résine conduit à une altération de l'état de surface du PDMS et donc à une étanchéité insuffisante. (b) Schéma du procédé amélioré, dans lequel le moule est retourné sur un wafer de silicium, permettant d'obtenir une surface parfaitement plane et donc une étanchéité fiable par effet ventouse.

Le puits en PDMS ainsi moulé est positionné directement sur les électrodes interdigitées, comme illustré en Figure III-39.

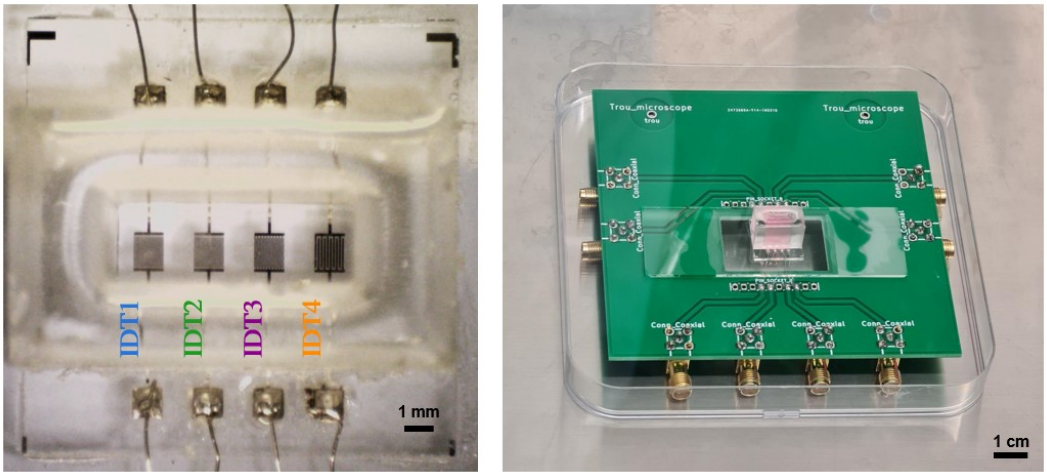


Figure III-39 : Observations macroscopiques du puits en PDMS positionné sur les électrodes.

Une amélioration envisagée consiste à concevoir un moule en deux parties, venant s'assembler directement autour d'un wafer en silicium, utilisé comme surface de moulage. Le modèle 3D numérique correspondant est présenté en Figure III-40. Cette approche permet la réalisation simultanée de 14 puits en PDMS, avec une procédure plus propre et plus

reproductible que celle actuellement employée. Ce design reste toutefois à valider expérimentalement car il n'a pas encore fait l'objet d'essais fonctionnels.

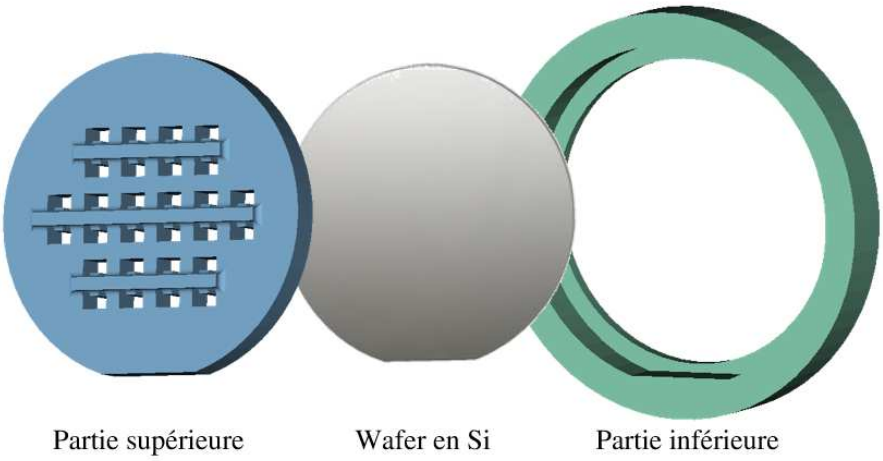


Figure III-40 : Moule, intégrant directement le wafer en silicium, pour la fabrication des puits en PDMS.

Montage des électrodes sur circuit imprimé

Dans une première approche, les connexions électriques des électrodes étaient réalisées en soudant directement des câbles sur les pads métalliques des échantillons, comme illustré en Figure III-39 ci-dessus. Bien que fonctionnelle, cette méthode s'avère peu adaptée lorsque les échantillons doivent être remplacés fréquemment.

Afin de pallier ces limites, une seconde version a été développée sous la forme d'un circuit imprimé (PCB) spécifiquement conçu pour l'intégration des électrodes, comme illustré en Figure III-41. Celui-ci comprend :

- huit contacts à ressort alignés avec les pads des électrodes interdigitées, assurant une connexion électrique sans recours à la soudure ;
- huit connecteurs coaxiaux de type SMA montés en bord de carte, permettant une connexion standardisée avec les instruments de mesure ;
- une fenêtre centrale usinée aux dimensions du puits en PDMS, assurant un accès direct à la zone active des électrodes ;
- six perçages traversants de 3 mm de diamètre, utilisés pour l'ancrage mécanique du support destiné à maintenir les échantillons en place.

Les composants (contacts à ressort et connecteurs SMA) sont fixés manuellement sur le PCB par soudure à l'étain. Puis, l'absence de court-circuit des connexions est systématiquement vérifiée à l'aide d'un multimètre.

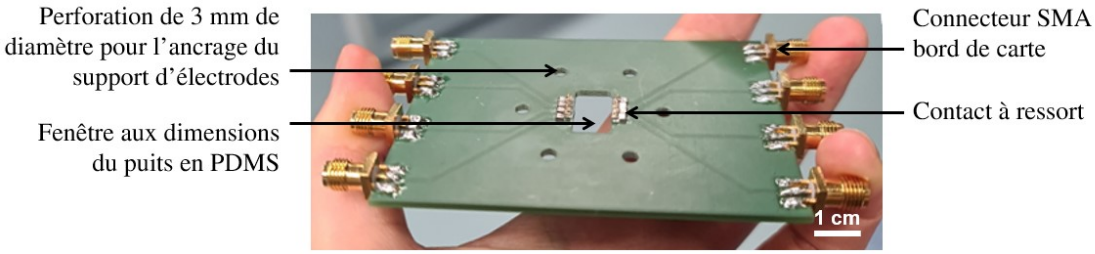


Figure III-41 : Circuit imprimé conçu pour l'interface électrique entre les électrodes microfabriquées et les équipements de mesure.

Le maintien mécanique des échantillons sur le circuit imprimé est assuré par un support en trois parties, fabriqué par impression 3D par dépôt de filament fondu, réalisé au CC Héré (IJL, Nancy) par Cyril Schlauder. Comme illustré en Figure III-42, le support comprend une partie supérieure et deux parties inférieures, fixées entre elles au moyen de quatre vis traversant le PCB. Les deux éléments inférieurs soutiennent l'échantillon en verre de 15 × 15 mm, sur lequel les électrodes sont microfabriquées, assurant ainsi un maintien fiable sans risque de déplacement. Cette conception positionne l'échantillon à une distance contrôlée du PCB, garantissant le contact électrique avec les contacts à ressorts tout en évitant l'application de contraintes mécaniques excessives. De plus, le support est muni de pieds conçus pour s'adapter à la grille métallique perforée de l'incubateur MCO-18AC (Sanyo, Japon). Ce dispositif maintient l'ensemble stable et horizontal, y compris en présence de plusieurs câbles coaxiaux. Cette stabilité limite les artefacts de mesure liés aux vibrations et assure que toutes les électrodes restent immergées dans le liquide.

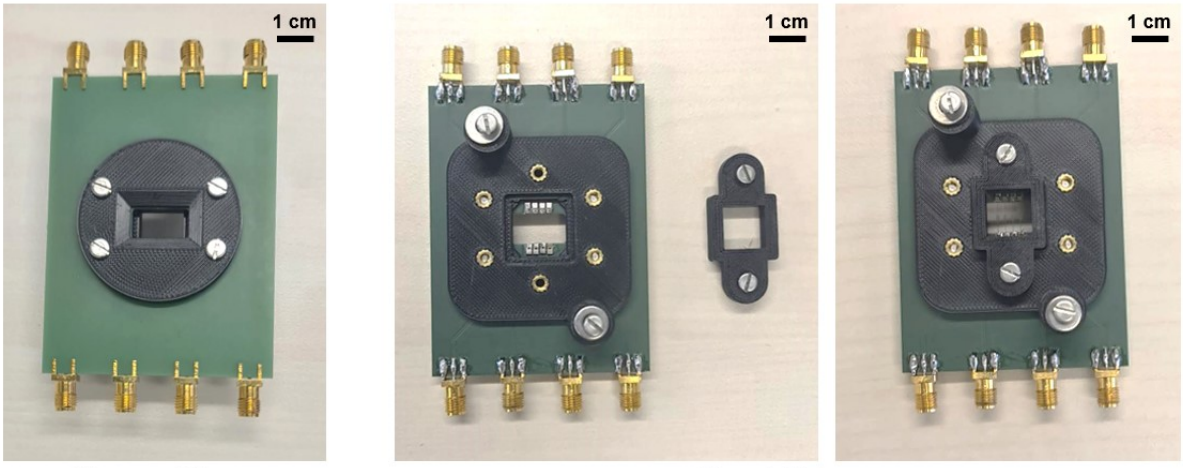


Figure III-42 : Support imprimé en 3D en trois parties pour le maintien des échantillons sur le circuit imprimé.

Analyseurs d'impédance

Le circuit imprimé est relié à l'appareil de mesure par l'intermédiaire de câbles coaxiaux SMA en configuration 4 fils – 2 points. Chaque connecteur SMA du PCB reçoit deux câbles

coaxiaux distincts, raccordés par l'intermédiaire de connecteurs en T : l'un est dédié à l'injection du courant et l'autre à la mesure du potentiel. L'ensemble conduit à quatre câbles aboutissant sur l'analyseur d'impédance, respectivement connectés aux entrées de courant (Hcur, Lcur) et de tension (Hpot, Lpot). Cette architecture permet de dissocier les chemins d'injection et de mesure, de sorte que les résistances parasites des câbles et des contacts n'affectent pas la mesure de potentiel.

Deux analyseurs d'impédance ont été utilisés selon le contexte expérimental : l'E4990A (Keysight Technologies®, États-Unis) pour les mesures réalisées hors incubateur et le MFIA (Zurich Instruments®, Suisse) pour celles effectuées en incubateur. Ils couvrent tous les deux les gammes de fréquence allant de 20 Hz à 5 MHz et des impédances comprises entre le milliohm et le téraohm. Dans les conditions de mesure retenues, la précision moyenne est de l'ordre de 0,1 %, ce qui garantit la fiabilité des résultats. L'acquisition des données est assurée respectivement par les logiciels LabVIEW (National Instruments®, États-Unis) et LabOne® (Zurich Instruments®, Suisse). Les fichiers bruts, enregistrés au format .csv, sont ensuite traités avec MATLAB (MathWorks®, États-Unis, version R2019b) à l'aide de scripts personnalisés permettant l'organisation, la visualisation et l'interprétation des données.

III.3 - Conclusion

Ce chapitre présente la réalisation technologique de l'intestin-sur-puce instrumenté. Le travail s'articule autour de deux volets complémentaires : la fabrication de la puce microfluidique et la mise au point de l'instrumentation associée.

La fabrication et l'assemblage du dispositif reposent sur des procédés de microfabrication reproductibles, adaptés aux contraintes de culture cellulaire. Plusieurs itérations successives permettent d'améliorer la robustesse et la fiabilité du système : réduction des plis membranaires, limitation des défauts d'alignement lors du poinçonnage et optimisation de l'étanchéité par une modification des orifices d'entrée et de sortie. La sélection de la membrane poreuse se fonde sur l'analyse de critères structuraux et fonctionnels tels que la densité et le diamètre des pores, l'épaisseur et la porosité surfacique. Sa caractérisation repose sur des mesures de mouillabilité, sur l'imagerie au microscope à force atomique et sur l'évaluation de l'élargissement des pores, garantissant son adéquation avec les conditions microphysiologiques et biologiques visées.

En parallèle, des électrodes interdigitées sont conçues et microfabriquées, puis intégrées dans un environnement expérimental adapté. Des puits en PDMS assurent le confinement du milieu liquide tout en maintenant une compatibilité avec les conditions de culture cellulaire. Un circuit imprimé dédié est développé pour garantir une connexion électrique fiable, ainsi qu'un support mécanique stabilisant les électrodes. La connexion aux analyseurs d'impédance est

réalisée en configuration quatre fils. Ces développements instrumentaux contribuent à lever le verrou lié à la sensibilité et à la résolution spatiale limitées des électrodes traditionnellement employées. Enfin, une perspective d'automatisation de la commutation entre électrodes est introduite, avec l'objectif de réduire les manipulations manuelles, d'accroître la reproductibilité et de faciliter la réalisation de séries expérimentales étendues.

Ainsi, ce chapitre établit les fondations technologiques nécessaires à l'utilisation de l'intestin-sur-puce instrumenté. Dans la continuité de ce travail de conception et de fabrication, il est désormais nécessaire d'évaluer le fonctionnement du dispositif en conditions expérimentales. Le chapitre suivant présente ainsi une série de résultats préliminaires obtenus à partir des électrodes interdigitées et du dispositif microfluidique, tant sur le plan de la caractérisation électrique que de l'utilisation biologique.

Chapitre IV : APPLICATIONS BIOLOGIQUES DE L'INTESTIN-SUR-PUCE INSTRUMENTE

Ce chapitre est consacré aux applications biologiques de l'intestin-sur-puce instrumenté par spectroscopie d'impédance. Il se divise en deux volets complémentaires. La première partie est dédiée à la mise en culture de cellules épithéliales intestinales dans le dispositif, depuis la comparaison des conditions de coculture jusqu'à la mise en évidence de la production de mucus. La seconde partie porte sur le suivi électrique des cultures, à travers la caractérisation des électrodes interdigitées, l'évaluation de leur profondeur de pénétration et de leur facteur de forme, puis l'application de la spectroscopie d'impédance pour analyser en temps réel l'évolution de monocouches cellulaires épithéliales.

IV.1 - CULTURES DE CELLULES EPITHELIALES INTESTINALES DANS L'INTESTIN-SUR-PUCE

Le développement de l'intestin-sur-puce nécessite une validation biologique, destinée à vérifier que l'environnement microfluidique mis en place est compatible avec les cellules épithéliales intestinales. La robustesse et la pertinence du modèle reposent en effet sur la capacité des cellules à adhérer, proliférer, se différencier et reproduire certaines fonctions essentielles de la barrière intestinale, telles que la polarisation ou la sécrétion de mucus. Ainsi, deux axes d'analyse sont explorés. D'une part, le support de culture et de ses effets sur la viabilité et la confluence cellulaires est étudié, en comparant une condition de référence classique aux différentes étapes menant vers l'intestin-sur-puce. D'autre part, la pertinence physiologique du modèle est évaluée à travers la caractérisation de la production de mucus par la coculture.

Pour aborder ces deux axes, il est tout d'abord nécessaire de présenter les lignées cellulaires utilisées et les conditions générales de leur entretien, qui constituent la base expérimentale commune à l'ensemble des configurations étudiées.

Généralités sur les lignées cellulaires et leur entretien

Les cellules Caco-2 (gracieusement fournies par le laboratoire UMR_S INSERM 1256 NGERE) et HT29-MTX (Merck, Allemagne, réf. HTB-38) sont cultivées dans du DMEM high glucose (Merck, Allemagne, réf. D6429) un milieu standard enrichi en glucose (4,5 g/L) pour assurer un apport énergétique suffisant aux cellules épithéliales à fort métabolisme. Dans une coculture, le milieu doit répondre aux besoins des deux lignées pour permettre leur croissance dans un environnement commun. Ici, l'utilisation du DMEM high glucose, qui constitue le milieu de référence aussi bien pour les Caco-2 que pour les HT29-MTX, garantit cette compatibilité et permet la coculture sans ajustement particulier. Ce milieu est supplémenté avec :

- 10 % (v/v) de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Merck, Allemagne, réf. F7524), qui fournit un mélange de facteurs de croissance, d'hormones, de protéines de liaison et de nutriments essentiels à la survie et à la prolifération cellulaires ;

- 1 % (v/v) de pénicilline-streptomycine (Merck, Allemagne, réf. P0781), des antibiotiques utilisés pour limiter les contaminations bactériennes ;

- 0,025 % (v/v) d'amphotéricine B (Merck, Allemagne, réf. A2942), un antifongique permettant d'éviter la prolifération de levures et de moisissures.

Les cultures sont maintenues en flasques T75 (Corning, États-Unis) dans un incubateur (37 °C, 5 % CO2, 95 % d'humidité relative). Le milieu est renouvelé tous les 2 à 3 jours. Lorsque

la confluence atteint 80–90 %, les cellules sont détachées par incubation avec de la trypsine-EDTA 0,25 % (Merck, Allemagne, réf. T3924) pendant 5 minutes à 37 °C. La réaction est neutralisée par addition de DMEM complet, puis les cellules sont centrifugées (1500 rpm, 5 min). Après resuspension, la concentration cellulaire est déterminée par coloration au bleu de trypan et comptage sur hémocytomètre. Les cellules sont ensuite soit réensemencées pour l'entretien de la lignée, soit utilisées pour les expériences décrites dans ce chapitre.

Afin de garantir une comparaison entre les différentes conditions expérimentales, la densité d'ensemencement est fixée à $3{,}5 \times 10^5$ cellules. cm^{-2}. Cette densité est identique pour toutes les configurations étudiées, ce qui permet de comparer directement les effets du support et des conditions de culture sur la viabilité et la prolifération cellulaire.

IV.1.A - De la culture standard a l'intestin-sur-puce : comparaison des conditions de coculture

Le développement de l'intestin-sur-puce requiert la validation des conditions de culture des cellules épithéliales intestinales. La réponse des cellules épithéliales est en effet fortement influencée par leur environnement : nature du support et confinement conditionnent à la fois l'adhésion initiale, la viabilité, la prolifération et la différenciation. Une comparaison systématique de différentes configurations est donc indispensable afin d'identifier les éventuelles altérations induites par le passage de conditions standards vers un dispositif microfluidique instrumenté.

Stratégie expérimentale

L'impact de l'environnement de culture est analysé selon quatre configurations expérimentales, schématisées en Figure IV-1 :

- la culture en plaque standard, considérée comme condition de référence ;
- la culture sur membranes fonctionnalisées, permettant d'introduire le support qui sera utilisé par la suite dans le dispositif ;
- la culture en puce microfluidique en conditions statiques, qui impose un confinement géométrique marqué et un volume de milieu limité ;
- la culture en puce microfluidique perfusée de milieu de culture à l'aide d'une pompe péristaltique, qui impose aux cellules une contrainte de cisaillement pariétal physiologique, rendant le système plus représentatif des conditions in vivo.

La culture est suivie à trois temps : après 1 jour (J1), après 3 jours (J3) et après 7 jours (J7), correspondant aux phases d'adhésion puis de prolifération. Dans les cultures en puits (référence et membranes fonctionnalisées), le milieu est renouvelé tous les deux jours afin d'assurer un apport constant en nutriments et de limiter l'accumulation de métabolites. En puce microfluidique en condition statique, le milieu est changé tous les jours. Deux paramètres principaux sont évalués : la viabilité cellulaire, reflétant la capacité des cellules à survivre dans l'environnement considéré, et la confluence, traduisant l'homogénéité du recouvrement de la surface de culture et dont la cinétique quantifie la dynamique de croissance sur chaque support.

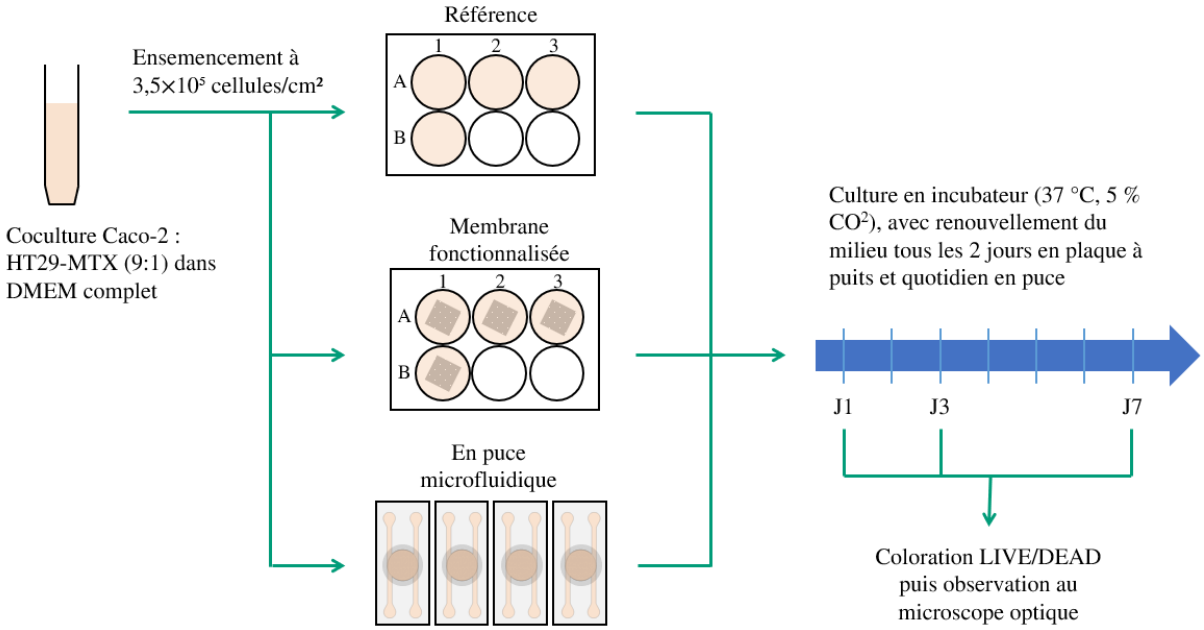


Figure IV-1 : Stratégie expérimentale.

Méthodes de caractérisation des cultures

La viabilité cellulaire est évaluée à l'aide du kit fluorescent LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity for mammalian cells (ThermoFisher Scientific, États-Unis, réf. L3224). Ce kit repose sur l'utilisation de deux sondes fluorescentes complémentaires, permettant de discriminer les cellules viables des cellules mortes :

- La calcéine AM est une molécule non fluorescente et perméable aux membranes plasmiques. Une fois entrée dans la cellule vivante, elle est hydrolysée par les estérases intracellulaires en calcéine, une forme fluorescente qui s'accumule dans le cytoplasme. La calcéine émet alors une fluorescence verte intense détectée avec un filtre adapté (longueurs d'onde d'excitation 494 nm, émission 517 nm).

- L'éthidium homodimère-1 est un colorant intercalant de l'ADN qui ne traverse pas les membranes intactes. Il ne pénètre que dans les cellules dont la membrane plasmique est compromise, c'est-à-dire en situation de mort cellulaire. Une fois lié à l'ADN nucléaire, il émet une fluorescence rouge brillante (excitation 528 nm, émission 617 nm).

Avant marquage, les cultures sont rincées avec du PBS (Merck, Allemagne, réf. D8537). Pour chaque condition, un échantillon est systématiquement traité avec 1 mL de méthanol 70 % (Carlo Erba, Italie, réf. 525102) pendant 30 minutes à 37 °C : traitement induit une mort cellulaire complète et fournit un témoin négatif, utilisé pour le calibrage de l'imagerie en fluorescence. Ensuite, pour l'ensemble des échantillons, une solution de marquage est ensuite préparée (1 mL de PBS, 1 µL de calcéine AM et 8 µL d'éhidium homodimère-1) et déposée sur les cellules. L'incubation est réalisée pendant 40 minutes à 37 °C dans l'obscurité, les réactifs étant photosensibles. Après un rinçage final au PBS, les échantillons sont immédiatement observés au microscope.

Les acquisitions sont effectuées avec un microscope à fluorescence Axio Observer (Zeiss, Allemagne) équipé du logiciel Zen (Zeiss, Allemagne). Chaque zone d'acquisition est enregistrée dans deux modes :

- en contraste de phase, une technique de microscopie en lumière transmise qui convertit les déphasages optiques produits par les structures cellulaires transparentes en différences d'intensité visibles. Cette approche permet de rendre observables des cellules vivantes non colorées, qui seraient autrement difficilement discernables en champ clair.

- en fluorescence, pour la détection des signaux issus du marquage LIVE/DEAD, le canal rouge étant systématiquement calibré à l'aide du témoin négatif.

Chaque condition expérimentale est réalisée en quatre réplicats biologiques indépendants. Parmi ceux-ci, trois sont utilisés pour l'analyse quantitative de la viabilité et de la confluence, et un est systématiquement traité au méthanol afin de servir de contrôle négatif pour l'étalonnage du microscope. Pour chaque réplicat biologique destiné à l'analyse, au moins trois zones d'acquisition indépendantes sont imagées au microscope. Chaque zone est enregistrée en double mode, contraste de phase et fluorescence, ce qui constitue les réplicats techniques. Les valeurs de viabilité et de confluence retenues correspondent à la moyenne des trois réplicats biologiques, ce qui les rend représentatives de chaque condition. Cette organisation prend en compte la variabilité biologique tout en contrôlant la reproductibilité technique.

Les résultats sont présentés de manière progressive : la référence en plaque, puis les membranes fonctionnalisées, avant d'aborder la culture en puce microfluidique, d'abord en conditions statiques puis en conditions dynamiques.

Condition de référence

La culture en plaque à puits constitue la condition de référence, permettant d'évaluer la viabilité et la dynamique de croissance de la coculture Caco-2 : HT29-MTX dans un

environnement standard. Les résultats, disponibles à la Figure IV-2, montrent une viabilité élevée et stable, supérieure à 95 % à l'ensemble des temps considérés. Parallèlement, la confluence augmente progressivement, passant de 56,0 % à J1 à 79,0 % à J3, pour atteindre 96,6 % à J7. Cette évolution correspond à une phase d'adhésion initiale suivie d'une prolifération régulière, aboutissant à la formation d'une monocouche épithéliale continue et homogène après une semaine de culture. La culture en plaque standard fournit ainsi une base de comparaison robuste pour l'analyse des autres supports étudiés.

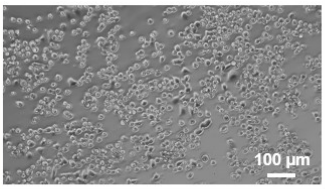
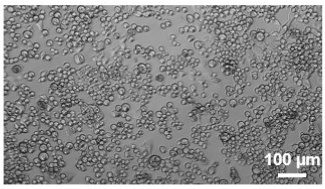
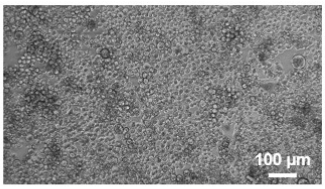
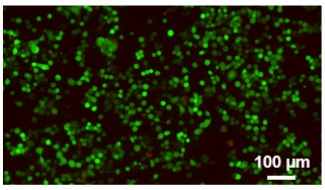
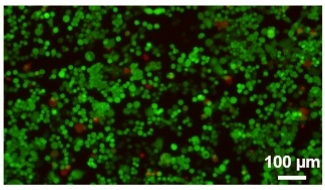
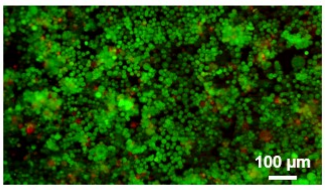
	J1	J2	J3
Viabilité	95,3 %	95,5 %	97,2 %
Confluence	56,0 %	79,0 %	96,6 %
Contraste de phase			
LIVE/DEAD			

Figure IV-2 : Viabilité et confluence de la coculture Caco-2 : HT29-MTX en condition de référence.

La première ligne présente les pourcentages moyens de viabilité et de confluence. Les lignes suivantes montrent des microphotographies représentatives en microscopie optique en contraste de phase et après marquage fluorescent LIVE/DEAD (cellules vivantes en vert, cellules mortes en rouge). Les images présentées ne constituent qu'un exemple illustratif parmi les zones d'acquisition réalisées. Barre d'échelle = 100 µm.

Culture sur membrane fonctionnalisée

L'utilisation de membranes comme support de culture constitue une étape intermédiaire vers l'utilisation de dispositifs microfluidiques, permettant d'introduire un substrat plus proche de celui employé dans les puces tout en conservant des conditions expérimentales simples (culture en puits, volume de milieu abondant, absence de flux). L'objectif est d'évaluer si le changement de support modifie la viabilité cellulaire ou la dynamique de croissance de la coculture.

Les expériences sont réalisées sur des membranes commerciales non poreuses, présentées sous la référence 3 au Tableau III-2. Ce choix est motivé par leur transparence optique : les membranes poreuses à densité de pores élevée compliquent l'acquisition et l'analyse en microscopie. Ces membranes sont fonctionnalisées à la fibronectine selon le protocole décrit au Chapitre III, puis disposées au fond de plaques à puits avant ensemencement.

Comme illustré en Figure IV-3, la viabilité cellulaire se maintient à un niveau élevé sur l'ensemble de la cinétique, avec 98,1 % à J1, 96,2 % à J3 et 94,1 % à J7. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues dans la condition de référence, confirmant que la membrane fonctionnalisée n'affecte pas la survie cellulaire. La confluence progresse toutefois plus lentement aux temps précoces (34,0 % à J1 et 66,0 % à J3) avant d'atteindre 91,0 % à J7. Ce profil suggère une adhésion initiale moins efficace qu'en plaque à puits, malgré la présence de fibronectine. Ce retard reste cependant transitoire, la prolifération compensant le déficit d'adhésion et conduisant à la formation d'une monocouche homogène à J7, comparable à la référence.

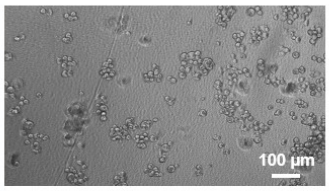
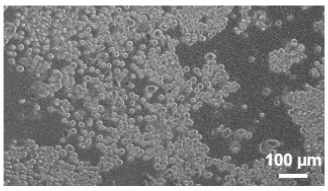
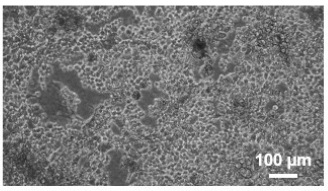
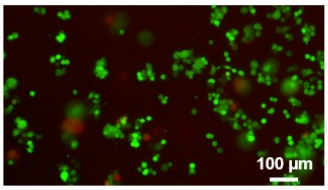
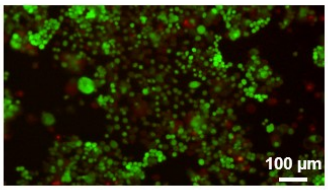
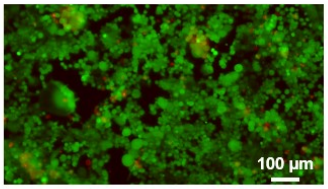
	J1	J2	J3
Viabilité	98,1 % 103 % de variation relative	96,2 % 101 % de variation relative	94,1 % 97 % de variation relative
Confluence	34,0 % 61 % de variation relative	66,0 % 84 % de variation relative	91,0 % 94 % de variation relative
Contraste de phase			
LIVE/DEAD			

Figure IV-3 : Viabilité et confluence de la coculture Caco-2 : HT29-MTX sur membrane fonctionnalisée.

Ces observations sont comparables avec la littérature, qui indique que la fonctionnalisation de membranes en PET par des signaux d'adhésion ne compromet pas la viabilité cellulaire des Caco-2 et que l'adhésion initiale sur ces supports peut être moins efficace que sur des surfaces de référence, mais que ce déficit est transitoire et compensé par la prolifération cellulaire, conduisant à la formation d'une monocouche homogène [276].

Ainsi, les résultats présentés confirment la compatibilité biologique des membranes fonctionnalisées à la fibronectine et valident leur pertinence comme support pour la culture épithéliale dans l'intestin-sur-puce.

Culture en puce statique

Dans l'intestin-sur-puce, la culture cellulaire est réalisée dans une chambre microfluidique confinée, dont les dimensions réduisent fortement le volume de milieu

disponible. Les expériences sont menées en conditions statiques, c'est-à-dire sans circulation active de milieu, afin d'évaluer l'impact du confinement seul, indépendamment des contraintes mécaniques générées par l'écoulement.

Comme présenté en Figure IV-4, la viabilité moyenne atteint 86,8 % à J1, se maintient à 86,8 % à J3, puis diminue à 78,7 % à J7. La confluence demeure très faible sur l'ensemble de la cinétique, avec 3,1 % à J1, 1,3 % à J3 et 10,6 % à J7 : ces valeurs, très réduites et leur progression lente, traduisent une adhésion initiale inefficace et une prolifération compromise. De plus, comme illustré en Figure IV-5, une forte variabilité inter-réplicats est observée à J7 : la viabilité varie de 44,5 % à 97,0 % et la confluence de 1,8 % à 26,3 %, ce qui reflète la sensibilité du système aux micro-variations expérimentales.

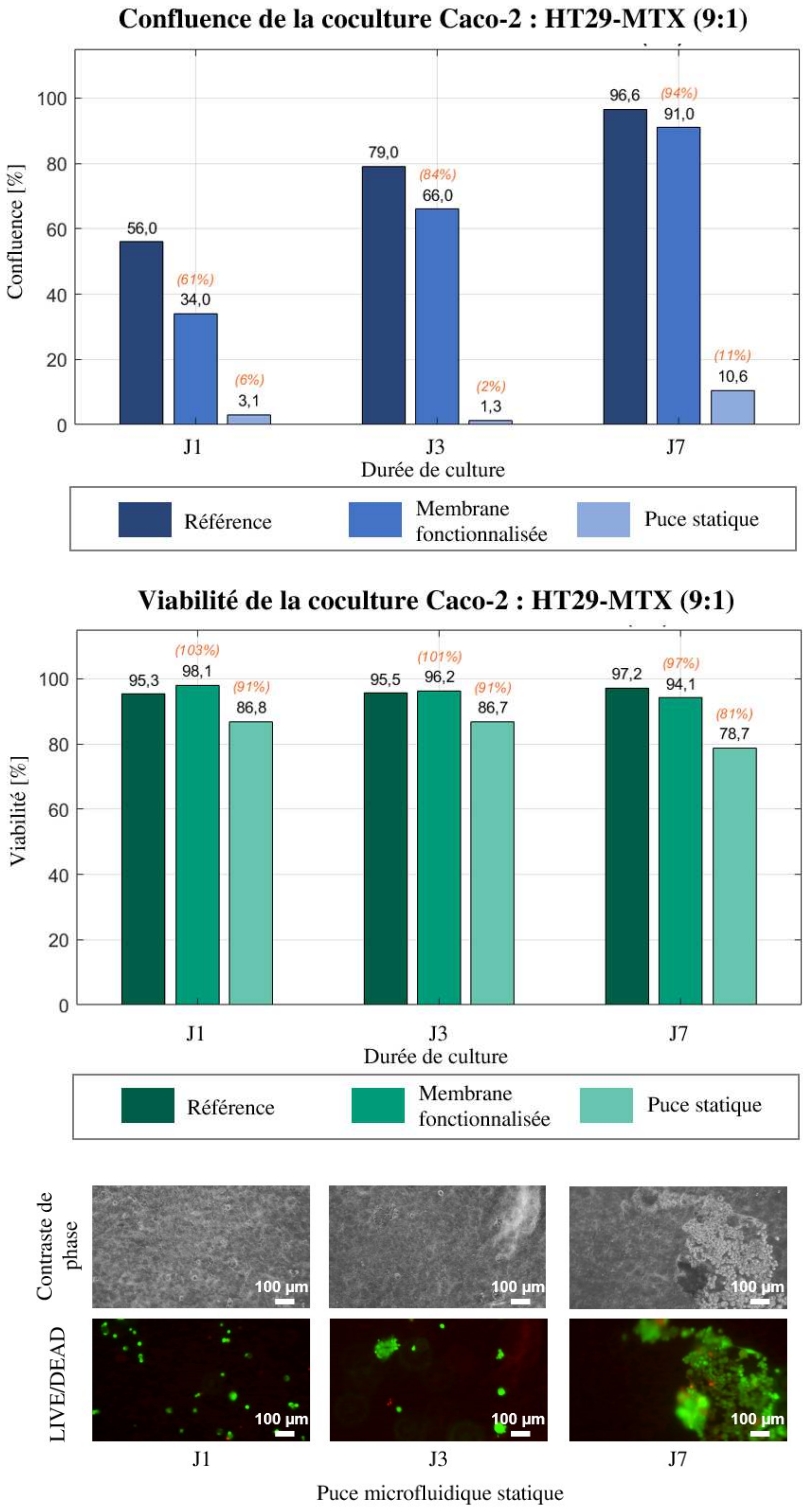


Figure IV-4 : Viabilité et confluence de la coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) en puce microfluidique statique.

Viabilité (en vert, en haut) et confluence (en bleu, en bas). Pour différents supports : référence (culture en plaque à puits), en foncé. Sur membrane fonctionnalisée à la fibronectine en puits de culture, en couleur médium, et enfin en puce microfluidique en statique, en clair. Au dessus des barres, en noir est écrit la valeur. Et en orange entre parenthèse et en italique est écrit, pour les conditions membrane et puce, la variation relative par rapport à la référence.

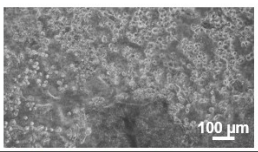
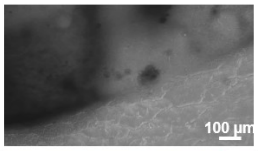
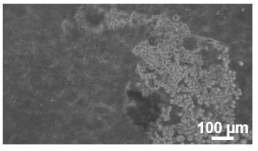
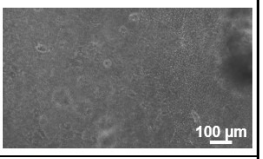
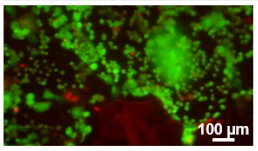
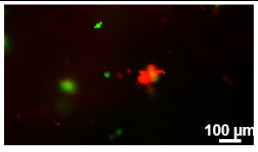
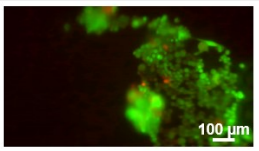
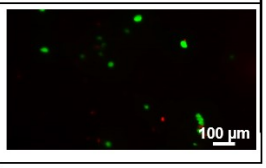
	J7			
	Puce 1	Puce 2	Puce 3	Puce 4
Viabilité	95,9 %	44,5 %	97,0 %	77,5 %
Confluence	26,3 %	2,2 %	11,9 %	1,8 %
Contraste de phase				
LIVE/DEAD				

Figure IV-5 : Hétérogéinité en culture en puce statique.

Viabilité et confluence calculées pour chaque réplicat biologique de puce en statique avec une coculture cultivée 7 jours. Images illustratives de chaque puce, en contraste de phase et en LIVE/DEAD. Scale bar = 100 µm.

Culture en puce dynamique

La mise en culture en conditions dynamiques est complexe en raison de problèmes récurrents d'étanchéité du dispositif, qui s'accentuent lors des essais prolongés et conduisent à des contaminations ou à une mortalité cellulaire prématurée. Malgré les améliorations successives apportées au design, décrites au chapitre précédent, le nombre d'expériences exploitables reste limité : à ce stade, une seule expérience est conduite et caractérisée avec succès pendant 24 h de perfusion.

Après l'ensemencement, les cellules sont laissées en sédimentation et en phase d'adhésion pendant la nuit, puis la perfusion est initiée le lendemain selon les paramètres décrits précédemment. Après 24 h, la viabilité cellulaire est mesurée à 63,6 %, tandis que la confluence n'atteint que 1,9 %, soit des valeurs inférieures à celles observées dans toutes les autres configurations expérimentales. Comme illustré en Figure IV-6, les cellules viables se distribuent préférentiellement dans les zones périphériques de la chambre circulaire, au contact des parois latérales.

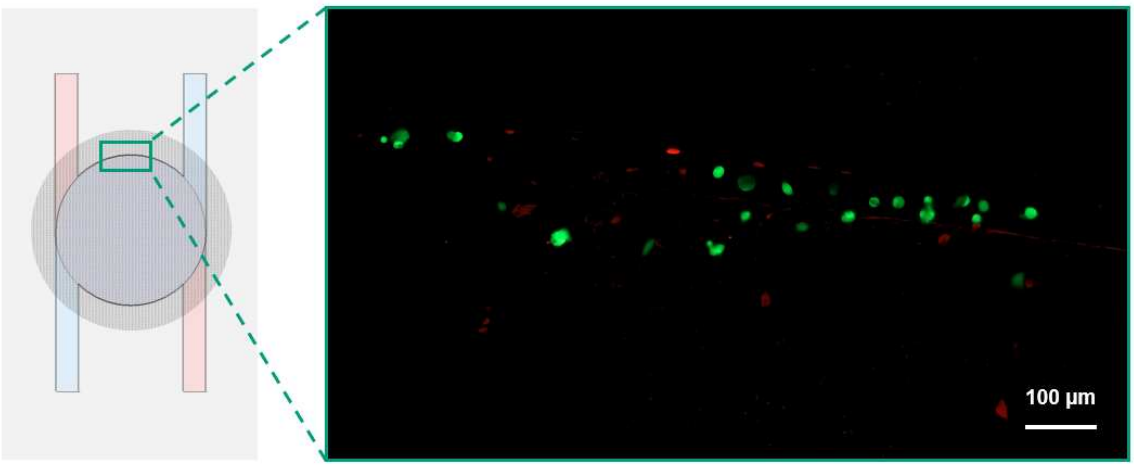


Figure IV-6 : Répartition des cellules en conditions dynamiques dans l'intestin-sur-puce.

À gauche : schéma de la chambre microfluidique indiquant en vert la zone observée. À droite : image représentative après marquage LIVE/DEAD à J1 (cellules viables en vert, cellules mortes en rouge). Les cellules se concentrent dans les régions périphériques, tandis que la zone centrale est peu colonisée.

Discussion

Les résultats obtenus en puce, aussi bien en conditions statiques que dynamiques, mettent en évidence une marge de progression avant d'atteindre un modèle physiologiquement pertinent et reproductible : les viabilités et confluences observées en puce sont nettement inférieures à celles des cultures réalisées sur membrane fonctionnalisées. Afin d'identifier les causes de ces limitations, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées.

- **Volume limité de milieu de culture.** Le volume restreint de milieu dans les puces microfluidiques pourrait à priori constituer un facteur limitant pour la croissance cellulaire. Néanmoins, une analyse quantitative permet d'écarter cette hypothèse. À 10,6 % de confluence sur une surface de $S_{chambre}$ = 79 mm² et en considérant une surface cellulaire moyenne de 176,7 µm² correspondant à un diamètre de 15 µm, le nombre de cellules adhérentes peut être estimé à $4{,}7\times10^{4}$. Rapporté au volume de la chambre $V_{chambre}$ = 120 µL, cela équivaut à $3{,}9\times10^{5}$ cellules/mL. À titre comparatif, la culture de référence en plaque 6 puits ($3{,}5\times10^{5}$ cellules/cm², soit $3{,}36\times10^{6}$ cellules dans 5 mL) atteint $6{,}7\times10^{5}$ cellules/mL. Il apparaît donc que la culture en puce, à faible confluence, offre un volume de milieu plus important par cellule que la culture conventionnelle en puits. La limitation de croissance observée ne peut donc pas être attribuée à une insuffisance globale de nutriments.

- **Durée d'adhésion avant perfusion.** La très faible confluence observée en conditions dynamiques pourrait, de prime abord, être expliquée par une adhésion cellulaire incomplète avant l'application du flux. Dans le protocole employé, les cellules disposent

de 12 heures pour sédimenter et adhérer au substrat avant le démarrage de la perfusion. Or, les données de la littérature montrent que les cellules Caco-2 adhèrent et s'étalent sur des surfaces recouvertes de protéines de matrice en un laps de temps bien plus court, généralement compris entre 3,5 et 6,5 heures sur fibronectine [277]. Un délai de 12 heures apparaît donc largement compatible avec l'établissement d'une adhésion efficace. Cette conclusion est confortée par les tests effectués sur la membrane dépourvue de système microfluidique, qui révèlent une adhésion initiale légèrement moins efficace que dans les puits, mais néanmoins suffisante pour assurer l'ancrage cellulaire. L'hypothèse d'un défaut d'adhésion peut ainsi être écartée.

- **Porosité de la membrane.** Les membranes non poreuses limitent la polarisation et la différenciation cellulaire, tandis que les membranes poreuses favorisent un phénotype épithélial plus représentatif [208]. Il apparaît donc nécessaire de reproduire ces expériences sur membranes poreuses.

- **Durée de culture.** La durée totale de culture est limitée à sept jours. Cette échelle temporelle est compatible avec l'étude des HT29-MTX, dont la sécrétion de mucus devient abondante après six à huit jours de culture [278]. En revanche, pour les Caco-2, cette durée reste insuffisante pour atteindre leur phénotype différencié, qui nécessite 21 jours de culture post-confluence [36], [37].

- **Formation de microbulles d'air.** La formation de microbulles d'air constitue un problème majeur pour la culture cellulaire car elle induit des hétérogénéités marquées entre réplicats et entre zones d'une même puce, pouvant localement provoquer la mort cellulaire.

    - En conditions statiques, ces bulles apparaissent spontanément dans les canaux en raison de la forte perméabilité du PDMS aux gaz, qui favorise la diffusion et l'accumulation d'air dissous dans le milieu jusqu'à atteindre une nucléation, c'est-à-dire c'est-à-dire la formation de bulles lorsque la solubilité maximale du gaz est atteinte. Ce problème peut être limité en réduisant la perméabilité du matériau. Une première approche consisterait à remplacer le PDMS par des alternatives peu perméables aux gaz, comme des dispositifs entièrement en verre. Lorsque les avantages technologiques du PDMS, comme la facilité de microfabrication, souhaitent être conservés, l'application de revêtements barrière tels que le Parylene-C [279] constitue une solution efficace, en formant une couche protectrice qui réduit considérablement la diffusion gazeuse et donc la formation spontanée de bulles.

    - En conditions dynamiques, elles sont également générées par la pompe péristaltique, en particulier à faible débit, du fait des fluctuations de pression [280]. Lorsqu'une dépression transitoire, par exemple lors du relâchement d'un rouleau, fait chuter la

pression en dessous de la pression de vapeur du liquide, un phénomène de cavitation peut survenir, c'est-à-dire la formation de bulles de vapeur liées à cette baisse locale de pression [281]. L'intégration de dispositifs de débullage en amont de la zone de culture constitue une solution efficace. Ces modules, qu'ils soient académiques [282] ou commerciaux [283], reposent sur une membrane hydrophobe qui évacue sélectivement les bulles tout en préservant l'intégrité du flux, comme illustré en Figure IV-7. Leur efficacité peut être renforcée par un dégazage préalable du milieu, qui réduit la concentration en gaz dissous et limite ainsi la nucléation lors des variations de pression induites par la pompe.

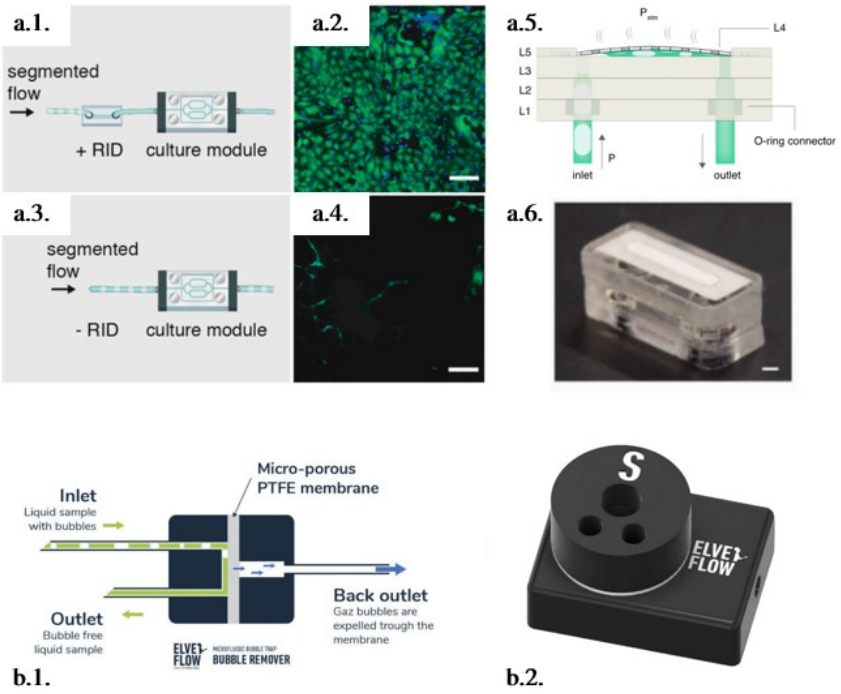


Figure IV-7 : Dispositifs externes de débullage microfluidique basés sur des membranes hydrophobes [282], [283].

(a) Dispositif de [282]. (a.1–a.4) Évaluation de l'impact du module de débullage sur la viabilité cellulaire en culture microfluidique. Schémas expérimentaux avec (a.1) et sans (a.3), module inséré en amont du module de culture, et images représentatives de cultures : (a.2) population viable en présence du module et (a.4) cellules peu nombreuses et endommagées en l'absence de module (barre d'échelle = 100 µm). (a.5) Schéma de principe du fonctionnement du module : au-delà de la pression d'ouverture, la membrane en PTFE (L4) se courbe et assure la continuité hydraulique entre l'entrée et la sortie ; les bulles rencontrant la surface hydrophobe sont évacuées vers l'atmosphère tandis que la phase liquide reste confinée. (a.6) Vue isométrique du module assemblé (barre d'échelle = 2 mm).
(b) Dispositif commercial [283]. (b.1) Schéma de fonctionnement d'un piège à bulles commercial utilisant également une membrane microporeuse en PTFE permettant l'évacuation sélective des bulles. (b.2) Image du dispositif commercial.

- **Altération de la fonctionnalisation des membranes.** Une autre hypothèse concerne l'altération de la chimie de surface des membranes au cours du processus d'intégration dans la puce. Comme décrit au Chapitre III, la membrane est modifiée par EDC/NHS

conduisant à la formation d'esters puis intégrée dans le dispositif par collage plasma avant le greffage de la fibronectine. Le plasma d'oxygène peut cependant dégrader ces esters, ce qui compromet l'attache de la fibronectine. L'absence de fibronectine limite fortement l'adhésion cellulaire, ce qui explique la confluence initialement faible et la prolifération ralentie. Cet effet du plasma apparaît d'autant plus probable que la membrane testée en puits, soumise au même protocole de fonctionnalisation mais sans exposition plasma, présente une adhésion et une prolifération plus favorables, même si la progression de la confluence y reste un peu plus lente que dans les conditions de référence. Cette hypothèse peut être testée par des caractérisations physico-chimiques complémentaires pour évaluer la stabilité des groupements fonctionnels après plasma ainsi que d'estimer l'efficacité réelle du greffage de la fibronectine. Si cette hypothèse se confirme, les dispositifs microfluidiques devront être adaptés de manière à ne plus recourir au plasma d'oxygène tout en maintenant une étanchéité satisfaisante. Dans cette perspective, les systèmes de serrage réversible, ou clamping, représentent une alternative pertinente. Ils consistent à maintenir la puce fermée soit par compression mécanique entre deux plaques, généralement à l'aide de vis ou d'écrous, soit par serrage magnétique, comme présenté en Figure IV-8 [284].

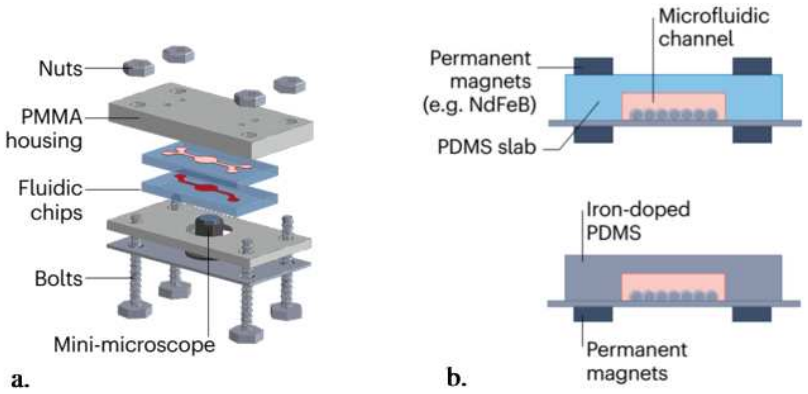


Figure IV-8 : Méthodes (a) mécaniques et (b) magnétiques de clamping de puces microfluidiques.

Au regard de l'ensemble de ces éléments, bien que plusieurs facteurs puissent contribuer aux performances limitées observées en puce, la formation de microbulles d'air apparaît comme le verrou technologique le plus critique à lever en priorité. Les bulles induisent des perturbations brutales et localisées du microenvironnement cellulaire, pouvant entraîner des zones de décollement, de mort cellulaire et une forte variabilité inter-expérimentale. Leur présence compromet ainsi la reproductibilité même du modèle, condition indispensable à toute amélioration ultérieure. La résolution systématique de ce problème, par la combinaison de matériaux moins perméables aux gaz, de revêtements barrière et de dispositifs de débullage en amont de la zone de culture, constitue donc une étape préalable incontournable avant toute optimisation plus fine du système microfluidique.

IV.1.B - PRODUCTION DE MUCUS

L'évaluation de la production de mucus constitue un critère central pour apprécier la validité physiologique du modèle cellulaire cultivé dans l'intestin-sur-puce. En effet, le mucus, en recouvrant l'épithélium intestinal, participe au maintien de son intégrité, régule la diffusion de biomolécules et module les interactions avec le microbiote. Sa reproduction par un modèle in vitro constitue ainsi un indicateur de sa proximité avec l'in vivo.

Ainsi, la coculture Caco-2 : HT29-MTX (ratio 9:1) est étudiée afin de déterminer si elle sécrète du mucus lorsqu'elle est cultivée dans le dispositif microfluidique. Les cellules sont cultivées sur membranes poreuses en PET fonctionnalisées à la fibronectine, présentées sous la référence 2 au Tableau III-2, identiques à celles utilisées dans l'intestin-sur-puce. Contrairement aux membranes non poreuses utilisées dans les expériences précédentes, ce type de support a été choisi afin de reproduire plus fidèlement l'architecture apicale/basale de l'épithélium intestinal et de permettre les échanges transmembranaires, conditions indispensables à la polarisation et à la différenciation cellulaire [208].

L'usage d'inserts commerciaux de type Transwell® ne permet pas de reproduire strictement ces conditions, en raison de l'intégration de membranes propriétaires aux caractéristiques différentes. Afin de garantir l'utilisation du même substrat, un insert personnalisé a été conçu. Deux géométries complémentaires ont été développées : un modèle carré pouvant accueillir des membranes jusqu'à 9 mm de côté et un modèle circulaire compatible avec un diamètre maximal de 11 mm, comme illustré en Figure IV-9. Ces modèles sont fabriqués par impression 3D au CC Héré (IJL, Nancy) par Cyril Schlauder. Cette approche permet une flexibilité expérimentale tout en assurant une continuité méthodologique entre les expériences réalisées sur support statique et celles conduites dans la puce.

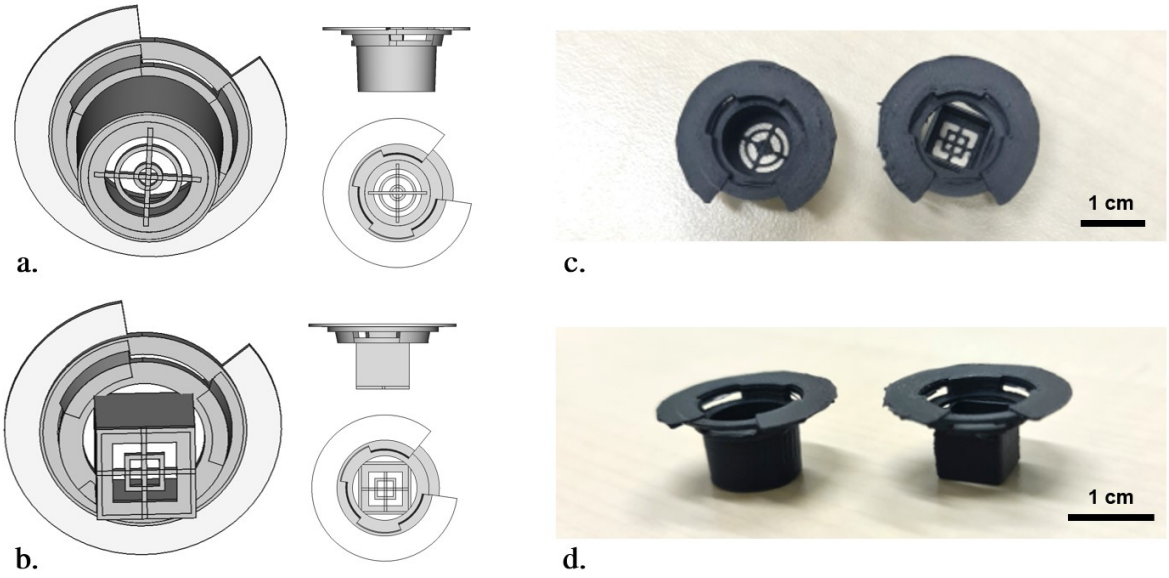
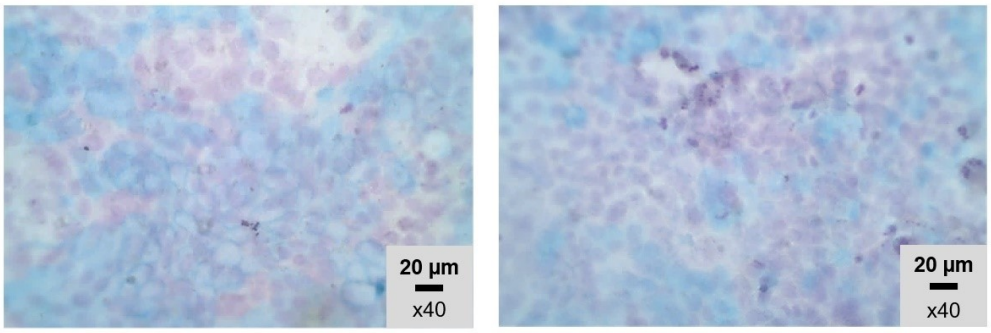


Figure IV-9 : Modèle numériques 3D des inserts personnalisés.

(a–b) Schémas CAO de deux modèles d'inserts (a) Modèle circulaire (jusqu'à 11 mm de diamètre) ; (b) modèle carré (jusqu'à 9 mm de côté). Ces supports, inspirés des Transwell®, permettent l'utilisation de membranes identiques à celles de l'intestin-sur-puce. (c–d) Photographies des inserts réalisés par impression 3D : vue supérieure (c) et vue latérale (d).

La coculture Caco-2 : HT29-MTX est ensemencée à forte densité ($3{,}5 \times 10^5$ cellules/cm², densité identique aux expériences précédemment décrites), afin d'atteindre rapidement la confluence et de permettre une culture post-confluence favorable à la différenciation. Les membranes sont ensuite caractérisées par des coupes histologiques colorées au bleu alcian et à l'hématoxyline, permettant d'évaluer la production de mucus. Le protocole détaillé de fixation, inclusion en paraffine, coloration et préparation des échantillons est présenté en Annexe G.

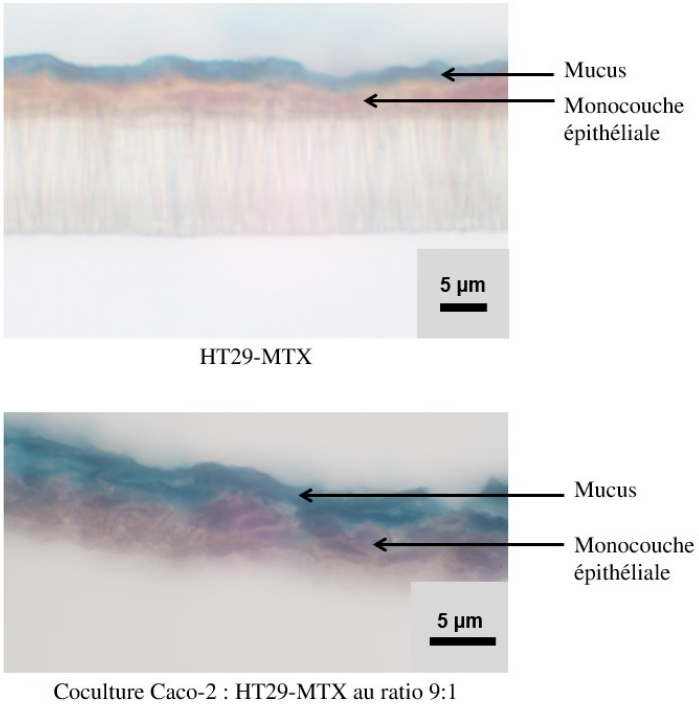
Les observations mettent en évidence la présence de mucus à la surface de la coculture, révélée par la coloration au bleu alcian. L'intensité et la distribution du marquage apparaissent comparables à celles observées pour la lignée HT29-MTX cultivée seule dans les mêmes conditions. Cette similarité est observée aussi bien en vue planaire, disponible à la Figure IV-10, qu'en coupes transversales, visible en Figure IV-11. Ces résultats suggèrent la capacité de la coculture à reproduire un phénotype sécrétoire fonctionnel.



HT29-MTX Coculture Caco-2 : HT29-MTX au ratio 9:1

Figure IV-10 : Observations de cocultures Caco-2 : HT29-MTX (9:1) colorées au bleu alcian et à l'hématoxyline (grossissement ×40).

La coloration met en évidence le mucus en bleu (bleu alcian) et les noyaux cellulaires en rouge-violet (hématoxyline). Les images montrent une distribution du mucus comparable entre la lignée HT29-MTX seule et la coculture après 21 jours de culture en insert personnalisé sur membrane fonctionnalisée à la fibronectine.



HT29-MTX

Coculture Caco-2 : HT29-MTX au ratio 9:1

Figure IV-11 : Coupes transversales de cocultures Caco-2 : HT29-MTX (9:1) colorées au bleu alcian et à l'hématoxyline (grossissement ×100).

Après 21 jours de culture en insert personnalisé sur membrane fonctionnalisée à la fibronectine, le mucus apparaît en bleu (bleu alcian) au-dessus de la monocouche épithéliale dont les noyaux sont colorés en rouge-violet (hématoxyline). En dessous de la couche cellulaire, la membrane de support poreuse est visible.

La mise en évidence d'une production de mucus par la coculture Caco-2 : HT29-MTX constitue un premier indicateur de la robustesse et de la pertinence biologique du modèle développé. Toutefois, plusieurs pistes d'amélioration peuvent être envisagées :

- **Caractérisation spécifique par immunofluorescence.** Le ciblage de mucines telles que MUC2 ou MUC5AC permet de préciser la composition du mucus et de vérifier que la coculture reproduit bien les phénotypes attendus dans un contexte intestinal.

- **Analyse de l'intégrité de la barrière cellulaire.** L'étude des jonctions serrées entre cellules épithéliales complète la caractérisation. L'association entre la production de mucus et l'intégrité cellulaire constitue un indicateur robuste de la fonction barrière et renforce la pertinence physiologique du modèle.

- **Validation en conditions microfluidiques.** La réalisation de ces analyses directement dans l'intestin-sur-puce permet de confirmer que l'environnement microfluidique, plus proche de la situation in vivo, ne modifie pas la sécrétion de mucus et conserve la pertinence physiologique du modèle.

IV.2 - SUIVI PAR SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE

La mise en œuvre de la spectroscopie d'impédance pour l'étude de cultures épithéliales intestinales repose sur plusieurs étapes méthodologiques. Il est d'abord nécessaire de caractériser les propriétés électriques des électrodes. Cette analyse est ensuite complétée par l'évaluation de la profondeur de pénétration du champ électrique, mise en relation avec l'épaisseur des tapis cellulaires, conditionnant la portion de l'échantillon effectivement sondée. Ensuite, le calcul des facteurs de forme des électrodes permet de convertir les données brutes en grandeurs physiques interprétables, indépendantes de la géométrie des dispositifs. Une fois ces éléments établis, la spectroscopie d'impédance est alors appliquée au suivi de tapis cellulaires intestinaux.

IV.2.A - CARACTERISATION INTRINSEQUE DES ELECTRODES INTERDIGITEES MICROFABRIQUEES

Vérification des IDT après microfabrication

Comme pour toute microréalisation, il est indispensable de contrôler l'intégrité des IDT avant leur utilisation. Les dispositifs sont d'abord nettoyés à l'acétone puis rincés à l'isopropanol. Une inspection au microscope optique permet de vérifier l'efficacité du nettoyage et de détecter d'éventuels défauts tels que des courts-circuits ou des discontinuités de piste, comme illustré en Figure IV-12. Ce contrôle visuel est complété par une mesure électrique au multimètre afin de confirmer l'absence de court-circuit et la continuité entre les connecteurs de bord et les contacts à ressort. Après validation, les IDT sont montées sur PCB pour caractérisation.

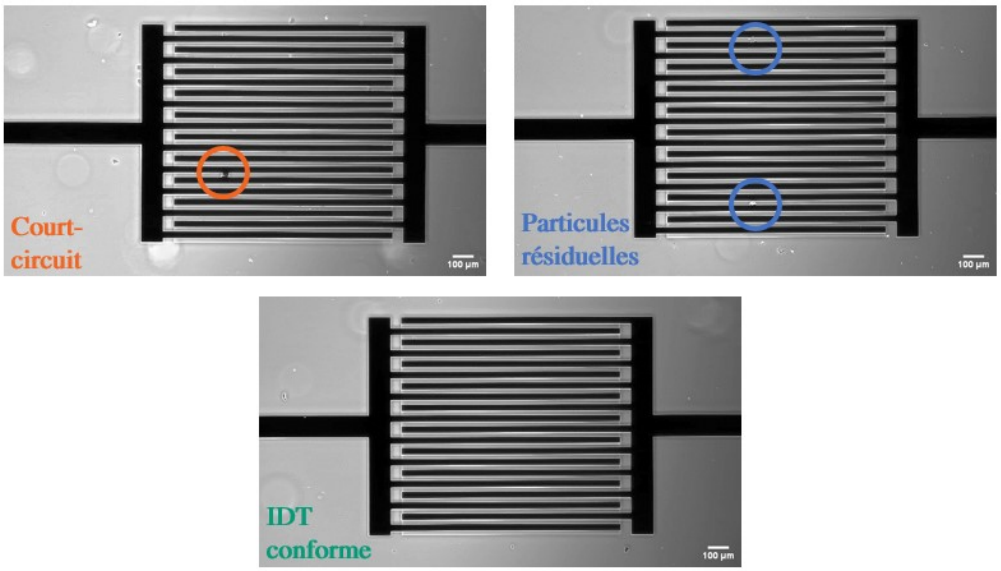


Figure IV-12 : Défauts typiques des IDT après microfabrication.

Observations au microscope optique d'IDT après microfabrication. (a) Court-circuit entre deux pistes (cercle orange). (b) Présence de particules résiduelles entre les électrodes (cercles bleus). (c) IDT conforme sans défaut observable. Échelle : 100 µm.

Caractérisation à vide des IDT

La première étape de caractérisation consiste à réaliser des mesures à vide, c'est-à-dire en l'absence de solution, afin d'évaluer la réponse intrinsèque des IDT. Le comportement correspond alors à celui d'un élément capacitif pur : module de l'impédance $|\underline{Z}(\omega)|$ inversement proportionnel à la fréquence et phase $\theta(\omega)$ à –90°. La Figure IV-13 présente le diagramme de Bode correspondant. Les perturbations observées en dessous de 10 kHz sont dues aux limitations de l'appareil de mesure (limité à 40 MΩ).

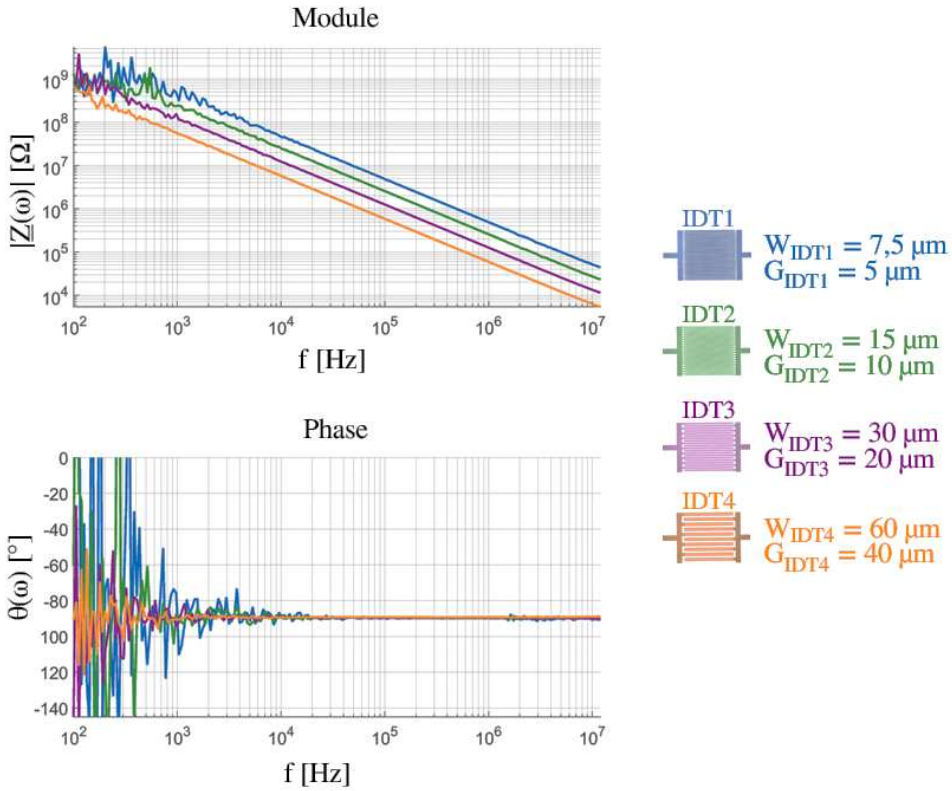


Figure IV-13 : Diagramme de Bode des IDT à vide.

Compte tenu de ce comportement capacitif, la capacité apparente $C_{app}(\omega)$ peut être calculée à partir de l'admittance complexe selon la relation donnée à l'Équation IV-1. Les courbes obtenues sont présentées en Figure IV-14.

$$C_{app}(\omega) = \frac{\Im\ \underline{Y}(\omega)}{\omega}$$

Équation IV-1 : Capacité apparente.

Avec :

$C_{app}(\omega)$	la capacité apparente du système, en [F].
$\underline{Y}(\omega)$	l'admittance complexe du système, en [S].
ω	la pulsation du signal sinusoïdal appliqué, en [rad·s^{-1}].

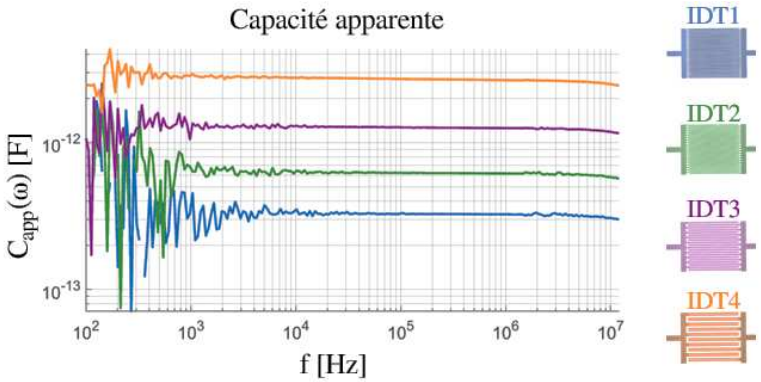


Figure IV-14 : Capacité apparente des IDT à vide.

La capacité à vide C_{vide} est ensuite définie comme la moyenne de $C_{app}(\omega)$ dans la bande de fréquences stable comprise entre 10^5 et 10^6 Hz. La valeur retenue correspond à la moyenne des capacités mesurées sur cet intervalle. Pour chacune des quatre géométries d'IDT, cette extraction est réalisée sur au moins quatre dispositifs distincts, afin d'assurer la robustesse statistique des résultats.

La Figure IV-15 présente les capacités à vide extraites pour les différentes géométries d'IDT. Les valeurs obtenues sont proches des rapports théoriques de 2 attendus. Cette cohérence reflète directement la multiplication par deux des dimensions des doigts, qui se traduit théoriquement par un doublement de la capacité. Les écarts résiduels relèvent des tolérances de la microfabrication (élargissement latéral des électrodes, réduction de l'espacement entre électrodes consécutives), dont l'impact relatif est particulièrement marqué pour les plus petites géométries.

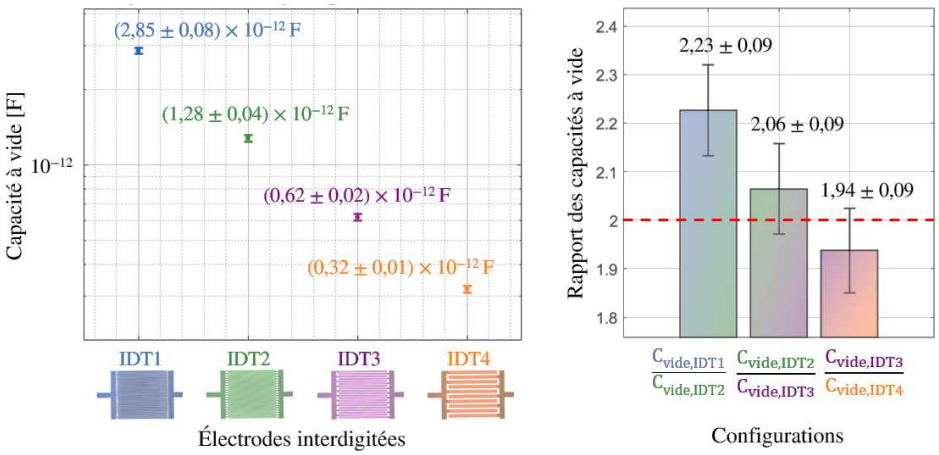


Figure IV-15 : Capacité à vide des électrodes interdigitées (gauche) et rapports de capacité entre géométries successives (droite).

Les capacités à vide sont extraites pour chacune des électrodes interdigitées (IDT1 à IDT4) à partir de la capacité apparente sur l'intervalle fréquentiel $[10^5 - 10^6]$ Hz, Les rapports successifs sont également présentés, avec comparaison à la valeur théorique attendue de 2, représentée par une ligne horizontale pointillée rouge. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Caractérisation des IDT avec de l'eau déionisée

Après la caractérisation à vide, la réponse des IDT est évaluée en présence d'un liquide diélectrique de référence. L'eau déionisée (EDI), choisie pour sa faible conductivité ionique, sert de base de comparaison avant l'analyse de solutions plus complexes.

La Figure IV-16 présente l'allure caractéristique de la réponse des solutions électrolytiques en spectroscopie d'impédance. À très basses fréquences, l'impédance est dominée par la capacité de double couche formée à l'interface électrode–électrolyte [285]. Dans la zone fréquentielle intermédiaire, la réponse est gouvernée par la conduction ionique de la solution, ce qui se traduit par un module constant et une phase proche de 0°(comportement résistif). À hautes fréquences enfin, la polarisation diélectrique des molécules d'eau prend le dessus : la réorientation rapide des dipôles sous l'effet du champ électrique accroît la permittivité effective et conduit à une décroissance capacitive du module accompagnée d'une phase proche de –90°[285], [286], [287], [212].

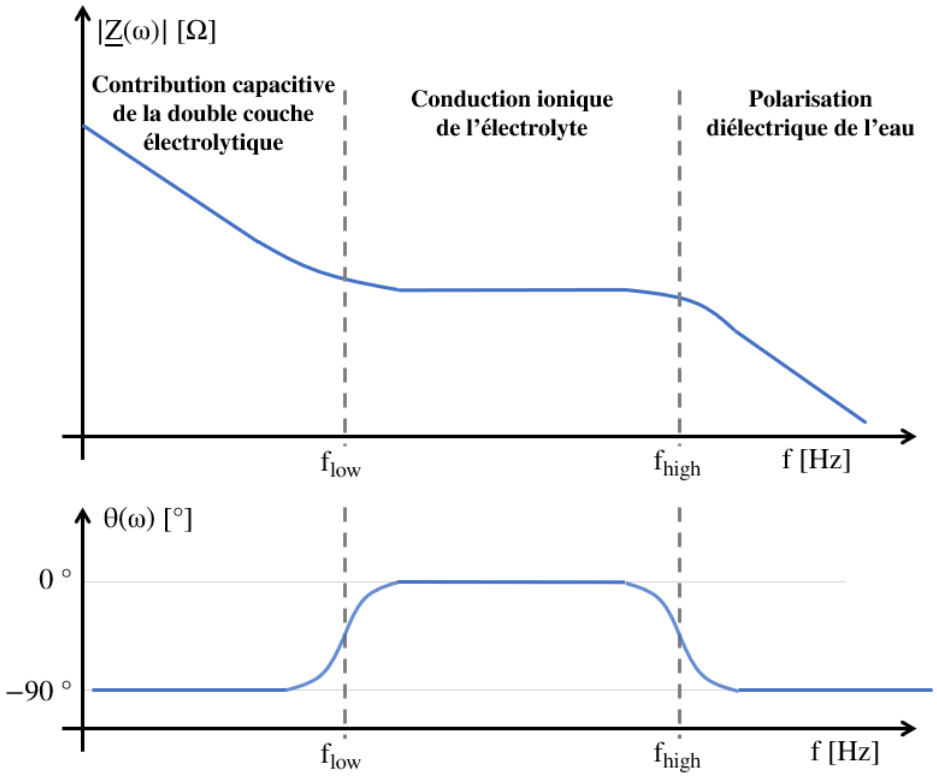


Figure IV-16 : Représentation schématique de la réponse fréquentielle d'une solution électrolytique en spectroscopie d'impédance.

Module de l'impédance $|\underline{Z}(\omega)|$ (en haut) et phase $\theta(\omega)$ (en bas). Trois régimes caractéristiques apparaissent : (i) à basses fréquences, la contribution de la double couche électrolytique entraîne un comportement capacitif, (ii) aux fréquences intermédiaires, l'impédance est dominée par la conduction ionique de la solution et (iii) à hautes fréquences, la polarisation diélectrique de l'eau conduit à nouveau à une réponse capacitive.

La Figure IV-17 montre la réponse fréquentielle des IDT en présence d'EDI. Deux régimes distincts apparaissent. À basses fréquences, l'impédance traduit un comportement résistif lié à la conduction ionique, tandis qu'à hautes fréquences, elle est dominée par la polarisation diélectrique de l'eau, caractérisée par une décroissance du module et une phase proche de –90°. Ces observations concordent avec le comportement théorique attendu.

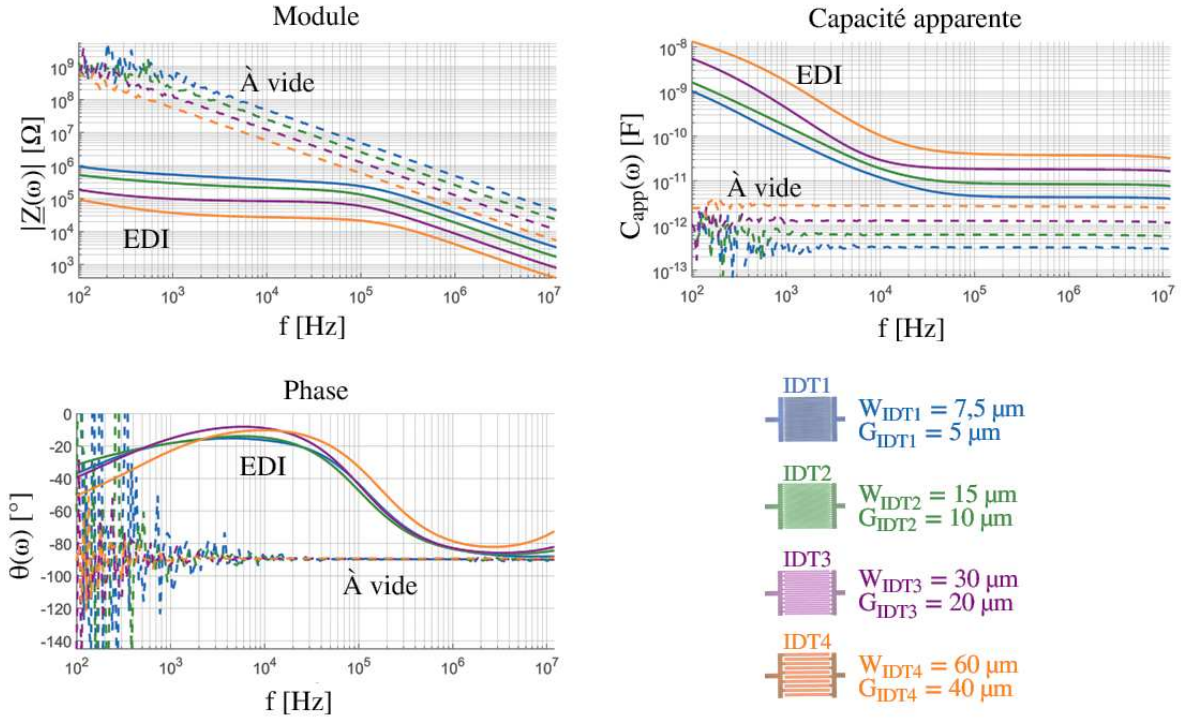


Figure IV-17 : Réponse fréquentielle des IDT en présence d'EDI.

Module, phase et capacité apparente pour les quatre géométries d'IDT. Les courbes en pointillés correspondent aux mesures à vide, et celles en traits pleins correspondent aux mesures en présence d'EDI.

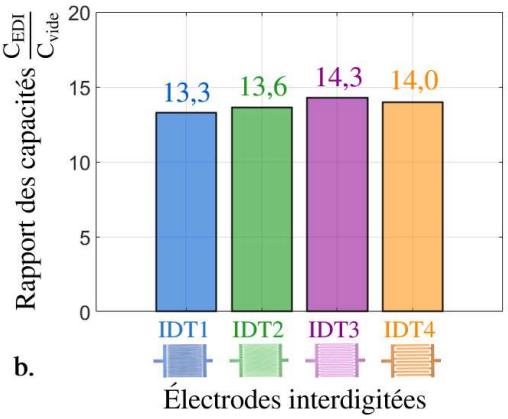
La Figure IV-18 présente les valeurs de capacité C_{EDI} extraites en présence d'EDI ainsi que le rapport C_{EDI} / C_{vide} pour chaque géométrie. Les rapports expérimentaux s'interprètent à partir des propriétés diélectriques des milieux traversés par les lignes de champ électrique. En configuration à vide, les électrodes sont en contact avec l'air et le verre du substrat. En présence d'EDI, l'air est remplacé par l'eau, dont la permittivité relative est plus élevée. Le rapport théorique, explicité à l'Équation IV-2, de l'ordre de 13,8, est cohérent avec les valeurs expérimentales.

$$\frac{C_{EDI}}{C_{vide}} = \frac{\epsilon_{r,EDI} + \epsilon_{r,verre}}{\epsilon_{r,air} + \epsilon_{r,verre}} \approx \frac{78+5}{1+5} = 13{,}8$$

Équation IV-2 : Rapport des capacités en présence d'EDI et à vide.

IDT	C_{EDI}
IDT1	4,33 ± 0,09 pF
IDT2	8,44 ± 0,20 pF
IDT3	18,0 ± 0,3 pF
IDT4	37,6 ± 1,3 pF

a.



b.

Figure IV-18 : Capacités extraites en présence d'EDI et comparaison avec la configuration à vide.

(a) Tableau récapitulatif des valeurs de capacité C_{vide}, extraites sur de la capacité apparente en présence d'EDI sur l'intervalle fréquentiel $[10^5 - 10^7]$ Hz. (b) Rapports $\frac{C_{EDI}}{C_{vide}}$ pour chaque géométrie.

Caractérisation des IDT avec du milieu de culture

Le DMEM, utilisé comme milieu de culture de référence, présente une conductivité ionique bien plus élevée que l'EDI en raison de sa forte teneur en sels minéraux. Comme l'illustre la Figure IV-19 les spectres d'impédance montrent une diminution globale du module, accompagnée d'un décalage des effets capacitifs vers les hautes fréquences. La capacité de double couche électrochimique est donc nettement observable à basse fréquence, contrairement à l'effet capacitif associé à la permittivité de l'eau.

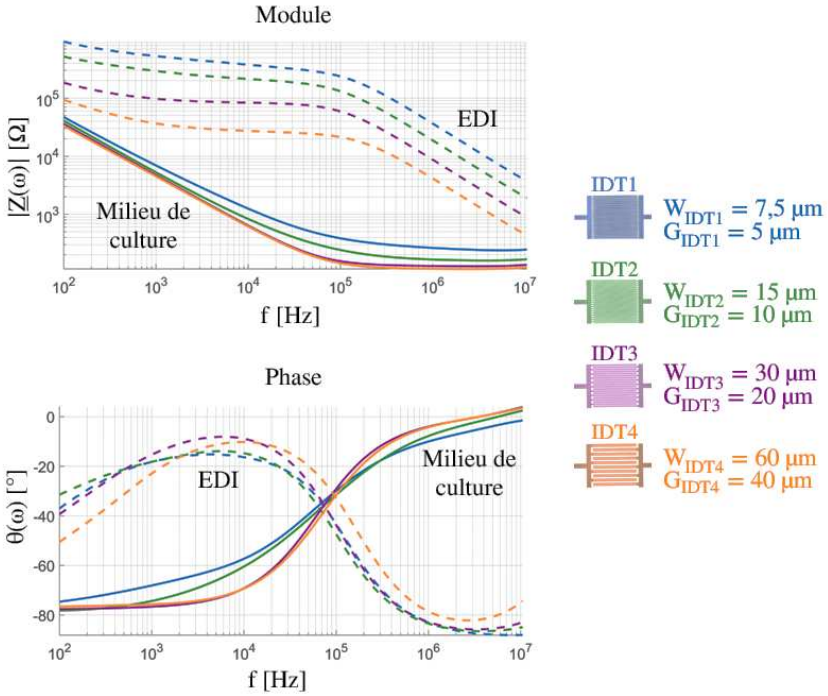


Figure IV-19 : Diagramme de Bode des IDT avec du milieu de culture.

Pertinence de la compensation des effets parasites du banc de mesure

Une analyse des contributions parasites du banc de mesure est disponible en Annexe G. Dans la plage de fréquences et d'impédances correspondant aux conditions expérimentales, l'erreur relative introduite reste inférieure à 1 %. Des écarts plus importants (> 1 %) n'apparaissent qu'à très haute fréquence (> 1 MHz) et pour des impédances faibles (< 100 Ω), conditions qui ne concernent pas les capteurs étudiés. Il est ainsi conclu qu'une compensation systématique n'est pas nécessaire ; les mesures sont donc exploitées sans correction, sauf mention contraire.

IV.2.B - Évaluation de la profondeur de penetration des IDT et mise en relation avec la hauteur des tapis cellulaires

La compréhension de l'interaction entre le champ électrique généré par les IDT et les tissus biologiques repose sur deux paramètres essentiels : la profondeur de pénétration du champ et l'épaisseur réelle des tapis cellulaires. Leur mise en relation est abordée ici au moyen de simulations par éléments finis et de mesures topographiques par AFM.

Simulation par éléments finis de la profondeur de pénétration des IDT

La profondeur de pénétration du champ électrique généré par les IDT correspond à la distance dans le milieu au-delà de laquelle l'intensité du champ devient négligeable. Elle détermine le volume effectif sondé par la mesure d'impédance et conditionne ainsi la capacité des IDT à interroger l'intégralité d'une monocouche cellulaire et de son environnement immédiat, comme la couche de mucus. Elle est évaluée par des simulations numériques réalisées avec COMSOL Multiphysics® (COMSOL AB, Suède).

Le système est modélisé par une goutte de milieu de culture déposée sur un réseau d'IDT en platine, comme illustré en Figure IV-20 pour le cas de l'IDT4. La goutte est représentée par un demi-disque de rayon 5 mm : ce rayon est choisi volontairement beaucoup plus grand que la profondeur maximale du champ électrique généré par les électrodes, de sorte que les lignes de champ restent confinées dans la goutte et que les effets de bord n'affectent pas la simulation. Les électrodes, modélisées sous forme de doigts métalliques interdigités, sont alternativement définies comme portées à la masse ou à un potentiel fixé, ce qui génère un champ électrique périodique. Les largeurs, espacements et nombres de doigts sont adaptés à chaque géométrie d'IDT étudiée (IDT1 à IDT4). Du fait de la grande longueur des doigts par rapport à leur largeur et à leur espacement, le problème est invariant selon l'axe longitudinal. Il est donc réduit à une

modélisation 2D dans le plan (x, z), ce qui simplifie les calculs tout en conservant la représentativité physique. Les équations sont résolues en régime stationnaire afin d'obtenir la distribution spatiale de la densité de courant dans le domaine liquide.

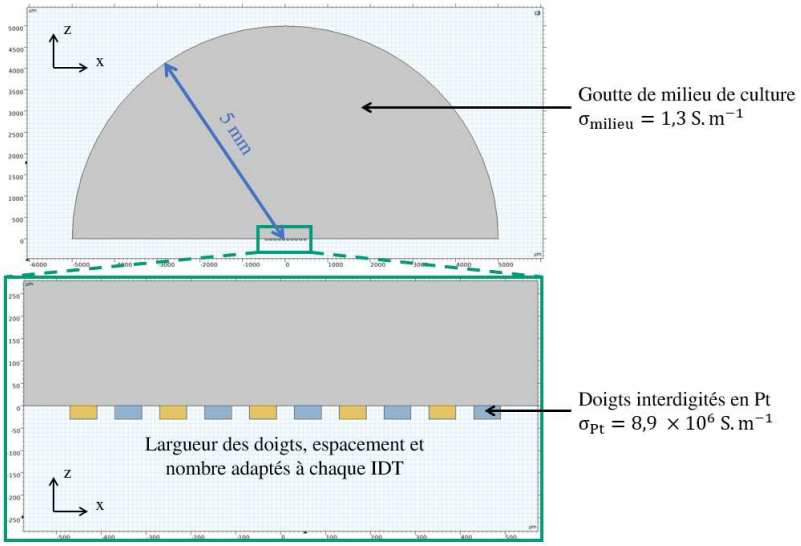


Figure IV-20 : Modèle numérique 2D pour la détermination de la profondeur de pénétration, cas de l'IDT4.

La norme de la densité de courant $|\vec{J}(x,z)|$ est exportée pour traitement sous MATLAB (MathWorks, États-Unis). Une fenêtre d'analyse est définie dans les coordonnées [-500 ; 500] µm en x et [0 ; 300] µm en z, afin de concentrer l'étude sur la région située au-dessus des électrodes (z = 0). Puis, pour chaque hauteur z, la norme de la densité de courant est moyennée suivant l'axe x, ce qui permet d'obtenir la densité de courant moyenne transversale notée $J_{moy}(z)$, qui décrit l'évolution en profondeur de l'intensité du champ électrique. Les résultats sont représentés en Figure IV-21, pour les quatre IDT.

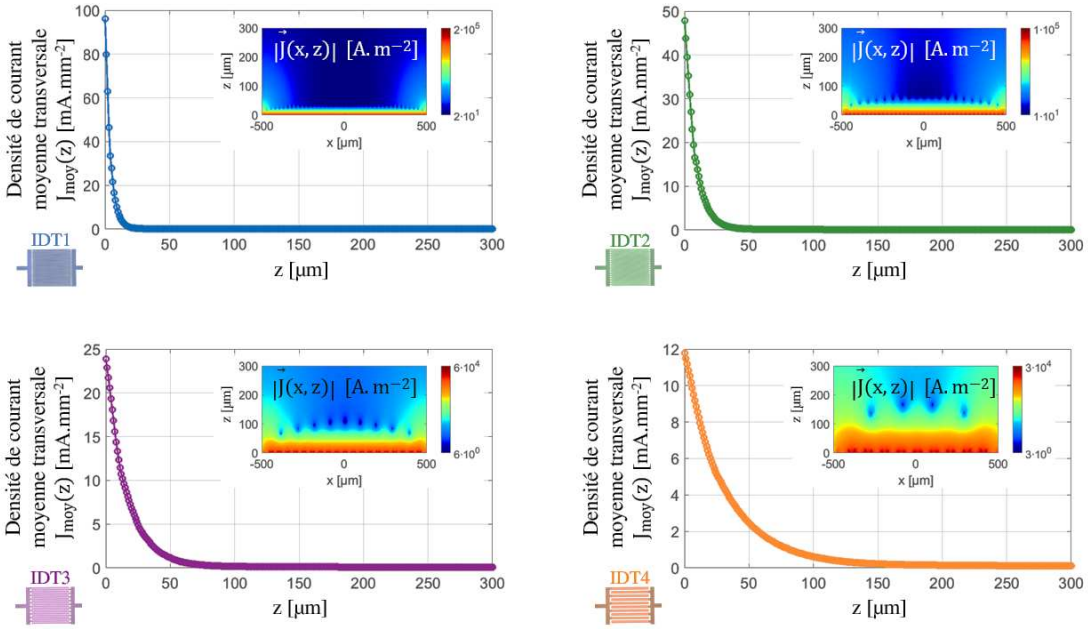


Figure IV-21 : Densité de courant moyenne transversale et cartographies associées pour les IDT.

Évolution de la densité de courant moyenne transversale en [mA. mm^{-2}] en fonction de la distance y en [µm] à partir de la surface des électrodes (fixée en y = 0 µm). Chaque tracé correspond à une géométrie d'IDT (IDT1 à IDT4), avec des couleurs associées aux schémas des électrodes. Les insertions présentent les cartographies bidimensionnelles de la norme de la densité de courant $\left|\vec{J}(x, y)\right|$ en $\left[A. m^{-2}\right]$.

La densité de courant moyenne transversale $J_{moy}(z)$ décroît de manière exponentielle avec la distance à l'électrode. Les profils transversaux s'ajustent à une loi exponentielle décroissante avec un coefficient de détermination $R^2 > 0,99$ pour toutes les géométries ($R^2_{IDT1} = 0,9985$; $R^2_{IDT2} = 0,9988$; $R^2_{IDT3} = 0,9987$; $R^2_{IDT4} = 0,9977$), ce qui confirme la validité de ce modèle.

Afin de relier la décroissance exponentielle à une mesure quantitative de la pénétration du champ, une fonction de répartition normalisée est introduite. Cette fonction R(z) exprime la fraction du courant total injecté par l'IDT qui évolue dans la couche comprise entre la surface des électrodes (z = 0) et une profondeur z donnée. La Figure IV-22 illustre l'évolution de R(z) pour chaque IDT.

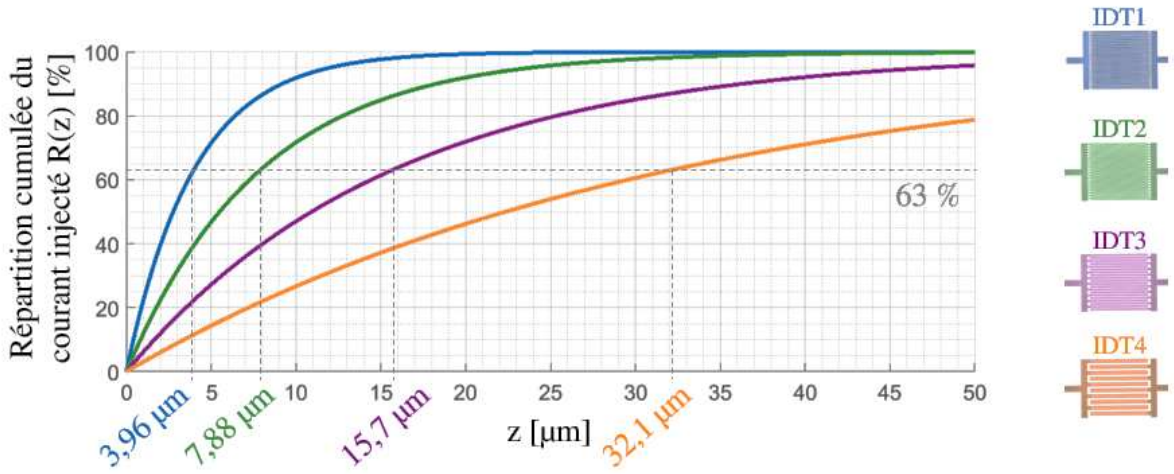


Figure IV-22 : Répartition cumulée du courant injecté de chaque IDT.

La profondeur de pénétration effective est définie comme la valeur p_{eff} telle que $R(p_{efff}) = 63$ %. Elle croît avec la période des électrodes : elle vaut 3,96 µm pour l'IDT1, 7,88 µm pour l'IDT2, 15,7 µm pour l'IDT3 et 32,1 µm pour l'IDT4. Ainsi, p_{eff} dépend de la géométrie des électrodes.

Les valeurs simulées de p_{eff} peuvent être confrontées aux prédictions théoriques issues de la littérature. Deux définitions complémentaires de la profondeur de pénétration sont généralement rapportées. La première, d'origine purement électrique, définit la profondeur théorique comme la demi-période spatiale des électrodes : $p_{th,97\%} = W + G$ [215], correspondant à la distance contenant 97 % du champ électrique [288], [289]. Elle vaut 12,5 µm, 25 µm, 50 µm et 100 µm pour les IDT1 à IDT4. Toutefois, pour les applications biologiques, une définition plus restrictive est souvent privilégiée, fondée sur un seuil de 63 % du champ électrique, qui correspond à la zone où l'interaction électrode-milieu est la plus significative. Les profondeurs théoriques associées $p_{th,63\%}$ deviennent respectivement 3,56 µm, 7,12 µm, 14,3 µm et 28,5 µm.

Les profondeurs simulées représentent ainsi $0{,}3 \cdot p_{th,97\%}$ et $1{,}1 \cdot p_{th,63\%}$. Cette double comparaison met en évidence que les simulations ne valident pas la définition purement géométrique à 97 %, mais coïncident étroitement avec la définition à 63 %, plus adaptée aux systèmes biologiques. Cette proportionnalité, observée pour toutes les géométries, confirme la robustesse des valeurs simulées et leur cohérence avec les prédictions analytiques. Ainsi, tandis que la définition à 97 % fournit une borne supérieure du champ électrique, la définition à 63 % décrit plus fidèlement la zone effectivement sondée par le dispositif dans un contexte expérimental réel.

Détermination de la hauteur des tapis épithéliaux

Afin de déterminer quelles géométries d'électrodes correspondent le mieux à l'investigation des tapis cellulaires, il est nécessaire de connaître leur épaisseur réelle. Cette information est obtenue par des mesures de topographie en AFM, réalisées dans des conditions expérimentales proches de celles utilisées pour la spectroscopie d'impédance.

Des lamelles de verre sont soigneusement nettoyées à l'acétone avec du papier optique, puis rincé à l'isopropanol. Ensuite, elles sont recouvertes par pulvérisation cathodique d'une couche d'adhésion de tantale (Ta) suivie d'un dépôt de platine (Pt), selon les mêmes paramètres de microfabrication que ceux employés pour la réalisation des IDT. Ces substrats en platine servent de support à la culture cellulaire. Certaines zones de la surface sont masquées à l'aide de ruban adhésif de manière à conserver des régions de substrat nu servant de référence de hauteur. Des cellules épithéliales HT29-MTX y sont ensuite ensemencées à une densité de 3,5 $\times$ 10^5 cellules/cm², correspondant à la densité de référence utilisée dans l'ensemble du travail. Les cultures sont maintenues avec un changement quotidien de milieu de culture, du DMEM complet. Après deux jours de culture, elles sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde (PFA, 4 %) pendant 40 minutes à température ambiante. Après fixation, les adhésifs de masquage sont retirés afin d'exposer les zones de substrat de référence. Les échantillons sont ensuite rincés deux fois dans de l'eau déionisée (EDI) afin d'éliminer les résidus salins susceptibles d'altérer la mesure puis séchés. Puis, ils sont analysés par AFM (Park Systems, Corée du Sud) en mode non-contact : les résultats sont disponibles en Figure IV-23.

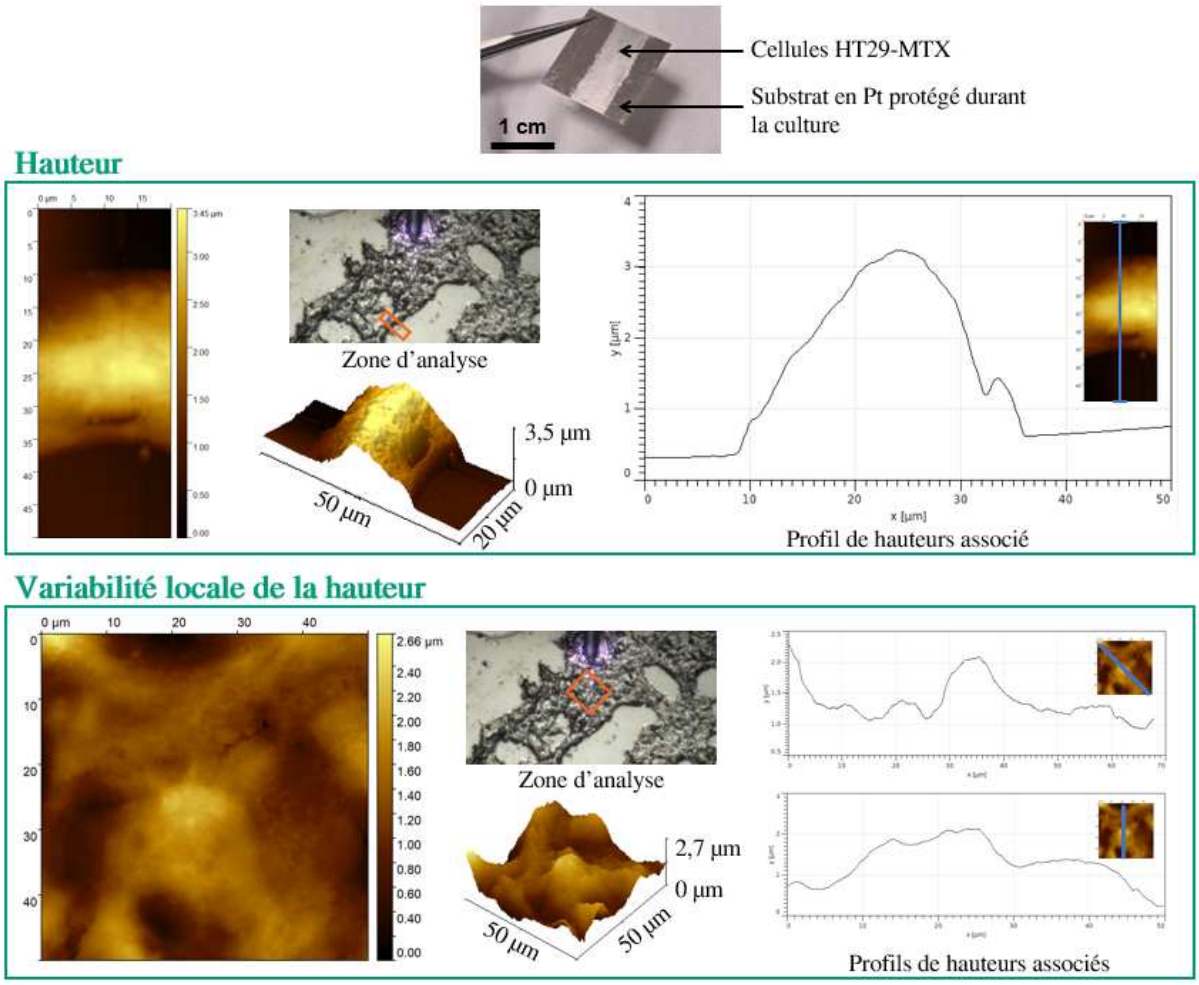


Figure IV-23 : Caractérisation topographique des tapis cellulaires HT29-MTX par microscopie à force atomique.

Les cellules HT29-MTX sont cultivées sur un substrat de platine, dont certaines zones sont protégées durant la culture afin de servir de référence de hauteur. En haut, hauteur moyenne du tapis cellulaire. La topographie AFM et le profil associé permettent de déterminer l'épaisseur apparente par comparaison avec le substrat nu. En bas, variabilité locale de la hauteur. L'analyse de zones de tapis cellulaire met en évidence une topographie irrégulière.

L'expérience met en évidence l'adhésion directe des cellules épithéliales sur le platine, malgré l'inertie chimique de ce métal généralement défavorable à l'attachement spontané. L'observation par AFM de tapis homogènes confirme que les cellules colonisent efficacement le Pt sans traitement préalable, garantissant que les mesures d'impédance, réalisées par la suite, reflètent bien la réponse cellulaire et non celle du milieu environnant. Si nécessaire, une fonctionnalisation de surface à la fibronectine pourrait être envisagée pour renforcer l'adhésion.

L'AFM fournit deux types de mesures complémentaires. L'analyse d'une cellule isolée sur le substrat permet d'estimer directement son épaisseur, mesurée ici à 3,45 µm. À l'inverse, sur un tapis cellulaire continu, le substrat n'est plus visible et l'information accessible concerne la variabilité locale de la surface : elle est caractérisée par une rugosité RMS de 355 nm, reflétant la variabilité topographique des tapis cellulaires. Cette rugosité reflète l'hétérogénéité

de l'organisation cellulaire et doit être prise en compte pour décrire l'épaisseur réelle du tapis. En combinant ces deux approches, l'épaisseur moyenne des tapis cellulaires cultivés sur Pt est estimée à $h_{cellule} = 3{,}5 \pm 0{,}4$ µm.

Ces résultats constituent une première estimation de l'épaisseur des tapis cellulaires dans les conditions de culture utilisées (HT29-MTX sur Pt, 2 jours). Pour améliorer la robustesse et la représentativité de la valeur $h_{cellule}$, il serait pertinent de compléter ces mesures sur d'autres modèles biologiques, tels que les lignées Caco-2 ou des cocultures Caco-2 : HT29-MTX au ratio 9:1, ainsi que sur différents substrats (verre et substrat interdigité alternant verre et Pt) et pour des temps de culture plus longs. Néanmoins, la valeur obtenue par cette première approche reste cohérente avec les observations histologiques de cultures sur membranes poreuses fonctionnalisées, cultivées pendant 21 jours, présentées en Figure IV-11, qui indiquent une épaisseur de tapis comprise entre 3 et 4 µm, à laquelle s'ajoute une couche de mucus d'environ 2 µm d'épaisseur.

À partir des fonctions de répartition cumulée R(z) de chaque IDT, le courant injecté transitant dans la zone correspondant à l'épaisseur cellulaire peut être déterminé. Les valeurs obtenues sont : $R_{IDT1}(h_{cellule}) = 58 \pm 4$ %, $R_{IDT2}(h_{cellule}) = 36 \pm 3$ %, $R_{IDT3}(h_{cellule}) = 20 \pm 2$ % et $R_{IDT4}(h_{cellule}) = 10 \pm 1$ %. L'IDT1 apparaît donc comme la géométrie la plus adaptée pour cibler spécifiquement la couche épithéliale.

En tenant compte d'une couche de mucus supplémentaire ($h_{mucus} = 2$ µm), les fractions atteignent 75 %, 50 %, 29 % et 16 % pour les IDT1 à IDT4 respectivement. La contribution spécifique du mucus, obtenue par soustraction, est $R_{IDT1}(h_{mucus}) = 17$ %, $R_{IDT2}(h_{mucus}) = 14$ %, $R_{IDT3}(h_{mucus}) = 9$ % et $R_{IDT4}(h_{mucus}) = 6$ %. Ainsi, les géométries IDT1 et IDT2 sont non seulement les plus sensibles à la couche cellulaire, mais également les plus pertinentes pour sonder la couche de mucus qu'elle sécrète, ce qui valide leur pertinence pour l'étude des tapis épithéliaux. À l'inverse, les géométries IDT3 et IDT4, caractérisées par une profondeur d'investigation plus importante, sondent majoritairement le milieu extracellulaire environnant, ce qui les rend davantage adaptées à l'analyse globale du microenvironnement que de la couche cellulaire elle-même.

IV.2.C - DETERMINATION DU FACTEUR DE FORME

Le facteur de forme, noté k, est une constante géométrique qui dépend de la configuration des électrodes. Dans le cas d'IDT, il est déterminé par la largeur W, la longueur L et l'espacement G des doigts, le nombre total de doigts N, ainsi que par la surface active exposée au liquide [290]. En théorie, k devrait rester indépendant de la nature de l'électrolyte, pour autant que celui-ci se comporte comme un conducteur homogène et isotrope [291], [292]. Dans la pratique cependant, l'existence de phénomènes électrochimiques à l'interface

électrode-électrolyte peut en altérer la valeur apparente [291], [293], d'où la nécessité de combiner une approche théorique par simulations numériques et une validation expérimentale dans des conditions représentatives des applications biologiques.

Facteur de forme issu de simulations numériques

Les facteurs de formes déterminés par simulations numériques sont : $k_{simulé,IDT1} = 19{,}4\ m^{-1}$, $k_{simulé,IDT2} = 38{,}5\ m^{-1}$, $k_{simulé,IDT3} = 77{,}2\ m^{-1}$ et $k_{simulé,IDT4} = 164\ m^{-1}$. Chaque passage d'une géométrie à la suivante entraîne un doublement de $k_{simulé}$, conformément aux prédictions géométriques. Ces valeurs se situent dans l'ordre de grandeur rapporté pour des électrodes interdigitées micrométriques [294], confirmant la pertinence du modèle numérique. Les détails de la modélisation sont présentés en Annexe H.

Détermination expérimentale du facteur de forme

Les valeurs simulées du facteur de forme constituent un cadre de référence idéal, mais doivent être confrontées aux mesures expérimentales, afin de tenir compte des effets électrochimiques susceptibles d'altérer la réponse des électrodes. Une validation expérimentale est donc nécessaire afin de confronter ces prédictions aux conditions pratiques rencontrées lors des mesures en milieu biologique.

Le milieu de culture DMEM complémenté en SVF, utilisé dans les expériences cellulaires, constitue à priori la solution de référence. Toutefois, sa composition est complexe (glucose, acides aminés, sels, vitamines, indicateur de pH, etc.) et peut varier selon les lots, ce qui compromet sa reproductibilité [295]. De plus, il est instable dans le temps : il est sensible aux contaminations microbiologiques, peut se dégrader rapidement en l'absence de stérilité et perd ses propriétés initiales après quelques jours seulement [295]. Ces contraintes pratiques le rendent inadapté comme solution de référence pour l'étalonnage du facteur de forme.

La conductivité du milieu complet est néanmoins mesurée à l'aide de la cellule liquide 16452A (Keysight Technologies®, États-Unis), donnant $\sigma_{milieu} = 1{,}3\ S.m^{-1}$ à 20 °C. Pour reproduire cette valeur dans des conditions maîtrisées et stables, une série de solutions de NaCl dans de l'eau désionisée est préparée, couvrant une gamme étendue de concentrations allant de 0,3 g/L à 18 g/L.

Les conductivités des solutions étalons sont d'abord mesurées avec la cellule liquide Keysight 16452A, garantissant une calibration précise des électrolytes. Ces solutions sont ensuite utilisées pour la détermination expérimentale du facteur de forme des électrodes interdigitées. Chaque solution est déposée dans un puits en PDMS centré sur la zone active des IDT et la réponse fréquentielle est enregistrée à l'aide de l'impédancemètre E4990A (Keysight Technologies®, États-Unis). L'analyse consiste à identifier le plateau résistif. Dans cette zone,

la résistance parallèle R_p est extraite et le facteur de forme expérimental est alors calculé : $k_{exp} = \sigma_{solution} \times R_p$.

Les résultats expérimentaux sont présentés en Figure IV-24. Aux fortes conductivités, les valeurs de k_{exp} sont nettement supérieures à celles issues des simulations. Lorsque la concentration en NaCl diminue, k_{exp} décroît et se rapproche progressivement des prédictions numériques, certaines configurations devenant comparables aux résultats simulés. Dans ce régime dilué, les rapports géométriques entre configurations successives convergent également vers le facteur 2 attendu.

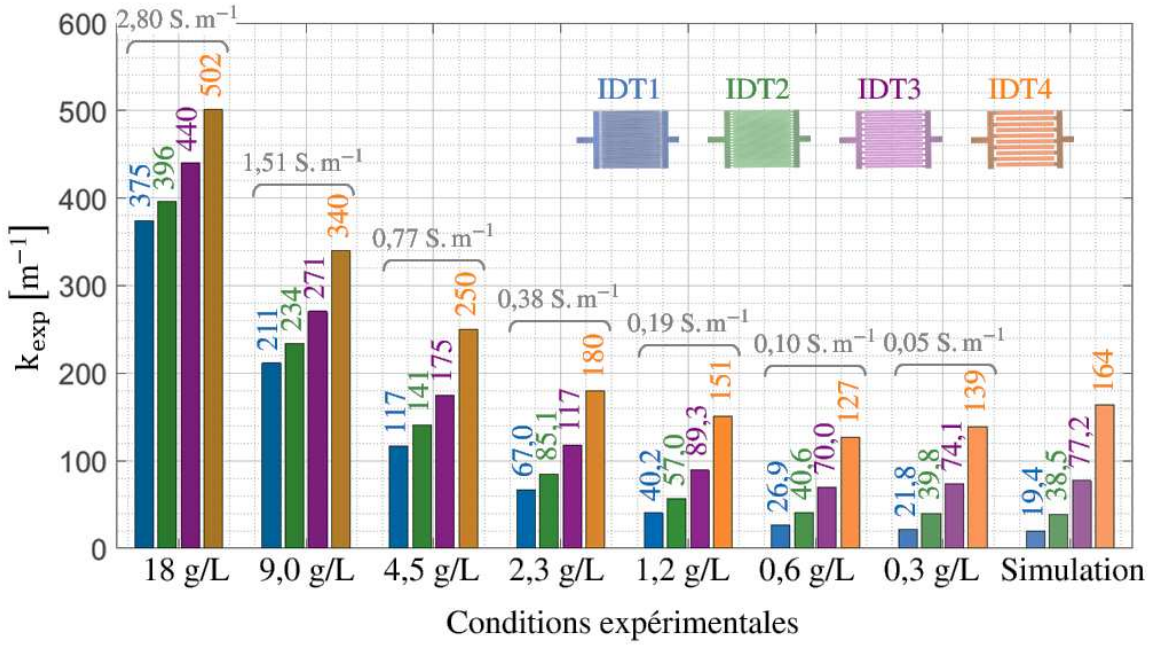


Figure IV-24 : Évolution du facteur de forme expérimental en fonction de la concentration en NaCl et comparaison avec les valeurs simulées.

Facteurs de forme expérimentaux (k_{exp}) obtenus pour les quatre géométries d'électrodes interdigitées (IDT1 en bleu, IDT2 en vert, IDT3 en violet IDT4 en orange). Les solutions de NaCl couvrent une gamme de concentrations de 18 g/L à 0,3 g/L, correspondant à des conductivités, indiquées en gris, comprises entre 2,80 et 0,05 S. m^{-1}. Les valeurs simulées sont indiquées à droite pour comparaison.

Ces résultats confirment que les simulations décrivent correctement le comportement des électrodes pour de faibles conductivités, tandis que des écarts significatifs apparaissent en solution fortement ionique [291], [293]. Ces écarts s'expliquent par des phénomènes électrochimiques absents du modèle numérique : la formation d'une double couche à l'interface électrode-électrolyte, qui accroît la résistance mesurée, et la redistribution du champ électrique, renforcée par la forte densité ionique, qui réduit la profondeur de pénétration et le volume effectivement sondé [293], [291].

Les simulations constituent donc une référence utile mais incomplète, nécessitant une calibration expérimentale dans des conditions proches de l'application réelle. Dans la suite, les valeurs obtenues avec la solution à 9,0 g/L de NaCl ($\sigma_{9,0\ g/L} = 1,5\ S.m^{-1}$) sont retenues comme référence, car elles reflètent le comportement effectif des électrodes dans un milieu de conductivité comparable à celui du DMEM complet ($\sigma_{milieu} = 1,3\ S.m^{-1}$). Ainsi : $k_{IDT1} = 211\ m^{-1}$, $k_{IDT2} = 234\ m^{-1}$, $k_{IDT3} = 271\ m^{-1}$ et $k_{IDT4} = 340\ m^{-1}$.

IV.2.D - Application de la spectroscopie d'impedance pour le suivi de cultures cellulaires intestinales

La spectroscopie d'impédance constitue une approche non invasive et sensible pour sonder les propriétés électriques de systèmes biologiques. Afin d'établir la validité et la pertinence de cette méthode pour le suivi en temps réel de cultures épithéliales intestinales dans un intestin-sur-puce, une démarche progressive a été adoptée. Dans un premier temps, la comparaison entre électrolyte pur et suspension cellulaire permet de mettre en évidence les bases fréquentielles de la détection. Cette observation est ensuite validée expérimentalement à l'aide d'un système modèle simple, constitué de levures boulangères, dont la sédimentation fournit une première preuve de concept de la capacité des électrodes interdigitées à détecter des cellules vivantes. Dans un second temps, l'analyse est étendue à des modèles plus complexes et physiologiquement pertinents, afin d'évaluer la capacité de la spectroscopie d'impédance à suivre l'évolution d'un tapis cellulaire épithélial. Enfin, l'effet de la densité initiale d'ensemencement est étudié afin d'identifier les réponses électriques associées à des conditions extrêmes.

L'Annexe I présente un rappel des différences fondamentales de réponse fréquentielle entre un électrolyte pur et un milieu biologique, servant de base d'interprétation aux analyses qui suivent.

IV.2.D.a - Validation préliminaire par suivi de sédimentation de levures boulangères

La validation préliminaire repose sur l'étude d'une suspension de levures boulangères par spectroscopie d'impédance. Cette approche, simple à mettre en œuvre, permet d'évaluer la capacité des électrodes interdigitées à détecter les modifications de la réponse fréquentielle induites par la présence de matériel biologique. Elle constitue ainsi une première preuve de concept du fonctionnement du dispositif, avant l'exploration de modèles cellulaires plus complexes.

Les levures boulangères (Saccharomyces cerevisiae) sont des micro-organismes eucaryotes unicellulaires de 5 à 10 µm de diamètre. Leur cytoplasme conducteur est délimité par une membrane plasmique, comme dans les cellules épithéliales intestinales, ce qui leur confère une réponse électrique représentative. Leur utilisation comme système modèle se justifie par plusieurs atouts. Elles sont non pathogènes et disponibles sous forme sèche, pouvant être facilement réhydratées avant utilisation. Elles ne requièrent pas de conditions de culture contraignantes et peuvent survivre dans des solutions simples, y compris de l'eau pendant la durée des mesures. Leur robustesse, associée à leur caractère non adhérent, en font un modèle approprié pour une première validation du dispositif.

Le protocole expérimental consiste à réhydrater des levures boulangères lyophilisées dans un milieu liquide, puis à transférer un volume de 200 µL de la suspension obtenue dans un puits en PDMS disposé sur les IDT. Les mesures de spectroscopie d'impédance sont réalisées à l'aide de l'impédancemètre E4990A (Keysight Technologies®, États-Unis). Une acquisition toutes les minutes est réalisée par LabVIEW (National Instruments®, États-Unis). Les données brutes sont ensuite exportées et traitées sous MATLAB (MathWorks, États-Unis).

Lorsque le DMEM complet est utilisé comme solution de réhydratation, les spectres obtenus correspondent à ceux d'un électrolyte pur et ne révèlent aucune signature cellulaire. Cette absence de contribution s'explique par la présence d'amphotéricine B (0,025 % v/v), systématiquement ajoutée au DMEM complet comme antifongique dans les protocoles de culture cellulaire. Les levures perdent ainsi leur viabilité dans ce milieu, ce qui empêche toute détection spécifique par spectroscopie d'impédance. Afin d'éviter cet effet, l'eau du robinet est utilisée comme milieu de suspension.

Comme illustré schématiquement en Figure IV-25, les cellules s'accumulent progressivement au fond du puits sous l'effet de la gravité. Cette redistribution augmente la concentration cellulaire au voisinage des électrodes et modifie la réponse fréquentielle. La Figure IV-26 présente l'évolution du module $|\underline{Z}(\omega, t)|$ et de la phase $\theta(\omega, t)$ de l'impédance mesurée au cours de la sédimentation des levures boulangères.

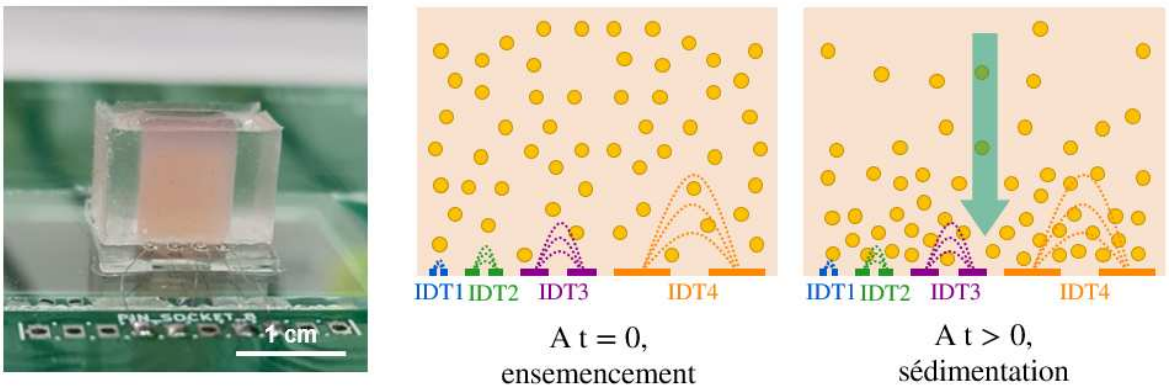


Figure IV-25 : Principe du suivi de la sédimentation des levures boulangères.

À gauche : Photographie du puits en PDMS positionné sur les électrodes interdigitées (IDT1–IDT4), rempli d'une suspension concentrée de levures boulangères. Au centre : Schéma de la situation au temps initial : les cellules sont réparties de manière homogène dans le volume du puits. À droite : schéma de la sédimentation des levures boulangères (t>0) : la sédimentation entraîne une accumulation progressive des cellules au voisinage des électrodes. Les pointillés représentent les lignes de champ électrique générées par les IDT.

La sensibilité de la mesure dépend directement de la profondeur de pénétration effective du champ électrique associée à chaque géométrie. Pour l'IDT1 ($p_{eff,IDT1}$ = 3,96 µm), le champ reste confiné à l'extrême surface. Dans ce régime, les levures non adhérentes ne sont pas détectées de manière stable, ce qui explique que la courbe ne montre pratiquement aucune variation. À l'opposé, les électrodes de plus grande dimension, IDT3 ($p_{eff,IDT3}$ = 15,7 µm) et IDT4 ($p_{eff,IDT4}$ = 32,1 µm), sondent un volume plus important. Leur réponse est dominée par les redistributions tardives liées à l'accumulation massive de levures au fond du puits, tandis que les variations initiales restent limitées. L'IDT2 ($p_{eff,IDT2}$ = 7,88 µm) présente un comportement intermédiaire. Son spectre suit une évolution comparable à ceux des IDT3 et IDT4, traduisant la détection d'une couche cellulaire suite à la sédimentation. Cette variation apparaît dès les premiers instants, révélant une sensibilité aux couches proches de la surface.

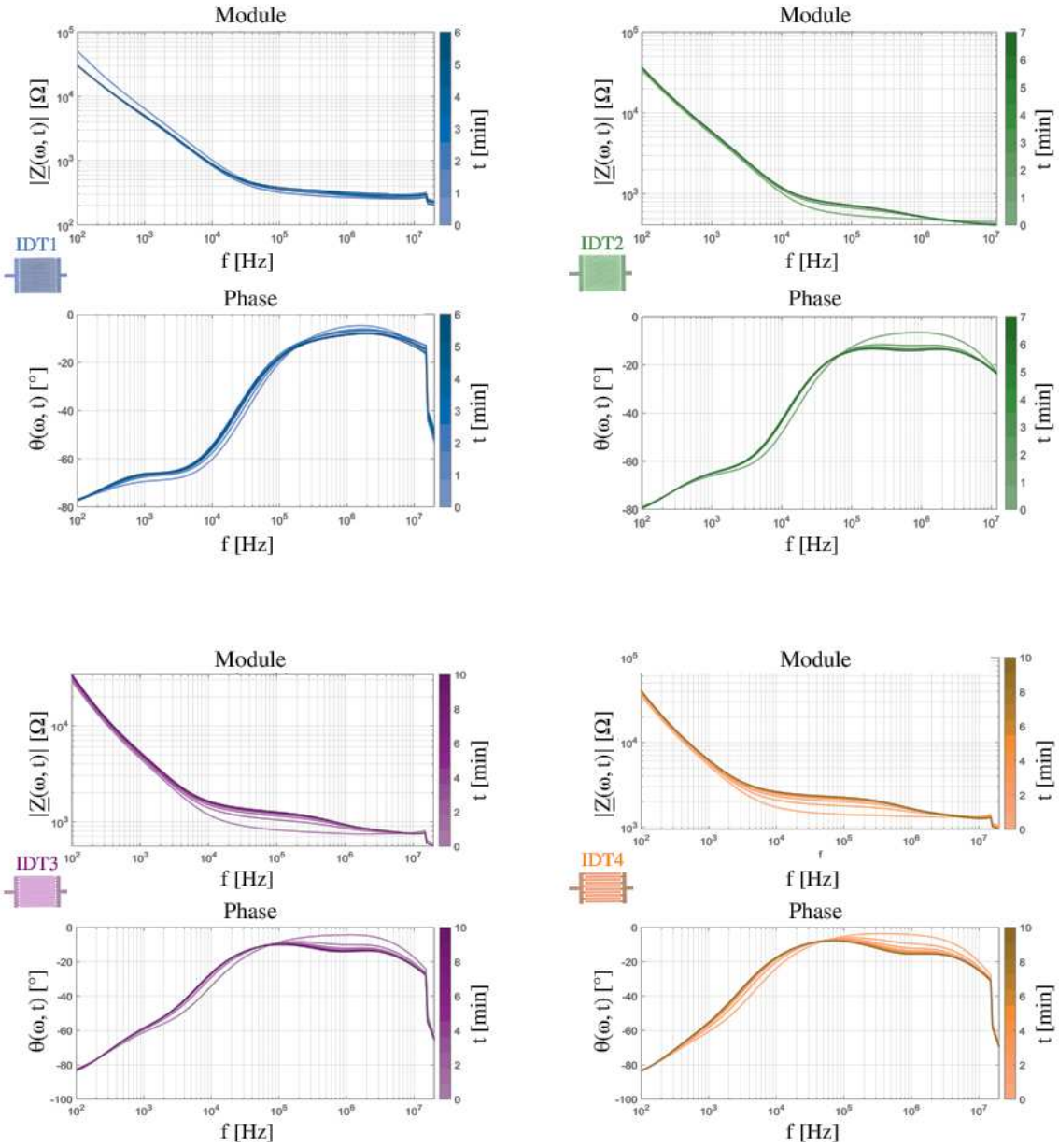


Figure IV-26 : Évolution temporelle de l'impédance complexe au cours de la sédimentation de levures boulangères sur l'ensemble des IDT.

Module $\left|\underline{Z}(\omega,t)\right|$ et phase $\theta(\omega,t)$ de l'impédance mesurée en fonction de la fréquence et du temps pour les quatre électrodes (IDT1 à IDT4). Les échelles de couleur indiquent la progression temporelle des acquisitions. Les variations observées dépendent de la géométrie des électrodes, les IDT de plus grande dimension sondant un volume plus important et montrant une sensibilité accrue aux phénomènes de sédimentation.

La Figure IV-27 présente l'évolution fréquentielle du module $\left|\underline{Z}(\omega,t)\right|$ et de la phase $\theta(\omega,t)$ sur la plage fréquentielle $\left[5\times10^{4};1\times10^{7}\right]$ Hz. Les fréquences inférieures à 5×10^{4} Hz sont écartées en raison de l'effet prédominant de la double couche électrochimique, tandis que celles supérieures à 1×10^{7} Hz sont dominées par la permittivité de l'eau et par des résonances instrumentales.

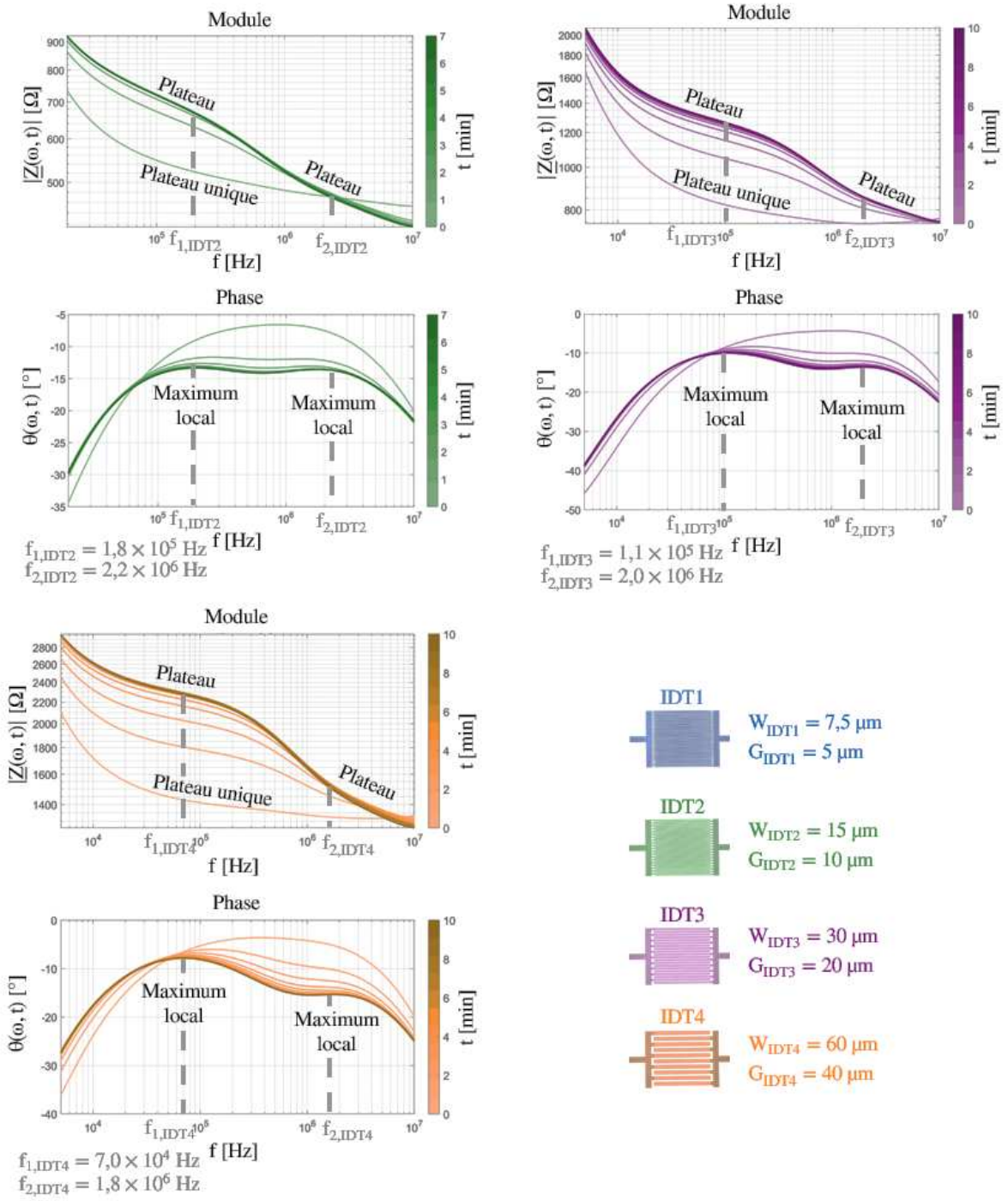


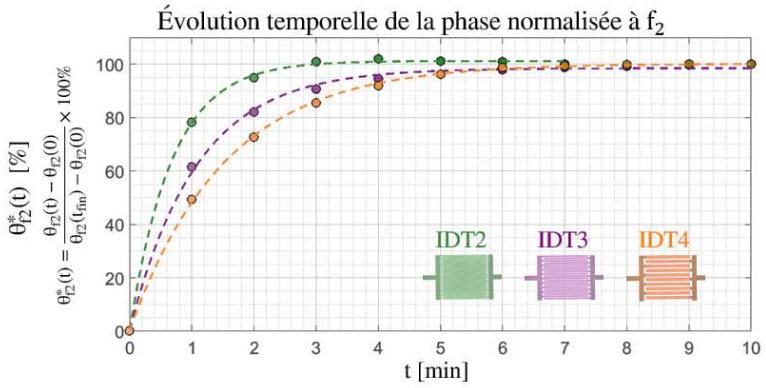
Figure IV-27 : Identification des plateaux caractéristiques l'impédance complexe au cours de la sédimentation de levures boulangères sur IDT3 et IDT4.

Module et phase de l'impédance mesurée pour les deux électrodes (IDT3 en haut, IDT4 en bas) en fonction de la fréquence et du temps (échelle de couleur). L'évolution temporelle met en évidence la sédimentation progressive de la levure boulangère, qui se traduit par l'apparition de plateaux caractéristiques dans le module ainsi que par deux maximums locaux de la phase.

Au temps initial, correspondant à l'ensemencement, les cellules sont uniformément réparties dans le volume du puits. Leur concentration au voisinage immédiat des électrodes est

négligeable, ce qui se traduit par un plateau unique dans le module $|\underline{Z}(\omega, 0)|$ typique d'un électrolyte pur. Au cours du temps, la sédimentation entraîne une accumulation progressive des levures au voisinage des électrodes. Le spectre évolue vers l'apparition de deux plateaux successifs dans le module $|\underline{Z}(\omega, t)|$ et de deux maximums locaux dans la phase $\theta(\omega, t)$. Le premier plateau est observé aux fréquences intermédiaires, à $f_{1,IDT2} = 1{,}8 \times 10^5$ Hz, $f_{1,IDT3} = 1{,}1 \times 10^5$ Hz et $f_{1,IDT4} = 7{,}0 \times 10^4$ Hz. Il correspond à un régime dans lequel la membrane cellulaire impose une barrière capacitive : le courant circule dans les espaces extra- et paracellulaires. Puis, entre f_1 et f_2, la capacité membranaire domine la réponse. Enfin, le second apparaît à hautes fréquences ($f_{2,IDT2} = 2{,}2 \times 10^6$ Hz, $f_{2,IDT3} = 2{,}0 \times 10^6$ Hz et $f_{2,IDT4} = 1{,}8 \times 10^6$ Hz) : le champ électrique traverse les membranes et interroge simultanément les compartiments intra- et extracellulaires.

Ces différences qualitatives entre IDT sont confirmées par l'analyse cinétique, disponible en Figure IV-28, qui permet de quantifier la rapidité de la réponse. L'évolution temporelle de la phase normalisée à f_2 est correctement décrite par un ajustement exponentiel, ce qui permet d'extraire les constantes de temps caractéristiques. Les valeurs obtenues ($\tau_{IDT2} = 0{,}68$ min, $\tau_{IDT3} = 1{,}09$ min et $\tau_{IDT4} = 1{,}53$ min) révèlent une hiérarchie nette : l'IDT2 présente la cinétique la plus rapide, tandis que les électrodes de plus grande période répondent plus lentement. Ces résultats confirment que l'IDT2 combine une détection précoce des premières couches avec une évolution finale comparable à celle des IDT3 et IDT4.



Fit exponentiel

$\theta^*_{f2}(t) = 100 \times \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right)$

IDT	Temps caractéristique τ	R^2
IDT2	0,679 min	0,999
IDT3	1,09 min	0,998
IDT4	1,53 min	0,999

Figure IV-28 : Dynamique temporelle de la phase normalisée à f_2.

Les données expérimentales (points) ont été indépendamment normalisées pour chaque IDT. Les courbes sont ajustées par un modèle exponentiel (lignes pointillées). Les valeurs de la constante de temps τ et le coefficient de détermination R^2 sont indiqués dans le tableau. L'IDT2 présente la réponse la plus rapide ($\tau_{IDT2} = 0{,}68$ min), suivi de l'IDT3 ($\tau_{IDT3} = 1{,}09$ min) et de l'IDT4 ($\tau_{IDT4} = 1{,}53$ min).

Globalement, l'apparition de ces signatures fréquentielles confirme la présence de cellules vivantes en suspension. Leur détection par les IDT démontre que le dispositif permet d'identifier des cellules vivantes dans un milieu conducteur. Cette première validation expérimentale établit la preuve de concept et ouvre la voie à l'étude de modèles biologiques plus complexes.

IV.2.D.b - Suivi de tapis épithéliaux intestinaux par spectroscopie d'impédance

Après l'étude sur cellules en suspension, l'analyse s'étend à des tapis épithéliaux intestinaux. Une coculture de Caco-2 : HT29-MTX (9:1) est mise en place, utilisée comme modèle de barrière intestinale appliqué à l'étude des MICI dans l'intestin-sur-puce. Le suivi de ces cultures adhérentes par spectroscopie d'impédance permet ainsi d'évaluer la capacité du dispositif à caractériser des processus dynamiques liés à l'adhésion et à l'organisation cellulaire.

La mise en œuvre de ce modèle nécessite cependant des conditions expérimentales spécifiques, adaptées à la culture prolongée de cellules adhérentes et au suivi non-invasif en temps réel. Le protocole expérimental établi pour l'ensemencement, l'incubation et l'acquisition des mesures est détaillé ci-après.

- **Nettoyage pré-expérience**. Avant chaque expérience, les dispositifs sont entièrement démontés (électrodes, supports, PCB, vis, puits en PDMS et lamelles de verre). Tous les composants, ainsi que les outils de manipulation (tournevis, pinces), sont nettoyés à l'éthanol à 70 % puis au Mycoplasma Off® (Minerva Biolabs, Allemagne). La stérilisation est réalisée sous hotte à flux laminaire par exposition aux UV pendant 30 min, les pièces étant retournées pour un second cycle de 30 min afin d'assurer une exposition homogène. Le remontage est effectué en conditions stériles. Les dispositifs assemblés sont placés dans l'incubateur MCO-18AC (Sanyo, Japon) à 37°C afin d'être stabilisés en température avant utilisation.

- **Préparation de la solution de cellules**. Les expériences sont menées sur une coculture de cellules épithéliales intestinales : Caco-2 (90 %, passage 15) et HT29-MTX (10 %, passage 56). Les cellules sont préparées selon un protocole standard : rinçage du tapis cellulaire au PBS, détachement enzymatique par trypsine-EDTA, inactivation par milieu complet, centrifugation et remise en suspension. Après comptage, la suspension est ajustée à $3{,}5 \times 10^5$ cellules/mL dans du DMEM complet. Cette suspension est conservée dans l'incubateur jusqu'à l'utilisation.

- **Mesures préalables**. Les mesures sont réalisées avec un impédancemètre MFIA (Zurich Instruments, Suisse) piloté par le logiciel LabOne®. Les paramètres de mesure sont fixés à une plage fréquentielle de 50 Hz à 5 MHz, avec 201 points par balayage et une tension d'excitation de 100 mV. Plusieurs mesures de référence sont réalisées : court-circuit, circuit ouvert et, de manière systématique, la caractérisation à vide de chaque électrode afin de vérifier sa capacité intrinsèque. Enfin, un spectre est enregistré en présence du milieu de culture seul (DMEM complet préchauffé à 37 °C).

- **Suivi en continu**. Un volume de 200 µL de solution cellulaire est déposé dans chaque puits, correspondant à une densité cellulaire de $3{,}5 \times 10^5$ cellules/cm² sur une surface de 0,20 cm². Le puits est recouvert d'une lamelle de verre afin de limiter l'évaporation du milieu de culture. Les acquisitions sont automatisées grâce au logiciel AutoHotkey (AutoHotkey Foundation LLC, États-Unis), avec une mesure toutes les 30 min et un enregistrement au format .csv avec sauvegarde automatique. Le milieu de culture est renouvelé une fois par jour.

- **Nettoyage post-expérience**. À la fin du suivi, les cellules sont détachées du substrat par incubation avec 200 µL de trypsine-EDTA pendant 20 min. Des rinçages dynamiques sont ensuite réalisés afin de renforcer l'action de cisaillement et d'assurer un détachement efficace. L'opération est répétée deux à trois fois jusqu'à disparition complète du tapis cellulaire, vérifiée par observation microscopique. Tous les éléments du dispositif sont ensuite démontés, nettoyés à l'éthanol 70 % puis au Mycoplasma Off® et stérilisés aux UV pour réutilisation.

Le suivi de la coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) est réalisé sur l'IDT1. En effet, les analyses préalables montrent que les IDT3 et 4 ne permettent pas de caractériser efficacement l'interface cellule-substrat en raison de leur profondeur de pénétration trop importante. L'IDT2 peut sonder à la fois la surface et une couche plus épaisse, mais son signal reste moins spécifique. L'IDT1 se révèle adaptée à l'étude de l'extrême surface, qui correspond ici à la couche de cellules épithéliales intestinales adhérentes. Cette géométrie est donc choisie pour évaluer directement la sensibilité du dispositif aux phénomènes d'adhésion et d'organisation de ce tapis cellulaire.

La réponse fréquentielle brute enregistrée pendant 65 h présente des contributions parasites aux basses et hautes fréquences, liées respectivement à la capacité de double couche électrochimique et à l'inductance des câbles coaxiaux. Ces effets, décrits et corrigés en détail en Annexe J, réduisent la plage de fréquences exploitable. La compensation appliquée supprime ces artefacts et élargit la fenêtre fréquentielle utile, ce qui permet d'analyser plus finement l'évolution de l'impédance au cours du suivi cellulaire.

Pour extraire des signatures représentatives de l'activité cellulaire, les impédances compensées peuvent être visualisées sous forme de variations relative du module et absolue de la phase, par rapport à la condition sans cellule. Les représentations tridimensionnelles de la Figure IV-29 permettent de suivre simultanément l'évolution temporelle et fréquentielle de la réponse électrique et de faire émerger des zones où l'influence des cellules est la plus marquée. L'analyse de la phase met en évidence deux domaines distincts, centrés respectivement en $f_1 = 4{,}1 \times 10^4$ Hz et en $f_2 = 1{,}2 \times 10^6$ Hz.

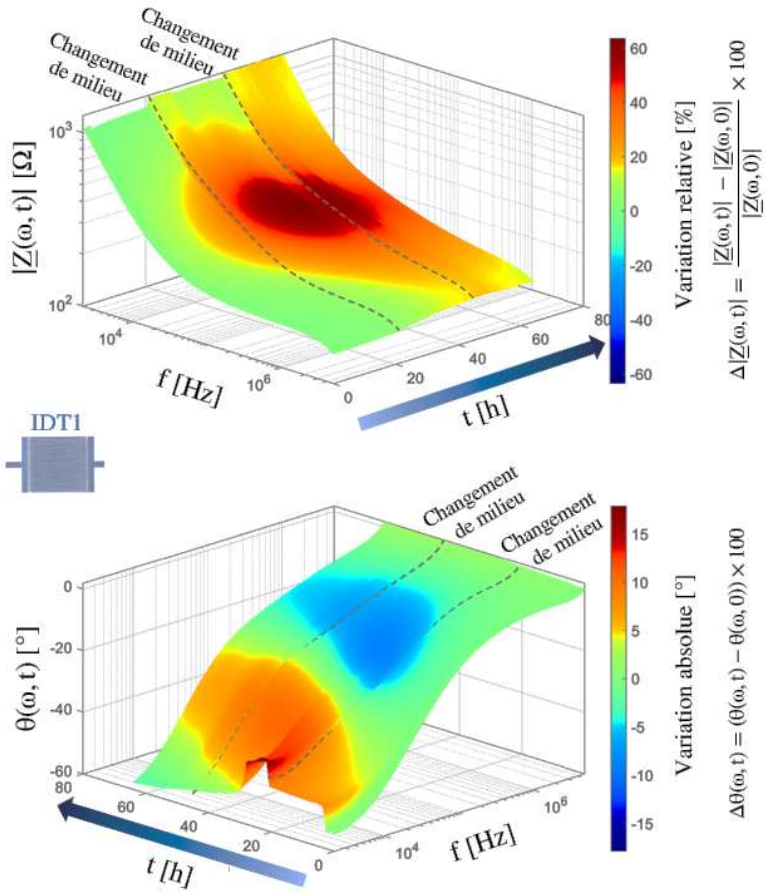


Figure IV-29 : Visualisation 3D de la variation temporelle relative du module et de variation absolue de la phase de l'impédance lors du suivi d'une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) sur l'IDT1 pendant 65 h.

Évolution du module (haut) et de la phase (bas) de l'impédance compensée, représentées sous forme de surfaces 3D en fonction de la fréquence et du temps. La plage fréquentielle analysée est : $[5 \times 10^3;\ 5 \times 10^6]$ Hz. La couleur de la surface indique la variation par rapport à la condition sans cellules, renseignée en $t = 0$. L'expression de la variation relative du module est : $\Delta|\underline{Z}(\omega,t)| = \frac{|\underline{Z}(\omega,t)| - |\underline{Z}(\omega,0)|}{|\underline{Z}(\omega,0)|} \times 100$. La phase étant proche de zéro, une variation relative n'est pas pertinente car elle conduirait à des valeurs divergentes. Sa variation est donc exprimée de manière absolue : $\Delta\theta(\omega,t) = \big(\theta(\omega,t) - \theta(\omega,0)\big) \times 100$. Les pointillés gris indiquent les temps des changements de milieu de culture, réalisés après 21 h et 45 h d'incubation.

La conductivité apparente $\sigma(\omega,t)$ est calculée, à l'aide du facteur de forme k, selon l'Équation IV-3. Elle traduit les mesures d'impédance en propriétés électriques effectives du système, en reflétant la facilité de passage du courant à travers les espaces extra- et paracellulaires puis, à plus haute fréquence, au travers des membranes vers les compartiments intracellulaires.

$$\sigma(\omega, t) = k \cdot G(\omega, t) = k \cdot \Re \quad \frac{1}{\underline{Z}(\omega, t)}$$

Équation IV-3 : Conductivité apparente.

Avec :

$\sigma(\omega,t)$	la conductivité apparente du milieu sondé, en [S·m⁻¹].
k	le facteur de forme de l'électrode, en [m⁻¹].
$G(\omega,t)$	la conductance mesurée, en [S].
$\underline{Z}(\omega, t)$	l'impédance complexe mesurée, en [Ω] ;

La Figure IV-30 présente la réponse fréquentielle sous ses représentations usuelles, à savoir son module $|\underline{Z}(\omega, t)|$, sa phase $\theta(\omega, t)$ et sa conductivité apparente $\sigma(\omega, t)$, afin de visualiser la position des fréquences caractéristiques f_1 et f_2 identifiées.

La réponse fréquentielle du DMEM complet sans cellules, à $t = 0$, présente l'allure caractéristique d'un électrolyte pur. La conductivité apparente moyenne, calculée entre $2{,}2 \times 10^5$ et $2{,}7 \times 10^6$ Hz, est $\sigma_{milieu,37°C} = 1{,}19 \pm 0{,}03$ S. m^{-1}, qui correspond à la conductivité du milieu complet à 37°C. À titre de comparaison, une mesure antérieure réalisée à 20 °C donne $\sigma_{milieu,20°C} = 1{,}3$ S. m^{-1}. Comme la conductivité ionique croît avec la température, une valeur plus élevée est attendue à 37 °C qu'à 20 °C. L'écart observé peut s'expliquer par la variabilité de composition des DMEM et SVF. La valeur obtenue doit donc être considérée comme spécifique des lots utilisés plutôt que comme une constante universelle.

Au cours du suivi, la réponse fréquentielle s'écarte du milieu de référence et traduit progressivement l'influence des cellules vivantes. À $f_1 = 4{,}1 \times 10^4$ Hz, l'augmentation de $|\underline{Z}(f_1, t)|$, l'inflexion de $\theta(f_1, t)$ et baisse de $\sigma(f_1, t)$ traduisent l'effet capacitif des membranes et la restriction des voies de conduction extra- et paracellulaires. À $f_2 = 1{,}2 \times 10^6$ Hz, courant franchit la barrière membranaire et la mesure reflète la conductivité combinée du milieu extracellulaire et du cytoplasme.

L'analyse est affinée en suivant les paramètres normalisés $|\underline{Z}|_{norm}(t)$ et $\sigma_{norm}(t)$ [193], [194]. Et, $\Delta\sigma(t) = |\sigma_{norm,f1}(t) - \sigma_{norm,f2}(t)|$ exprime l'écart entre les deux plateaux fréquentiels. Son augmentation reflète l'augmentation de la confluence de la monocouche et le renforcement de l'effet barrière, tandis que sa diminution peut résulter d'une perte de polarisation membranaire, d'un relâchement des jonctions serrées ou d'une perte de viabilité cellulaire. $\Delta\sigma(t)$ constitue ainsi un indicateur global de l'intégrité épithéliale, intégrant à la fois les propriétés membranaires individuelles et l'organisation intercellulaire.

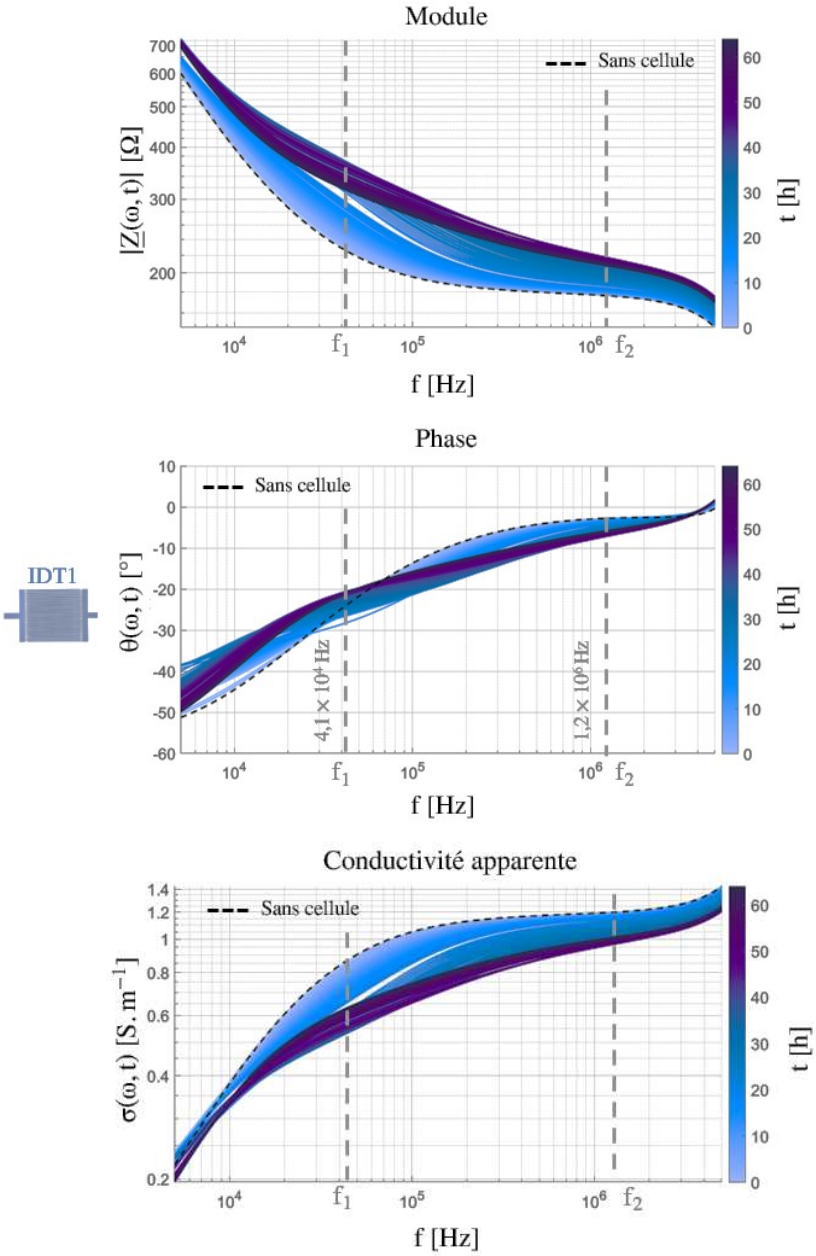


Figure IV-30 : Évolution fréquentielle de l'impédance et de la conductivité apparente lors du suivi d'une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) sur l'IDT1 pendant 65 h.

Le module $|\underline{Z}(\omega,t)|$, la phase $\theta(\omega,t)$ et la conductivité apparente $\sigma(\omega,t)$ sont représentés en fonction de la fréquence et du temps, évoluant du bleu clair à t = 0 h au violet foncé à t = 65 h. La courbe en tiret noir correspond à la référence sans cellules. Deux fréquences caractéristiques apparaissent, symbolisées par des pointillés verticaux : en $f_1 = 4{,}1 \times 10^4$ Hz, associée au passage du courant dans les espaces extra- et paracellulaires, et $f_2 = 1{,}2 \times 10^6$ Hz, correspondant à la traversée de la membrane cellulaire par le courant et à l'accès simultané aux compartiments intra- et extracellulaires.

La Figure IV-31 illustre l'évolution des paramètres normalisés :

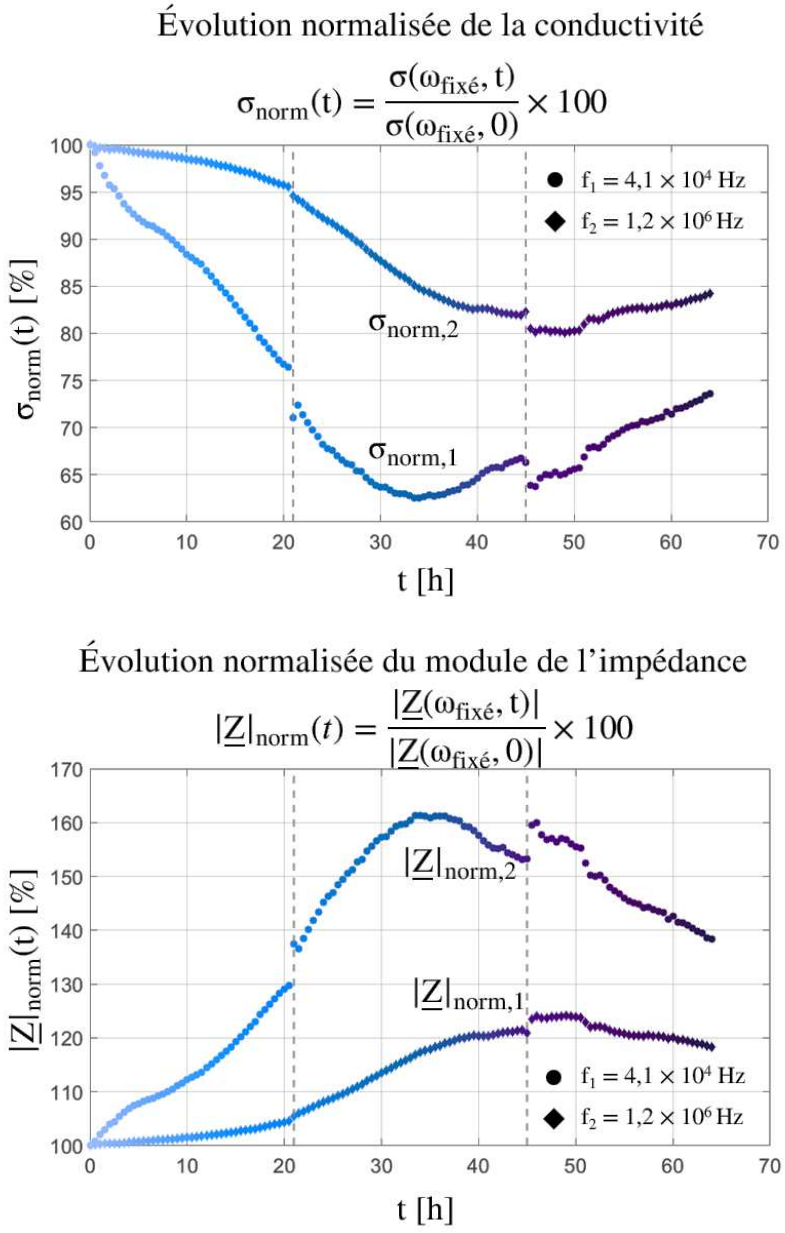


Figure IV-31 : Évolution temporelle de la conductivité apparente normalisée et du module de l'impédance normalisé aux fréquences caractéristiques lors du suivi d'une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) sur l'IDT1.

La conductivité apparente normalisée $\sigma_{norm}(t)$ (en haut) et le module de l'impédance normalisé $|\underline{Z}|_{norm}(t)$ (en bas) sont représentés en fonction du temps pour les deux fréquences caractéristiques. Les cercles indiquent la réponse à en $f_1 = 4{,}1 \times 10^4$ Hz et les losanges celles à $f_2 = 1{,}2 \times 10^6$ Hz. Les lignes pointillées verticales correspondent aux changements de milieu réalisés à 21 h et 45 h.

Au cours des 10 premières heures, $|\underline{Z}|_{norm,f1}$ augmente légèrement tandis que $\sigma_{norm,f1}$ décroît progressivement, ce qui traduit la sédimentation et l'adhésion initiale.

Entre 10 et 32 h, l'augmentation de $|\underline{Z}|_{norm,f1}$ pour atteindre environ 160 %, tandis que $\sigma_{norm,f1}$ atteint un minimum voisin de 63 %. $\Delta\sigma$ atteint sa valeur maximale. Cette phase correspond à la croissance du tapis cellulaire : les cellules s'étalent, se densifient et établissent des jonctions intercellulaires, conférant à la monocouche une capacité isolante maximale. À f_2, le courant traverse les cellules et circule à la fois dans le milieu extracellulaire et dans le cytoplasme, dont la conductivité est plus faible que celle du milieu pur [296]. La densification cellulaire accroît donc la proportion de cytoplasme traversé, ce qui diminue $\sigma_{norm,f2}$ et augmente $|\underline{Z}|_{norm,f2}$.

Au-delà de 32 h, $|\underline{Z}|_{norm,f1}$ décroît légèrement tandis que $\sigma_{norm,f1}$ remonte progressivement. Cette évolution ne traduit pas nécessairement une dégradation de l'intégrité de la barrière épithéliale, mais peut au contraire correspondre à une étape de différenciation avancée du tapis cellulaire. En effet, des comportements très similaires ont été récemment rapportés par Venz *et al.* dans une étude d'impédance à haute résolution spatiale sur des monocultures de Caco-2 ensemencées à une densité (4×10^5 cellules. cm^{-2}), proche de celle utilisée ici pour la coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) à $3{,}5 \times 10^5$ cellules. cm^{-2}. Dans leur étude, l'augmentation initiale de l'impédance, associée à la prolifération et à la formation des jonctions serrées, est suivie d'une diminution progressive corrélée à la formation de structures tridimensionnelles appelées dômes, comme illustré en Figure IV-32 [297]. Ces dômes résultent de la polarisation des cellules épithéliales, qui activent des pompes ioniques apicales induisant une accumulation de fluide sous la monocouche, provoquant son décollement localisé du substrat tout en conservant des jonctions serrées fonctionnelles. La baisse d'impédance observée est alors attribuée à l'augmentation de la distance électrode-cellules, et non à une perte de viabilité ou à une rupture de la barrière [297]. Ici, les tendances observées sont qualitativement cohérentes avec ce mécanisme : la remontée progressive de la conductivité apparente après 32 h peut ainsi refléter une réorganisation tridimensionnelle du tapis épithélial plutôt qu'un relâchement des jonctions intercellulaires. Bien que la présence des cellules HT29-MTX et la sécrétion de mucus puissent moduler la dynamique exacte de formation de ces structures, la similarité des densités cellulaires et des signatures électriques suggère que des phénomènes analogues de polarisation et de soulèvement local de la monocouche sont susceptibles d'intervenir également dans notre système.

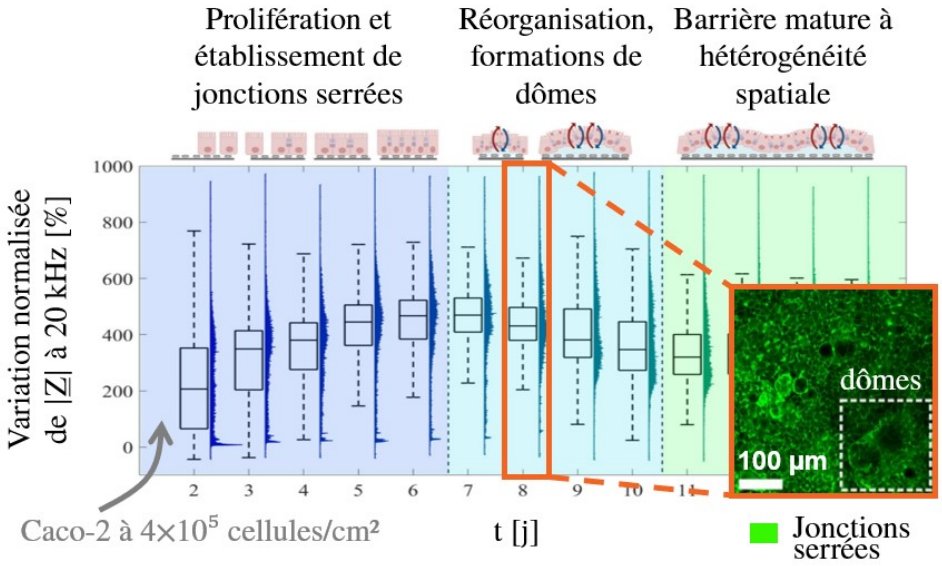


Figure IV-32 : Évolution temporelle de l'impédance normalisée de cellules Caco-2 et corrélation avec la formation de dômes tridimensionnels [297].

Variation normalisée de $|Z|_1$ au cours de 14 jours de culture de cellules Caco-2 (4×10^5 cellules. cm^{-2}) sur microélectrodes haute densité. Trois phases sont identifiées : (i) prolifération et formation de la barrière épithéliale bidimensionnelle, (ii) apparition de domes tridimensionnels associée à une diminution progressive de l'impédance, et (iii) barrière mature présentant une hétérogénéité spatiale marquée. Les images confocales associées montrent l'expression des jonctions serrées (ZO-1) et la présence de structures en dôme corrélées aux zones de diminution locale d'impédance.

Cette hypothèse de réorganisation morphologique de la monocouche est compatible avec l'observation finale d'un tapis cellulaire continu et homogène en contraste de phase, recouvrant uniformément l'ensemble de la zone active des électrodes interdigitées, disponible en Figure IV-33.

Pour compléter cette interprétation basée sur les signatures électriques, une observation morphologique du tapis cellulaire est réalisée en fin d'expérience. L'image en contraste de phase, disponible en Figure IV-33, montre qu'à ce stade la coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) forme un tapis homogène recouvrant l'électrode. Cette observation confirme l'adhésion et l'expansion du tapis cellulaire, en cohérence avec l'augmentation de l'impédance et la diminution de la conductivité observées au cours des premières dizaines d'heures. En revanche, une telle imagerie bidimensionnelle ne permet pas de visualiser d'éventuelles réorganisations tridimensionnelles localisées, telles que la formation transitoire de dômes, qui se traduisent principalement par un soulèvement local du tapis cellulaire plutôt que par une rupture de continuité. Un suivi morphologique temporel à haute résolution, idéalement par microscopie confocale en coupe optique, couplé aux mesures d'impédance, permettrait d'identifier directement ces structures tridimensionnelles et de corréler leur apparition aux variations de conductivité apparente observées après 32 h.

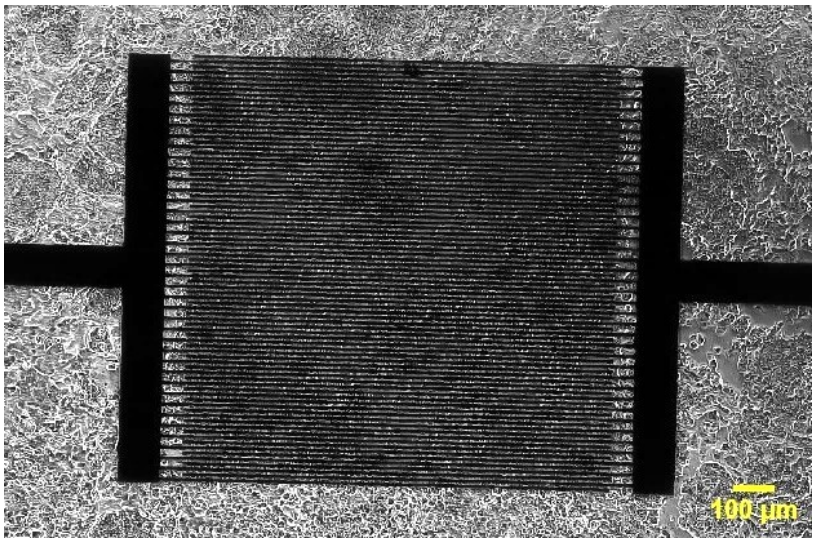


Figure IV-33 : Observation en contraste de phase de la coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) recouvrant la zone active des électrodes interdigitées après 65 h de culture sur IDT1.

Image en contraste de phase montrant une monocouche épithéliale continue et homogène formée par la coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) sur l'électrode interdigitée IDT1. Les cellules recouvrent uniformément l'ensemble de la surface active sans zones de décollement visibles, indiquant une adhésion stable et une confluence élevée du tapis cellulaire à ce stade de culture (barre d'échelle : 100 µm).

Cette étude démontre que la spectroscopie d'impédance, appliquée à l'électrode IDT1, permet de suivre sur une durée de 65 h l'évolution d'une coculture épithéliale intestinale Caco-2 : HT29-MTX (9:1). Les mesures mettent en évidence une succession d'étapes caractéristiques : une phase initiale d'adhésion, une densification et une organisation progressive de la monocouche, puis une légère décroissance de l'impédance après environ 32 h. À la lumière de travaux récents sur des monocultures de Caco-2 à densité comparable, cette dernière phase peut être interprétée non comme une dégradation de la barrière, mais comme une réorganisation morphologique avancée associée à la formation de structures tridimensionnelles de type dômes, résultant de la polarisation épithéliale et du soulèvement localisé de la monocouche.

L'interprétation de ces signatures électriques nécessite toutefois d'être complétée par des approches biologiques standard. Les observations morphologiques en microscopie optique permettent d'évaluer l'organisation globale de la monocouche et son degré de compacité, mais restent insuffisantes pour détecter des réorganisations tridimensionnelles localisées. Des techniques d'imagerie volumique, telles que la microscopie confocale, seraient nécessaires pour confirmer directement la présence éventuelle de dômes dans la coculture. En parallèle, des tests de viabilité tels que l'imagerie LIVE/DEAD fournissent une quantification de la proportion de cellules vivantes et mortes, permettant de déterminer si la décroissance observée correspond à une perte de viabilité ou à une réorganisation structurelle du tapis cellulaire. L'intégration de ces données biologiques avec les mesures électrochimiques permet de renforcer l'interprétation

des signaux enregistrés et d'attribuer plus précisément les variations observées à des mécanismes cellulaires spécifiques.

Enfin, la reproductibilité des résultats doit être vérifiée par la réalisation d'au moins trois réplicats biologiques, afin de distinguer les tendances robustes des variations liées à la variabilité expérimentale et d'assurer la fiabilité des interprétations

IV.2.D.c - Détection par spectroscopie d'impédance des effets de la densité d'ensemencement

Après l'étude de la dynamique en condition standard, l'analyse est étendue à des cultures de HT29-MTX seules, en variant la densité initiale d'ensemencement. Trois conditions sont testées : la densité de référence utilisée tout au long de ce travail ($3{,}5 \times 10^5$ cellules $\cdot$ cm^{-2}), ainsi que des densités volontairement plus élevées, augmentées d'un facteur 10 ($3{,}5 \times 10^6$ cellules $\cdot$ cm^{-2}) et 100 ($3{,}5 \times 10^7$ cellules $\cdot$ cm^{-2}) Ces fortes concentrations ne correspondent pas à des conditions physiologiques mais permettent de soumettre le système à des conditions extrêmes afin de générer des réponses électriques contrastées. Sur le plan biologique, de telles densités entraînent une confluence quasi immédiate, mais peuvent induire un stress cellulaire important compromettant la viabilité. L'objectif est donc d'évaluer dans quelle mesure la spectroscopie d'impédance est capable de détecter ces effets liés à des conditions extrêmes de concentration cellulaire.

Le protocole expérimental reste identique à celui décrit précédemment, depuis le nettoyage et la stérilisation des dispositifs jusqu'au suivi en continu par spectroscopie d'impédance. Les mesures sont réalisées avec l'impédancemètre MFIA (Zurich Instruments, Suisse) et traitées sous MATLAB (MathWorks, États-Unis), en appliquant la même procédure de compensation électrochimique et en calculant la conductivité apparente normalisée à partir du facteur de forme de l'électrode.

Les évolutions de la conductivité normalisée σ_{norm} pour les trois conditions testées sont présentées en Figure IV-34.

À la densité de référence, les conductivités normalisées $\sigma_{norm,f1}$ et $\sigma_{norm,f2}$ présentent une chute abrupte durant les 2 premières heures, correspondant à la sédimentation et à l'adhésion initiale des cellules sur l'électrode. Dans les heures suivantes, une diminution progressive et continue est observée, traduisant une densification de la monocouche par prolifération cellulaire. À 72 h, aucun plateau n'est atteint. Cette évolution s'explique par le temps de doublement relativement long des HT29-MTX, estimé entre 40 et 50 h, alors qu'il est généralement plus court pour les Caco-2 (environ 30 à 35 h). Cette prolifération plus lente retarde l'atteinte d'une confluence stable et justifie l'absence de stabilisation du signal à la fin

de l'expérience. De plus, $\Delta\sigma_{max,HT29-MTX} = 23\ \%$ est similaire à $\Delta\sigma_{max,coculture} = 22\ \%$. Toutefois, cette similitude numérique ne doit pas être interprétée comme la conséquence de mécanismes équivalents. Dans la coculture, la variation de conductivité est principalement liée à l'établissement rapide d'une barrière épithéliale cohésive par les Caco-2, qui forment des jonctions serrées fonctionnelles et organisent l'architecture de la monocouche. En revanche, dans les cultures composées uniquement de HT29-MTX, l'augmentation du signal résulte surtout de la prolifération cellulaire, sans constitution d'un réseau de jonctions serrées aussi robuste. Ainsi, une amplitude similaire de $\Delta\sigma$ peut être obtenue par des mécanismes biologiques différents et à des échelles de temps distinctes.

Lorsque la densité d'ensemencement est augmentée d'un facteur dix, la dynamique des signaux électriques est modifiée. Une adhésion rapide est observée dans les premières heures ($t < 3$ h), conduisant immédiatement à une confluence de la surface disponible. Cette situation se traduit par une stabilisation rapide des conductivités normalisées, avec un $\Delta\sigma$ valant 8 % entre 3 h et 17 h. Puis, un changement brutal de tendance est observé : les conductivités normalisées augmentent rapidement et $\Delta\sigma$ diminue jusqu'à atteindre environ 3 %. Ce comportement traduit une perte progressive de cohésion de la monocouche et une déstabilisation de la barrière épithéliale. Sur le plan biologique, cette évolution est cohérente avec les contraintes imposées par la surconfluence. La compétition accrue pour les nutriments et l'oxygène, combinée à une accumulation de déchets métaboliques, induit un stress cellulaire important qui se traduit par une réduction de la viabilité.

Lorsque la densité initiale est augmentée d'un facteur cent par rapport à la condition de référence, la dynamique mesurée par spectroscopie d'impédance présente un profil encore plus extrême. Une chute initiale des conductivités est enregistrée dans les premières heures, traduisant la sédimentation et l'adhésion rapide des cellules à la surface de l'électrode. À partir de 20 h, une inversion marquée de la tendance est observée, avec une remontée progressive des conductivités normalisées, ramenant $\Delta\sigma$ à environ 1 % en fin de suivi. Sur le plan biologique, cette évolution peut être attribuée à un stress massif induit dès l'ensemencement : la compétition mécanique pour l'espace, la limitation immédiate en nutriments et en oxygène ainsi que l'accumulation de déchets métaboliques entraînent une perte rapide de viabilité. Contrairement à la condition intermédiaire ($3{,}5 \times 10^6$ cellules $\cdot$ cm^{-2}), où la monocouche reste transitoirement cohésive avant de se dégrader, la culture à $3{,}5 \times 10^7$ cellules $\cdot$ cm^{-2} ne parvient pas à établir une organisation épithéliale cohérente.

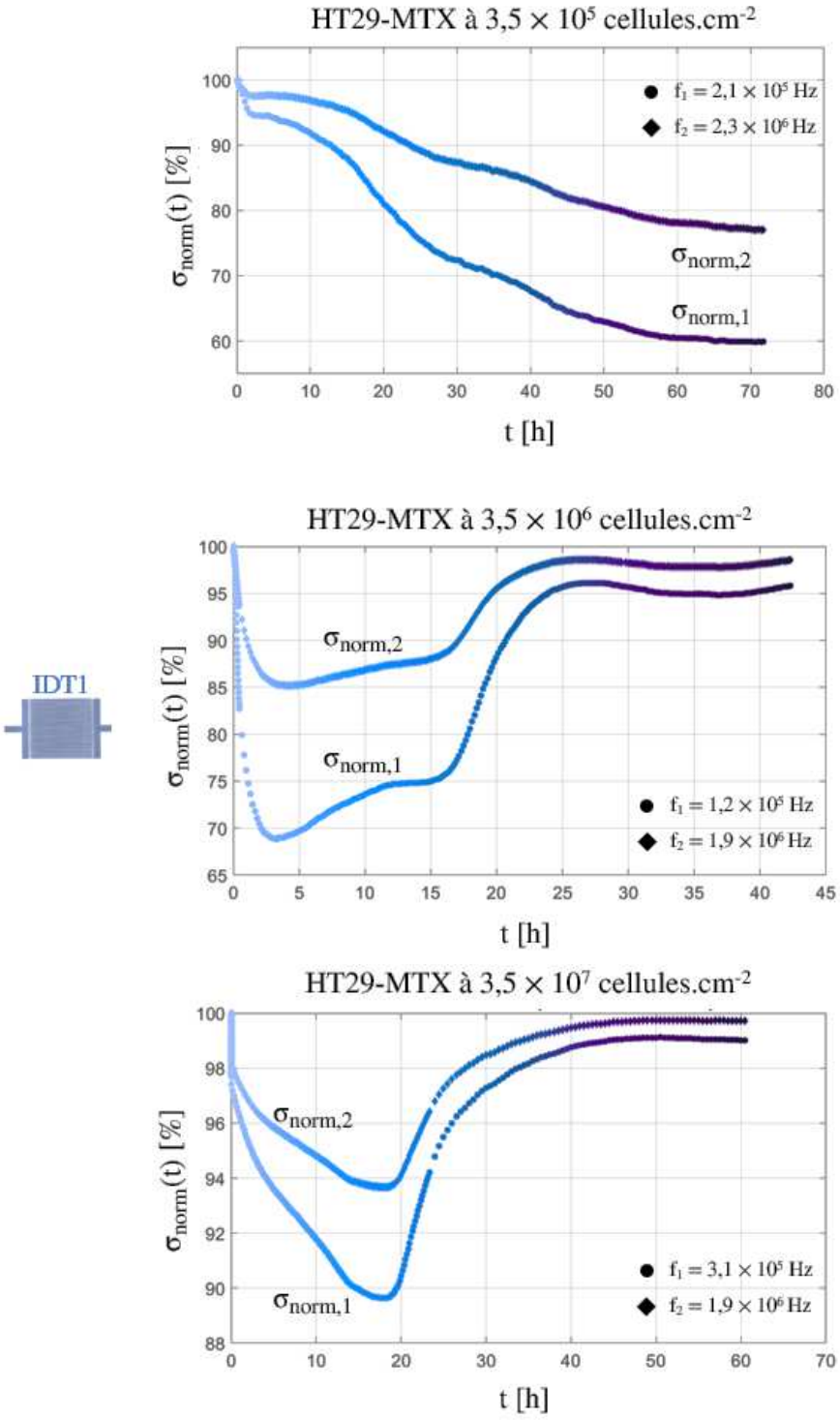


Figure IV-34 : Effet de la densité d'ensemencement sur l'évolution temporelle de la conductivité normalisée des cultures de HT29-MTX.

Évolution de $\sigma_{norm}(t)$ mesurée sur l'électrode IDT1 pour trois densités initiales : $3{,}5\times10^{5}$ cellules/cm² (en haut), $3{,}5\times10^{6}$ cellules/cm² (milieu) et $3{,}5\times10^{7}$ cellules/cm² (en bas). Les courbes correspondent aux réponses à deux fréquences caractéristiques f_1, symbolisé par des ronds, et f_2, représenté par des losanges. Les valeurs des fréquences sont indiquées dans chaque graphe.

L'ensemble des comportements observés sous forte contrainte de densité d'ensemencement trouve une justification directe dans le cadre décrit en section I.5.B.a. La littérature établit que la spectroscopie d'impédance permet de suivre successivement la formation d'un tapis cellulaire confluant puis sa désorganisation, généralement associée à l'apoptose [192], [193], [194]. La phase de croissance, caractérisée par l'adhésion, l'étalement et l'établissement de jonctions intercellulaires, se traduit par une augmentation progressive de l'impédance, tandis que la dégradation du tapis cellulaire induit une chute rapide du signal liée à la perte d'adhésion, à la rupture des jonctions et à l'altération membranaire, comme décrit à la Figure I-37 [192] et à la Figure I-38 [193]. Les signatures mesurées dans les conditions de surconfluence s'inscrivent ainsi pleinement dans ces mécanismes établis, correspondant à une accélération des phases de désorganisation décrites dans les modèles impédancemétriques classiques.

La spectroscopie d'impédance a permis de caractériser de manière fine l'impact de la densité initiale d'ensemencement sur la dynamique des cultures de HT29-MTX. À la densité de $3{,}5 \times 10^5$ cellules·cm^{-2}, le signal reflète essentiellement la prolifération progressive, alors qu'à des densités extrêmes, il révèle des scénarios distincts allant d'une confluence transitoire suivie de mortalité à une perte de viabilité quasi immédiate. Ainsi, cette approche permet de suivre l'évolution des cultures depuis la phase de croissance jusqu'à la désorganisation complète de la barrière. Ces résultats confirment la pertinence de la spectroscopie d'impédance pour le suivi en temps réel des barrières épithéliales intestinales dans l'intestin-sur-puce.

IV.3 - Conclusion

Les cocultures Caco-2 : HT29-MTX adhèrent et prolifèrent efficacement sur des membranes fonctionnalisées à la fibronectine, conduisant à la formation de monocouches confluentes. En revanche, dans les dispositifs microfluidiques, l'adhérence initiale reste faible et la prolifération limitée, aussi bien en conditions statiques que sous flux péristaltique. L'altération de la fonctionnalisation des membranes lors de l'intégration dans les puces semble limiter l'adhérence cellulaire, ce qui peut être contourné par l'utilisation de méthodes d'assemblage alternatives telles que le clamping mécanique. La présence récurrente de microbulles perturbe également le microenvironnement et empêche la formation d'un tapis cellulaire continu, problème qui peut être résolu par l'intégration d'un dispositif de débullage en amont.

La différenciation fonctionnelle des cocultures est confirmée par la sécrétion de mucus, révélée par coloration au bleu alcian après 21 jours de culture. Cette observation montre que le modèle reproduit cette caractéristique clé de l'épithélium intestinal in vivo. Cette analyse peut être complétée par le marquage des protéines de jonctions serrées des cellules Caco-2 afin de

mieux caractériser la barrière épithéliale et être étendue aux cultures microfluidiques pour tester la robustesse du phénotype dans un environnement dynamique.

La validation instrumentale repose sur la spectroscopie d'impédance, dont la sensibilité dépend étroitement des caractéristiques des électrodes. Les capacités à vide obtenues sont de 2,85 ± 0,08 pF pour IDT1, 1,28 ± 0,04 pF pour IDT2, 0,62 ± 0,02 pF pour IDT3 et 0,32 ± 0,01 pF pour IDT4.

La profondeur de pénétration, qui caractérise la capacité des électrodes interdigitées à sonder efficacement les cultures cellulaires, vaut 3,96 µm pour IDT1, 7,88 µm pour IDT2, 15,7 µm pour IDT3 et 32,1 µm pour IDT4. Ces valeurs peuvent être comparées à l'épaisseur des tapis cellulaires mesurée par AFM à 3,5 ± 0,4 µm. Ainsi, IDT1 cible principalement la monocouche, tandis qu'IDT2 inclut également la couche de mucus. En revanche, IDT3 et IDT4 sondent des volumes trop importants, ce qui réduit la spécificité du signal vis-à-vis de l'épithélium.

Le calcul des facteurs de forme des électrodes permet de convertir les mesures brutes en grandeurs électriques intrinsèques, indépendantes de la géométrie des électrodes. Les valeurs simulées, purement géométriques, sont de 19,36 m^{-1} pour l'IDT1, 38,46 m^{-1} pour l'IDT2, 77,23 m^{-1} pour l'IDT3 et 163,7 m^{-1} pour l'IDT4. Dans une solution ionique concentrée comme le milieu de culture, la formation d'une double couche électrochimique et la redistribution des lignes de champ modifient ces valeurs. L'utilisation d'une solution de NaCl à 9,0 g/L, modèle représentatif du milieu complet, conduit ainsi à des valeurs expérimentales plus élevées : 211 m^{-1} pour l'IDT1, 234 m^{-1} pour l'IDT2, 271 m^{-1} pour l'IDT3 et 340 m^{-1} pour l'IDT4 confirmant l'importance de ces effets pour une interprétation correcte des mesures en conditions biologiques.

Le suivi d'une suspension de levures boulangères fournit une première validation biologique : la sédimentation progressive des cellules entraîne l'apparition des deux plateaux caractéristiques du module et des maximums locaux de phase, signatures typiques des systèmes vivants. Ce résultat démontre la capacité des électrodes à détecter la présence de cellules et constitue une preuve de concept solide avant application à des modèles épithéliaux plus complexes.

Le suivi en temps réel d'une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) démontre ensuite la pertinence de l'approche pour interroger l'adhésion et l'organisation progressive d'un tapis cellulaire intestinal. Les spectres révèlent des phases successives d'adhésion, de densification et de réorganisation, associées à des variations spécifiques du module, de la phase et de la conductivité apparente. L'application d'une compensation électrochimique élargit la fenêtre fréquentielle utile et permet d'identifier deux fréquences caractéristiques, à 41 kHz et 1,2 MHz, respectivement associées au passage du courant dans les espaces extra- et paracellulaires et à

sa traversée membranaire. L'évolution de la réponse traduit la croissance et l'organisation de la monocouche, puis une légère décroissance après environ 32 h, suggérant une modulation de la barrière. Ces résultats sont corroborés par l'imagerie en contraste de phase, qui confirme la présence d'un tapis cellulaire homogène après 65 h.

Enfin, la variation de la densité d'ensemencement des HT29-MTX illustre la capacité de la spectroscopie d'impédance à détecter les effets de conditions extrêmes. À la densité de référence ($3{,}5 \times 10^5$ cellules $\cdot$ cm^{-2}), la réponse reflète essentiellement la prolifération lente des cellules, tandis qu' des densités élevées ($3{,}5 \times 10^6$ et $3{,}5 \times 10^7$cellules $\cdot$ cm^{-2}), les signaux traduisent respectivement une monocouche transitoire suivie d'une perte de viabilité quasi immédiate liée à la surconfluence.

Ainsi, ces travaux démontrent que la spectroscopie d'impédance constitue un outil robuste et non invasif pour le suivi en temps réel de cultures épithéliales intestinales. Les prochaines étapes consistent à associer les signatures électriques à des observations morphologiques et à des tests de viabilité, afin de relier plus directement la réponse fréquentielle aux mécanismes cellulaires, tout en renforçant la robustesse de l'approche par des réplicats biologiques. Puis, l'intégration des électrodes dans l'intestin-sur-puce ouvre la voie à un dispositif unique et instrumenté, capable de modéliser la barrière épithéliale dans un environnement biomimétique et de constituer un outil innovant pour l'étude des MICI.

Conclusion générale et perspectives

Les MICI constituent un enjeu médical et scientifique majeur. Incurables à ce jour, elles résultent d'interactions complexes entre facteurs génétiques, microbiens, environnementaux et immunitaires, qui altèrent la barrière intestinale et perturbent l'homéostasie du tube digestif. La compréhension fine de ces mécanismes reste entravée par l'absence de modèles prédictifs fiables : les cultures bidimensionnelles offrent une représentation partielle de la complexité tissulaire, tandis que les modèles animaux souffrent de divergences interespèces et de contraintes éthiques croissantes. Face à ces limites, les organes-sur-puce se sont imposés comme une voie innovante pour recréer in vitro des microenvironnements dynamiques et physiologiquement pertinents.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette dynamique avec l'ambition de développer un intestin-sur-puce instrumenté par spectroscopie d'impédance, spécifiquement dédié à l'étude des MICI. L'approche proposée associe une architecture microfluidique biomimétique, une instrumentation électrique sensible et un modèle cellulaire représentatif, afin de fournir une lecture fonctionnelle continue et physiologiquement pertinente de la barrière intestinale.

Le dispositif microfluidique conçu repose sur une architecture à deux canaux superposés séparés par une membrane poreuse. Cette configuration recrée la polarité apicale et basolatérale et permet l'application d'un flux péristaltique générant une contrainte de cisaillement physiologique. La géométrie circulaire de la chambre réduit significativement le risque de piégeage de bulles tout en optimisant la surface de culture. Validée par calculs analytiques, simulations par éléments finis et itérations expérimentales, cette conception établit une base robuste pour des cultures épithéliales en environnement contrôlé.

Un soin particulier est porté à la sélection et à la caractérisation des membranes. Les membranes en PET présentent des pores submicroniques, une porosité élevée et une faible épaisseur, assurant à la fois une compartimentalisation stricte des cellules et une diffusion contrôlée des biomolécules sécrétées. La fonctionnalisation à la fibronectine améliore l'adhérence cellulaire sans altérer la sélectivité, comme le confirment les observations au MEB. La réussite du greffage est validée à la fois par AFM et par des mesures d'angle de contact. Ces éléments garantissent la compatibilité mécanique et biologique en conditions microfluidiques.

Sur le plan biologique, la coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) reproduit simultanément la fonction barrière et la sécrétion de mucus, deux paramètres centraux de la physiopathologie intestinale. En conditions statiques, les monocouches présentent les caractéristiques fonctionnelles attendues, ce que confirme la coloration au bleu alcian après 21 jours. En conditions microfluidiques, l'adhérence initiale et la prolifération apparaissent plus fragiles.

Ces observations confirment la pertinence du modèle, tout en révélant les marges d'amélioration nécessaires pour stabiliser les cultures dynamiques.

L'instrumentation électrique développée constitue un autre apport essentiel. Des électrodes interdigitées micrométriques, déclinées en quatre géométries, sont microfabriquées et intégrées dans l'environnement de culture via un circuit imprimé dédié en configuration quatre fils. Les quatre géométries d'électrodes définissent des fenêtres de sensibilité complémentaires. L'IDT1 ($W_{IDT1} = 7{,}5$ µm, $G_{IDT1} = 5$ µm, $p_{eff,IDT1} = 3{,}96$ µm), dont la profondeur de pénétration est proche de l'épaisseur moyenne des monocouches mesurée par AFM (3,5 ± 0,4 µm), cible sélectivement la barrière épithéliale et se révèle particulièrement adaptée à l'évaluation fine de son intégrité. L'IDT2 ($W_{IDT2} = 15$ µm, $G_{IDT2} = 10$ µm, $p_{eff,IDT2} = 7{,}88$ µm) explore un régime intermédiaire, englobant à la fois la monocouche et la couche de mucus, avec une cinétique de réponse rapide qui lui confère une bonne résolution vis-à-vis des événements localisés à l'interface cellulaire-luminale. Les électrodes de plus grande période, IDT3 ($W_{IDT3} = 30$ µm, $G_{IDT3} = 20$ µm, $p_{eff,IDT3} = 15{,}7$ µm) et IDT4 ($W_{IDT4} = 60$ µm, $G_{IDT4} = 40$ µm, $p_{eff,IDT4} = 32{,}1$ µm), sondent quant à elles des volumes élargis incluant la monocouche, le mucus et une fraction notable du milieu de culture : elles sont donc adaptées au suivi de variations globales du microenvironnement, comme celles induites par la sédimentation de cellules en suspension.

Grâce à cette instrumentation, la spectroscopie d'impédance permet de suivre en continu la dynamique cellulaire. Deux fréquences caractéristiques sont identifiées : l'une, associée aux chemins extra- et paracellulaires, l'autre à la traversée transmembranaire. Ensemble, elles permettent de distinguer les phases d'adhésion, d'augmentation de la confluence, de réorganisation des monocouches ou de perte de viabilité.

Malgré les avancées de ce travail, plusieurs limites subsistent et définissent autant de perspectives pour les recherches futures. Celles-ci peuvent être hiérarchisées selon leur priorité de mise en œuvre, des actions les plus urgentes aux développements à plus long terme :

- **Stabilité des cultures en flux dynamique**. L'adhérence initiale des cellules reste limitée et leur prolifération restreinte, ce qui fragilise la formation de tapis cellulaires. Ces difficultés semblent liées, d'une part, à l'altération de la fonctionnalisation des membranes lors du collage plasma, réduisant leur capacité d'adhérence, et d'autre part, à la formation récurrente de microbulles, favorisée par la perméabilité du PDMS aux gaz, qui perturbe le microenvironnement et endommage les monocouches. Pour y remédier, plusieurs pistes peuvent être explorées : recourir à des techniques d'assemblage non destructives comme le clamping mécanique, intégrer des dispositifs de débullage microfluidiques ou utiliser des matériaux moins perméables, tels que le verre ou le PDMS revêtu de Parylene.

- **Automatisation du protocole de mesure**. Dans l'état actuel, chaque électrode doit être connectée manuellement à l'analyseur d'impédance, ce qui empêche tout suivi en temps réel sur plusieurs électrodes en parallèle. Cette contrainte rallonge les protocoles et introduit une variabilité liée aux manipulations répétées. L'intégration de commutateurs différentiels, détaillé en Annexe K, permettant la sélection automatique des électrodes tout en conservant la configuration quatre fils, offrirait la possibilité d'un suivi plus rapide et plus reproductible sur un grand nombre d'échantillons.

- **Corrélation biologique des mesures électriques**. Les signatures d'impédance obtenues sont interprétées comme le reflet de phénomènes cellulaires, mais leur validation reste encore partielle. Elles devraient être systématiquement corroborées par des méthodes standard de biologie cellulaire, telles que des tests de viabilité ou des marquages de protéines de jonctions serrées, afin de renforcer la robustesse et la valeur physiologique des résultats.

- **Suivi de la production de mucus**. L'IDT1 permet de caractériser l'évolution des monocouches épithéliales. L'IDT2, dont la profondeur de pénétration englobe la monocouche et la couche de mucus, est adapté à la transposition de ces suivis électriques dans des conditions comparables, tout en apportant une lecture spécifique de la dynamique de sécrétion et d'accumulation du mucus. Cette approche constitue un moyen pertinent pour étudier la formation et altérations du mucus, intervenant dans la physiopathologie des MICI.

- **Reproductibilité statistique**. Le faible nombre de réplicats biologiques limite la solidité des conclusions, principalement à cause des contraintes de fabrication et de manipulation des dispositifs. Augmenter à la fois le nombre de puces microfluidiques utilisées et le nombre d'électrodes testées représente une solution concrète pour améliorer la robustesse et la portée des analyses.

- **Intégration des électrodes au sein de la puce microfluidique**. Les électrodes interdigitées ont jusqu'ici été testées en puits, hors dispositif microfluidique. Leur intégration directe dans l'intestin-sur-puce constitue une étape clé pour obtenir un système complet.

- **Modèle biologique utilisé**. La coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1), bien que représentative de la fonction barrière et de la production de mucus, reste éloignée des tissus primaires. Elle ne prend pas en compte d'autres acteurs clés de la physiopathologie des MICI, tels que les cellules immunitaires et le microbiote ou les fibroblastes. L'introduction progressive de ces compartiments tissulaires, suivie de l'utilisation de cellules dérivées de patients, constitue une étape essentielle pour accroître la pertinence physiologique et translationnelle du modèle.

Ce travail répond directement à plusieurs verrous identifiés dans l'état de l'art. Le cloisonnement entre biologie, microfluidique et instrumentation s'atténue grâce à une approche intégrée, pensée dès l'origine pour l'étude des MICI. L'introduction d'un flux péristaltique physiologique et d'une compartimentalisation stricte permet de lever le verrou lié à l'absence de contraintes mécaniques pertinentes. La coculture Caco-2 : HT29-MTX marque une avancée vers une représentativité accrue, tout en laissant place à une complexification ultérieure du modèle. Enfin, l'approche instrumentale développée dépasse les limites du TEER, basé sur une analyse monofréquence qui ne permet pas de distinguer les contributions extra-/paracellulaires et transcellulaires. La spectroscopie d'impédance, associée à des électrodes interdigitées micrométriques adaptées à l'échelle cellulaire, lève ce verrou et offre une caractérisation plus riche et nuancée du comportement épithélial et de son microenvironnement.

En résumé, ce travail établit les bases d'un intestin-sur-puce instrumenté pour l'étude des MICI, en intégrant de façon cohérente biologie, microfluidique et instrumentation électronique. Les résultats obtenus démontrent le potentiel de la spectroscopie d'impédance comme outil de suivi fonctionnel en temps réel, capable de suivre l'évolution de la barrière intestinale. À long terme, le dispositif pourra évoluer vers des approches ex vivo, plus proches de la physiologie humaine. Il constituerait alors un outil pertinent pour approfondir la compréhension des mécanismes physiopathologiques liés aux MICI, pour faciliter l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques et pour contribuer au développement de la médecine personnalisée.

Liste des productions scientifiques

Communication orale :

12–13 juin 2025 — Agathe Lemée, Julien Claudel, Halima Alem-Marchand, Microfabricated interdigitated electrodes for real-time monitoring of intestinal cells: towards a gut-on-a-chip model for inflammatory bowel disease, 3rd Workshop on Microfluidic & Biodevices, Nancy — Communication orale.

Présentations par poster :

14–15 novembre 2024 — Agathe Lemée, Julien Claudel, Djésia Arnone, Marie Boudaud, Nina Touly, Laurent Peyrin-Biroulet, Halima Alem-Marchand, Growth of intestinal mucus in a microfluidic chip for further use as an ex-vivo device for biomedical applications in inflammatory bowel disease research, Colloque international Futures de l'IHU INFINY, Vandœuvre-lès-Nancy — Présentation par poster.

5 décembre 2024 — Agathe Lemée, Julien Claudel, Halima Alem-Marchand, Ex vivo model of inflammatory bowel diseases, Assemblée générale du département N2EV et Journée doctorants, Nancy — Présentation par poster.

Annexe A : Principes fondamentaux de la microfluidique

La microfluidique désigne l'étude et la manipulation de fluides à l'échelle micrométrique, généralement à l'intérieur de dispositifs miniaturisés, tels que des canaux de dimensions allant du micromètre à quelques millimètres. Bien qu'elle soit réalisée à une échelle bien plus petite que les écoulements de fluides classiques, la microfluidique repose sur les mêmes principes physiques [126].

L'équation de Navier-Stokes, disponible à l'Équation A-1, décrit les écoulements de fluides incompressibles visqueux. Pour cela, une particule de fluide de volume dV et de masse volumique ρ est considérée. Le fluide est considéré newtonien, de viscosité dynamique η. L'écoulement est considéré incompressible : en d'autres termes, son volume est considéré comme constant quelle que soit la pression qu'il subit [126].

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho\left(\vec{v} \cdot \vec{\nabla}\right)\vec{v} = \rho\vec{g} - \vec{\nabla}p + \eta\vec{\Delta}\vec{v} + \vec{f}$$

Équation A-1 : Équation de Navier-Stokes.

Avec :

ρ	la masse volumique du fluide, en [kg. m^{-3}]
t	le temps, en [s]
$\vec{v}$	le vecteur vitesse, en [m. s^{-1}]
p	la pression, en [Pa]
η	la viscosité dynamique du fluide, en [Pl] ou [Pa.s]
$\vec{g}$	le champ de gravité, en [m. s^{-2}]

L'écoulement est donc influencé par les forces volumiques suivantes :

$\rho\vec{g}$	la force volumique de pesanteur
$-\vec{\nabla}p$	la force volumique de pression
$\eta\vec{\Delta}\vec{v}$	la force volumique de viscosité
$\vec{f}$	les autres forces volumiques supplémentaires

En raison de la non-linéarité de son terme convectif, l'équation de Navier-Stokes est complexe à résoudre de manière analytique. C'est pourquoi, en pratique l'écoulement est souvent caractérisé par le nombre de Reynolds Re, une grandeur adimensionnée, qui est définie à l'Équation A-2.

$$Re = \frac{\rho V D_h}{\eta}$$

Équation A-2 : Nombre de Reynolds.

Avec :

ρ	la masse volumique du fluide, en [kg. m^{-3}]
η	la viscosité dynamique, en [Pl] ou [Pa. s]
V	la vitesse caractéristique de l'écoulement, en [m. s^{-1}]
D_h	le diamètre hydraulique du canal, en [m]

La définition du nombre de Reynolds est issue de l'équation de Navier-Stokes : il s'agit du rapport entre le terme convectif et le terme diffusif, comme le montre l'Équation A-3.

$$Re = \frac{\text{terme convectif}}{\text{terme diffusif}} = \frac{\left|\rho(\vec{v}\cdot\vec{\nabla})\vec{v}\right|}{\left|\eta\vec{\Delta}\vec{v}\right|} \approx \frac{\rho V D_h}{\eta}$$

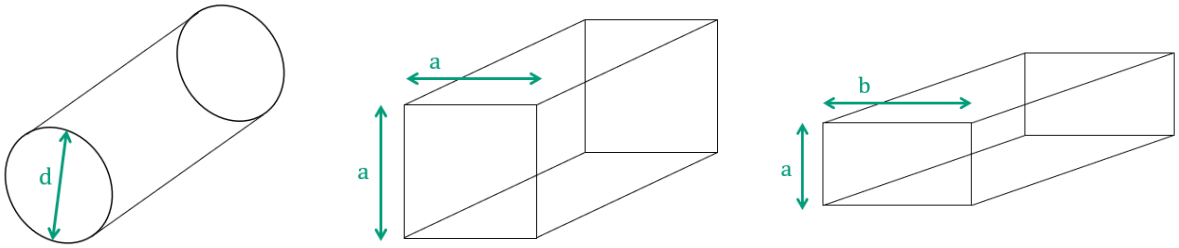
Équation A-3 : Obtention du nombre de Reynolds à partir de l'équation de Navier-Stokes.

Pour calculer le nombre de Reynolds, il est nécessaire de connaitre le diamètre hydraulique du canal dans lequel le fluide s'écoule. Le diamètre hydraulique, noté D_h, est une grandeur communément utilisée en mécanique des fluides, dont la formule est donnée à l'Équation A-4 [298].

$$D_h = \frac{4(\text{aire de la section})}{\text{périmètre de la section}}$$

Équation A-4 : Diamètre hydraulique [128].

Il s'agit d'une grandeur particulièrement utile car elle permet de simplifier les calculs. En effet, elle permet, à partir d'un système quelconque, de se rapporter à un système de section circulaire de diamètre équivalent [299]. La Figure A-1 donne l'expression du diamètre hydraulique dans le cas de sections circulaire, carrée ou rectangulaire.



$$D_h = \frac{4\ \frac{\pi d^2}{4}}{\pi\, d} = d \qquad D_h = \frac{4a^2}{4a} = a \qquad D_h = \frac{4(ab)}{2(a+b)} = \frac{2ab}{a+b}$$

Figure A-1 : Diamètres hydrauliques de canaux à sections circulaire, carrée ou rectangulaire.

Le nombre de Reynolds permet de déterminer le régime d'écoulement du fluide, qu'il soit laminaire ou turbulent. Lorsque Re $>$ 4000, l'écoulement est turbulent : il est régi majoritairement par des effets convectifs et est chaotique et irréversible. A l'inverse, lorsque Re $<$ 2000, l'écoulement est laminaire : il est régi majoritairement par des effets de diffusion et est prévisible [300], [301].

Dans le cas de solutions aqueuses ($\rho_{eau} \simeq 10^3$ kg. m^{-3} et $\eta_{eau} \simeq 10^{-3}$ Pa. s à 20°C) en écoulement dans un microsystème ($D_{h,micro} \simeq 10^{-6}$ m et V_{micro} comprise entre quelques µm. s^{-1} et quelques cm. s^{-1}), l'expression du nombre de Reynolds peut être simplifiée, comme le montre l'Équation A-5. Ainsi, en microfluidique, le nombre de Reynolds est généralement très inférieur à 1 : on parle d'écoulement rampant, ou d'écoulement de Stokes, qui est stationnaire, réversible et parfaitement déterministe, dans lequel les lignes de courant sont parallèles et l'organisation du fluide se fait en couches fluides glissant les unes sur les autres [300], [301].

$$Re_{micro} = \frac{\rho_{eau}\, V_{micro}\, D_{h,micro}}{\eta_{eau}} \approx V_{micro}\, \frac{10^3 \quad 10^{-6}}{10^{-3}} \in \left[10^{-6}; 10^{-2}\right] \ll 1$$

Équation A-5 : Nombre de Reynolds en microfluidique de solutions aqueuses.

Dans le cadre d'un écoulement laminaire visqueux au sein d'un canal microfluidique, le fluide s'organise en couches parallèles qui glissent les unes sur les autres sans se mélanger. La vitesse n'est pas homogène sur l'ensemble de la section : elle est nulle au niveau des parois, en raison de la condition de non-glissement, et atteint un maximum au centre du canal. Cette distribution donne lieu à un profil de vitesse parabolique, comme illustré à la Figure A-2. Le

glissement différentiel entre les couches de fluide est à l'origine d'un phénomène appelé cisaillement.

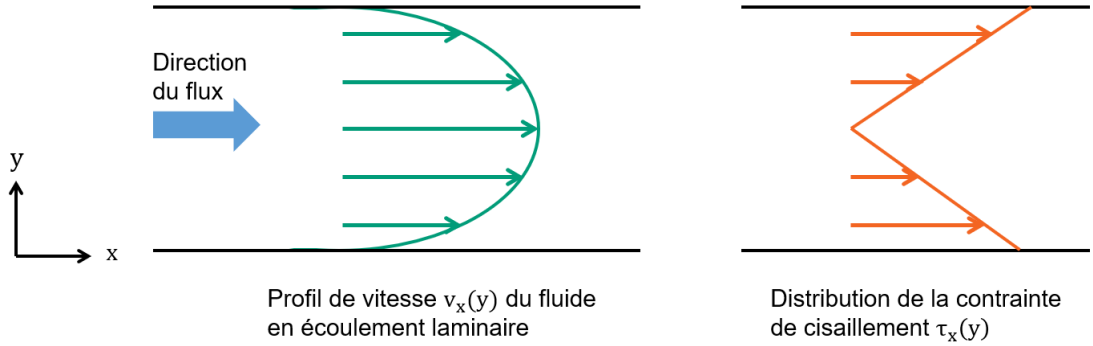


Figure A-2 : Profil de vitesse et contrainte de cisaillement d'un fluide en écoulement laminaire dans un canal microfluidique.

À gauche : Profil de vitesse $v_x(y)$ parabolique du fluide en écoulement laminaire dans un canal microfluidique : minimal au paroi et maximal au centre du canal. À droite : distribution de la contrainte de cisaillement $\tau_x(y)$, maximale à proximité des parois.

La contrainte de cisaillement, notée τ, correspond à la force tangentielle par unité de surface qu'un fluide visqueux exerce sur une paroi solide, ou entre deux couches fluides adjacentes. Elle constitue la manifestation mécanique du cisaillement dans un fluide en mouvement.

Dans le cas d'un fluide newtonien incompressible, la contrainte de cisaillement est proportionnelle au gradient de vitesse perpendiculaire à la surface. Sa formule, dans le cas d'un écoulement parallèle à l'axe $\vec{x}$ et normal à l'axe $\vec{y}$, est disponible à l'Équation A-6.

$$\tau_x(y) = \eta \frac{dv_x(y)}{dy}$$

Équation A-6 : Contrainte de cisaillement.

Avec :

$\tau_x(y)$	la contrainte de cisaillement, en [Pa] ou [dyn. cm^{-2}]
η	la viscosité dynamique, en [Pl] ou [Pa. s]
$v_x(y)$	la composante de vitesse parallèle à la paroi, en [m. s^{-1}]

Cette relation montre que la contrainte de cisaillement est d'autant plus importante que la variation de vitesse est rapide dans la direction normale à l'écoulement. Elle souligne également le rôle déterminant de la viscosité : à gradient de vitesse équivalent, un fluide plus visqueux exercera une contrainte plus élevée. La contrainte de cisaillement s'exprime généralement en pascal. Cependant, dans certains contextes biologiques, une unité plus traditionnelle est encore fréquemment utilisée : le dyne par centimètre carré, noté dyn. cm^{-2}. La conversion entre ces deux unités s'effectue comme suit : $1[\text{Pa}] = 10[\text{dyn. cm}^{-2}]$.

Annexe B : Procédés de fabrication et matériaux des membranes poreuses

La membrane séparant les compartiments apical et basolatéral dans les dispositifs intestin-sur-puce est un élément fonctionnel clé. Plusieurs types de membranes sont couramment utilisées selon les objectifs de conception : des membranes rigides en polycarbonate (PC) [238] ou polytéréphtalate d'éthylène (PET) [162] ou des membranes souples en polydiméthylsiloxane (PDMS) [302]. Aussi, il est à noter que des matériaux alternatifs comme la nitrocellulose peuvent également être utilisés, bien que leur usage soit plus marginal [303].

Membranes rigides en PC et PET

Les membranes en polytéréphtalate d'éthylène (PET) et en polycarbonate (PC) sont parmi les plus utilisées dans les dispositifs intestin-sur-puce lorsqu'une séparation rigide et reproductible entre compartiments est requise [238], [162]. Ces polymères sont couramment employés sous forme de membranes commerciales, notamment dans les Transwell®, et se distinguent par leur fabrication industrielle standardisée [304]. Ces membranes sont généralement produites par un procédé d'irradiation ionique suivi d'attaque chimique contrôlée, dit track-etching, qui permet d'obtenir des pores cylindriques parfaitement calibrés, avec des diamètres de l'ordre du micromètre [305], [306]. Ce procédé garantit une distribution homogène des pores et une excellente reproductibilité [307].

Ces membranes rigides présentent une bonne compatibilité avec divers traitements de surface, peuvent être aisément découpées ou insérées dans des supports, et offrent une stabilité mécanique appréciable en conditions de flux [239], [240]. Leur faible adsorption des biomolécules ainsi que leur inertie chimique en font des supports fiables pour des expériences prolongées [308]. À faible densité de pores, elles restent transparentes et permettent une observation efficace en microscopie optique à transmission. En revanche, une densité de pores plus élevée réduit leur transparence, les rendant seulement translucides et compliquant les observations visuelles [309], [310], [311]. De plus, leur intégration dans des systèmes microfluidiques requiert des techniques de collage spécifiques, ce qui complexifie le processus d'assemblage [312], [313], [314].

Ainsi, les membranes en PET ou en PC sont particulièrement adaptées aux applications où la reproductibilité et la stabilité chimique sont prioritaires. En revanche, leur rigidité, leur faible perméabilité aux gaz et les contraintes d'intégration limitent leur usage dans des systèmes flexibles ou dynamiques.

Membranes souples en PDMS

Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est fréquemment utilisé pour la fabrication de membranes poreuses intégrées dans les dispositifs intestin-sur-puce, en particulier lorsque l'ensemble de la puce est lui-même constitué du même matériau [315], [316]. La membrane est généralement obtenue par dépôt d'une fine couche de PDMS par spin-coating : une technique qui permet de contrôler précisément l'épaisseur souhaitée, allant de quelques microns à plusieurs dizaines de microns [317], [318]. La formation des pores peut être réalisée par diverses méthodes, notamment l'intégration de microbilles sacrifiables [319], la gravure assistée par plasma [320], ou encore la micro-perforation au laser [321]. Toutefois, ces procédés génèrent des pores dont la taille, la densité et la régularité sont souvent moins bien maîtrisées que dans les membranes commerciales en PET ou PC, ce qui peut nuire à la reproductibilité d'un dispositif à l'autre [145], [315].

Lorsque le dispositif est entièrement conçu en PDMS, l'utilisation de ce matériau pour la membrane assure une intégration homogène et sans contrainte d'assemblage [317]. Une illustration de ce type de dispositif est présentée à la Figure B-1 [145]. Toutefois, au-delà des limites déjà évoquées du matériau (adsorption, relargage, sensibilité aux solvants), son élasticité peut entraîner des déformations sous l'effet du flux ou de la pression [322]. Cela peut altérer la stabilité géométrique de la membrane et perturber les conditions expérimentales.

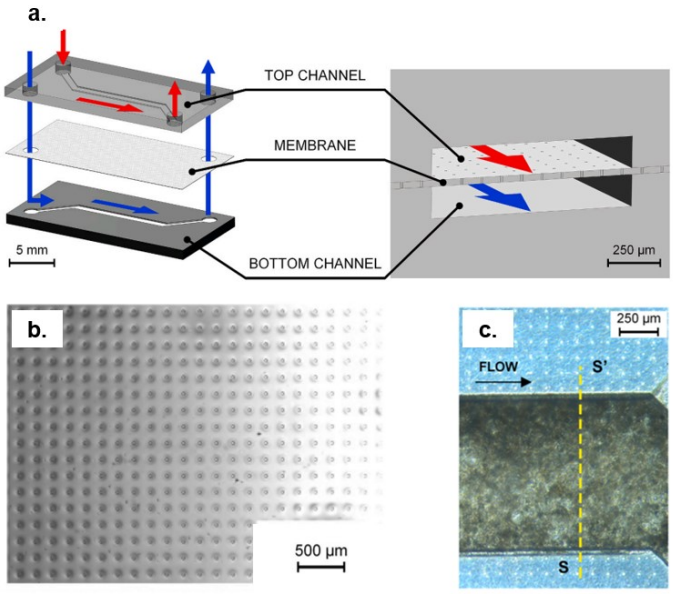


Figure B-1 : Intestin-sur-puce intégrant une membrane en PDMS microperforée [145].

a. Représentation éclatée et coupe transversale tridimensionnelle d'un dispositif intestin-sur-puce à double canaux en PDMS séparées par une membrane microperforée, également en PDMS. b. Observtion au microscope de la membrane en PDMS avant assemblage, d'une épaisseur de 30 µm, présentant des pores circulaires de 12 µm de diamètre disposés en matrice carrée avec un pas de 100 µm. c. Vue supérieure du dispositif quatre jours après l'ensemencement de cellules Caco-2, montrant une croissance homogène sur la membrane.

Ainsi, les membranes en PDMS sont particulièrement adaptées à des dispositifs de recherche ou à des modèles exploratoires, où la souplesse de conception et la facilité d'intégration sont des atouts. En revanche, elles sont moins indiquées pour des applications nécessitant une stricte reproductibilité ou une stabilité chimique renforcée.

Annexe C : Techniques usuelles de caractérisation de cellules épithéliales

Caractérisation morphologique des cellules épithéliales

Pour analyser la morphologie de l'épithélium cultivé sur puce, plusieurs techniques d'imagerie complémentaires sont couramment utilisées : la microscopie optique, microscopie confocale, la microscopie à fluorescence, incluant les colorants standards et l'immunofluorescence, ainsi que la microscopie électronique à balayage.

La microscopie optique en champ clair et en contraste de phase constitue une méthode de base, non invasive, permettant d'observer les cultures cellulaires directement dans les canaux microfluidiques. Elle est principalement utilisée pour évaluer la confluence, la morphologie générale des cellules et leur adhérence au support, comme le montre la Figure C-1 [323]. Ces techniques ne nécessitent aucun marquage spécifique, ce qui les rend compatibles avec un suivi en conditions de culture en temps réel. En revanche, leur résolution reste limitée [324].

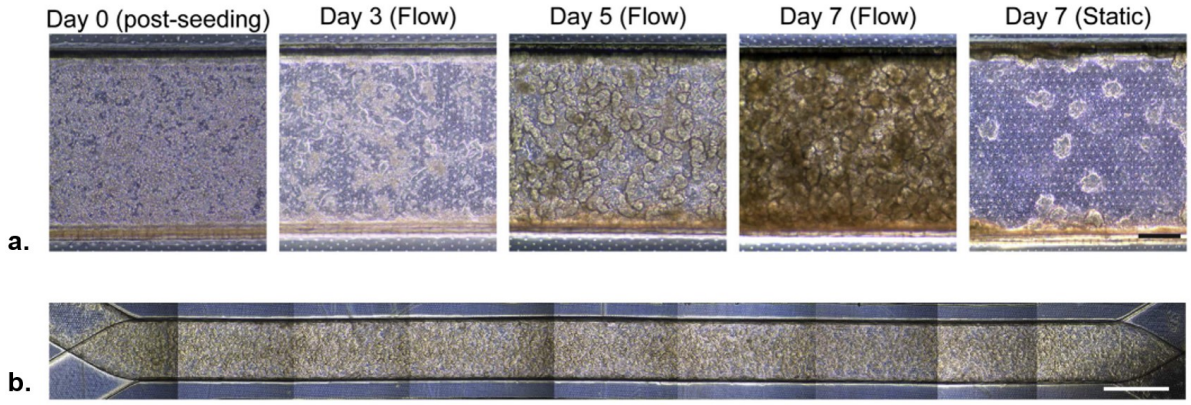


Figure C-1 : Observation en microscopie optique de cellules épithéliales cultivées dans une puce microfluidique [323].

Imagerie en contraste de phase de cellules épithéliales dérivées d'organoïdes intestinaux humains ensemencées dans une puce microfluidique et soumises, ou non, à un flux continu de milieu (30 mL/h). (a) Images en contraste de phase aux jours 0, 3, 5 et 7 en conditions dynamiques et au jour 7 en conditions statiques. L'acquisition permet d'évaluer la progression de la confluence, l'adhérence cellulaire et la stabilité morphologique au cours du temps. Barre d'échelle = 200 µm. (b) Image panoramique recomposée après 5 jours de culture sous flux continu. Barre d'échelle = 1 mm.

Pour aller au-delà de cette observation globale et accéder à une analyse plus fine de l'organisation cellulaire, il est nécessaire d'utiliser des techniques à plus haute résolution. La microscopie confocale répond à cet objectif en permettant une visualisation détaillée de l'épithélium en trois dimensions. Ainsi, il est possible de visualiser des plans de coupes des structures observées, tout en conservant l'échantillon intact [325], [326].

En complément, la microscopie à fluorescence permet une observation plus fine de l'organisation cellulaire à l'aide de marqueurs fluorescents. On distingue deux grandes approches : d'une part, les colorants fluorescents standards, et d'autre part, l'immunofluorescence. Les colorants standards se fixent directement à certaines structures cellulaires sans nécessiter d'anticorps. Par exemple, le DAPI (4′,6-diamidino-2-phénylindole) marque l'ADN nucléaire et permet d'évaluer la densité et la distribution des noyaux [327], [328]. L'immunofluorescence, quant à elle, repose sur l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre une protéine d'intérêt, ce qui permet une détection ciblée de protéines. Comme illustré en Figure C-2, cette méthode permet d'étudier l'organisation fonctionnelle de l'épithélium. Elle permet par exemple de visualiser les protéines de jonctions serrées telles que ZO-1 ou l'occludine, qui témoigne de l'intégrité de la barrière épithéliale. Elle est également utilisée pour caractériser la différenciation cellulaire, à travers des marqueurs spécifiques comme MUC2 ou MUC5AC, exprimés par les cellules caliciformes [325], [326].

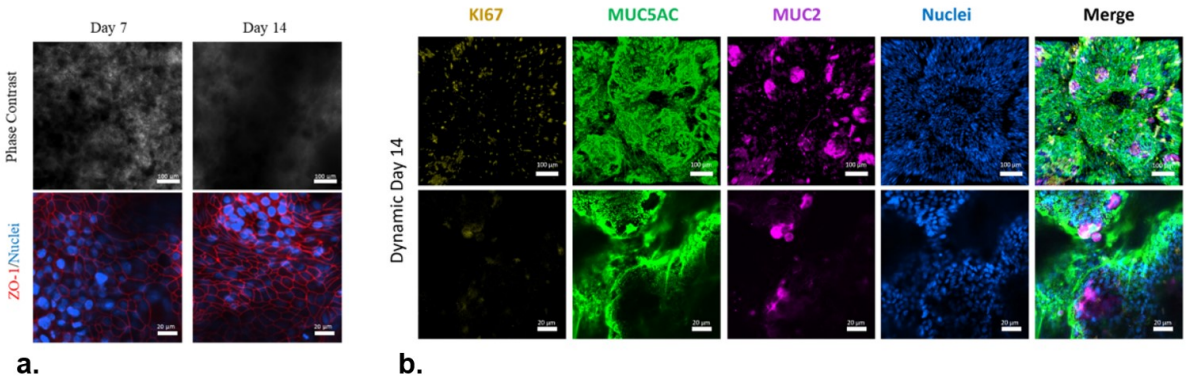


Figure C-2 : Observation en microscopie confocale à immunofluorescence de cellules épithéliales [325].

(a) Imagerie par microscopie à contraste de phase (haut) et microscopie confocale en fluorescence (bas) de cellules HT29-MTX cultivées sous conditions dynamiques (cisaillement : 0,01 dyne/cm²) aux jours 7 et 14. La coloration immunofluorescente cible la protéine de jonction serrée ZO-1 (rouge), révélant la formation progressive de jonctions cellulaires définies. Les noyaux sont contre-colorés avec un marqueur nucléaire (bleu), permettant de visualiser la densité et la distribution cellulaire.
(b) Imagerie confocale de cellules HT29-MTX au jour 14, illustrant une caractérisation phénotypique fine par immunomarquage multicanal. Les cellules sont colorées pour : KI67 (jaune) : marqueur de prolifération cellulaire, MUC5AC (vert) : mucine exprimée par les cellules caliciformes de type gastrique, MUC2 (magenta) : mucine associée aux cellules caliciformes intestinales, Noyaux (bleu) : contre-coloration nucléaire.

La microscopie électronique à balayage (MEB) est utilisée pour visualiser la surface apicale de l'épithélium à haute résolution, en particulier les structures fines telles que les microvillosités. Cette technique permet d'accéder à une échelle nanométrique, largement supérieure à celle des microscopes optiques. Elle constitue un outil de référence pour évaluer la différenciation morphologique des cellules épithéliales, notamment en confirmant la présence, la densité et l'organisation des microvillosités caractéristiques des entérocytes matures [329].

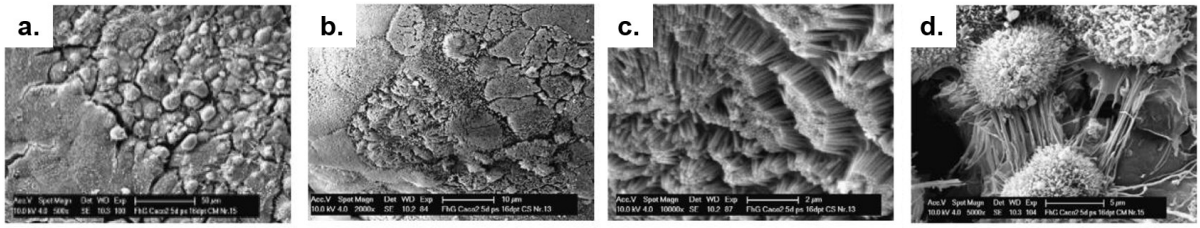


Figure C-3 : Observation en microscopie électronique à balayge de cellules épithéliales [329].

Photographies MEB de monocouches de cellules Caco-2 cultivées pendant 18 jours. Les images (a) et (b) montrent une vue d'ensemble de la monocouche cellulaire, (c) montre les microvillosités et (d) les jonctions sérrées.

Évaluation fonctionnelle de l'intégrité de la barrière épithéliale

L'intégrité fonctionnelle de la barrière épithéliale peut être évaluée à l'aide de tests de perméabilité paracellulaire, qui permettent de mesurer passage de molécules à travers la couche cellulaire. Le principe consiste à introduire un traceur fluorescent ou coloré du côté apical de l'épithélium, puis à prélever des échantillons dans le compartiment basolatéral à différents temps pour en mesurer la diffusion. Des composés de différentes tailles sont utilisés en fonction de la sensibilité recherchée, comme le FITC-Dextran [186]. Ces tests fournissent un indicateur utile de l'état de la barrière [35], [330].

La résistance électrique transépithéliale (TEER) constitue un autre indicateur de l'intégrité fonctionnelle de la barrière épithéliale. Elle permet de mesurer, de manière non invasive, la capacité de l'épithélium à limiter le passage paracellulaire d'ions, c'est-à-dire la cohésion des jonctions serrées entre les cellules. Plus la barrière est fonctionnelle, plus la résistance mesurée est élevée [35], [330]. Cette méthode fera l'objet d'un développement plus détaillé dans la suite.

Analyses directe et indirecte de viabilité cellulaire

Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer la viabilité ou la cytotoxicité cellulaire dans les modèles in vitro, en s'appuyant soit sur des approches directes, reposant sur l'observation des cellules vivantes et mortes, soit sur des méthodes indirectes, basées sur l'activité métabolique globale du tissu, comme le montre la Figure C-4 [153].

L'essai LIVE/DEAD est une méthode de référence pour évaluer la viabilité cellulaire dans les systèmes de culture in vitro, y compris en microfluidique. Il repose sur une double coloration par fluorescence : la calcéine-AM est convertie en un signal vert dans les cellules vivantes, tandis que l'éthidium homodimer-1 (EthD-1) pénètre uniquement les cellules mortes et colore leur noyau en rouge [153], [168], .

D'autres approches, comme les tests MTT ou AlamarBlue, permettent d'estimer la viabilité de manière indirecte, en mesurant l'activité cellulaire globale. Ces tests reposent sur la

transformation d'un composé initial en un produit coloré ou fluorescent par les cellules vivantes. Après incubation, l'intensité du signal mesuré reflète l'état de santé du tissu, et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à un témoin non traité. Bien que simples à mettre en œuvre, ces méthodes ne fournissent pas d'information spatiale, contrairement aux colorations LIVE/DEAD [153], [331], [332].

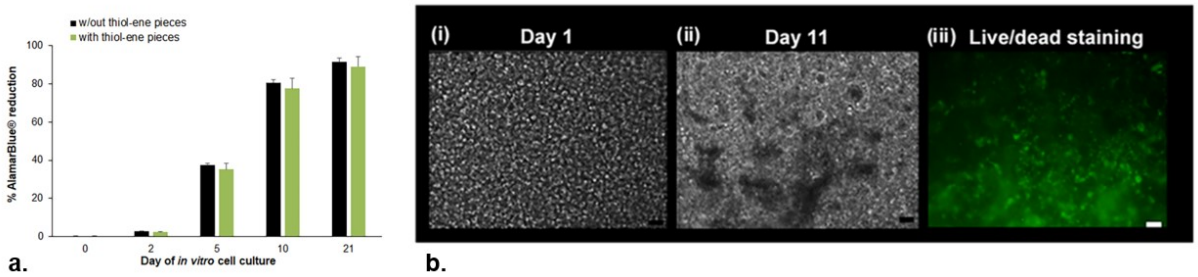


Figure C-4 : Tests de viabilité cellulaire et d'activité métabolique afin d'évaluer la bio-compatibilité d'un intestin-sur-puce [153].

(a) Activité métabolique cellulaire mesurée par le test AlamarBlue® entre le jour 0 et le jour 21, en présence ou non d'éléments du matériau constitutif du dispositif (n = 3 ; moyenne ± SEM). Une augmentation progressive du signal indique une prolifération cellulaire soutenue. (b) Images microscopiques représentatives de la culture : (i) observation en contraste de phase au jour 1, (ii) au jour 11, montrant une forte densité cellulaire, (iii) coloration Live/Dead au jour 11, révélant une majorité de cellules vivantes (signal vert). Barre d'échelle = 50 µm.

Annexe D : Fondements microscopiques de la réponse électrique des milieux biologiques

Le comportement électrique et diélectrique des milieux biologiques repose sur les propriétés fondamentales des matériaux ioniques qui les composent. Selon l'échelle considérée, la réponse à une excitation électrique se manifeste par la polarisation de dipôles, la réorganisation d'ions en solution ou la formation de structures interfaciales comme la double couche. Ces phénomènes, à la fois locaux et collectifs, forment les bases physiques nécessaires à la modélisation des milieux biologiques.

Moment dipolaire

Les matériaux peuvent être classés comme polaires ou apolaires en fonction de la répartition de leurs charges. Lorsque les charges positives et négatives d'une molécule ne sont pas uniformément réparties, la molécule devient polaire et présente un moment dipolaire $\vec{P}$. L'expression du moment dipolaire est donnée à l'Équation D-1.

$$\vec{P} = \sum_{k=1}^{n} q_k \, \vec{r_k}$$

Équation D-1 : Moment dipolaire.

Avec :

$\vec{P}$	le moment dipolaire, en [Cm] ou [D]
q_k	les charges élémentaires composant la molécule, en [C]
$\vec{r_k}$	les vecteurs rayons, orientés de la charge négative à la positive, en [m]
n	le nombre de charges élémentaires, sans unité.

Ce phénomène est observé dans les molécules d'eau, où l'atome d'oxygène, plus électronégatif, attire davantage les électrons que les atomes d'hydrogène. Il en résulte une distribution dissymétrique des charges : l'oxygène porte une charge partielle négative -2δ tandis que chaque hydrogène porte une charge partielle positive $+\delta$. deux moments dipolaires élémentaires, associés aux liaisons O–H, se combinent vectoriellement pour donner un moment dipolaire résultant. En l'absence de champ électrique externe, les dipôles moléculaires sont orientés de manière aléatoire. Toutefois, sous l'effet d'un champ électrique appliqué, ces moments dipolaires tendent à s'aligner dans la direction du champ, ce qui confère aux tissus biologiques comme les cellules humaines des propriétés diélectriques mesurables.

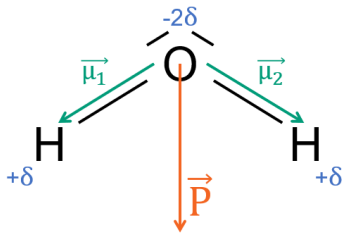


Figure D-1 : Moment dipolaire de la molécule d'eau.

La notion de moment dipolaire est essentielle pour expliquer le comportement des électrolytes en solution : la polarité de la molécule d'eau lui confère une forte capacité à interagir avec les ions.

Solution électrolytique

Les électrolytes sont des substances chimiques qui, une fois dissoutes dans l'eau, libèrent des ions mobiles capables de transporter une charge électrique. Dans les tissus vivants, le liquide intracellulaire, appelé cytosol, est une solution électrolytique constituée d'eau et d'ions dissous. Comme illustré à la Figure D-2 a formation d'une solution électrolytique implique trois étapes principales :

1. Ionisation : les molécules de l'électrolyte sont rompues par les interactions avec les molécules d'eau polaires, formant ainsi des ions.

2. Dissociation : grâce à leur moment dipolaire élevé, les molécules d'eau exercent des forces électrostatiques qui séparent les ions.

3. Solvatation : les molécules d'eau entourent ces ions, stabilisant ainsi la solution.

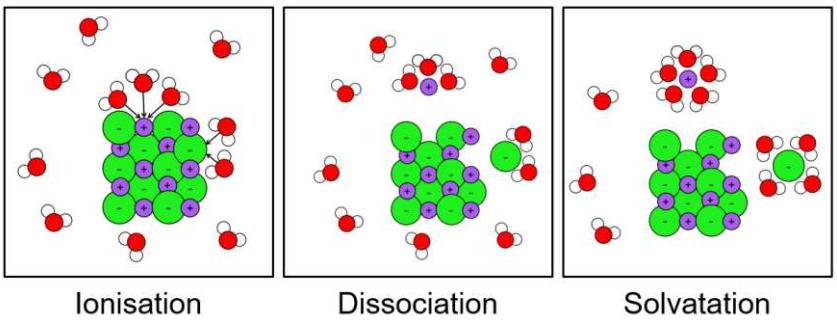


Figure D-2 : Étapes de la formation d'une solution électrolytique.

C'est donc la polarité de l'eau, issue de son moment dipolaire, qui permet la formation et la stabilisation des électrolytes dans le cytosol. Cette organisation moléculaire favorise la mobilité des ions, condition essentielle à la conductivité ionique.

Conductivité

La mobilité ionique se traduit à l'échelle macroscopique par la conductivité ionique des solutions biologiques. Dans une solution électrolytique, les porteurs de charge sont les ions libres : des cations, chargés positivement, et des anions, chargés négativement. Leur mouvement collectif sous l'effet d'un champ électrique donne naissance à un courant électrique. Ce courant est décrit par la densité de courant électrique $\vec{J}$. Son équation est donnée à l'Équation E-2 [333].

$$\vec{J} = \sum_{k=1}^{n} n_k \, q_k \, \overrightarrow{v_k}$$

Équation E-2 : Densité de courant.

Avec :

- $\vec{J}$ le vecteur densité de courant, en $[A.\,m^{-2}]$
- n_k la densité volumique de porteur de charge, en $[m^{-3}]$
- q_k la charge du porteur de charge, en [C] ou [A. s]
- $\overrightarrow{v_k}$ le vecteur vitesse moyenne du porteur de charge dans le volume, en $[m.\,s^{-1}]$

Ainsi, le courant augmente avec le nombre d'ions, leur charge et leur vitesse dans le champ électrique. Or, la vitesse du porteur de charge $\overrightarrow{v_k}$ est proportionnelle au champ électrique $\vec{E}$ via une constante appelée mobilité ionique, notée μ_k. Ainsi, la loi d'Ohm locale, disponible à l'Équation E-3 permet de relier directement la densité de courant au champ électrique appliqué en introduisant la notion de conductivité, notée σ. Elle caractérise la capacité d'un matériau à laisser circuler un courant électrique et dépend du nombre de porteurs de charge, de leur charge électrique, et de leur mobilité.

$$\vec{J} = \sigma \, \vec{E} \;\text{ tel que } \sigma = \sum_{k=1}^{n} n_k \, q_k \, \mu_k$$

Équation E-3 : Loi d'Ohm locale.

Avec :

- $\vec{J}$ le vecteur densité de courant, en $[A.\,m^{-2}]$
- σ la conductivité, en $[S.\,m^{-1}]$
- $\vec{E}$ le champ électrique, en $[V.\,m^{-1}]$
- n_k la densité volumique de porteur de charge, en $[m^{-3}]$
- q_k la charge du porteur de charge, en [C] ou [A. s]
- μ_k la mobilité ionique, en $[m^2V^{-1}s^{-1}]$

À faible concentration ionique, la conductivité augmente avec le nombre d'ions disponibles : plus il y a d'ions libres, plus le courant peut circuler. Cependant, pour relier cette

propriété locale à une mesure réalisée à l'échelle macroscopique, il faut aussi tenir compte de la géométrie du système. En effet, la quantité de courant mesurée dépend non seulement de la conductivité de la solution, mais aussi de la forme et de la dimension du volume traversé par le courant. Cette réalité se traduit par la notion de résistance électrique R, qui permet de relier le comportement du milieu conducteur à des grandeurs mesurables, comme la tension électrique U et le courant électrique I. La Figure E-3 illustre le passage du courant à travers un volume de solution entre deux électrodes. La résistance électrique rencontrée dans ce cas est donnée par l'Équation E-4.

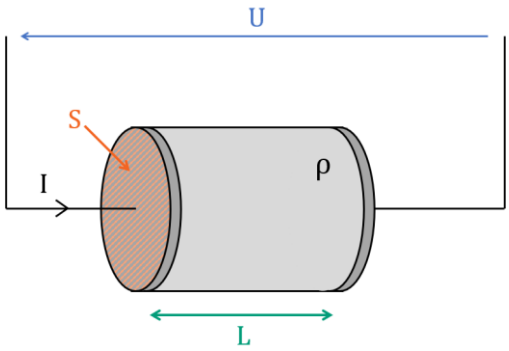


Figure E-3 : Résistance électrique d'un matériau entre deux électrodes.

$$R = \rho \frac{L}{S} = \frac{U}{I} \quad \text{tel que } \rho = \frac{1}{\sigma}$$

Équation E-4 : Résistance électrique d'un matériau entre deux électrodes.

Avec :

R	la résistance électrique, en [Ω]
ρ	la résistivité du matériau, en [Ω. m]
L	la distance entre les deux électrodes, en [m]
S	la surface des électrodes, en [m^2]
U	la tension, en [V]
I	le courant, en [A]

La conductivité augmente proportionnellement au nombre d'ions libres : plus il y a de porteurs de charge, plus le courant peut circuler. Toutefois, cette relation n'est pas linéaire à haute concentration. Lorsque les ions de même charge se rapprochent excessivement, les interactions électrostatiques entre eux deviennent significatives, limitant leur mobilité effective. Ce phénomène conduit à une saturation progressive de la conductivité.

Toutefois, la réponse aux matériaux polaires, dont les tissus biologiques, ne se limite pas à la simple conduction. En présence d'un champ électrique, la matière peut également se polariser, induisant des phénomènes supplémentaires tels que la relaxation diélectrique, qui influencent fortement la réponse en régime dynamique.

Polarisation d'un matériau et relaxation diélectrique

Au-delà de la simple conduction, la réponse d'un matériau à un champ électrique dépend de la manière dont ses charges internes se réarrangent. La polarisation d'un matériau correspond à la réorganisation interne des charges, entraînant l'apparition de dipôles électriques, notamment à la surface ou au sein du matériau. Ce phénomène dépend du type de matériau et de l'échelle d'observation. On distingue quatre mécanismes de polarisation, illustrés à la Figure E-4, qui interviennent à différentes qui interviennent à différentes échelles spatiales (de l'atome au matériau entier) et temporelles (de l'ordre de la femtoseconde à la seconde) :

- Polarisation électronique : À l'échelle atomique, le nuage électronique est légèrement déplacé par rapport au noyau sous l'effet du champ, créant un dipôle. Cette réponse est quasi instantanée, avec des temps caractéristiques de l'ordre du femtoseconde, et est présente dans tous les matériaux.

- Polarisation ionique : À l'échelle moléculaire, les ions positifs et négatifs d'une molécule se déplacent légèrement autour de leur position d'équilibre, créant ainsi un dipôle.

- Polarisation dipolaire d'orientation : Lorsqu'un champ électrique est appliqué sur une molécule polaire, ces dipôles vont s'aligner dans sa direction. Ce réalignement s'effectue à l'échelle moléculaire et s'étend sur des temps caractéristiques compris entre la nanoseconde et la milliseconde, en fonction de la température et de la viscosité du milieu.

- Polarisation de charge d'espace : Ce phénomène se manifeste dans les milieux électrolytiques, où les charges libres peuvent migrer sous l'effet d'un champ électrique. En conséquence, les charges s'accumulent aux interfaces, induisant un déséquilibre local, bien que l'ensemble du matériau reste globalement neutre.

Dans les milieux électrolytiques, l'application d'un champ électrique induit une accumulation d'ions aux interfaces, notamment sur les électrodes. Cette organisation localisée des charges donne naissance à une double couche électrochimique.

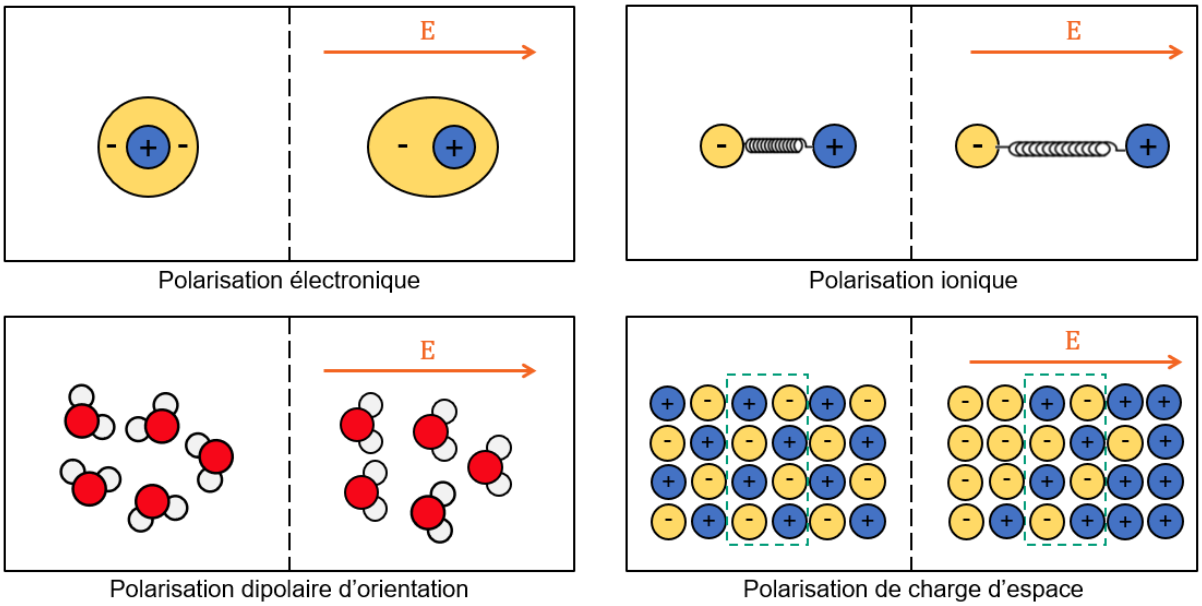


Figure E-4 : Polarisations des matériaux.

Notion de double couche électrochimique

Lorsque qu'un potentiel est appliqué entre une électrode et une solution électrolytique, une redistribution des ions est observée à leur interface. Au fil du temps, plusieurs modèles ont été proposés pour décrire la distribution des charges à cette interface, chacun apportant des améliorations progressives [334]. Ces modèles sont illustrés à la Figure E-5.

Le premier modèle, proposé par Helmholtz en 1879, décrit la double couche électrique comme une couche compacte d'ions opposés à la charge de l'électrode, adsorbés à sa surface. Dans ce cadre, les co-ions sont repoussés, tandis que les contre-ions sont attirés et immobilisés à proximité immédiate de l'électrode. Cette structure est comparable à un condensateur diélectrique classique, formé de deux plaques planaires séparées par une distance fixe H [334]. Ce modèle présente toutefois des limites et ne permet pas de décrire le comportement électrochimique observé en conditions réelles.

Le modèle de Gouy-Chapman, proposé en 1913, introduit une amélioration majeure en considérant que les ions de l'électrolyte sont thermiquement agités et se distribuent de manière diffuse autour de l'électrode [335], [336]. Les charges s'étalent ainsi dans l'espace selon un équilibre entre les forces électrostatiques et le phénomène de diffusion [334]. Malgré son avancée, ce modèle suppose une distribution continue et monotone des charges, ce qui peut ne pas être entièrement précis dans tous les contextes électrochimiques. Ce modèle rend mieux compte des phénomènes observés dans les solutions électrolytiques, notamment la décroissance du potentiel électrique avec la distance. Cependant, il suppose une distribution continue, monotone et idéale des charges, qui est trop simpliste notamment à fortes concentrations ioniques.

En 1924, le modèle de Stern vient combiner les deux approches précédentes. Il propose une structure en deux régions : une couche compacte formée d'ions immobiles, fortement adsorbés à la surface de l'électrode, suivie d'une couche diffuse dans laquelle les ions sont libres de se répartir selon les lois de Gouy-Chapman [337]. Ce modèle hybride décrit la capacité interfaciale totale comme la mise en série des capacités associées à la couche compacte et à la couche diffuse. Il permet ainsi de mieux représenter la complexité des interactions à l'interface électrode/électrolyte.

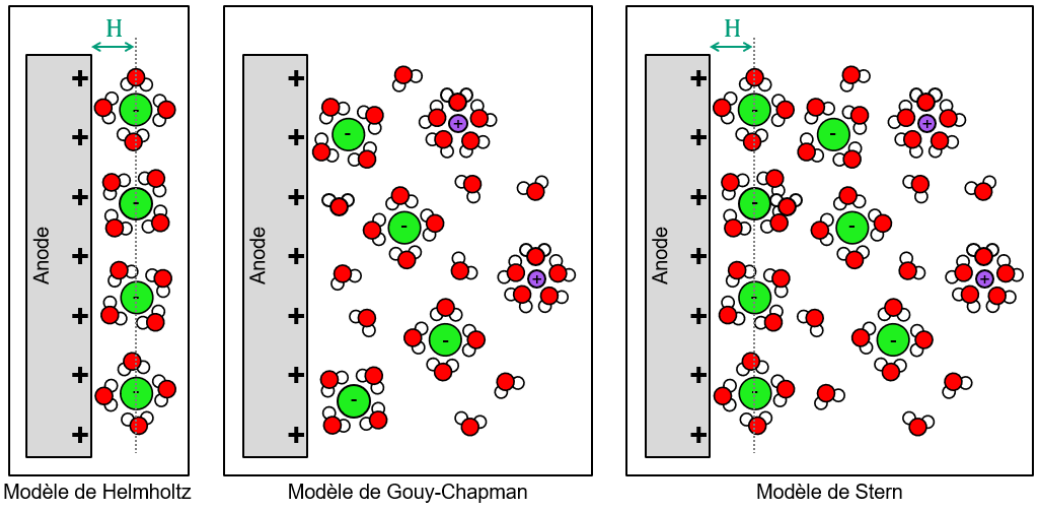


Figure E-5 : Modèles de double couche électrochimique.

Les trois modèles précédemments expliqués sont schématisés. (a) correspond au modèle de Helmholtz composé d'une couche compacte d'ions adsorbés à la surface de l'électrode. L'analogue électrique de ce modèle est un condensateur composé de deux électrodes distantes de H. (b) correspond au modèle de Gouy-Chapman ayant une couche diffuse. Enfin, (c) correspond au modèle de Stern reprendant la couche compacte et la couche diffuse des deux modèles précédents.

Ainsi, les concepts depuis les propriétés fondamentales des matériaux électrolytiques jusqu'aux comportements spécifiques des cellules sous champ électrique, permettent d'appréhender comment la matière biologique interagit avec une excitation électrique. En reliant les phénomènes microscopiques, tels que la polarisation, la conductivité ou la formation de double couche, aux réponses observées expérimentalement. Ces phénomènes constituent les bases nécessaires à l'élaboration de modèles électriques représentatifs des milieux biologiques.

Annexe E : Modèles théoriques de la réponse biologique

Afin de représenter de façon simplifiée mais fidèle la réponse électrique des tissus biologiques, divers modèles théoriques ont été proposés. Certains, comme les modèles de Debye ou Cole-Cole, adoptent une approche phénoménologique basée sur la relaxation diélectrique. D'autres s'appuient sur la structure cellulaire, tels que le modèle de cellule en suspension, ou encore le modèle de monocouche cellulaire, particulièrement adapté à l'étude des tissus épithéliaux comme l'intestin.

Modèle de Debye

Le modèle de Debye, introduit en 1929, constitue la première approche théorique pour décrire la réponse électrique des milieux polarisables. Appliqué aux cellules biologiques, ce modèle représente la membrane comme un circuit électrique élémentaire composé d'une capacité C_m en parallèle avec une résistance R_m. La capacité modélise l'accumulation de charges de part et d'autre de la membrane, tandis que la résistance rend compte de la conductance membranaire liée aux canaux ioniques, comme illustré à la Figure E-1.

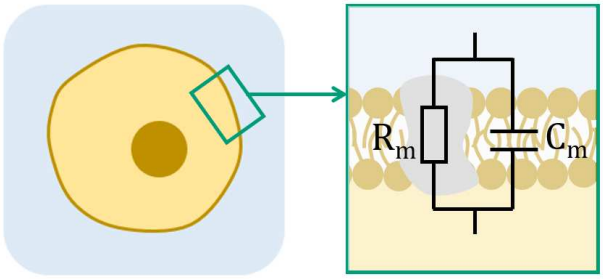


Figure E-1 : Modèle de Debye.

(a) Schéma de la cellule, dont la membrane cellulaire a volontairement été mis en évidence, par un contour marron marqué. (b) Schéma électrique équivalent d'une cellule, ayant de deux composants : une résistance R_m et une capacité C_m, représentant la membrane cellulaire.

Ce modèle permet de décrire la réponse de la cellule à basse fréquence, lorsque les charges ont le temps de s'accumuler contre la membrane. Toutefois, il repose sur l'hypothèse d'une relaxation unique et homogène, ce qui ne permet pas de rendre compte de la diversité des temps de relaxation observés expérimentalement dans les membranes biologiques.

Modèle de Cole-Cole

Le modèle de Cole-Cole a été proposé pour dépasser cette simplification. Il introduit une distribution statistique des constantes de temps de relaxation afin de mieux représenter la réponse électrique complexe des tissus biologiques : les différents types de dipôles présents dans les membranes cellulaires ont des temps de relaxation différents. Comme illustré à la Figure E-2, cette approche repose sur l'ajout d'un élément Z_{CPE} (Constant Phase Element),

permettant de modéliser un comportement non idéal, intermédiaire entre celui d'une capacité et d'une résistance. Ainsi, il reproduit les comportements électriquement dispersifs observés dans les tissus biologiques [338].

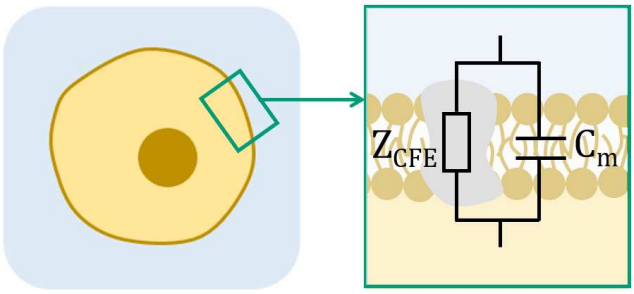


Figure E-2 : Modèle de Cole-Cole.

Malgré cette amélioration, ce modèle reste limité au niveau cellulaire et ne prend pas en compte les milieux intracellulaire et extracellulaire dans lesquels évolue la cellule.

Modèle d'une cellule en suspension

Contrairement aux modèles décrits précédemment, le modèle Fricke tient également compte de l'environnement dans lequel est la cellule, c'est-à-dire aux milieux intracellulaire et extracellulaire. Ce modèle est donc particulièrement pertinent pour étudier des cellules dans leur milieu physiologique [339] [340] [341]. Le schéma électrique équivalent, disponible à la Figure E-3 associe la résistance R_{ex} du milieu extracellulaire, la capacité C_m de la membrane, et la résistance R_{cy} du cytoplasme. Ce modèle permet ainsi de simuler le comportement électrique d'une cellule en suspension dans un milieu conducteur, de façon plus réaliste.

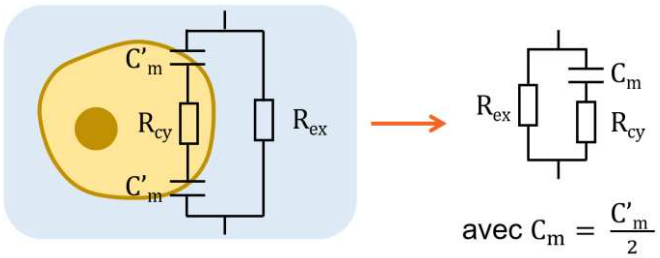


Figure E-3 : Modèle de Fricke, équivalent électrique d'une cellule en suspension.

Le modèle de Fricke prend en compte les interactions électriques entre les différents composants de la cellule et leur environnement, ce qui permet de mieux comprendre les processus électrophysiologiques. Il offre une représentation réaliste des phénomènes observés, tels que la perméabilité ionique à travers la membrane, les gradients de potentiel et les réponses électriques lors de stimulations externes [339] [340] [341]. Néanmoins, le modèle de Fricke reste limité à une cellule isolée et ne permet pas de prendre en compte les interactions intercellulaires qui deviennent essentielles dans les tissus organisés.

Modèle d'une monocouche de cellules

Le modèle électrique d'une monocouche cellulaire représente une avancée majeure dans la modélisation des propriétés des barrières épithéliales. Lorsqu'un courant traverse un tapis cellulaire, il peut emprunter deux voies : transcellulaire (à travers les cellules) ou paracellulaire (entre les cellules adjacentes). Ce modèle reprend les éléments du modèle de Fricke pour la voie transcellulaire et y ajoute des composants supplémentaires pour représenter le passage du courant paracellulaire. La résistance R_{js} modélise les jonctions serrées et la résistance R_i représente la mince couche de liquide interstitiel séparant les cellules [342]. Ces composants supplémentaires représentatif de l'environnement permettent de capturer les mécanismes de transport paracellulaire et transcellulaire qui sont cruciaux pour comprendre le comportement des barrières épithéliales [343], [344], [345].

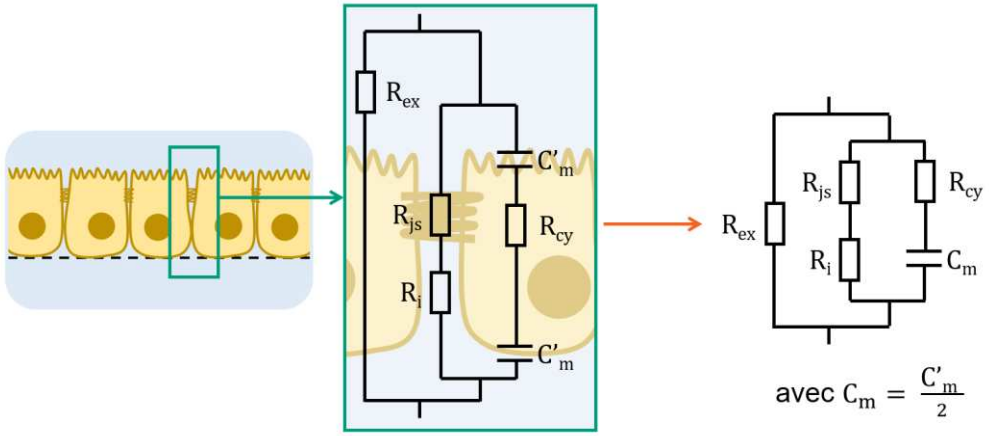


Figure E-4 : Modèle équivalent électrique d'un tapis cellulaire.

Ainsi, les modèles électriques équivalents, qu'il s'agisse des premières approches empiriques de Debye et Cole-Cole, des modèles pour cellules en suspension ou des représentations plus élaborées des monocouches épithéliales, constituent un cadre théorique solide pour appréhender la réponse électrique des tissus biologiques. Ces modèles trouvent des applications concrètes en biologie, notamment à travers la mesure de la résistance électrique transépithéliale, aujourd'hui utilisée comme méthode de référence pour évaluer l'intégrité et la fonctionnalité des barrières épithéliales.

Annexe F : Préparation histologique des échantillons membranaires

Ce protocole décrit la préparation histologique de cocultures Caco-2 : HT29-MTX au ratio 9:1 cultivées sur membrane poreuses en PET fonctionnalisées à la fibronectine. Elle est utilisée pour l'évaluation du mucus et de l'organisation cellulaire. La coloration au bleu alcian met en évidence les mucopolysaccharides acides constituant le mucus, tandis que la contre-coloration à l'hématoxyline révèle les noyaux cellulaires.

- **Fixation.** Après 21 jours de culture, les membranes sont prélevées et fixées 15 min dans du méthacarn (60 % (v/v) méthanol, 30 % (v/v) chloroforme, 10 % (v/v) acide acétique glacial) pendant 15 min, puis rincées dans du PBS pendant 5 min.

- **Coupe transversales (facultatif).** Les membranes sont incluses en paraffine puis sectionnées au microtome en coupes de 8 µm. Le déparaffinage est effectué par deux immersions successives de 3 min dans de l'histoclear suivies d'une série de réhydratations dans des bains d'éthanol décroissants (100 % 2 × 3 min, 95 % 3 min, 70 % 3 min, 50 % 3 min). Les échantillons sont ensuite rincés 5 min dans du PBS, puis 5 min dans de l'EDI afin d'éliminer les sels et prévenir la formation de cristaux.

- **Coloration histologiques.** Les membranes sont rincées dans du PBS, puis immergées 3 min dans une solution d'acide acétique à 3 %. Elles sont ensuite incubées pendant 30 min dans une solution filtrée de bleu alcian, puis rincées à nouveau trois fois au PBS. Une contre-coloration est réalisée par incubation 3 min dans une solution d'hématoxyline diluée à 1/8. Enfin, elles sont rincées à l'EDI et séchées.

- **Observation.** Les échantillons sont examinés au microscope optique équipé d'une caméra couleur.

Annexe G : Modélisation et évaluation des effets parasites du banc de mesure

Lors de la caractérisation des IDT montées sur PCB, l'impédance mesurée n'est pas uniquement représentative de l'échantillon étudié, mais inclut également les contributions parasites introduites par le montage expérimental. Ces contributions proviennent de plusieurs phénomènes physiques :

- Les résistances de connexion correspondent aux pertes localisées aux interfaces électriques. Elles peuvent apparaître aussi bien au niveau des contacts mécaniques ressort/PCB que lors du serrage des connecteurs coaxiaux. Leur contribution s'ajoute en série à l'impédance du dispositif et se traduit principalement par une augmentation artificielle de la composante réelle, notamment en basses fréquences où la partie résistive domine la réponse mesurée.

- Les inductances de câblage dépendent de la géométrie et de la longueur des conducteurs reliant l'échantillon à l'instrumentation. Dans le montage expérimental, elles proviennent des pistes du PCB et des câbles coaxiaux. Leur effet devient significatif au-delà du MHz, où une composante inductive artificielle peut masquer la réponse de l'échantillon.

- Les capacités parasites proviennent du couplage électrostatique entre conducteurs voisins ou vis-à-vis de la masse. Elles sont introduites principalement par les pistes du PCB et par le blindage des câbles coaxiaux. Leur contribution, équivalente à une impédance parallèle, tend à diminuer artificiellement l'impédance mesurée, avec un impact croissant à haute fréquence.

Le montage expérimental peut ainsi être représenté par un modèle équivalent intégrant ces différents éléments parasites, comme illustré en Figure G-1.

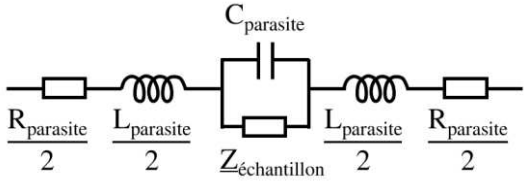


Figure G-1 : Modèle équivalent de l'impédance mesurée expérimentalement intégrant les effets parasites série et parallèle.

Ce modèle illustre la représentation simplifiée de la chaîne de mesure. L'impédance propre de l'échantillon $\underline{Z}_{échantillon}$ est perturbée par des résistances et inductances parasites placées en série ($R_{parasite}$, $L_{parasite}$) et par une capacité parasite en parallèle ($C_{parasite}$).

Afin de corriger l'influence des éléments parasites, une procédure de compensation peut être mise en œuvre sur la base de deux mesures de référence. La première est réalisée en court-

circuit, l'échantillon étant remplacé par un conducteur métallique. Cette configuration permet d'isoler les contributions en série liées aux résistances et aux inductances parasites, comme illustré en Figure G-2, grâce à l'Équation G-1. La seconde est effectuée en circuit ouvert, l'échantillon étant retiré du montage. Elle met en évidence les effets capacitifs parasites en parallèle, comme montré en Figure G-3.

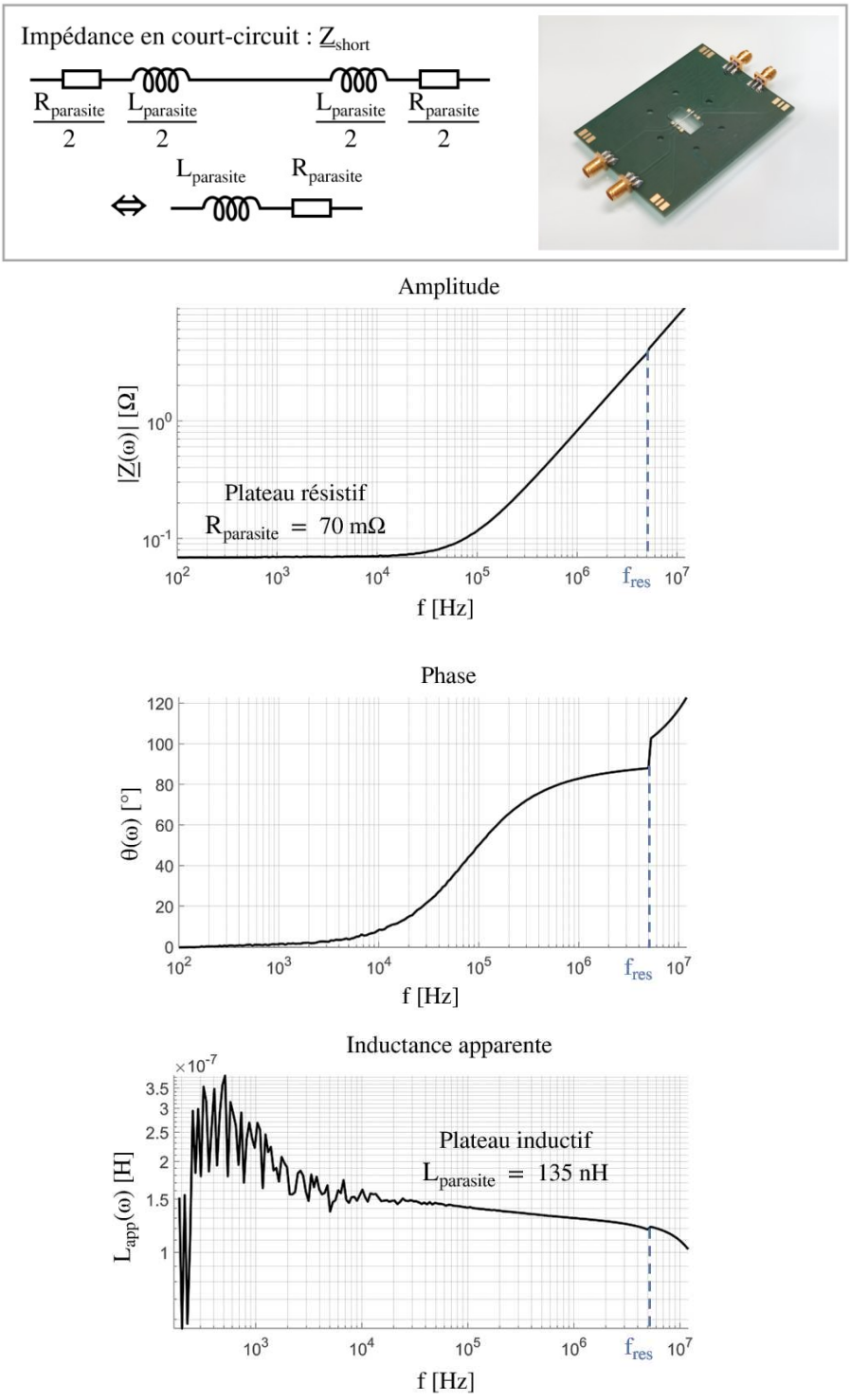


Figure G-2 : Mesure en court-circuit : identification des contributions parasites série ($R_{parasite}$ et $L_{parasite}$).

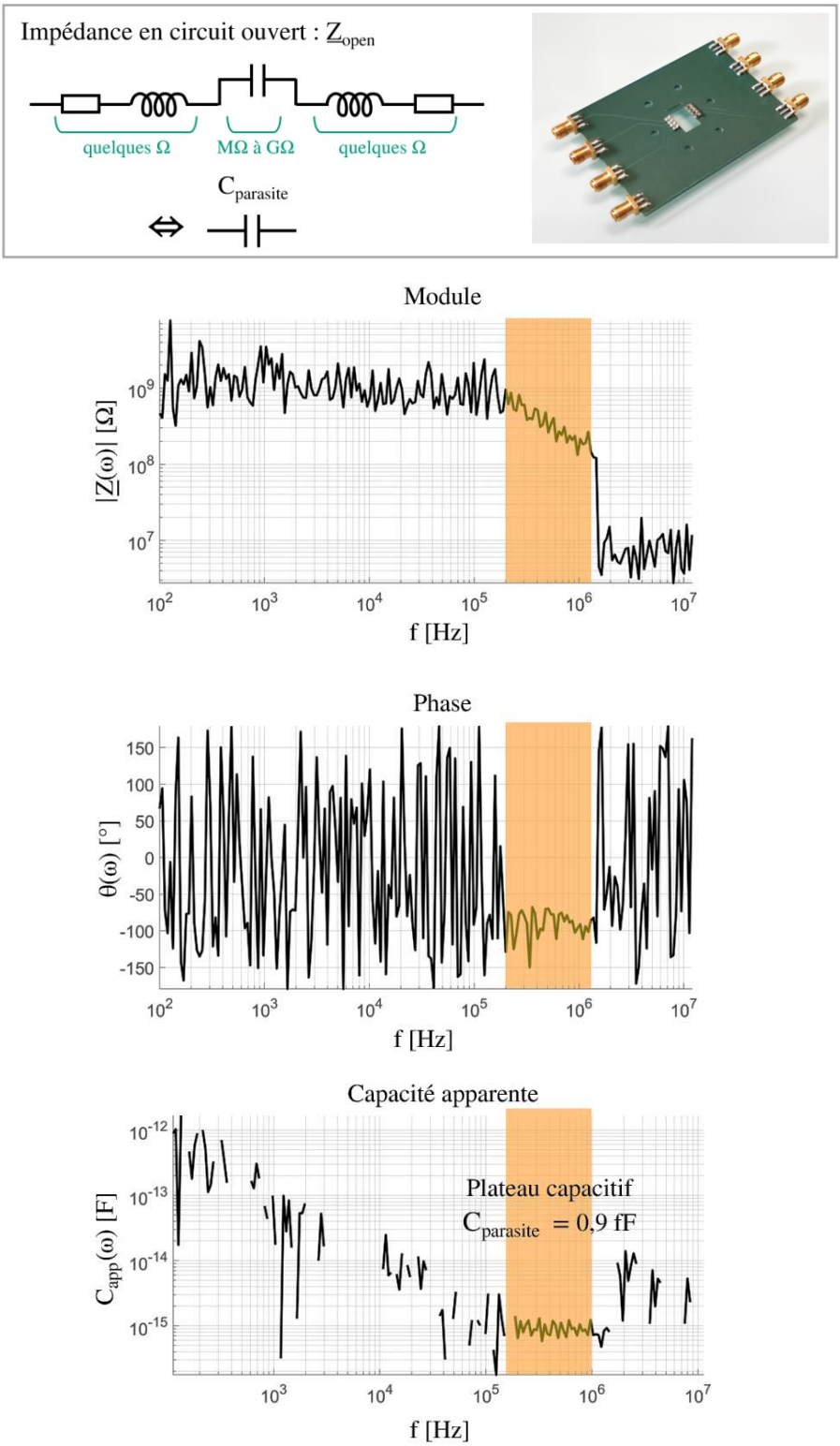


Figure G-3 : Mesure en circuit ouvert : identification des contributions parasites parallèles ($C_{parasite}$).

$$L_{app} = \frac{\Im\ \underline{Z}(\omega)}{\omega}$$

Équation G-1 : Inductance apparente.

Les mesures en court-circuit et en circuit ouvert permettent d'identifier directement les valeurs caractéristiques des éléments parasites. La partie résistive observée en court-circuit conduit à une estimation de $R_{parasite} \approx 70\ m\Omega$ tandis que la pente inductive observée aux hautes fréquences correspond à $L_{parasite} \approx 135\ nH$. De plus, un phénomène de résonance apparaît à hautes fréquence : celui-ci se situe à $f_{res} \approx 4 \times 10^6$ Hz, en dehors de la bande de mesure d'intérêt, et n'impacte donc pas l'exploitation des résultats. De la même manière, le comportement capacitif mesuré en circuit ouvert conduit à une estimation de $C_{parasite} \approx 0{,}9\ fF$. Ces paramètres permettent de définir un modèle simplifié de l'impédance mesurée, représenté en Figure G-4.

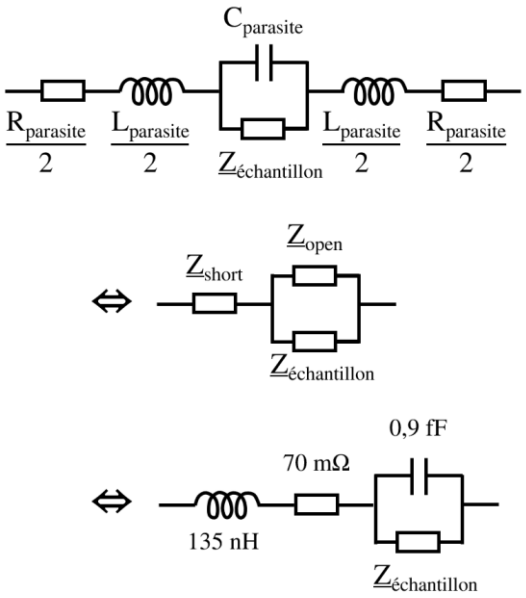


Figure G-4 : Modèle équivalent paramétré du banc de mesure.

L'influence des éléments parasites du banc de mesure est évaluée en les exprimant sous la forme d'une erreur relative sur l'impédance mesurée. Le montage de mesure est représenté par l'association de l'impédance propre de l'échantillon $\underline{Z}_{échantillon}$ avec :

- une impédance série issue des résistances et inductances parasites, identifiée par la mesure en court-circuit :

$$\underline{Z}_{short} = R_{parasite} + j\,\omega L_{parasite}$$

- une impédance parallèle issue des capacités parasites, identifiée par la mesure en circuit ouvert :

$$\underline{Z}_{open} = R_{parasite} + j\,\omega L_{parasite}$$

L'objectif est d'évaluer l'erreur relative introduite par ces éléments parasites dans la mesure d'impédance.

Contribution série

Dans le cas série, l'impédance mesurée est la somme de l'échantillon et de l'impédance obtenue en court-circuit :

$$\underline{Z}_{total} = \underline{Z}_{échantillon} + \underline{Z}_{court-circuit}$$

L'erreur relative est définie comme :

$$Err_{série}(\omega) = \frac{\left|\underline{Z}_{total}\right| - \left|\underline{Z}_{échantillon}\right|}{\left|\underline{Z}_{échantillon}\right|}$$

En considérant $\left|\underline{Z}_{short}\right| \ll \left|\underline{Z}_{échantillon}\right|$, l'expression se majore par :

$$Err_{série}(\omega) \leq \frac{\left|\underline{Z}_{short}\right|}{\left|\underline{Z}_{échantillon}\right|} = \frac{\sqrt{R_{parasite}^2 + \left(\omega L_{parasite}\right)^2}}{\left|\underline{Z}_{échantillon}\right|}$$

Contribution parallèle

Dans le cas parallèle, l'impédance mesurée s'écrit :

$$\frac{1}{\underline{Z}_{total}} = \frac{1}{\underline{Z}_{échantillon}} + \frac{1}{\underline{Z}_{open}}$$

Ainsi :

$$\underline{Z}_{total} = \frac{\underline{Z}_{échantillon}}{1 + \frac{\underline{Z}_{échantillon}}{\underline{Z}_{open}}}$$

En supposant que $\left|\underline{Z}_{open}\right| \gg \left|\underline{Z}_{échantillon}\right|$, un développement limité conduit à :

$$\underline{Z}_{total} = \underline{Z}_{échantillon}\left(1 - \frac{\underline{Z}_{échantillon}}{\underline{Z}_{open}}\right)$$

L'écart relatif peut alors être écrit :

$$\mathrm{Err}_{\text{parallèle}}(\omega) = \frac{|\underline{Z}_{\text{total}}| - |\underline{Z}_{\text{échantillon}}|}{|\underline{Z}_{\text{échantillon}}|} \leq \frac{|\underline{Z}_{\text{échantillon}}|}{\underline{Z}_{\text{open}}} = \frac{|\underline{Z}_{\text{échantillon}}|}{\frac{1}{\omega C_{\text{parasite}}}}$$

Erreur relative majorée

En combinant les deux contributions, une expression majorée de l'erreur relative globale est obtenue :

$$\mathrm{Err}(\omega) \leq \mathrm{Err}_{\text{série}}(\omega) + \mathrm{Err}_{\text{parallèle}}(\omega)$$

Soit, en substituant les expressions :

$$\mathrm{Err}(\omega) \leq \frac{\sqrt{R_{\text{parasite}}^2 + \left(\omega L_{\text{parasite}}\right)^2}}{|Z_{\text{échantillon}}|} + |Z_{\text{échantillon}}| \times \omega C_{\text{parasite}}$$

Il convient de noter que seuls les modules des impédances sont considérés dans ce développement. Les phases sont négligées, ce qui évite une modélisation vectorielle complexe mais conduit à une estimation conservatrice. L'expression obtenue correspond donc à une borne supérieure : l'erreur réelle est nécessairement inférieure ou égale aux valeurs calculées. Cette formulation fournit ainsi un critère quantitatif fiable pour juger de la pertinence d'une procédure de compensation.

L'équation est implémentée sous MATLAB (MathWorks, États-Unis) afin de calculer l'erreur sur une plage de fréquences comprise entre 10^2 et 10^7 Hz et de modules d'impédance d'échantillon compris entre 10^1 et 10^6 Ω. L'erreur est représentée en pourcentage sous forme de carte, disponible en Figure G-5. Cette représentation permet d'identifier clairement les zones où l'erreur est négligeable et celles où les effets parasites deviennent significatifs.

Dans la plage de fréquences et d'impédances correspondant aux capteurs étudiés, l'erreur reste inférieure à 1 %. Des écarts plus marqués, dépassant ce seuil, n'apparaissent que dans des configurations extrêmes, à très hautes fréquences (au-delà du MHz) et pour de faibles impédances (inférieures à 100 Ω), qui ne correspondent pas aux conditions expérimentales. Ainsi, la compensation systématique des effets parasites du banc de mesure n'est pas nécessaire : les mesures effectuées sans correction décrivent fidèlement l'impédance des échantillons.

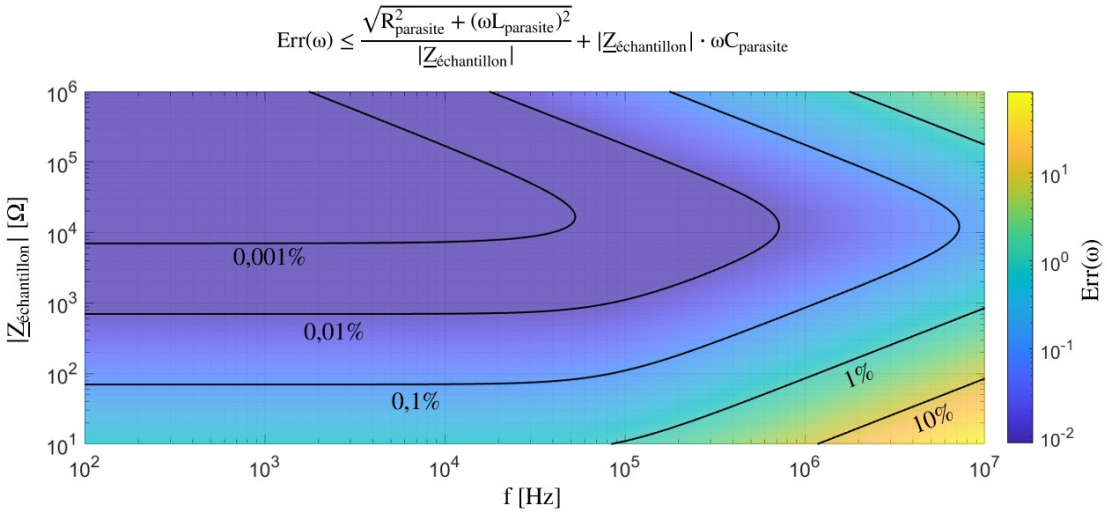


Figure G-5 : Carte de l'erreur relative maximale introduite par les éléments parasites du banc de mesure.

Carte calculée en fonction de la fréquence et du module de l'impédance de l'échantillon, avec représentation colorée de l'erreur relative et isolignes à 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 % et 10 %.

Annexe H : Détermination du facteur de forme par simulations par éléments finis

La détermination du facteur de forme commence par une modélisation numérique par éléments finis destinée à calculer $k_{simulé}$ pour chacune des géométries d'IDT. Cette étape fournit une valeur de référence qui servira de base de comparaison avec les résultats expérimentaux.

Les calculs sont effectués avec COMSOL Multiphysics® (COMSOL AB, Suède). Le système est modélisé par une goutte de liquide électrolytique en forme de demi-sphère de rayon 5 mm déposée sur les électrodes. Ce rayon, largement supérieur à la profondeur de pénétration du champ, garantit le confinement des lignes de champ dans le liquide et limite les effets de bord. Les électrodes sont représentées comme un réseau de doigts, dont seule la portion active est modélisée : cette hypothèse repose sur l'idée que les pistes recouvertes par l'isolant présentent une impédance élevée et ne participent pas significativement au transport de charges. Le domaine est discrétisé par un maillage raffiné et la résolution est effectuée en régime stationnaire. La Figure H-1 illustre le cas de l'IDT4, avec la géométrie simulée et la distribution du potentiel électrique. L'alternance des doigts reliés à la masse et au potentiel apparaît clairement, en accord avec la périodicité attendue du champ.

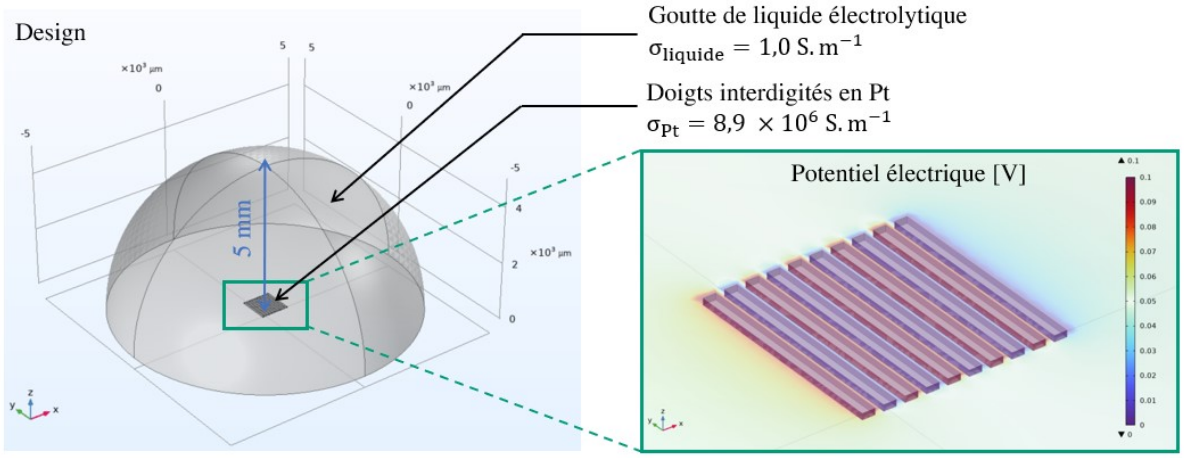


Figure H-1 : Modèle numérique 3D pour la détermination du facteur de forme, cas de l'IDT4.

Représentation 3D du modèle comprenant une goutte de liquide électrolytique ($\sigma_{liquide} = 1{,}0\ S.m^{-1}$) déposée sur un réseau d'électrodes interdigitées en platine ($\sigma_{Pt} = 8{,}9 \times 10^6\ S.m^{-1}$). L'encadré montre la distribution du potentiel électrique obtenue en régime stationnaire, où l'alternance des doigts portés à la masse et au potentiel impose la périodicité du champ.

Le facteur de forme est ensuite déterminé à partir de la résistance comme explicité à l'Équation H-1:

$$k_{simulé} = \sigma_{liquide} \times R_{simulé}$$

Équation IVH-1 : Facteur de forme simulé.

Avec :

$k_{simulé}$	le facteur de forme simulé, en [m^{-1}]
$\sigma_{liquide}$	la conductivité du liquide électrolytique, en [$S.m^{-1}$]
$R_{simulé}$	la résistance du système, en [Ω]

Les facteurs de formes déterminés par simulations numériques sont : $k_{simulé,IDT1} = 19{,}36\ m^{-1}$, $k_{simulé,IDT2} = 38{,}46\ m^{-1}$, $k_{simulé,IDT3} = 77{,}23\ m^{-1}$ et $k_{simulé,IDT4} = 163{,}7\ m^{-1}$, comme illustré en Figure H-2**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**. Ces valeurs se situent dans l'ordre de grandeur attendu pour des électrodes interdigitées micrométriques : la littérature rapporte, pour des géométries comparables, des facteurs de forme compris entre une dizaine et quelques centaines de m^{-1}, ce qui conforte la validité des résultats obtenus [294].

Entre configurations successives, le rapport des facteurs de forme est proche de deux. Cette proportionnalité s'explique par l'évolution des paramètres géométriques : la longueur des doigts L et la surface totale de l'électrode sont maintenues constantes, tandis que la largeur W et l'espacement G des doigts sont doublés et que le nombre de doigts N est divisé par deux. L'électrode comporte alors deux fois moins d'unités interdigitées en parallèle, mais chaque paire d'électrodes sonde un volume de liquide environ deux fois plus grand. La redistribution des lignes de champ qui en résulte double la résistance mesurée et, par conséquent, le facteur de forme.

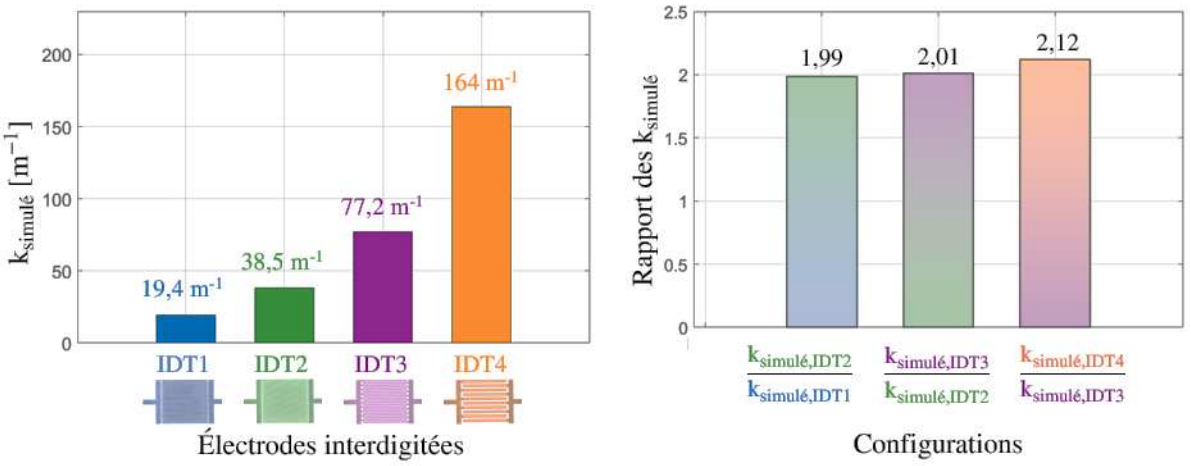


Figure H-2 : Facteur de forme simulé $k_{simulé}$ des IDT.

Évolution du facteur de forme obtenu par simulation numérique pour quatre géométries d'électrodes interdigitées (IDT1 à IDT4). Les valeurs simulées sont respectivement 19,4 m^{-1} 38,5 m^{-1}, 77,2 m^{-1} et 164 m^{-1}. Chaque passage d'une configuration à la suivante conduit au doublement de $k_{simulé}$.

Annexe I : Signature fréquentielle caractéristique des milieux électrolytiques et biologiques

La réponse fréquentielle d'un électrolyte pur diffère de celle d'un fluide contenant des cellules vivantes, comme illustré en Figure I-1.

- Dans le cas d'un électrolyte dépourvu de structure cellulaire, le module de l'impédance $|\underline{Z}(\omega)|$ atteint un plateau unique aux fréquences intermédiaires, correspondant à la conductivité de la solution.

- En revanche, les matériaux biologiques présentent une évolution de $|\underline{Z}(\omega)|$ caractérisée par deux plateaux successifs [212]. À basse fréquence, les membranes cellulaires, de nature capacitive, s'opposent au passage du courant, qui circule alors principalement dans les espaces extracellulaires et paracellulaires. Lorsque la fréquence augmente, la réponse est dominée par la capacité membranaire. À haute fréquence, le champ traverse les membranes et atteint les compartiments intracellulaires, tout en poursuivant sa propagation dans le milieu extracellulaire [285].

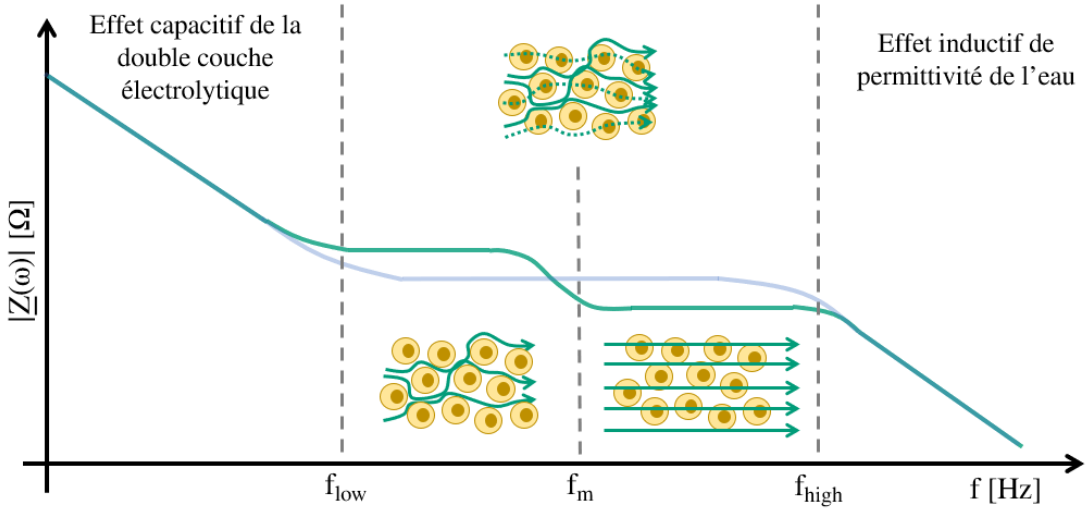


Figure I-1 : Allure caractéristique de la réponse fréquentielle des matériaux biologiques et d'un électrolyte pur.

Évolution du module de l'impédance $|\underline{Z}(\omega)|$ en fonction de la fréquence pour une solution électrolytique (bleu) et un milieu cellulaire (vert). L'électrolyte présente un plateau unique lié à sa conductivité, tandis que le fluide biologique montre deux plateaux successifs.

Cette évolution fréquentielle caractéristique permet d'identifier clairement la présence et l'organisation de structures cellulaires au sein d'un milieu conducteur.

Annexe J : Compensation électrochimique appliquée aux mesures cellulaires

Cette annexe détaille la procédure de compensation électrochimique mentionnée dans la section IV.2.D.b. Lors du suivi de cocultures épithéliales par spectroscopie d'impédance, la réponse fréquentielle brute est parasitée aux extrémités de la bande de mesure. Deux contributions dominent, comme illustré en Figure J-1 :

- À basse fréquence, jusqu'à environ 8×10^4 Hz, la réponse est dominée par la capacité de la double couche électrochimique C_{dl} qui se traduit par un comportement capacitif marqué.

- À haute fréquence, au-delà de 1×10^6 Hz, la réponse présente un caractère inductif lié à la fois à la permittivité de l'eau et à l'utilisation de longs câbles coaxiaux d'environ 2 m reliant le PCB placé dans l'incubateur à l'impédancemètre situé à l'extérieur.

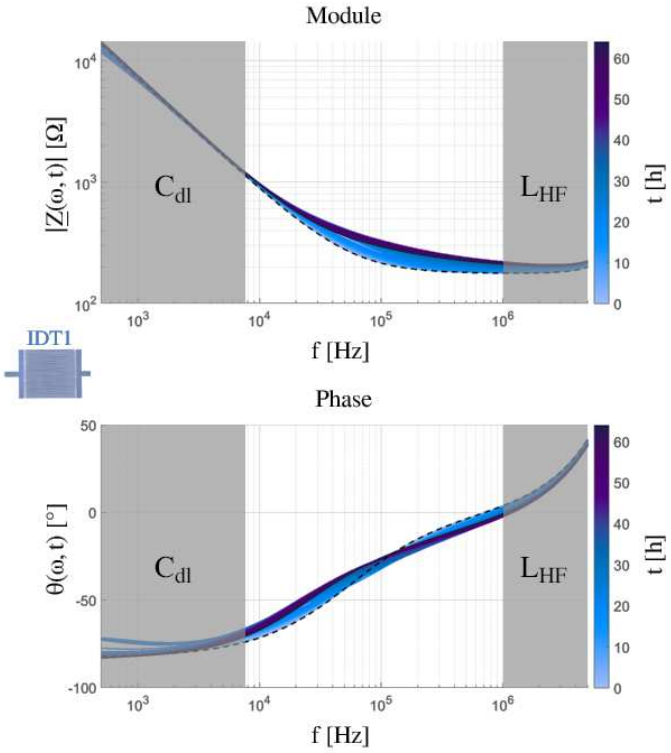


Figure J-1 : Évolution du module $|\underline{Z}(\omega, t)|$ et de la phase $\theta(\omega, t)$ mesurés par l'IDT1 lors du suivi d'une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) sur l'IDT1 pendant 65 h.

Le diagramme de Bode met en évidence trois zones distinctes. À basse fréquence (<10^4 Hz), la réponse est dominée par la capacité de double couche électrochimique C_{dl} ce qui entraîne une forte décroissance du module et un déphasage marqué. À haute fréquence (>10^6 Hz), un comportement inductif apparaît, lié à la permittivité du milieu aqueux et à l'inductance parasite des câbles coaxiaux. Les spectres sont représentés en fonction du temps, codé en couleur (du bleu clair à t=0 h au violet foncé à t=65 h). Le tracé en pointillé noir correspond à la mesure de référence réalisée avec du milieu de culture seul.

Ces contributions masquent partiellement le signal d'intérêt et peuvent être compensées pour agrandir la plage fréquentielle utile.

Procédure de compensation

La procédure de compensation repose sur l'estimation des contributions parasites à partir de fréquences de référence choisies en dehors des zones influencées par les cellules.

- À basse fréquence, l'évaluation se fait dans l'intervalle $[5 \times 10^2;\ 8 \times 10^4]$ Hz. Une fréquence trop proche de la limite supérieure risquerait d'intégrer une contribution cellulaire. Le calcul est donc réalisé à $f_{BF} = 7 \times 10^2$ Hz, en effectuant une moyenne locale sur six points autour de la fréquence de référence, de façon à obtenir une estimation plus robuste et moins bruitée de la capacité apparente. La capacité de double couche obtenue est $C_{app}(f_{BF}) = C_{dl} = 28{,}5$ nF. Cet ordre de grandeur est en accord avec la littérature, qui rapporte des valeurs de capacité de double couche comprises entre 10 et 100 nF, en fonction des propriétés de l'électrode et de l'électrolyte utilisé [346].

- À haute fréquence, l'inductance parasite est estimée en choisissant une fréquence suffisamment élevée pour éviter toute influence cellulaire, mais inférieure aux zones de résonance instrumentale. La valeur retenue est $f_{HF} = 4 \times 10^6$ Hz ce qui conduit à une inductance $L_{app}(f_{HF}) = L_{HF} = 4{,}27$ µH, compatible avec l'effet attendu de câbles coaxiaux de plusieurs mètres.

Correction appliquée

Une fois C_{dl} et L_{HF} estimés, l'impédance est corrigée en soustrayant ces contributions parasites, selon l' Équation J-1 :

$$\underline{Z}_{comp}(\omega, t) = \Re\ \underline{Z}(\omega, t) \quad + j\ \Im\ \underline{Z}(\omega, t) \quad - \omega L_{HF} + \frac{1}{\omega C_{dl}}$$

Équation J-1 : Impédance complexe compensée.

Signaux compensés

La Figure J-2 illustre l'effet de la compensation électrochimique. À haute fréquence, la phase devient négative après correction, en accord avec le comportement attendu pour des électrodes en milieu électrolytique. À basse fréquence, la correction réduit l'influence de la double couche électrochimique, ouvrant une plage supplémentaire de réponse exploitable. La fenêtre fréquentielle utile passe ainsi de $[8 \times 10^4;\ 1 \times 10^6]$ Hz avant correction à $[5 \times 10^3;\ 5 \times 10^6]$ Hz après correction, soit un gain de plus d'une décade en basses fréquences et d'un facteur 5 en hautes fréquences. Cette amélioration permet d'analyser plus finement la réponse associée au suivi du tapis épithélial.

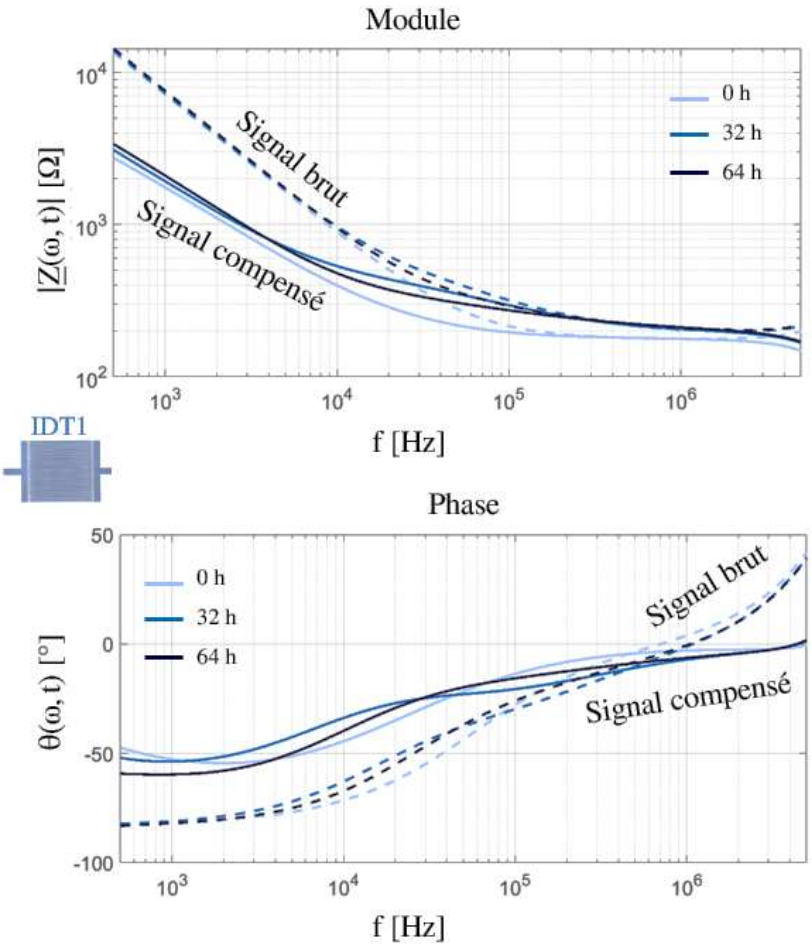


Figure J-2 : Comparaison du module $|\underline{Z}(\omega,t)|$ et de la phase $\theta(\omega,t)$ des impédances complexes brute et compensée.

Les courbes représentent l'évolution de l'impédance complexe avant (pointillés) et après (traits pleins) compensation électrochimique, pour trois temps représentatifs : 0 h (bleu clair), 32 h (bleu moyen) et 64 h (bleu foncé). La compensation permet de réduire l'influence de la capacité de double couche à basse fréquence (< 10^4 Hz) et des artefacts inductifs à haute fréquence (> 10^6 Hz).

Annexe K : Perspectives d'automatisation du protocole de mesure

Dans l'architecture actuelle, chaque électrode montée sur PCB est reliée manuellement à l'analyseur d'impédance au moyen de câbles coaxiaux. Lorsqu'il est nécessaire de modifier l'IDT interrogée, les connexions doivent être reconfigurées à la main, ce qui rend le protocole long et contraignant. Cette manipulation répétée constitue également une source de variabilité expérimentale : l'ouverture fréquente de l'incubateur entraîne des vibrations mécaniques et une baisse transitoire de la température, susceptibles d'affecter les mesures.

Afin de pallier ces limitations, une évolution envisagée consiste à intégrer des commutateurs différentiels, permettant de sélectionner automatiquement l'IDT à interroger. Cette approche vise à supprimer l'intervention manuelle dans le routage des signaux et à accroître la reproductibilité des protocoles.

Le principe de cette organisation est présenté en Figure K-1. Deux commutateurs différentiels (2 → 2×8) assurent le routage simultané des lignes de courant (Lcur, Hcur) et de potentiel (Lpot, Hpot). Chaque paire de lignes correspond ainsi à une électrode interdigitée (IDT) donnée. La sélection de l'IDT active est ensuite réalisée par un étage supplémentaire de commutation (1 → 8), qui distribue le signal de commande aux blocs différentiels.

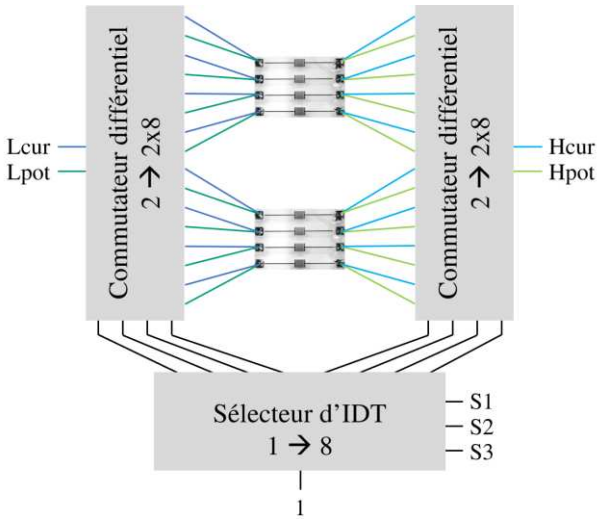


Figure K-1 : Architecture de commutation différentielle pour la sélection automatique des IDT.

Cette organisation permet d'automatiser l'adressage des IDT tout en conservant la configuration de mesure à quatre fils. Elle réduit les manipulations manuelles, diminue la variabilité et ouvre la voie à des séquences de mesures rapides et reproductibles sur un grand nombre d'échantillons.

Références bibliographiques

[1] K. M. van de Graaff, « Anatomy and physiology of the gastrointestinal tract », Pediatric Infectious Disease, vol. 5, n°11, pp. S11-S16, 1986.

[2] J. W. Heath, A. Stevens et B. Young, Altas d'histologie fonctionnelle de Weather, 2e éd., De Boeck, 2008.

[3] K. Yeshi, R. Ruscher, L. Hunter *et al.*, « Revisiting Inflammatory Bowel Disease: Pathology, Treatments, Challenges and Emerging Therapeutics Including Drug Leads from Natural Products », *Journal of Clinical Medicine,* vol. 9, n°14, 2020.

[4] S. Nikolaus et S. Schreiber, « Diagnostics of Inflammatory Bowel Disease », *Reviews in basic and clinical gastroenterology,* vol. 133, n°15, pp. 1670-1689, 2007.

[5] G. Roda, S. Chien Ng, P. G. Kotze *et al.*, « Crohn's disease », *Nature Reviews Disease Primers,* vol. 6, n°11, p. 22, 2020.

[6] P. Dalibon, « Crohn's disease and ulcerative colitis, major similarities », *Actualités Pharmaceutiques,* vol. 54, n°1545, pp. 20-24, 2015.

[7] B. Verstockt, B. Bressler, H. Martinez-Lozano *et al.*, « Time to Revisit Disease Classification in Inflammatory Bowel Disease: Is the Current Classification of Inflammatory Bowel Disease Good Enough for Optimal Clinical Management? », *Gastroenterology,* vol. 162, pp. 1370-1382, 2022.

[8] A. N. Ananthakrishnan, « Epidemiology and risk factors for IBD », *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,* vol. 12, pp. 205-217, 2015.

[9] L. Jostins, S. Ripke, R. K. Weersma *et al.*, « Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease », *Nature,* vol. 491, n°17422, pp. 119-124, 2012.

[10] A. N. Ananthakrishnan, C. N. Bernstein, D. Iliopoulos *et al.*, « Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence », *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,* vol. 15, pp. 39-49, 2018.

[11] A. Levine, J. M. Rhodes, J. O. Lindsay *et al.*, « Dietary guidance from the international organization for the study of inflammatory bowel diseases », *Clinical Gastroenterology and Hepatology,* vol. 16, n°16, pp. 1381-1392, 2020.

[12] V. Vieujean, B. Caron, V. Haghnejad *et al.*, « Impact of the Exposome on the Epigenome in Inflammatory Bowel Disease Patients and Animal Models », *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 23, n°114, p. 7611, 2022.

[13] T. H. Bisgaard, K. H. Allin, R. Elmahdi *et al.*, « The bidirectional risk of inflammatory bowel disease and anxiety or depression: A systematic review and meta-analysis », *General Hospital Psychiatry,* vol. 83, pp. 109-116, 2023.

[14] V. Laredo, S. García-Mateo, S. J. Martínez-Domínguez *et al.*, « Risk of cancer in patients with inflammatory bowel diseases and keys for patient management », *Cancers,* vol. 15, n°13, 2023.

[15] S. Alatab, S. Sepanlou, K. Ikuta *et al.*, « The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 », *The Lancet Gastroenterology and Hepatology,* vol. 5, n°11, pp. 17-30, 2020.

[16] G. G. Kaplan et J. W. Windsor, « The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease », *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,* vol. 18, pp. 56-66, 2021.

[17] K. T. Park, O. G. Ehrlich, J. I. Allen *et al.*, « The Cost of Inflammatory Bowel Disease: An Initiative From the Crohn's & Colitis Foundation », *Inflammatory Bowel Diseases,* vol. 26, n°11, pp. 1-10, 2020.

[18] S. van Gennep, S. W. Evers, S. T. Rietdijk *et al.*, « High disease burden drives indirect costs in employed inflammatory bowel disease patients: the WORK-IBD study », *Inflammatory Bowel Diseases,* vol. 27, n°110, pp. 1592-1600, 2021.

[19] U.S. National Cancer Institute, « Diagram showing the parts of the large intestine », 11 06 2025. [En ligne]. Available: https://nci-media.cancer.gov/pdq/media/images/751388.jpg.

[20] L. Beaugerie et H. Sokol, Les fondamentaux de la pathologie digestive: enseignement intégré, appareil digestif, Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson, 2014.

[21] Université de Montpellier, « Histologie et Pathologie des Organes », 16 06 2025. [En ligne]. Available: https://histologielv.umontpellier.fr//index.php?module=detail&subaction=desc&vue=4&itm=126&g=1&d=1 .

[22] J. D. Wood, « Enteric nervous system: reflexes, pattern generators and motility », *Current Opinion in Gastroenterology,* vol. 24, n°12, pp. 149-158, 2008.

[23] M. Camilleri, « Integrated upper gastrointestinal response to food intake », *Gastroenterology,* vol. 131, n°12, pp. 640-658, 2006.

[24] G. Bassotti, E. Antonelli, V. Villanacci *et al.*, « Pathogenesis of inflammatory bowel disease: Role of motility », *World Journal of Gastroenterology,* vol. 20, n°11, pp. 37-46, 2014.

[25] A. Waugh et A. Grant, Ross et Wilson : Anatomie et physiologie normales et pathologiques, 11e éd., Elsevier Masson, 2011.

[26] S. Mehandru et J.-F. Colombel, « The intestinal barrier, an arbitrator turned provocateur in IBD », *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,* vol. 18, pp. 83-84, 2021.

[27] Y. Kang, H. Park, B.-H. Choe *et al.*, « The role and function of mucins and its relationshipto inflammatory bowel disease », *Frontiers in MEdicine,* vol. 9, 2022.

[28] M. R. Kudelka, S. R. Stowell, R. D. Cummings *et al.*, « Intestinal epithelial glycosylation in homeostasis and gut microbiota interactions in IBD », *Gastroenterology & Hepatology,* vol. 17, pp. 597-617, 2020.

[29] M. E. V. Johansson, « Mucus Layers in Inflammatory Bowel Disease », *Inflammatory Bowel Disease,* vol. 20, n°111, pp. 2124-2131, 2014.

[30] C. Schultsz, F. M. van den Berg, F. W. Ten Kate *et al.*, « The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls », *Gastroenterology,* vol. 117, n°15, pp. 1089-1097, 1999.

[31] C. Cremon, B. Barbaro, F. Falangone *et al.*, « Inflammatory and Microbiota-Related Regulation of the Intestinal Epithelial Barrier », *Frontiers in Nutrition,* vol. 8, 2021.

[32] A. R. Bourgonje, T. Vogl, E. Segal *et al.*, « Antibody signatures in inflammatory boweldisease: current develeopments and future applications », *Trends in Molecular Medicine,* vol. 28, n°18, pp. 693-705, 2022.

[33] N. Iyer et S. C. Corr, « Gut Microbial Metabolite-Mediated Regulation of the Intestinal Barrier in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease », *Nutrients,* vol. 13, n°112, 2021.

[34] M. Noben, W. Vanhove, K. Arnauts *et al.*, « Human intestinal epithelium in a dish: Current models for research into gastrointestinal pathophysiology », *United European*

Gastroenterology Journal, vol. 5, n°18, pp. 1073-1081, 2017.

[35] S. Rahman, M. Ghiboub, J. M. Donkers *et al.*, « The Progress of Intestinal Epithelial Models from Cell Lines to Gut-On-Chip », *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 22, n°114, 2021.

[36] C. Anortwe, P. S. Fasinu et B. Rosenkranz, « Application of Caco-2 Cell Line in Herb-Drug Interaction Studies: Current Approaches and Challenges », *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences,* vol. 17, n°11, pp. 1-19, 2014.

[37] Y. Sambuy, I. De Angelis, M. L. Scarino *et al.*, « The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics », *Cell Biology and Toxicology,* vol. 21, pp. 1-26, 2005.

[38] H. Kitamura, M. Cho, B. H. Lee *et al.*, « Alteration in mucin gene expression and biological properties of HT29 colon cancer cell subpopulations », *European Journal of Cancer,* vol. 32, n°110, pp. 1788-1796, 1996.

[39] J. Elzinga, B. van der Lugt, C. Belzer *et al.*, « Characterization of increased mucus production of HT29-MTX-E12 cells grown under Semi-Wetinterface with Mechanical Stimulation », *PLOS One,* vol. 16, n°112, 2021.

[40] D. Martínez-Maqueda, B. Miralles et I. Recio, « The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health: in vitro and ex vivo models », chez *Chapter 11: HT29 Cell Line*, Cham, Springer, 2015, pp. 113-124.

[41] S. Lopez-Escalera et A. Wellejus , « Evaluation of Caco-2 and human intestinal epithelial cells as in vitro models of colonic and small intestinal integrity », *Biochemistry and Biophysics Reports,* vol. 31, 2022.

[42] T. Y. Ma, D. Hollander, D. K. Bhalla *et al.*, « IEC-18, a nontransformed small intestinal cell line for studying epithelial permeability », *Journal of Laboratory and Clinical Medicine,* vol. 120, n°12, pp. 329-341, 1992.

[43] P. Hoffmann, M. Burmester, M. Langeheine *et al.*, « Caco-2/HT29-MTX co-cultured cells as a model for studying physiological properties and toxin-induced effects on intestinal cells », *PLoS ONE,* vol. 16, 2021.

[44] F. Pan, L. Han, Y. Zhang *et al.*, « Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies », *International Journal of Food Sciences and Nutrition,* vol. 66, n°16, pp. 680-685, 2015.

[45] F. Leonard, E.-M. Collnot et C.-M. Lehr, « A Three-Dimensional Coculture of Enterocytes, Monocytes and Dendritic Cells To Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro », *Molecular Pharmaceutics,* vol. 7, n°16, p. 2103–2119, 2010.

[46] N. P. K. Le, M. J. Altenburger et E. Lamy, « Development of an Inflammation-Triggered In Vitro “Leaky Gut” Model Using Caco-2/HT29-MTX-E12 Combined with Macrophage-like THP-1 Cells or Primary Human-Derived Macrophages », *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 24, n°18, 2023.

[47] S. Al-Ghadban, S. Kaissi, F. Homaidan *et al.*, « Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease », *Scientific Reports,* vol. 6, 2016.

[48] N. J. Darling, C. L. Mobbs, A. L. González-Hau *et al.*, « Bioengineering Novel in vitro Co-culture Models That Represent the Human Intestinal Mucosa With Improved Caco-2 Structure and Barrier Function », *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,* vol. 8, 2020.

[49] L. Kajári, V. Szabó, B. Jójárt *et al.*, « P0022 Development of primary human fibroblast cell cultures for fibrosis modelling in Inflammatory Bowel Diseases », *Journal of Crohn's and Colitis,* vol. 19, n°11, 2025.

[50] D. Ferrari, F. Cimino, D. Fratantonio *et al.*, « Cyanidin-3-O-Glucoside Modulates the In Vitro InflammatoryCrosstalk between Intestinal Epithelial and Endothelial Cells », *Mediators of Inflammation,* p. 3454023–3454028, 2017.

[51] M. Sadaghian Sadabad, J. V. von Martels, M. Tanweer Khan *et al.*, « A simple coculture system shows mutualism between anaerobic faecalibacteria and epithelial Caco-2 cells », *Scientific Reports,* vol. 5, 2015.

[52] R. Kim, Y. Wang et C. E. Sims, « A Platform for Co-Culture of Primary Human Colonic Epithelium With Anaerobic Probiotic Bacteria », *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,* vol. 10, 2022.

[53] N. Sasaki, K. Miyamoto, K. M. Maslowski *et al.*, « Development of a Scalable Coculture System for Gut Anaerobes and Human Colon Epithelium », *Gastroenterology,* vol. 159, n°11, pp. 388-390, 2020.

[54] D. Marescotti, G. Lo Sasso, D. Guerrera *et al.*, « Development of an Advanced Multicellular Intestinal Model for Assessing Immunomodulatory Properties of Anti-Inflammatory Compounds », *Frontiers in Pharmacology,* vol. 12, 2021.

[55] P. Phuangbubpha, S. Thara, P. Sriboonaied *et al.*, « Optimizing THP-1 Macrophage Culture for an Immune-Responsive Human Intestinal Model », *Cells* , vol. 12, n°110, 2023.

[56] S. Tamura, C. E. T. Pasang, M. Tsuda *et al.*, « Tri-culture model of intestinal epithelial cell, macrophage, and bacteria for the triggering of inflammatory bowel disease on a microfluidic device », *European Journal of Cell Biology,* vol. 104, n°12, 2025.

[57] J. S. Dutton, S. S. Hinman, R. Kim *et al.*, « Primary Cell-Derived Intestinal Models: Recapitulating Physiology », *Trends in Biotechnology,* vol. 37, n°17, pp. 744-760, 2019.

[58] C. Wen, D. Chen, R. Zhong *et al.*, « Animal models of inflammatory bowel disease: category and evaluation indexes », *Gastroenterology Report,* vol. 12, 2024.

[59] J. de Voss et L. Diehl, « Murine models of inflammatory bowel disease (IBD): challenges of modeling human disease », *Toxicologic Pathology,* vol. 42, n°11, pp. 99-110, 2014.

[60] B. Chassaing, O. Koren, J. K. Goorich *et al.*, « Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome », *Nature,* vol. 519, pp. 92-96, 2015.

[61] D. Arnone, M. Vallier, S. Hergalant *et al.*, « Long-Term Overconsumption of Fat and Sugar Causes a Partially Reversible Pre-inflammatory Bowel Disease State », *Frontiers in Nutrition,* vol. 18, 2021.

[62] European Parliament and Council, « Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes », European Union, Brussels, 2010.

[63] B. Chassaing, J. D. Aitken, M. Malleshappa *et al.*, « Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice », *Current Protocols in Immunology,* vol. 104, pp. 15.25.1-15.25.14, 2014.

[64] W. A. Rose, K. Sakamoto et C. A. Leifer, « Multifunctional role of dextran sulfate sodium for in vivo modeling of intestinal diseases », *BMC Immunology,* vol. 13, n°141, 2012.

[65] F. Scheiffele et I. J. Fuss, « Induction of TNBS Colitis in Mice », *Current Protocols in Immunology,* vol. 49, pp. 15.19.1-15.19.14, 2002.

[66] R. Gadaleta, O. García-Irigoyen et A. Moschetta, « Exploration of Inflammatory Bowel Disease in Mice: Chemically Induced Murine Models of Inflammatory Bowel Disease (IBD) », *Current Protocols in Mouse Biology,* vol. 7, pp. 13-28, 2017.

[67] S. Y. Oh, K. Cho, J. L. Kang *et al.*, « Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease », *International Journal of Molecular Medicine,* vol. 33, pp. 333-340, 2014.

[68] F. Powrie, M. Leach, S. Mauze *et al.*, « Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells », *Immunity,* vol. 1, n°17, pp. 553-562, 1994.

[69] H.-Q. Jiang, N. Kushnir, M. C. Thurnheer *et al.*, « Monoassociation of SCID mice with Helicobacter muridarum, but not four other enterics, provokes IBD upon receipt of T cells », *Gastroenterology,* vol. 122, n°15, pp. 1346-1354, 2002.

[70] D. Jamwal, R. Marati, C. Harrison *et al.*, « Total CD3 T Cells Are Necessary and Sufficient to Induce Colitis in Immunodeficient Mice With Dendritic Cell-Specific Deletion of TGFbR2: A Novel IBD Model to Study CD4 and CD8 T-Cell Interaction », *Inflammatory Bowel Diseases,* vol. 26, n°12, p. 229–241, 2019.

[71] L. Steidler, W. Hans, S. Lieven Schotte *et al.*, « Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10 », *Science,* vol. 289, n°15483, pp. 1352-1355, 2000.

[72] M. Mähler et E. Leiter, « Genetic and environmental context determines the course of colitis developing in IL-10-deficient mice », *Inflammatory Bowel Diseases,* vol. 8, n°15, pp. 347-355, 2002.

[73] T. S. Nielsen, M. Fredborg, M. Thiel *et al.*, « Dietary red meat adversely affects disease severity in a pig model of DSS-induced colitis despite reduction in colonic pro-inflammatory gene expression », *Nutrients,* p. 12, 2020.

[74] G. C. Pistol, D. E. Marin, M. C. Rotar *et al.*, « Bioactive compounds from dietary whole grape seed meal improved colonic inflammation via inhibition of MAPKs and NF-kB signaling in pigs with DSS induced colitis », *Journal of Functional Foods,* vol. 66, 2020.

[75] «Nonhypoalbuminemic nflammatory bowel disease in dogs as disease model », *Inflammatory Bowel Diseases,* vol. 27, pp. 1975-1985, 2021.

[76] C. C. Otoni, R. M. Heilmann, M. Garc ıa-Sancho *et al.*, « Serologic and fecal markers to predict response to induction therapy in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease », *Journal of Veterinary Internal Medicine,* vol. 32, pp. 999-1008, 2018.

[77] H. Y. Li, X. Y. Liu, X. Y. Chen *et al.*, « Application of zebrafish models in inflammatory bowel disease », *Frontiers in Immunology,* vol. 8, 2017.

[78] N. Buchon, N. A. Buchon, M. Poidevin *et al.*, « Drosophila intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation », *Cell Host & Microbe,* vol. 5, pp. 200-211, 2009.

[79] I. Hubrecht, N. Baenas, C. Sina *et al.*, « Effects of non-caloric artificial sweeteners on naïve and dextran sodium sulfate-exposed Drosophila melanogaster », *Food Frontiers,* vol. 3, pp. 728-735, 2022.

[80] C. Becker, M. C. Fantini, S. Wirtz *et al.*, « In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy », *Gut,* vol. 54, pp. 950-954, 2005.

[81] U. Erben, C. Loddenkemper, K. Doerfel *et al.*, « A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models », *International Journal of Clinical and Experimental Pathology,* vol. 7, n°18, pp. 4557-4576, 2014.

[82] L. Cork, T. B. Clarkson, R. Jacoby *et al.*, « Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials », *JACC: Basic to*

Translational Science, vol. 276, pp. 758-759, 1997.

[83] L. Meigs, « Animal testing and its alternatives - the most important omics is economics », *ALTEX - Alternatives to animal experimentation,* vol. 35, n°13, pp. 275-305, 2018.

[84] G. A. Van Norman, « Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials », *JACC: Basic to Translational Science,* vol. 4, pp. 845-854, 2019.

[85] R. L. Perlman, « Mouse models of human disease: An evolutionary perspective », *Evolution, Medicine, and Public Health,* vol. 2016, n°11, pp. 170-176, 2016.

[86] P. Libby, « Murine "Model" Monotheism: An Iconoclast at the Altar of Mouse », *Circulation Research,* vol. 117, n°111, pp. 921-925, 2015.

[87] A. C. Drake, « Of mice and men: what rodent models don't tell us », *Cellular & Molecular Immunology,* vol. 10, pp. 284-285, 2013.

[88] J. Wu, B. Zhang, L. Peng *et al.*, « Current gut-on-a-chip platforms for clarifying the interactions between diet, gut microbiota and host health », *Trends in Food Science & Technology,* vol. 134, pp. 1-12, 2023.

[89] B. Wang et G. Gray, « Concordance of Noncarcinogenic Endpoints in Rodent Chemical Bioassays », *Risk Analysis,* vol. 35, n°16, pp. 1154-1166, 2015.

[90] G. A. Van Norman, « Phase II trials in drug development and adaptative trial design », *JACC: Basic to Translational Science,* vol. 4, n°13, pp. 428-437, 2019.

[91] E. Törnqvist, A. Annas, B. Granath *et al.*, « Strategic Focus on 3R Principles Reveals Major Reductions in the Use of Animals in Pharmaceutical Toxicity Testing », *PLoS ONE,* vol. 9, n°17, 2014.

[92] Parlement Européen, « Résolution du Parlement européen du 16 septembre 2021 sur les plans et actions visant à accélérer la transition vers l'innovation sans utilisation d'animaux dans la recherche, les essais réglementaires et l'éducation (2021/2784(RSP)) », Strasbourg, 2021.

[93] S. E. Escher, F. Partosch, S. Konzok *et al.*, « Development of a Roadmap for Action on New Approach Methodologies in Risk Assessment », *EFSA Supporting Publication,* vol. 19, n°16, pp. 1-153, Regulatory Toxicology and Pharmacology.

[94] «Human intestinal spheroids cultured using Sacrificial Micromolding as a model system for studying drug transport », *Scientific Reports,* vol. 9, 2019.

[95] E. Gheytanchi, M. Naseri, F. Karimi-Busheri *et al.*, « Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines », *Cancer Cell International,* vol. 21, n°1204, 2021.

[96] N. Mahmoud, M.-E. F. Hegazy, W. Wadie *et al.*, « Naphthoquinone derivatives as P-glycoprotein inducers in inflammatory bowel disease: 2D monolayers, 3D spheroids, and in vivo models », *Pharmacological Research,* vol. 179, 2022.

[97] M. Rescigno, « Intestinal epithelial spheroids: new tools for studying gastrointestinal diseases », *Gut,* vol. 64, pp. 859-860, 2015.

[98] L. Schulte, M. Hohwieler, M. Müller *et al.*, « Intestinal Organoids as a Novel Complementary Model to Dissect Inflammatory Bowel Disease », *Stem Cells International,* 2019.

[99] M. Dicarlo, G. Teti, G. Verna *et al.*, « Quercetin Exposure Suppresses the Inflammatory Pathway in Intestinal Organoids from Winnie Mice », *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 20, 2019.

[100] E. d'Aldebert, M. Quaranta, M. Sébert *et al.*, « Characterization of Human Colon Organoids From

Inflammatory Bowel Disease Patients », *Frontiers in Cell and Developmental Biology,* vol. 8, 2020.

[101] L. O'Connell, D. C. Winter et C. A. Aherne, « The Role of Organoids as a Novel Platform for Modeling of Inflammatory Bowel Disease », *Frontiers in Pediatrics,* vol. 9, 2021.

[102] Y. Wakisaka, S. Sugimoto et T. Sato, « Organoid Medicine for Inflammatory Bowel Disease », *Stem Cells,* vol. 40, n°12, pp. 123-132, 2022.

[103] M. Lucafò, A. Muzzo, M. Marcuzzi *et al.*, « Patient-derived organoids for therapy personalization in inflammatory bowel diseases », *World Journal of Gastroenterology,* vol. 28, pp. 2636-2653, 2022.

[104] H. C. K. Angus, A. G. Butt, M. Schultz *et al.*, « Intestinal Organoids as a Tool for Inflammatory Bowel Disease Research », *Frontiers in Medicine,* vol. 6, 2020.

[105] W. Ding, O. M. Marx, W. Koltun *et al.*, « Disease Severity Impairs Generation of Intestinal Organoid Cultures From Inflammatory Bowel Disease Patients », *The Journal of surgical research,* vol. 293, pp. 187-195, 2023.

[106] N. Taebnia, R. Zhang, E. B. Kromann *et al.*, « Dual-Material 3D-Printed Intestinal Model Devices with Integrated Villi-like Scaffolds », *American Chemical Society,* vol. 13, n°149, 2021.

[107] A. García-González, M. Jáquez-Sánchez, A. Maya-Morales *et al.*, « 3D-Printed Scaffold Mimicking IBD Gut Microenvironments: An In Vitro Model for Bacterial Bioink Growth », *2024 46th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC),* pp. 1-4, 2024.

[108] J. Liu, Q. Wang, Y. Le *et al.*, « 3D-Bioprinting for Precision Microtissue Engineering: Advances, Applications, and Prospects », *Advanced Healthcare Materials,* vol. 14, n°110, 2024.

[109] C. Godier, Z. Baka, L. Lamy *et al.*, « A 3D Bio-Printed-Based Model for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *Diseases,* vol. 206, p. 12, 2024.

[110] T. Agarwal, V. Onesto, D. Banerjee *et al.*, « 3D bioprinting in tissue engineering: current state-of-the-art and challenges towards system standardization and clinical translation. », *Biofabrication,* 2025.

[111] B. Zhang, Y. Luo, L. Ma *et al.*, « 3D bioprinting: an emerging technology full of opportunities and challenges », *Bio-Design and Manufacturing,* vol. 1, pp. 2-13, 2018.

[112] P. Ghazal, S. Watterson, K. A. Robertson *et al.*, « The in silico macrophage: toward a better understanding of inflammatory disease », *Genome Medicine,* vol. 3, n°14, 2011.

[113] T. Johnson, A. Akinsanmi, S. A. Ejembi *et al.*, « Modern drug discovery for inflammatory bowel disease: The role of computational methods », *World Journal of Gastroenterology,* 2023.

[114] D. Halder, S. Das, A. Joseph *et al.*, « Molecular docking and dynamics approach to in silico drug repurposing for inflammatory bowels disease by targeting TNF alpha », *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics,* vol. 41, pp. 3462-3475, 2022.

[115] L. Lafuente-Gracia, E. Borgiani, G. Nasello *et al.*, « Towards in silico Models of the Inflammatory Response in Bone Fracture Healing », *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,* vol. 9, 2021.

[116] M. Mastrangeli, S. Millet, C. Mummery *et al.*, « Organ-on-Chip In Development: ORCHID Final Report », 23 mai 2018. [En ligne]. Available: https://euroocs.eu/wp-content/uploads/2022/05/ORCHID-Summary.pdf. [Accès le 24 avril 2025].

[117] N. F. Doost et S. K. Srivastava, « A Comprehensive Review of Organ-on-a-Chip Technology and Its

Applications », *Biosensors,* vol. 14, 2024.

[118] M. Rothbauer, J. Rosser, H. Zirath *et al.*, « Tomorrow today: organ-on-a-chip advances towards clinically relevant pharmaceutical and medical in vitro models », *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 55, pp. 81-86, 2019.

[119] S. K. Srivastava, G. W. Foo, N. Aggarwal *et al.*, « Organ-on-chip technology: Opportunities and challenges », *Biotechnology Notes,* vol. 5, pp. 8-12, 2024.

[120] H. Azizgolshani, J. Coppeta, E. Vedula *et al.*, « High-throughput organ-on-chip platform with integrated programmable fluid flow and real-time sensing for complex tissue models in drug development workflows », *Lab on a Chip,* vol. 21, n°18, pp. 1454-1474, 2021.

[121] E. Esch, A. Bahinski et D. Huh, « Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery », *Nature reviews. Drug discovery,* vol. 14, n°14, pp. 248-260, 2015.

[122] Z. Zhou, L. Cong et X. Cong, « Patient-Derived Organoids in Precision Medicine: Drug Screening, Organoid-on-a-Chip and Living Organoid Biobank », *Frontiers in Oncology,* vol. 11, 2021.

[123] A. Vollertsen, A. Vivas, B. V. van Meer *et al.*, « Facilitating implementation of organs-on-chips by open platform technology », *Biomicrofluidics,* vol. 15, 2021.

[124] R. Kankala, S.-B. Wang et A. Chen, « Microengineered Organ-on-a-chip Platforms towards Personalized Medicine », *Current pharmaceutical design,* vol. 24, n°145, pp. 5354-5366, 2019.

[125] S. Taavitsainen, K. Juuti-Uusitalo, K. Kurppa *et al.*, « Gut-on-chip devices as intestinal inflammation models and their future for studying multifactorial diseases », *Frontiers in Lab on a Chip Technologies,* 2024.

[126] G. Whitesides, « The origins and the future of microfluidics », *Nature,* vol. 442, n°17101, pp. 368-373, 2006.

[127] H. Dongeun, B. D. Matthews, A. Mammoto *et al.*, « Reconstituting organ-level lung functions on a chip », *Science,* vol. 328, n°15986, pp. 1662-1668, 2010.

[128] D. E. Ingber, « Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine », *Nature Reviews Genetics,* vol. 23, pp. 467-491, 2022.

[129] R. Driver et S. Mishra, « Organ-On-A-Chip Technology: An In-depth Review of Recent Advancements and Future of Whole Body-on-chip », *BioChip Journal,* vol. 17, pp. 1-23, 2023.

[130] C. M. Leung, P. de Haan, K. Ronaldson-Bouchard *et al.*, « A guide to the organ-on-a-chip », *Nature Reviews Methods Primers,* vol. 2, 2022.

[131] J. A. Brown, V. Pensabene, D. A. Markov *et al.*, « Recreating blood–brain barrier physiology and structure on chip: a novel neurovascular microfluidic bioreactor », *Biomicrofluidics,* p. 9, 2015.

[132] S. I. Ahn, Y. J. Sei, H.-J. Park *et al.*, « Microengineered human blood–brain barrier platform for understanding nanoparticle transport mechanisms », *Nature Communications,* vol. 11, 2020.

[133] Y. S. Zhang, A. Arneri, S. Bersini *et al.*, « Bioprinting 3D microfibrous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip », *Biomaterials,* vol. 110, pp. 45-59, 2026.

[134] S. Liu, C. Fang, C. Zhong *et al.*, « Recent advances in pluripotent stem cell-derived cardiac organoids and heart-on-chip applications for studying anti-cancer drug-induced cardiotoxicity », *Cell Biology and Toxicology,* vol. 39, pp. 2527-2549, 2023.

[135] J. Faria, S. Ahmed, K. G. F. Gerritsen *et al.*, « Kidney-based in vitro models

for drug-induced toxicity testing », *Archives of Toxicology,* vol. 93, pp. 3397-3418, 2019.

[136] S. J. Allison, « Kidney glomerulus-on-a-chip », *Nature Reviews Nephrology,* vol. 13, 2017.

[137] K. M. Bircsak, R. DeBiasio, M. Miedel *et al.*, « A 3D microfluidic liver model for high throughput compound toxicity screening in the OrganoPlate® », *Toxicology,* vol. 450, 2023.

[138] L. Ewart, A. Apostolou, S. A. Briggs *et al.*, « Performance assessment and economic analysis of a human Liver-Chip for predictive toxicology », *Communications Medicine,* vol. 2, 2022.

[139] S. Deguchi et K. Takayama , « State-of-the-art liver disease research using liver-on-a-chip », *Inflammation and Regeneration,* vol. 42, 2022.

[140] J. H. Sung, Y. I. Wang, N. N. Sriram *et al.*, « Recent Advances in Body-on-a-Chip Systems », *Analytical Chemistry,* vol. 91, n°11, pp. 330-351, 2019.

[141] A. Williamson, S. Singh, U. Fernekorn *et al.*, « The future of the patient-specific Body-on-a-chip », *Lab on a Chip,* vol. 13, n°118, pp. 3471-3780, 2021.

[142] R. G. L. da Silva et A. Blasimme, « Organ chip research in Europe: players, initiatives, and policies », *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,* vol. 11, 2023.

[143] J. Shoji, R. P. Davis, C. L. Mummery *et al.*, « Global Literature Analysis of Organoid and Organ-on-Chip Research », *Advanced healthcare materials,* vol. 13, n°121, 2024.

[144] A. Özkan, A. T. LoGrande, J. F. Feitor *et al.*, « Intestinal organ chips for disease modelling and personalized medicine », *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology,* vol. 21, pp. 751-773, 2024.

[145] P. de Haan, K. Mathwig, L. Yuan *et al.*, « Facile fabrication of microperforated membranes with re-useable SU-8 molds for organs-on-chips », *Organs-on-a-Chip,* vol. 5, 2023.

[146] M. Keuper-Navis, H. E. Amirabadi, J. Donkers *et al.*, « Intestinal Cells-on-Chip for Permeability Studies », *Micromachines,* vol. 15, n°112, 2024.

[147] W. Kim et G. H. Kim, « An innovative cell-printed microscale collagen model for mimicking intestinal villus epithelium », *Chemical Engineering Journal,,* vol. 334, pp. 2308-2318,, 2018.

[148] M. W. Tibbitt et K. S. Anseth, « Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for », *Biotechnology and Bioengineering,* vol. 103, n°19, pp. 655-663, 2009.

[149] D. Vera, M. García-Díaz, N. Torras *et al.*, « A 3D bioprinted hydrogel gut-on-chip with integrated electrodes for transepithelial electrical resistance (TEER) measurements », *Biofabrication,* vol. 16, 2024.

[150] J. Creff, R. Courson, T. Mangeat *et al.*, « Fabrication of 3D scaffolds reproducing intestinal epithelium topography by high-resolution 3D stereolithography », *Biomaterials,* vol. 221, 2019.

[151] K. Y. Shim, D. Lee, J. Han *et al.*, « Microfluidic gut-on-a-chip with three-dimensional villi structure », *Biomedical Microdevices,* vol. 19, n°137, 2017.

[152] B. Gumuscu, H. J. Albers, A. van den Berg *et al.*, « Compartmentalized 3D Tissue Culture Arrays under Controlled Microfluidic Delivery », *Scientific Reports,* vol. 7, 2017.

[153] H. Y. Tan, U. L. Trier, M. Dufva *et al.*, « A multi-chamber microfluidic intestinal barrier model using Caco-2 cells for drug transport studies », *PLOS One,* vol. 13, n°15, 2018.

[154] H. Kimura, T. Yamamoto, H. Sakai *et al.*, « An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models », *Lab on a Chip,* vol. 8, pp. 741-746, 2008.

[155] M. Xavier, L. García-Hevia, I. R. Amdo *et al.*, « In Vitro Intestinal Uptake And Permeability Of Fluorescently-Labelled Hyaluronic Acid Nanogels », *International Journal of Nanomedicine,* vol. 14, pp. 9077-9088, 2019.

[156] O. Vincentini, V. Prota, S. Cecchetti *et al.*, « Towards the Standardization of Intestinal In Vitro Advanced Barrier Model for Nanoparticles Uptake and Crossing: The SiO2 Case Study », *Cells,* vol. 11, n°121, 2022.

[157] M. Lindner, A. Laporte, S. Block *et al.*, « Physiological shear stress enhances differentiation and mucus-formation of intestinal epithelial cells in vitro », *Authorea,* 2020.

[158] M. Marzorati, B. Vanhoecke, T. De Ryck *et al.*, « The HMI™ module: a new tool to study the Host-Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract in vitro », *BMC Microbiology,* vol. 14, 2014.

[159] D. Huh, G. Hamilton et D. E. Ingber, « Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow », *Lab on a Chip,* vol. 12, 2012.

[160] C. A. M. Fois, A. Schindeler, P. Valtchev *et al.*, « Dynamic flow and shear stress as key parameters for intestinal cells morphology and polarization in an organ-on-a-chip model », *Biomedical Microdevices,* vol. 23, n°155, 2021.

[161] P. Guo, A. M. Weinstein et S. Weinbaum, « A hydrodynamic mechanosensory hypothesisfor brush border microvilli for brush border microvilli », *American Journal of Physiology-Renal Physiology,* vol. 279, n°14, 2000.

[162] K. Kulthong, L. P. M. Duivenvoorde, B. Mizera *et al.*, « Implementation of a dynamic intestinal gut-on-a-chip barrier model for transport studies of lipophilic dioxin congeners », *RSC Advances,* vol. 8, 2018.

[163] P. Borwornpiyawat, E. Juntasaro, S. Aueviriyavit *et al.*, « Effects of Porous Size and Membrane Pattern on Shear Stress Characteristic in Gut-on-a-Chip with Peristalsis Motion », *Micromachines,* vol. 14, n°11, 2023.

[164] H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton *et al.*, « Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow », *Lab on a Chip,* vol. 12, pp. 2165-2174, 2012.

[165] P. Borwornpiyawat, E. Juntasaro, S. Aueviriyavit *et al.*, « CFD Investigation into Influences of a Transversely and Periodically Deforming Microchannel on Shear Stress Behavior in a Gut-on-a-chip Device », *Engineering Journal,* vol. 27, n°15, 2022.

[166] L. Wang, J. Han, W. Su *et al.*, « Gut-on-a-chip for exploring the transport mechanism of Hg(II) », *Microsystems & Nanoengineering,* vol. 9, n°12, 2023.

[167] Q. Zhao, T. Cole et Y. Zhang, « Mechanical Strain-Enabled Reconstitution of Dynamic Environment in Organ-on-a-Chip Platforms: A Review », *Micromachines,* vol. 12, n°1765, 2021.

[168] P. Shah, J. Fritz, E. Glaab *et al.*, « A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human–microbe interface », *Nature Communications,* vol. 7, 2016.

[169] J. Z. H. von Martels, M. S. Sadabad, A. R. Bourgonje *et al.*, « The role of gut microbiota in health and disease: In vitro modeling of host-microbe interactions at the aerobe-anaerobe interphase of the human gut », *Anaerobe,* vol. 44, pp. 3-12, 2017.

[170] J. Kim, M. Hegde et A. Jayaraman, « Co-culture of epithelial cells and bacteria for investigating host–pathogen interactions », *Lab on a Chip,* vol. 10, pp. 43-50, 2009.

[171] M. S. Jeon, Y. Y. Choi, S. J. Mo *et al.*, « Contributions of the microbiome to intestinal inflammation in a gut-on-a-chip », *Nano Convergence,* vol. 9, n°18, 2022.

[172] D. Marrero, F. Pujol-Vila, D. Vera *et al.*, « Gut-on-a-chip: Mimicking and

monitoring the human intestine », *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 181, 2021.

[173] M. Azimzadeh, P. Khashayar, M. Amereh *et al.*, « Microfluidic-Based Oxygen (O2) Sensors for On-Chip Monitoring of Cell, Tissue and Organ Metabolism », *Biosensors,* vol. 12, n°16, 2022.

[174] S. Matsumoto, A. R. Safitri, M. Danoy *et al.*, « Investigation of the hepatic respiration and liver zonation on rat hepatocytes using an integrated oxygen biosensor in a microscale device », *Biotechnology Progress,* vol. 35, n°15, 2019.

[175] L. Orcheston-Findlay, A. Hashemi, A. Garrill *et al.*, « A microfluidic gradient generator to simulate the oxygen microenvironment in cancer cell culture », *Microelectronic Engineering,* vol. 195, pp. 107-113, 2018.

[176] D. Sticker, M. Rothbauer, J. Ehgartner *et al.*, « Oxygen Management at the Microscale: A Functional Biochip Material with Long-Lasting and Tunable Oxygen Scavenging Properties for Cell Culture Applications », *ACS Applied Materials & Interfaces,* vol. 11, n°110, 2019.

[177] F. Liebisch, A. Weltin, J. Marzioch *et al.*, « Zero-consumption Clark-type microsensor for oxygen monitoring in cell culture and organ-on-chip systems », *Sensors and Actuators B: Chemical,* vol. 322, 2020.

[178] M. H. Macedo, E. Martinez, C. Barrias *et al.*, « Development of an Improved 3D in vitro Intestinal Model to Perform Permeability Studies of Paracellular Compounds », *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,* vol. 8, 2020.

[179] C. Pereira, F. Araújo, C. C. Barrias *et al.*, « Dissecting stromal-epithelial interactions in a 3D in vitro cellularized intestinal model for permeability studies », *Biomaterials,* vol. 56, pp. 36-45, 2015.

[180] S.-Y. Jeong, J.-H. Lee, Y. Shin *et al.*, « Co-Culture of Tumor Spheroids and Fibroblasts in a Collagen Matrix-Incorporated Microfluidic Chip Mimics Reciprocal Activation in Solid Tumor Microenvironment », *PLoS ONE,* vol. 11, n°17, 2016.

[181] Y. Guo, R. Luo, Y. Wang *et al.*, « SARS-CoV-2 induced intestinal responses with a biomimetic human gut-on-chip », *Science Bulletin,* vol. 66, n°18, pp. 783-793, 2021.

[182] B. Jing, Z. A. Wang, C. Zhang *et al.*, « Establishment and Application of Peristaltic Human Gut-Vessel Microsystem for Studying Host–Microbial Interaction », *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,* vol. 8, 2020.

[183] H. Kim, H. Li, J. Collins *et al.*, « Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* vol. 113, n°11, pp. 7-15, 2016.

[184] M. Maurer, M. S. Gresnigt, A. Last *et al.*, « A three-dimensional immunocompetent intestine-on-chip model as in vitro platform for functional and microbial interaction studies », *Biomaterials,* vol. 220, 2019.

[185] M. Morelli, D. Kurek, C. P. Ng *et al.*, « Gut-on-a-Chip Models: Current and Future Perspectives for Host–Microbial Interactions Research », *Biomedicines,* vol. 11, n°12, 2023.

[186] W. Shin et H. J. Kim, « Intestinal barrier dysfunction orchestrates the onset ofinflammatory host–microbiome cross-talk in a humangut inflammation-on-a-chip », *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 115, n°145, pp. 10539-10547, 2018.

[187] A. Özkan, G. E. Merry, D. B. Chou *et al.*, « Human Organ Chips Reveal New Inflammatory Bowel Disease Drivers », *Research Square [preprint],* 2025.

[188] J. P. Vigh, A. Kincses, B. Ozgür *et al.*, « Transendothelial Electrical

Resistance Measurement across the Blood–Brain Barrier: A Critical Review of Methods », *Micromachines,* vol. 12, 2021.

[189] M. Theile, L. Wiora, D. Russ *et al.*, « A Simple Approach to Perform TEER Measurements Using a Self-Made Volt-Amperemeter with Programmable Output Frequency », *Journal of Visualized Experiments,* vol. 152, 2019.

[190] B. Srinivasan, A. Kolli, M. Esch *et al.*, « TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems », *Journal of Laboratory Automation,* vol. 20, n°12, pp. 107-126, 2015.

[191] H. Fricke et S. Morse, « The Electric Resistance and Capacity of Blood for Frequencies Between 800 and 4½ Million Cycles », *Journal of General Physiology,* vol. 9, n°12, pp. 153-167, 1925.

[192] J. Wegener, C. R. Keese et I. Giaever, « Electric Cell–Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces », *Experimental Cell Research,* vol. 259, n°11, pp. 158-166, 2000.

[193] A. Kociubiński, « Electric cell-substrate impedance sensing in biocompatibility research », *Journal of Electrical Bioimpedance,* vol. 12, pp. 163-168, 2021.

[194] S. Arndt, J. Seeback, K. Psathaki *et al.*, « Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis », *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 19, pp. 583-594, 2004.

[195] L. Ceriotti, J. Ponti, P. Colpo *et al.*, « Assessment of cytotoxicity by impedance spectroscopy », *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 22, n°112, pp. 3057-3063, 1007.

[196] J. Mamouni et L. Yang, « nterdigitated microelectrode-based microchip for electrical impedance spectroscopic study of oral cancer cells », *Biomedical Microdevices,* vol. 13, pp. 1075-1088, 2011.

[197] M. W. van der Helm, O. Y. F. Henry, A. Bein *et al.*, « Non-invasive sensing of transepithelial barrier function and tissue differentiation in organs-on-chips using impedance spectroscopy », *Lab on a Chip,* vol. 19, pp. 452-463, 2019.

[198] K. Brandauer, A. Lorenz, S. Schobesberger *et al.*, « Sensor-integrated gut-on-a-chip for monitoring senescence-mediated changes in the intestinal barrier », *Lab on a Chip,* vol. 25, n°17, 2025.

[199] J. Fernandes, N. Karra, J. Bowring *et al.*, « Real-time monitoring of epithelial barrier function by impedance spectroscopy in a microfluidic platform », *Lab on a Chip,* vol. 22, pp. 2041-2054, 2022.

[200] D. Marrero, A. Guimerà, L. Maes *et al.*, « Organ-on-a-chip with integrated semitransparent organic electrodes for barrier function monitoring », *Lab on a Chip,* vol. 23, pp. 1825-1834, 2023.

[201] T. Gerasimenko, S. Nikulin, G. Zakharova *et al.*, « Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues », *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,* vol. 7, 2020.

[202] A. George, K. Gottlieb, S. Baxi *et al.*, « P0264 Using a machine learning model to grade clip-level endoscopic inflammation reveals the heterogeneity of mucosal inflammation in ulcerative colitis », *Journal of Crohn's and Colitis,* vol. 19, n°1Supplement_1, p. i697–i698, 2025.

[203] Y. Fan, R. Mu, H. Xu *et al.*, « A novel deep learning-based computer-aided diagnosis system for predicting inflammatory activity in ulcerative colitis », *Gastrointestinal endoscopy,* vol. 97, n°12, pp. 335-346, 2023.

[204] J. Claudel, A. L. A. de Araujo, M. Nadi *et al.*, « Lab-On-A-Chip Device for Yeast Cell Characterization in Low-Conductivity Media Combining Cytometry and Bio-Impedance », *Sensors,* vol. 19, n°115, 2019.

[205] H. Song, Y. Wang, J. M. Rosano *et al.*, « A microfluidic impedance flow cytometer for identification of differentiation state of stem cells », *Lab on a Chip,* vol. 12, 2013.

[206] T. García-Sánchez, R. Bragós et L. M. Mir, « In vitro analysis of various cell lines responses to electroporative electric pulses by means of electrical impedance spectroscopy », *Biosensors and Bioelectronics,* vol. 117, pp. 207-216, 2018.

[207] R. Bettenfeld, J. Claudel, D. Kourtiche *et al.*, « Design and Modeling of a Device Combining Single-Cell Exposure to a Uniform Electrical Field and Simultaneous Characterization via Bioimpedance Spectroscopy », *Sensors,* vol. 23, n°17, 2023.

[208] S. P. Tucker, L. R. Melsen et R. W. Compans, « Migration of polarized epithelial cells through permeable membrane substrates of defined pore size », *European Journal of Cell Biology,* vol. 58, n°12, pp. 280-290, 1992.

[209] P. Kenchetty P, T. Miura et S. Uno, « Computer simulation for electrochemical impedance of a living cell adhered on the inter-digitated electrode sensors », *Japanese Journal of Applied Physics,* vol. 58, 2019.

[210] H. Morgan, T. Sun, D. Holmes *et al.*, « Single cell dielectric spectroscopy », *Journal of Physics D: Applied Physics,* vol. 40, p. 61, 2007.

[211] T. Sun, N. G. Green, S. Gawad *et al.*, « Analytical electric field and sensitivity analysis for two microfluidic impedance cytometer designs », *IET Nanobiotechnology,* vol. 1, n°15, 2007.

[212] J. Claudel, T.-T. Ngo, D. Kourtiche *et al.*, « Interdigitated Sensor Optimization for Blood Sample Analysis », *Biosensors,* vol. 10, n°1208, 2020.

[213] F. Starzyk, « Parametrisation of interdigit comb capacitor for dielectric impedance spectroscopy », *Archives of Material Science and Engineering,* vol. 34, n°11, pp. 31-34, 2008.

[214] N. J. Kidner, Z. J. Homrighaus, T. O. Mason *et al.*, « Modeling interdigital electrode structures for the dielectric characterization of electroceramic thin films », *Thin Solid Films,* vol. 496, n°12, pp. 539-545, 2006.

[215] A. V. Mamishev, K. Sundara-Rajan, F. Yang *et al.*, « Interdigital sensors and transducers », *Proceedings of the IEEE,* vol. 92, n°15, pp. 808-845, 2004.

[216] C.-U. Kim, G. Li, H. Jong *et al.*, « Numerical analysis on effective electric field penetration depth for interdigital impedance sensor », *Journal of Physics: Conference Series,* vol. 418.

[217] A. R. A. Rahman, D. T. Price et S. Bhansali, « Effect of electrode geometry on the impedance evaluation of tissue and cell culture », *Sensors and Actuactors B: Chemical,* vol. 127, n°11, pp. 89-96, 2007.

[218] T. Lesuffleur, N. Porchet, J.-P. Aubert *et al.*, « Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. », *Journal of cell science,* vol. 106, n°13, pp. 771-783, 1993.

[219] R. Dahiya, T. Lesuffleur, K. S. Kwak *et al.*, « Expression and characterization of mucins associated with the resistance to methotrexate of human colonic adenocarcinoma cell line HT29. », *Cancer research,* vol. 52, n°117, pp. 4655-4662, 1992.

[220] L. Albenberg, T. Esipova, C. P. Judge *et al.*, « Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota », *Gastroenterology,* vol. 147, n°15, pp. 1055-1063, 2014.

[221] A. Swidsinski, B. C. Sydora, Y. Doerffel *et al.*, « Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota », *Inflammatory Bowel*

Diseases, vol. 13, n°18, pp. 963-970, 2007.

[222] L. Maes, A. Szabó, J. van Haevermaete *et al.*, « P035 3D bioprinting of gelatin derivatives: towards novel small intestinal in vitro models », *Journal of Crohn's and Colitis,* 2024.

[223] V. De Gregorio, G. Imparato, F. Urciuolo *et al.*, « Micro-patterned endogenous stroma equivalent induces polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium », *Acta biomaterialia,* vol. 81, pp. 43-59, 2018.

[224] S. Medvedeva, K. Achasova, L. Boldyreva *et al.*, « The application of explants, crypts, and organoids as models in intestinal barrier research », *Tissue barriers,* 2024.

[225] H. J. Kim, « Pathomimetic Gut Inflammation-on-a-Chip for Validating Personalized Microbiome Therapeutics », *The FASEB Journal,* vol. 31, n°1S1, p. 1048.3, 2017.

[226] H. Grasberger, J. Gao, H. Nagao-Kitamoto *et al.*, « Increased Expression of DUOX2 is an Epithelial Response to Mucosal Dysbiosis Required for Immune Homeostasis in Mouse Intestine », *Gastroenterology,* vol. 149, n°17, pp. 1849-1859, 2015.

[227] B. Liang, C. Wu, C. Wang *et al.*, « New insights into bacterial mechanisms and potential intestinal epithelial cell therapeutic targets of inflammatory bowel disease », *Frontiers in Microbiology,* vol. 13, 2022.

[228] S. Cicchinelli, S. Gemma, G. Pignataro *et al.*, « Intestinal Fibrogenesis in Inflammatory Bowel Diseases: Exploring the Potential Role of Gut Microbiota Metabolites as Modulators », *Pharmaceuticals,* vol. 17, n°1490, 2024.

[229] B.-J. Ke, G. Dragoni, G. Matteoli *et al.*, « Fibroblast Heterogeneity in Inflammatory Bowel Disease », *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 25, 2024.

[230] Z. Cader et A. Kaser, « Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation », *Gut,* vol. 62, pp. 1653-1664, 2013.

[231] F. Fava et S. Danese, « Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? », *World journal of gastroenterology,* vol. 17, n°15, pp. 557-566, 2011.

[232] M. J. Mehta, S. Ahmed et G. Dryden, « Immunopathophysiology of inflammatory bowel disease: how genetics link barrier dysfunction and innate immunity to inflammation », *Innate Immunity,* vol. 23, pp. 497-505, 2017.

[233] J. Ko, D. Park, S. Lee *et al.*, « Engineering Organ-on-a-Chip to Accelerate Translational Research », *Micromachines,* vol. 13, 2022.

[234] M. A. Ferraz, H. S. Rho, D. Hemerich *et al.*, « An oviduct-on-a-chip provides an enhanced in vitro environment for zygote genome reprogramming », *Nature Communications,* vol. 9, 2018.

[235] Y. Xia et G. M. Whitesides, « Soft Lithography », *Angewandte Chemie International Edition,* vol. 37, n°15, pp. 550-670, 1998.

[236] A. Tony, I. Badea, C. Yang *et al.*, « The Additive Manufacturing Approach to Polydimethylsiloxane (PDMS) Microfluidic Devices: Review and Future Directions », *Polymers,* vol. 15, 2023.

[237] I. Miranda, A. Souza, P. Sousa *et al.*, « Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review », *Journal of Functional Biomaterials,* vol. 13, n°12, 2022.

[238] A. H. McMillan, E. Thomée, A. Dellaquila *et al.*, « Rapid Fabrication of Membrane-Integrated Thermoplastic Elastomer Microfluidic Devices », *Micromachines,* vol. 11, n°18, 2020.

[239] L. Dauginet, A.-S. Duwez, R. Legras *et al.*, « Surface Modification of Polycarbonate and Poly(ethylene terephthalate) Films and Membranes

by Polyelectrolyte Deposition », *Langmuir,* vol. 17, n°113, p. 3952–3957, 2001.

[240] K. Szafran, M. Jurak, R. Mroczka *et al.*, « Surface Properties of the Polyethylene Terephthalate (PET) Substrate Modified with the Phospholipid-Polypeptide-Antioxidant Films: Design of Functional Biocoatings », *Pharmaceutics,* vol. 14, n°112, 2022.

[241] G. Yi, M. Zhong et J. Yu, « Large-Scale Fabrication of Freestanding Polymer Ultrathin Porous Membranes for Transparent Transwell Coculture Systems », *American Chemical Society,* vol. 18, n°111, pp. 8168-8179, 2024.

[242] B. Choi, J.-W. Choi, H. Jin *et al.*, « Condensed ECM-based nanofilms on highly permeable PET membranes for robust cell-to-cell communications with improved optical clarity », *Biofabrication,* vol. 13, n°14, 2021.

[243] Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), « Polyéthylène téréphtalate (PET) - Plastiques, Risque et Analyse ThermIQue », [En ligne]. Available: https://www.inrs.fr/dam/jcr:fc8f650a-36cf-4e39-8f44-f11e53a3858b/POLYMERE_PET.pdf . [Accès le 4 septembre 2025].

[244] I. Pereiro, A. F. Khartchenko, L. Petrini *et al.*, « Nip the bubble in the bud: a guide to avoid gas nucleation in microfluidics », *Lab on a Chip,* vol. 19, n°114, pp. 2296-2314, 2019.

[245] M. Yang, N. Sun, Y. Luo *et al.*, « Emergence of debubblers in microfluidics: A critical review », *Biomicrofluidics,* vol. 16, n°13, 2022.

[246] C. Poon, « Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices », *bioRxiv,* 2020.

[247] it4ip, « Catalogue de produits : Membranes poreuses commerciales en PET », [En ligne]. Available: https://www.it4ip.be/12-products-catalog. [Accès le 26 août 2025].

[248] F. Prabowo, A. Wing-Keung et H. Shen, « Effect of Curing Temperature and Cross-Linker to Pre-Polymer Ratio on the Viscoelastic Properties of a PDMS Elastomer », *Advanced Materials Research,* vol. 1112, pp. 410-413, 2015.

[249] G. Zhang, S. Yuli, B. Qian *et al.*, « Experimental study on mechanical performance of polydimethylsiloxane (PDMS) at various temperatures », *Polymer Testing,* vol. 90, 2020.

[250] V. Genovés, L. Maini, C. Roman *et al.*, « Variation in the viscoelastic properties of polydimethylsiloxane (PDMS) with the temperature at ultrasonic frequencies », *Polymer Testing,* vol. 124, 2023.

[251] J. Grant, A. Özkan, C. Oh *et al.*, « Simulating drug concentrations in PDMS microfluidic organ chips », *Lab on a Chip,* vol. 21, n°118, pp. 3509-3519, 2021.

[252] J. Yao, Y. Guan, Y. Park *et al.*, « Optimization of PTFE Coating on PDMS Surfaces for Inhibition of Hydrophobic Molecule Absorption for Increased Optical Detection Sensitivity », *Sensors,* vol. 21, n°15, 2021.

[253] S.-S. D. Carter, A. Atif, S. Kadekar *et al.*, « PDMS leaching and its implications for on-chip studies focusing on bone regeneration applications », *Organs-on-a-Chip,* vol. 2, 2020.

[254] J. N. Lee, C. Park et G. M. Whitesides, « Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices », *Analytical Chemistry,* vol. 75, n°123, pp. 6544-6554, 2003.

[255] Formlabs, « Black Resin V5 », [En ligne]. Available: https://formlabs.com/fr/boutique/materials/black-resin/. [Accès le 2025 août 27].

[256] Y. Bin, K. Oishi, K. Yoshida *et al.*, « Mechanical Properties of Poly(ethylene terephthalate)

Estimated in Terms of Orientation Distribution of Crystallites and Amorphous Chain Segments under Simultaneous Biaxially Stretching », *Polymer Journal,* vol. 36, n°111, pp. 888-898, 2004.

[257] N. Stribeck, S. Fakirov, A. A. Apostolov *et al.*, « Deformation Behavior of PET, PBT and PBT-Based Thermoplastic Elastomers as Revealed by SAXS from Synchrotron », *Macromolecular Chemistry and Physics,* vol. 204, n°17, pp. 1000-1013, 2003.

[258] A. T. Chalackal et S. Kanakambaran, « Investigations on thermal and mechanical characteristics of PDMS embedded FBG sensors for wearable sensing applications », *Smart Materials and Structures,* vol. 4, n°11, 2025.

[259] N. S. Mohamed et K. C. Theng, « Mechanical Properties of Graded Polydimethylsiloxane for Flexible Electronics," Journal of Physics: Conference Series », *Journal of Physics: Conference Series,* vol. 1150, 2019.

[260] H. Son, A. L. Chau et C. Davis, « Polymer thin film adhesion utilizing the transition from surface wrinkling to delamination », *Soft matter,* vol. 15, n°131, pp. 6375-6382, 2019.

[261] Z. Zeng, H. Yu et X. Chen, « In situ characterization of buckling dynamics in silicon microribbon on », *Extreme Mechanics Letters,* vol. 58, 2021.

[262] S. Nikravesh, D. Ryu et Y.-L. Shen, « Instabilities of Thin Films on a Compliant Substrate: Direct Numerical Simulations from Surface Wrinkling to Global Buckling », *Scientific Reports,* vol. 10, 2020.

[263] X. Yuan, P. Zhao, Q. Fan *et al.*, « Theoretical and numerical analysis on buckling instability in a thin film sandwiched between two finite-thickness substrates under in-plane compression », *International Journal of Solids and Structures,* vol. 304, 2024.

[264] H. Mei, C. Landis et R. Huang, « Concomitant wrinkling and buckle-delamination of elastic thin films on compliant substrates », *Mechanics of Materials,* vol. 43, n°111, pp. 627-642, 2011.

[265] J. D. Baek, Y.-J. Yoon, W. Lee *et al.*, « A circular membrane for nano thin film micro solid oxide fuel cells with enhanced mechanical stability », *Energy and Environmental Science,* vol. 8, n°111, pp. 3374-3380, 2015.

[266] Longer Precision Pump Co., « G100-2J Peristaltic Pump Drive – Datasheet », 2021.

[267] Y. Yalikun, N. Ota, D. Ma *et al.*, « Horizontal connection method for glass microfluidic devices », *Micro & Nano Letters,* vol. 15, n°15, pp. 333-338, 2020.

[268] Y.-S. Sun, « Comparison of Chip Inlet Geometry in Microfluidic Devices for Cell Studies », *Molecules,* vol. 21, n°16, 2016.

[269] Y. Zhang, C. Chai, X. S. Jiang *et al.*, « Fibronectin immobilized by covalent conjugation or physical adsorption shows different bioactivity on aminated-PET », *Materials Science and Engineering: C,* vol. 27, pp. 213-219, 2007.

[270] E. P. Ivanov, Nanoscale Structure and Properties of Microbial Cell Surfaces, Hauppauge: Nova Science Publishers Inc, 2006.

[271] L. Maurer, W. Ma et D. Mosher, « Dynamic structure of plasma fibronectin », *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology,* vol. 51, pp. 213 - 227, 2016.

[272] H. Erickson et N. Carrell, « Fibronectin in extended and compact conformations. Electron microscopy and sedimentation analysis. », *The Journal of biological chemistry,* vol. 258, n°123, pp. 14539-14544, 1983.

[273] J. Pelta, H. Berry, G. Fadda *et al.*, « Statistical conformation of human plasma fibronectin », *Biochemistry,* vol. 39, n°117, pp. 5146-5154, 2000.

[274] M. Rocco, E. Infusinil, M. Giovanna *et al.*, « Models of fibronectin », *The EMBO Journal,* vol. 6, 1987.

[275] A. L. A. de Araujo, J. Claudel, D. Kourtiche *et al.*, « Influence of Electrode Connection Tracks on Biological Cell Measurements by Impedance Spectroscopy », *Sensors,* vol. 19, n°113, 2019.

[276] S. Biltresse, M. Attolini, J. Marchand-Brynaert *et al.*, « Cell adhesive PET membranes by surface grafting of RGD peptidomimetics », *Biomaterials,* vol. 26, n°122, pp. 4576-4587, 2005.

[277] Š. Jokhadar, V. Šuštar, S. Svetina *et al.*, « Time Lapse Monitoring of CaCo-2 Cell Shapes and Shape Dependence of the Distribution of Integrin β1 and F-Actin on their Basal Membrane », *Cell Communication & Adhesion,* vol. 16, pp. 1-13, 2009.

[278] M. Centonze, E. J. W. Berenschot, S. Serrati *et al.*, « The Fast Track for Intestinal Tumor Cell Differentiation and In Vitro Intestinal Models by Inorganic Topographic Surfaces », *Pharmaceutics,* vol. 14, n°1218, 2022.

[279] S. Gao, T. Xu, L. Wu *et al.*, « Complete Prevention of Bubbles in a PDMS-Based Digital PCR Chip with a Multifunction Cavity », *Biosensors,* vol. 14, n°13, 2024.

[280] V. Steijn, M. Kreutzer et C. Kleijn, « Velocity fluctuations of segmented flow in microchannels », *Chemical Engineering Journal,* Vols. %1 sur %2135, S1, pp. S159-S165, 2008.

[281] C. Brennen, « Bubbly flow model for the dynamic characteristics of cavitating pumps », *Journal of Fluid Mechanics,* vol. 89, n°12, pp. 223-240, 1978.

[282] M. J. Williams, N. K. Lee, J. A. Mylott *et al.*, « A Low-Cost, Rapidly Integrated Debubbler (RID) Module for Microfluidic Cell Culture Applications », *Micromachines,* vol. 10, n°1360, 2019.

[283] Darwin Microfluidics, « Autoclavable Bubble Trap for Microfluidics », [En ligne]. Available: https://darwin-microfluidics.com/products/autoclavable-bubble-trap-for-microfluidics?srsltid=AfmBOooJGQNj8QPSWbDxGZdG1_wSXUuGMwmbYxnOzwfHhdl2EK9pz_6-. [Accès le 2025 septembre 11].

[284] D. J. Teixeira Carvalho, L. Moroni et S. Giselbrecht, *Nature Reviews Materials,* vol. 8, pp. 147-164, 2023.

[285] L. Batyuk et N. Kizilova, « Modeling of dielectric permittivity of the erythrocytes membrane as a three-layer model », chez *Development Trends in Medical Science and Practice: The Experience of Countries of Eastern Europe and Prospects of Ukraine*, Riga, Lettonie, Baltija Publishing, 2018, pp. 18-37.

[286] A. Alves De Araujo, Conception et réalisation d'un biocapteur à matrice d'électrodes pour la caractérisation de milieux biologiques par spectroscopie d'impédance, Thèse soutenue le 17 décembre 2019 pour obtenir le Grade de Docteur de l'Université de Lorraine.

[287] A. De Araujo, J. Claudel, D. Kourtiche *et al.*, « Use of an insulation layer on the connection tracks of a biosensor with coplanar electrodes to increase the normalized impedance variation », *Biosensors,* vol. 9, n°13, 2019.

[288] Z. Zhou, R. Wang, Z. Yang *et al.*, « The semi-analytical model of electric field and capacitance in a multilayer-structured interdigital electrode capacitor », *Applied Mathematical Modelling,* vol. 136, n°1115632, 2024.

[289] C.-U. Kim, G.-F. Li, J. Li *et al.*, « Numerical analysis on effective electric field penetration depth for interdigital impedance sensor », *Journal of Physics: Conference Series,* vol. 418, n°1012020, 2013.

[290] N. Hosseini, G. Gagnon-Turcotte, G. Bl-George *et al.*, « Optimization & Characterization of Interdigitated Electrodes for Microbial Growth Monitoring », *2021 43rd Annual*

International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC), 2021.

[291] N. F. Sheppard, R. C. Tucker et C. Wu, « Electrical conductivity measurements using microfabricated interdigitated electrodes », *Analytical Chemistry,* vol. 65, n°19, pp. 1199-1202, 1993.

[292] N. S. Mazlan, M. M. Ramli, M. M. A. B. Abdullah *et al.*, « Interdigitated electrodes as impedance and capacitance biosensors: A review », *AIP Conference Proceedings,* vol. 1885, n°11, 2017.

[293] A. Dizon et M. E. Orazem, « On experimental determination of cell constants for interdigitated electrodes », *Electrochimica Acta,* vol. 337, 2020.

[294] M. Ibrahim, J. Claudel, D. Kourtiche *et al.*, « Physical and Electrical Modeling of Interdigitated Electrode Arrays for Bioimpedance Spectroscopy », chez *New Developments and Applications in Sensing Technology*, Berlin, Allemagne, Springer, 2011, pp. 169-189.

[295] T. Weber, J. Wiest, S. Oredsson *et al.*, « Case Studies Exemplifying the Transition to Animal Component-free Cell Culture », *Alternatives to Laboratory Animals,* vol. 50, n°15, pp. 330-338, 2022.

[296] S. Gabriel, R. W. Lau et C. Gabriel, « The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues », *Physics in Medicine & Biology,* vol. 41, n°111, p. 2271, 1996.

[297] A. Venz, B. Duckert, L. Lagae *et al.*, « Impedance mapping with high-density microelectrode array chips reveals dynamic heterogeneity of in vitro epithelial barriers », *Scientific Reports,* vol. 15, 2025.

[298] B. E. Rapp, « Chapter 16 - Analytical Solutions to Poiseuille Flow Problems in Different Geometries », chez *Micro and Nano Technologies, Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics*, Elsevier, 2017, pp. 323-349.

[299] A. M. C. van Dinther, C. G. P. H. Schroën, F. J. Vergeldt *et al.*, « Suspension flow in microfluidic devices — A review of experimental techniques focussing on concentration and velocity gradients », *Advances in Colloid and Interface Science,* vol. 173, pp. 23-24, 2012.

[300] N. Convery et N. Gadegaard, « 30 years of microfluidics », *Micro and Nano Engineering,* vol. 2, pp. 79-91, 2019.

[301] A. Kumar et U. Panda, « Chapter 12 - Microfluidics-based devices and their role on point-of-care testing », chez *From Lab to Clinics, Biosensor Based Advanced Cancer Diagnostics*, Academic Press, 2022, pp. 197-224.

[302] W. F. Quirós-Solano, N. Gaio, O. M. J. A. Stassen *et al.*, « Microfabricated tuneable and transferable porous PDMS membranes for Organs-on-Chips », *Scientific Reports,* vol. 8, 2018.

[303] Y. Guo, Z. Li, W. Su *et al.*, « A Biomimetic Human Gut-on-a-Chip for Modeling Drug Metabolism in Intestine », *Artifical Organs,* vol. 42, n°112, pp. 1236-1242, 2018.

[304] Merck KGaA, « Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts, CLS3422 », Sigma-Aldrich, [En ligne]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/product/sigma/cls3422. [Accès le 08 07 2025].

[305] K. Cuanalo-Contreras, A. M. R. Hogrebe, K. Teichmann *et al.*, « Track-Etched Membranes for Drug Pharmaceutical Research », *Chemie Ingenieur Technik,* vol. 95, n°19, pp. 1372-1380, 2023.

[306] H. Mukaibo, L. Horne, D. Park *et al.*, « Controlling the length of conical pores etched in ion-tracked poly(ethylene terephthalate) membranes », *Small,* vol. 5, n°121, pp. 2474-2479, 2009.

[307] T. Ma, J.-M. Janot et S. Balme, « Track-Etched Nanopore/Membrane: From Fundamental to Applications », *Small Methods,* vol. 4, n°19, 2020.

[308] P. V. van Midwoud, A. Janse, M. Merema *et al.*, « Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models », *Analytical Chemistry,* vol. 84, n°19, pp. 3938-3944, 2012.

[309] G. Ceccio, J. Vacik, J. Siegel *et al.*, « Etching and Doping of Pores in Polyethylene Terephthalate Analyzed by Ion Transmission Spectroscopy and Nuclear Depth Profiling », *Membranes,* vol. 12, 2022.

[310] A. Kozlovskiy, D. Borgekov, I. Kenzhina *et al.*, « PET Ion-Track Membranes: Formation Features and Basic Applications », chez *Springer Proceedings in Physics*, Cham, Switzerland, Springer, 2019, pp. 331-342.

[311] Y. Gao, M. Zhong, J. Yu *et al.*, « Large-Scale Fabrication of Freestanding Polymer Ultrathin Porous Membranes for Transparent Transwell Coculture Systems », *ACS Nano,* vol. 18, n°111, pp. 8168-8179, 2024.

[312] A. Borók, K. Laboda et A. Bonyár, « PDMS Bonding Technologies for Microfluidic Applications: A Review », *Biosensors,* vol. 11, n°18, 2021.

[313] X. Li, N. Wu, Y. Rojanasakul *et al.*, « Selective stamp bonding of PDMS microfluidic devices to polymer substrates for biological applications », *Sensors and Actuators A: Physical,* vol. 193, pp. 186-192, 2013.

[314] R. Sivakumar et N. Y. Lee, « Microfluidic device fabrication mediated by surface chemical bonding », *Analyst,* vol. 12, 2020.

[315] Y. Xie, Y. Guo, F. Wie *et al.*, « A flexible strategy to fabricate trumpet-shaped porous PDMS membranes for organ-on-chip application », *Biomicrofluidics,* vol. 18, 2024.

[316] R. Kida, A. Rajendran, M. Tsugane *et al.*, « Gut-liver interaction study on an all-polydimethylsiloxane microfluidic device integrating intestinal paracellular permeability assay », *Talanta Open,* vol. 9, 2024.

[317] M. M. Keshtiban, M. M. Zand, A. Ebadi *et al.*, « PDMS-based porous membrane for medical applications: design, development, and fabrication », *Biomedical Materials,* vol. 18, n°14, 2023.

[318] H. Le-The, M. Tibbe, J. Loessberg-Zahl *et al.*, « Large-scale fabrication of free-standing and sub-µm PDMS through-hole membranes », *Nanoscale,* vol. 10, pp. 7711-7718, 2018.

[319] L. Wang, C. Meyer, E. Guibert *et al.*, « Fabrication of high-transmission microporous membranes by proton beam writing-based molding technique », *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms,* vol. 404, pp. 224-227, 2017.

[320] Q. Zhang, S. Tinck, J. D. Marneffe *et al.*, « Mechanisms for plasma cryogenic etching of porous materials », *Applied Physics Letters,* pp. 111-117, 2017.

[321] B. Lerner, M. Perez, P. A. Kler *et al.*, « Laser fabrication of micropores and their integration to microfluidic platforms for DNA electrophoresis », *Microsystem Technologies,* vol. 18, pp. 429-435, 2012.

[322] J.-H. Huang, K. E. Haffey, A. Arefin *et al.*, « A microfluidic method to measure bulging heights for bulge testing of polydimethylsiloxane (PDMS) and polyurethane (PU) elastomeric membranes », *RSC Advances,* vol. 8, 2018.

[323] M. J. Workman, J. P. Gleeson, E. J. Troisi *et al.*, « Enhanced Utilization of Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Human Intestinal Organoids Using Microengineered Chips », *Cellular and Molecular*

Gastroenterology and Hepatology, vol. 5, n°14, pp. 669-677, 2018.

[324] B. C. Buchanan et J.-Y. Yoon, « Microscopic Imaging Methods for Organ-on-a-Chip Platforms », *Micromachines,* vol. 13, n°1328, 2022.

[325] A. Almalla, N. Alzain, L. Elomaa *et al.*, « Hydrogel-Integrated Millifluidic Systems: Advancing the Fabrication of Mucus-Producing Human Intestinal Models », *Cells,* vol. 13, 2024.

[326] G. Altay, S. Tosi, M. García-Díaz *et al.*, « Imaging the Cell Morphological Response to 3D Topography and Curvature in Engineered Intestinal Tissues », *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,* vol. 8, 2020.

[327] L. C. Delon, Z. Guo, A. Oszmiana *et al.*, « A systematic investigation of the effect of the fluid shear stress on Caco-2 cells towards the optimization of epithelial organ-on-chip models », *Biomaterials,* vol. 255, 2019.

[328] F. Fenyvesi, K. Réti-Nagy, Z. Bacsó´ *et al.*, « Fluorescently Labeled Methyl-Beta-Cyclodextrin Enters Intestinal Epithelial Caco-2 Cells by Fluid-Phase Endocytosis », *PLoS ONE,* vol. 9, n°11, 2014.

[329] R. Malpique, F. Ehrhart, A. Katsen-Globa *et al.*, « Cryopreservation of Adherent Cells: Strategies to Improve Cell Viability and Function After Thawing », *Tissue Engineering Part C Methods,* vol. 15, n°13, pp. 373-386, 2009.

[330] N. Ashammakhi, R. Nasiri, N. Barros *et al.*, « Gut-on-a-chip: Current progress and future opportunities », *Biomaterials,* vol. 255, 2020.

[331] D. Sakharov, D. Maltseva, E. Knyazev *et al.*, « Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology », *CMB Systems Biology,* vol. 13, n°119, 2019.

[332] S. Er, A. T. Koparal et M. Kivanc, « Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells », *Turkish Journal of Biology,* vol. 39, n°11, pp. 23-30, 2015.

[333] J. Picalek et J. Kolafa, « Molecular dynamics study of conductivity of ionic liquids: The Kohlrausch law », *Journal of Molecular Liquids,* vol. 134, n°11, pp. 29-33, 2007.

[334] H. Wang et L. Pilon, « Accurate Simulations of Electric Double Layer Capacitance of Ultramicroelectrodes », *The Journal of Physical Chemistry C,* vol. 115, pp. 16711-16719, 2011.

[335] G. Gouy, « Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte », *Journal de Physique Théorique et Appliquée,* vol. 9, n°11, pp. 457-468, 1910.

[336] D. L. Chapman, « A contribution to the theory of electrocapillarity », *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science,* vol. 25, n°1148, pp. 475-481, 1913.

[337] O. Stern, « Zur Theorie der Elektrolytischen Doppelschicht », *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie,* vol. 30, n°121-22, pp. 508-516, 1924.

[338] A. Ivorra, M. Genesca, A. Sola *et al.*, « Bioimpedance dispersion width as a parameter to monitor living tissues », *Physiological Measurement,* vol. 26, 2005.

[339] H. Fricke, « The electric capacity of suspensions with special reference to blood », *Journal of General Physiology,* vol. 9, n°12, pp. 137-152, 1925.

[340] M. Ibrahim, J. Claudel, D. Kourtiche *et al.*, « Physical and Electrical Modeling of Interdigitated Electrode Arrays for Bioimpedance Spectroscopy », *New Developments and Applications in Sensing Technology,* vol. 83, pp. 169-189, 2011.

[341] J.-L. Damez, S. Clerjon, S. Abouelkaram *et al.*, « Formulation of a Dry Weight Bioimpedance Index in Hemodialysis Patients », *Meat*

Science, vol. 77, n°14, pp. 512-519, 2007.

[342] D. H. Elbrecht, C. J. Long, J. J. Hickman *et al.*, « Transepithelial/endothelial Electrical Resistance (TEER) theory and applications for microfluidic body-on-a-chip devices », *Journal of Rare Diseases Research & Treatment,* vol. 1, n°13, pp. 41-52, 2016.

[343] E. Gersing, « Impedance spectroscopy on living tissue for determination of the state of organs », *Bioelectrochemistry and Bioenergetics,* vol. 45, pp. 145-149, 1998.

[344] K. Benson, S. Cramer et H.-J. Galla, « Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond », *Fluids and Barriers of the CNS,* vol. 10, n°11, p. 5, 2013.

[345] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch *et al.*, « TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems », *Journal of Laboratory Automation,* vol. 20, n°12, pp. 107-126, 2015.

[346] B. A. Yezer, A. S. Khair, P. Sides *et al.*, « Use of electrochemical impedance spectroscopy to determine double-layer capacitance in doped nonpolar liquids. », *Journal of colloid and interface science,* vol. 449, pp. 2-12, 2015.

Résumé de la thèse en anglais

Inflammatory bowel diseases (IBD), including Crohn's disease and ulcerative colitis, are gastrointestinal disorders resulting from the interplay between genetic predispositions and environmental factors. Characterized by chronic inflammation, incurable, and with major medical and socio-economic impact, they involve epithelial barrier disruption, mucus abnormalities, and dysregulation of interactions with the microbiota, underlying tissues, and the immune system. These functions, essential to intestinal physiology, remain challenging to model: 2D cell cultures fail to reproduce the full architectural and dynamic complexity, while animal models present interspecies differences and ethical concerns. To address these limitations, innovative devices are emerging, including organ-on-a-chip platforms, which recreate dynamic and biomimetic microenvironments in vitro through microfluidics.

This thesis develops an instrumented gut-on-a-chip for the study of IBD, designed to model the intestinal barrier and enable real-time functional monitoring. Fabricated in polydimethylsiloxane, the chip consists of two superposed channels separated by a submicron porous membrane functionalized with fibronectin and subjected to physiological shear stress generated by peristaltic perfusion. Its performance is assessed through analytical and numerical approaches, with successive adjustments reinforcing robustness and reliability.

Biologically, a Caco-2 : HT29-MTX (9:1) coculture is used as an epithelial model, ensuring barrier functionality and mucus production. The transition from reference conditions to the microfluidic device highlights the influence of the microenvironment on cellular organization and dynamics. Mucus, used as an indicator of functional maintenance, is analyzed under physiologically representative conditions. Designed as an evolving platform, the chip can be complemented with mesenchymal, immune, or microbial compartments to more faithfully reproduce intestinal pathophysiology.

In parallel, micrometric interdigitated electrodes are developed to provide a non-invasive, sensitive, real-time monitoring tool for the epithelial barrier using impedance spectroscopy. Four geometries are characterized electrically and numerically, showing that the signal depends on electrode–sample interactions and the penetration depth within the epithelial monolayer and mucus layer. Biological validations, conducted on yeast suspensions and cocultures, confirm the device's ability to track adhesion, densification, and cellular reorganization, by identifying characteristic frequencies that differentiate extracellular and paracellular currents from transmembrane conduction. The study of extreme seeding conditions further illustrates the sensitivity of the method in detecting overconfluence and loss of cell viability. Impedance spectroscopy thus emerges as a robust, complementary tool to the gut-on-a-chip.

The results highlight the relevance of a biomimetic ex vivo model for IBD research and the value of microfluidic systems in reproducing physiologically relevant microenvironments. Instrumentation with interdigitated electrodes demonstrates the potential of impedance spectroscopy: their integration into the gut-on-a-chip would complete the device. In the longer term, the use of patient-derived cells would open potential applications in personalized medicine.

Key words: Inflammatory Bowel Diseases (IBD), Gut-on-a-chip, Microfluidics, Microelectronics, Impedance Spectroscopy.

Résumé de la thèse en français

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), incluant la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont des pathologies du tractus gastro-intestinal issues d'interactions entre prédispositions génétiques et facteurs environnementaux. Caractérisées par une inflammation chronique, incurables et à fort impact médico-socio-économique, elles impliquent altération de la barrière épithéliale, anomalies du mucus et dérégulation des échanges avec le microbiote, les tissus et l'immunité. Ces fonctions, essentielles à la physiologie intestinale, restent difficiles à modéliser : les cultures 2D ne restituent pas toute la complexité architecturale et dynamique, tandis que les modèles animaux présentent des limites interespèces et éthiques. Pour y répondre, des dispositifs innovants émergent, dont les organes-sur-puce, qui recréent in vitro des microenvironnements dynamiques et biomimétiques grâce à la microfluidique.

Cette thèse développe un intestin-sur-puce instrumenté pour l'étude des MICI, permettant de modéliser la barrière intestinale et d'en suivre les fonctions en temps réel. Réalisée en polydiméthylsiloxane, la puce comporte deux canaux superposés séparés par une membrane submicronique fonctionnalisée à la fibronectine et soumise à une contrainte de cisaillement générée par perfusion péristaltique. Son fonctionnement s'évalue par approches analytiques et numériques, avec des ajustements successifs qui renforcent robustesse et fiabilité.

Sur le plan biologique, une coculture Caco-2 : HT29-MTX (9:1) sert de modèle épithélial, assurant barrière fonctionnelle et production de mucus. Son évolution, des conditions de référence jusqu'au dispositif microfluidique, met en évidence l'influence du microenvironnement sur l'organisation et la dynamique cellulaires. Le mucus, pris comme indicateur du maintien fonctionnel, fait l'objet d'analyses dans des conditions physiologiques représentatives. Conçue comme plateforme évolutive, la puce peut être complétée par des compartiments mésenchymateux, immunitaires ou microbiens pour refléter plus fidèlement la physiopathologie intestinale.

En parallèle, des électrodes interdigitées micrométriques sont développées pour un suivi non invasif, sensible et en temps réel de la barrière épithéliale par spectroscopie d'impédance. Quatre géométries sont caractérisées électriquement et numériquement, montrant que le signal dépend de l'interaction électrode-échantillon et de la profondeur de pénétration dans la monocouche et le mucus. Des validations biologiques, menées sur levures puis cocultures, confirment la capacité du dispositif à suivre adhésion, densification et réorganisation cellulaires, en identifiant des fréquences caractéristiques différenciant les passages extracellulaires et paracellulaires d'une part, et transmembranaires d'autre part. L'étude de conditions extrêmes d'ensemencement illustre la sensibilité de la méthode à la surconfluence et à la perte de viabilité. La spectroscopie d'impédance constitue ainsi un outil robuste et complémentaire à l'intestin-sur-puce.

Les résultats mettent en évidence l'intérêt d'un modèle ex vivo biomimétique pour l'étude des MICI et la pertinence des systèmes microfluidiques pour reproduire des environnements physiologiques. L'instrumentation par électrodes interdigitées démontre la valeur de la spectroscopie d'impédance : leur intégration dans l'intestin-sur-puce contribuerait à compléter le dispositif. À terme, l'utilisation de cellules dérivées de patients ouvrirait des perspectives en médecine personnalisée.

Mots clés : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), Intestin-sur-puce, Microfluidique, Microélectronique, Spectroscopie d'impédance.