



**HAL**  
open science

# Stimulation bioélectrique à retour objectif

Alexia Bailleul

► **To cite this version:**

Alexia Bailleul. Stimulation bioélectrique à retour objectif. Electronique. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0104 . tel-04572990

**HAL Id: tel-04572990**

**<https://theses.hal.science/tel-04572990>**

Submitted on 13 May 2024

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR**  
**DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUE ET DE  
L'INGÉNIEUR  
SPÉCIALITÉ ÉLECTRONIQUE

Par **Alexia BAILLEUL**

---

**Stimulation bioélectrique à retour objectif**

---

Sous la direction de : Sylvie RENAUD et de Serge BERNARD

Soutenue le 19 avril 2023

Membres du jury :

M. FRANCAIS Olivier	PU	Université Gustave Eiffel-ESIEE, ESYCOM	Rapporteur
M. BERGAUD Christian	DR	CNRS, LAAS	Rapporteur
Mme DUFOUR Isabelle	PU	Université de Bordeaux, IMS	Présidente
Mme CABASSON Aline	MCF	Université Côte d'Azur, I3S	Examinatrice
M. CARNAC Gilles	CR	CNRS, PhyMedExp	Examineur
Mme RENAUD Sylvie	PU	Bordeaux INP, IMS	Directrice de thèse
M. BERNARD Serge	DR	CNRS, LIRMM	Co-directeur de thèse
M. SOULIER Fabien	MCF	Université de Montpellier, LIRMM	Invité



Thèse réalisée dans les laboratoires

**IMS**

au sein du groupe **BioElectronique**.

Université de Bordeaux

CNRS UMR-5218 - Bordeaux INP

351 cours de la libération

33405 TALENCE Cedex

France

**LIRMM**

au sein du groupe **Microélectronique**.

Université de Montpellier

CNRS UMR-5506

161 rue Ada

34095 MONTPELLIER Cedex 5

France



*« Chaque découverte scientifique est passionnante parce qu'elle ouvre un univers de questions. Si les questions vous angoissent, ne soyez pas scientifiques. »*

Boris Cyrulnik



# Résumé

Les accidents vasculaires cérébraux et les lésions de la moelle épinière sont les deux principales causes de paralysie. Une récupération complète des fonctions motrices n'est pas possible à l'heure actuelle, mais un rétablissement partiel de ces fonctions peut être atteint grâce à la stimulation électrique : cette approche permet déjà une amélioration de la qualité de vie de patients en leur rendant une certaine indépendance.

La stimulation électrique consiste à exciter des tissus biologiques à l'aide d'un courant électrique pour activer une réponse physiologique ou motrice. Plus particulièrement, la stimulation électrique fonctionnelle se concentre sur les troubles neuromusculaires et vise à restaurer la motricité. Cependant, les implants présentent encore des limites qui empêchent leur utilisation chronique. La stimulation électrique ne recrée pas fidèlement le fonctionnement du système neuromusculaire : en particulier, elle ne respecte pas l'ordre de recrutement naturel des fibres musculaires et active d'abord les plus larges et les plus fatigables, aboutissant à une fatigue musculaire prématurée.

Actuellement, la majorité des systèmes de stimulation fonctionne en boucle ouverte, c'est-à-dire que les paramètres de stimulation sont pré-programmés et ne s'adaptent pas automatiquement à l'état physiologique des tissus stimulés, soit de leur fatigue. Ce type de fonctionnement non-adaptatif limite l'efficacité du système et son utilisation à long terme.

De ce constat émerge le besoin d'un contrôle en boucle fermée, qui nécessite un retour objectif permettant d'évaluer l'efficacité de la stimulation et d'ajuster ses paramètres en fonction de la fatigue musculaire. Comme phénomène complexe, multifactoriel et dynamique, la fatigue se traduit par diverses altérations physiologiques, métaboliques, mécaniques et électriques.

L'objectif de cette thèse est d'établir un marqueur de la fatigue musculaire induite par stimulation électrique. Ce marqueur se doit d'être objectif, évaluant l'état physiologique des tissus musculaires et l'efficacité de la stimulation. Notre choix s'est porté sur la mesure de bioimpédance, qui évalue les propriétés électriques intrinsèques des tissus permettant alors de renseigner sur leur état physiologique. Il s'agit d'une mesure électrique rapide, réalisée par l'intermédiaire d'électrodes, déjà présentes dans les systèmes d'électrostimulation. Afin d'identifier un marqueur de la fatigue musculaire par bioimpédancemétrie, nous avons fait le choix d'utiliser un modèle de muscle squelettique *in vitro*, pour sa simplicité et rapidité de mise en œuvre pour réaliser une preuve de concept. Le manuscrit de thèse détaille nos approches et résultats ayant permis de :

- Développer et caractériser deux modèles *in vitro* de muscle squelettique, respectivement en 2D (sur microelectrode array) et en 3D (mini-muscle autour de piliers PDMS se rapprochant davantage des conditions *in vivo*). Dans cette dernière configuration, le dispositif combinant stimulation électrique des tissus musculaires 3D et la mesure de force de contraction a été validé.
- Développer et valider l'instrumentation permettant la stimulation électrique et les mesures de bioimpédance sur ces modèles *in vitro*.
- Réaliser la preuve de concept de mesure de fatigue par bioimpédancemétrie dans un contexte *in vitro* 2D.

A travers l'application de divers scénarios de stimulation, nous montrons que notre système est capable d'induire une activité musculaire sur un modèle *in vitro* 2D, et que cette activité engendre des variations mesurables de la bioimpédance. Des premières conclusions sont tirées sur la variation de la bioimpédance en fonction des profils de stimulation, en vue de valider la capacité de la bioimpédance à être un marqueur de la fatigue. Les travaux à venir viseront à extrapoler ces résultats au modèle *in vitro* 3D développé dans la thèse.

**Mots-clés :** Stimulation électrique, Bioimpédance, MEA, In vitro, Fatigue musculaire, Muscle squelettique

# Abstract

Cerebrovascular accidents and spinal cord injuries are the leading cause of paralysis. While full restoration of motor functions is yet unattainable, partial recovery is made possible thanks to electrical stimulation : as of today, this approach is already improving the quality of life of paralyzed patients and restoring partial independence. Electrical stimulation consists in exciting biological tissues with an electrical current to elicit a physiological or a motor response. In particular, functional electrical stimulation focuses on restoring motor function in neuromuscular disorders. However, modern implants still have flaws that limit chronic use.

Electrical stimulation does not faithfully mimic the function of the neuromuscular system : particularly, it does not follow the natural order of recruitment of muscle fibers. Instead, it activates the largest and most-fatigable fibers first, leading to premature muscle fatigue. Currently, most electrical stimulation devices operate in open-loop, meaning their stimulation parameters are preprogrammed and do not adjust with respect to the physiological state of the stimulated tissues (i.e. their fatigue). This lack of adaptability greatly hinders the efficacy of the system, as well as its long-term usability. This matter motivates the development of closed-loop controlled systems, that will monitor the efficacy of stimulation and adapt their parameters with respect to muscle fatigue. As a complex, multifactorial, and dynamic phenomenon, muscle fatigue translates to diverse physiological, metabolic, mechanical, and electrical alterations. In turn, these affect the passive electrical properties of muscle tissues (conductivity, permittivity), which can be evaluated through bioimpedance measurements.

The goal of this thesis is to establish a marker of electrically-induced muscle fatigue. This marker should objectively evaluate the physiological state of muscle tissue and the efficiency of stimulation. To that end, we use bioimpedance measurements that evaluate the intrinsic electrical properties of tissue and encode their physiological state. Bioimpedance is a fast electrical measurement, performed thanks to electrodes that already exist in electrostimulation systems. In this work, we seek to identify a bioimpedance-based marker of muscle fatigue on an *in vitro* skeletal muscle cell model, chosen for its simplicity and rapid deployment towards a proof-of-concept. This thesis manuscript describes our investigations and findings in :

- Developing and characterizing two *in vitro* skeletal muscle models, one in 2D (on microelectrode arrays) and the other 3D (muscle organoids cultured on PDMS pillars, closer to *in vivo* conditions). In the latter, the equipment responsible for both electrical stimulation of 3D muscle tissue and measurement of contraction force was validated.
- Developing and validating the instrumentation responsible for electrical stimulation and bioimpedance measurements on the *in vitro* cell models.
- Deploying a proof-of-concept of bioimpedance-based measurements of muscle fatigue on *in vitro* 2D muscle cells.

Through several stimulation scenarios, we demonstrate that the developed system is capable of inducing muscle cell activity on an *in vitro* 2D model that further leads to measurable effects on bioimpedance. Conclusions are drawn from the measured bioimpedance variations observed with respect to stimulation patterns, in order to

validate the ability of bioimpedance to reflect muscle fatigue. From the grounds presented in this thesis, future works will aim at extending the results to the 3D *in vitro* cell model developed at the end of the thesis.

**Keywords :** Electrical stimulation, Bioimpedance, MEA, In vitro, Muscle fatigue, Skeletal muscle

## *Remerciements*

Ce manuscrit de thèse est l’aboutissement de trois années de recherche, une aventure source de joies et d’exaltations, mais aussi de questionnements et de (nombreuses) remises en question. Les travaux présentés dans ce document n’auraient pu voir le jour sans l’aide et le soutien de nombreuses personnes que je souhaite remercier à travers ces quelques pages.

Je remercie tout d’abord M. Olivier Français et M. Christian Bergaud, d’avoir accepté de relire mon manuscrit de thèse. Vos remarques et vos questions ont mené à une discussion scientifique très enrichissante, apportant d’intéressantes pistes d’amélioration possibles pour la suite de mes travaux. Mes remerciements vont également aux autres membres du jury, qui ont tous accepté sans hésitation de se déplacer pour évaluer mes travaux de thèse. Je remercie M. Gilles Carnac d’avoir apporté son expertise en biologie et ingénierie tissulaire. Vos retours constructifs et votre enthousiasme pour mon travail ont mis en lumière plusieurs perspectives, toute aussi passionnante les unes que les autres. Je souhaite aussi remercier Mme Aline Cabasson, qui, malgré l’éloignement entre nos deux domaines de recherche, a su trouver des remarques et des questions très justes et pertinentes. Enfin, je remercie Mme Isabelle Dufour, présidente du jury, pour sa curiosité et son enthousiasme à l’égard de mon travail. La diversité des domaines d’expertise de chacun des membres du jury a conduit à une soutenance extrêmement enrichissante et agréable, que ce soit sur le plan scientifique mais aussi humain.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement Sylvie Renaud et Serge Bernard, pour m’avoir offert l’opportunité de réaliser une thèse sous leur direction. Merci pour votre soutien, votre bienveillance, votre humanité... Il n’est pas toujours évident d’encadrer une étudiante qui doute beaucoup mais vous avez accompli cette tâche avec brio. Vous avez su me soutenir, m’encourager et me conseiller avec empathie et sagesse dans les meilleurs moments comme dans les pires. Je me sens extrêmement chanceuse d’avoir eu l’opportunité de vous rencontrer et d’avoir réalisé mes travaux de thèse à vos côtés. Ces travaux sont le reflet de mon travail, mais aussi de votre incroyable encadrement qui m’a permis de persévérer. Vous m’avez apporté l’écoute, la confiance et l’autonomie nécessaire pour faire de moi une scientifique, mais aussi une personne, écoutée, respectée et plus sûre d’elle. Pour tout cela, je ne saurais vous remercier assez.

Je remercie les professeurs Yann Deval et Cristell Maneux, directeurs successifs de l’IMS, de m’avoir accueilli au sein du laboratoire. Je remercie également Yann Percherancier et Yannick Bornat (puis Timothée Lévi) de m’avoir accueilli respectivement au sein du groupe Bioélectronique et de l’équipe Elibio (maintenant devenue TIPS). Je réalise la chance que j’ai d’avoir pu travailler dans ce groupe multidisciplinaire si bienveillant, accueillant, et scientifiquement stimulant. Mener à bien une thèse est impossible sans équipe, c’est pourquoi je tiens à remercier l’ensemble des membres de l’équipe Elibio/TIPS que j’ai pu rencontrer au cours de ces trois années. Merci Noëlle de t’être rendue disponible pour moi lorsque j’en avais besoin, pour m’avoir aidé à rédiger mon premier article et m’avoir transmis ton expertise en bioimpédance. Merci également à Antoine, pour ton savoir être et ton savoir-faire. Tes (si nombreuses) connaissances techniques et scientifiques, mêlées à ta pédagogie, m’ont énormément apporté, notamment en programmation et analyse vidéo. Tu m’as également apporté une aide précieuse lors de ma période de rédaction. Vient ensuite le tour de notre Père Castor, plus connu sous le nom de Gilles : merci pour ta bonne humeur, tes encouragements, ton humour et tes histoires toujours plus saugrenues les unes que les autres. Je

souhaite aussi remercier les doctorants de cette belle équipe Elibio : merci Loïc, Marie et Roland, pour le soutien mutuel, les discussions/débats scientifiques (et pas que) et les fous rire lors des pauses déjeuner. Je tiens à remercier plus particulièrement Loïc : tu m'as toujours soutenu et écouté (vive les biérotérapies) et a su me faire relativiser dans n'importe quelle situation. Marie, ton sujet de thèse était très loin d'être facile, et j'admire sincèrement ta persévérance et ta rigueur scientifique. Je te souhaite une soutenance de thèse aussi belle et agréable que la mienne. Roland, avec Marie et moi tu as vu toutes les phases de joie et de déprime d'un doctorat, mais je n'ai aucun doute sur le fait que ta thèse sera elle aussi très réussie. Merci à tous les autres membres de l'équipe qui ont croisé ma route, merci à Yannick, Donnie, et également aux deux stagiaires, Adrien et Aurélian, pour votre travail et l'aide précieuse que vous m'avez apporté.

Ma thèse ayant débuté par une mission au sein du laboratoire LIRMM à Montpellier, je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe SmartIES. Et plus particulièrement, merci à Serge, Fabien, Michel, Vincent, Mohan, Achraf, Moez et Fathi, pour votre accueil chaleureux, vos précieux conseils et votre soutien. La pandémie a malheureusement réduit le temps passés ensemble, mais je n'oublierai jamais ce lieu où tout a commencé, avec le doux son des cigales en été qui me rappelle mon sud (le vrai sud, donc pas Bordeaux).

Ensuite, je tiens à remercier les autres équipes du groupe Bioélectronique, notamment l'équipe Bio-EM (maintenant SANE). Merci à l'ensemble de ses membres pour votre gentillesse et tous les échanges scientifiques que nous avons pu avoir autour de la biologie. Il est parfois difficile de communiquer entre experts de domaines variés, mais votre curiosité scientifique et votre passion pour votre métier a fait naître des échanges passionnants. Je souhaite plus particulièrement remercier Florence, pour son aide et sa disponibilité pour la réalisation de l'ensemble de mes expérimentations. Celles-ci n'auraient pas été possible sans toi, tu as été un élément clé à la réussite de cette thèse. Même lorsque je t'ai demandé de sortir de ta zone de confort pour faire des mini-muscles 3D, tu n'as jamais râlé et m'a toujours apporté ton aide pour mes manips. Merci également aux doctorants de cette équipe, avec qui j'ai passé du temps en salle de manips en semaine ou le week-end. En particulier, merci Alex et Anne pour nos discussions scientifiques et personnelles, les rires nerveux en raison de manips qui marchent paaaas, de MEA, de cellules déchirées, décollées, contaminées... Finalement, merci à l'ensemble des doctorants du groupe BioElec : Loïc, Marie, Roland, Clémence, Alex, Anne pour les afterworks, les pauses repas qui nous ont tous permis de râler, rire, décompresser.

Mes travaux m'ont amené à collaborer avec des experts de domaines divers et variés, tous rassemblés autour du projet SMARTSTIM. Je souhaite ainsi remercier l'ensemble des partenaires du projet pour les rencontres/discussions scientifiques annuelles, qui furent immensément enrichissantes et inspirantes. Outre Florence, je voudrais remercier Julien et Florian, pour votre disponibilité malgré une charge de travail importante, votre pédagogie et l'aide précieuse que vous m'avez apporté lors de ces trois années. Vous avez la capacité de transmettre vos connaissances de manière si simple et si didactique que ce fut un réel plaisir d'échanger et d'apprendre avec vous.

Il me paraît également indispensable de remercier l'ensemble des personnes en dehors de la sphère professionnelle, amis et amis d'amis, qui m'ont permis de me distraire, de décompresser et de ne pas oublier ma vie hors labo. Je commencerai par remercier les Apprentis (Supé-Supé-Supélec est là!) pour les différents week-end passés ensemble, comme à la belle époque, avec une pensée particulière pour Ju et Jgleu, respectivement mes dog- et cat-person préférés. Je souhaite aussi remercier ceux

rencontrés ces dernières années, lors de concerts ou autour de verre(s), apéros (parfois dinatoires) : merci Ben, Popo, Ulysse, Gabi, Guilhem, Lola, Nico...

Je dédie ce paragraphe (et plus généralement cette thèse) à l'ensemble des personnes qui dans le passé m'ont tendu la main, m'ont aidé à me relever, et à me dépasser quand j'en avais besoin. Je n'en serais pas là aujourd'hui sans vous. Merci à Emeric pour les galetothérapies (ça ne nous rajeunit pas), les soirées canap ou bar, ton soutien, ta bonne humeur et ton optimisme inébranlable. Merci Aline et Christophe, pour votre bienveillance, votre pédagogie et vos conseils. Sans vous, je n'aurais jamais postulé et intégré Supélec, et je n'aurais alors jamais rencontré Sylvie. Aline, je ne vais pas refaire une déclaration ici, nous avons suffisamment pleuré le jour de la soutenance, mais je te suis éternellement reconnaissante pour ton aide, ton empathie, les soupes de nouilles, les mojitos, la découverte de la Malaisie et du tartare de bœuf. Mes pensées vont également à mes anciens mentors Christophe et Thierry (les vieux dinosaures), qui ont cru en moi, cette étudiante/ « petite caissière de Leclerc ». Vous m'avez permis de grandir et de m'affirmer (oui je râle toujours).

Enfin, je tiens à remercier ma famille pour votre soutien durant ces trois ans et votre présence le jour de ma soutenance. Mention spéciale à ma belle-famille (les Sarrote, Escourolle, Jourdain, Esponda et tutti quanti), pour votre accueil si chaleureux au sein de votre famille, vos petites attentions envers moi, votre soutien, votre champagne et cognac-Schweppes, vos concerts. Vous vous êtes déplacés en nombre pour m'écouter parler pendant plusieurs heures, sur des sujets scientifiques et techniques complexes, mais cela vous faisait plaisir et m'a rempli de joie. Et par-dessus tout, merci Pierre d'être à mes côtés depuis toutes ces années. Il n'est pas aisé de vivre avec une thésarde mais tu as su m'apporter tout ce dont j'avais besoin : nourriture ( O : ) , distractions, sorties, concerts, vacances, rires, réconfort, soutien, amour... Tu m'as faite découvrir cette belle région du Sud-Ouest, qui est devenue ma maison. Chocolatine et poche, merci à tous...



# Table des matières

Résumé	vii
Abstract	ix
Table des figures	xix
Liste des tableaux	xxxi
Liste des Abréviations	xxxiii
Introduction	1
<b>1 Contexte scientifique : la stimulation électrique fonctionnelle</b>	<b>3</b>
1.1 Histoire de la stimulation électrique . . . . .	3
1.2 Principe de la stimulation électrique . . . . .	6
1.2.1 Électrophysiologie des cellules excitables . . . . .	6
1.2.2 Principe de la stimulation extracellulaire . . . . .	8
1.2.3 Electrodes pour la stimulation électrique . . . . .	13
1.2.4 Signaux pour la stimulation électrique . . . . .	15
1.3 Applications de la stimulation électrique . . . . .	18
1.3.1 Les applications thérapeutiques . . . . .	19
1.3.2 Les applications fonctionnelles . . . . .	20
1.4 Stimulation électrique pour le contrôle moteur . . . . .	22
1.4.1 Anatomie et physiologie du système moteur . . . . .	22
1.4.1.1 Structure du système neuromusculaire . . . . .	22
1.4.1.2 Le couplage excitation-contraction . . . . .	25
1.4.1.3 Recrutement naturel et modulation de la force . . . . .	27
1.4.2 Restaurer la motricité avec la stimulation électrique . . . . .	29
1.4.2.1 Recrutement par stimulation électrique et modulation de la force . . . . .	29
1.4.2.2 Adaptations musculaires en réponse à la stimulation électrique . . . . .	31
1.5 Les limites et les enjeux de la stimulation électrique . . . . .	32
1.6 Objectifs de la thèse et environnement du projet . . . . .	33
1.6.1 Objectifs . . . . .	33
1.6.2 Environnement du projet . . . . .	34
<b>2 La bioimpédance comme marqueur de la fatigue musculaire</b>	<b>37</b>
2.1 Comment évaluer la fatigue musculaire ? . . . . .	37
2.1.1 Définition de la fatigue . . . . .	37
2.1.2 Mécanismes impliqués dans le développement de la fatigue lors de contractions volontaires . . . . .	39
2.1.2.1 La fatigue centrale . . . . .	39
2.1.2.2 La fatigue périphérique . . . . .	40

2.1.3	Mécanismes de la fatigue induite par stimulation électrique . . .	42
2.1.3.1	Sollicitations physiologiques et métaboliques . . . . .	42
2.1.3.2	Mécanismes de la fatigue électriquement induite . . . . .	43
2.1.3.3	Influence des paramètres de stimulation . . . . .	44
2.1.4	Méthodes de mesure de la fatigue musculaire . . . . .	45
2.2	Bioimpédance : un marqueur électrique de l'état des tissus . . . . .	47
2.2.1	Définitions générales . . . . .	48
2.2.2	Propriétés électriques des milieux biologiques . . . . .	50
2.2.2.1	Conductivité ionique . . . . .	51
2.2.2.2	Propriétés diélectriques . . . . .	52
2.2.3	Propriétés électriques passives des tissus . . . . .	53
2.2.4	Modèles électriques équivalents . . . . .	55
2.2.4.1	Modèle électrique des tissus . . . . .	55
2.2.4.2	Effets d'interface . . . . .	57
2.2.4.3	Modèle électrique global . . . . .	60
2.2.5	Méthodes de mesures d'impédance . . . . .	60
2.2.6	Applications . . . . .	62
2.2.6.1	Les principales applications de la spectroscopie d'im- pédance . . . . .	62
2.2.6.2	Les effets de l'activité musculaire sur la bioimpédance	62
2.3	Conclusion . . . . .	63
<b>3</b>	<b>Conception du banc de test <i>in vitro</i></b>	<b>67</b>
3.1	Modèle biologique <i>in vitro</i> de muscle squelettique . . . . .	68
3.2	Conception du système de stimulation électrique . . . . .	70
3.2.1	État de l'art des systèmes de stimulation <i>in vitro</i> . . . . .	70
3.2.2	Architecture du système de stimulation électrique . . . . .	73
3.2.3	Validation du système de stimulation électrique et du modèle biologique . . . . .	77
3.2.3.1	Protocoles . . . . .	77
3.2.3.2	Résultats . . . . .	79
3.3	Conception du système de mesure de bioimpédance . . . . .	84
3.3.1	Etat de l'art des systèmes de mesure de bioimpédance <i>in vitro</i> .	84
3.3.2	Conception d'interfaces et d'électrodes de stimulation adaptées	85
3.3.3	Choix technologiques des MEA et mise au point du protocole de culture . . . . .	86
3.3.3.1	Mise au point du protocole de culture : choix du coating	86
3.3.3.2	Effet de la couche de passivation . . . . .	88
3.3.4	Caractérisation du système de mesure de bioimpédance . . . . .	90
3.3.4.1	Impédance théorique . . . . .	91
3.3.4.2	Impédance réelle : effet du matériau des électrodes et effets parasites . . . . .	94
3.3.4.3	Effet du coating . . . . .	98
3.4	Évaluation de l'activité contractile <i>in vitro</i> . . . . .	99
3.4.1	État de l'art des méthodes d'évaluation de l'activité contractile <i>in vitro</i> . . . . .	99
3.4.2	Matériel pour les mesures optiques . . . . .	102
3.4.3	Matériel pour les mesures électrophysiologiques . . . . .	103
3.5	Bilan des caractéristiques du banc de test . . . . .	104

<b>4</b>	<b>Évaluation de la fatigue musculaire par mesure de bioimpédance</b>	<b>107</b>
4.1	Protocoles expérimentaux	107
4.1.1	Phase de culture cellulaire	107
4.1.2	Phase d'expérimentations	109
4.1.2.1	Stimulation électrique	109
4.1.2.2	Mesures de bioimpédance	110
4.1.2.3	Suivi vidéo et analyse de l'activité contractile	111
4.2	Identification d'une métrique pour l'évaluation de la fatigue musculaire par bioimpédance	112
4.3	Résultats expérimentaux	116
4.3.1	Série 1	116
4.3.1.1	Scénarios et patterns de stimulation électrique	116
4.3.1.2	Résultats	118
4.3.2	Série 2	126
4.3.2.1	Scénarios et patterns de stimulation électrique	126
4.3.2.2	Résultats	127
4.3.3	Série 3	133
4.3.3.1	Scénarios et patterns de stimulation électrique	133
4.3.3.2	Résultats	134
4.3.4	Synthèse des effets des paramètres de stimulation	140
4.4	Discussion	140
<b>5</b>	<b>Évaluation mécanique de la fatigue musculaire dans un modèle 3D</b>	<b>147</b>
5.1	Principe de fonctionnement et état de l'art	148
5.2	Dispositif basé sur l'état de l'art : mise au point du protocole de fabrication et essais de culture <i>in vitro</i> 3D	150
5.2.1	Conception et fabrication	151
5.2.2	Essai de culture <i>in vitro</i> 3D	156
5.2.2.1	Protocoles expérimentaux	156
5.2.2.2	Résultats et discussion	158
5.3	Conception d'un nouveau dispositif : améliorations de la géométrie et du protocole de culture	160
5.3.1	Modifications des dimensions des piliers et des chambres de culture	160
5.3.2	Évaluation mécanique de l'activité musculaire	162
5.3.2.1	Protocoles expérimentaux	162
5.3.2.2	Résultats	165
5.4	Discussion générale	170
	<b>Conclusion</b>	<b>177</b>
	<b>A Data sheet du Keysight E4990A</b>	<b>181</b>
	<b>Liste des publications</b>	<b>183</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>185</b>



# Table des figures

1.1	(a) Illustration d'une préparation nerf-muscle de J. Swammerdam [3]. (b) Illustration du laboratoire de L. Galvani avec une table sur laquelle est posée une grenouille disséquée et une machine électrique. . . . .	4
1.2	Schéma et photographie du rhéotome inventé par J. Bernstein [17]. . .	5
1.3	(a) Photographie du premier pacemaker implanté en 1958 (6 x 2.2 cm, 170 g, image de Siemens <sup>1</sup> ). (b) Photographie du plus petit pacemaker au monde, Micra <sup>TM</sup> TPS, mesurant 25.9 x 6.7 mm, pour un poids de 1.75 g. Image de Medtronic <sup>2</sup> . . . . .	5
1.4	Schéma de la membrane plasmique et ses principaux canaux ioniques .	6
1.5	(a) Modèle électrique à conductance parallèle de la membrane plasmique des cellules excitables. (b) Représentation du signal de potentiel d'action.	8
1.6	Modèle électrique d'une fibre uniforme de diamètre $d$ , représentée par une série de compartiments de longueur $\Delta x$ liés par des conductances intracellulaires axiales $G_a$ . Chaque compartiment est modélisé par un circuit parallèle comprenant une capacité $C_m$ et une conductance $G_m$ en série avec le potentiel de repos $V_r$ et un courant ionique $I_{m,n}$ . Illustration adaptée de [23]. . . . .	10
1.7	Illustration du concept de fonction d'activation permettant de prédire les zones dépolarisées et hyperpolarisées, dans le cas d'une stimulation extracellulaire d'une fibre excitable, délivrée par une source ponctuelle à une certaine distance de la fibre. . . . .	11
1.8	Représentation des courbes amplitude-durée et charge-durée indiquant l'ensemble des combinaisons de paramètres d'un stimulus pour atteindre le seuil d'excitation. . . . .	12
1.9	(a) Effet de la distance entre l'électrode et un axone sur le seuil d'excitation, en fonction du diamètre de la fibre (largeur d'impulsion fixée à 100 $\mu s$ ). Calculé par [28] à partir du modèle de McNeal [24]. (b) Courbes amplitude-durée en fonction du type cellulaire. Illustrations issues de [22].	13
1.10	Formes d'onde typiques et leurs paramètres . . . . .	16
1.11	Exemples de sites d'applications de la stimulation électrique . . . . .	18
1.12	(a) Ceinture lombaire d'électrothérapie commercialisée par Urgo <sup>3</sup> . (b) Photographie du seul neurostimulateur pour stimulation cérébrale profonde commercialisé (Medtronic, Percept <sup>TM</sup> , 68 x 51 x 11 mm, 61 g) <sup>4</sup> . . . . .	20
1.13	(a) Illustration du système de stimulation du pied tombant ActiGait [57]. (b) Photographie du dernier implant cochléaire développé par Oticon Medical, Neuro 2, image d'Oticon medical <sup>5</sup> . (c) Photographie du neurostimulateur implantable eCoin <sup>®</sup> pour le traitement de l'incontinence urinaire <sup>6</sup> . . . . .	21
1.14	Organisation des structures neurales impliquées dans le contrôle moteur	23
1.15	Anatomie du muscle strié squelettique <sup>7</sup> . . . . .	24
1.16	Schéma du couplage excitation-contraction . . . . .	26

1.17 Réponse mécanique (secousse, ou <i>twitch</i> ) d'une fibre musculaire à un seul potentiel d'action (PA), caractérisée par une période de latence et une phase de contraction et de relaxation. Les temps indiqués sont arbitraires. . . . .	28
1.18 Phénomène de sommation temporelle des contractions d'une seule fibre découlant de l'augmentation des stimuli nerveux. . . . .	29
1.19 Recrutement des fibres musculaires en réponse à une stimulation électrique appliquée sur le muscle (a) ou sur le nerf (b) . . . . .	30
2.1 Facteurs menant à l'épuisement : (1) variations de la force requise, (2) variations de la force maximale, (3) fatigabilité intrinsèque du muscle (adaptée de [107]). . . . .	38
2.2 Illustration des manifestations de la fatigue : baisse de la force développée lors d'une secousse et d'une contraction tétanique parfaite, allongement des temps de contraction et de relaxation, et baisse des vitesses de contraction et de relaxation, entraînant une modification de la relation force-fréquence. . . . .	39
2.3 Sites potentiels de la fatigue neuromusculaire : la fatigue centrale est associée aux altérations des sites 1-3, et la fatigue périphérique aux altérations des sites 4-9. Adaptée de [108]. . . . .	40
2.4 Relation entre la concentration de calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique (RS) et la force produite par un muscle non fatigué et par un muscle fatigué. Au cours de la fatigue, la force développée peut diminuer en raison d'une diminution de la force maximale produite par chaque pont d'actine-myosine, d'une diminution de la sensibilité au calcium des myofibrilles, et/ou d'une diminution de la quantité de calcium libéré par le RS (Figure adaptée de [111]). . . . .	41
2.5 Exemples d'utilisations d'un dynamomètre isocinétique (Biodex System 4 <sup>8</sup> ) pour la mesure de couple généré lors de mouvements de la cheville ou de la flexion du genou. . . . .	46
2.6 Évolution de l'onde M sur 30 s de stimulation à 30 Hz du muscle biceps brachial. Adaptée de [133]. . . . .	47
2.7 Schéma présentant les liens entre les grandeurs de conductivité, résistivité et résistance pour un matériau conducteur (gauche), de capacitance et de permittivité pour un matériau diélectrique (milieu), de conductivité, permittivité et impédance pour un matériau à la fois conducteur et diélectrique (droite). . . . .	49
2.8 Exemples de représentation de l'impédance : (gauche) diagramme de Bode représentant le module et la phase de l'impédance en fonction de la fréquence de mesure, (droite) diagramme de Nyquist représentant la partie imaginaire $X$ de l'impédance en fonction de sa partie réelle $R$ . Figures adaptées de [138]. . . . .	50
2.9 Schéma des différents types de polarisation induites par l'application d'un champ électrique : (a) polarisation électronique, (b) polarisation ionique, (c) polarisation d'orientation. . . . .	53
2.10 Schéma des trajectoires du courant dans les tissus et milieux biologiques en fonction de la fréquence du signal de mesure . . . . .	54
2.11 Spectres de permittivité et de conductivité des tissus biologiques et les 3 dispersions $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ . . . . .	55

2.12	Spectres de permittivité et de conductivité du muscle en longitudinal et en transversal (ovin), du sang (ovin, données limitées à des fréquences supérieures à 1 MHz) et du tissu adipeux (bovin), mesurés à 37°C par [146, 147] <sup>9</sup> . . . . .	56
2.13	(a) Modèle électrique équivalent des tissus biologiques proposé par Fricke et (b) la représentation dans le plan complexe des mesures d'impédance réalisées par Fricke sur une suspension de globules rouges de veau (figure extraite de [149]). . . . .	56
2.14	(a) Modèle électrique équivalent de Cole-Cole, comprenant un CPE de phase constante $\phi$ , des résistances $R_\infty$ et $\Delta R = R_0 - R_\infty$ , et (b) la représentation dans le plan complexe de l'impédance associée (figure extraite de [149]). . . . .	57
2.15	Schéma de la double couche électrique à l'interface électrode-électrolyte (sans ions adsorbés), composée de la couche compacte et de la couche diffuse. L'effet capacitif de la double couche engendre une chute de potentiel (trait plein rouge) égale à $\Phi_0 - \Phi_2$ , avec $\Phi_0$ le potentiel appliqué à l'électrode et $\Phi_2$ le potentiel au plan externe d'Helmholtz (PEH). . . . .	58
2.16	Modèle global de l'ensemble électrode-tissu correspondant à la mise en série du modèle électrique de l'interface ( $C_{dl}$ ou $Z_{CPE}$ ) et du modèle électrique du tissu (modèle de Fricke ou modèle de Cole). L'impédance de l'interface (courbe grise) masque l'impédance du tissu (courbe marron) en basse fréquence. . . . .	60
2.17	Schéma des configurations de mesure de bioimpédance à 2 et 4 électrodes	61
2.18	(a) Variations de force, de résistance et de réactance (R et X mesurées à 50 kHz) lors de contractions volontaires en rampes ou en impulsions, figure issue de [171] (b) Diagramme de Nyquist des mesures de bioimpédance du biceps d'un participant avant et après fatigue, figure issue de [174]. . . . .	64
3.1	Schéma bloc du banc de test adapté à un modèle de muscle squelettique <i>in vitro</i> . Il comprend un système de stimulation incluant l'électronique permettant la génération des signaux de stimulation, ainsi qu'une interface et des électrodes dédiées pour délivrer ces signaux. Le système de mesure de bioimpédance comprend l'électronique et des électrodes permettant la mesure, et une interface entre ces deux blocs. Un dernier bloc permet l'évaluation de l'activité musculaire <i>in vitro</i> . Les numéros indiquent l'ordre dans lequel est traitée chaque partie du banc de test dans ce chapitre. . . . .	67
3.2	Représentation schématique du processus de différenciation de myoblastes indifférenciés, induit par un milieu de culture pauvre en facteur de croissance . . . . .	69
3.3	(a) Photographies d'une matrice de microélectrodes commercialisée par MultiChannel Systems (59 électrodes de 30 $\mu\text{m}$ de diamètre, espacées de 200 $\mu\text{m}$ , diamètre du puits de culture 19 mm) et (b) photographies des macroélectrodes de carbone commercialisées par IonOptix (C-dish, modèle CLD6WFC adapté à une plaque de culture 6 puits). . . . .	72
3.4	Schéma bloc du système de stimulation . . . . .	73

3.5	Interface logicielle permettant de générer jusqu'à 6 signaux biphasiques dans un unique signal, de calculer les paramètres pour la génération des signaux de commande des démultiplexeurs, d'ajouter ou supprimer un signal de la mémoire du générateur, et enfin de lancer une séquence de stimulation (bouton vert). Les signaux sont constitués d'impulsions répétées à une fréquence $f$ pendant une certaine durée (case "Durée stimulation"), avec des temps de pause entre les trains d'impulsions (case "Durée pause") : exemple du signal 6, de fréquence 2 Hz pendant 1 seconde soit 2 impulsions . . . . .	74
3.6	Photographie du modèle d'électrodes C-dish CLD6WFC commercialisé par IonOptix (gauche) et schéma des connexions électriques des différentes paires d'électrodes (droite). . . . .	75
3.7	Interface électronique permettant d'amplifier le signal de sortie du générateur ( $V_{gene}$ , gain 2), de démultiplexer les 6 signaux aux puits de culture (W1-6, W1b-W6b) et de mesurer la tension et le courant de stimulation appliqués ( $V_{stim}$ , $I_{stim}$ ). . . . .	76
3.8	(a) Protocole de culture des cellules musculaires C2C12 comprenant une étape d'ensemencement, suivie des phases de prolifération et de différenciation. Les cellules différenciées (myotubes) sont ensuite utilisées pour les expérimentations de stimulation électrique. (b) Matériel et protocole de stimulation appliqué aux 12 puits de culture (2 plaques de 6 puits) : les signaux sont biphasiques asymétriques, de durée fixée et d'amplitude variable. . . . .	78
3.9	Photographie des cellules musculaires C2C12 après 5 jours de différenciation sur support de culture en plastique. . . . .	80
3.10	Zones contractiles lors du premier jour d'application de la stimulation électrique à 1 Hz (vidéos filmées au centre de chaque puits) selon les valeurs de courant de stimulation. Chaque ligne (2 images) correspond à une valeur de courant de stimulation, appliqué sur deux puits référencés $P_iW_j$ . Les zones présentant des contractions sont affichées dans des couleurs plus chaudes. . . . .	81
3.11	Zones contractiles lors du huitième jour d'application de la stimulation électrique à 1 Hz (vidéos filmées au centre de chaque puits) selon les valeurs de courant de stimulation. Chaque ligne (2 images) correspond à une valeur de courant de stimulation, appliqué sur deux puits référencés $P_iW_j$ . Les zones présentant des contractions sont affichées dans des couleurs plus chaudes. . . . .	82
3.12	Profils de contraction en fonction de la fréquence de stimulation. . . . .	83
3.13	(a) Structure d'électrodes interdigitées : photographie d'un modèle commercialisé par Agilent (E-plate 16) et vue schématique. (b) Exemples d'impédance d'électrodes interdigitées (IDE, E-plate 16 commercialisées par Agilent) et de matrices de microélectrodes (MEA, MEA60-200-Pt comprenant 59 électrodes de 30 $\mu\text{m}$ de diamètre, espacées de 200 $\mu\text{m}$ et commercialisées par MicroElectrode Devices). . . . .	84
3.14	Photographies du support adapté aux MEA (gauche), des électrodes de stimulation avec leur PCB de support (droite) et schéma de l'ensemble du système de mesure de bioimpédance (bas). . . . .	87

3.15 Photographies des cellules C2C12 après 2 jours de culture (a) sans coating, avec coating (b) laminine, (c) PEI, (d) PLL, (e) Matrigel. (f) Photographie extraite de précédentes expérimentations, dans des puits en plastique pour comparer les morphologies des cellules dans les différentes conditions de culture. . . . .	89
3.16 Photographies des cellules C2C12 après 3 jours de prolifération sur MEA présentant une couche de passivation en (a) SU-8, ou en (b) SiN. . . . .	90
3.17 Photographies des cellules C2C12 (myotubes) 5 jours de différenciation sur MEA à couche de passivation en SU-8. . . . .	91
3.18 Conductivité et permittivité relative de l'eau déionisée (EDI), du tampon salin (PBS), du milieu de prolifération (Mp) et du milieu de différenciation (Mdiff). . . . .	92
3.19 Courbe de capacitance de l'air, de l'eau déionisée (EDI), du tampon salin (PBS), du milieu de prolifération (Mp) et du milieu de différenciation (Mdiff). . . . .	93
3.20 Impédance simulée d'une paire de microélectrodes adjacentes de diamètre 30 $\mu\text{m}$ , espacées de 200 $\mu\text{m}$ pour les différents milieux caractérisés. . . . .	94
3.21 Impédance théorique et impédances réelles des trois modèles de MEA considérés, dont les électrodes sont constituées de Platine (Pt), de Noir de Platine (Pt Black) ou de PEDOT-CNT. . . . .	95
3.22 Impédances théoriques avec différentes valeurs de surface effective ( $S_{\text{eff}}$ ) comprises entre S (surface réelle des électrodes) et $S \times 1000$ , et les impédances réelles des MEA dont les électrodes sont constituées de Noir de Platine (Pt Black) ou de PEDOT-CNT. . . . .	95
3.23 (a) Impédance d'une paire d'électrodes adjacentes (25-35) en Noir de Platine (Pt Black) à vide (Air) et en présence de tampon salin (PBS), et impédance à vide au niveau des 2 contacts du connecteur correspondant aux points de connexion de la paire 25-35. (b) Emplacement des mesures d'impédances réalisées sur le MEA et sur le connecteur. . . . .	96
3.24 Impédances de trois paires d'électrodes adjacentes (47-57, 44-45, 24-25) constituées de Noir de Platine à vide (Air) et impédances à vide des contacts du connecteur correspondant aux points de connexion des trois mêmes paires. Les emplacements des points de mesures sont indiqués à droite. . . . .	96
3.25 Photographies des pistes de connexion des électrodes des modèles de MicroElectrode Devices (haut, électrodes Pt ou Pt Black) et de Multi-Channel Systems (bas, électrodes PEDOT-CNT). . . . .	97
3.26 Impédances et effets parasites des trois modèles de MEA (Noir de Platine Pt Black, Platine Pt et PEDOT-CNT). . . . .	98
3.27 Impédances moyennes des MEA avec PBS seul, ou avec coating (Matrigel) et milieu de culture (moyennes sur onze paires d'électrodes en Platine Pt ou Noir de Platine Pt Black, deux MEA pour chaque condition). . . . .	99
3.28 Amplitude et vitesse ( <i>c.f. équations 3.5</i> ) extraits d'une vidéo enregistrée avec la caméra SCOP-CAM4K (60 images par secondes) et le microscope inversé, avec un codec h265. Les traits gris situent les artefacts des keyframes, toutes les 30 images. . . . .	103
3.29 Photographie du système d'acquisition d'activité électrique. . . . .	103

3.30	Exemple de mesure électrique avec un MEA ne contenant que du milieu de culture, lors de l'application d'un signal de stimulation biphasique asymétrique d'amplitude $2 V_{pp}$ , de durée d'impulsion 5 ms et de fréquence 1 Hz sur les électrodes (a) 48 et (b) 76. . . . .	104
3.31	(a) Schéma et (b) photographie du banc de test proposé comprenant un système de stimulation (Générateur Agilent 33120A, électrodes de carbone custom), un système de mesure de bioimpédance (Analyseur Keysight E4990A, matrice de microélectrodes Pt Black), un système de mesures électrophysiologiques (Nexys 4, matrice de microélectrodes Pt Black) et un PC réalisant le contrôle et l'acquisition des trois systèmes. La stimulation électrique, les mesures de bioimpédance et électrophysiologiques sont réalisées sur une culture de cellules musculaires (lignée C2C12). . . . .	105
4.1	Plan général des 3 séries d'expérimentations comprenant une phase de caractérisation des MEA, une phase de culture suivie de la phase d'expérimentation combinant stimulation électrique et de mesures de bioimpédance, et le nettoyage des MEA en fin de campagne. . . . .	108
4.2	Protocole de culture comprenant une étape de stérilisation, de coating des MEA, d'ensemencement, de prolifération et de différenciation des cellules musculaires, suivi de la phase d'expérimentations (EXP) sur trois MEA (un MEA contrôle CTRL et deux MEA stimulés STIM). . . . .	108
4.3	(a) Schéma du système de stimulation : le signal de stimulation est généré par un générateur de forme arbitraire et délivré aux 2 MEA placés dans un incubateur. Les 2 patterns sont distribués via une interface électronique. L'Analog Discovery 2 contrôle l'interface et le générateur, et réalise l'acquisition des tensions et courants de stimulation. Un ordinateur contrôle l'Analog Discovery 2 et permet la création du signal de stimulation et son enregistrement dans le générateur. (b) Paramètres des impulsions biphasiques asymétriques constituant un pattern de stimulation (ensemble d'impulsions biphasiques) : $I_p$ , $T_p$ l'amplitude et la durée de l'impulsion positive, $T$ et $f$ la période et la fréquence des impulsions biphasiques. . . . .	110
4.4	Système de mesure de bioimpédance en configuration 2 points, avec une paire d'électrodes composée de 2 électrodes adjacentes horizontalement ou verticalement. La flèche rouge indique l'orientation du champ électrique de stimulation ( $E_{stim}$ ). . . . .	111
4.5	Déroulement de la phase d'expérimentation sur plusieurs jours, comprenant plusieurs scénarios de stimulation électrique, et de temps de repos. Chaque période de stimulation est précédée et suivie par des étapes de mesure de bioimpédance (BioZ). Pendant la phase de stimulation, des enregistrements vidéos sont réalisés. . . . .	112
4.6	Moyennes et écarts-types du module et de la phase de l'impédance sans cellules (PBS, 10 paires d'électrodes), et avec cellules musculaires différenciées (D5 après 5 jours de différenciation, 15-20 paires d'électrodes) pour (a) la Série 1, (b) la Série 2 et (c) la Série 3. . . . .	113
4.7	Photographies des cellules musculaires C2C12 après 5 jours de différenciation (D5). . . . .	114
4.8	Variation relative du module moyen de l'impédance avec cellules différenciées (D5) par rapport à l'impédance sans cellules (PBS) pour (a) la Série 1, (b) la Série 2 et (c) la Série 3. . . . .	115

4.9	(a) Patterns et (b) scénarios de stimulation utilisés lors de la série 1, et appliqués à 2 MEA (STIM1 et STIM2), tandis que CTRL1 sert de contrôle et ne reçoit pas de stimulation électrique. . . . .	117
4.10	Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J1 pendant laquelle le pattern 1 a été appliqué pendant 8 heures à STIM1 et STIM2. Les croix rouges sur les boxplot symbolisent la valeur moyenne des données. . . . .	119
4.11	Activité contractile ( <i>c.f. Section 4.1.2.3</i> ) des cellules musculaires C2C12 lors du J1 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz. . . . .	119
4.12	Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J2 pendant laquelle le Pattern 1 a été appliqué pendant 8 heures à STIM1 et STIM2. Les croix rouges sur les boxplot symbolisent la valeur moyenne des données. . . . .	120
4.13	Activité contractile ( <i>c.f. Section 4.1.2.3</i> ) des cellules musculaires C2C12 lors du J2 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz. . . . .	120
4.14	Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires d'électrodes) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J3 pendant laquelle le pattern 2 a été appliqué pendant 2 heures, suivi d'un temps de repos (zones grises) de 2 (STIM1) ou 4 (STIM2) heures et de nouveau l'application du Pattern 2 pendant 2 heures. . . . .	121
4.15	Activité contractile ( <i>c.f. Section 4.1.2.3</i> ) des cellules musculaires C2C12 lors du J3 : à la mise en route de la stimulation à 10 Hz (H0), après 2 heures (H2), puis pendant la seconde période de stimulation à 10 Hz après un temps de repos (H0b) et 2 heures après (H2b). . . . .	122
4.16	Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J4 pendant laquelle le Pattern 2 a été appliqué pendant 4 (STIM2) ou 6 (STIM1) heures. . . . .	123
4.17	Activité contractile ( <i>c.f. Section 4.1.2.3</i> ) des cellules musculaires C2C12 lors du J4 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4) et 6 (H6) heures de stimulation à 10 Hz. . . . .	123
4.18	(a) Patterns et (b) scénarios de stimulation utilisés lors de la série 2, et appliqués à 2 MEA (STIM3 et STIM4), tandis que CTRL2 sert de contrôle et ne reçoit pas de stimulation électrique. . . . .	126
4.19	Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J1 pendant laquelle le Pattern 1 a été appliqué pendant 8 heures à STIM3-4, suivi d'un temps de repos nocturne (zone grise). . . . .	128
4.20	Activité contractile ( <i>c.f. Section 4.1.2.3</i> ) des cellules musculaires C2C12 lors du J1 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz. . . . .	128

4.21	Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J2 pendant laquelle le Pattern 3 a été appliqué pendant 2 heures, suivi d'un temps de repos (zones grises) de 2 (STIM3) ou 4 (STIM4) heures, puis d'une nouvelle application du Pattern 3 pendant 2 heures, et enfin un repos nocturne. . . . .	129
4.22	Activité contractile ( <i>c.f. Section 4.1.2.3</i> ) des cellules musculaires C2C12 lors du J2 : à la mise en route de la stimulation à 10 Hz (H0), après 2 heures (H2), puis pendant la seconde période de stimulation à 10 Hz après un temps de repos (H0bis) et 2 heures après (H2bis). . . . .	130
4.23	Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J3 pendant laquelle le Pattern 3 a été appliqué pendant 4 (STIM3) ou 6 (STIM4) heures, suivi d'un temps de repos nocturne (zones grises). . .	131
4.24	Activité contractile ( <i>c.f. Section 4.1.2.3</i> ) des cellules musculaires C2C12 lors du J3 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4) et 6 (H6) heures de stimulation à 10 Hz. . . . .	131
4.25	(a) Patterns et (b) scénarios de stimulation utilisés lors de la série 3, et appliqués à 4 MEA (STIM5, STIM6, STIM7 et STIM8), tandis que CTRL3 sert de contrôle et ne reçoit pas de stimulation électrique. . .	133
4.26	Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J1 pendant laquelle le Pattern 1 a été appliqué pendant 8 heures à STIM5 et STIM6, suivi d'un temps de repos nocturne (zones grises). . . . .	135
4.27	Activité contractile ( <i>c.f. Section 4.1.2.3</i> ) des cellules musculaires C2C12 lors du J1 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz. . . . .	135
4.28	Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J2 pendant laquelle le Pattern 5 a été appliqué pendant 2 heures à STIM5 et STIM6. . . . .	136
4.29	Activité contractile ( <i>c.f. Section 4.1.2.3</i> ) des cellules musculaires C2C12 lors du J2 : à la mise en route de la stimulation (H0) et après 2 heures (H2) de stimulation à 20 Hz. . . . .	136
4.30	Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J3 pendant laquelle le Pattern 1 a été appliqué pendant 2 heures à STIM7 et STIM8, suivi d'une pause de 2 heures (zone grise) avant d'appliquer le Pattern 5 à STIM8 et le Pattern 6 à STIM8. . . . .	137
4.31	Activité contractile ( <i>c.f. Section 4.1.2.3</i> ) des cellules musculaires C2C12 lors du J3 : à la mise en route de la stimulation à 1 Hz (H0), après 2 heures (H2), puis pendant la seconde période de stimulation à 20 Hz (STIM8) ou 50 Hz (STIM7) après 2 heures de repos (H0bis) et 2 heures après (H2bis). . . . .	138
4.32	Photographies de cellules musculaires C2C12 avant stimulation (gauche, H0), après 7 (milieu, H7) et 8 heures (droite, H8) de stimulation à 1 Hz. 142	

4.33	(a) Activité électrique mesurée sur les électrodes 12 et 13 lors de l'application du pattern 1 (1 Hz) à STIM5, et (b) activité contractile autour des électrodes 12 et 13 (image représentant la somme des différences entre 2 images successives pendant 5 secondes). Les couleurs claires indiquent les zones présentant le plus de mouvements (contractions).	144
5.1	Principe de la mesure de force à l'aide de piliers cylindriques ou parallélépipédiques. Les fibres musculaires (en jaune) s'entourent autour de 2 piliers (en bleu). Lors d'une contraction des fibres, la force $F$ appliquée à une certaine hauteur ( $L$ ) entraîne un déplacement du sommet du pilier d'une distance $\delta$ . La force est calculée à partir de la mesure du déplacement et de la constante de raideur du pilier ( <i>c.f. équations 5.2</i> ).	149
5.2	Dessin CAO du moule du premier dispositif comprenant 36 chambres de culture (6 de chaque design du <i>Tableau 5.2</i> ). Les signes "+" et "-", sérigraphiés sur le moule, indiquent respectivement l'emplacement des chambres de culture comprenant les piliers de plus grand et de plus petit diamètre, indiqués en blanc).	152
5.3	Photographies (a) du moule maître imprimé en 3D comprenant 36 chambres de culture (6 de chaque design du <i>Tableau 5.2</i> ), et de (b) l'étape de coating chimique du moule maître en résine.	153
5.4	Photographies de (a) de l'EcoFlex coulé sur le moule résine après dégazage, et (b) du moule en EcoFlex résultant.	154
5.5	Conséquences d'un mauvais coating chimique au PFOTS en raison d'une mauvaise activation de la surface du moule EcoFlex, se traduisant par une réaction du PDMS et de l'EcoFlex, (a) la détérioration du moule EcoFlex et (b) l'obtention d'une structure PDMS sans piliers ni chambres de culture.	154
5.6	Photographies (a) du PDMS coulé dans le moule EcoFlex après dégazage, et (b) de la structure finale en PDMS obtenue.	155
5.7	(a) Zoom sur une chambre de culture avec 2 piliers complets, (b) et une chambre de culture avec des piliers partiellement arrachés	155
5.8	Schéma du protocole de culture débutant par (1) le collage des chambres de culture au fond de puits en plastique, qui sont ensuite (2) stérilisées à l'éthanol et traitées au Pluronic F-127. Vient ensuite (3) l'élaboration d'un mélange hydrogel-cellules, (4) l'ensemencement dans les chambres de culture PDMS, (5) la polymérisation du mélange dans un incubateur, (6) une phase de prolifération des myoblastes entraînant la compaction du mélange, suivie (7) d'une phase de différenciation pour l'obtention de myotubes contractiles, et finalement (8) les expérimentations impliquant la stimulation électrique des myotubes par le biais des électrodes C-dish.	157
5.9	Photographies des six chambres de culture PDMS (de W1 à W6) après 6 jours de différenciation. Les images sont obtenues avec appareil non professionnel pour avoir une vue d'ensemble des chambres de culture (photographies prises par le dessus).	159
5.10	Photographies du puits W3 après 6 jours de différenciation obtenues avec un microscope inversé (vues de dessous selon le schéma en haut de la figure) : (haut) vue en coupe indiquant les hauteurs du réglage focal, (centre) photographies de la base et du cône du piler 1, et du cône du pilier 2, (bas) structure du tissu près du pilier 1 et photographie du fond de la chambre de culture PDMS.	160

5.11	Dessin CAO du second design : (gauche) dimensions d'une chambre de culture comprenant deux piliers dépassant de la chambre, et (droite) structure complète du moule comprenant 48 chambres de culture en PDMS incluant chacune 2 piliers (diamètres entre 400 et 600 $\mu\text{m}$ ). . .	161
5.12	Photographies (a) du moule maître en résine, (b) de la structure finale en PDMS et (c) d'une chambre de culture. . . . .	162
5.13	Patterns et scénarios de stimulation appliqués à l'ensemble des puits (2 plaques de 6 puits) comprenant chacun un tissu musculaire 3D. Les patterns de stimulation sont ceux utilisés dans le <i>Chapitre 4</i> lors des expérimentations 2D avec des MEA. . . . .	164
5.14	Photographies des tissus musculaires 3D après six jours de différenciation (2 plaques de culture $P_i$ comprenant chacune 6 puits $W_j$ ). Chaque ligne (3 images) correspond à une densité cellulaire initiale (à l'ensemencement), et chaque colonne (4 images) correspond à un diamètre de piliers. Les images sont obtenues avec un microscope inversé (vue du dessous) et un appareil non professionnel. . . . .	166
5.15	(a) Force de contraction des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J1 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz. A droite sont indiqués le diamètre des piliers et le nombre initial de cellulesensemencées. (b) Forces maximales des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J1, au cours des 8 heures de stimulation à 1 Hz. . . . .	168
5.16	(a) Force de contraction des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J2 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz. A droite sont indiqués le diamètre des piliers et le nombre initial de cellulesensemencées. (b) Forces maximales des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J2, au cours des 8 heures de stimulation à 1 Hz. . . . .	169
5.17	(a) Force de contraction des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J3 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2) heures de stimulation à 1 Hz, puis à la mise en route de la stimulation à 10 Hz (H0b), et après 2 (H2b), 4 (H4b) et 6 (H6b) heures. A droite sont indiqués le diamètre des piliers et le nombre initial de cellulesensemencées. (b) Forces maximales des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J3, au cours des 2 heures de stimulation à 1 Hz et des 6 heures de stimulation à 10 Hz. . . . .	171
5.18	(a) Force de contraction des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J4 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4) et 6 (H6) heures de stimulation à 20 Hz. A droite sont indiqués le diamètre des piliers et le nombre initial de cellulesensemencées. (b) Forces maximales des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J4, au cours des 6 heures de stimulation à 20 Hz. . . . .	172
5.19	(a) Force de contraction des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J5 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4) et 6 (H6) heures de stimulation à 50 Hz. A droite sont indiqués le diamètre des piliers et le nombre initial de cellulesensemencées. (b) Forces maximales des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J5, au cours des 6 heures de stimulation à 50 Hz. . . . .	173
A.1	Temps de mesure par point en fonction du paramètres "Measurement Time" de l'analyseur Keysight E4990A . . . . .	181

A.2 Précision des mesures d'impédance au niveau des 4 ports du panneau avant du Keysight E4990A (pour un signal de 0,5 Vrms, et Measurement Time = 5). . . . .	182
--	-----



# Liste des tableaux

1.1	Caractéristiques des trois types de fibres musculaires squelettiques. . . . .	25
2.1	Conductivités molaires ioniques ( $\text{mS}\cdot\text{m}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ ) des principaux ions présents dans les milieux biologiques. . . . .	51
3.1	Caractéristiques des générateurs commercialisés par MultiChannel Systems et IonOptix pour des applications de stimulation électrique de cultures <i>in vitro</i> . . . . .	71
3.2	Valeurs de courant de stimulation selon la tension appliquée aux électrodes C-dish (valeurs pic). . . . .	79
3.3	Caractéristiques techniques de l'analyseur d'impédance Keysight E4990A	86
3.4	Propriétés électriques (conductivité, permittivité relative) et capacités de double couche des différents échantillons caractérisés. . . . .	92
3.5	Composants du banc de test et leurs caractéristiques . . . . .	106
4.1	Variations relatives de la bioimpédance moyenne à 10 kHz et activité contractile obtenus au cours de la série 1. . . . .	125
4.2	Variations relatives de la bioimpédance moyenne à 10 kHz et activité contractile obtenus au cours de la série 2. . . . .	132
4.3	Variations relatives de la bioimpédance moyenne à 10 kHz et activité contractile obtenues au cours de la série 3. . . . .	139
4.4	Synthèse des variations relatives minimales et maximales de bioimpédance obtenues lors des 3 séries d'expérimentations, suite à l'application des 6 patterns de stimulation. . . . .	140
5.1	Exemples de géométries et caractéristiques de piliers flexibles en PDMS issus de la littérature. . . . .	150
5.2	Caractéristiques des chambres de culture et des piliers du premier dispositif.	151
5.3	Diamètres des piliers, densités cellulaires et nombre de cellules ensemencées dans les six chambres de culture PDMS placées dans des puits en plastique. . . . .	156
5.4	Caractéristiques des chambres de culture et des piliers du second dispositif.	161
5.5	Diamètres des piliers, densités cellulaires et nombre de cellules ensemencées dans les douze chambres de culture PDMS placées dans des puits en plastique. . . . .	163
5.6	Synthèse des forces minimales ( $F_{\text{min}}$ ) et maximales ( $F_{\text{max}}$ ) mesurées lors des expérimentations, lors de l'application des 4 patterns de stimulation.	174



# Liste des Abréviations

<b>ACh</b>	AcétylCholine
<b>ATP</b>	Adénosine TriPhosphate
<b>AVC</b>	Accident Vasculaire Cérébral
<b>BIA</b>	Bioelectrical impedance Analysis
<b>C2C12</b>	Lignée cellulaire de myoblastes de souris
<b>CNT</b>	Carbon NanoTube
<b>CPE</b>	Constant Phase Element
<b>DBS</b>	Depp Brain Stimulation
<b>DHPR</b>	Récepteurs des DiHydroPyridines
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>ECIS</b>	Electric Cell-Substrate Impedance Sensing
<b>EDI</b>	Eau DéIonisée
<b>EIM</b>	Electrical Impedance Myography
<b>EIT</b>	Electrical Impedance Tomography
<b>EMG</b>	ElectroMyoGramme
<b>FCS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FDM</b>	Fused Deposition Modeling
<b>FINE</b>	Flat Interface Nerve Electrode
<b>FMV</b>	Force Maximale Volontaire
<b>HS</b>	Horse Serum
<b>IDE</b>	InterDigitated Electrodes
<b>LIFE</b>	Longitudinal IntraFascicular Electrodes
<b>MCS</b>	MultiChannel Systems
<b>MEA</b>	MicroElectrode Array
<b>MEMS</b>	MicroElectroMechanical Systems
<b>MMG</b>	MécanoMyoGramme
<b>PCB</b>	Printed Circuit Board
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCr</b>	PhosphoCréatine
<b>PDMS</b>	PolyDiMéthylSiloxane
<b>PEDOT</b>	Poly(3,4-EthylèneDioxyThiophène)
<b>PEH</b>	Plan Externe d'Helmholtz
<b>PEI</b>	PolyEthylImine
<b>PFOTS</b>	1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltriethoxysilane
<b>Pi</b>	Phosphate Inorganique
<b>PIH</b>	Plan Interne d'Helmholtz
<b>PLL</b>	Poly-L-Lysine
<b>Pt</b>	Platine
<b>Pt Black</b>	Noir de Platine
<b>RyR1</b>	Récepteurs de la Ryanodine
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>SCPI</b>	Standard Commands for Programmable Instruments

<b>SERCA</b>	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
<b>SiN</b>	Nitruire de Silicium
<b>SLA</b>	Stéréolithographique
<b>SMA</b>	SubMiniature version A connector
<b>TENS</b>	Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation
<b>TIME</b>	Transversal Intrafascicular Multichannel Electrode
<b>TiN</b>	Nitruire de Titane
<b>UV</b>	Ultra-Violet

# Introduction

Les accidents vasculaires cérébraux et les lésions de la moelle épinière sont les deux principales causes de paralysie. Une récupération complète des fonctions motrices est impossible à l'heure actuelle. Cependant, un rétablissement partiel de ces fonctions peut être atteint grâce à la stimulation électrique : cette approche permet déjà une amélioration de la qualité de vie des patients en leur rendant une certaine indépendance. La **stimulation électrique** consiste à exciter des tissus biologiques à l'aide d'un courant électrique pour activer une réponse physiologique ou sensori-motrice. Elle peut être utilisée à des fins exploratoires, de diagnostic ou thérapeutique, allant du traitement de la douleur jusqu'au traitement de pathologies cardiaques ou neurologiques. La **stimulation électrique fonctionnelle** se concentre sur les troubles du système neuronal et neuromusculaire et vise à restaurer des fonctions sensorielles ou motrices. Malgré les nombreux progrès technologiques et le développement des connaissances scientifiques du système neuromusculaire, les implants de stimulation électrique fonctionnelle présentent encore plusieurs limites empêchant leur utilisation chronique. En effet, la stimulation électrique fonctionnelle ne recrée pas fidèlement le fonctionnement du système neuromusculaire naturel : en particulier, elle ne respecte pas l'ordre de recrutement naturel des fibres musculaires et active d'abord les plus larges et les plus fatigables, aboutissant à une **fatigue musculaire prématurée**. Actuellement, la majorité des systèmes de stimulation fonctionne en boucle ouverte, c'est-à-dire que les paramètres de stimulation sont pré-programmés et ne s'adaptent pas automatiquement à l'état physiologique des muscles stimulés et à leur fatigue. Ce type de fonctionnement non-adaptatif limite fortement l'efficacité du système et son utilisation à long terme.

De ce constat est né le consortium **SMARTSTIM**, formé de quatre laboratoires UMR CNRS (ETIS, IJL, IMS, LIRMM) et soutenu par le CNRS dans le cadre des projets 80'PRIME. Ce consortium ambitionne de développer des modèles et systèmes électroniques intégrés pour la stimulation électrique chronique du vivant (*in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*). Ces modèles et systèmes sont conçus pour permettre des **bio-stimulations "intelligentes", adaptées en temps réel grâce à un retour objectif**. On entend ici par "retour objectif" une métrique calculée à partir de mesures en temps réel sur le tissu ou l'organe stimulé. Cette métrique se doit d'être une évaluation objective de l'influence de la stimulation, et témoigne de son efficacité. La stratégie de SMARTSTIM est de lever les verrous de la stimulation électrique par une **approche interdisciplinaire** et une méthodologie de co-conception modèle/matériel/preuve de concept.

Le projet de thèse est au centre du projet SMARTSTIM et de la problématique de **stimulation bioélectrique à retour objectif**. Dans le cas de la stimulation électrique fonctionnelle, il s'agit de trouver une métrique objective de la fatigue musculaire afin d'ajuster les paramètres de stimulation en fonction de celle-ci. La fatigue musculaire est un phénomène complexe, multifactoriel et dynamique, se traduisant par diverses altérations physiologiques, métaboliques, mécaniques et électriques. Celles-ci affectent alors les propriétés électriques passives des tissus (conductivité, permittivité), qui peuvent être évaluées par mesure de **bioimpédance**. L'objectif du projet de thèse

est donc d'étudier la pertinence de la bioimpédance comme **marqueur objectif de la fatigue musculaire**. Cette thèse interdisciplinaire s'est déroulée au sein des laboratoires IMS et LIRMM.

Le manuscrit est divisé en cinq chapitres qui suivent le cheminement des étapes de réflexion, conception et d'expérimentation réalisées lors de cette thèse :

- le *Chapitre 1* expose le contexte scientifique du sujet de recherche en retraçant l'historique de la stimulation électrique et en explicitant son fonctionnement, ses applications, ainsi que ses limites
- le *Chapitre 2* établit d'une part un état de l'art des connaissances scientifiques actuelles au sujet de la fatigue musculaire, de ses mécanismes et des méthodes pour la mesurer, et d'autre part la description de la bioimpédance, de ses aspects théoriques et de ses applications
- le *Chapitre 3* détaille la conception d'un banc de test spécifique afin de répondre à la problématique du sujet de thèse, combinant des systèmes de stimulation électrique et de mesure de bioimpédance conçus autour d'un modèle biologique *in vitro*
- le *Chapitre 4* présente le déroulement de plusieurs campagnes d'expérimentations, et en discute les résultats
- le *Chapitre 5* propose une alternative au banc de test du *Chapitre 3*, reposant sur l'utilisation d'un modèle biologique se rapprochant davantage des conditions *in vivo*, et présente les résultats préliminaires obtenus avec ce nouveau système.

## Chapitre 1

# Contexte scientifique : la stimulation électrique fonctionnelle

### 1.1 Histoire de la stimulation électrique

La découverte de la **bioélectricité** remonte à plus de 2000 ans. Les Égyptiens et les Grecs avaient notamment constaté que certaines espèces de poissons étaient capables de délivrer des chocs importants à d'autres organismes [1]. Mais cette discipline est récente puisque les phénomènes électriques et biologiques associés ne sont étudiés que depuis quelques siècles.

Les premières expériences scientifiques sur la physiologie neuromusculaire ont été menées par le biologiste néerlandais *Jan Swammerdam* dans les années 1660. À cette époque, on pensait que la contraction musculaire était causée par l'écoulement "d'esprits animaux" ou de "liquide nerveux" du cerveau jusqu'au muscle [2]. Il mit un terme à cette théorie en réalisant plusieurs expérimentations sur des préparations nerf-muscle [3]. L'une de ses expériences a démontré que le volume du muscle n'augmente pas pendant une contraction, prouvant que cette dernière n'est donc pas causée par un "liquide nerveux". Il a également montré que la contraction pouvait se produire sans aucune connexion entre le muscle et le cerveau. Il observa, en effet, qu'une "irritation" du nerf avec un fil d'argent entraînait une réaction mécanique du muscle. Son système était constitué deux métaux noyés dans un électrolyte (*Figure 1.1(a)*), ce qui est probablement à l'origine d'une force électromotrice et d'un courant électrique associé, provoquant alors la contraction [4]. Mais l'origine électrique de la contraction ne fut élucidée que plus tard.

Les premières expériences de stimulation électrique n'ont été possibles qu'à partir du 18<sup>ème</sup> siècle, avec l'invention de la jarre de Leyden, l'ancêtre du condensateur. En 1747, *Jean Jallabert* utilisa ce dispositif pour délivrer des chocs électriques à un patient paralysé d'un bras et démontra qu'il était alors possible d'utiliser l'électricité pour stimuler les muscles et "inverser" la paralysie [5]. Il s'agit de la toute première utilisation thérapeutique de la stimulation électrique.

Les expériences les plus célèbres sur la stimulation neuromusculaire sont celles réalisées par *Luigi Galvani* à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle [6]. Sa première expérience utilisait une grenouille disséquée et posée sur une table, sur laquelle se trouvait également une machine électrique (*Figure 1.1(b)*). Il constata que les muscles de la grenouille se contractaient à chaque fois que son assistant touchait le nerf fémoral avec un scalpel et qu'une étincelle jaillissait de la machine électrique distante. Après avoir conduit plusieurs expériences, il expliqua ce phénomène par la décharge d'une "électricité animale" présente dans le muscle [7]. *Alessandro Volta* poursuivit les expérimentations de *Galvani* l'amenant à mettre au point la première pile électrique, la pile voltaïque, constituée de deux métaux et d'un électrolyte [8]. Il montra que la condition essentielle pour produire des contractions était la présence de deux métaux différents, tandis

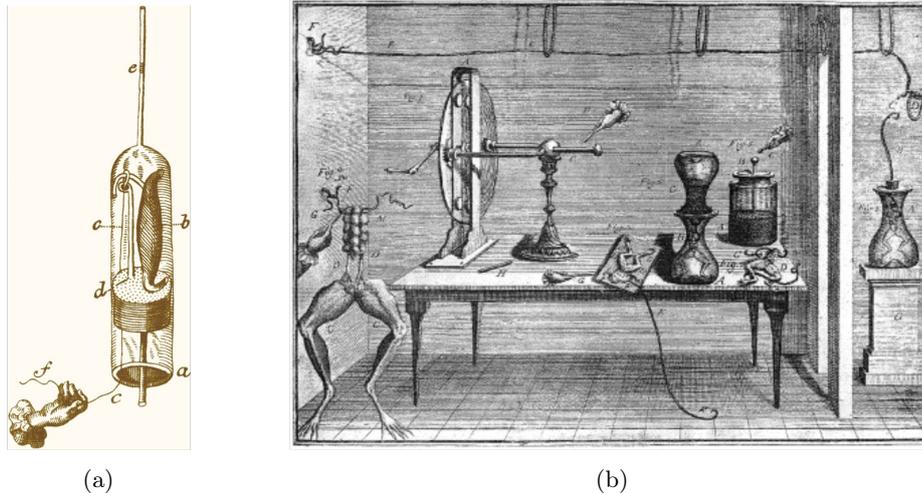


FIGURE 1.1 – (a) Illustration d'une préparation nerf-muscle de J. Swammerdam [3]. (b) Illustration du laboratoire de L. Galvani avec une table sur laquelle est posée une grenouille disséquée et une machine électrique.

que *Galvani* pensait qu'il fallait nécessairement un arc conducteur pour décharger l'électricité animale.

Au cours du 19<sup>ème</sup> siècle, les progrès techniques et les recherches sur l'électricité et les phénomènes physiques ont permis de nouvelles découvertes dans le domaine de la bioélectricité. L'invention du galvanomètre a entre autres permis à *Carlo Matteucci* de réaliser les premières mesures de courants bioélectriques sur un muscle de grenouille [9]. Il a ainsi découvert l'existence d'un événement bioélectrique transitoire accompagnant la contraction musculaire, phénomène aujourd'hui connu sous le nom de potentiel d'action. Peu de temps après, *Emil du Bois-Reymond* répéta l'expérience et mesura ce même phénomène dans un nerf de grenouille [10]. Une autre avancée majeure fut réalisée par *Hermann von Helmholtz* en 1850, qui mesura la vitesse de propagation d'un signal électrique le long d'un nerf moteur [11].

Durant le 20<sup>ème</sup> siècle, les découvertes se sont accélérées d'une part grâce au développement de nouvelles technologies et d'instruments de mesure, et d'autre part grâce aux recherches en physique et en biologie. En 1868, *Julius Bernstein* mis au point un nouvel instrument, le rhéotome (*Figure 1.2*), suffisamment rapide pour mesurer l'évolution du courant lors d'un potentiel d'action [12]. A partir d'une loi d'électrochimie qu'il appliqua aux membranes cellulaires, il proposa la première théorie expliquant l'origine du potentiel membranaire de repos [13]. En 1939, *Alan Hodgkin* et *Andrew Huxley* furent les premiers à mesurer un potentiel d'action à l'aide d'électrodes intracellulaires [14]. En 1952, ils proposèrent un modèle mathématique du comportement électrique des neurones [15], postulant que des canaux ioniques présents dans leur membrane en sont à l'origine, ce qui leur a valu le prix Nobel en 1963. Leur théorie n'a pu être confirmée expérimentalement que bien plus tard, à la fin des années 1970, avec l'invention de la technique du patch-clamp par *Erwin Neher* et *Bert Sakmann* [16], qui reçurent également un prix Nobel en 1991.

L'invention du transistor en 1948, par *John Bardeen*, *William Shockley* et *Walter Brattain*, a considérablement impacté le développement des systèmes de mesure et de stimulation. Elle a notamment permis de les miniaturiser, de les rendre portables et implantables, et également plus fiables. En 1957, *André Djourno* et *Charles Eyriès* furent les premiers à implanter une électrode intra-auriculaire pour stimuler électriquement le nerf auditif dans le but de restaurer l'audition [18]. L'année suivante a eu lieu

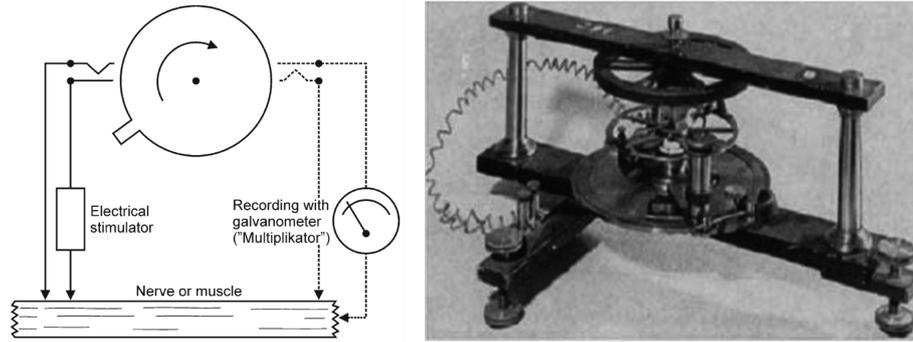


FIGURE 1.2 – Schéma et photographie du rhéotome inventé par J. Bernstein [17].

la première implantation de pacemaker (*Figure 1.3(a)*), conçu par l'ingénieur *Rune Elmgvist* et implanté par le chirurgien *Ake Senning* [19]. Depuis, les implants sont devenus considérablement plus performants, intelligents et compacts. Le plus petit pacemaker est fabriqué et commercialisé par Medtronic (*Figure 1.3(b)*), et fut implanté pour la première fois en France en 2014<sup>1</sup>.



FIGURE 1.3 – (a) Photographie du premier pacemaker implanté en 1958 (6 x 2.2 cm, 170 g, image de Siemens<sup>2</sup>). (b) Photographie du plus petit pacemaker au monde, Micra™TPS, mesurant 25.9 x 6.7 mm, pour un poids de 1.75 g. Image de Medtronic<sup>3</sup>.

Depuis ces premiers essais, la stimulation électrique reste aujourd'hui un sujet de recherche très prisé. Les recherches en neurosciences apportent sans cesse de nouvelles connaissances et une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine des pathologies neuromusculaires. En parallèle, les progrès techniques offrent la possibilité d'une meilleure prise en charge de ces pathologies via la stimulation électrique. Les applications sont nombreuses et ne cessent de se développer, donnant lieu à de nombreux sujets de recherche et d'essais cliniques. La stimulation cardiaque représente l'application la plus connue et répandue, mais ne sera pas traitée dans ce document puisque nous nous intéressons principalement aux applications neuromusculaires.

1. <https://www.chu-bordeaux.fr/Espace-média/Archives/Stimulation-cardiaque-1ère-implantation-du-plus-petit-stimulateur-cardiaque-mini-invasif/>

2. Photographie de Siemens, issue de <https://www.medmuseum.siemens-healthineers.com/en/stories-from-the-museum/herzschriftmacher>

3. Photographie de Medtronic, issue de [www.medtronic.com/ca-fr/professionnels-de-la-sante/produits/rhythme-cardiaque/stimulateurs\\_cardiaques/systeme-stimulateur-micra.html](http://www.medtronic.com/ca-fr/professionnels-de-la-sante/produits/rhythme-cardiaque/stimulateurs_cardiaques/systeme-stimulateur-micra.html)

## 1.2 Principe de la stimulation électrique

La stimulation électrique agit sur les cellules dites **excitables**, dont font partie les neurones et les cellules musculaires. L'excitation des premières déclenche une activité électrique qui se propage dans le système nerveux, tandis que l'excitation des cellules musculaires induit des contractions. Ces événements sont associés à des courants bioélectriques, générés par la circulation d'espèces chargées (ions), à la différence des courants électriques générés par la circulation d'électrons. Dans cette section, nous décrivons le fonctionnement physiologique de ces cellules excitables pour ensuite expliquer le principe et les méthodes de stimulation électrique permettant de les exciter.

### 1.2.1 Électrophysiologie des cellules excitables

Toute cellule est entourée par sa **membrane plasmique**, qui sépare les milieux intra et extracellulaire, et dont le rôle est de contrôler le passage des ions et molécules entre ces deux espaces. Cette membrane est constituée de deux couches de phospholipides, dont les têtes hydrophiles sont tournées vers les milieux intra et extracellulaire tandis que les queues hydrophobes forment l'intérieur de la membrane (*Figure 1.4*). Cette barrière n'est pas purement isolante mais semi-perméable, puisqu'elle comporte également des protéines qui forment des canaux et des pompes permettant des échanges d'ions et de molécules entre les deux milieux. Les **canaux ioniques** sont sélectifs et permettent le passage des ions à travers la membrane suivant leurs gradients de concentrations. À l'inverse, les **pompes ioniques** transfèrent les ions contre leurs gradients de concentration, impliquant la consommation d'énergie.

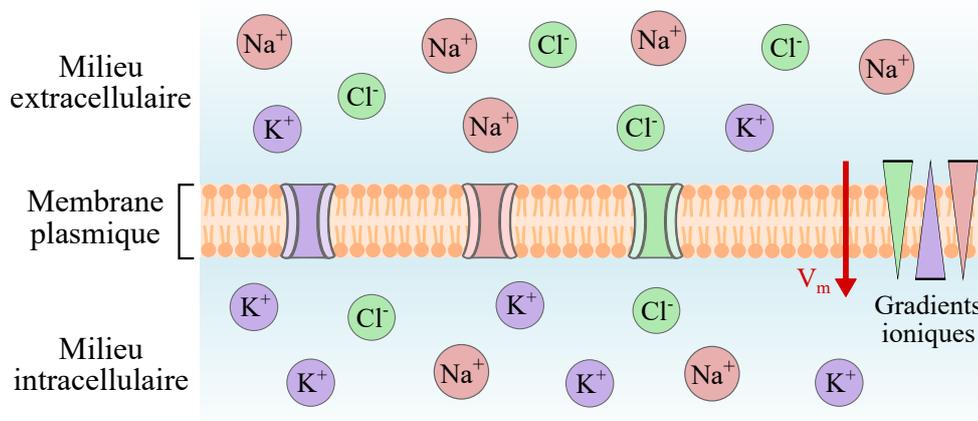


FIGURE 1.4 – Schéma de la membrane plasmique et ses principaux canaux ioniques

#### Le potentiel de repos

Au repos, les concentrations ioniques diffèrent de part et d'autre de la membrane : les concentrations des ions sodium ( $Na^+$ ) et chlorure ( $Cl^-$ ) sont plus importantes à l'extérieur de la cellule qu'à l'intérieur, et inversement pour les ions potassium ( $K^+$ ). Ces gradients chimiques donnent lieu à l'établissement d'un **potentiel membranaire de repos**. On définit le potentiel membranaire  $V_m$  par la différence de potentiel entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire :

$$V_m = V_i - V_e \quad (1.1)$$

Le potentiel d'équilibre de chaque espèce est lié à sa concentration ionique intra et extracellulaire et peut être calculé par l'équation de Nernst [20] :

$$E_i = \frac{-RT}{zF} \ln \frac{[C_i]_i}{[C_i]_e} \quad (1.2)$$

avec  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température (K),  $z$  la valence de l'ion  $i$ ,  $F$  la constante de Faraday,  $[C_i]_i$  et  $[C_i]_e$  les concentrations de l'ion  $i$  dans les compartiments intracellulaire et extracellulaire, respectivement. L'équation de Goldman-Hodgkin-Katz [21] découle de cette relation et permet de calculer le potentiel membranaire de repos, en considérant les ions principaux ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ) dans les 2 milieux :

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na^+}[Na^+]_e + P_{K^+}[K^+]_e + P_{Cl^-}[Cl^-]_e}{P_{Na^+}[Na^+]_i + P_{K^+}[K^+]_i + P_{Cl^-}[Cl^-]_i} \quad (1.3)$$

avec  $P_i$  le coefficient de perméabilité de la membrane pour l'espèce  $i$ . Au repos, ce potentiel est généralement compris entre  $-60$  et  $-90$   $mV$ , l'intérieur étant chargé négativement par rapport à l'extérieur. Cette polarisation des cellules excitables est entretenue par les pompes ioniques.

### Le potentiel d'action

La perméabilité de la membrane, et par conséquent son potentiel, peuvent être amenés à varier au cours du temps. En effet, les canaux ioniques peuvent s'ouvrir ou se fermer sous l'effet d'un champ électrique (canaux dits voltage-dépendants) ou de certains ligands (canaux dits ligand-dépendants). En 1939, *Hodgkin* et *Huxley* réussirent à mesurer le potentiel à l'intérieur d'un nerf et ont montré que, durant une impulsion nerveuse, ce potentiel varie de  $-70$   $mV$  à  $+30$   $mV$  [14]. En 1952, ils ont été les premiers, avec *Bernhard Katz*, à décrire et modéliser le comportement électrique des membranes des cellules excitables, ce qui a donné la description classique actuelle de l'ouverture et de la fermeture voltage-dépendantes des canaux sodium et potassiques [15].

Au repos (en l'absence de stimulation), la membrane a un certain potentiel  $V_m$ , qui ne satisfait pas les potentiels d'équilibre de tous les ions ( $E_i$  dans l'équation 1.2), ce qui induit donc un courant net non nul à travers la membrane. Chaque ion  $i$  est soumis à un gradient électrochimique  $V_m - E_i$ , et son courant  $I_i$  est proportionnel à ce gradient et sa conductance  $g_i$ . Le modèle électrique de la membrane intègre la contribution de chaque ion, et suppose que chaque ion traverse la membrane de manière indépendante, ce qui a donné lieu au modèle électrique à conductances parallèles illustré en *Figure 1.5(a)*. Dans ce modèle, seuls les ions sodium et potassium y sont intégrés car ce sont ceux qui ont un impact le plus significatif sur la dynamique du potentiel membranaire. Une troisième branche représente le courant généré par les autres ions (courant de fuite, ou "leakage current"), notamment l'ion chlorure. De plus, on y trouve également une capacité  $C_m$  qui modélise la propriété isolante des lipides constituant la membrane.

Les cellules excitables sont capables de générer une impulsion transitoire à travers la membrane, appelée **potentiel d'action**. Il s'agit d'un phénomène bioélectrique fondamental, responsable de la génération et de la transmission des messages nerveux électriques entre le système nerveux et le reste du corps. Ce signal électrique est la conséquence d'un stimulus qui dépolarise la membrane, ce qui entraîne l'ouverture ou la fermeture des canaux ioniques et donc la modification des conductances électriques.

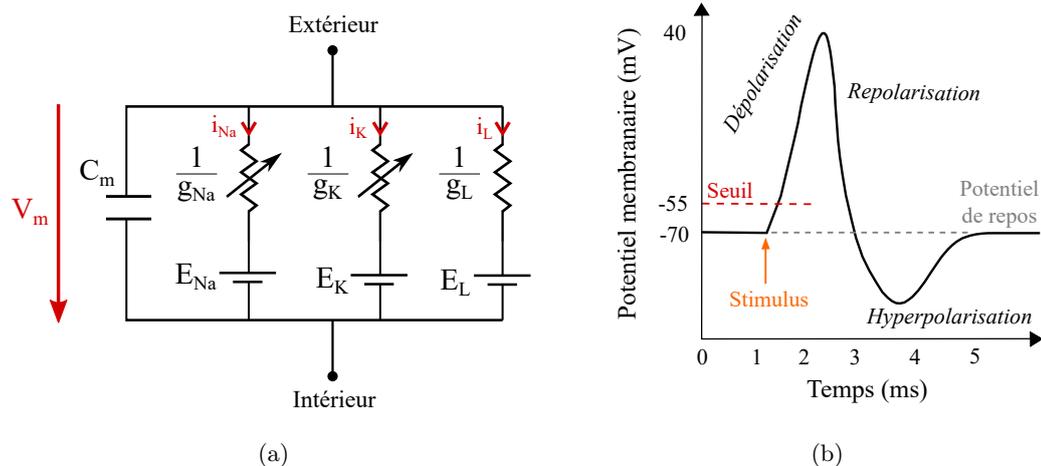


FIGURE 1.5 – (a) Modèle électrique à conductance parallèle de la membrane plasmique des cellules excitables. (b) Représentation du signal de potentiel d'action.

Le potentiel d'action est caractérisé par trois phases, illustrées en *Figure 1.5(b)*. En premier, se produit une phase de **dépolarisation** due à l'ouverture des canaux sodiques provoquant un flux entrant d'ions  $Na^+$  dans la cellule. Le potentiel membranaire augmente jusqu'à atteindre une valeur pic d'environ 30-40 mV. Ces canaux deviennent ensuite inactifs et les canaux potassiques s'ouvrent pour créer un flux sortant d'ions  $K^+$ , il s'agit de la phase de **repolarisation**. S'ensuit une phase d'**hyperpolarisation**, où le potentiel membranaire est plus bas que le potentiel de repos. Cette période est aussi appelée **période réfractaire**, car pendant ce laps de temps, la cellule ne peut pas être de nouveau excitée. Enfin, les gradients chimiques sont rétablis et le potentiel membranaire retourne à sa valeur de repos.

Le potentiel d'action est généré lorsque le stimulus dépolarise suffisamment la membrane, c'est-à-dire lorsque le potentiel membranaire atteint environ -55 mV. Ce **seuil d'excitation** dépend du diamètre de la cellule et également du type de cellule (*c.f. Section 1.2.2*). Le potentiel d'action est un phénomène non linéaire : l'amplitude du potentiel d'action est indépendante de l'intensité du stimulus. Ce phénomène est donc qualifié de "tout ou rien".

Ce phénomène électrique est essentiel à la communication entre le système nerveux et le reste du corps. Il s'accompagne de la libération de messagers (neurotransmetteurs) permettant le contrôle et la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, telle que la contraction musculaire.

### 1.2.2 Principe de la stimulation extracellulaire

L'objectif de la stimulation électrique est d'**induire de manière artificielle** le déclenchement d'un **potentiel d'action** au sein de cellules excitables, ou à l'inverse, d'inhiber leur l'activité électrique. Dans notre contexte, nous nous intéressons plus particulièrement au premier phénomène.

La génération d'un potentiel d'action est permise par l'application d'un courant électrique à l'intérieur d'une cellule excitable (stimulation intracellulaire) ou à proximité de celle-ci (stimulation extracellulaire), modifiant ainsi sa tension transmembranaire [22]. La membrane réagit passivement tant que le seuil d'excitation n'est pas atteint, mais une fois ce dernier atteint, elle réagit en générant un potentiel d'action. Ici, nous nous intéressons à la **stimulation extracellulaire**.

### Contrôle du potentiel électrique extracellulaire

La stimulation électrique extracellulaire consiste à **contrôler le champ électrique externe** de la cellule afin de modifier son potentiel électrique extracellulaire ( $V_e$  dans l'équation 1.1). En électrophysiologie, le raisonnement classique considère une source (électrode) monopole ponctuelle, c'est-à-dire un point délivrant un certain courant  $I$ , plongée dans un conducteur de volume infini, homogène et isotrope, de conductivité  $\sigma$  [23]. Le champ électrique  $\vec{E}$  dans un milieu conducteur est régi par les équations de Maxwell et est exprimé comme le gradient négatif d'un potentiel scalaire  $V$  [22] :

$$\vec{E} = -\nabla V \quad (1.4)$$

La force exercée par le champ électrique crée un flux de charges, et la densité de courant  $\vec{J}$  est liée au champ électrique par la loi d'Ohm [22] :

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} = -\sigma \nabla V \quad (1.5)$$

Si le monopole délivre un courant  $I$ , la densité de courant à une distance  $r$  de la source (électrode) est déterminée par la relation suivante :

$$\|\vec{J}\| = \frac{I}{4\pi r^2} \quad (1.6)$$

A partir des deux dernières équations et en intégrant par rapport à  $r$ , on obtient l'expression du potentiel électrique dans le milieu en fonction de la distance  $r$  :

$$V(r) = \frac{I}{4\pi\sigma r} \quad (1.7)$$

Cette relation montre que le potentiel électrique extracellulaire dépend non seulement de la **distance** par rapport à l'électrode, mais également du **courant** injecté par celle-ci et non pas de la tension appliquée.

### La fonction d'activation

Pour comprendre l'influence du potentiel extracellulaire sur l'activation des cellules excitables, les travaux d'*Hogdkin* et *Huxley* furent déterminants. En effet, leur modèle à conductance a permis l'émergence de nouveaux modèles mathématiques apportant une meilleure compréhension de leur comportement sous l'effet de la stimulation électrique.

*McNeal* [24] et *Rattay* [25] ont établi les premiers modèles permettant de calculer la tension de membrane  $V_m$  sous l'effet d'un stimulus électrique  $I_{stim}$ . Une partie de ce courant charge la capacité de la membrane  $C_m$ , tandis qu'une autre partie ( $I_m$ ) passe à travers les canaux ioniques :

$$I_{stim} = C_m \frac{dV_m}{dt} + I_m \quad (1.8)$$

Leurs modèles considèrent que les fibres sont un assemblage d'une série infinie de compartiments, liés entre eux par des conductances  $G_a$ . Chaque compartiment est représenté par une capacité  $C_m$  et une conductance  $G_m$  (*Figure 1.6*).

La longueur d'un compartiment  $n$  est suffisamment faible pour considérer que ses potentiels intracellulaire  $V_{i,n}$  et extracellulaire  $V_{e,n}$  peuvent être représentés par leur valeur moyenne. Le courant au centre d'un compartiment  $n$  se décompose en un courant capacitif, des courants ioniques à travers la membrane, et des courants intracellulaires en direction des compartiments voisins. La première loi de Kirchhoff

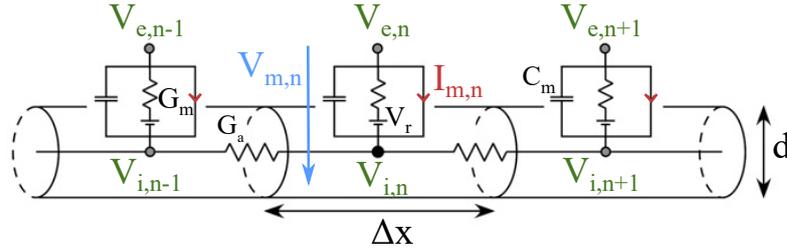


FIGURE 1.6 – Modèle électrique d'une fibre uniforme de diamètre  $d$ , représentée par une série de compartiments de longueur  $\Delta x$  liés par des conductances intracellulaires axiales  $G_a$ . Chaque compartiment est modélisé par un circuit parallèle comprenant une capacité  $C_m$  et une conductance  $G_m$  en série avec le potentiel de repos  $V_r$  et un courant ionique  $I_{m,n}$ . Illustration adaptée de [23].

énonce que la somme de ces courants est nulle, pour n'importe quel compartiment  $n$  :

$$C_m \frac{d(V_{i,n} - V_{e,n})}{dt} + G_m(V_{i,n} - V_{e,n} - V_r) + I_{m,n} + G_a(2V_{i,n} - V_{i,n-1} - V_{i,n+1}) = 0 \quad (1.9)$$

Il est possible d'exprimer les paramètres du modèle en fonction de la surface  $s$  ou de la longueur du compartiment  $\Delta x$  :

$$C_m = c_m \pi d s \quad G_a = \pi \frac{d^2}{\rho_i 4 \Delta x} \quad G_m = g_m \pi d \Delta x \quad I_{m,n} = i_{m,n} \pi d \Delta x \quad (1.10)$$

avec  $d$  le diamètre de la fibre, et  $\rho_i$  la résistivité du milieu intracellulaire. On introduit également la constante de temps de la membrane  $\tau$  et la constante d'espace de la fibre  $\lambda$  définies par les relations suivantes :

$$\tau = \frac{C_m}{G_m} = \frac{c_m}{g_m} \quad \lambda = \sqrt{\frac{G_a}{G_m}} \Delta x = \sqrt{\frac{d}{4\rho_i g_m}} \quad (1.11)$$

En réarrangeant l'équation 1.9, pour y introduire la variation de la tension membranaire du compartiment  $V_{m,n} = V_{i,n} - V_{e,n}$  autour de son potentiel de repos  $V_r$ , on obtient :

$$\tau \frac{dV_{m,n}}{dt} - \lambda^2 \frac{V_{m,n-1} - 2V_{m,n} + V_{m,n+1}}{\Delta x} + V_{m,n} + \frac{i_{m,n}}{g_m} = \lambda^2 \frac{V_{e,n-1} - 2V_{e,n} + V_{e,n+1}}{\Delta x^2} \quad (1.12)$$

Cette équation fut d'abord proposée pour les fibres myélinisées [24], et fut étendue par [25] dans le cas des fibres non myélinisées, avec  $\Delta x \rightarrow 0$  :

$$\tau \frac{\partial V_m(x)}{\partial t} - \lambda^2 \frac{\partial^2 V_m(x)}{\partial x^2} + V_m(x) + \frac{i_m(x)}{g_m} = \lambda^2 \frac{\partial^2 V_e(x)}{\partial x^2} \quad (1.13)$$

avec  $x$  la coordonnée le long de la fibre. Dans cette équation, le terme à droite est appelé la **fonction d'activation** [25], représentant le courant entrant à la coordonnée  $x$ , induit par le champ électrique appliqué. Cette fonction indique les zones de la membrane qui seront dépolarisées ou hyperpolarisées par le stimulus électrique. Lorsque la dérivée seconde du potentiel  $V_e$  est positive, la membrane est dépolarisée, et dans le cas contraire, la membrane est hyperpolarisée. Ce principe est illustré en *Figure 1.7*.

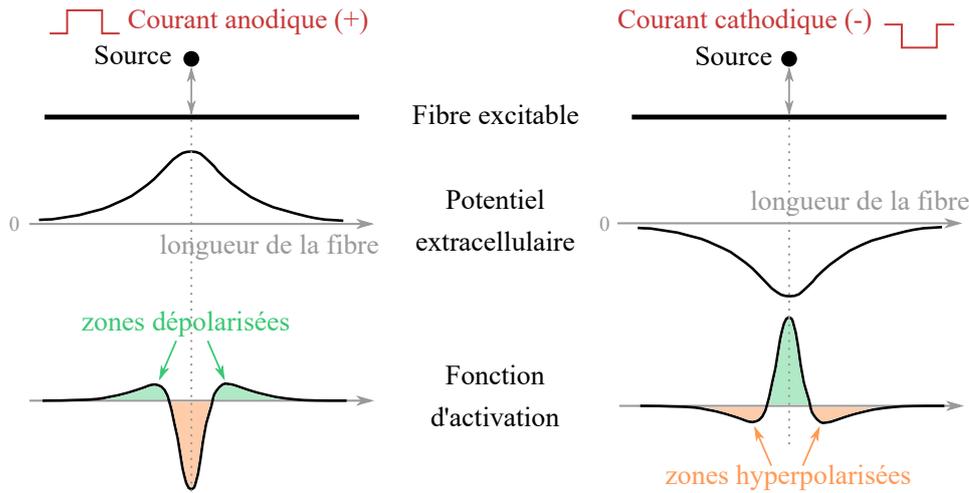


FIGURE 1.7 – Illustration du concept de fonction d'activation permettant de prédire les zones dépolarisées et hyperpolarisées, dans le cas d'une stimulation extracellulaire d'une fibre excitable, délivrée par une source ponctuelle à une certaine distance de la fibre.

La fonction d'activation ne donne pas l'évolution du potentiel membranaire  $V_m(t)$  au cours du temps, mais indique sa variation initiale lors de l'application d'un stimulus [22]. Peu importe la polarité du courant de stimulus, qu'il soit cathodique ou anodique, celui-ci entrainera la création de **zones dépolarisées** et de **zones hyperpolarisées**. Cependant, il apparaît clairement que, pour une même amplitude, un courant cathodique induit une dépolarisation plus importante de la membrane (*Figure 1.7*), au point de coordonnée où est appliqué le stimulus. Malgré tout, il est possible d'utiliser un courant anodique pour stimuler des fibres excitables puisqu'il entraine également la dépolarisation de 2 zones latérales.

### La courbe amplitude-durée

En réalité, les conditions permettant d'atteindre le seuil d'excitation et de déclencher la génération d'un potentiel d'action ne dépendent pas seulement de l'amplitude  $I$  du courant, mais de la **quantité de charge injectée**  $Q$  :

$$Q = IT \quad (1.14)$$

avec  $T$  la durée du stimulus. *Georges Weiss* fut le premier à étudier la relation entre la quantité de charge et la durée du stimulus [26]. Il proposa une première équation empirique connue sous le nom de la loi d'excitation de Weiss pour la charge :

$$Q_{th} = a + bT \quad (1.15)$$

avec  $a$  et  $b$  des constantes, dont il ne donna pas d'interprétations physiques. Plus tard, *Louis Lapicque* s'intéressa au lien entre l'amplitude, la durée du stimulus et le seuil d'excitation [27]. Il observa que l'amplitude  $I_{th}$  nécessaire pour déclencher un potentiel d'action augmente lorsque la durée  $T$  du stimulus diminue, et proposa une autre forme pour l'équation de Weiss, cette fois-ci en lien avec l'amplitude de courant :

$$I_{th} = I_{rh} \left( 1 + \frac{T}{T} \right) \quad (1.16)$$

Cette relation, connue sous le nom d'équation de Weiss-Lapicque, introduit deux notions fondamentales pour décrire l'excitabilité des cellules : la **rhéobase** et la **chronaxie**. La rhéobase ( $I_{rh}$ ) correspond à l'amplitude minimale permettant d'atteindre la tension de seuil lorsque la durée du stimulus est infinie. Ainsi, les stimuli d'intensité inférieure à la rhéobase ne permettront jamais d'atteindre le seuil d'excitation et la génération d'un potentiel d'action, peu importe leur durée. La chronaxie est définie comme la durée d'un stimulus ayant une amplitude égale à deux fois la rhéobase.

Dans le même article [27], *Lapicque* proposa un autre modèle mathématique (équation de Lapicque-Blair), en se basant sur l'idée qu'une membrane cellulaire peut être modélisée par une résistance parallèle à une capacité :

$$I_{th} = \frac{I_{rh}}{1 - e^{-T/\tau}} \quad (1.17)$$

La courbe de la *Figure 1.8*, appelée la **courbe amplitude-durée**, illustre cette relation. Elle montre une allure exponentielle décroissante et divise toutes les combinaisons intensité-durée en deux catégories. Les combinaisons se trouvant au-dessus de la courbe permettent d'atteindre le seuil d'excitabilité et d'induire la génération de potentiels d'action. A l'inverse, toutes les autres combinaisons produisent une tension transmembranaire inférieure à la tension de seuil. En dessous du seuil, la membrane présente un comportement passif et linéaire. Selon le signe du courant injecté, la membrane sera légèrement dépolarisée ou hyperpolarisée pendant un instant, avant de revenir à son état de repos.

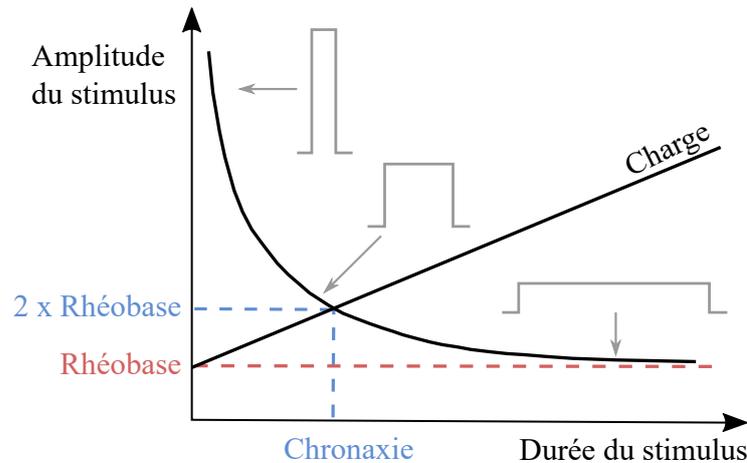


FIGURE 1.8 – Représentation des courbes amplitude-durée et charge-durée indiquant l'ensemble des combinaisons de paramètres d'un stimulus pour atteindre le seuil d'excitation.

Ce modèle permet d'appréhender simplement les bases de l'excitabilité des tissus, définie par les paramètres de rhéobase et chronaxie introduits précédemment. En pratique, la rhéobase est difficile à mesurer car la membrane tend à s'adapter au champ électrique appliqué pour des impulsions de longue durée [28]. Ce phénomène est connu sous le nom d'accoutumance (*accommodation* en anglais) [29]. C'est pourquoi certains chercheurs proposent plutôt l'utilisation de la chronaxie pour comparer l'excitabilité de différents tissus : par exemple, une valeur supérieure à 10 ms serait caractéristique d'un tissu musculaire, tandis que les valeurs inférieures caractériseraient plutôt les nerfs moteurs [28].

Cependant, les deux paramètres peuvent varier considérablement selon le matériel, le signal de stimulation ou les conditions de mesure [30]. A partir de l'équation 1.7, il

apparaît clairement que la **distance entre l'électrode et le tissu** affecte le seuil d'excitation, comme illustré dans la *Figure 1.9(a)*. De plus, il a également été démontré que le seuil dépend de l'**orientation du champ électrique**. En effet, l'excitation de cellules par un champ électrique longitudinal se produit à un seuil bien plus bas que dans le cas d'un champ électrique transversal à la fibre [31].

De plus, les modèles de McNeal [24] et Rattay [25] ont fait apparaître l'influence du **diamètre de la fibre** excitable (équations 1.11 et 1.13) sur le seuil d'excitation : les fibres de large diamètre sont plus excitables, comme illustré en *Figure 1.9(a)*.

Enfin, le seuil d'excitation dépend du **type cellulaire**. Il a été en effet démontré que les cellules musculaires sont moins excitables que les neurones moteurs qui les innervent. La *Figure 1.9(b)* illustre ce phénomène : pour des stimulus de durée inférieure à 1 ms, le courant nécessaire pour exciter un muscle est plus de dix fois supérieur à celui nécessaire pour la stimulation d'un nerf moteur.

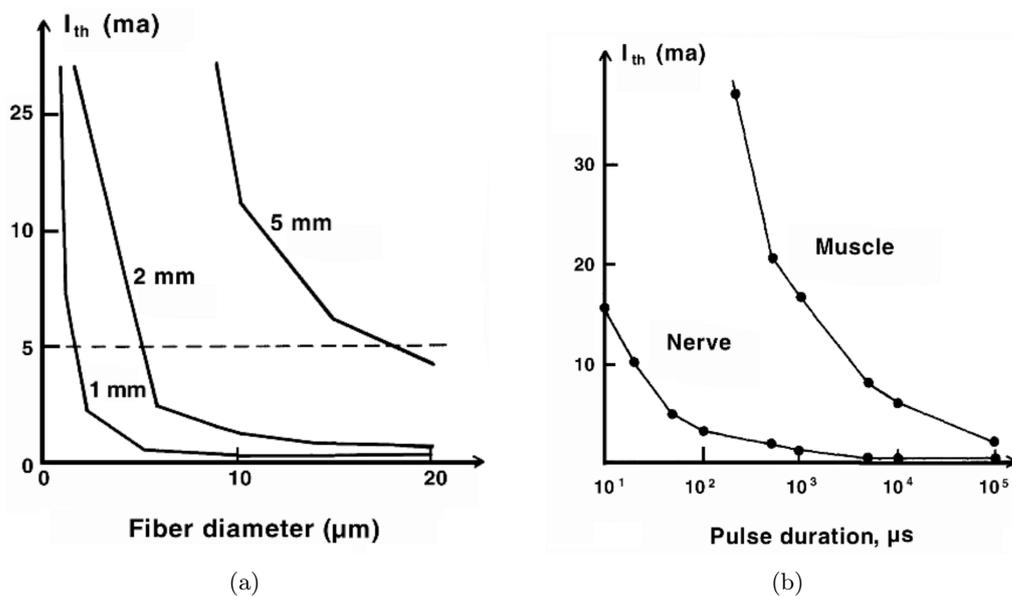


FIGURE 1.9 – (a) Effet de la distance entre l'électrode et un axone sur le seuil d'excitation, en fonction du diamètre de la fibre (largeur d'impulsion fixée à  $100 \mu\text{s}$ ). Calculé par [28] à partir du modèle de McNeal [24]. (b) Courbes amplitude-durée en fonction du type cellulaire. Illustrations issues de [22].

Les paramètres d'excitabilité d'un tissu sont donc déterminés de manière empirique [32], et sont spécifiques à une application, à une distance et une orientation entre le tissu et le champ électrique donnés.

### 1.2.3 Electrodes pour la stimulation électrique

L'application de la stimulation se fait par l'intermédiaire d'électrodes. C'est à l'interface entre l'électrode et le tissu qu'ont lieu les **phénomènes de transport de charges** permettant la stimulation du tissu cible.

#### L'interface électrode-tissu

Dans les électrodes métalliques, les charges sont portées par les électrons, tandis que dans les tissus et les milieux biologiques (électrolytes) elles sont portées par les ions. À l'interface électrode-tissu se produit deux principaux mécanismes de transport de charge [32]. D'une part, il y a les **réactions non-faradiques**, qui n'impliquent pas de transfert

d'électrons entre l'électrode et l'électrolyte, mais simplement une redistribution des charges présentes dans l'électrolyte. D'autre part, les **réactions faradiques**, pendant lesquelles des électrons sont transférés entre l'électrode et l'électrolyte, entraînent la réduction ou l'oxydation des espèces chimiques de l'électrolyte. Ces dernières peuvent être irréversibles et entraîner la formation de nouvelles espèces chimiques dans le milieu, pouvant endommager le tissu ou l'électrode. Ces réactions comprennent l'électrolyse de l'eau, l'oxydation des métaux, des composés salins et organiques, et la réduction de l'oxygène [33, 34]. Elles altèrent la composition chimique du milieu, et entraînent une corrosion des électrodes et des lésions cellulaires, pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire. Ainsi, l'objectif d'un système de stimulation est d'éviter à tout prix ces réactions. Pour cela, le choix des électrodes et plus particulièrement de matériaux adaptés est primordial.

### Exigences relatives aux matériaux

Pour assurer l'**efficacité** et la **sûreté du système**, les matériaux constituant les électrodes doivent répondre à un certain nombre d'exigences [32] :

- les matériaux isolants et conducteurs doivent être biocompatibles de sorte qu'ils n'induisent pas de réponse toxique ou immunitaire du tissu ;
- ils doivent être mécaniquement résistants, tout en étant suffisamment flexibles pour résister aux mouvements pendant toute la durée d'utilisation ;
- le matériau conducteur doit permettre d'injecter suffisamment de charges pour induire une réponse physiologique du tissu cible ;
- les réactions faradiques durant la stimulation ne doivent pas atteindre un niveau toxique pour le tissu ;
- les réactions de corrosion durant la stimulation ne doivent pas atteindre des niveaux entraînant la défaillance prématurée de l'électrode ;
- les caractéristiques du matériau (e.g. l'impédance électrique) doivent être suffisamment stables pendant toute la durée d'utilisation.

Ces critères sont fondamentaux pour la conception de systèmes implantés, puisque ces derniers doivent permettre une utilisation chronique sur une très longue période (plus de dix ans). Ainsi, les matériaux conducteurs souvent utilisés en stimulation sont le platine, le titane, l'or, l'acier inoxydable et des alliages à partir de ces métaux [32].

### Les catégories d'électrodes

Il existe différents sortes d'électrodes, que l'on peut classer selon leur degré d'invasivité, leur sélectivité et leur durée d'utilisation. Le choix du type d'électrodes dépend de l'application visée. Nous pouvons distinguer 3 grandes catégories d'électrodes de stimulation, de la moins invasive à la plus invasive [35] :

- les électrodes **transcutanées**, sont les plus simples d'utilisation. Elles se positionnent sur la peau, près du nerf ou du muscle cible, et sont reliées à un stimulateur externe délivrant des stimuli régulés en tension pour limiter le risque de fortes densités de courant et de brûlures [36]. Les inconvénients principaux de ces électrodes sont : l'activation des récepteurs cutanés de la douleur, la difficulté de positionnement, la pauvre sélectivité, la fixation précaire sur les membres en mouvements et des irritations de la peau. Pour toutes ces raisons, elles sont essentiellement utilisées pour les **applications thérapeutiques** de rééducation, renforcement musculaire et de traitement de la douleur.

- les électrodes **percutanées**, sont les moins invasives après les électrodes de surface. Elles sont placées sans chirurgie dans le muscle (électrode **intramusculaire**) ou sur la surface du tissu conjonctif qui l'entoure, l'épimysium (électrode **épimysiale**), et sont connectées à un stimulateur externe par des fils sortant de la peau. Elles permettent une meilleure sélectivité et l'élimination de l'impédance de la peau permettant de réduire les amplitudes de courant de stimulation [36]. Cependant, leur utilisation peut amener des risques d'infection, d'endommagement des fibres, de déplacement et de rupture de l'électrode, limitant leur usage dans le temps et en dehors des laboratoires et cliniques. Les systèmes percutanés ont servi de précurseurs aux systèmes entièrement implantés [35].
- les électrodes **implantées** sont conçues pour des utilisations à long terme, et ciblant de préférence les nerfs pour limiter tout risque de rupture liée aux mouvements de contraction. On distingue les électrodes **extraneurales** et **intraneurales**. Parmi les premières se trouvent les électrodes **Cuff**, formées d'une manchette isolante enveloppant le nerf et comprenant plusieurs contacts répartis sur la surface interne. Il existe également un modèle similaire, l'électrode **FINE** (Flat Interface Nerve Electrode), qui aplatit le nerf et assure alors une plus grande proximité avec les faisceaux contenant les axones neuronaux et une meilleure résolution spatiale [37]. Parmi les électrodes intraneurales, le modèle **LIFE** (Longitudinal IntraFascicular Electrodes) est un fil flexible, inséré dans le nerf le long d'un fascicule. Le modèle **TIME** (Transversal Intrafascicular Multichannel Electrode) est quant à lui inséré transversalement dans le nerf et permet d'établir un contact avec plusieurs faisceaux [38]. Enfin, il existe également des réseaux d'électrodes, les **Utah Electrode Array**, qui pénètrent le nerf et établissent un contact avec plusieurs faisceaux.

#### 1.2.4 Signaux pour la stimulation électrique

Un protocole de stimulation doit être à la fois efficace et sûr [32]. Son efficacité est déterminée par sa capacité à **induire la réponse physiologique désirée**, c'est-à-dire le déclenchement ou l'inhibition de potentiels d'action. Dans le premier cas, il doit donc permettre de délivrer une quantité de charges suffisante pour atteindre le seuil d'excitation. Par ailleurs, celle-ci doit être limitée et contrôlée pour **empêcher l'endommagement du tissu stimulé** et des électrodes.

##### Formes d'onde

Le signal de stimulation le plus efficace pour initier un potentiel d'action est l'**onde monophasique** [32], illustrée en *Figure 1.10*. Cependant, cette forme d'onde induit des processus chimiques délétères pour le tissu et les électrodes (*c.f. Section 1.2.3*).

Des études ont démontré que l'utilisation d'ondes **biphasiques** permettent d'éviter ces dommages tissulaires et matériels [39, 40]. Ces ondes étaient d'abord appelées "Lilly pulse", du nom du chercheur qui proposa cette forme d'onde. Elles se composent d'une première phase, permettant le déclenchement de l'effet physiologique recherché (phase de stimulation), et d'une seconde phase (phase d'inversion) permettant d'inverser la direction des réactions électrochimiques se produisant lors de la première phase. Idéalement, les quantités de charge de chacune des phases doivent être égales. Il s'agit des ondes biphasique **balancées**, illustrées en *Figure 1.10*. Ce sont les plus utilisées pour la stimulation électrique puisqu'elles limitent les dommages infligés aux tissus.

Cependant, la seconde phase peut empêcher le déclenchement de l'effet physiologique désiré, ce qui a pour conséquence d'augmenter le seuil d'excitation en comparaison de

celui obtenu avec un signal monophasique [41]. L'introduction d'un délai entre les 2 impulsions remédie à ce problème et abaisse le seuil d'excitation.

Plus la durée de la phase d'inversion est rapide, moins il y aura de dommages infligés aux tissus. Toutefois, cela implique un courant plus important qui peut entraîner une suppression de l'effet physiologique souhaité et un risque de corrosion de l'électrode [32]. C'est pourquoi, on utilise parfois des ondes biphasiques balancées **asymétriques** (Figure 1.10), avec une phase d'inversion plus longue et d'amplitude inférieure à celle de la phase de stimulation.

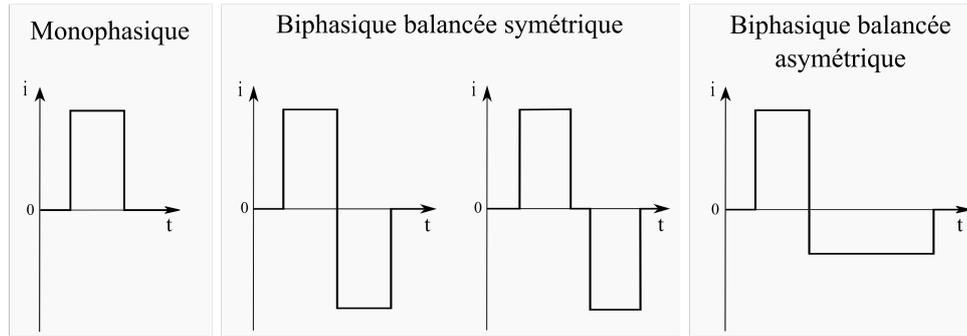


FIGURE 1.10 – Formes d'onde typiques et leurs paramètres

Dans la littérature, on retrouve également des travaux explorant l'utilisation d'autres types de forme d'onde, plus complexes. Il peut s'agir de signaux rectangulaires hachés et parfois modulés en amplitude, ou bien des formes non rectangulaires (gaussienne, sinusoïdale, exponentielle, rampe,...) [42, 43]. Ces formes d'onde sont essentiellement étudiées par le biais de simulations numériques, qui montrent que ces signaux peuvent être plus performants en terme de consommation d'énergie, de capacité d'injection de charge, et permettent d'abaisser le seuil d'excitation [42]. Quelques travaux impliquant des expérimentations *in vitro* [44] ou *in vivo* [43, 45] semblent confirmer ces résultats, néanmoins l'utilisation de ces forme d'onde reste très rare.

### Polarité

L'effet de la stimulation électrique ne dépend pas seulement de la charge ou de la forme d'onde, mais également de la **polarité du signal**. D'après la fonction d'activation de *Rattay* (équation 1.13), un courant **cathodique** est plus efficace pour induire une dépolarisation de la membrane, et par conséquent la génération d'un potentiel d'action. Le seuil de stimulation avec un courant **anodique** peut être quatre fois supérieur à celui d'un courant cathodique [46]. Cependant, nous avons vu précédemment (*c.f. Section 1.2.2*) que l'effet d'un stimulus électrique sur une membrane dépend fortement de la position et de l'orientation de la cellule excitable par rapport à l'électrode et au champ électrique. Des simulations ont fait ressortir qu'une stimulation anodique active préférentiellement les fibres orthogonales, à des seuils plus bas qu'avec une stimulation cathodique [47].

### Stimulation en courant vs. stimulation en tension

En plus des différents paramètres évoqués précédemment, un autre choix rentre en jeu, celui d'une stimulation **régulée en courant ou en tension**. Chaque solution présente des avantages et des inconvénients, qui dépendent du point de vue (électrochimiste versus neurophysiologiste [23]).

Il a été établi que la quantité de charge résiduelle doit être contrôlée et limitée pour minimiser l'endommagement du tissu. Une stimulation **régulée en courant** permet de contrôler précisément cette quantité de charge, indépendamment de l'impédance de l'électrode [48]. Elle assure également un **équilibre précis des charges** entre la phase stimulation et la phase d'inversion. C'est pourquoi elle est couramment utilisée.

Malgré cela, ce type de stimulation ne garantit pas une sécurité absolue. Une stimulation en courant ne permet pas le contrôle du potentiel des électrodes. Ce dernier peut sortir de la fenêtre de potentiel du matériau et induire des réactions d'oxydoréduction parfois irréversibles, endommageant l'électrode (dissolution, corrosion, oxydation) et/ou le tissu (oxydation ou réduction de l'eau, modification du pH) [23, 32].

Une stimulation **régulée en tension** permet de remédier à cette problématique, et présente aussi l'avantage d'être plus simple à concevoir. Elle est couramment utilisée pour la stimulation cérébrale profonde [23] et pour la stimulation transcutanée par l'intermédiaire d'électrodes de surface car elle permet d'éviter les risques d'irritation ou de brûlure de la peau lorsqu'une électrode est défectueuse [48].

Cependant, une stimulation régulée en tension ne permet pas de prédire le volume de tissu activé, puisque cela dépend du courant injecté (équation 1.7), et par conséquent de l'impédance de l'électrode. Cela devient encore plus problématique pour l'utilisation à long terme, typiquement pour les implants. En effet, les fluctuations d'impédance de l'interface électrode-tissu, dues à la dégradation des électrodes ou à la formation de tissu fibrotique autour de celles-ci [49], vont affecter l'efficacité de la stimulation.

### Choix optimal ?

Finalement, la conception d'un système de stimulation électrique demande de faire plusieurs choix : une forme d'onde, sa polarité, ses paramètres (amplitude, durée), et sa régulation en courant ou en tension.

Pour minimiser l'endommagement des tissus et des électrodes, le meilleur choix consiste à utiliser des **signaux biphasiques régulés en courant**. Ils permettent le contrôle précis de la quantité de charges injectées, de l'équilibre des charges, minimisant ainsi les réactions d'oxydoréduction irréversibles. Toutefois, une stimulation régulée en tension est plus simple à concevoir, et réduit les réactions d'oxydoréduction en contrôlant le potentiel des électrodes.

D'après le modèle de *Rattay*, un courant cathodique est plus efficace qu'un courant anodique. En revanche, l'effet d'un stimulus dépend de l'orientation du champ électrique par rapport aux cellules, si bien qu'une stimulation anodique semble plus efficace pour le recrutement des fibres orthogonales au champ électrique.

Pour toutes ces raisons, les signaux biphasiques régulés en courant, avec une phase de stimulation cathodique, sont souvent préférés en stimulation électrique. Une étude compare l'efficacité de 4 signaux biphasiques (première phase anodique et seconde phase cathodique, ou inversement, régulés en courant ou en tension) [50]. Avec surprise, ils ont constaté que la forme d'onde biphasique régulée en tension, commençant par une phase anodique, est celle qui a induit le plus de réponse au sein d'une culture de neurones *in vitro*.

Le choix des paramètres de stimulation dépend de la distance électrode-tissu, du type cellulaire et de l'application. Pour minimiser la quantité de charge injectée, il est conseillé d'utiliser des impulsions de courte durée, de l'ordre de dizaines de microsecondes [32]. Ce n'est pas toujours possible car certaines contraintes biologiques requièrent l'utilisation d'impulsions de plus longue durée, allant jusqu'à plusieurs millisecondes. De plus, une impulsion courte impose l'application d'un courant plus

important, ce qui peut être un facteur limitant dans le cas de stimulateur alimenté par batterie avec un courant de sortie limité. L'amplitude du stimulus dépend du volume de tissu à activer : plus celle-ci est importante, plus le nombre de cellules dépolarisées sera également important.

Par conséquent, le choix optimal de forme d'onde et de paramètres de stimulation est difficile à établir car il dépend de l'application, des contraintes associées et du matériel.

### 1.3 Applications de la stimulation électrique

Les applications de la stimulation électrique sont nombreuses, puisqu'elle peut cibler l'ensemble du système nerveux et les différents types de cellules musculaires.

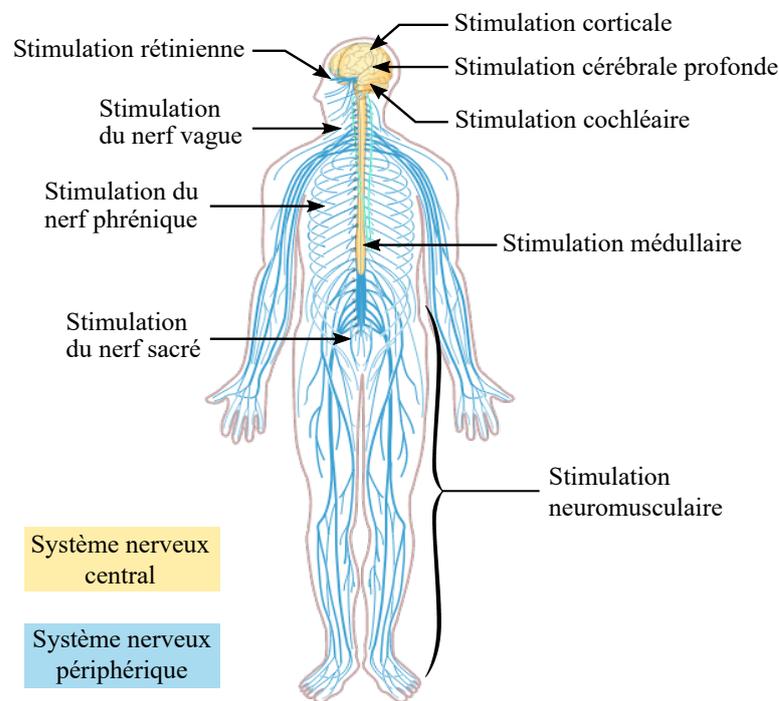


FIGURE 1.11 – Exemples de sites d'applications de la stimulation électrique

Le système nerveux est divisé en deux parties : le système nerveux **central** et le système nerveux **périphérique**. Le premier est formé par l'encéphale, contrôlant la plupart des fonctions du corps, et la moelle épinière le long de la colonne vertébrale, permettant l'acheminement des signaux nerveux et contrôlant également de nombreux réflexes. Le second comprend l'ensemble des nerfs périphériques, qui relient le système nerveux central aux différents organes et muscles du corps. Ils sont divisés en deux catégories, selon le sens de circulation des signaux nerveux. Les fibres nerveuses **afférentes**, ou **sensitives**, transportent l'information provenant des récepteurs sensoriels des organes et des muscles vers le système nerveux central. Les fibres nerveuses **efférentes**, ou **motrices**, transportent les commandes motrices du cerveau vers les muscles. Ces commandes peuvent être volontaires, pour le contrôle des muscles squelettiques, ou gérées de manière autonome, pour le contrôle des muscles lisses (viscères) et cardiaques. L'ensemble de ces cellules nerveuses et musculaires peuvent être stimulées électriquement. Des exemples de site d'application de la stimulation électrique sont illustrés en *Figure 1.11*, et sont cités dans les paragraphes suivants.

Les utilisations de la stimulation électrique peuvent être divisées en plusieurs catégories, selon leur objectif [35] :

- les applications **thérapeutiques** ont pour objectif d'améliorer la santé des tissus et les fonctions volontaires, en induisant des changements physiologiques qui subsistent après l'utilisation de la stimulation. Elles peuvent également traiter les symptômes de certains troubles neurologiques.
- les applications **fonctionnelles** ont pour but de remplacer ou restaurer certaines fonctions, notamment sensorielles et motrices, qui ne sont plus assurées par le système nerveux.

### 1.3.1 Les applications thérapeutiques

#### Rééducation et renforcement musculaire

Les thérapies utilisant la stimulation électrique concernent majoritairement des problématiques de rééducation et de renforcement musculaire, notamment après un accident vasculaire cérébral. Elles visent à **améliorer les fonctions motrices** déficientes afin que le patient puisse de nouveau marcher, se tenir debout ou manipuler des objets. Elles reposent sur le concept de neuroplasticité stipulant que le système nerveux est capable de modifier ses connections pour se réorganiser et intégrer de nouvelles capacités motrices [51]. De plus, la stimulation neuromusculaire permet de renforcer les muscles, de lutter contre la faiblesse et l'atrophie musculaire [36].

Ces systèmes sont généralement externes et non invasifs, utilisant des électrodes de surface placées sur la peau près du **muscle** ou du **nerf périphérique** cible.

#### Traitement de la douleur

Un autre exemple d'électrothérapie consiste à traiter la douleur par neurostimulation électrique **transcutanée** (*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*, abrégé TENS). Cette technique s'avère efficace pour les douleurs post-opératoires, musculaires, ou encore les dysménorrhées [52]. La société Urgo commercialise des patch d'électrostimulation reposant sur ce principe et applicable aux douleurs lombaires (*Figure 1.12(a)*) et menstruelles.

La douleur chronique peut également être traitée par stimulation **médullaire** (moelle épinière). La société Medtronic a entre autres développé deux stimulateurs médullaires totalement implantables pour cette application <sup>4</sup>.

#### Traitement de troubles neurologiques et inflammatoires

Avec le développement de la **stimulation cérébrale profonde** (*Deep Brain Stimulation*, abrégé DBS) sont apparues de nombreuses applications permettant de traiter les troubles et maladies neurologiques.

Dans le cas de la maladie de **Parkinson**, celle-ci permet de supprimer ou réduire considérablement les symptômes de tremblements [53]. Elle peut se révéler également efficace pour la réduction des crises d'épilepsie chez les patients souffrant d'**épilepsie** pharmaco-résistante [54]. Pour ces deux pathologies, la stimulation améliore largement la qualité de vie des patients et réduit leur état dépressif. Des études montrent par ailleurs qu'elle représente un traitement prometteur pour les **dépansions chroniques**

---

4. <https://europe.medtronic.com/xd-en/healthcare-professionals/products/neurological/spinal-cord-stimulation-systems.html>

résistantes au traitement [55]. Les systèmes de stimulation cérébrale profonde reposent sur l'utilisation d'un neurostimulateur et d'électrodes implantés. Seule la société Medtronic commercialise un stimulateur pour cette application (*Figure 1.12(b)*).

Le traitement de l'épilepsie et de la dépression peuvent également être réalisés par stimulation du **nerf vague** [56]. De manière surprenante, la stimulation du nerf vague représenterait également une piste prometteuse de traitement **anti-inflammatoire**. Des études se penchent alors sur son application pour le traitement de nombreuses maladies en lien avec des phénomènes inflammatoires, comme la fibromyalgie, les migraines, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose ou encore le diabète [56].



FIGURE 1.12 – (a) Ceinture lombaire d'électrothérapie commercialisée par Urgo <sup>5</sup>. (b) Photographie du seul neurostimulateur pour stimulation cérébrale profonde commercialisé (Medtronic, Percept™, 68 x 51 x 11 mm, 61 g) <sup>6</sup>.

### 1.3.2 Les applications fonctionnelles

#### Fonctions motrices

Les accidents vasculaires cérébraux et les lésions de la moelle épinière sont les deux grandes causes de **paralysie**. Une récupération complète des fonctions motrices n'est pas possible à l'heure actuelle, mais la stimulation électrique peut remplacer ces fonctions et permettre une amélioration de la qualité de vie des patients en leur rendant une certaine indépendance.

Il est possible de corriger l'hémiplégie, comme le **syndrome du pied tombant** survenant à la suite d'un accident vasculaire cérébral. Les personnes qui en sont atteintes sont incapables de soulever la partie avant du pied, et rencontrent alors des difficultés pour marcher. Ce problème peut être traité par un dispositif qui stimule le **nerf péronier** par l'intermédiaire d'électrodes cuff implantées et d'un boîtier de contrôle externe (*Figure 1.13(a)*) [57].

Pour les patients tétraplégiques, la priorité est mise sur la restauration des mouvements de la main et des doigts, notamment la fonction de **préhension** [58]. Le système le plus efficace fut le FreeHand<sup>®</sup> de la société NeuroControl, reposant sur l'utilisation d'électrodes **épinysiales** et **intramusculaires** et d'un stimulateur implanté permettant le contrôle de douze muscles du bras. Il fut implanté sur plus de 250 patients, permettant d'améliorer considérablement leur fonction de préhension et leur autonomie pour exécuter des activités du quotidien [59], avant que l'entreprise NeuroControl

5. Photographie d'Urgo, issue de <https://electrotherapie.urgo.fr/solution-electrotherapie-tens/urgo-ceinture-lombaire-electrotherapie/>

6. Photographie de Medtronic, issue de <https://europe.medtronic.com/xd-en/healthcare-professionals/products/neurological/deep-brain-stimulation-systems/percept-pc.html>

ne fasse faillite en 2001<sup>7</sup>. Plus récemment, un essai clinique démontra la possibilité de restaurer les fonctions motrices de la main avec seulement deux électrodes cuff multicontacts (6 à 9 contacts) [60].

Les systèmes actuels ne permettent aux patients paraplégiques de **remarcher** qu’avec l’aide de déambulateurs ou d’autres dispositifs permettant de stabiliser les chevilles, genoux et hanches [58]. Des progrès restent à faire pour recréer l’activité complexe de marche, nécessitant la coordination de plusieurs muscles. En Suisse, un récent essai clinique a permis à trois personnes souffrant de lésions médullaires de se tenir debout, de marcher, mais aussi de faire du vélo et nager, grâce à la stimulation électrique **médullaire** [61].

Pour toutes ces applications, les systèmes sont conçus pour un usage long terme, et sont donc invasifs et destinés à être implantés lors d’une opération chirurgicale.

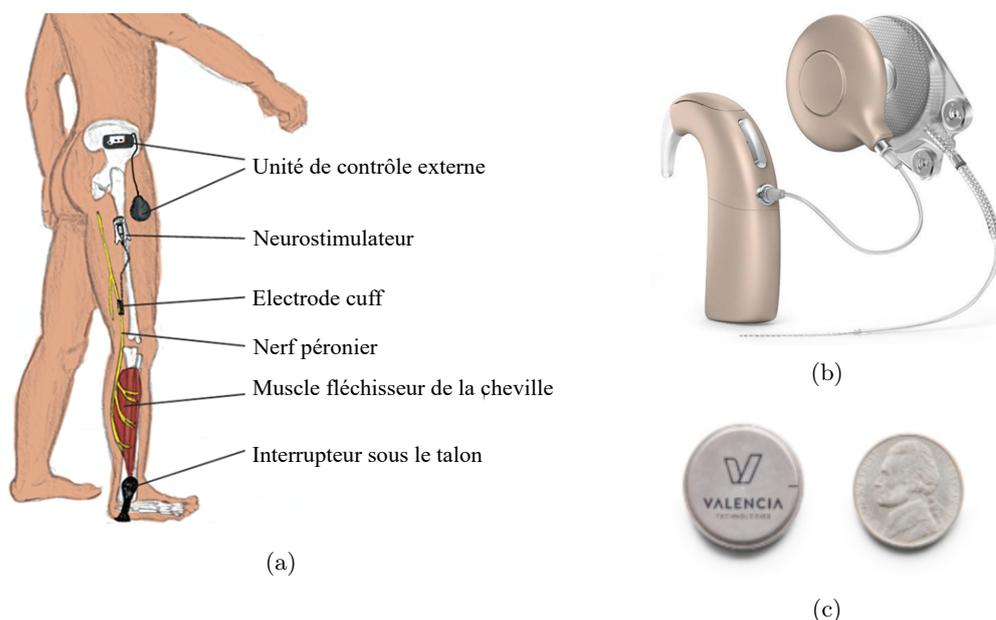


FIGURE 1.13 – (a) Illustration du système de stimulation du pied tombant ActiGait [57]. (b) Photographie du dernier implant cochléaire développé par Oticon Medical, Neuro 2, image d’Oticon medical<sup>8</sup>. (c) Photographie du neurostimulateur implantable eCoin<sup>®</sup> pour le traitement de l’incontinence urinaire<sup>9</sup>.

## Fonctions sensorielles

Les **implants cochléaires** représentent l’application sensorielle la plus connue et répandue, pour la restauration de l’**ouïe** en cas de surdité. Depuis les premiers essais de stimulation du nerf auditif en 1957 [18], les progrès techniques ont permis d’en faire le premier neurostimulateur crânien implantable et efficace [62]. Les implants actuels comprennent un dispositif externe, qui reçoit et traite les sons, et transmet le signal à travers la peau à un dispositif interne, qui transduit le signal reçu et stimule directement le **nerf cochléaire** (Figure 1.13(b)). Même s’il s’agit du stimulateur le plus commun aujourd’hui, les recherches sont toujours en cours, étudiant notamment

7. <https://www.technologyreview.com/2015/04/09/168424/paralyzed-again/>

8. Photographie d’Oticon Medical, issue de <https://www.oticonmedical.com/fr/solutions/cochlear-implants/neuro-system>

9. Photographie de Valencia Technologies, issue de <https://valenciatechnologies.com/valencia-technologies-announces-first-commercial-implantation-of-ecoin/>

de nouvelles stratégies de stimulation (piézoélectrique, optique) et le développement de stimulateurs totalement implantables [63].

Un autre exemple de restauration sensorielle est la stimulation électrique **rétinienne** [64] ou **corticale** [65] pour restaurer la **vue** chez les personnes aveugles. Les premières tentatives datent de près d'un siècle, où l'application de courants électriques au niveau du lobe occipital donna une perception de la lumière chez des patients aveugles [66]. Cela a conduit au développement de la première prothèse implantable, capable de stimuler le cortex visuel et de produire des perceptions visuelles chez un patient aveugle [67]. Le premier implant rétinien Argus II® [68] fut commercialisé entre 2013 et 2020 par la compagnie *Second Sight*, et implanté chez plus de 350 personnes. Mais la compagnie a récemment annoncé l'arrêt de maintenance de son système <sup>10</sup>.

La stimulation électrique permet également la restauration d'autres sensations telles que le **toucher**, la **proprioception**, ou encore la **température** par stimulation des nerfs périphériques appropriés [69]. Ce domaine est particulièrement intéressant pour le développement et le contrôle en boucle fermée de **prothèses** pour les personnes amputées. Par exemple, *Stanisa Raspopovic* et ses collaborateurs ont élaboré une prothèse de main bidirectionnelle : des capteurs sur la prothèse et la stimulation d'un nerf sensoriel permettent à l'utilisateur de ressentir un objet, et le décodage des signaux de ses nerfs moteurs lui permet de saisir l'objet et de moduler la force produite en temps réel [70].

## Autres fonctions

En plus des fonctions motrices, les lésions de la moelle épinière peuvent affecter d'autres fonctions du corps, pouvant être remplacées par la stimulation. Par exemple, la stimulation des **nerfs sacrés** permet de rétablir le contrôle de la **vessie** en cas d'incontinence, ou au contraire en cas de paralysie des muscles la contrôlant [71]. En 2022, *Valencia Technologies* lance la commercialisation du premier neurostimulateur tibial implantable pour le traitement de l'incontinence urinaire (*Figure 1.13(c)*). Il est également possible d'assister et restaurer la **fonction respiratoire** en stimulant le **nerf phrénique**, déclenchant des contractions du diaphragme [72].

## 1.4 Stimulation électrique pour le contrôle moteur

Dans nos recherches, nous nous intéressons plus particulièrement aux **applications neuromusculaires** et notamment la restauration des fonctions motrices. Ici, nous exposons d'abord le fonctionnement naturel et les caractéristiques physiologiques du système moteur. A partir de cette compréhension de la physiologie musculaire, nous détaillons comment la stimulation électrique permet de restaurer la motricité.

### 1.4.1 Anatomie et physiologie du système moteur

#### 1.4.1.1 Structure du système neuromusculaire

Le système moteur présente une **organisation très complexe et interconnectée** qui implique l'ensemble du système nerveux, les muscles striés squelettiques et des récepteurs sensoriels.

<sup>10</sup>. <https://www.usine-digitale.fr/article/comment-la-start-up-second-sight-a-laisse-les-utilisateurs-de-son-il-bionique-dans-le-noir.N1785162>

## Le contrôle moteur

Le système nerveux central intègre la décision de mouvement et diverses informations sensorielles pour définir les ordres moteurs à transmettre au système périphérique qui commande les muscles. La hiérarchie du système moteur peut se décomposer en trois niveaux : le niveau le plus haut décide d'initier un mouvement, le niveau intermédiaire génère les commandes motrices et régule le mouvement, et le dernier niveau transmet les ordres moteurs aux muscles et les informations sensorielles aux niveaux supérieurs.

L'intention de mouvement est issue de plusieurs zones du lobe frontal, qui transmettent cette intention et les informations sensorielles au cortex moteur. Celui-ci traite les informations pour générer une séquence permettant l'initiation du mouvement, transmise au tronc cérébral. Les ganglions de la base traitent également diverses informations et ont un rôle majeur dans l'initiation du mouvement et la suppression des mouvements indésirables. Le cervelet joue un rôle essentiel pour la génération de mouvement coordonnés et précis. Il régule les commandes motrices pour réduire les erreurs entre le mouvement désiré et le mouvement généré. Finalement la commande motrice est transmise à la moelle épinière, et transite par les neurones moteurs (motoneurones  $\alpha$ ), connectés aux fibres musculaires par des jonctions neuromusculaires.

Le système neuromusculaire est lié à différents types de récepteurs sensoriels permettant la régulation des mouvements. D'une part, on trouve les récepteurs cutanés qui fournissent des informations de pression et de vibration (mécanorécepteurs), de douleur (nocicepteurs) et de température (thermorécepteurs) à partir de stimuli externes. D'autre part, il existe des mécanorécepteurs spécialisés (propriocepteurs) fournissant des informations sur la position des différentes parties du corps :

- les fuseaux neuromusculaires, présents à l'intérieur des muscles, renseignant la longueur et les variations de longueur du muscle ;
- les organes de Golgi, présents au niveau des tendons, sensibles à la tension et la force appliquée au muscle et au tendon.

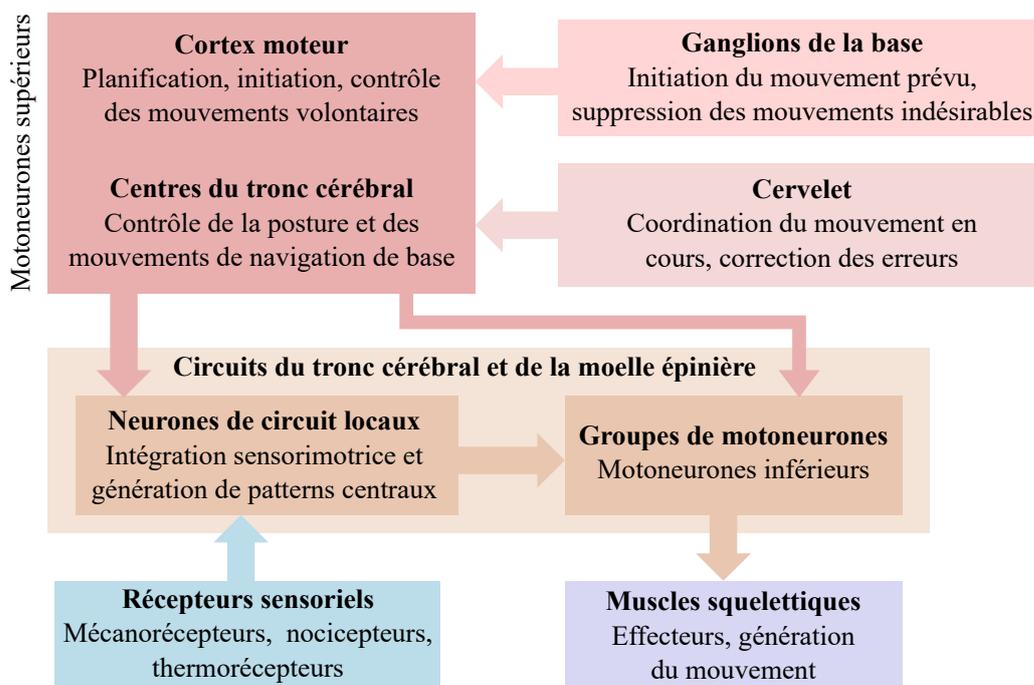


FIGURE 1.14 – Organisation des structures neurales impliquées dans le contrôle moteur

## Structure du muscle strié squelettique

Les muscles striés squelettiques sont attachés au squelette par l'intermédiaire de tendons. Leur structure est illustrée en *Figure 1.15*. Un muscle squelettique est entouré d'un tissu conjonctif, appelé épimysium, et est organisé en fascicules (ou faisceaux). Ces faisceaux sont également entourés de tissu conjonctif, le périmysium, et contiennent plusieurs fibres musculaires. Les **fibres musculaires** sont des cellules striées, multinucléées, de diamètre compris entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  et de longueur pouvant atteindre plusieurs dizaines de centimètres. Une cellule musculaire est caractérisée par quatre propriétés essentielles :

- **excitabilité**, la capacité de réagir à un stimulus par la production d'un potentiel d'action ;
- **contractilité**, la capacité de se raccourcir sous l'effet d'un potentiel d'action ;
- **extensibilité**, la capacité de s'étirer ;
- **élasticité**, la capacité de reprendre sa longueur initiale après une contraction.

A l'intérieur de ces cellules se trouvent des **myofibrilles**, constitués de **myofilaments** et responsables de la contraction de la cellule. Il s'agit de protéines organisées en motifs réguliers, les **sarcomères**, représentant l'unité contractile des fibres musculaires leur donnant leur aspect strié. Les deux myofilaments sont la myosine (filament épais) et l'actine (filament fin).

Les fibres musculaires sont regroupées en **unités motrices**. Il s'agit de l'association d'un motoneurone et du groupement de fibres musculaires qu'il innerve. Les fibres d'une unité motrice sont réparties dans le muscle, et leur nombre dépend du type d'unité motrice.

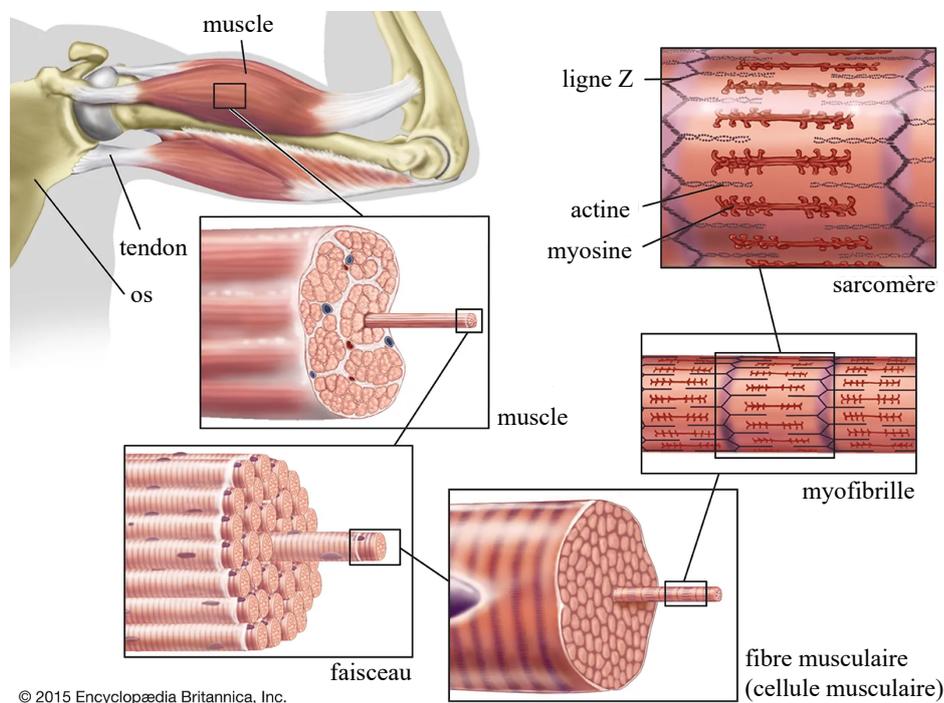


FIGURE 1.15 – Anatomie du muscle strié squelettique <sup>11</sup>.

11. Illustration adaptée de [www.britannica.com/science/muscle](http://www.britannica.com/science/muscle)

TABLEAU 1.1 – Caractéristiques des trois types de fibres musculaires squelettiques.

	<b>Type I (lente)</b>	<b>Type IIa (rapide)</b>	<b>Type IIb (rapide)</b>
<b>Diamètre de la fibre et de l'axone</b>	petit	intermédiaire	grand
<b>Vitesse de contraction</b>	lente	rapide	rapide
<b>Durée de contraction (secousse)</b>	longue	courte	très brève
<b>Force produite</b>	faible	moyenne	élevée
<b>Métabolisme</b>	oxidatif	oxidatif, glycolytique	glycolytique
<b>Fatigabilité</b>	faible	moyenne	élevée

### Les types d'unités motrices

Il existe plusieurs types de fibres musculaires, qui se distinguent par leurs caractéristiques histologique, biochimique, morphologique, ou physiologique [73]. L'existence de plusieurs méthodes de caractérisations peut donner des classifications différentes, mais on identifie généralement **trois grands types de fibres musculaires**. Leurs propriétés sont résumées dans le *Tableau 1.1*. Cette classification s'applique aussi aux unités motrices, puisqu'un motoneurone innerve plusieurs fibres musculaires du même type.

Les **fibres de type I** se contractent lentement et utilisent l'énergie issue du processus de respiration aérobie (métabolisme oxidatif). C'est pourquoi elles sont aussi appelées **fibres lentes** oxydatives. Elles produisent une faible force, mais sont très résistantes à la fatigue. Ces fibres sont très utiles pour des exercices peu intenses mais prolongés, comme le maintien de la posture.

A l'inverse, les **fibres de type IIb** se contractent très rapidement et produisent une force bien plus élevée, sur un laps de temps très bref. Leur énergie provient de la voie métabolique glycolytique et elles se fatiguent très rapidement. Elles sont aussi appelées **fibres rapides** glycolytiques. Ces fibres sont sollicitées pour des exercices intenses et brefs. Enfin, le **type IIa** présentent les caractéristiques intermédiaire des 2 autres types, avec un métabolisme mixte (oxidatif et glycolytique).

Tous les muscles squelettiques sont constitués des trois types de fibres musculaires, dans des proportions différentes. Ces proportions dépendent de plusieurs critères, dont la fonction du muscle, mais également de la condition physique de l'individu et son âge. En effet, les fibres musculaires ont la capacité de s'adapter et passer d'un type à un autre [74]. L'entraînement physique permet une transition des fibres rapides en fibres lentes plus résistantes à la fatigue, tandis qu'un usage sévèrement limité des muscles induira la transition inverse.

#### 1.4.1.2 Le couplage excitation-contraction

La contraction résulte d'une succession de phénomènes chimiques, électriques, mécaniques, rassemblés sous le nom de **couplage excitation-contraction** défini par *Alexander Sandow* en 1952 [75]. Il décrit l'ensemble des processus se produisant à partir

de la génération du potentiel d'action de la fibre musculaire jusqu'à sa contraction (Figure 1.16).

### Excitation

La fibre musculaire est une cellule excitable qui possède des canaux et pompes ioniques nécessaires au maintien d'un potentiel membranaire de repos et à la génération d'un potentiel d'action. Son potentiel de repos est inférieur à celui des neurones (environ  $-90\text{ mV}$  contre environ  $-70\text{ mV}$  pour les neurones), s'expliquant par une plus grande contribution de la conductance de l'ion chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) [76]. L'ion chlorure aurait également un rôle majeur dans le maintien de l'excitabilité musculaire lors de stimulations répétées, en compensant l'hyperpolarisation de la membrane provoquée par une fuite d'ions potassium vers l'extérieur de la cellule [77]. Son importance fut découverte par l'étude de la myotonie, caractérisée par des cellules musculaires hyperexcitables et causée par une faible conductance de l'ion  $\text{Cl}^-$ .

Le premier processus responsable de la contraction se produit à la jonction neuro-musculaire. Dans le terminal de l'axone (synapse) se trouvent des vésicules stockant un **neurotransmetteur**, l'acétylcholine (ACh). L'arrivée du potentiel d'action au niveau de la synapse déclenche l'ouverture de canaux calciques, entraînant un flux entrant d'ions calcium et la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane du neurone. L'acétylcholine est alors relâchée au sein de la fente synaptique et se lie à des récepteurs spécifiques présents sur la membrane de la fibre musculaire. Si le nombre de récepteurs liant l'ACh est suffisamment important, cela engendre la **dépolarisation** de la membrane plasmique, aussi appelée **sarcolemme**. Cette dépolarisation active les canaux ioniques du sarcolemme produisant alors un potentiel d'action musculaire.

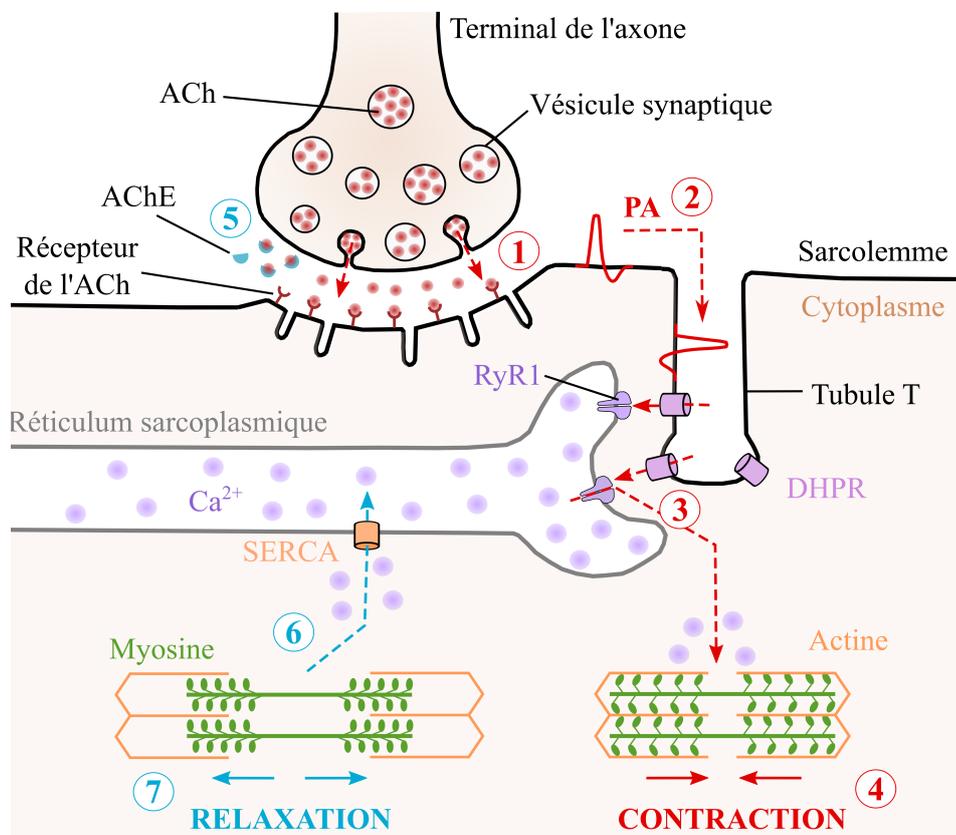


FIGURE 1.16 – Schéma du couplage excitation-contraction

## Contraction

Une fois le potentiel d'action musculaire généré, celui-ci se propage le long du sarcolemme. Le sarcolemme a la particularité de posséder des invaginations, les tubules transversaux (tubules T), qui s'étendent perpendiculairement à la surface de la cellule et pénètrent à l'intérieur. Le potentiel d'action descend le long de ces tubules T et active des structures responsables de la transduction du signal électrique en signal chimique permettant le déclenchement de la contraction.

Les cellules musculaires renferment un compartiment intracellulaire, le réticulum sarcoplasmique, contenant des ions calcium et dont les citernes terminales se trouve à proximité des tubules T. La dépolarisation de la membrane des tubules T active les récepteurs des dihydropyridines (DHPR), des canaux calciques ( $Ca^{2+}$ ) sensibles au voltage. En face de ces canaux se trouvent d'autres canaux calciques, les récepteurs de la ryanodine (RyR1), dans la membrane du réticulum sarcoplasmique. Les canaux DHPR activent les canaux RyR1, probablement par interaction mécanique mais les mécanismes moléculaires en jeu restent à élucider [78]. L'ouverture des RyR1 entraîne la libération de grandes quantités d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) du réticulum vers le cytoplasme. Ces ions vont déclencher la **formation de ponts entre les protéines contractiles** (myofilaments d'actine et de myosine), les faisant glisser l'une le long de l'autre, entraînant donc la **contraction** musculaire.

La **relaxation** de la fibre est permise par l'hydrolyse de l'ACh par l'enzyme acétylcholinestérase, formant la choline libre qui est ramenée dans la synapse où elle permettra la resynthèse d'ACh. De plus, les ions calcium sont recapturés par les pompes sarco-endoplasmiques (SERCA), du cytoplasme vers le réticulum sarcoplasmique, menant finalement au détachement des myofilaments.

## Métabolisme

Pour réaliser l'ensemble de ces processus, les fibres musculaires consomment de l'énergie, dont la source est l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP). Pendant la contraction, l'énergie est principalement consommée par la formation des ponts actine-myosine et par la pompe ionique (SERCA) en charge de la recapture du calcium dans le réticulum [79]. Le stock d'ATP intracellulaire est très limité, c'est pourquoi différents processus métaboliques sont activés. Ils sont divisés en deux grandes catégories :

- la voie métabolique anaérobie utilise la dégradation de la phosphocréatine (PCr), et surtout celle du glycogène musculaire (**métabolisme glycolytique**). Ce dernier est dégradé en glucose qui entre dans le processus de la glycolyse, qui forme du lactate et des ions hydrogène en cas d'exercice intense Cette voie est la plus rapide et prédomine lors d'une activité physique intense.
- la voie aérobie (**métabolisme oxydatif**) repose sur l'oxydation des glucides (glycogène et glucose extracellulaire) et des lipides stockés dans les graisses et les muscles. Cette voie est plus lente mais fournit bien plus d'énergie, c'est pourquoi elle est prédominante pendant les exercices peu intenses et prolongés.

### 1.4.1.3 Recrutement naturel et modulation de la force

Dans une unité motrice, les fibres musculaires sont du même type et sont contrôlées par le même motoneurone. Elles sont donc simultanément activées sous l'effet d'un stimulus nerveux, ou au repos. Un unique potentiel d'action nerveux donne lieu à une contraction appelée **secousse** (*twitch* en anglais). Les caractéristiques de cette secousse sont illustrées en *Figure 1.17*. On distingue une période de latence de quelques millisecondes entre la génération du potentiel d'action musculaire et la contraction,

due au temps de propagation du potentiel d'action jusqu'aux tubules T. Du fait de l'augmentation de concentration du calcium intracellulaire, s'ensuit la phase de contraction : la force produite augmente jusqu'à atteindre un pic. Enfin, la recapture du calcium donne lieu à la phase de relaxation, plus longue que la phase de contraction. Les vitesses de contraction et de relaxation varient d'un type de fibre à l'autre, et dépendent de la rapidité de formation-détachement des ponts actine-myosine, de la rapidité de consommation-production d'énergie, et de la gestion du calcium intracellulaire.

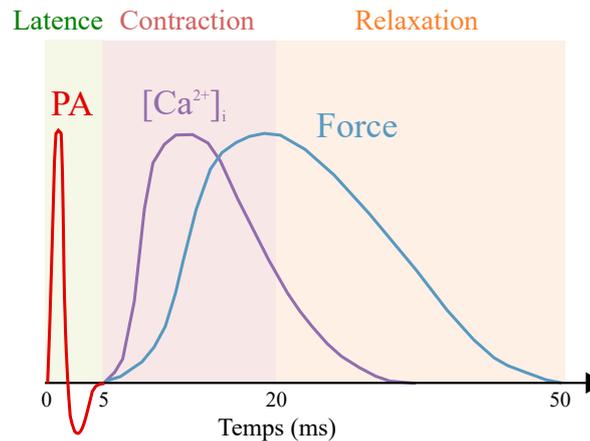


FIGURE 1.17 – Réponse mécanique (secousse, ou *twitch*) d'une fibre musculaire à un seul potentiel d'action (PA), caractérisée par une période de latence et une phase de contraction et de relaxation. Les temps indiqués sont arbitraires.

La secousse musculaire produit une faible force, sur un laps de temps assez court. La durée totale d'une secousse est comprise entre quelques millisecondes et cent millisecondes selon le type de muscle. Le fonctionnement normal d'un muscle implique des contractions plus longues avec une force plus importante, modulée en fonction des besoins. Pour cela, le système nerveux utilise le principe de **sommation** des contractions. Il existe deux types de sommation : la sommation spatiale et la sommation temporelle.

La **sommation spatiale** consiste à recruter simultanément plus d'unités motrices [80], réparties dans le muscle, ce qui permet d'augmenter la force produite. Le recrutement des unités motrices suit un ordre bien déterminé, connu sous le nom de **principe de taille d'Henneman** (*Henneman's size principle*) [81]. Ce principe stipule que les motoneurones, et par extension les fibres musculaires, sont recrutés par ordre de taille, du plus petit diamètre au plus large, selon l'effort à fournir. En premier lieu sont d'abord recrutées les fibres de faible diamètre, produisant une faible force et présentant une grande résistance à la fatigue. Ensuite, pour des tâches nécessitant davantage de force, il y aura un recrutement progressif des fibres plus larges, capables de générer plus de force mais avec une fatigabilité plus importante.

La **sommation temporelle** consiste à augmenter la fréquence des stimulations nerveuses. Un potentiel d'action permet la génération d'une secousse musculaire. Si un second potentiel d'action vient exciter la fibre lors de la phase de relaxation, cela déclenche une nouvelle contraction avant même que la première ne soit terminée. Ce dernier stimulus engendre une nouvelle libération de calcium dans le cytoplasme de la cellule musculaire, augmentant alors la force de contraction. Ce phénomène, illustré en *Figure 1.18*, est rendu possible par la période de latence et le fait que les phases de contraction et de relaxation sont bien plus longues que la période réfractaire. Plus la fréquence des stimuli augmente, plus les secousses fusionnent en une longue contraction

continue, aussi appelée **tétanos** parfait. La fréquence à laquelle apparaît le tétanos parfait est appelée la **fréquence de fusion**. Elle varie d'un muscle à l'autre, et dépend plus particulièrement du ratio des types de fibres le constituant, puisque les fibres lentes auront une fréquence de fusion plus faible que les fibres rapides.

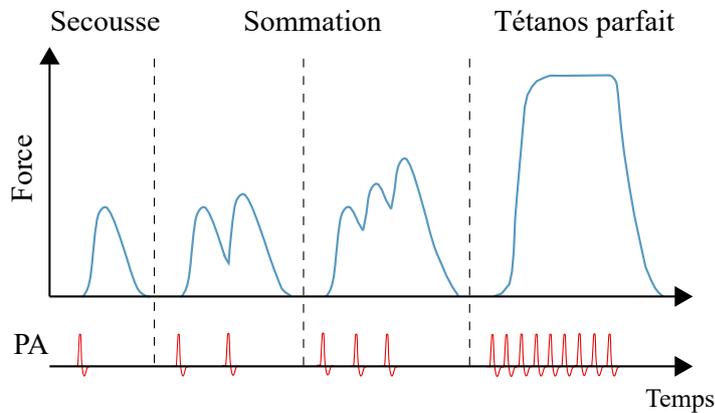


FIGURE 1.18 – Phénomène de sommation temporelle des contractions d'une seule fibre découlant de l'augmentation des stimuli nerveux.

Enfin, lors d'une contraction volontaire, le recrutement des unités motrices se produit de manière **asynchrone**. Cela permet de produire des contractions lisses et fusionnées, à des fréquences de stimulation relativement faibles pour chaque unité motrice [82], évitant ainsi des sollicitations énergétiques trop importantes. Les fréquences de stimulation varient d'un muscle à l'autre, d'une unité motrice à l'autre au sein du même muscle, et également du type de contraction. Les fréquences moyennes pour une unité motrice se trouvent aux alentours de 5-10 Hz pour des faibles contractions, 10-20 Hz pour des contractions modérées et entre 20 et 40 Hz pour des contractions plus importantes [83].

Finalement, l'ensemble de ces mécanismes permettent d'alterner les fibres recrutées, moduler la force générée et ainsi minimiser la fatigue musculaire.

## 1.4.2 Restaurer la motricité avec la stimulation électrique

### 1.4.2.1 Recrutement par stimulation électrique et modulation de la force

Le système moteur s'étend du cerveau jusqu'aux muscles, en passant par la moelle épinière et les nerfs périphériques. Ainsi, il est possible de stimuler électriquement n'importe lequel de ces sites pour induire des contractions musculaires et restaurer la motricité. Le choix dépendra de l'objectif thérapeutique. Par exemple, dans le cas de rééducation musculaire, les cliniciens utilisent des électrodes de surface pour stimuler directement le muscle cible, ou le nerf périphérique qui le commande. Dans le cas de paralysie et de lésion de la moelle épinière, les cibles seront les motoneurones. En règle générale, la stimulation électrique du système nerveux est préférée car les neurones sont plus excitables que les cellules musculaires.

Quel que soit le site de stimulation, **la force** générée par stimulation électrique **est modulée en jouant sur les paramètres du signal de stimulation**. L'amplitude et la durée des impulsions, ainsi que la fréquence de stimulation, influencent chacun le recrutement des fibres. De la même façon que dans le cas d'une contraction volontaire, un seul stimulus électrique, ou une fréquence de stimulation faible (ex : 1 Hz), vont provoquer une réponse mécanique de type twitch. Pour accroître la force de contraction,

il est possible soit d'augmenter l'amplitude ou la durée du signal, soit d'augmenter sa fréquence. Une amplitude, ou une durée, plus élevée permet de recruter davantage de fibres. Dans le cas d'une stimulation directe du muscle avec des électrodes de surface, augmenter l'amplitude ou la durée de l'impulsion va entraîner la dépolarisation des fibres musculaires plus profondes dans le muscle [84]. Dans ce cas, il y a recrutement des fibres superficielles, proches des électrodes (*Figure 1.19*). Si le site de stimulation est un nerf, on retrouve le même principe, mais concernant les axones. Augmenter l'amplitude ou la durée du signal va permettre la dépolarisation d'axones plus profonds dans le nerf. La différence réside dans le fait que cette fois-ci les fibres musculaires recrutées sont réparties dans le muscle (*Figure 1.19*) [84]. Dans les deux cas, il y a une **sommation spatiale** (*c.f. Section 1.4.1.3*) des contractions : les forces produites par chaque fibre s'ajoutent pour produire davantage de force.

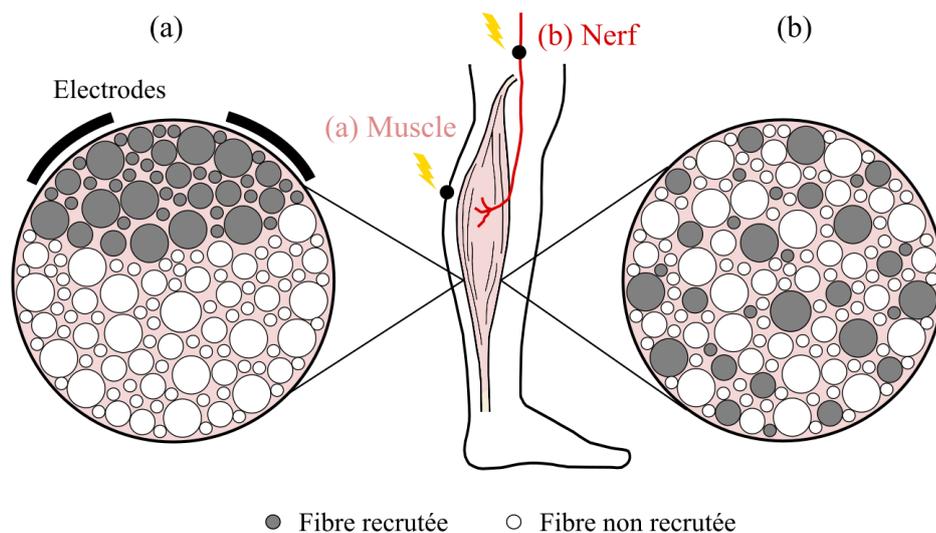


FIGURE 1.19 – Recrutement des fibres musculaires en réponse à une stimulation électrique appliquée sur le muscle (a) ou sur le nerf (b)

De la même manière qu'une contraction volontaire, on peut également utiliser le principe de **sommation temporelle** (*c.f. Section 1.4.1.3*) pour augmenter la force générée par stimulation externe. Pour cela, il suffit d'augmenter la fréquence de stimulation : plus elle augmente, plus les contractions seront puissantes et lisses.

Une des différences fondamentales entre une contraction volontaire et une contraction électriquement induite concerne l'ordre de recrutement. En effet, les fibres ayant un grand diamètre, sont plus excitables que les fibres de faible diamètre. Un stimulus électrique externe va donc recruter en premier lieu les fibres les plus larges, plus fatigables. Il s'agit du **recrutement inverse** à celui de la loi d'Henneman, observés lors d'une contraction volontaire. Mais à cela s'ajoute aussi l'influence de la distance entre les fibres et les électrodes : les premières fibres recrutées sont celles qui sont les plus proches de l'électrode. Finalement, le recrutement par stimulation électrique est **aléatoire** [85], car la stimulation active les fibres de large diamètre, mais également quelques fibres de plus petits diamètres proches des électrodes. Le recrutement est dit **non sélectif et spatialement fixe**.

Une autre différence majeure entre les deux modes de recrutement réside dans la temporalité du recrutement. Le mode de recrutement naturel est asynchrone et permet d'alterner les fibres recrutées, ce qui n'est pas le cas avec la stimulation électrique

[83]. La force générée par contraction électriquement induite résulte de l'activation synchrone de plusieurs fibres. Le recrutement est dit **synchrone**.

Pour produire des contractions lisses et sans à-coups d'une amplitude suffisante, le recrutement par stimulation électrique impose l'utilisation de fréquences de stimulation plus élevées que celles du fonctionnement naturel [83]. Les fréquences couramment utilisées sont comprises entre 10 et 50 Hz [36]. La fréquence est fixée de sorte à produire une contractions lisse, et la force est ensuite modulée en réglant l'amplitude ou la durée des impulsions de stimulation.

#### 1.4.2.2 Adaptations musculaires en réponse à la stimulation électrique

Le muscle squelettique est un tissu particulièrement **plastique**, capable de procéder à des changements morphologiques et biochimiques en réponse à des changements d'activité contractile et environnementaux. A la suite d'une blessure médullaire ou d'un AVC, l'inutilisation des muscles paralysés provoque leur atrophie en raison de la dégradation accrue et la diminution de la synthèse des protéines constituant les myofibrilles [86]. De plus, les fibres musculaires lentes sont converties en fibres rapides, entraînant une forte baisse de la capacité de génération de force et de la résistance à la fatigue. La stimulation électrique permettrait de limiter ou d'inverser certains de ces phénomènes.

En effet, l'article [87] recense les principaux effets de la stimulation électrique chronique basse fréquence ( $\leq 10\text{-}20$  Hz) appliquée à des muscles de type rapide chez des modèles animaux :

- **transformation métabolique**, se traduisant par une augmentation des capacités métaboliques oxydatives aérobiques, une baisse des capacités métaboliques glycolytiques (*c.f. Section 1.4.1.2*) ;
- changement de **composition des protéines des myofibrilles**, se manifestant par une plus grande proportion de fibre lente (type I) en raison de la transition des isoformes rapides vers les isoformes lents ;
- **modifications des protéines régulatrices du calcium**, c'est-à-dire impliquées dans la dynamique du calcium, se traduisant par une transition de l'isoforme rapide vers l'isoforme lent de la protéine SERCA, et la diminution du nombre de récepteurs RyR et DHPR (*c.f. Section 1.4.1.2*).

Ces effets bénéfiques de la stimulation électrique sont alors particulièrement intéressants pour le traitement des troubles neuromusculaires, tels que les dystrophies et les paralysies à la suite d'un AVC ou d'une lésion de la moelle épinière.

Des études ont effectivement démontré que la stimulation induit une augmentation du diamètre des fibres, du volume du muscle, et de la capacité de génération de force, permettant ainsi de **lutter contre l'atrophie et la faiblesse musculaire** [58, 86, 87, 88]. La stimulation électrique entraîne également une transition des fibres rapides en fibres lentes, associée à une amélioration des capacités métaboliques oxydatives, menant à une **meilleure résistance à la fatigue** [86, 88]. L'amélioration de l'endurance pourrait aussi s'expliquer par l'**amélioration de la fonction cardiovasculaire** et de l'augmentation de la densité des vaisseaux sanguins induites par la stimulation, qui augmentent le flux sanguin et les apports en oxygène et substrats métaboliques au muscle [58, 87, 88]. Une stimulation basse fréquence ( $\leq 10\text{-}20$  Hz) serait préférable pour l'augmentation de la résistance à la fatigue et la diminution de l'atrophie, tandis qu'une stimulation à plus haute fréquence ( $\geq 30$  Hz) aggraverait ces phénomènes [87, 89].

Il faut cependant noter que tous ces changements sont **réversibles** : le muscle revient lentement à son état initial (avant stimulation), lorsque la stimulation est interrompue pendant une longue période (plusieurs mois) [28, 87, 89].

## 1.5 Les limites et les enjeux de la stimulation électrique

Malgré les recherches et l'essor commercial de dispositifs de stimulation aidant au traitement de nombreuses maladies et déficiences neurologiques, ces derniers présentent toutefois plusieurs limitations. Ici, nous exposons les limites des systèmes de stimulation actuels, et nous passons en revue les principales stratégies d'améliorations.

### Résolution spatiale et sélectivité limitées de la stimulation

Les systèmes nerveux et musculaires sont des réseaux denses et compacts, impliquant des centaines voire des millions de cellules pour la réalisation d'une tâche spécifique. En regard, et malgré les progrès techniques de microfabrication qui ont permis l'essor d'électrodes de plus en plus petites et denses, la résolution spatiale et la sélectivité de la stimulation électrique restent limitées [90].

La faible densité spatiale des électrodes génère un **contrôle grossier** des fonctions neuromusculaires [90], en ne recrutant qu'un faible nombre de fibres nerveuses ou musculaires. Pour produire des contractions lisses et sans à-coups, le recrutement spatialement fixe et synchrone implique l'utilisation de fréquences de stimulation plus élevées que durant les contractions volontaires [83]. Cela a pour conséquence d'induire une **fatigue prématurée** des fibres musculaires.

La **faible sélectivité** des systèmes de stimulation actuels résulte de la propagation des courants de stimulation sur une "large" zone autour des électrodes. Cela peut engendrer l'activation de plusieurs structures simultanément : neurones excitateurs et inhibiteurs dans le cerveau, voies motrices et sensorielles dans la moelle épinière et les nerfs périphériques [90]. Ce phénomène peut entraîner des **effets secondaires** indésirables, comme des altérations de certaines fonctions cognitives chez des patients atteints de la maladie de Parkinson traitée par stimulation cérébrale profonde [91]. Dans le cas de la restauration des fonctions motrices, la stimulation électrique ne reproduit pas l'ordre de recrutement naturel et active d'abord les fibres musculaires les plus larges et les plus fatigables, aboutissant encore une fois à une **fatigue musculaire prématurée** [83].

### Efficacité limitée de la stimulation en boucle ouverte

La majorité des systèmes de stimulation fonctionne en **boucle ouverte**, c'est-à-dire que les paramètres de stimulation sont pré-programmés par le clinicien et ne s'adaptent pas automatiquement au patient. Ce type de fonctionnement **non adaptatif** engendre plusieurs inconvénients limitant l'efficacité du système et son utilisation à long terme.

L'optimisation du protocole de stimulation peut se révéler très longue puisqu'il n'existe pas de méthode efficace et objective pour déterminer les paramètres optimaux pour chaque patient. Cette procédure d'ajustement peut durer plusieurs mois après l'implantation du stimulateur et des électrodes. Dans le cas des implants cochléaires, les patients doivent suivre des séances d'orthophonie et une période de réapprentissage pendant laquelle le cerveau apprend à interpréter la stimulation électrique spectralement appauvrie [92]. De plus, ces procédures requièrent un retour verbal de la part de l'utilisateur, ce qui peut s'avérer compliqué dans le cas des stimulateurs cochléaires [92].

Le fonctionnement en boucle ouverte ne garantit pas une efficacité sur le long terme, puisque les paramètres de stimulation ne s'adaptent pas à l'état physiologique des tissus. Un exemple typique est celui de la formation de tissus fibrotique autour des électrodes après l'implantation, entraînant une augmentation de l'impédance de l'interface électrode-tissu et par conséquent l'augmentation des seuils de stimulation [49]. Dans le cas de la restauration des fonctions motrices, les systèmes en boucle ouverte ne tiennent pas compte de la **non linéarité** et de la **variabilité** dans le temps de la réponse des muscles à la stimulation (fatigue, effet d'entraînement), ni des perturbations imprévisibles comme les réflexes moteur ou la spasticité (raideur musculaire involontaire) [93]. De plus, le système neuromusculaire est un système extrêmement complexe et couplé, faisant intervenir de nombreux circuits neuronaux interconnectés ayant des rôles spécifiques. Reproduire les mouvements naturels du corps qui impliquent l'utilisation simultanée de plusieurs muscles s'avère alors très complexe.

### Stratégies d'améliorations

Les principales stratégies pour améliorer la sélectivité et le mode de recrutement consistent à **intégrer des principes physiologiques du fonctionnement naturel** dans les protocoles de stimulation [83]. Dans le cas du contrôle moteur, ces principes visent à générer des contractions obéissant au principe de taille d'Henneman et à reproduire les patterns et les fréquences de décharge des unités motrices se produisant lors des contractions volontaires. Pour ce faire, les méthodes employées comprennent l'optimisation du nombre et du positionnement des électrodes, des patterns et des paramètres de stimulation [94]. L'utilisation de plusieurs électrodes de manière asynchrone permet par exemple de reproduire le mode de recrutement naturel (asynchrone, spatialement distribué, à faible taux de décharge), et ainsi de réduire ou retarder l'apparition de la fatigue musculaire [95].

Malgré cela, le protocole de stimulation reste non adaptatif aux perturbations et conditions physiologiques des tissus. C'est pourquoi il y a un intérêt grandissant pour le **contrôle en boucle fermée**, qui nécessite un retour permettant d'évaluer l'efficacité de la stimulation et d'ajuster les paramètres de stimulation. La source de contrôle peut être artificielle ou biologique. Dans le premier cas, le signal provient de capteurs (e.g. capteurs de mouvement, de force), tandis que dans le second cas le signal est issu de l'enregistrement de biopotentiels (i.e. activité électrique des muscles, des nerfs ou du cerveau) [96].

## 1.6 Objectifs de la thèse et environnement du projet

### 1.6.1 Objectifs

La stimulation électrique fonctionnelle étudiée dans cette thèse se concentre sur les troubles neuromusculaires et vise à restaurer la motricité des patients atteints de paralysie. Malgré les progrès technologiques et l'amélioration des connaissances scientifiques du système neuromusculaire, les implants actuels présentent encore plusieurs limitations majeures empêchant leur utilisation chronique. En effet, **la stimulation électrique fonctionnelle ne recrée pas fidèlement le fonctionnement du système neuromusculaire** : en particulier, elle ne respecte pas l'ordre de recrutement naturel des fibres musculaires et active d'abord les fibres les plus larges et les plus fatigables, aboutissant à une **fatigue musculaire prématurée**. Actuellement, la majorité des systèmes de stimulation fonctionne en boucle ouverte : les paramètres de

stimulation sont préprogrammés et ne s'adaptent pas automatiquement à l'état physiologique des muscles stimulés et à leur fatigue. Ce type de fonctionnement non-adaptatif limite l'efficacité du système et son utilisation à long terme.

L'objectif de cette thèse est d'établir un marqueur de la fatigue musculaire induite par stimulation électrique. Ce marqueur se doit d'être **objectif**, évaluant l'état physiologique des tissus musculaires et l'efficacité de la stimulation. Notre choix s'est porté sur la mesure de **bioimpédance** (*Chapitre 2*), qui évalue les propriétés électriques intrinsèques des tissus permettant alors de renseigner sur leur état physiologique. Il s'agit d'une mesure électrique rapide, réalisée par l'intermédiaire d'électrodes, déjà présentes dans les systèmes d'électrostimulation. Afin d'identifier un marqueur de la fatigue musculaire par bioimpédancemétrie, nous avons fait le choix d'utiliser un modèle de muscle squelettique *in vitro*, pour sa simplicité et rapidité de mise en œuvre pour réaliser une preuve de concept. Sachant qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de système *in vitro* permettant la stimulation électrique et le suivi de bioimpédance de cellules musculaires, ces travaux de thèse ont pour but de :

- Développer un modèle *in vitro* de muscle squelettique (*Chapitre 3* et *Chapitre 5*) ;
- Développer l'instrumentation permettant la stimulation électrique et les mesures de bioimpédance (*Chapitre 3*) ;
- Réaliser la preuve de concept de mesure de fatigue par bioimpédancemétrie dans un contexte *in vitro* 2D (*Chapitre 4*).

À partir des résultats obtenus, les objectifs à long terme sont d'abord de réaliser des systèmes pour le suivi physiologique temps réel des tissus stimulés. Ensuite, la validation du marqueur objectif de la fatigue musculaire permettra la réalisation de systèmes en boucle fermée, capables d'adapter les paramètres de stimulation en fonction de la fatigue musculaire. Atteindre ces objectifs permettrait ainsi d'améliorer l'utilisation chronique de neuroprothèses.

### 1.6.2 Environnement du projet

Cette thèse s'inscrit au cœur du projet PRIME80 du CNRS **SMARTSTIM**, qui propose une méthodologie de développement de modèles et systèmes électroniques intégrés, conçus pour la bio-stimulation efficace, adaptée en temps réel grâce à un retour objectif. Le consortium SMARTSTIM rassemble **quatre laboratoires** UMR CNRS autour de cette problématique commune :

- le laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système de Bordeaux (IMS) pour l'intégration bio-électronique et l'expérimentation *in vitro* ;
- le laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microélectronique de Montpellier (LIRMM) pour les circuits intégrés spécifiques et les dispositifs embarqués ;
- le laboratoire Traitement de l'Information et des Systèmes de Cergy-Pontoise (ETIS) pour les architectures numériques ;
- l'Institut Jean Lamour de Nancy (IJL) pour les interfaces biophysiques et la bioimpédancemétrie.

SMARTSTIM s'appuie sur l'expertise de laboratoires INSIS, INS2I et INC dans les sciences de l'ingénieur, les sciences physiques et les sciences de la vie, par une approche de co-conception modèle/matériel/preuve de concept. Les outils matériels et logiciels développés dans SMARTSTIM sont pensés pour être adaptables à de nombreux contextes expérimentaux et sont répliqués dans les quatre laboratoires partenaires, facilitant la fédération de compétences structurantes de notre communauté scientifique.

Le travail de thèse s'est déroulé au sein du groupe Bioélectronique de l'IMS Bordeaux et de l'équipe SmartIES (Smart Integrated Electronic Systems) du LIRMM

Montpellier. L'IJL et ETIS, les autres partenaires de SMARTSIM, sont intervenus ponctuellement en soutien comme on le verra dans la suite du manuscrit.

### Le laboratoire IMS : de l'Intégration du Matériau au Système

L'IMS est une UMR CNRS de l'INSIS, dont les trois tutelles sont l'Université de Bordeaux, Bordeaux INP et le CNRS. Centré sur le domaine des Technologies de l'Information et des Sciences pour l'Ingénieur, le laboratoire IMS adresse au travers de ses groupes de recherche un continuum de la recherche : depuis l'intégration des matériaux en vue du développement de composants dédiés aux systèmes d'information, et jusqu'à l'étude de l'interaction de ces mêmes systèmes avec le monde extérieur.

### Le groupe Bioélectronique

Le groupe BioElectronique de l'IMS s'est formé en 2009 et regroupe environ 25 personnes (dont 15 permanents). Il est structurellement pluridisciplinaire car il regroupe des chercheurs aux compétences initiales en Sciences de l'Ingénieur et Sciences du Vivant. L'interdisciplinarité est au cœur de la recherche du groupe Bioélectronique. Elle s'illustre avec des travaux à l'interface entre la Physique, l'Électronique et la Biologie. En Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes. Les moyens d'étude vont de l'instrumentation physique au calcul embarqué en passant par la conception de circuits et systèmes spécifiques. Aujourd'hui, les activités de recherche du groupe se répartissent sur 3 thématiques : Santé Environnementale, Technologies pour la santé et Intelligence Artificielle Matérielle. Le projet SMARTSTIM relève de la thématique "Technologies pour la santé", qui se focalise sur l'interface bioélectronique sous forme d'électrode ou d'un réseau d'électrodes, en contact avec des cellules ou tissus excitables, c'est-à-dire capables d'une activité électrique propre ou réagissant à une stimulation électrique. Pour étudier cette interface et explorer une question scientifique liée à la santé sont développés des circuits intégrés ou discrets, ainsi que des protocoles et modèles biologiques traitant des tissus neuronaux, musculaires ou cellules pancréatiques.

Cette thèse est le premier projet du groupe BioElectronique consacré à l'étude des tissus musculaires. Toutefois, d'autres projets ont permis d'acquérir une expertise certaine sur la stimulation des tissus, ainsi que sur la caractérisation par bioimpédance : stimulation DBS *in vivo* sur des modèles de souris Parkinson [97], stimulation adaptative *in vivo* des muscles du diaphragme sur rat anesthésié [98], spectroscopie d'impédance *in vitro* et *ex vivo* pour évaluer les phénomènes de fibrose dans les tissus cardiaques [99, 100]. Un stimulateur électronique multi-applications a été récemment développé : capable de délivrer des formes d'onde arbitraires produites en temps réel sur des tissus ou cellules *in vitro* ou *in vivo*, il permet aussi la mesure de bioimpédance et est exploité pour étudier la neurostimulation sélective et adaptative [101, 102].

L'originalité du groupe Bioélectronique de l'IMS réside en partie dans les moyens d'innovation en Biologie qu'il détient, rassemblés dans sa **Plateforme du Vivant**. La plateforme du Vivant entretient des activités autour des études en biologie, de la molécule au petit animal, et à l'interface de l'électronique (bioélectronique) et de la physique (bioélectromagnétisme). Elle est située dans les locaux de l'IMS et au cœur du groupe Bioélectronique, favorisant des échanges réguliers et des collaborations locales (et externes) transverses. Portée par une ingénieure de recherche en biologie, la plateforme du vivant met à disposition de ses collaborateurs des savoirs et équipements spécialisés en biologie cellulaire et moléculaire. Particulièrement dans le cadre de cette thèse, elle a pu donner une expertise et un accès régulier aux équipements suivants :

- Matrices de Microélectrodes (MEA) ;

- Autoclaves ;
- Hottes à flux laminaires ;
- Incubateurs CO<sub>2</sub> ;
- Microscopes : contraste de phase, confocal.

### **Le laboratoire LIRMM : Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microélectronique de Montpellier**

Le LIRMM est une UMR CNRS de l'INS2I, dont les tutelles sont l'Université de Montpellier et le CNRS. Au sein du LIRMM, l'équipe SmartIES est une équipe d'une trentaine de chercheurs dont les activités sont centrées sur les méthodes de conception et la modélisation de dispositifs, systèmes et circuits intégrés conçus en technologie CMOS, à l'aide de technologies émergentes (CNT, CNTFET, MRAM, ...), selon des approches de conception alternatives (3D, adiabatique, etc.).

L'ensemble de ces travaux visent à développer des systèmes et circuits intégrés offrant de hautes performances et une consommation d'énergie réduite, mais également des circuits adaptatifs à leur état de fonctionnement et à l'environnement de sorte à garantir la fonctionnalité, la sûreté et la sécurité des informations traitées ou bien satisfaire des contraintes applicatives spécifiques.

Dans cette démarche SmartIES se caractérise par sa volonté de conduire les approches théoriques jusqu'à des démonstrateurs expérimentaux ou des bancs de mesure. Au cours des cinq dernières années, on peut noter de nombreux travaux ayant contribué à des réalisations matérielles (ASIC, plateformes expérimentales dédiées, prototypes matériels et/ou logiciels) et conduit à des transferts technologiques.

L'équipe SmartIES travaille depuis 2002 sur la stimulation électrique fonctionnelle et plus particulièrement les circuits intégrés de stimulation électrique. Elle développe des architectures permettant d'assurer la bonne répartition et le contrôle des courants de stimulation vers les différents pôles des électrodes de stimulation. D'autre part, depuis une dizaine d'années, l'équipe développe aussi des circuits de spectroscopie de bioimpédance qui permettent d'effectuer des mesures ultra rapides sur une large plage de fréquence (typiquement du Hz au MHz). Les résultats de ce travail de thèse auront un apport significatif sur les futurs développements sur ces sujets.

## Chapitre 2

# La bioimpédance comme marqueur de la fatigue musculaire

Dans le *Chapitre 1*, nous avons exposé le principe et les applications de la stimulation électrique, et plus particulièrement celles permettant la restauration de la motricité chez les personnes atteintes de paralysies.

La stimulation électrique recrute les fibres dans l'ordre inverse de celui du fonctionnement naturel : les fibres rapides sont recrutées en premier lieu, car elles ont un seuil de déclenchement par stimulation externe plus bas. Or, ce sont également les fibres les plus fatigables, qui sont naturellement recrutées qu'en cas de nécessité de fournir un effort très intense et bref. Le mode de recrutement par stimulation électrique induit alors une fatigue musculaire plus rapide et plus intense que lors d'une activité musculaire volontaire naturelle.

Pour minimiser la fatigue et retarder son apparition, une solution consiste à développer des systèmes de stimulation avec une régulation en boucle fermée, afin d'adapter les paramètres de stimulation en fonction de l'état physiologique du muscle et de son degré de fatigue. Afin de choisir une méthode de mesure objective de la fatigue musculaire, il est nécessaire de définir précisément ce qu'est la fatigue musculaire, comment elle se manifeste et quels sont les mécanismes physiologiques mis en jeu.

La première section de ce chapitre détaille les notions de physiologie neuromusculaire en lien avec la fatigue, pour ensuite exposer et comparer les différentes méthodes existantes de mesure de la fatigue. La seconde section introduit la méthode de mesure choisie dans le cadre de cette thèse et les concepts physiques associés.

## 2.1 Comment évaluer la fatigue musculaire ?

### 2.1.1 Définition de la fatigue

La fatigue musculaire est un **phénomène complexe, multifactoriel et dynamique**. Elle est généralement définie comme la diminution de la production de force ou de puissance en réponse à une activité musculaire [103]. Elle est étudiée depuis plus d'un siècle, mais la complexité du phénomène rend difficile l'établissement d'un consensus pour le décrire précisément, ce qui a conduit à faire évoluer sa définition au cours des années.

Dans les années 1980, la fatigue était initialement définie comme l'incapacité d'un muscle ou d'un groupe de muscles à maintenir la force requise ou attendue [104]. Cette définition sous-entendait que la fatigue n'apparaît qu'après une période d'exercice prolongée, or il a été prouvé que des événements physiologiques apparaissent dès le début de l'exercice [105]. Une décennie plus tard, la fatigue désigne alors une altération aiguë de la performance impliquant une augmentation de l'effort requis pour produire

une force désirée et finalement l'incapacité de produire cette force [106]. Cette définition met en lumière la **distinction** entre la **fatigue** et l'**épuisement** menant à l'arrêt de la tâche.

On définit le temps d'endurance comme la durée pendant laquelle il est possible de produire et de maintenir une force donnée [105]. Ce concept est illustré en *Figure 2.1*. Le temps d'endurance dépend de trois facteurs : la force requise, la force maximale que peut produire le muscle et la fatigabilité intrinsèque du muscle [107]. L'augmentation et la diminution de la force générée engendrent un épuisement plus ou moins rapide. La force de contraction maximale d'un muscle diminue progressivement dès le début de l'exercice, réduisant ainsi le temps d'endurance. A la fin de ce temps d'endurance commence la phase d'épuisement, se traduisant par l'incapacité à produire la force requise, menant finalement à l'arrêt de la tâche.

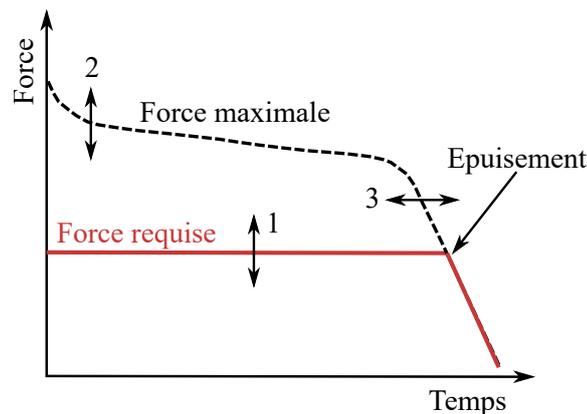


FIGURE 2.1 – Facteurs menant à l'épuisement : (1) variations de la force requise, (2) variations de la force maximale, (3) fatigabilité intrinsèque du muscle (adaptée de [107]).

Finalement, la définition actuelle décrit la fatigue musculaire comme un **phénomène réversible**, caractérisé par toute **diminution de la performance** d'un muscle associée à l'activité musculaire [107]. Le déclin des performances musculaires se manifeste par [103, 105, 107] :

- une **baisse de la force** produite par une secousse et de la force maximale (tétanos) ;
- un **allongement des temps de contraction et de relaxation** et par conséquent la diminution des vitesses contraction et de relaxation.

Finalement, l'ensemble de ces altérations modifie la relation entre la force produite et la fréquence de stimulation, comme illustré en *Figure 2.2*.

La fatigue est une série d'adaptations se produisant dès le début de l'exercice afin de maintenir le plus longtemps possible le niveau de performance initial. Par exemple, la diminution des vitesses de contraction et de relaxation produisent des contractions plus longues et donc une fusion des contractions à une fréquence plus faible (*Figure 2.2*). La baisse de la fréquence de fusion permet de produire davantage de force à des fréquences plus faibles, ayant alors un effet de préservation de la force [107]. La fatigue musculaire peut alors être considérée comme un **mécanisme adaptatif et de protection** afin de limiter l'activité musculaire et éviter des dommages irréversibles des tissus musculaires.

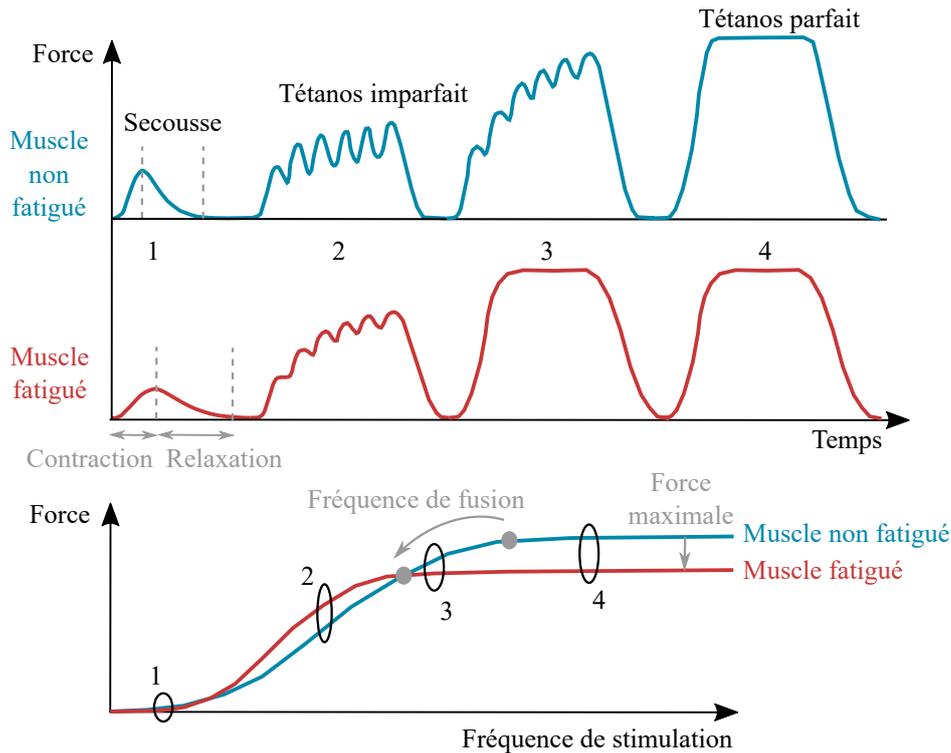


FIGURE 2.2 – Illustration des manifestations de la fatigue : baisse de la force développée lors d’une secousse et d’une contraction téтанique parfaite, allongement des temps de contraction et de relaxation, et baisse des vitesses de contraction et de relaxation, entraînant une modification de la relation force-fréquence.

### 2.1.2 Mécanismes impliqués dans le développement de la fatigue lors de contractions volontaires

La contraction musculaire met en jeu plusieurs structures et résulte de nombreux mécanismes physiologiques. Le phénomène de fatigue peut provenir de n’importe quel site dans la chaîne de commande du système moteur, partant du cortex moteur jusqu’au muscle en passant par la moelle épinière, les motoneurons et finalement la fibre musculaire. L’ensemble des origines possibles entraînant l’apparition de la fatigue sont illustrées en *Figure 2.3*. On distingue la **fatigue centrale** (*Figure 2.3*, sites 1-3), qui rassemble les mécanismes survenant au sein du système nerveux, et la **fatigue périphérique** (*Figure 2.3*, sites 4-9) qui concerne les mécanismes au sein des muscles à partir de la jonction neuromusculaire. Ainsi, la fatigue centrale est associée à une réduction de la capacité du système nerveux à activer les muscles, tandis que la fatigue périphérique se caractérise par des altérations de la fonction musculaire. Les neurones sensoriels ont aussi un rôle dans l’apparition de la fatigue musculaire, ce qui rend la distinction entre la fatigue centrale et périphérique plus complexe.

#### 2.1.2.1 La fatigue centrale

La fatigue centrale comprend l’ensemble des altérations survenant lors la génération de la commande motrice et le recrutement des unités motrices, au **niveau cortical et spinal**.

Le recrutement des unités motrices est contrôlé par le système nerveux central par le biais de diverses voies excitatrices et inhibitrices. Lors de contractions fatigantes, l’ordre de recrutement des unités motrices est inchangé [109]. Elles sont recrutées par

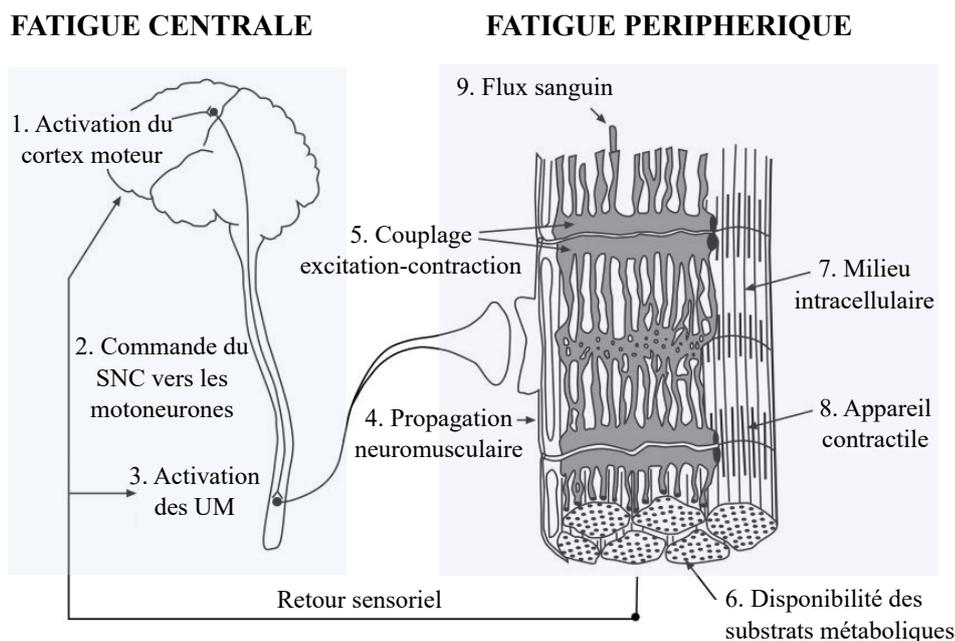


FIGURE 2.3 – Sites potentiels de la fatigue neuromusculaire : la fatigue centrale est associée aux altérations des sites 1-3, et la fatigue périphérique aux altérations des sites 4-9. Adaptée de [108].

ordre de taille des motoneurones, et une rotation s'effectue pour activer de nouvelles unités motrices et en désactiver d'autres, qui peuvent être à nouveau recrutées plus tard. Cependant, il a été observé que la fréquence de stimulation (ou fréquence de décharge) des unités motrices décroît avec la fatigue [109]. Cette réduction peut être due à un **déclin de l'activité corticale**, une **diminution de l'excitabilité des motoneurones**, ou des **mécanismes inhibiteurs des retours sensoriels**. Après une contraction fatigante, l'excitabilité du cortex peut en effet être réduite [103]. En parallèle, l'excitabilité des motoneurones peut être impactée par un changement de leurs propriétés intrinsèques ou sous l'effet de neurotransmetteurs comme la sérotonine [109]. Enfin, les neurones sensoriels des muscles peuvent entraîner une réduction de la fréquence de décharge des unités motrices par l'inhibition directe des motoneurones au niveau spinal, ou par des effets supraspinaux qui réduisent la commande motrice descendante.

### 2.1.2.2 La fatigue périphérique

**Au-delà de la jonction neuromusculaire**, de nombreux mécanismes contribuent à l'altération de la fonction musculaire et au développement de la fatigue. Ils regroupent les altérations pouvant survenir lors de la transmission neuromusculaire, de la propagation des potentiels d'actions musculaires, du couplage excitation-contraction et des mécanismes contractiles associés [110]. Nous exposons ici les principales causes à l'origine de ces altérations. Il faut cependant noter que les mécanismes impliqués dans la fatigue périphérique sont fortement variables et dépendants des conditions expérimentales et des modèles biologiques étudiés (*in vivo* ou *in vitro*), rendant difficile d'affirmer avec certitude l'apparition ou la prédominance d'un mécanisme sur un autre.

La **transmission neuromusculaire**, c'est-à-dire la conversion d'un potentiel d'action nerveux en potentiel d'action musculaire, peut être altérée par : une propagation

du potentiel nerveux insuffisante au niveau des terminaisons axonales, une réduction de la quantité de neurotransmetteurs disponibles ou libérés, ou une diminution de la sensibilité des récepteurs post-synaptiques à l'acétylcholine [110]. L'**excitabilité de la membrane** des fibres musculaires peut être réduite dans le cas de contractions intenses ou de longue durée [107]. Cette perte d'excitabilité est provoquée par une activité insuffisante des pompes ioniques  $Na^+-K^+$ , ne pouvant plus restaurer les gradients électrochimiques, entraînant une accumulation d'ions potassium extracellulaire et la dépolarisation de la membrane. Cependant, dans les conditions physiologiques *in vivo*, des mécanismes compensent ce phénomène, dont la conductance élevée de l'ion chlorure [107].

Au niveau intracellulaire, le **couplage excitation-contraction** peut être perturbé par une réduction des interactions entre les myofilaments d'actine et de myosine ou encore par une altération de la dynamique du calcium, en raison d'une déplétion en substrats métaboliques ou d'une accumulation de métabolites. Les altérations au sein du couplage excitation-contraction et leurs effets sur la force musculaire produite sont illustrés en *Figure 2.4*.

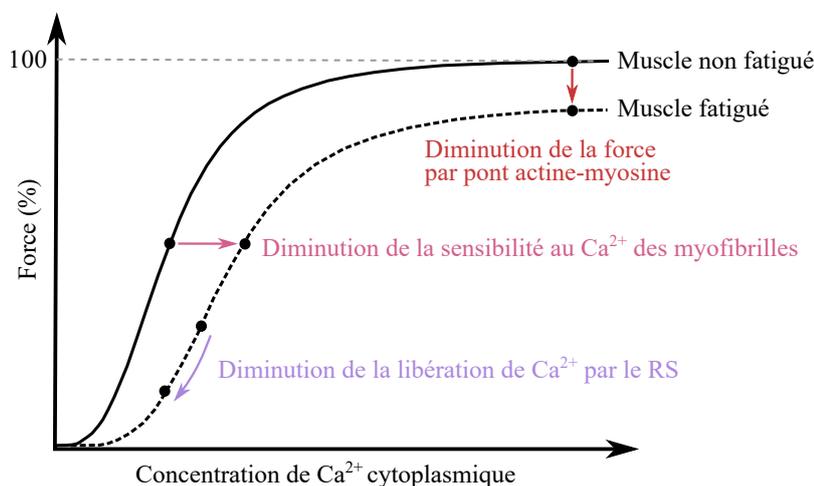


FIGURE 2.4 – Relation entre la concentration de calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique (RS) et la force produite par un muscle non fatigué et par un muscle fatigué. Au cours de la fatigue, la force développée peut diminuer en raison d'une diminution de la force maximale produite par chaque pont d'actine-myosine, d'une diminution de la sensibilité au calcium des myofibrilles, et/ou d'une diminution de la quantité de calcium libéré par le RS (Figure adaptée de [111]).

Les processus à l'origine de la contraction musculaire consomment de l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP, qui est produit par différentes voies métaboliques à partir des molécules de glucose et de glycogène (*c.f. Section 1.4.1.2*). Les **déplétions des substrats métaboliques** réduisent l'activité des pompes ioniques du réticulum sarcoplasmique et la formation des ponts actine-myosine, les deux principales sources d'hydrolyse de l'ATP. Cela peut entraîner une baisse de la libération ou de la recapture de calcium libéré par le réticulum sarcoplasmique, pouvant se traduire par une réduction de la force développée et une réduction des vitesses de contraction et de relaxation [107].

L'**accumulation de métabolites** dans le cytoplasme peut aussi fortement affecter le couplage excitation-contraction. La dégradation du glycogène conduit à la formation de lactate et des ions hydrogènes ( $H^+$ ), et l'hydrolyse de l'ATP produit des phosphates inorganiques (Pi). L'accumulation de Pi entraîne leur entrée dans le

réticulum sarcoplasmique et leur liaison avec des ions  $Ca^{2+}$ , réduisant la quantité de  $Ca^{2+}$  libre nécessaire à la formation des ponts actine-myosine [107]. Le Pi et les ions  $H^+$  inhibent aussi directement les interactions entre les myofilaments et une sensibilité réduite au calcium, provoquant une baisse de la force générée par les ponts et leur vitesse d'attachement et de détachement [103]. De plus, le métabolisme oxydatif mène à la formation d'espèces oxygénées réactives (*reactive oxygen species*, ROS) ayant un rôle important dans la fatigue musculaire par l'oxydation de protéines essentielles (pompe  $Na^+-K^+$ , myofilaments, DHPR, RyR1) [103].

Enfin, le **flux sanguin** joue également un rôle dans l'établissement de la fatigue. Lors d'une activité physique, le flux sanguin augmente pour apporter des substrats aux muscles et évacuer les métabolites. Cependant, la contraction engendre une compression des vaisseaux, diminuant l'apport sanguin et d'oxygène, ce qui provoque alors une accumulation plus rapide des métabolites et accélère le processus de fatigue [110].

En parallèle de ces divers mécanismes, apparaît également le phénomène de **potentiation**. La potentiation se manifeste par une amélioration des propriétés contractiles du muscle, à savoir une augmentation de la force développée lors d'une secousse, après une brève activité musculaire volontaire ou induite [112]. Cela s'expliquerait par une phosphorylation (ajout d'un groupe phosphate) de la chaîne de myosine, entraînant une sensibilité accrue des myofilaments au calcium et par conséquent une meilleure efficacité des cycles d'attachement et de détachement des ponts actine-myosine en termes de force développée, et de rapidité d'attachement et de détachement [112]. Ce phénomène induit l'effet inverse de celui de la fatigue (direction opposée à celle de la flèche rose dans la *Figure 2.4*), et peut coexister avec la fatigue.

### 2.1.3 Mécanismes de la fatigue induite par stimulation électrique

#### 2.1.3.1 Sollicitations physiologiques et métaboliques

En raison de la différence de mode de recrutement par rapport aux contractions volontaires, les contractions électriquement induites (*c.f. Section 1.4.2.1*) entraînent des sollicitations métaboliques et physiologiques plus importantes.

En effet, à force ou puissance développée égale, une session de stimulation électrique induit une plus forte augmentation du rythme cardiaque, de la consommation d'oxygène et du quotient respiratoire (ratio du volume de dioxyde de carbone expiré sur le volume d'oxygène consommé), et une baisse plus importante de la force que lors d'une séance de contractions volontaires [113, 114].

Toujours à force ou puissance égale, la stimulation électrique conduit à un stress métabolique plus important, se traduisant par une diminution du pH intramusculaire et de la concentration de substrats métaboliques (phosphocréatine, glycogène) et par une augmentation de la concentration en lactate et en ammoniac dans le sang [113, 115]. De plus, à consommation d'oxygène égale, la production de lactate, l'absorption de glucose et le quotient respiratoire sont bien plus importants lors de contractions électriquement induites que lors de contractions volontaires [116]. Ces phénomènes sont associés au métabolisme anaérobie, caractéristique des fibres de type II (rapides).

Finalement, un protocole de stimulation électrique **sollicite** davantage le **système cardiorespiratoire**, induit un **stress métabolique** plus important et une **fatigue musculaire précoce** et plus prononcée.

### 2.1.3.2 Mécanismes de la fatigue électriquement induite

#### Cas du muscle sain

Étant donné que la stimulation électrique est généralement appliquée aux nerfs périphériques ou aux muscles, la fatigue induite par stimulation est souvent attribuée à des mécanismes périphériques [83]. Pourtant, le mode de recrutement par stimulation électrique est non sélectif, pouvant alors entraîner l'activation des fibres nerveuses sensitives et induire des effets aux niveaux spinal et cortical.

Une équipe a étudié le développement de la fatigue du triceps sural (mollet) en réponse à un protocole de stimulation à 30 Hz [117]. Pour cela, ils ont évalué l'excitabilité musculaire et spinale, les propriétés contractiles (en réponse à un stimulus supramaximal) et la force maximale volontaire (FMV) avant et après le protocole. Ils ont observé une baisse de la FMV après la session de stimulation, tandis que les excitabilités musculaire et spinale et les propriétés contractiles étaient préservées. Ils ont donc mis en évidence une **origine supraspinale** de la fatigue et ont émis l'hypothèse qu'elle résulte de l'activation des fibres afférentes, qui aurait altéré les circuits générant la commande corticale motrice descendant vers les motoneurones.

Cette même équipe a reproduit le même protocole de stimulation sur l'abductor pollicis brevis (pouce), qui est un muscle bien plus petit, moins puissant et moins résistant à la fatigue que le triceps sural [118]. Dans cette étude, ils ont également constaté une baisse de la FMV et la préservation de l'excitabilité des motoneurones après la session de stimulation. En revanche, la commande corticale était inchangée et l'excitabilité musculaire réduite, démontrant une **origine périphérique** de la fatigue. Il faut cependant noter que, malgré l'utilisation d'un même protocole de stimulation dans les 2 études, la force musculaire développée dans la première [117] était supérieure à celle développée dans la seconde [118], pouvant expliquer les différents mécanismes de fatigue mis en jeu.

Pour résumer, chez un sujet sain, la stimulation électrique sollicite l'ensemble du système neuromusculaire et la fatigue induite peut avoir des **origines centrale ou périphérique**. Ces mécanismes ne dépendent pas seulement du protocole de stimulation, mais aussi du muscle stimulé (fatigabilité, contribution des retours sensoriels).

#### Cas du muscle paralysé

La paralysie peut survenir à la suite d'une lésion médullaire, d'un AVC ou encore de maladies neurodégénératives, et induit une atrophie musculaire, une conversion des fibres lentes en fibres rapides, une baisse de la force maximale et de la résistance à la fatigue. Les personnes atteintes de paralysie sont donc particulièrement sujettes au développement rapide et marqué de la fatigue musculaire. Son développement est très étudié chez les blessés médullaires, dont la lésion est dite complète en l'absence totale de sensibilité et de motricité, ou incomplète en cas de persistance partielle des fonctions sensorielles et motrices. Malgré l'absence de connexion avec les centres corticaux, les circuits spinaux sous la lésion restent fonctionnels, suggérant que la fatigue musculaire électriquement induite peut provenir de mécanismes périphériques ou spinaux.

Une étude a exploré les effets de la stimulation électrique du nerf médian (main) sur l'excitabilité des motoneurones, sur un groupe de blessés médullaires et un groupe contrôle [119]. Après le protocole de stimulation<sup>1</sup>, l'excitabilité spinale a diminué de façon similaire dans les 2 groupes, alors que la force développée par les muscles paralysés a chuté à 38% de la force initiale contre 85% de la force initiale pour le

1. Train continu, pendant 90 s, d'impulsions de 250  $\mu$ s, 18 Hz, d'intensité supramaximale

groupe contrôle. L'étude montre donc que l'**excitabilité spinale** peut être affectée par la stimulation électrique, mais n'est pas le mécanisme principal à l'origine de la fatigue induite au sein des muscles paralysés.

Pour mieux élucider les mécanismes mis en jeu, une équipe a évalué les excitabilités spinale et musculaire et les propriétés contractiles, avant et après un protocole de stimulation<sup>2</sup> appliqué au nerf tibial contrôlant le triceps sural, chez des personnes atteintes de lésion complète [120]. La session de stimulation a provoqué un développement rapide de la fatigue associé à une altération des propriétés contractiles du muscle (baisse de la force développée et des vitesses de contraction et de relaxation), sans diminution des excitabilités musculaire et spinale. Cela suggère donc une origine périphérique, et plus particulièrement une **altération du couplage excitation-contraction** et de la capacité de génération de force des ponts actine-myosine.

Enfin, une étude plus ancienne avait exploré le lien entre la fatigue induite par la stimulation<sup>3</sup> électrique de quadriceps paralysés et le signal électromyographique (EMG), reflétant l'**excitabilité musculaire** et le nombre d'unités motrices recrutées. Les résultats ont montré une forte corrélation entre la diminution de la force développée et de l'amplitude du signal d'EMG [121].

En résumé, bien que les différentes expérimentations mettent en évidence différents mécanismes à l'origine de la fatigue électriquement induite chez le muscle paralysé, celle-ci semblent avoir une **origine principalement périphérique** [119, 120, 121].

### 2.1.3.3 Influence des paramètres de stimulation

Les mécanismes à l'origine de la fatigue varient selon le muscle stimulé, mais également selon les protocoles de stimulation utilisés.

Plusieurs travaux ont comparé les effets des paramètres de stimulation sur le développement de la fatigue musculaire. Par exemple, une équipe a élaboré plusieurs protocoles de stimulation pour évaluer séparément les effets du niveau d'activation (60% vs 80% du courant maximal toléré), de la fréquence (20 Hz vs 80 Hz) et de la durée des impulsions (150  $\mu$ s vs 400  $\mu$ s) [122]. Pour chaque protocole, ils ont mesuré la force au cours du temps et le nombre de contractions dont la force était supérieure à 50% de la force initiale. Leurs résultats montrent que les **protocoles à haute fréquence** (80 Hz) **induisent une fatigue bien plus rapide et marquée** que tous les autres protocoles, se traduisant par une diminution plus rapide et plus importante de la force musculaire. Une étude similaire compare également les effets des 3 paramètres de stimulation (45% vs 75% de la force maximale, 25 Hz vs 100 Hz et 150  $\mu$ s vs 450  $\mu$ s) [123]. Les deux études tirent la même conclusion : augmenter la fréquence de stimulation induit un développement plus rapide et marqué de la fatigue musculaire tandis que l'augmentation de l'amplitude de courant ou de la durée des impulsions a peu d'impact.

De manière générale, les recherches semblent montrer que pour des fréquences de stimulation élevées (> 30 Hz), la fatigue musculaire résulte principalement d'une altération de la transmission et de la propagation neuromusculaire pouvant provenir d'une défaillance de conduction des axones, d'une réduction de la quantité de neurotransmetteur libéré, ou encore d'une diminution de l'excitabilité des fibres musculaires [89, 124, 125]. À des fréquences plus faibles, l'excitabilité musculaire ne semble pas

2. Stimulation intermittente comprenant 3 séries de 5 trains (2 s on, 2 s off) d'impulsions biphasiques de 450  $\mu$ s, 30 Hz, d'intensité permettant de générer 50% de la force maximale

3. Train continu d'impulsions monophasiques, de durée de 250  $\mu$ s, à 20 Hz, d'amplitude 120 mA produisant la force maximale

altérée et la fatigue est associée à des changements métaboliques ou des altérations du couplage excitation-contraction [89, 124, 125].

#### 2.1.4 Méthodes de mesure de la fatigue musculaire

La fatigue musculaire provient d'une multitude de mécanismes et induit une gamme d'altérations (physiologiques, métaboliques, mécaniques et électriques), donnant la possibilité d'évaluer la fatigue musculaire par différentes méthodes.

##### Mesures physiologiques et métaboliques

L'exercice physique induit non seulement une fatigue des muscles activés, mais également une fatigue globale de l'organisme qui peut être mesurée par des **paramètres physiologiques** [89]. Ils incluent le rythme cardiaque, la consommation d'oxygène, la pression et le flux sanguin, qui augmentent avec l'intensité de l'exercice [126, 127].

Il est également possible d'étudier la fatigue d'un point de vue métabolique. Des données biochimiques liées au **métabolisme musculaire** peuvent être obtenues de manière invasive par biopsie, ou non invasive grâce à la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire [89]. Elles permettent de déterminer les concentrations de composés utilisés ou issus de différentes voies métaboliques tels que l'ATP, la phosphocréatine (PCr), les sucres (glucose, glycogène) ou encore le lactate. Certains composés comme le glucose et le lactate peuvent aussi être dosés par l'intermédiaire de biocapteurs portables et non invasifs [128]. Néanmoins, la fatigue musculaire est causée par une multitude de mécanismes, et il n'existe alors pas de biomarqueur unique pour l'évaluer [129].

Finalement, ces 2 méthodes sont peu utilisées, car il n'existe **pas de marqueur** physiologique ou métabolique **unique** permettant d'évaluer la fatigue : le marqueur dépend du type et de l'intensité de l'exercice, mais également de l'individu (âge, genre, condition physique).

##### Mesures mécaniques

Les mesures mécaniques permettent d'évaluer les **propriétés contractiles** du muscle, à savoir la force développée, les temps et vitesses de contraction et de relaxation. Ces mesures sont généralement réalisées en clinique par l'intermédiaire de machines spécifiques (dynamomètre, ergomètre, tapis roulant non motorisé), selon le mode de contraction [89] :

- contraction isométrique, le muscle et l'articulation sont fixés dans une position, la longueur du muscle est constante, la force ou le couple développé par le muscle pendant la contraction sont mesurés ;
- contraction isotonique, le muscle se contracte en produisant un couple constant, et la vitesse angulaire est mesurée. Elle peut être concentrique (raccourcissement) ou excentrique (allongement) ;
- contraction isocinétique, la vitesse angulaire est constante et le couple est mesuré.

L'activité mécanique du muscle peut également être évaluée par mécanomyographie (MMG), qui consiste à mesurer les vibrations musculaires par l'intermédiaire d'un accéléromètre placé sur le muscle [130]. Le signal MMG provient de l'activité mécanique des unités motrices activées, reflétant à la fois le niveau de recrutement et leurs propriétés contractiles. Avec le développement de la fatigue, le nombre de fibres activées



FIGURE 2.5 – Exemples d'utilisations d'un dynamomètre isocinétique (Biodex System 4<sup>4</sup>) pour la mesure de couple généré lors de mouvements de la cheville ou de la flexion du genou.

et la force développée diminuent, se traduisant par une diminution de l'amplitude crête à crête du signal MMG [131].

### Mesures électriques

La mesure de l'activité électrique musculaire (**électromyographie**, EMG) est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'étude de la fatigue musculaire. Elle évalue l'excitabilité musculaire par la mesure des potentiels d'action produits par les unités motrices qui se contractent. Elle peut être réalisée de manière non invasive avec des électrodes de surface, ou invasive en utilisant des électrodes intramusculaires.

Lors d'une contraction volontaire, le signal EMG est un signal composite complexe en raison du recrutement asynchrone des unités motrices, tandis que lors d'une contraction électriquement induite, le signal résultant est un potentiel d'action musculaire composé. Il s'agit de la somme des potentiels d'action découlant de l'activation synchrone de plusieurs unités motrices, appelé l'**onde M**. L'analyse de l'amplitude du signal permet de quantifier le nombre d'unités motrice recrutées. Avec l'apparition de la fatigue, ce nombre diminue et entraîne par conséquent une baisse de l'amplitude maximale du signal [132]. La vitesse de conduction des fibres musculaires peut également être affectée par la fatigue, se traduisant par un allongement de la durée de l'onde M, et de la compression de son spectre fréquentiel vers des fréquences plus basses [132, 133]. Ainsi, les quatre paramètres les plus couramment utilisés pour quantifier la fatigue sont : la valeur absolue moyenne ou la valeur moyenne quadratique dans le domaine temporel, la fréquence moyenne ou la fréquence médiane dans le domaine fréquentiel [134]. Pour plus de précision, elle est évaluée par une analyse conjointe du spectre et de l'amplitude avec l'utilisation de transformées de Fourier à court terme ou les transformées en ondelettes [134, 135].

### Application pour des systèmes en boucle fermée

La réponse mécanique du muscle à la stimulation électrique est variable à cause des effets d'entraînement et de la fatigue, c'est pourquoi il y a un intérêt croissant pour les **systèmes en boucle fermée** dont les paramètres de stimulation s'adaptent à ces phénomènes. Nous avons vu précédemment que la fatigue se traduit par diverses altérations physiologiques, métaboliques, mécaniques et électriques. Puisqu'il n'existe

4. Photographies issues de <https://www.biodex.com/physical-medicine/products/dynamometers/system-4-quick-set>

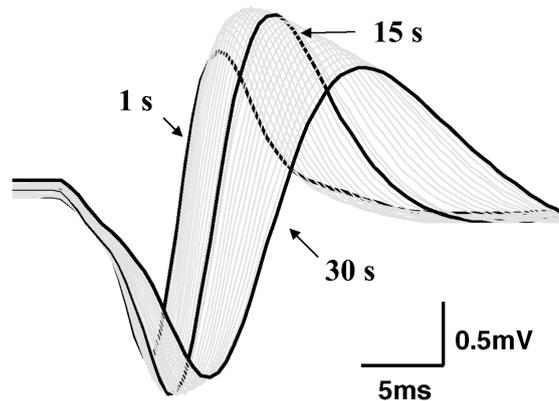


FIGURE 2.6 – Évolution de l'onde M sur 30 s de stimulation à 30 Hz du muscle biceps brachial. Adaptée de [133].

pas de biomarqueur unique, les méthodes de mesure physiologique et métabolique ne sont pas utilisées pour la régulation en boucle fermée. Les recherches actuelles se concentrent donc sur les mesures mécaniques et électriques.

Les mesures mécaniques évaluent les propriétés contractiles du muscle et fournissent alors une mesure directe de la fatigue. Cependant, les capteurs de force (ou de couple) les plus fiables et les plus utilisés ne sont pas adaptés à la vie quotidienne des patients. Le développement de la mécanomyographie est une piste de réponse à ce problème en reposant sur l'utilisation de capteurs miniatures et portables. Cette méthode de mesure est relativement récente, et nécessite des recherches plus approfondies avant d'envisager son utilisation en tant que retour objectif de la fatigue musculaire [136].

La méthode de mesure de la fatigue la plus répandue est celle reposant sur l'analyse du signal EMG (onde M). Les paramètres de l'onde M permettent non seulement d'évaluer le taux d'activation et l'excitabilité des unités motrices, mais semblent également corrélés au couple développée par le muscle [137]. Malgré cela, nous avons vu que la fatigue peut se manifester par une altération des propriétés contractiles du muscle, sans modification significative de l'onde M. L'utilisation simultanée des signaux MMG et EMG pourrait résoudre ce problème, mais nécessite davantage de matériels et de traitement de signal. Le signal EMG est sensible aux sources de bruit et notamment aux artefacts de stimulation, pouvant perturber la mesure.

Une nouvelle méthode d'évaluation de l'activité musculaire se développe depuis plusieurs années. Il s'agit de la **bioimpédance**, qui évalue les propriétés électriques passives des tissus (conductivité, permittivité).

## 2.2 Bioimpédance : un marqueur électrique de l'état des tissus

La bioimpédance rassemble les **propriétés électriques passives** des tissus biologiques, en opposition aux propriétés électriques actives des cellules excitables décrites dans le *Chapitre 1*. Cette section définit la notion d'impédance et les propriétés électriques associées pour ensuite décrire les propriétés électriques passives des milieux et tissus biologiques et les modèles électriques associés. Les méthodes de mesure et les applications de la bioimpédance sont également passées en revue.

### 2.2.1 Définitions générales

L'**impédance électrique** est définie comme la capacité d'un système à s'opposer au passage d'un courant électrique lorsqu'une différence de potentiel lui est appliquée [138]. Ce terme provient du verbe anglais "to impede" signifiant "faire obstacle à". L'inverse de l'impédance est appelée admittance et est notée  $Y$ . L'impédance est définie, par la loi d'Ohm, comme le rapport entre la tension appliquée et le courant électrique résultant dans un système linéaire à :

$$\underline{Z} = \frac{\underline{U}}{\underline{I}} \quad \text{et} \quad \underline{Y} = \frac{1}{\underline{Z}} \quad (2.1)$$

avec  $\underline{Z}$ ,  $\underline{U}$ ,  $\underline{I}$  représentant respectivement l'impédance, la tension et le courant sous forme complexe. Il est possible d'exprimer l'impédance sous forme complexe, avec  $U_0$  et  $I_0$  les modules de  $\underline{U}$  et  $\underline{I}$ , et  $\varphi$  le déphasage entre les deux grandeurs électriques :

$$\begin{aligned} \underline{Z} &= \frac{U_0}{I_0} e^{j\varphi} = \frac{U_0}{I_0} (\cos\varphi + j\sin\varphi) \\ \underline{Z} &= R + jX \end{aligned} \quad (2.2)$$

La résistance  $R$  correspond à la partie réelle de l'impédance, et la réactance  $X$  à sa partie imaginaire. La réactance donne une indication sur le comportement du système : il est purement résistif si elle est nulle, inductif si elle est positive, et capacitif si elle est négative.

L'impédance d'un matériau est liée à ses propriétés intrinsèques, à savoir sa **conductivité** et sa **permittivité**.

#### Cas d'un matériau conducteur

Un matériau **conducteur** est caractérisé par sa capacité à conduire un courant électrique (conductivité  $\sigma$ , en  $S/m$ ), ou à l'inverse sa capacité à s'opposer à la circulation du courant électrique (résistivité  $\rho$ , en  $\Omega.m$ ). Si l'on considère un échantillon homogène purement conducteur de longueur  $e$ , en contact avec deux électrodes de surface  $S$  (*Figure 2.7*), le lien entre sa conductivité et la résistance ( $\Omega$ ) mesurée est donnée par [48] :

$$R = \rho \frac{e}{S} = \frac{1}{\sigma} \frac{e}{S} \quad (2.3)$$

#### Cas d'un matériau diélectrique

Etymologiquement, un **diélectrique** est un matériau qu'un champ électrique pénètre (le grec "dia" signifiant "à travers") [138]. Une substance sans charges libres est considérée comme un diélectrique parfait, ou autrement dit un **isolant**. Un matériau est dit diélectrique s'il a la capacité de stocker et dissiper de l'énergie de manière capacitive. Cette définition dépend de la fréquence de mesure, car même un métal peut devenir un diélectrique à une fréquence suffisamment élevée.

Pour un échantillon purement diélectrique, l'application d'une tension continue n'engendrera pas de courant continu, tandis qu'une tension alternative donnera lieu à un **courant alternatif**. Les propriétés diélectriques (permittivité  $\epsilon$ ) des matériaux sont liées aux concepts de capacité formée par deux plaques, entre lesquelles se trouve un matériau diélectrique [138]. Le lien entre la permittivité (propriété intrinsèque du matériau) et la capacitance (*Farad*) mesurée dépend de la surface  $S$  ( $m^2$ ) des

électrodes et de la distance  $e$  (m) les séparant [48] :

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r S}{e} \quad (2.4)$$

avec  $\epsilon_0$  et  $\epsilon_r$ , la permittivité du vide ( $8.85 \times 10^{-12} F/m$ ) et la permittivité relative du matériau (sans unité). Dans le cas des métaux, le courant capacitif est un courant d'électrons qui charge les plaques, sans qu'ils ne quittent ou n'entrent dans les plaques. Ce courant capacitif présente un déphasage de  $90^\circ$  (quadrature de phase) par rapport à la tension alternative appliquée.

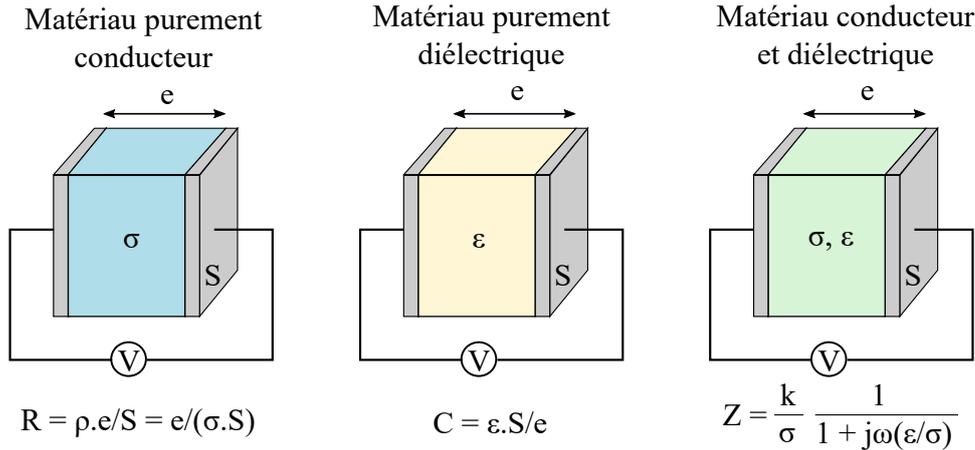


FIGURE 2.7 – Schéma présentant les liens entre les grandeurs de conductivité, résistivité et résistance pour un matériau conducteur (gauche), de capacitance et de permittivité pour un matériau diélectrique (milieu), de conductivité, permittivité et impédance pour un matériau à la fois conducteur et diélectrique (droite).

### Cas d'un matériau conducteur et diélectrique

Si l'échantillon considéré présente à la fois des propriétés conductrices et diélectriques, celui-ci sera caractérisé par une conductivité  $\sigma$  et une permittivité  $\epsilon$ . Appliquer un champ électrique à ce matériau conduira alors à l'établissement d'un courant continu en phase et d'un courant alternatif en quadrature [48]. Dans ce cas, il est plus intéressant d'utiliser les notations complexes afin de prendre en compte ces deux propriétés. En considérant un tel matériau placé entre deux plaques (ou électrodes) de surface  $S$ , séparées d'une distance  $e$ , celui-ci présentera une impédance  $\underline{Z}$  égale à :

$$\underline{Z} = \frac{k}{\sigma} \frac{1}{1 + j \frac{\epsilon}{\sigma} \omega} \quad \text{avec } k = \frac{e}{S} \text{ le facteur de forme} \quad (2.5)$$

Ces dernières équations négligent l'impédance des électrodes, et considèrent le cas le plus simple comprenant un milieu homogène et deux électrodes parallèles, induisant un champ électrique uniforme et des lignes de champ parallèles. Elles montrent finalement que l'impédance  $Z$  est inversement proportionnelle à la conductivité et la permittivité, et elles soulignent également sa dépendance vis-à-vis de la géométrie des électrodes et de l'échantillon, en introduisant le facteur de forme  $k$ .

Pour extraire les propriétés intrinsèques (conductivité et permittivité) du matériau, il est plus aisé d'utiliser l'admittance car elle donne directement accès à ces propriétés,

au facteur de forme près :

$$\underline{Y} = \frac{1}{k}(\sigma + j\omega\epsilon) \quad (2.6)$$

### Représentations graphiques de l'impédance

Dans le cas d'un échantillon complexe et non homogène (cas des échantillons biologiques), la conductivité et la permittivité ne peuvent plus être considérées comme constantes. Les termes  $\sigma$  et  $\epsilon$  des équations 2.5 et 2.6 sont alors remplacés par leur notation complexe, puisqu'ils dépendent de la fréquence de mesure. Il paraît donc intéressant d'étudier leur impédance sur une large gamme de fréquence, conduisant à des **diagrammes spectroscopiques d'impédance**. Il existe deux types de représentations graphiques : le diagramme de Bode représentant le module d'impédance et la phase en fonction de la fréquence, et le diagramme de Wessel (ou de Nyquist) représentant la partie imaginaire de l'impédance en fonction de sa partie réelle (*Figure 2.8*).

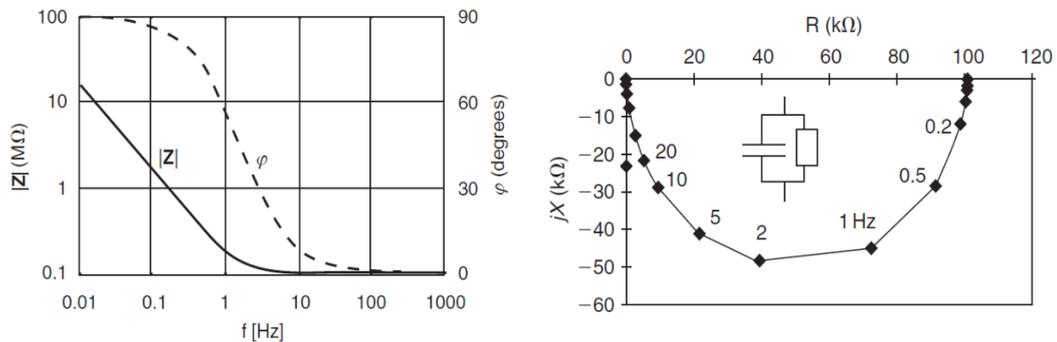


FIGURE 2.8 – Exemples de représentation de l'impédance : (gauche) diagramme de Bode représentant le module et la phase de l'impédance en fonction de la fréquence de mesure, (droite) diagramme de Nyquist représentant la partie imaginaire  $X$  de l'impédance en fonction de sa partie réelle  $R$ . Figures adaptées de [138].

Dans le cas des échantillons biologiques, on parle de **bioimpédance**. Ce sont des matériaux complexes, présentant à la fois des propriétés de conductivité et des propriétés diélectriques, décrites dans les sections suivantes.

### 2.2.2 Propriétés électriques des milieux biologiques

Les milieux intracellulaires et extracellulaires sont des **électrolytes**, c'est-à-dire des milieux comprenant des ions et des protéines dissous dans un solvant (eau). Ils sont caractérisés par une **conductivité ionique** puisque les charges sont portées par les ions, tandis que dans les métaux il s'agit des électrons et donc d'une conductivité électrique [138]. Le courant au sein d'un électrolyte est un phénomène plus complexe que dans un métal et implique le **transport de matière**.

Dans une solution au repos (sans champ électrique appliqué), l'ensemble des particules est immobile. Les ions de signes opposés s'attirent et attirent également les molécules d'eau, dont la charge globale est nulle mais dont la répartition des charges n'est pas centrée (molécule polaire). Les espèces non chargées sont impliquées dans des phénomènes de **diffusion**. Il s'agit de phénomènes non électriques, survenant en présence de gradients de concentration et régis par la loi de Fick [22].

Sous l'effet d'un champ électrique, il se produit un phénomène de **migration** des espèces chargées (ions) et une **réorientation** des molécules polaires. Le premier

phénomène caractérise la **conductivité ionique**, tandis que le second phénomène définit les **propriétés diélectriques** des milieux.

### 2.2.2.1 Conductivité ionique

*Kohlrausch* a démontré que la conductivité ionique résulte de la contribution séparée des anions et des cations [139]. La densité de courant  $J$  (A/m<sup>2</sup>) d'une paire anion-cation est définie par l'équation 2.7 :

$$J = (nzev)_+ + (nzev)_- = Fc\gamma(\mu_- + \mu_+)E \quad (2.7)$$

avec  $n$  le nombre d'ions,  $z$  la valence d'un atome,  $e$  la charge d'un électron (C),  $v$  la vitesse de l'ion (m/s),  $\sigma$  la conductivité (S),  $F$  la constante de Faraday (C/mol),  $c$  la concentration (mol/m<sup>3</sup>),  $\gamma$  le coefficient d'activité (compris entre 0 et 1),  $\mu$  la mobilité de l'ion (m<sup>2</sup>/(V.s)) et  $E$  le champ électrique (V/m). Cette densité de courant peut également être exprimée en fonction de la conductivité et du champ électrique, représentant alors l'équivalent de la loi d'Ohm pour les fluides conducteurs :

$$J = \sigma E \quad (2.8)$$

On peut également définir la contribution d'une paire anion-cation par sa conductivité molaire  $\Lambda$  (S.m<sup>2</sup>.mol<sup>-1</sup>). Il est possible de définir la conductivité molaire de chaque ion indépendamment, et d'exprimer la conductivité globale ( $\sigma$ ) comme la somme des conductivités molaires ( $\Lambda_i$ ) et concentrations ioniques ( $c_i$ ) :

$$\Lambda = \frac{\sigma}{c} = \gamma(\mu_- + \mu_+) \quad (2.9)$$

$$\sigma = \sum_{i=0}^n c_i \Lambda_i \quad (2.10)$$

Le *Tableau 2.1* donne les conductivités molaires des ions les plus présents dans les tissus biologiques.

TABLEAU 2.1 – Conductivités molaires ioniques (mS.m<sup>2</sup>.mol<sup>-1</sup>) des principaux ions présents dans les milieux biologiques.

<b>Cations</b>	$\Lambda$	<b>Anions</b>	$\Lambda$
H <sup>+</sup> /H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>	34,98	OH <sup>-</sup>	19,86
Na <sup>+</sup>	5,01	Cl <sup>-</sup>	7,63
K <sup>+</sup>	7,35	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,45
Ca <sup>2+</sup>	11,90	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	13,86

L'ensemble de ces relations ne sont correctes que pour des gammes de concentrations ioniques limitées. En effet, à de fortes concentrations, les ions sont si nombreux que leurs champs interagissent : les ions de charges opposées ont tendance à former des paires ioniques et présentent alors une mobilité plus faible [138].

La température et la pression influencent également la conductivité d'une solution [138]. En effet, l'augmentation de température diminue la viscosité de l'eau, favorisant la mobilité des ions. La conductivité d'une solution varie de 2% par degré Celsius. A

l'inverse, l'augmentation de la pression augmente la viscosité et entraîne alors une diminution de la conductivité.

### 2.2.2.2 Propriétés diélectriques

#### Polarisation et moment dipolaire

Un concept essentiel pour examiner les propriétés diélectriques des tissus est la notion de **polarisation**. Il s'agit d'une perturbation de la distribution des charges dans une région donnée, induite par un champ électrique [138]. Dans les tissus, la polarisation peut être endogénique ou exogénique. La membrane plasmique est le parfait exemple d'une polarisation endogénique : l'intérieur de la cellule est chargé négativement par rapport à l'extérieur, grâce aux processus actifs des pompes ioniques.

Les molécules composant un matériau sont constituées d'un ensemble d'atomes chargés positivement ou négativement, le tout étant électriquement neutre. Ces atomes sont liés par des forces, dont celles régies par la loi de Coulomb. La polarité d'une molécule est fonction de la répartition de ses charges. On dit qu'une molécule est **polaire** lorsque le barycentre des charges positives n'est pas confondu avec celui des charges négatives, ce qui est le cas de la molécule d'eau. Dans le cas inverse, la molécule est dite **apolaire**. Les molécules polaires sont caractérisées par leur **moment dipolaire**  $p$ . Celui-ci est qualifié de moment dipolaire permanent lorsqu'il représente une propriété intrinsèque de la molécule, c'est-à-dire s'il n'est pas induit par un champ électrique extérieur.

#### Polarisation d'un matériau

Au niveau macroscopique, la polarisation  $P$  d'un matériau représente le moment dipolaire électrique par unité de volume, orienté dans le sens du champ électrique ( $E$ ) [138] :

$$P = (\epsilon_r - 1)\epsilon_0 E = \chi\epsilon_0 E \quad (2.11)$$

avec  $\epsilon_0$  la permittivité du vide ( $F/m$ ),  $\epsilon_r$  la permittivité relative (sans dimension) et  $\chi$  la susceptibilité du matériau. Cette relation montre le lien entre le mécanisme de **polarisation** et la **permittivité** : une forte polarisation implique une grande permittivité. De plus, elle montre également le lien de proportionnalité entre la polarisation et le champ électrique. En l'absence d'un champ électrique, les molécules polaires sont orientées de façon aléatoire et la polarisation globale est nulle. La permittivité mesure alors la densité de moment dipolaire créé ou induit par un champ électrique.

Lorsque l'on applique un champ électrique, différents types de polarisation (*Figure 2.9*) se produisent, à différentes échelles [138] :

- **polarisation électronique** : le nuage électronique, comprenant les charges négatives, se déplace par rapport au noyau atomique contenant les charges positives. Ce déplacement, à l'échelle atomique, est très faible et très rapide (de l'ordre de la picoseconde).
- **polarisation ionique** : à l'échelle moléculaire, ce sont les ions constituant la molécule qui vont se déplacer sous l'effet d'un champ électrique extérieur. Les ions de charges négatives et positives se déplacent dans des directions opposées, déplaçant ainsi les barycentres des charges positives et négatives. Les molécules apolaires deviennent donc polaires. Ce phénomène est plus long que la polarisation électronique.
- **polarisation d'orientation** : à l'échelle moléculaire se produisent également des mouvements de rotation des dipôles permanents. Ce phénomène ne concerne

que les molécules polaires, qui vont s'orienter dans le sens du champ électrique externe. Il est bien plus lent que les deux autres mécanismes de polarisation.

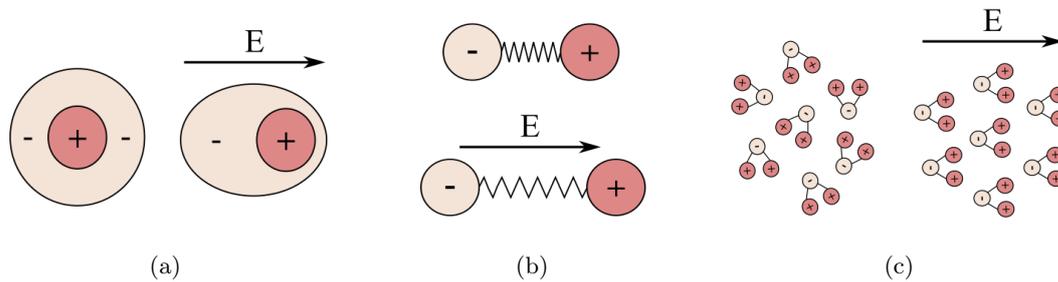


FIGURE 2.9 – Schéma des différents types de polarisation induites par l'application d'un champ électrique : (a) polarisation électronique, (b) polarisation ionique, (c) polarisation d'orientation.

## Notions de relaxation et de dispersion

Jusqu'ici, on considérait la polarisation comme un état statique, dépendant seulement du champ électrique. Cependant, dans un champ électrique dont l'intensité et la direction varient, la polarisation et le déplacement des charges dans un matériau ne se produisent pas instantanément. Ce processus dépend de la fréquence de mesure : en basses fréquences les charges ont le temps de s'orienter et la polarisation est maximale, tandis que dans les hautes fréquences, la polarisation et la permittivité diminuent. Il s'agit du concept de **relaxation**, dont la caractéristique est le temps de relaxation : le matériel évolue d'un état d'équilibre (sans champ électrique) à un nouvel état d'équilibre en réponse à un champ électrique. La **dispersion** est le concept correspondant dans le domaine fréquentiel [138].

### 2.2.3 Propriétés électriques passives des tissus

#### A l'échelle de la cellule

Les **milieux intracellulaire et extracellulaire** sont des électrolytes aqueux, présentant à la fois des propriétés conductrices et diélectriques. Le solvant, l'eau, présente une permittivité relative de l'ordre de 80 à 20°C (73 à 37°C) [138]. La présence d'ions dans l'eau diminue la **permittivité** puisque les molécules d'eau sont plus étroitement liées et plus difficilement polarisées. Les ions engendrent également une **conductivité électrolytique** de l'ordre de 1 S/m [138, 140].

Les milieux intra et extracellulaires sont séparés par la **membrane plasmique**, formée d'une bicouche lipidique et de protéines transmembranaires. Les protéines et canaux membranaires apportent une conductivité très faible et souvent négligée, de l'ordre de  $10^{-6}$  S/m [138, 140]. Les lipides lui confèrent des propriétés **isolantes et capacitives**, généralement de l'ordre  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  pour une membrane d'environ 7 nm d'épaisseur [138]. Mais cette valeur peut varier considérablement avec la structure de la cellule. En effet, les cellules musculaires présentent une capacité surfacique jusqu'à 8 fois supérieure à cette valeur, en raison de la présence du réseau de tubules transverses [141]. Leur membrane plasmique possède une capacité surfacique de l'ordre de  $1\text{-}2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ , et les membranes tubulaires de l'ordre de  $4\text{-}10 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  [141].

En raison de la forte capacité de la membrane, en basse fréquence, le courant circule autour des cellules, dans le milieu extracellulaire conducteur. A des fréquences plus

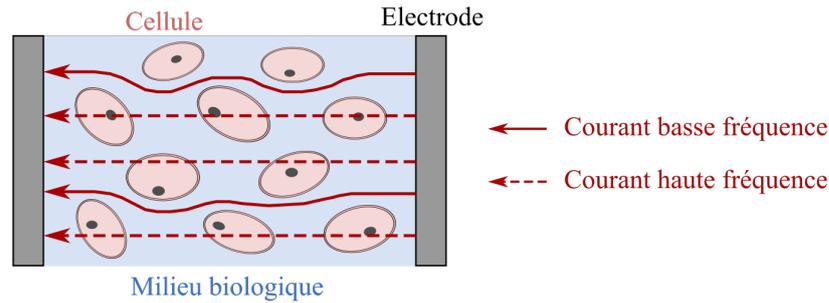


FIGURE 2.10 – Schéma des trajectoires du courant dans les tissus et milieux biologiques en fonction de la fréquence du signal de mesure

élevées, la membrane devient progressivement passante, laissant circuler le courant dans les milieux intracellulaire et extracellulaire (*Figure 2.10*).

### A l'échelle du tissu

Les tissus sont des matériaux très **hétérogènes**, puisqu'ils comprennent plusieurs types cellulaires de morphologie, de taille et de fonctions différentes.

Pour un tissu donné, ses propriétés intrinsèques varient avec la **fréquence** de mesure : la permittivité décroît avec l'augmentation de la fréquence, et à l'inverse, la conductivité augmente. Ces évolutions se font en trois grandes étapes, ou **dispersions** (*c.f. Section 2.2.2.2*), illustrées en *Figure 2.11* et nommées  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  [142]. Chaque région est la manifestation de différents mécanismes de polarisation se produisant à différentes gammes de fréquences, variables d'un tissu à l'autre. Un certain nombre de mécanismes sont identifiés et reflètent les différents compartiments constituant les tissus :

- la **dispersion**  $\alpha$  (mHz - kHz), associée à des phénomènes de diffusion ioniques à la surface des membranes [143]. Elle est caractérisée par une forte baisse de la permittivité, qui peut atteindre des ordres de grandeur de  $10^7$  en très basses fréquences.
- la **dispersion**  $\beta$  (1 kHz - 100 MHz), due à la polarisation des membranes cellulaires, des protéines et autres macromolécules organiques [143], polarisation interfaciale (effets de Maxwell-Wagner<sup>5</sup>) en raison de la structure hétérogène des tissus [142].
- la **dispersion**  $\gamma$  (100 MHz-100 GHz), due à la polarisation des molécules d'eau [143]. Dans cette gamme de fréquence, les membranes des cellules sont passantes et l'échantillon biologique est vu comme un simple électrolyte, engendrant une forte augmentation de la conductivité.

Les gammes de fréquence des trois dispersions et les spectres de conductivité et de permittivité sont très variables d'un tissu à l'autre. Ces propriétés électriques dépendent de leur **teneur en électrolyte**, de la **densité et mobilité des porteurs de charge**, ou encore de la **densité cellulaire**. Certains tissus, comme le tissu adipeux ou les os, comportent une plus grande quantité de lipides ou composés inorganiques et moins d'électrolytes, et présentent donc une conductivité en basses fréquences bien moins importante que d'autres tissus (*Figure 2.12*) [138, 140]. A l'inverse, le sang présente une conductivité plus importante que celle des tissus [140], car il est majoritairement composé d'électrolytes (plasma).

5. Les effets de Maxwell-Wagner proviennent de l'accumulation de charges à l'interface de matériaux diélectriques différents.

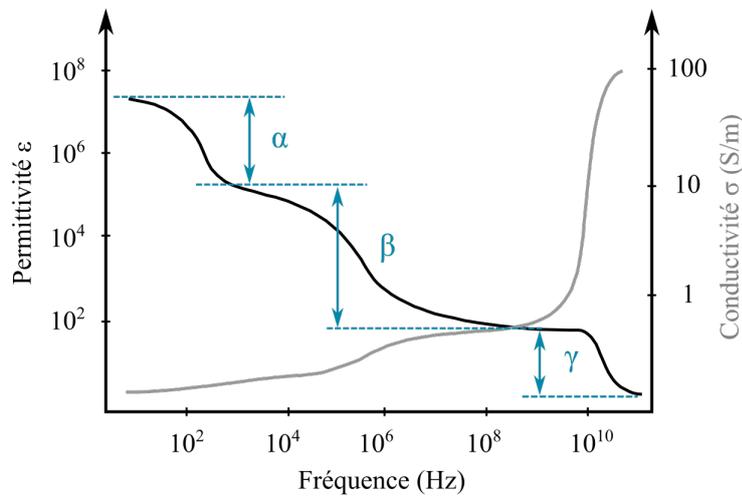


FIGURE 2.11 – Spectres de permittivité et de conductivité des tissus biologiques et les 3 dispersions  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .

La **structure** des tissus et des cellules impacte également ces propriétés, notamment l'orientation des cellules (**anisotropie**) et la présence de membranes délimitant des compartiments au sein des organes ou des cellules mêmes. Par exemple, le tissu musculaire a la particularité de présenter une dispersion  $\alpha$  très marquée, résultant principalement du réseau de tubules transverses [142]. L'anisotropie est aussi un phénomène visible en basses fréquences puisqu'il est dû aux membranes cellulaires [138]. Il est particulièrement marqué au sein du tissu musculaire, et se reflète sur les spectres de conductivité et de permittivité en dessous de 10 MHz (*Figure 2.12*) [143]. En basse fréquence, la conductivité dans le sens longitudinal peut être 5 à 8 fois supérieure à celle dans le sens transversal [144, 145]. Dans la *Figure 2.12*, on remarque également que dans la direction longitudinale, la dispersion  $\beta$  devient presque inexistante. Les propriétés dans le sens transversal semblent alors dominées par les phénomènes de polarisation interfaciale de type Maxwell-Wagner au niveau des membranes cellulaires [138].

## 2.2.4 Modèles électriques équivalents

### 2.2.4.1 Modèle électrique des tissus

#### Modèle de Fricke

En étudiant l'impédance électrique de cellules sphériques en suspension (globules rouges), *Fricke* et *Morse* ont montré que leurs mesures pouvaient être modélisées par le circuit électrique présenté en *Figure 2.13(a)* [148]. Ce modèle associe à chaque partie constituant une cellule et son environnement, un composant électrique traduisant son comportement électrique. Les **milieux intracellulaires et extracellulaires** étant des électrolytes avec un comportement purement résistif, ceux-ci sont respectivement représentés par des **résistances**  $R_i$  et  $R_e$ . La **membrane**, quant à elle, possède des propriétés isolantes et capacitives, et est représentée par un **condensateur**  $C_m$ . Finalement, l'impédance de ce modèle électrique équivalent est :

$$Z = R_e \frac{1 + j\omega R_i C_m}{1 + j\omega (R_i + R_e) C_m} \quad (2.12)$$

6. Données disponibles sur <http://niremf.ifac.cnr.it/docs/DIELECTRIC/Title.html>

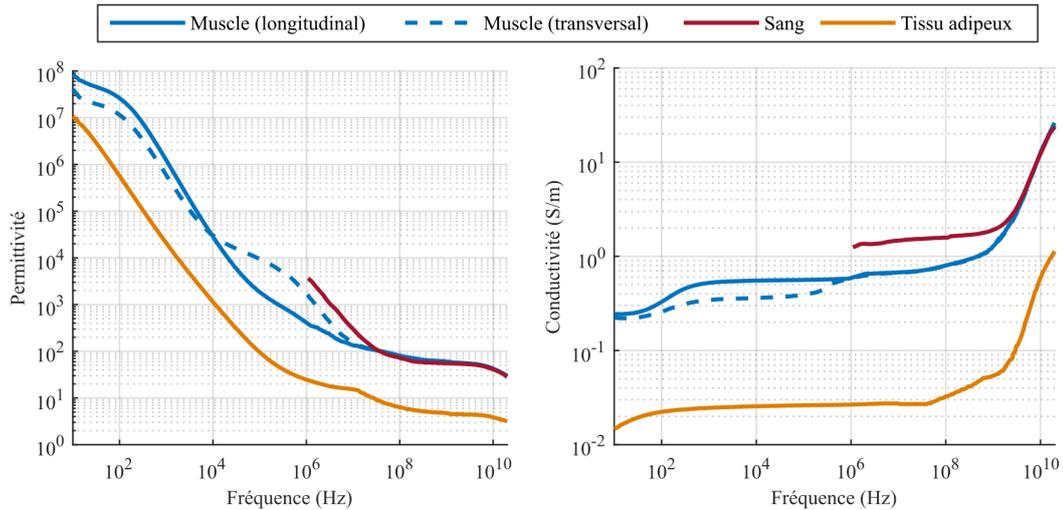


FIGURE 2.12 – Spectres de permittivité et de conductivité du muscle en longitudinal et en transversal (ovin), du sang (ovin, données limitées à des fréquences supérieures à 1 MHz) et du tissu adipeux (bovin), mesurés à 37°C par [146, 147] <sup>6</sup>.

Le modèle de Fricke traduit donc le comportement électrique décrit précédemment : en basse fréquence, l'effet résistif du milieu extracellulaire prédomine ( $Z = R_e$ ), puis à plus haute fréquence, la membrane devient passante et le courant circule alors dans les 2 résistances ( $Z = R_i // R_e$ ).

Bien que le modèle de Fricke est satisfaisant pour modéliser l'impédance de cellules en suspension, celui-ci concorde moins avec l'impédance des tissus qui ont une structure et un comportement électrique plus complexes. Le modèle considère des composants électriques idéaux indépendants de la fréquence, dont l'impédance totale représentée dans le plan complexe prend la forme d'un arc de cercle semi-circulaire. En réalité, Cole observa que l'impédance des tissus se présente sous la forme d'un arc "déprimé", c'est-à-dire plus tout à fait semi-circulaire et dont le centre se trouve sous l'axe des abscisses (Figure 2.13(b)).

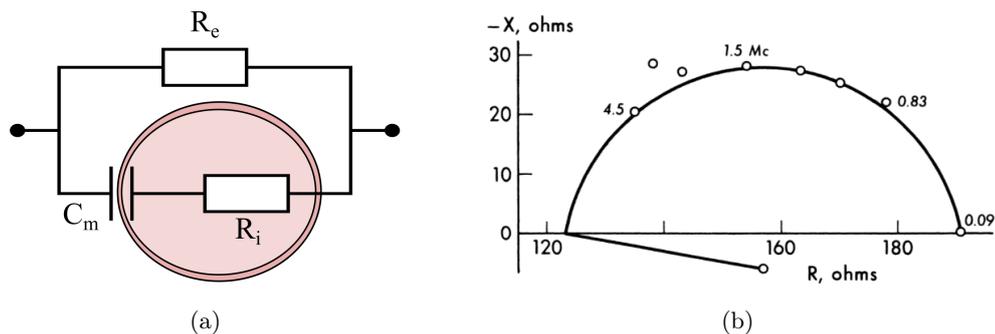


FIGURE 2.13 – (a) Modèle électrique équivalent des tissus biologiques proposé par Fricke et (b) la représentation dans le plan complexe des mesures d'impédance réalisées par Fricke sur une suspension de globules rouges de veau (figure extraite de [149]).

### Modèle de Cole-Cole

En 1932, Cole reprit les travaux de Fricke et montra que la **membrane** peut être représentée par la combinaison en série d'une capacité et d'une résistance dépendant

de la fréquence, dont la phase restait plus ou moins constante lorsque la fréquence variait [150]. Cette combinaison est aujourd'hui connue sous le nom d'**élément à phase constante** (*Constant Phase Element*, CPE), modélisant une résistance et un condensateur qui dépendent de la fréquence, et dont l'impédance est donnée par :

$$Z_{CPE}(\omega) = K(j\omega)^{-\alpha} \quad \text{avec} \quad K = |Z_{CPE}|_{\omega=1} \quad (\text{en } \Omega \cdot s^{-\alpha}) \quad (2.13)$$

avec  $\alpha$  une constante comprise entre 0 et 1 [151]. Quand  $\alpha$  est nul, il s'agit d'une résistance parfaite, et à l'inverse il s'agit d'une capacité parfaite lorsque  $\alpha$  est égal à 1. La phase de cet élément est constante et égale à  $\phi = -\alpha\pi/2$  radians. En 1940, *Cole* proposa une équation empirique pour modéliser l'impédance des tissus, utilisant cet élément CPE [152] :

$$Z = R_{\infty} + \frac{R_0 - R_{\infty}}{1 + (j\omega\tau)^{\alpha}} \quad (2.14)$$

avec  $R_0$  et  $R_{\infty}$  les résistances à fréquence nulle et infinie respectivement. Le circuit équivalent associé à cette équation est présenté en *Figure 2.14(b)*, avec  $\Delta R = R_0 - R_{\infty}$  [151]. La *Figure 2.14(b)* représente l'impédance de ce modèle dans le plan complexe, et illustre le lien avec les différents paramètres du modèle.

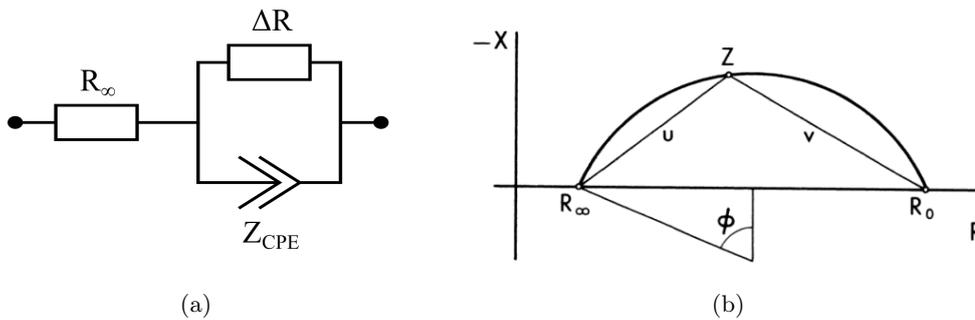


FIGURE 2.14 – (a) Modèle électrique équivalent de Cole-Cole, comprenant un CPE de phase constante  $\phi$ , des résistances  $R_{\infty}$  et  $\Delta R = R_0 - R_{\infty}$ , et (b) la représentation dans le plan complexe de l'impédance associée (figure extraite de [149]).

#### 2.2.4.2 Effets d'interface

Jusqu'à présent, nous ne considérons que les propriétés intrinsèques des échantillons biologiques et l'impédance qui en résulte, sans prendre en compte l'impédance des électrodes. Cependant, celle-ci n'est pas à négliger car l'**interface électrode-électrolyte** est le lieu de **réactions physico-chimiques** pouvant impacter les mesures de bioimpédance.

A l'interface électrode-électrolyte, se produisent des **phénomènes de transport de charges** impliquant des électrons au sein de l'électrode métallique (conduction électronique) et les ions présents dans l'électrolyte (conduction ionique). Ces phénomènes sont classés en deux catégories : les effets **non faradiques**, entraînant une redistribution des charges de l'électrolyte, et les effets **faradiques** se traduisant par des transferts d'électrons entre l'électrode et l'électrolyte (réactions d'oxydo-réduction, *c.f. Section 1.2.3*) [32].

Sous l'effet d'un champ électrique, les ions au sein de l'électrolyte migrent vers l'interface avec l'électrode, donnant lieu à l'établissement d'une **double couche électrique**. Les travaux d'*Helmholtz*, *Gouy*, *Chapman* et *Stern* ont donné la description

actuelle des phénomènes physiques à l'origine de cette double couche (*Figure 2.15*), composée de :

- la **couche compacte**, ou couche de Stern ou d'Helmholtz, s'étend de la surface de l'électrode jusqu'au plan externe d'Helmholtz (PEH). Elle contient des molécules d'eau et quelquefois des ions ou molécules dits spécifiquement adsorbés, c'est-à-dire liés à la surface par des liaisons chimiques [153]. Le plan interne d'Helmholtz (PIH) se trouve au niveau du centre de ces ions. Ensuite se trouvent des ions hydratés, liés par des forces électrostatiques à l'électrode chargée, et dont les centres se trouvent sur le plan externe d'Helmholtz. Dans cette couche, le potentiel électrique décroît linéairement.
- la **couche diffuse**, ou couche de Gouy-Chapman, débute au niveau du plan externe d'Helmholtz, et contient des molécules d'eau et des ions hydratés, distribués dans la couche en raison de l'agitation thermique [153]. Son épaisseur est plus importante que celle de la couche compacte et dépend de la concentration ionique totale de l'électrolyte, ainsi que du potentiel appliqué. Dans cette couche, le potentiel décroît de façon exponentielle.

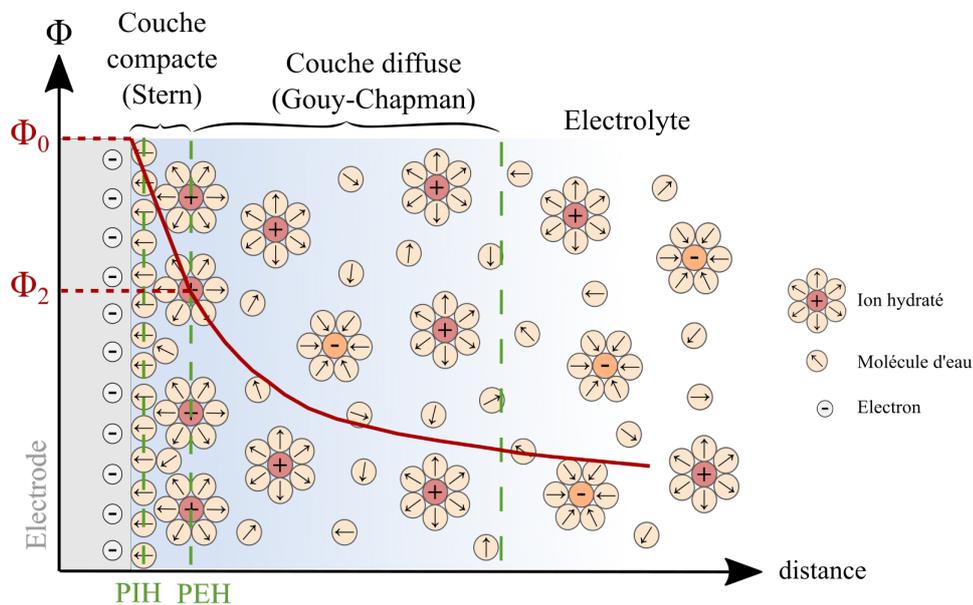


FIGURE 2.15 – Schéma de la double couche électrique à l'interface électrode-électrolyte (sans ions adsorbés), composée de la couche compacte et de la couche diffuse. L'effet capacitif de la double couche engendre une chute de potentiel (trait plein rouge) égale à  $\Phi_0 - \Phi_2$ , avec  $\Phi_0$  le potentiel appliqué à l'électrode et  $\Phi_2$  le potentiel au plan externe d'Helmholtz (PEH).

### Effets non faradiques : capacité de double couche

La double couche électrique induit un **effet capacitif**, et une chute du potentiel appliqué menant à une quasi-absence du champ électrique dans l'échantillon biologique à basses fréquences. Ce phénomène est aussi connu sous le nom de **polarisation de l'électrode** [154].

La couche compacte présente un comportement diélectrique en raison de la polarisation des molécules d'eau, et peut être simplement modélisée par une capacité  $C_H$  :

$$C_H = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{d_{PEH}} \quad (2.15)$$

avec  $d_{PEH}$  la distance entre la surface de l'électrode et le plan externe d'Helmholtz (PEH, voir *Figure 2.15*) [153]. La couche diffuse apporte également un effet capacitif, plus complexe de par la présence de charges (ions), et dont la capacité  $C_D$  résultante est définie par :

$$C_D = \kappa \epsilon_0 \epsilon_r \cosh\left(\frac{z_i e \Phi_2}{2kT}\right) \quad \text{avec} \quad \frac{1}{\kappa} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k T}{2c_i z e}} \quad (2.16)$$

avec  $z_i$  la valence d'un ion  $i$ ,  $e$  la charge d'un électron,  $\Phi_2$  le potentiel au plan externe d'Helmholtz (début de la couche diffuse, voir *Figure 2.15*),  $k$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température. L'inverse du terme  $\kappa$  est homogène à une distance et représente l'épaisseur de la couche diffuse (longueur de Debye), en fonction de  $c_i$  la concentration de l'ion  $i$  [153]. Ces relations reflètent bien la dépendance de la capacité  $C_D$  de la couche diffuse par rapport à la concentration ionique de l'électrolyte et le potentiel appliqué à l'électrode.

Finalement, la **capacité totale** de la double couche  $C_{dl}$  est représentée par la mise en série des deux capacités :

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_D} \quad (2.17)$$

Elle est généralement exprimée en capacité surfacique, de l'ordre de quelques  $\mu F/cm^2$  jusqu'à plusieurs centaines de  $\mu F/cm^2$  [155]. Sa valeur dépend de la conductivité et de la température de l'échantillon, mais également de la taille et de l'état de surface de l'électrode [154]. L'effet de polarisation de l'électrode peut être minimisé en augmentant la surface de l'interface électrode-électrolyte, en augmentant la surface de l'électrode ou en utilisant des matériaux rendant sa surface rugueuse. En effet, les électrodes recouvertes de matériaux poreux (e.g. PEDOT, noir de platine Pt-Black) présentent une surface effective plus importante, déplaçant l'effet de polarisation vers les basses fréquences [155].

### Effets faradiques : transfert de charge et diffusion

En plus des effets capacitifs de la double couche se produisent des processus faradiques, se traduisant par des réactions électrochimiques et la diffusion des ions dans la couche diffuse.

Malgré l'effet capacitif, certaines charges parviennent à traverser la double couche, par l'intermédiaire de réactions d'oxydo-réduction [156]. Ces fuites de charge sont représentées par une **résistance de transfert de charge**  $R_{ct}$  :

$$R_{ct} = \frac{RT}{nF i_0} \quad (2.18)$$

avec  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température (K),  $n$  le nombre d'électrons impliqués dans la réaction,  $F$  la constante de Faraday et  $i_0$  le courant d'échange [153].

Dans la couche diffuse, la diffusion des ions vers l'interface se produit à une vitesse finie et donne alors lieu à une impédance au flux de courant. Cette impédance de diffusion est l'**impédance de Warburg**, dont l'expression est :

$$Z_W = k(1 - j)\omega^{-0.5} \quad (2.19)$$

avec  $\omega$  ( $s^{-1}$ ) la pulsation et  $k$  le coefficient de diffusion ( $\Omega s^{-0.5}$ ) [156]. Il s'agit d'un CPE ("Constant Phase Element") avec une phase constante de  $45^\circ$ .

Finalement, le **modèle électrique de l'interface** se compose de la résistance  $R_{ct}$  en série avec l'impédance de Warburg  $Z_W$ , le tout en parallèle de la capacité de double couche  $C_{dl}$ . Cependant, l'interface ne présente pas un comportement capacitif idéal, et peut aussi être alors modélisée par un CPE, tel que défini dans l'équation 2.13 [156].

### 2.2.4.3 Modèle électrique global

Le modèle électrique global de l'ensemble électrode-tissu correspond alors à la mise en série du modèle électrique de l'interface avec celui du tissu biologique (Figure 2.16). En basses fréquences, l'impédance de l'interface est prédominante et masque l'impédance du tissu.  $R_{ct}$  et  $Z_W$  apparaissent en très basses fréquences ( $f < 1$  Hz), peu utilisées pour les mesures de bioimpédance. Ces éléments sont donc souvent négligés, et l'interface est simplement modélisée par la capacité  $C_{dl}$  ou par un CPE.

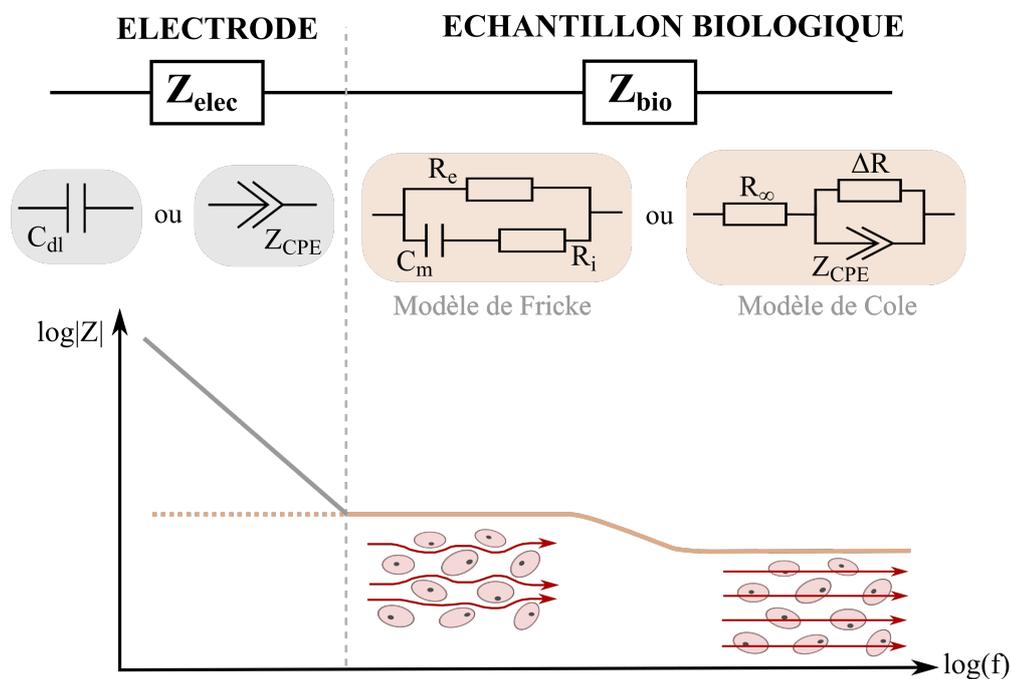


FIGURE 2.16 – Modèle global de l'ensemble électrode-tissu correspondant à la mise en série du modèle électrique de l'interface ( $C_{dl}$  ou  $Z_{CPE}$ ) et du modèle électrique du tissu (modèle de Fricke ou modèle de Cole). L'impédance de l'interface (courbe grise) masque l'impédance du tissu (courbe marron) en basse fréquence.

### 2.2.5 Méthodes de mesures d'impédance

La mesure d'impédance consiste à appliquer un courant (ou tension) alternatif et mesurer le potentiel (ou courant) généré. On peut alors calculer l'impédance  $Z$  avec l'équation 2.1 et en extraire son module et sa phase, les tissus ayant une réponse linéaire à une stimulation par courant faible.

La mesure de bioimpédance à une seule fréquence, plus particulièrement à 50 kHz, est très répandue et est utilisée pour évaluer la composition corporelle (masses musculaire et grasseuse, quantité d'eau...) [157]. Cependant, nous avons vu que les propriétés électriques des tissus varient avec la fréquence de mesure. Il apparaît donc plus intéressant d'étudier celles-ci sur une large gamme de fréquence : il s'agit de la **spectroscopie de bioimpédance**. Dans notre contexte, nous utiliserons la spectroscopie de bioimpédance afin d'identifier une signature de la fatigue musculaire dans le spectre.

### Balayage fréquentiel vs Signaux multifréquentiels

La spectroscopie d'impédance peut être réalisée selon deux approches :

- par **balayage fréquentiel**, consistant à appliquer un signal sinusoïdal monofréquentiel pour évaluer l'impédance sur une gamme de fréquences (balayage linéaire ou logarithmique). Le principal inconvénient de cette méthode est le temps de mesure qui dépend de la gamme et du nombre de fréquences mesurées, et peut atteindre jusqu'à plusieurs minutes [138].
- avec un **signal multifréquentiel**, consistant à appliquer un signal contenant plusieurs fréquences pour mesurer l'impédance sur une large gamme de fréquence en une fois [138]. Cette méthode est bien plus rapide que le balayage en fréquence, mais également moins précise et plus complexe à implémenter [158, 102]. Les signaux couramment utilisés pour cette approche sont les multisinus (somme de sinus), les chirp (signal sinusoïdal de fréquence variable dans le temps), ou des séquences binaires pseudo-aléatoires [159].

Pour avoir le meilleur compromis vitesse-précision sur une large gamme de fréquence, certains développent des architectures hybrides implémentant l'approche multifréquentielle en basses fréquences et l'approche par balayage pour les hautes fréquences [160].

### Electrodes

De même que pour les applications de stimulation électrique, les électrodes utilisées pour la mesure de bioimpédance doivent être biocompatibles, résistantes à la corrosion et ne pas induire de réactions faradiques pouvant endommager le tissu (*c.f. Section 1.2.3*).

La mesure de bioimpédance peut être réalisée sous plusieurs configurations (*Figure 2.17*). La plus répandue est la **méthode 2 points**, utilisant deux électrodes. La paire d'électrodes sert à la fois à appliquer le courant de mesure, et à mesurer la tension induite. Dans cette configuration, la polarisation de l'électrode perturbe la mesure et prédomine le spectre en basse fréquence (*c.f. Section 2.2.4.2*). Pour remédier à ce problème, il est possible d'utiliser la **méthode 4 points** [154]. Elle consiste à utiliser deux électrodes pour appliquer le courant de mesure, et une autre paire d'électrodes mesurant le potentiel induit. Mais cette configuration est plus vulnérable aux erreurs de mesure et l'interprétation des mesures peut être plus complexe. Par exemple, des simulations par éléments finis montrent que cette configuration induit des zones de sensibilité négative, ce qui signifie qu'une augmentation d'impédance dans ces régions se traduira en réalité par une baisse d'impédance [161].

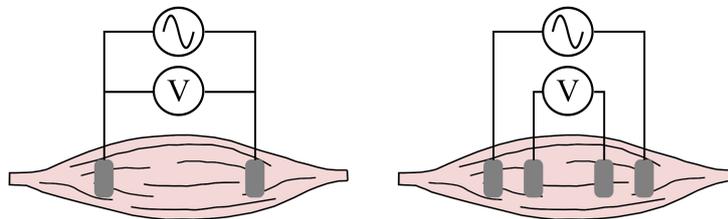


FIGURE 2.17 – Schéma des configurations de mesure de bioimpédance à 2 et 4 électrodes

## 2.2.6 Applications

### 2.2.6.1 Les principales applications de la spectroscopie d'impédance

L'application *in vivo* la plus connue est celle de l'analyse d'impédance bioélectrique (Bioelectrical Impedance Analysis, BIA), utilisée dans les balances impédancemètres. Elle évalue la **composition corporelle** (masse grasseuse et musculaire, la quantité d'eau totale) à partir de la mesure de bioimpédance à 50 kHz [157].

La bioimpédance peut aussi servir au **diagnostic** de pathologies, comme certains **troubles neuromusculaires** tels que la sclérose latérale amyotrophique (maladie de Charcot) et les dystrophies musculaires [162]. Elle peut également évaluer la sévérité d'une blessure musculaire [163], ou encore la perte de masse musculaire liée à l'âge [164]. L'évaluation de l'état des tissus musculaires par bioimpédance est connue sous le nom de **myographie par impédance électrique** ("Electrical Impedance Myography", EIM).

La **tomographie par impédance électrique** ("Electrical Impedance Tomography", EIT) est une technique d'imagerie reposant sur l'utilisation de la bioimpédance. Elle nécessite plusieurs dizaines d'électrodes : le courant est injecté dans une paire d'électrodes et les tensions entre les autres électrodes sont mesurées, puis le processus est réitéré pour chaque paire [138]. A partir d'algorithmes de reconstruction, elle permet alors de visualiser la distribution spatiale de la bioimpédance. Elle est utilisée pour le suivi de la respiration, de l'activité cardiaque et cérébrale, ou encore pour le dépistage de cancers [165].

Par ailleurs, de nombreuses **applications *in vitro*** ont vu le jour depuis plusieurs décennies grâce à *Giaever* et *Keese*. Ils proposèrent la technique connue sous le nom de "Electric Cell-Substrate Impedance Sensing" (ECIS), pour étudier l'adhésion et la prolifération de cellules *in vitro* [166]. Depuis, elle est utilisée pour une multitude d'applications comme l'évaluation de la viabilité des cellules dans le cadre de tests de toxicité de composants chimiques, ou sous l'effet d'une exposition aux ondes radiofréquences [167, 168]. Elle permet aussi de monitorer la croissance et la différenciation de cellules musculaires et reflète les changements morphologiques tels que l'atrophie et l'hypertrophie [169, 170].

### 2.2.6.2 Les effets de l'activité musculaire sur la bioimpédance

En plus des applications de diagnostic des troubles neuromusculaires, il y a un intérêt grandissant pour l'**évaluation de l'activité musculaire et de la fatigue par bioimpédance**. Les premières études investiguant ces effets datent d'une vingtaine d'années. *Shiffman* et ses collègues ont montré que la résistance et la réactance mesurées à 50 kHz augmentent lors de contractions volontaires isométriques, et qu'après contraction ces paramètres ne retournent pas à leurs valeurs initiales (*Figure 2.18(a)*) [171]. Ils ont constaté que la variation d'impédance précède la génération de force (quelques dizaines de millisecondes), suggérant que la bioimpédance ne reflète pas seulement les changements morphologiques associés à l'état contracté du muscle, mais également les processus physiologiques à l'origine de la génération de force. Un article plus récent a montré qu'au cours d'une contraction fatigante (contraction continue jusqu'à épuisement), la résistance à 50 kHz et 100 kHz augmente au début de l'exercice et diminue lorsque le sujet n'est plus capable de maintenir la force requise et continue de diminuer après une minute de repos [172]. Après une fatigue induite par des contractions isotoniques répétées, il y a également une baisse de la résistance et une augmentation de la réactance entre 10 kHz et 100 kHz (*Figure 2.18(b)*) [173, 174]. Dans le cas de contractions électriquement induites, plusieurs articles rapportent les même

phénomènes : augmentation de la résistance et de la réactance pendant la contraction, et une diminution de la résistance et une augmentation de la réactance après l'exercice [175, 176].

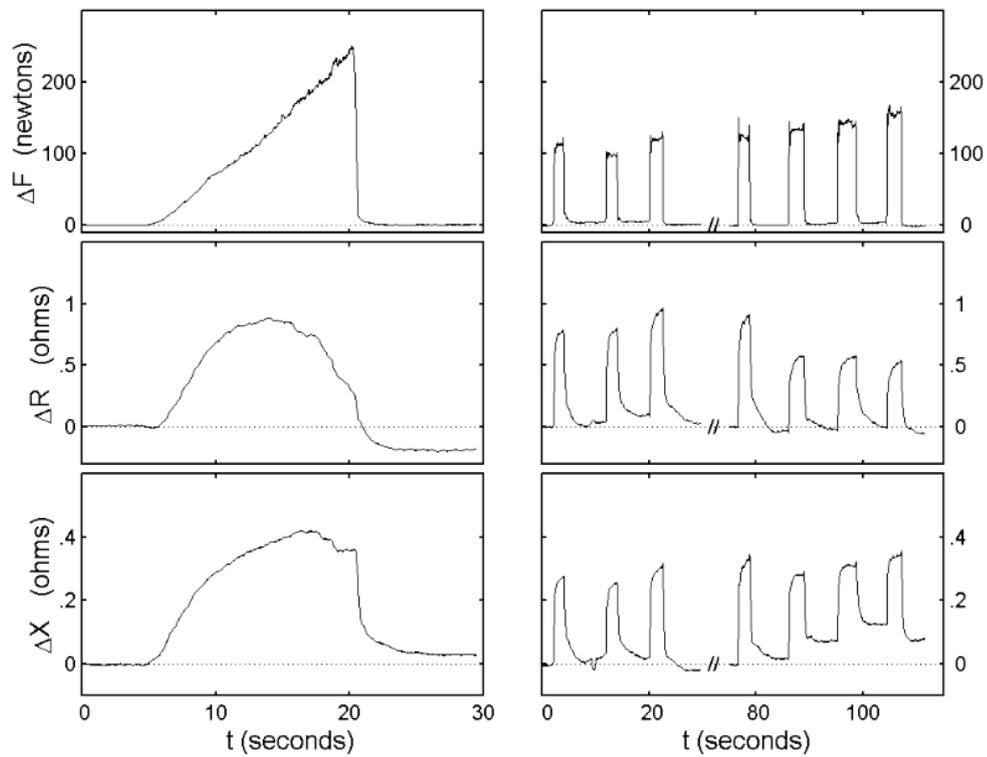
Bien que les origines de ces variations d'impédance ne soient pas encore tout à fait élucidées, les études citées émettent plusieurs hypothèses. L'accumulation de métabolites et le gonflement du muscle lors des contractions seraient à l'origine de la diminution de la résistance du tissu, en lien avec l'augmentation du volume de fluides (sang) et du nombre de porteurs de charges disponibles dans le tissu [172, 174]. L'augmentation de la réactance pourrait quant à elle provenir de dommages musculaires temporaires (rupture des membranes cellulaires) et de modifications des propriétés des membranes des fibres musculaires [163, 173, 177]. Que ce soit lors d'un exercice volontaire ou électriquement induit, les variations de résistance et de réactance sont plus importantes lorsque la force développée augmente [171, 176]. **Ainsi, la bioimpédance semble étroitement liée aux mécanismes de contraction et de génération de la force et traduire l'état du tissu musculaire lors de la contraction et de l'apparition de la fatigue.**

## 2.3 Conclusion

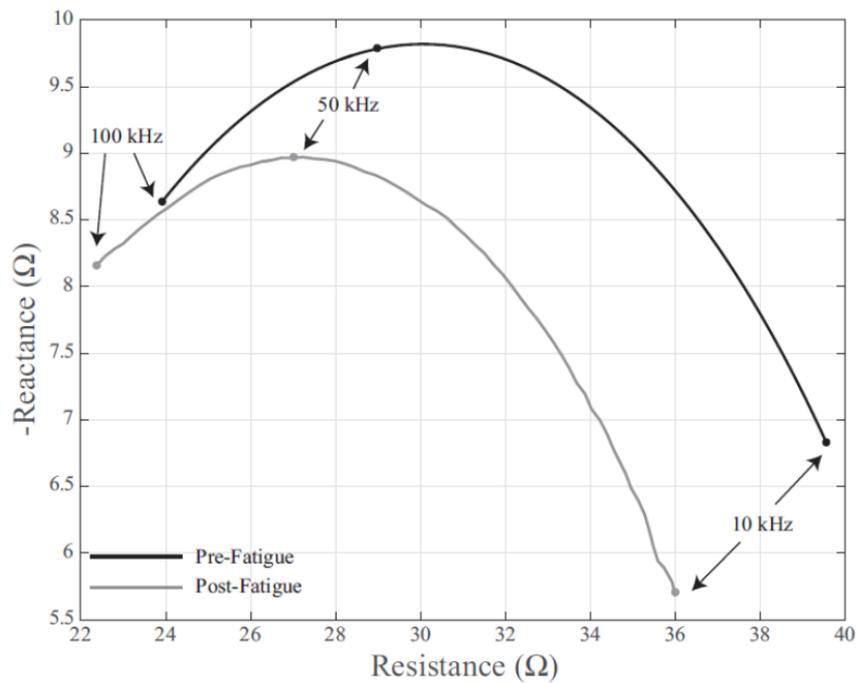
La **stimulation électrique induit une plus grande sollicitation du système cardiorespiratoire, un stress métabolique plus important, menant à une fatigue musculaire prématurée** et plus importante que lors d'une activité physique volontaire. Le phénomène de fatigue musculaire est complexe, dynamique et multifactoriel, se manifestant par une baisse des performances musculaires (baisse de la force produite, allongement des temps de contraction et de relaxation). Il implique de multiples mécanismes physiologiques dans l'ensemble du système neuromusculaire, offrant la possibilité d'évaluer la fatigue par l'intermédiaire de différentes méthodes (métaboliques, physiologiques, mécaniques, électriques). Les mesures métaboliques et physiologiques sont peu spécifiques, et par conséquent peu utilisées. A l'inverse, les mesures mécaniques et électriques sont plus répandues et représentatives de la fatigue, puisqu'elles témoignent respectivement des propriétés contractiles et d'excitabilité du muscle. Cependant, la fatigue peut parfois se manifester par une altération d'une seule de ces propriétés, nécessitant alors l'utilisation conjointe des deux méthodes de mesure pour une évaluation précise et robuste de la fatigue. C'est pourquoi il y a un intérêt grandissant pour l'utilisation de **la mesure de bioimpédance, reflétant la composition et la structure des tissus**, pouvant alors rendre compte des variations morphologiques, chimiques et métaboliques des muscles lors de contractions.

Bien que plusieurs études aient déjà démontré la pertinence de l'utilisation de cette mesure pour évaluer la fatigue musculaire, des progrès restent à faire pour préciser les relations entre la mesure de bioimpédance, la force, le mode de contraction et finalement la fatigue : il n'existe à notre connaissance pas de modèle *in vitro* permettant d'explorer de manière systématiques ces relations, voire de les quantifier. L'objectif de cette thèse est alors d'approfondir les connaissances actuelles sur ce sujet, et finalement démontrer l'intérêt de la **mesure de bioimpédance comme retour objectif** dans les systèmes de stimulation en boucle fermée. Pour ce faire, il a fallu concevoir un **banc de test spécifique** combinant de la **stimulation électrique** et mesure de **bioimpédance**, appliqués à un modèle biologique.

Le modèle humain *in vivo* représente le modèle biologique idéal puisqu'il intègre tous les mécanismes physiologiques impliqués dans l'activité musculaire et la fatigue (fatigue centrale et périphérique). Néanmoins, dans le cas de la restauration de la



(a)



(b)

FIGURE 2.18 – (a) Variations de force, de résistance et de réactance (R et X mesurées à 50 kHz) lors de contractions volontaires en rampes ou en impulsions, figure issue de [171] (b) Diagramme de Nyquist des mesures de bioimpédance du biceps d'un participant avant et après fatigue, figure issue de [174].

---

motricité des muscles paralysés, la fatigue a des origines principalement périphériques (à partir de la jonction neuromusculaire). Par conséquent, cela nous offre la possibilité d'étudier la fatigue musculaire induite par stimulation électrique sur des modèles *ex vivo* (muscle entier isolé) ou *in vitro* (cultures de cellules musculaires). Pour des problématiques éthiques et de reproductibilité, nous avons fait le choix d'utiliser un **modèle biologique *in vitro***. Le banc de test a donc été conçu pour ce type de modèle (culture cellulaire 2D) et sa conception est détaillée dans le chapitre suivant (*Chapitre 3*).



## Chapitre 3

# Conception du banc de test *in vitro*

Afin d'évaluer la fatigue musculaire par mesure de bioimpédance, nous avons conçu un banc de test permettant :

- de stimuler électriquement un modèle biologique *in vitro* de muscle squelettique pour induire une activité contractile et un état de fatigue ;
- de réaliser des mesures de bioimpédance de ce même modèle ;
- d'évaluer l'activité musculaire induite par la stimulation.

L'architecture globale du banc de test est présentée en *Figure 3.1*.

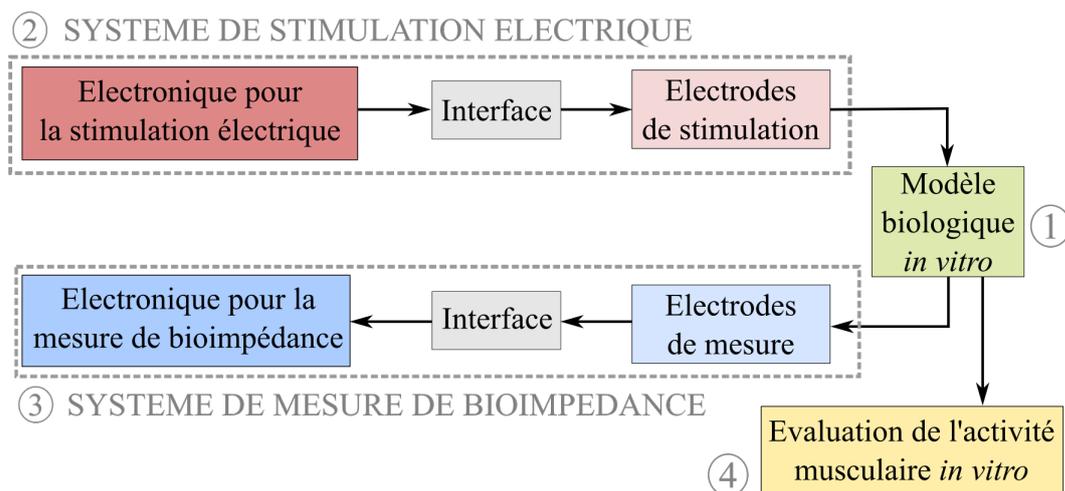


FIGURE 3.1 – Schéma bloc du banc de test adapté à un modèle de muscle squelettique *in vitro*. Il comprend un système de stimulation incluant l'électronique permettant la génération des signaux de stimulation, ainsi qu'une interface et des électrodes dédiées pour délivrer ces signaux. Le système de mesure de bioimpédance comprend l'électronique et des électrodes permettant la mesure, et une interface entre ces deux blocs. Un dernier bloc permet l'évaluation de l'activité musculaire *in vitro*. Les numéros indiquent l'ordre dans lequel est traitée chaque partie du banc de test dans ce chapitre.

Dans ce chapitre, nous présentons nos choix technologiques et la conception détaillée des différents blocs composant ce banc de test. Le chapitre suit la chronologie des raisonnements, des choix et des étapes de conception du banc qui ont été réalisés durant cette thèse :

1. le choix du modèle biologique de muscle strié squelettique *in vitro* et ses caractéristiques.
2. la conception d'un système de stimulation électrique adapté au modèle biologique choisi, et validé par le biais de plusieurs expérimentations.
3. la conception et la caractérisation d'un système de mesure de bioimpédance.

4. une revue des méthodes d'évaluation de l'activité musculaire *in vitro* afin d'identifier le lien entre les mesures de bioimpédance et l'activité musculaire.

Enfin, la dernière section résume les caractéristiques de chacun des blocs illustrés en *Figure 3.1*.

### 3.1 Modèle biologique *in vitro* de muscle squelettique

#### Choix du modèle

Les mécanismes à l'origine de la fatigue sont nombreux (*c.f. Section 2.1.2*) et dépendent du modèle étudié, des conditions expérimentales et des activités imposées au muscle. Le modèle biologique de référence pour l'étude de la fatigue musculaire est le muscle *in vivo*, puisqu'il intègre tous les mécanismes centraux et périphériques à l'origine de la fatigue. Mais la diversité des types de fibres musculaires selon le muscle étudié, et l'état physiologique des muscles selon le sexe, l'âge et la condition physique de l'individu rendent la reproductibilité des études difficile. Les mécanismes et les manifestations de la fatigue peuvent alors varier considérablement. Pour des questions éthiques, pratiques et de faisabilité, les expérimentations sur modèle humain sont limitées [178, 179]. L'utilisation *in vitro* de biopsies de muscle humain peut représenter une bonne alternative à l'expérimentation *in vivo* [180, 179]. Mais l'utilisation de cellules primaires humaines peut induire de grandes variabilités dans les résultats, à cause de plusieurs facteurs : le muscle choisi pour la biopsie, le niveau d'activité physique, l'état de santé, le sexe et l'âge du donneur [180].

Une alternative consiste à utiliser un muscle entier, isolé par dissection sur un modèle animal, et placé dans des solutions salines physiologiques. Ce modèle élimine les composantes centrales de la fatigue mais les proportions des types de fibres musculaires restent variables d'un muscle à l'autre, et d'un individu à l'autre. Pour évaluer la fatigue selon le type de fibre musculaire, les muscles de rat *soleus* et *extensor digitorum longus* sont respectivement utilisés comme des modèles de muscles lents et rapides [181]. Avec ce type de modèle, la diffusion de l'oxygène est limitée et la stimulation électrique peut induire des gradients de concentration (accumulation de potassium et d'acide lactique dans la solution), pouvant biaiser les méthodes d'évaluation de la fatigue [107]. Pour des questions éthiques, les expérimentations sur modèles *in vivo* humain ou animal sont de plus en plus réglementées et limitées, c'est pourquoi de nombreuses études se tournent vers l'utilisation de modèles biologiques *in vitro*.

Si les **cultures cellulaires *in vitro*** représentent une alternative bienvenue, les conditions de culture *in vitro* sont très différentes des conditions *in vivo*, notamment parce qu'elles sont souvent limitées à des structures 2D (planaires). Les mesures mécaniques sont alors plus difficiles à réaliser sur ce type de modèle biologique *in vitro* 2D. Néanmoins, ce modèle permet de réaliser plus facilement des analyses biochimiques et des études de fluorescence. Il est possible d'utiliser des **cellules primaires** ou des **lignées cellulaires immortalisées**. L'utilisation des premières peut entraîner des variations considérables des résultats expérimentaux du fait de l'hétérogénéité des donneurs, nécessite des procédures plus lourdes (chirurgie, élimination des types cellulaires non désirés, sacrifice de l'animal) pour la préparation des cultures et comporte un risque de contamination [182]. A l'inverse, les lignées cellulaires offrent davantage de reproductibilité, de disponibilité et de facilité d'utilisation [183]. C'est pourquoi nous choisirons d'utiliser ce type de **modèle *in vitro***, notre étude visant à être une première démonstration du lien entre bioimpédance et fatigue. Selon les résultats obtenus, il sera ensuite pertinent de reprendre notre méthode de caractérisations sur des lignées humaines et des cellules primaires.

Dans le cadre des études portant sur le muscle squelettique, nous retrouvons deux principales lignées cellulaires, à savoir les cellules L6, issues de muscle de rat, et les cellules C2C12, issues de muscle de souris [178]. Pour étudier les effets de l'exercice physique et de la fatigue musculaire, un bon modèle *in vitro* doit démontrer des effets semblables à ceux observés *in vivo* [179]. La revue de *Nikolic* et al. [183] recense un grand nombre d'études portant sur les effets de la stimulation électrique appliquée à des cultures cellulaires *in vitro* et compare ces effets à ceux que l'on peut observer *in vivo* après exercice physique. Sur les 72 études citées, les cellules C2C12 sont majoritairement utilisées (28 études) et semblent mieux caractérisées que la lignée L6. En effet, des équipes ont tenté d'exploiter les L6, mais n'ont pas réussi à induire de contractions chez ces dernières [184, 182]. De plus, les C2C12 présentent une plus grande abondance de protéines contractiles, une meilleure absorption de glucose en réponse à la stimulation électrique et forment des fibres musculaires plus allongées et mieux organisées par rapport aux cellules L6 [185]. Enfin, plusieurs études ont démontré qu'en réponse à la stimulation électrique les C2C12 présentent des réponses métaboliques, génétiques et moléculaires semblables à celles observés *in vivo*, comme une augmentation de la consommation de substrats métaboliques (glucose, glycogène, ATP) et de la production de lactate, une transition des protéines contractiles du type rapide vers le type lent et une hypertrophie des fibres [186, 182, 187, 188, 189]. Les C2C12 sont donc très utilisées comme modèle biologique *in vitro* de muscle squelettique pour l'étude des effets de l'exercice. A partir de ces données, nous avons donc choisi d'utiliser la **lignée cellulaire C2C12**. De plus, la plateforme du vivant du laboratoire IMS est d'ores et déjà dotée des savoirs et équipements nécessaires à ces cultures *in vitro*. Cette proximité facilitera par la suite les phases de culture cellulaire et les phases de mesure.

### Caractéristiques des C2C12 et protocole de culture

Nous introduisons ici quelques notions liées aux procédés de culture cellulaire, dans le but de définir les phases de prolifération et de différenciation auxquelles nous ferons référence dans le manuscrit.

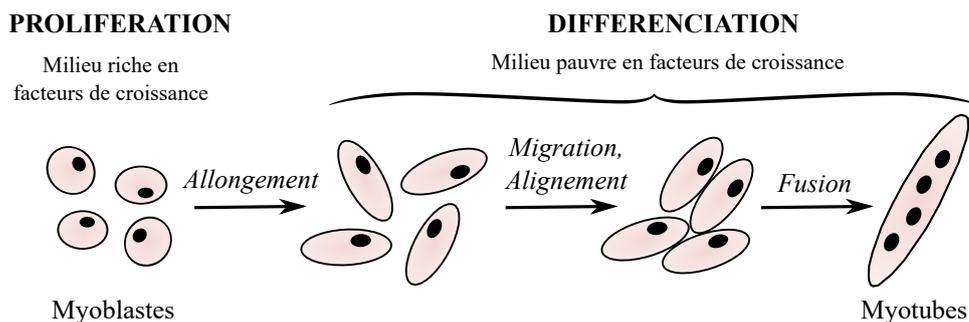


FIGURE 3.2 – Représentation schématique du processus de différenciation de myoblastes indifférenciés, induit par un milieu de culture pauvre en facteur de croissance

Les cellules C2C12 sont des myoblastes immortalisés, issus de cellules satellites de jambe de souris C3H, qui peuvent passer de la prolifération à la différenciation selon les conditions de culture. Les **myoblastes** sont des précurseurs mononucléés indifférenciés de fibres musculaires. Maintenus dans un milieu riche en facteur de croissance (milieu de prolifération), les myoblastes C2C12 restent dans un état prolifératif indifférencié (*Figure 3.2*). Dans ces conditions, ils sont en forme d'étoile ou fusiformes, de taille d'environ 20-80  $\mu\text{m}$ , mononuclés et contiennent des filaments d'actine et de myosine

distribués de façon diffuse dans le cytoplasme [190]. Quand environ 80-90% de la confluence cellulaire est atteinte, la différenciation peut être initiée en remplaçant le milieu de prolifération par le milieu de différenciation, pauvre en facteur de croissance. Les cellules commencent alors à s'allonger et migrent progressivement pour s'aligner entre elles et fusionner (*Figure 3.2*). A un stade intermédiaire de différenciation, les myofilaments (actine et myosine) s'organisent peu à peu. Après 5 jours de différenciation, les **myotubes** apparaissent. Il s'agit de cellules allongées (plusieurs centaines de micromètres de longueur, pour une largeur de 30-50  $\mu\text{m}$ ), fusiformes et parfois en forme de Y, possédant plusieurs noyaux cellulaires, et dont les myofilaments sont organisés en sarcomères et myofibrilles [190]. Les C2C12 présentent principalement les caractéristiques moléculaires et métaboliques associées aux fibres de type II (glycolytiques) [185].

Dans le cadre de cultures cellulaires, il est également important de définir la notion de **passage**. Le numéro de passage d'une culture cellulaire correspond au nombre de sous-cultures réalisées à partir d'un échantillon cellulaire initial. Concrètement, les cellules stockées dans un congélateur sont décongelées etensemencées dans des flasques avec du milieu de culture. Lorsque les cellules sont de nouveau congelées, puis décongelées et réensemencées, cela représente un passage. Concernant la lignée cellulaire C2C12, le fournisseur recommande d'utiliser les cellules présentant un nombre de **passage inférieur à 10** même s'il s'agit d'une lignée cellulaire immortalisée. En effet, après un grand nombre de passages, les cellules continuent de proliférer, mais leur phénotype et leur génotype peuvent être modifiés avec le temps.

## 3.2 Conception du système de stimulation électrique

Après avoir choisi le modèle cellulaire, nous nous sommes penchés sur la conception d'un système de stimulation *in vitro*. Nous détaillons ici nos choix technologiques et l'architecture du système de stimulation conçu, puis les expérimentations réalisées qui nous ont permis de valider notre modèle biologique et le système de stimulation électrique.

### 3.2.1 État de l'art des systèmes de stimulation *in vitro*

Dans la littérature, nous avons identifié deux principaux systèmes de stimulation électrique commerciaux, associant des électrodes avec un générateur spécifique dont les caractéristiques sont résumées dans le *Tableau 3.1*.

Le premier repose sur l'utilisation d'une **matrice de microélectrodes** (MEA<sup>1</sup>) et d'un générateur (STG4000<sup>2</sup>) commercialisés par MultiChannel Systems [191]. Ce système est très utilisé pour des cellules neuronales ou cardiaques *in vitro* [192, 193], cultivées au fond du puits d'un MEA en verre comprenant entre 32 et 256 électrodes en titane (TiN) ou PEDOT et nanotubes de carbone (PEDOT-CNT), de diamètre compris entre 10 et 30  $\mu\text{m}$  (*Figure 3.3(a)*). Le générateur STG4000 comprend 2, 4 ou 8 canaux de sortie indépendants et est capable de délivrer une tension maximale de 8 V et un courant maximal compris entre 160  $\mu\text{A}$  et 16 mA selon le modèle. Les signaux de stimulation sont programmables et peuvent être de différentes formes (sinusoïdal, impulsion monophasique ou biphasique, ou arbitraire).

1. <https://www.multichannelsystems.com/products/microelectrode-arrays>

2. <https://www.multichannelsystems.com/products/stg4000-series>

TABLEAU 3.1 – Caractéristiques des générateurs commercialisés par MultiChannel Systems et IonOptix pour des applications de stimulation électrique de cultures *in vitro*

Caractéristiques		STG4000 (MultiChannel Systems)	C-Pace EM (IonOptix)
Type de stimulation		Tension, courant	Tension
Forme d'onde		Programmable : sinus, rectangulaire, rampe, arbitraire	Rectangulaire biphasique
Tension	Maximale	$\pm 8$ V	$\pm 40$ V
	Résolution	1 mV	100 mV
Courant	Maximal	$\pm 160$ $\mu$ A, $\pm 1,6$ mA, $\pm 16$ mA	240 mA
	Résolution	20 nA, 200 nA, 2 $\mu$ A	-
Nombre de canaux		2, 4 ou 8	8
Fréquence		0 - 25 kHz	0,01 - 99 Hz
Durée des impulsions	Durée	-	0.4 - 24 ms
	Résolution	0,02 ms	0,2 ms

Le second système est commercialisé par la société IonOptix et comprend un générateur (C-Pace EM<sup>3</sup>) et des **macroélectrodes de carbone** (C-dish<sup>4</sup>). Les électrodes C-dish sont fixées sur un PCB qui se place au-dessus d'une plaque de culture en plastique comprenant 4, 6, 8, 12 ou 24 puits selon le modèle. Un exemple est illustré dans la *Figure 3.3(b)*. Ces électrodes sont plongées dans le milieu de culture et ne rentrent pas en contact avec les cellules. Le générateur C-Pace EM peut générer des impulsions biphasiques avec une tension maximale de 40 V, un courant maximal de 240 mA, une largeur d'impulsion comprise entre 0,4 et 24 ms et une fréquence de stimulation entre 10 mHz et 99 Hz. Ce système est communément utilisé pour la stimulation électrique de cellules cardiaques ou musculaires squelettiques *in vitro* comme les C2C12 [186, 187].

Le système de stimulation électrique STG4000 de MultiChannel Systems est conçu pour des stimulations locales et sélectives au sein d'une culture, avec des courants ou tensions de stimulation de faibles amplitudes. À l'inverse, le système C-Pace EM d'IonOptix permet une stimulation globale d'une culture par l'intermédiaire de macroélectrodes plongées dans le milieu, ce qui requiert des courants et tensions de stimulation plus élevés. Le principal inconvénient de ce système est l'absence de contrôle ou de mesure du courant de stimulation : seule la tension de stimulation est ajustée.

Dans la littérature, on trouve également des systèmes de stimulation custom reposant sur l'utilisation de fils de platine ou d'électrodes interdigitées associées à un générateur de forme arbitraire [194, 195].

3. <https://www.ionoptix.com/products/components/stimulators/c-pace-em/>

4. <https://www.ionoptix.com/products/components/stimulators/c-dish/>

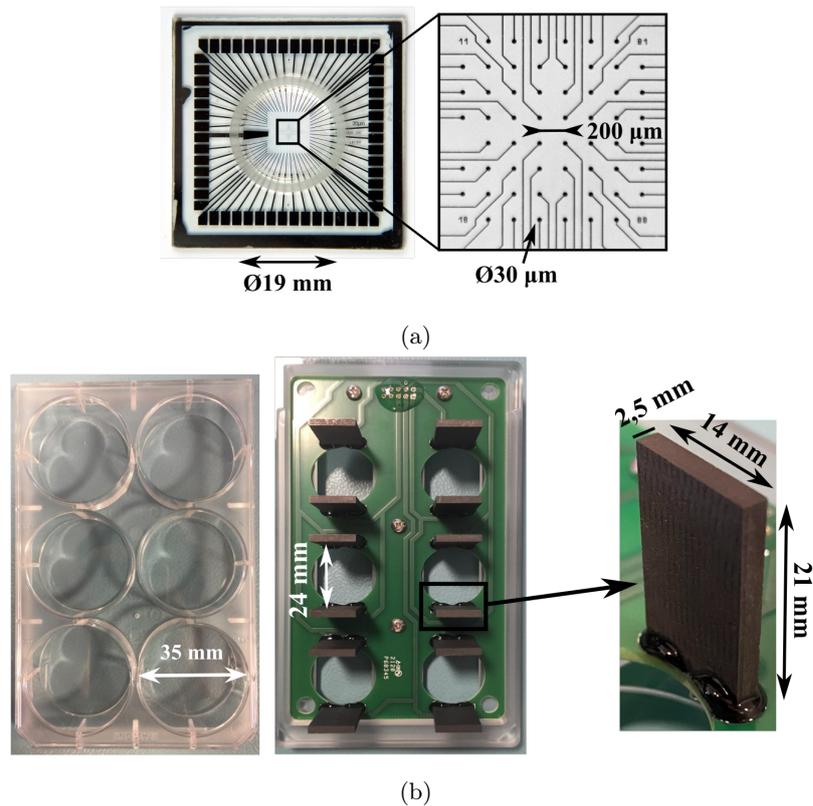


FIGURE 3.3 – (a) Photographies d'une matrice de microélectrodes commercialisée par MultiChannel Systems (59 électrodes de  $30\ \mu\text{m}$  de diamètre, espacées de  $200\ \mu\text{m}$ , diamètre du puits de culture  $19\ \text{mm}$ ) et (b) photographies des macroélectrodes de carbone commercialisées par IonOptix (C-dish, modèle CLD6WFC adapté à une plaque de culture 6 puits).

### Cahier des charges

Étant donné que la lignée C2C12 n'a jamais été utilisée au sein du laboratoire et que la majorité des études utilisant cette lignée ont recours au système commercial d'IonOptix, nous avons fait le choix d'acquérir un modèle d'électrodes C-dish. Ce modèle commercial d'électrodes de stimulation ne possède pas d'électrodes permettant les mesures de bioimpédance, comme présenté au début du chapitre (*Figure 3.1*). C'est pourquoi la version finale du banc de test ne repose pas sur l'utilisation des électrodes C-dish, qui ont seulement servi à réaliser les premiers essais de culture et de stimulation électrique. La version finale du banc de test comprend des microélectrodes permettant les mesures de bioimpédance et des macroélectrodes de stimulation en carbone, fabriquées au laboratoire (*c.f. Section 3.3*).

Ainsi, d'après les besoins en caractéristiques de stimulation recensés dans la littérature, nous avons décidé de concevoir **notre propre système de stimulation dont les spécifications électroniques** lui permettent de :

- être utilisé avec différents types d'électrodes de stimulation et différents puits de culture ;
- générer des signaux de stimulation biphasiques, symétriques ou asymétriques, configurables en termes d'amplitude (jusqu'à  $20\ \text{V}$ ), de durée d'impulsion ( $1 - 30\ \text{ms}$ ) et de fréquence ( $0,1 - 100\ \text{Hz}$ ) ;
- mesurer la tension et le courant de stimulation appliqués.

### 3.2.2 Architecture du système de stimulation électrique

L'architecture du système de stimulation, répondant au cahier des charges établi précédemment, est présentée en *Figure 3.4*. Le travail présenté ici a été réalisé avec l'aide de deux stagiaires de l'école d'ingénieurs ENSEIRB-MATMECA (Adrien d'Hollande et Aurélian Houé).

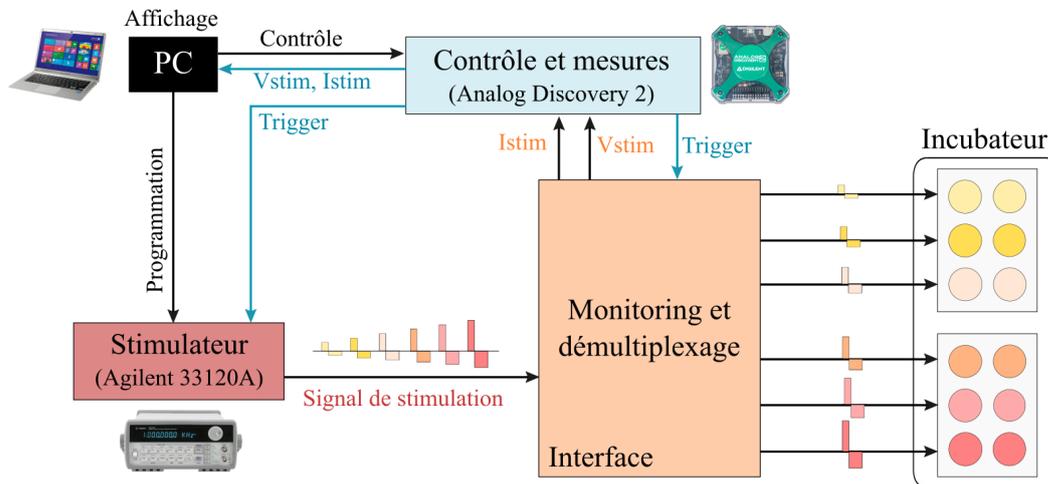


FIGURE 3.4 – Schéma bloc du système de stimulation

Le système repose sur un générateur de formes d'ondes arbitraires programmable (Agilent 33120A<sup>5</sup>, Agilent Technologies). Celui-ci est capable de générer des signaux d'amplitude allant de 50 mVpp à 20 Vpp, avec une gamme de fréquence comprise entre 100  $\mu$ Hz et 25 MHz. Une interface logicielle a été développée en Python pour la programmation du générateur. Elle permet à l'utilisateur de configurer jusqu'à six signaux biphasiques, symétriques ou asymétriques, d'amplitudes et de durées d'impulsion variables (*Figure 3.5*). Il est également possible d'indiquer si besoin la durée des trains d'impulsions et durée de pause entre ces derniers. Cela permet par exemple de créer un signal de stimulation constitué d'impulsions répétées à une fréquence  $f$  pendant une durée de 1 s, répété toutes les 5 s, comprenant ainsi des temps de pause de 4 s (*Figure 3.5*). Le programme concatène les six signaux biphasiques pour les enregistrer dans la mémoire du générateur. Ils sont ensuite démultiplexés sur six voies par une interface électronique présentée plus loin. Enfin, un bouton permet d'exécuter une séquence de stimulation en demandant à l'utilisateur le nom du signal à générer, son amplitude et sa fréquence (*Figure 3.5*). La communication entre l'ordinateur et le générateur est réalisée par l'intermédiaire de commandes SCPI (Standard Commands for Programmable Instruments).

5. <https://www.keysight.com/us/en/assets/7018-06809/data-sheets/5968-0125.pdf>

**Choix du pattern**

Liste des patterns enregistrés :

- SINC
- NEG\_RAMP
- EXP\_RISE
- EXP\_FALL
- CARDIAC
- PS2\_50Hz
- PS2\_50C
- PS2\_1Hz
- PS2\_20Hz

Amplitude maximale du signal : 10

Fréquence du générateur : 0.2

Valider

**interface pour la stimulation**

Fichier Générateur Aide

**Paramètres des signaux de stimulation**

Signal	Amplitude (+/-)	Fréquence(Hz)	Durée pulse - (ms)	Durée stimulation(s)	Durée pause(s)	Signaux asymétriques ?
Signal 1	2	2	5	1	0	<input type="checkbox"/>
Signal 2	2	2	10	1	0	<input type="checkbox"/>
Signal 3	2	2	15	1	0	<input type="checkbox"/>
Signal 4	2	2	5	1	0	<input type="checkbox"/>
Signal 5	2	2	10	1	0	<input type="checkbox"/>
Signal 6	2	2	15	1	4	<input type="checkbox"/>

Nouveau pattern

Afficher les graphiques

**Paramètres des signaux de stimulation**

**Signal de stimulation**

Signal de stimulation généré

Tension (V)

Temps (ms)

**Signaux de commandes des démultiplexeurs**

Signal 1

Signal 2

Signal 3

Signal 4

Signal 5

Signal 6

Temps (ms)

**Données pour les mus :**

Signal	Fréquence (Hz)	Duty cycle (%)	Phase (°)
Signal 1	2	3.0	333.28
Signal 2	2	5.0	259.92
Signal 3	2	7.0	196.56
Signal 4	2	3.0	144.0
Signal 5	2	5.0	80.64
Signal 6	2	7.0	17.28

Fréquence trigger : 0.2Hz

**Programmer le générateur (ajout/suppression d'un signal de stimulation)**

**Choix du pattern**

Liste des patterns enregistrés :

- SINC
- NEG\_RAMP
- EXP\_RISE
- EXP\_FALL
- CARDIAC
- PS2\_50Hz
- PS2\_50C
- PS2\_1Hz
- PS2\_20Hz

Amplitude maximale du signal : 10

Fréquence du générateur : 0.2

Valider

**Paramètres des signaux de stimulation**

Signal	Amplitude (+/-)	Fréquence(Hz)	Durée pulse - (ms)	Durée stimulation(s)	Durée pause(s)	Signaux asymétriques ?
Signal 1	2	2	5	1	0	<input type="checkbox"/>
Signal 2	2	2	10	1	0	<input type="checkbox"/>
Signal 3	2	2	15	1	0	<input type="checkbox"/>
Signal 4	2	2	5	1	0	<input type="checkbox"/>
Signal 5	2	2	10	1	0	<input type="checkbox"/>
Signal 6	2	2	15	1	4	<input type="checkbox"/>

Nouveau pattern

Afficher les graphiques

**Signal de stimulation**

Signal de stimulation généré

Tension (V)

Temps (ms)

**Signaux de commandes des démultiplexeurs**

Signal 1

Signal 2

Signal 3

Signal 4

Signal 5

Signal 6

Temps (ms)

**Données pour les mus :**

Signal	Fréquence (Hz)	Duty cycle (%)	Phase (°)
Signal 1	2	3.0	333.28
Signal 2	2	5.0	259.92
Signal 3	2	7.0	196.56
Signal 4	2	3.0	144.0
Signal 5	2	5.0	80.64
Signal 6	2	7.0	17.28

Fréquence trigger : 0.2Hz

**Lancer une séquence de stimulation**

**Paramètres des signaux de stimulation**

**Signaux de commandes des démultiplexeurs**

**Signal de stimulation**

FIGURE 3.5 – Interface logicielle permettant de générer jusqu'à 6 signaux biphasiques dans un unique signal, de calculer les paramètres pour la génération des signaux de commande des démultiplexeurs, d'ajouter ou supprimer un signal de la mémoire du générateur, et enfin de lancer une séquence de stimulation (bouton vert). Les signaux sont constitués d'impulsions répétées à une fréquence  $f$  pendant une certaine durée (case "Durée stimulation"), avec des temps de pause entre les trains d'impulsions (case "Durée pause") : exemple du signal 6, de fréquence 2 Hz pendant 1 seconde soit 2 impulsions

Afin de réaliser les premiers essais de culture et de stimulation des cellules musculaires C2C12, le système de stimulation électrique a d'abord été adapté aux électrodes C-dish, et plus particulièrement le modèle CLD6WFC présenté en *Figure 3.6*. Ce modèle est compatible avec des plaques de culture contenant 6 puits et comprend donc 6 paires d'électrodes. A partir du schéma de connexion des paires d'électrodes (*Figure 3.6*), nous avons choisi de concevoir une interface électronique permettant de distribuer jusqu'à six signaux de stimulation (correspondant à deux plaques d'électrodes C-dish, dont les puits sont connectés deux à deux).

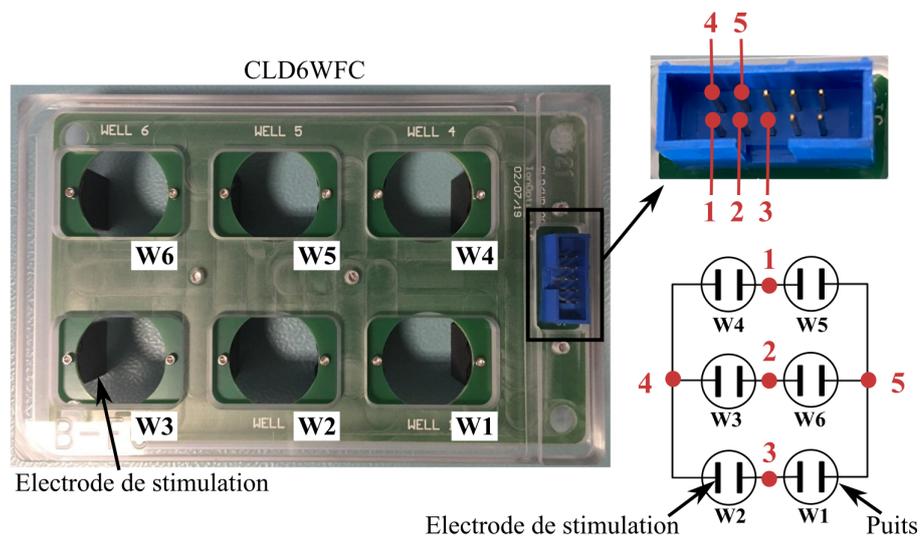


FIGURE 3.6 – Photographie du modèle d'électrodes C-dish CLD6WFC commercialisé par IonOptix (gauche) et schéma des connexions électriques des différentes paires d'électrodes (droite).

L'interface électronique (*Figure 3.7*) entre le générateur et les puits de culture comprend un amplificateur de puissance (de gain 2), associé à une alimentation externe pour fournir le courant de stimulation nécessaire, entre 10 et 50 mA. Elle permet également la mesure de la tension et du courant de stimulation par l'intermédiaire d'une résistance de shunt et d'un amplificateur d'instrumentation différentiel. Enfin, elle réalise aussi la distribution des signaux de stimulation vers les différents puits de culture par le biais de démultiplexeurs (ADG5433, Analog Devices) recevant le signal amplifié.

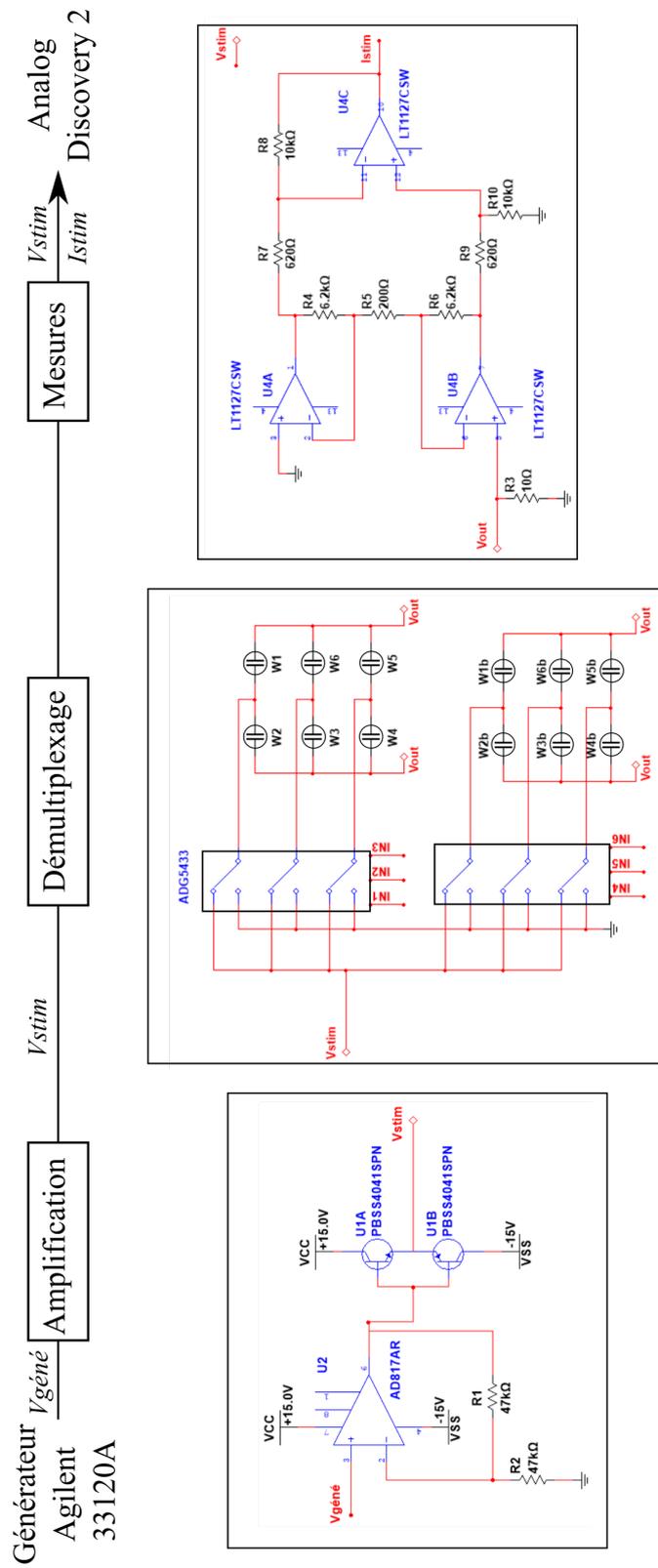


FIGURE 3.7 – Interface électronique permettant d'amplifier le signal de sortie du générateur ( $V_{géné}$ , gain 2), de démultiplexer les 6 signaux aux puits de culture (W1-6, W1b-W6b) et de mesurer la tension et le courant de stimulation appliqués ( $V_{stim}$ ,  $I_{stim}$ ).

L'instrument multifonction (Analog Discovery 2<sup>6</sup>, Digilent) génère les signaux de commande des démultiplexeurs et du générateur, et réalise l'acquisition ainsi que l'affichage des tensions et courants de stimulation. L'instrument est commandé par l'intermédiaire du logiciel Digilent WaveForms dans lequel il faut renseigner les paramètres des signaux de commande des démultiplexeurs (fréquence et phase fournies par l'interface logicielle, *Figure 3.5*) et la fréquence du trigger du générateur.

### 3.2.3 Validation du système de stimulation électrique et du modèle biologique

Le système de stimulation présenté en *Section 3.2.2* a été utilisé pour valider le modèle biologique. La validation du modèle requiert d'obtenir des réponses aux questions suivantes :

1. Est-ce que les C2C12 sont capables de se contracter dès la mise en route de la stimulation électrique, ou doivent-elles être stimulées pendant un certain laps de temps avant d'être contractiles ? Et comment évolue l'activité contractile au cours du temps ?

*Quelques publications évoquent la nécessité d'une "période d'entraînement" pour rendre les cellules C2C12 fonctionnelles et contractiles [186, 196].*

2. Quelles sont les amplitudes de courant de stimulation permettant d'induire des contractions ?

*La majorité des études sur les C2C12 utilisent le générateur C-Pace (IonOptix), qui stimule en tension sans fournir d'informations sur les valeurs de courant de stimulation ou sur la quantité de charges injectées. L'étude [197] annonce un courant de rhéobase (c.f. *Section 1.2.2*) entre 8 et 17 mA, selon l'orientation des cellules par rapport aux électrodes de stimulation, mais avec d'autres types d'électrodes que les électrodes C-dish.*

3. Pendant combien de temps peuvent-elles être stimulées avant qu'elles ne se décollent du support ?

*En effet, dans des conditions de culture in vitro, les contractions spontanées ou induites peuvent entraîner le détachement des cellules du support de culture [178].*

4. Quelle est l'influence des paramètres (amplitude, durée et fréquence des impulsions) de stimulation sur l'activité contractile des C2C12 ?

Pour répondre à l'ensemble de ces questions et valider ainsi le modèle biologique, nous avons réalisé des expérimentations dont les objectifs sont de :

- prendre en main le protocole de culture et induire la formation de myotubes fonctionnels et contractiles ;
- déclencher des contractions induites par stimulation électrique ;
- observer le comportement contractile des cellules musculaires en fonction des paramètres de stimulation.

#### 3.2.3.1 Protocoles

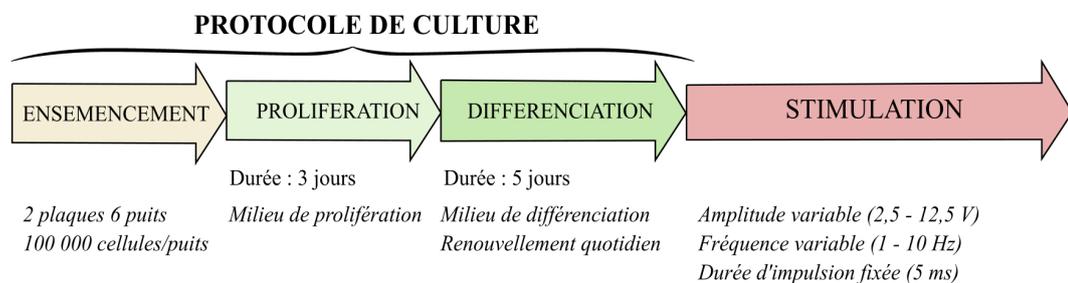
Le déroulement des expérimentations est présenté en *Figure 3.8*.

---

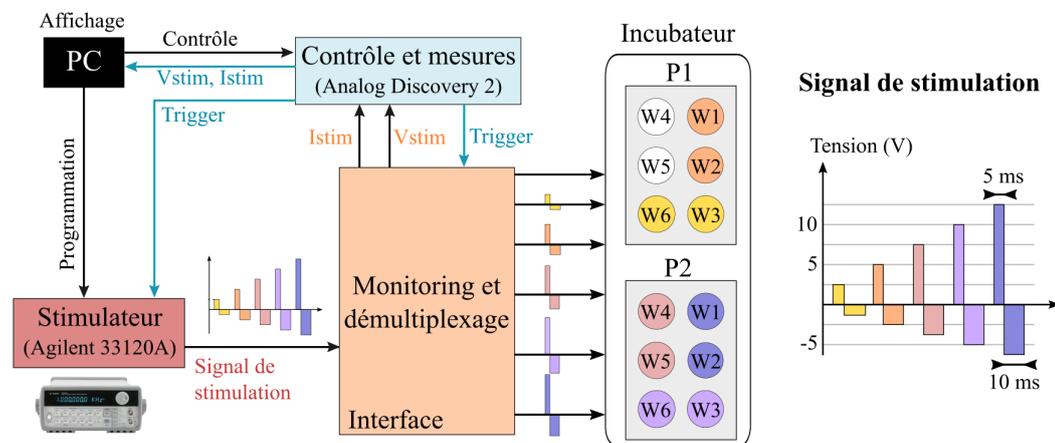
6. [www.digilent.com/reference/test-and-measurement/analog-discovery-2/](http://www.digilent.com/reference/test-and-measurement/analog-discovery-2/)

### Protocole de culture

Le protocole de culture a été réalisé au sein de la plate-forme du vivant de l'IMS, avec l'aide de Florence Poulletier de Gannes, Ingénieure de Recherche. (Figure 3.8(a)). Il débute par l'**ensemencement** de 100000 cellules dans chaque puits de deux plaques (P1, P2) comprenant chacune six puits de 35 mm de diamètre, avec 3 mL de milieu de prolifération. Ce milieu est composé de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), de 10% de sérum de veau foetal (Foetal Bovine Serum, FBS) et de 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine). La phase de **prolifération** dure entre deux à trois jours, jusqu'à ce que les cellules atteignent environ 90% de confluence. Après la phase de prolifération, la **différenciation** est initiée par un changement de milieu afin d'induire la formation de myotubes. Le milieu de différenciation, constitué de DMEM, de 2% de sérum de cheval (Horse Serum, HS) et de 1% d'antibiotiques, remplace le milieu de prolifération. Le milieu est changé quotidiennement pendant toute la durée de la phase de différenciation et d'expérimentation (stimulation sur Figure 3.8(a)). Après 5 jours de différenciation, des essais de stimulation électrique ont été réalisés.



(a)



(b)

FIGURE 3.8 – (a) Protocole de culture des cellules musculaires C2C12 comprenant une étape d'ensemencement, suivie des phases de prolifération et de différenciation. Les cellules différenciées (myotubes) sont ensuite utilisées pour les expérimentations de stimulation électrique. (b) Matériel et protocole de stimulation appliqué aux 12 puits de culture (2 plaques de 6 puits) : les signaux sont biphasiques asymétriques, de durée fixée et d'amplitude variable.

### Protocole de stimulation électrique

La stimulation électrique est assurée par le système de stimulation et les électrodes C-dish présentés dans la *Section 3.2.2*. Les signaux de stimulation sont créés par l'intermédiaire de l'interface logicielle, enregistrés dans un générateur de forme arbitraire et délivrés par le générateur et l'interface électronique permettant de démultiplexer et distribuer les signaux de stimulation aux différents puits de culture (*Figure 3.8(b)*).

Les signaux de stimulation appliqués sont **biphasiques asymétriques** : les durées des impulsions positives et négatives ont été fixées respectivement à 5 ms et 10 ms (*Figure 3.8(b)*). Avec notre modèle d'électrodes C-dish, le fabricant recommande d'appliquer des tensions de stimulation comprises entre 9 et 13 V. Les amplitudes de tension de stimulation appliquées sont comprises entre 2,5 et 12,5 V (*Figure 3.8(b)*) dans le but de :

- déterminer les valeurs de courant minimales permettant le recrutement des cellules C2C12 ;
- étudier l'effet de l'augmentation d'amplitude sur le taux de recrutement des fibres musculaires.

Cet intervalle de valeurs génère des courants de stimulation compris entre 10 et 50 mA (*Tableau 3.2*). Ces signaux ont été appliqués pendant plusieurs jours, à une fréquence de 1 Hz, afin de déterminer la durée maximale de maintien des cellules sur le support de culture. Des essais de stimulation à plus haute fréquence (2, 4 et 10 Hz) ont également été réalisés afin d'étudier l'effet de l'augmentation de la fréquence de stimulation et déterminer la fréquence de fusion <sup>7</sup>.

TABLEAU 3.2 – Valeurs de courant de stimulation selon la tension appliquée aux électrodes C-dish (valeurs pic).

<b>Tension de stimulation (V)</b>	2,5	5	7,5	10	12,5
<b>Courant de stimulation (mA)</b>	10	20	30	40	50

Durant les périodes de stimulation, les cellules ont été régulièrement observées par l'intermédiaire d'un microscope inversé, et des **enregistrements vidéos** ont été réalisés avec un appareil (Canon EOS 2000D) à une fréquence de 25 images par secondes et une résolution de 24,1 mégapixels. L'analyse des images vidéos (*c.f. Section 3.4.1, équation 3.5*) permet de mettre en évidence les zones dans lesquelles ont lieu les contractions musculaires. Pour cela, un programme Python convertit les images en niveaux de gris et calcule la différence entre une image de référence (sans contraction) et les images suivantes. Les images résultantes sont ensuite colorées pour afficher les zones de contractions avec des couleurs plus claires : plus il y a de mouvements, plus les pixels seront de couleur proche du jaune et du rouge, tandis que dans le cas contraire ils prendront une couleur plus froide (bleu). Ces analyses sont réalisées sur l'ensemble des pixels de chaque image, à partir de vidéos filmées au centre de chaque puits.

#### 3.2.3.2 Résultats

Après cinq jours de différenciation, de nombreux myotubes sont présents dans l'ensemble des puits : ils mesurent entre 200  $\mu\text{m}$  et 2 mm de longueur, pour une largeur

<sup>7</sup>. La fréquence de fusion est la fréquence de stimulation (naturelle ou artificielle) à partir de laquelle les secousses musculaires fusionnent en une longue contraction continue, aussi appelée tétanie parfaite.

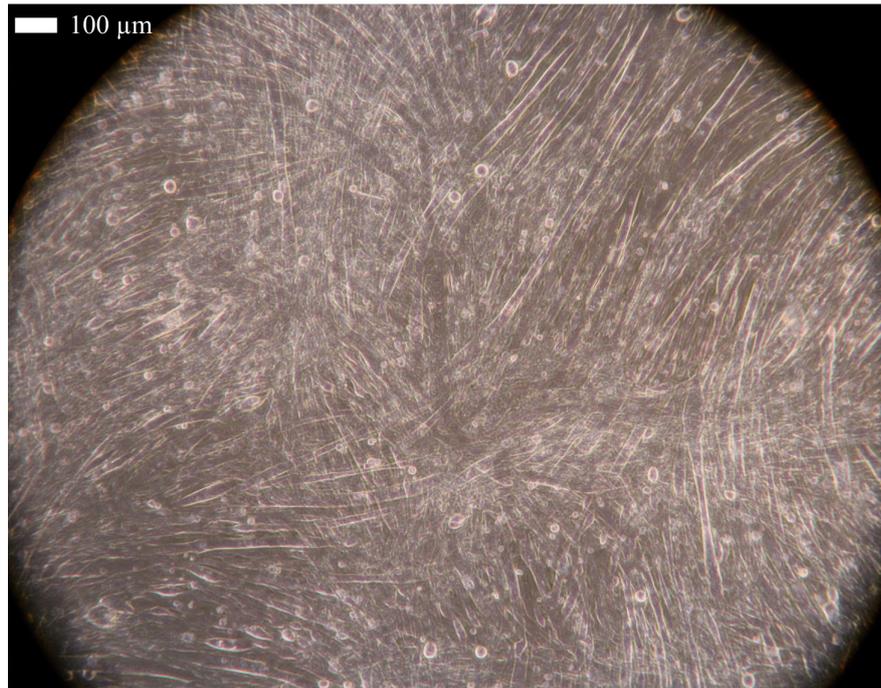


FIGURE 3.9 – Photographie des cellules musculaires C2C12 après 5 jours de différenciation sur support de culture en plastique.

comprise entre 10 et 50  $\mu\text{m}$ . Des contractions spontanées (sans stimulation électrique) ont été observées dans tous les puits, indiquant que les myotubes sont bien différenciés et contractiles.

Les résultats des analyses vidéos sont présentés en *Figure 3.10*, à raison de deux puits stimulés avec une même valeur de courant. Les zones contractiles, qui ressortent en couleurs chaudes, sont observées dès le début de la stimulation. Mais bien que l'on ait constaté des contractions dans l'ensemble des puits, nous remarquons globalement que **plus l'amplitude de courant de stimulation est grande, plus l'étendue des zones contractiles est importante**. Les contractions ont persisté pendant 8 jours, pendant lesquels nous avons observé une augmentation du nombre de myotubes contractiles et des surfaces présentant des contractions (*Figure 3.11*). Après 16 jours suivant l'ensemencement, les cellules se sont décollées de leur support de culture. Cette expérience nous permet de définir une gamme de courants de stimulation pertinente, sans toutefois nous indiquer de valeur minimale de courant générant des contractions.

Nous avons aussi testé des fréquences de stimulation comprises entre 1 et 10 Hz, dans le but de déterminer la fréquence de fusion. Les profils de contraction selon la fréquence de stimulation sont présentés en *Figure 3.12*. Ces derniers ont été définis à partir de l'équation 3.5 (*c.f. Section 3.4.1*) : les amplitudes représentent la moyenne des variations d'intensité des pixels d'une image donnée par rapport à l'image initiale (sans contraction). Une fréquence de stimulation de 1 Hz déclenche des **secousses musculaires**<sup>8</sup>. L'augmentation de la fréquence entraîne la sommation des secousses

8. Une secousse musculaire est une contraction provoquée par un seul influx nerveux (ou un seul stimulus électrique), composée d'une phase de contraction et d'une phase de relaxation. 4.

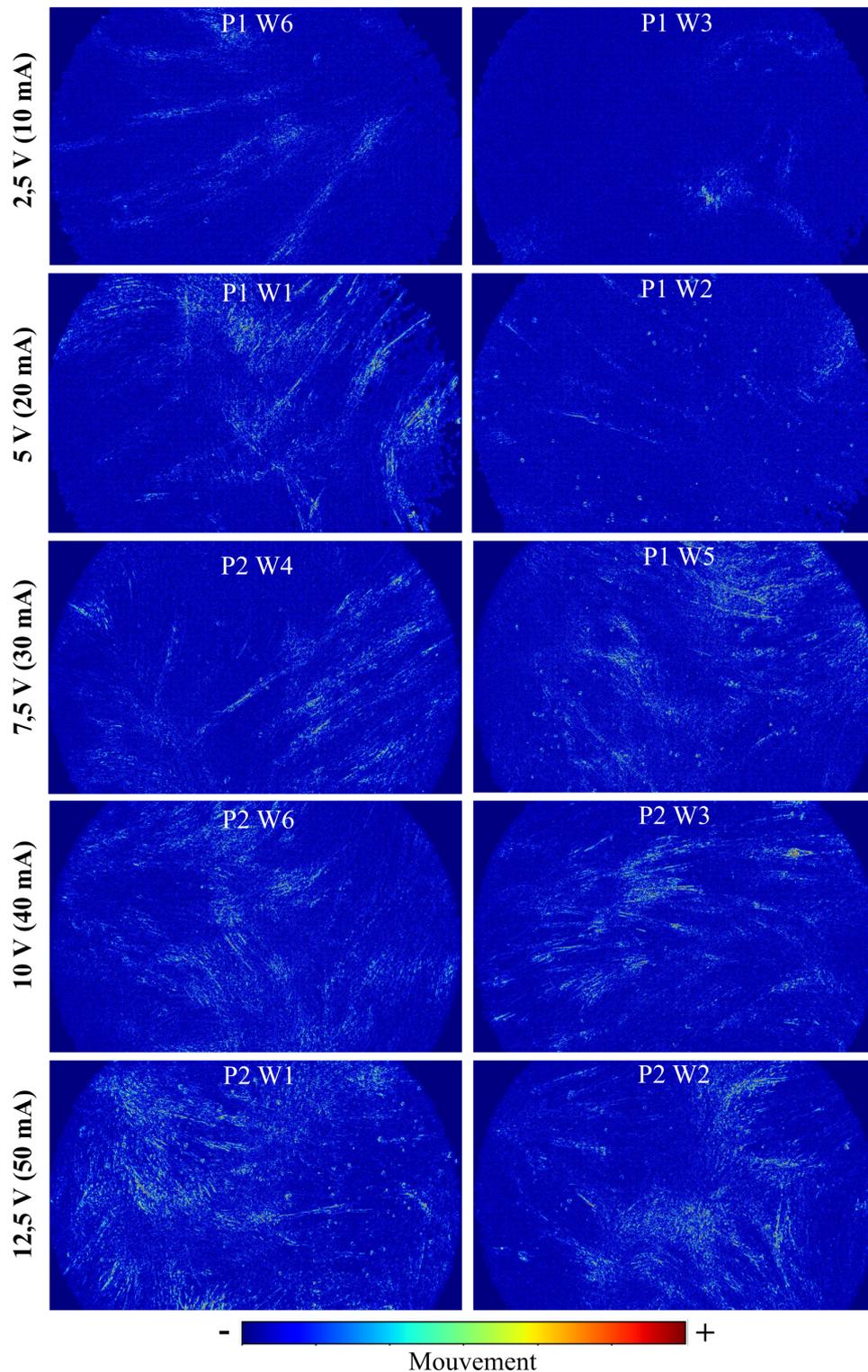


FIGURE 3.10 – Zones contractiles lors du premier jour d'application de la stimulation électrique à 1 Hz (vidéos filmées au centre de chaque puits) selon les valeurs de courant de stimulation. Chaque ligne (2 images) correspond à une valeur de courant de stimulation, appliqué sur deux puits référencés  $P_i W_j$ . Les zones présentant des contractions sont affichées dans des couleurs plus chaudes.

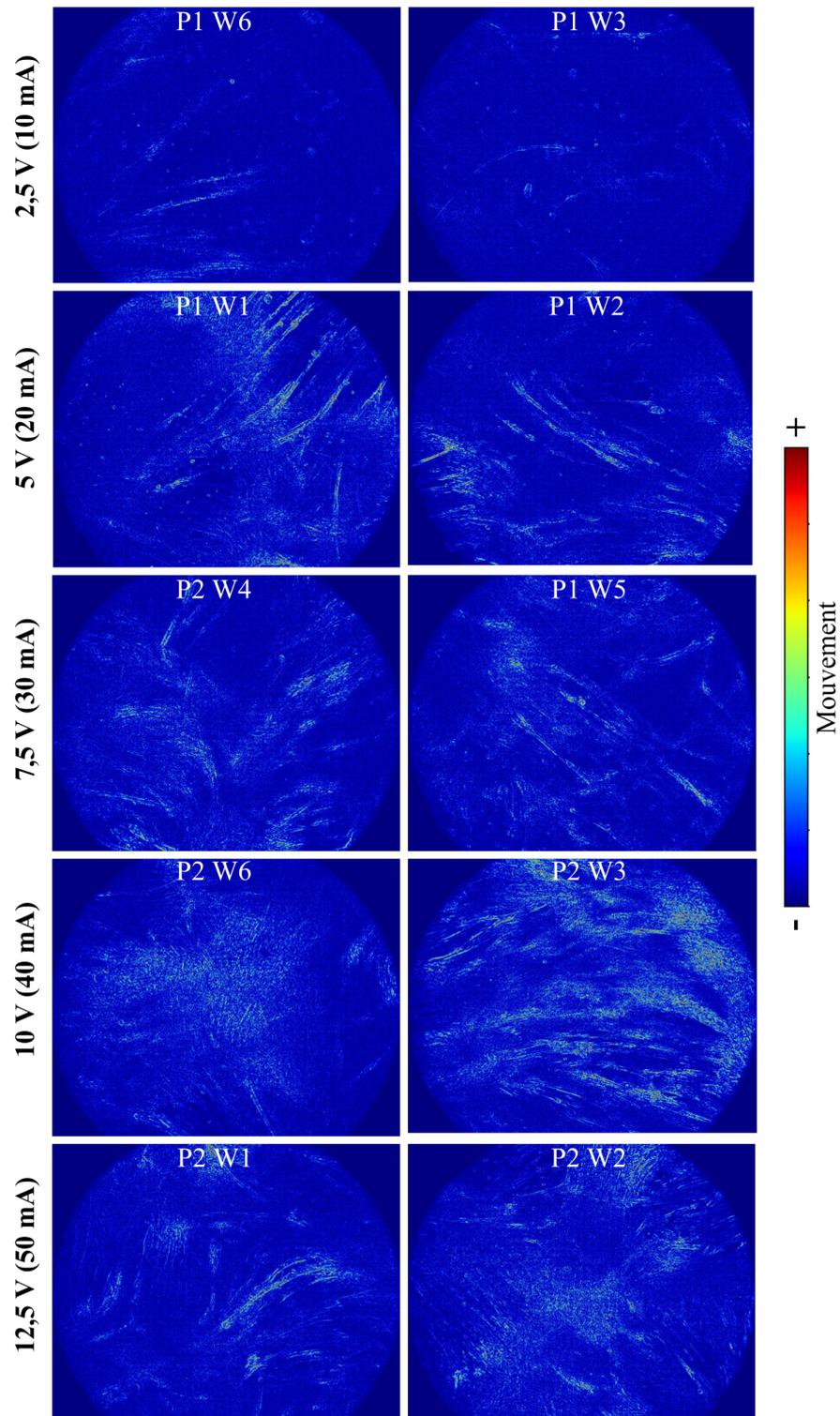


FIGURE 3.11 – Zones contractiles lors du huitième jour d’application de la stimulation électrique à 1 Hz (vidéos filmées au centre de chaque puits) selon les valeurs de courant de stimulation. Chaque ligne (2 images) correspond à une valeur de courant de stimulation, appliqué sur deux puits référencés  $P_i W_j$ . Les zones présentant des contractions sont affichées dans des couleurs plus chaudes.

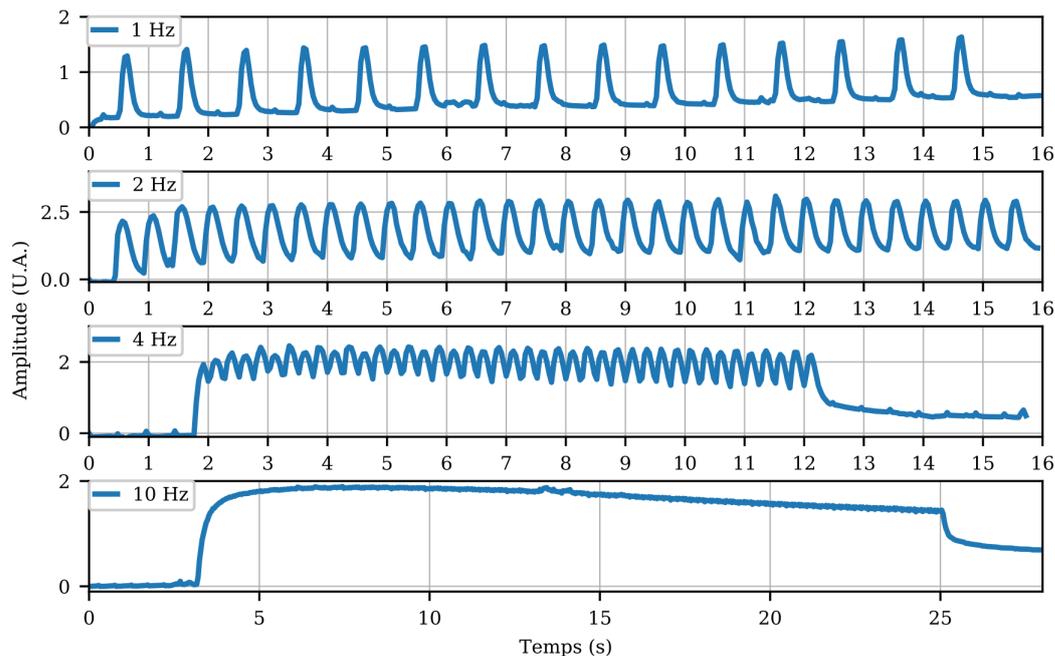


FIGURE 3.12 – Profils de contraction en fonction de la fréquence de stimulation.

musculaires pour générer des **contractions tétoniques**<sup>9</sup> imparfaites (4 Hz sur la *Figure 3.12*), ou parfaites (10 Hz sur la *Figure 3.12*). Les résultats obtenus sont cohérents avec l'étude [197].

Concernant l'influence des durées d'impulsions, nous n'avons pas pu extraire de résultats des expérimentations réalisées. En effet, il s'agissait des tous premiers essais de culture des cellules musculaires C2C12 qui ont abouti à un décollement systématique des cellules du support de culture au moment du passage en différenciation. A l'époque, nous n'obtenions que trop peu de myotubes pour pouvoir continuer les expériences. Nous avons supposé que cela provenait d'un nombre important de passages des cellules, bien que nous ne connaissions pas ce chiffre. Cependant, les expérimentations présentées ci-dessus ont été réalisées avec des cellules ayant subi un nombre de passages plus réduit et ont permis d'aboutir à la formation de myotubes fonctionnels et contractiles.

Finalement, les expériences réalisées nous ont permis de :

- prendre en main le protocole de culture des cellules musculaires C2C12 ;
- comprendre l'impact du nombre de passages sur le processus de prolifération et de différenciation des cellules musculaires C2C12 ;
- valider le système de stimulation électrique ;
- déterminer une gamme de courants et de fréquences de stimulation permettant d'obtenir une variété d'activité contractile.

9. Une contraction tétonique est la sommation de plusieurs secousses musculaires, en réponse à des stimuli de fréquence élevée. Un stimulus unique déclenche une secousse. Lorsqu'un second stimulus excite la fibre pendant la phase de relaxation de la première contraction, cela déclenche une nouvelle contraction et empêche le relâchement complet de la fibre musculaire. Plus la fréquence des stimuli augmente, plus les secousses fusionnent en une longue contraction continue (tétanos parfait).

### 3.3 Conception du système de mesure de bioimpédance

Une fois le système de stimulation validé, nous avons conçu un système de mesure de bioimpédance comprenant des électrodes et l'électronique nécessaire à la génération du courant de mesure et à l'acquisition de la tension résultante (ou inversement). Cette section présente un bref état de l'art des systèmes de mesure bioimpédance *in vitro*, les choix technologiques réalisés et finalement la caractérisation du système de mesure conçu.

#### 3.3.1 Etat de l'art des systèmes de mesure de bioimpédance *in vitro*

Les principes de la mesure de bioimpédance sont décrits en *Section 2.2.5* et nous détaillons ici sa mise en oeuvre dans des conditions *in vitro*.

A la différence des électrodes de stimulation, les électrodes de mesure de bioimpédance doivent se trouver au plus près des cellules. Dans un contexte *in vitro*, on distingue 2 grands types d'électrodes : les matrices de microélectrodes (MEA) et les électrodes interdigitées [169, 170, 198].

Les **MEA**, déjà présentés dans la *Section 3.2.1*, comprennent un grand nombre d'électrodes indépendantes et micrométriques : typiquement 60 électrodes de diamètre 10 ou 30  $\mu\text{m}$ , espacées de 100 ou 200  $\mu\text{m}$  et réparties sur une matrice  $8 \times 8$ . Ce type d'électrode permet de réaliser un grand nombre de mesures sur une même culture, dans différentes zones et configurations en termes d'orientation et de surface d'échantillon selon les électrodes choisies pour réaliser la mesure. Cependant, leur surface micrométrique leur confère une impédance importante (*c.f. Section 2.2.4.2*).

Les **électrodes interdigitées** sont constituées de 2 électrodes en forme de peignes imbriqués. Un exemple d'une plaque de culture multipuits avec électrodes interdigitées commercialisée par Agilent est présenté en *Figure 3.13(a)*. Ce type d'électrode crée une large surface de contact avec l'échantillon, leur conférant donc une impédance bien plus faible que les MEA (*Figure 3.13(b)*).

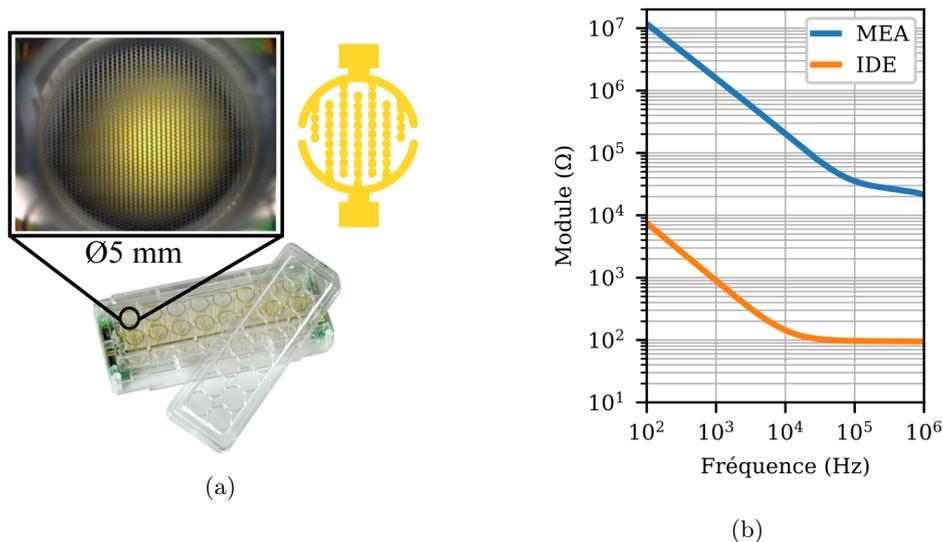


FIGURE 3.13 – (a) Structure d'électrodes interdigitées : photographie d'un modèle commercialisé par Agilent (E-plate 16) et vue schématique. (b) Exemples d'impédance d'électrodes interdigitées (IDE, E-plate 16 commercialisées par Agilent) et de matrices de microélectrodes (MEA, MEA60-200-Pt comprenant 59 électrodes de 30  $\mu\text{m}$  de diamètre, espacées de 200  $\mu\text{m}$  et commercialisées par MicroElectrode Devices).

Pour notre application, nous avons besoin d'un support de culture nous permettant l'**observation** des cellules musculaires. En effet, nous souhaitons nous assurer que celles-ci se contractent sous l'effet de la stimulation mais aussi surveiller et évaluer leur activité contractile au cours du temps. Cette contrainte exclut donc l'utilisation des électrodes interdigitées. Malgré leur impédance élevée, les MEA présentent plusieurs avantages pour notre application. Les multiples électrodes réparties sur une surface importante vont nous permettre de choisir les zones de mesures et privilégier celles dans lesquelles se trouvent des cellules contractiles. De plus, nous pourrions également choisir l'orientation des mesures et possiblement évaluer l'impact de l'anisotropie des cellules sur la mesure de bioimpédance. Pour réduire l'impédance d'interface des MEA, nous choisirons d'utiliser des MEA comprenant des électrodes les "plus larges" possibles, c'est-à-dire  $30\ \mu\text{m}$  de diamètre. De plus, nous verrons plus loin dans la *Section 3.3.4.2* que le choix du matériau constituant les électrodes permet de réduire davantage l'impédance d'interface. Finalement, afin d'avoir une "large" zone couverte par les électrodes de mesures, nous choisirons un modèle de MEA dont les électrodes sont les plus espacées possibles. En effet, nous souhaitons maximiser le nombre de myotubes contractiles proches des électrodes. Or nous avons vu (*c.f. Section 3.2.3.2*) que les myotubes peuvent atteindre plusieurs centaines de micromètres voire plusieurs millimètres de long et être inégalement répartis sur le support de culture. Notre choix se portera alors sur un modèle dont les électrodes sont espacées de  $200\ \mu\text{m}$ , permettant aux 60 électrodes de couvrir une zone de  $1,4 \times 1,4\ \text{mm}$ .

Pour réaliser les mesures de bioimpédance, nous avons le choix d'utiliser un analyseur d'impédance ou un circuit plus intégré, réalisé au sein du laboratoire LIRMM [199]. Cependant, en raison de problèmes techniques et de retards dus à la crise sanitaire, nous n'avons pas pu exploiter ce circuit. Aussi, les effets de la stimulation électrique sur la bioimpédance des cellules musculaires C2C12 n'ayant jamais été étudiés auparavant, le choix d'utiliser un instrument de référence s'est imposé. Nous avons alors choisi l'**analyseur d'impédance** Keysight E4990A dont les caractéristiques techniques sont résumées dans le *Tableau 3.3*. Cet instrument permet de mesurer des impédances sur un large intervalle de fréquence avec une grande précision (1% entre 20 Hz et 10 MHz pour des impédances comprises entre  $300\ \text{m}\Omega$  et  $4\ \text{M}\Omega$ , *c.f. Annexe A*). Le signal d'excitation peut être réglé en courant ou en tension (de  $5\ \text{mV}_{\text{rms}}$  à  $1\ \text{V}_{\text{rms}}$ , de  $200\ \mu\text{Arms}$  à  $20\ \text{mArms}$ ). Les faibles amplitudes du courant d'excitation permettent d'éviter de stimuler et provoquer des contractions musculaires lors des mesures de bioimpédance.

### 3.3.2 Conception d'interfaces et d'électrodes de stimulation adaptées

Pour réaliser les mesures de bioimpédance, nous avons fait le choix d'utiliser des matrices de microélectrodes (MEA). Afin de connecter les électrodes à l'analyseur d'impédance, nous avons conçu un support custom (*Figure 3.14*), réalisé par impression 3D. Il permet le maintien du MEA et l'accès à l'ensemble des électrodes par l'intermédiaire de contacts à ressort et de connecteurs. Un PCB comprenant des connecteurs SMA permet de relier 2 ou 4 électrodes d'un MEA aux 4 connecteurs BNC de l'analyseur d'impédance Keysight E4990A.

Avec l'aide de Gilles N'Kaoua, nous avons également fabriqué des macroélectrodes de stimulation adaptées aux MEA. En s'inspirant des électrodes C-dish (IonOptix), nous avons utilisé une plaque de graphite d'épaisseur 4 mm pour usiner des électrodes de dimensions  $4 \times 4 \times (\text{h})\ 22.5\ \text{mm}$ . Ces dernières sont vissées sur un PCB, qui peut être placé sur les connecteurs du support que nous avons conçu, permettant de

TABLEAU 3.3 – Caractéristiques techniques de l’analyseur d’impédance Keysight E4990A

Fréquence de mesure	20 Hz - 50 MHz
Résolution	1 mHz
Amplitude de tension	5 mVrms - 1 Vrms
Résolution	1 mV
Amplitude de courant	200 $\mu$ Arms - 20 Arms
Résolution	20 $\mu$ A
Gamme d’impédance	25 m $\Omega$ - 40 M $\Omega$
Type de mesure	Balayage linéaire, logarithmique
Nombre de points	2 - 1601
Paramètres mesurables	$ Z $ , $\theta_z$ , $ Y $ , $\theta_y$ , $C_p$ , $L_p$ , $L_s$ , $R_p$ , $R_s$ (R), D, Q, X, G, B, Z complexe, Y complexe
Précision	0,08% - 10% ( <i>c.f. Annexe A</i> )
Temps de mesure	1 (rapide) - 5 (précis) (paramètre Measurement Time, <i>c.f. Annexe A</i> )
Connectique	4 BNC
Communication	USB, GPIB, LAN
Types de calibration	OPEN (circuit ouvert), SHORT (court-circuit), LOAD (charge)

positionner les électrodes dans le puits de culture (*Figure 3.14*). Le PCB comprend un connecteur d’entrée pour le signal de stimulation et un trou central qui rend possible la visualisation des cellules sous un microscope.

### 3.3.3 Choix technologiques des MEA et mise au point du protocole de culture

Dans cette section, nous expliquons la mise au point du protocole de culture adapté au nouveau support (MEA) et les caractéristiques technologiques retenues, qui concernent notamment la couche de passivation et le matériau constituant les électrodes.

**Bien que cette section n’occupe qu’une partie limitée du manuscrit, nous tenons à souligner que ces étapes expérimentales se sont révélées longues et complexes, particulièrement pour l’obtention d’un bon maintien des cellules sur le support.**

#### 3.3.3.1 Mise au point du protocole de culture : choix du coating

Notre banc de test intègre l’utilisation de MEA comme support de culture. Ce nouveau support se trouve être plus rigide que les puits en plastique utilisés dans la *Section 3.2.3*. La revue [178] évoque la difficulté liée à l’utilisation de support rigide : ces derniers entraînent le détachement des myotubes contractiles, ce qui raccourcit

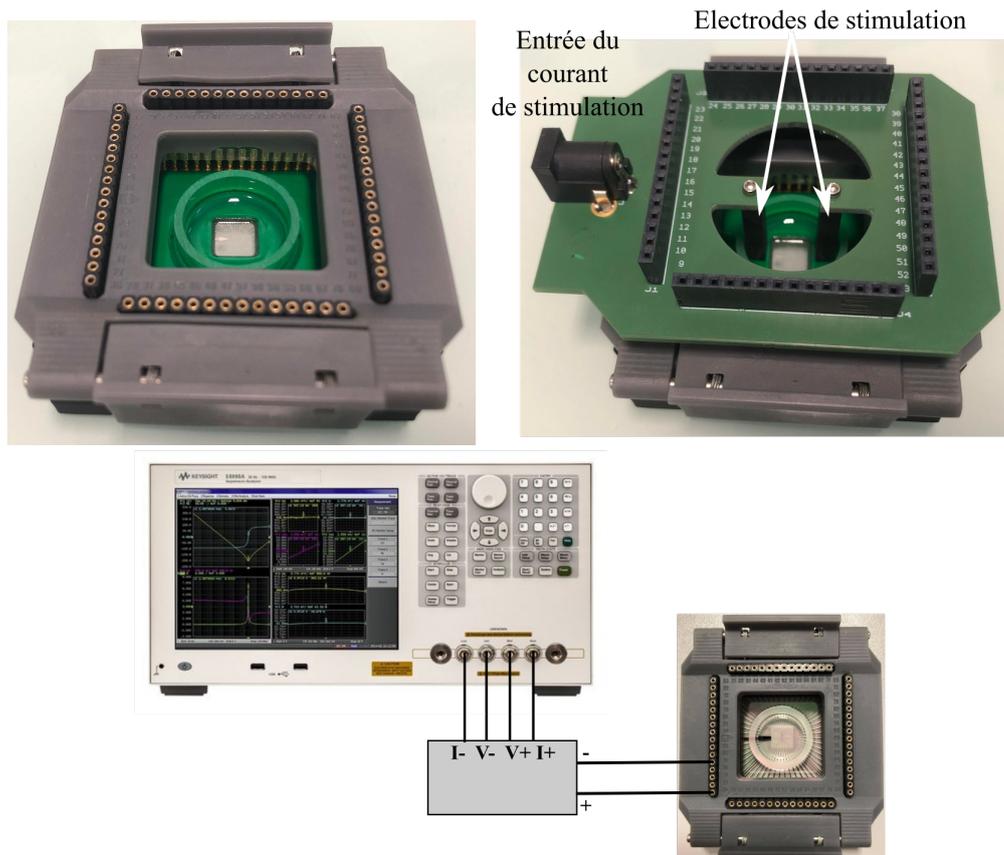


FIGURE 3.14 – Photographies du support adapté aux MEA (gauche), des électrodes de stimulation avec leur PCB de support (droite) et schéma de l'ensemble du système de mesure de bioimpédance (bas).

considérablement la durée des cultures. Toutefois, il est possible de remédier à ce problème en utilisant des **protéines de matrice extracellulaire** (*coating* en anglais) pour améliorer l'adhésion des cellules sur le support. Nous avons alors réalisé des essais de culture avec et sans coating. Dans la littérature, on recense différentes protéines de coating utilisés pour la culture de cellules musculaires *in vitro* : la laminine [200], la poly-L-lysine (PLL) [201], le polyéthylimine (PEI) [202] et le Matrigel [203].

### Protocoles

Avant ensemencement, cinq MEA (modèles de MultiChannel Systems, 59 micro-électrodes en PEDOT-CNT ou Titane, couche de passivation en nitrure de silicium, SiN) ont été nettoyés dans un bain d'éthanol à 70%, puis stérilisés par autoclave à 56°C pendant une nuit. Puis chaque protéine de matrice extracellulaire a été appliqué sur un MEA, selon les procédures suivantes :

- le PEI est déposé dans un MEA, laissé à 4°C pendant une nuit ;
- la PLL est déposé dans un MEA, laissé à 37°C pendant une nuit avant de retirer le surnageant le lendemain ;
- la laminine est déposée dans un MEA, laissé 2 heures à 37°C avant d'enlever le surnageant ;
- le matrigel est déposé dans un MEA, laissé 2 heures à température ambiante, avant d'enlever le surnageant et de laisser sécher 2 heures à température ambiante.

Ensuite, 2000 cellules C2C12 (passage  $< 10$ ) ont étéensemencées dans les cinq MEA, avec 1 mL de milieu de prolifération (DMEM, 10% FBS, 1% antibiotiques). A environ 90% de confluence cellulaire, le milieu de prolifération est remplacé par le milieu de différenciation (DMEM, 2% HS, 1% antibiotiques) pour induire la formation de myotubes (cellules musculaires différenciées capables de se contracter). Chaque jour, le milieu est renouvelé et les cellules sont inspectées visuellement sous microscope.

## Résultats

La *Figure 3.15* illustre la morphologie des cellules après deux jours en milieu de prolifération. Nous pouvons constater que la morphologie et l'adhésion des cellules sont très variables selon les conditions de coating. Sans protéines de coating (*Figure 3.15(a)*), ou avec laminine (*Figure 3.15(b)*), les cellules sont confluentes, peu allongées. Avec les protéines PEI (*Figure 3.15(c)*) et PLL (*Figure 3.15(d)*), il apparaît clairement que les cellules n'ont pas adhéré au support et forment plutôt des amas cellulaires. Avec le Matrigel (*Figure 3.15(e)*), les cellules sont confluentes et présentent une morphologie plus allongée, comparable à celle obtenue lors des expérimentations précédentes dans les puits en plastique (*Figure 3.15(f)*).

Nos résultats démontrent la **nécessité d'utiliser un coating** pour le maintien des cellules sur le support, et plus particulièrement le **Matrigel**. Malgré cela, il faut noter que la durée des cultures est très limitée dans le temps et ne permet pas de réaliser des expérimentations de stimulation électrique puisque les cellules se décollent après quatre ou cinq jours de différenciation. Nous avons émis l'hypothèse que le problème de décollement systématique des cellules provenait de la couche de passivation des MEA, faite en nitrure de silicium (SiN). Les matériaux inorganiques tel que le SiN présentent une grande rigidité (module d'élasticité  $E \sim 200$  GPa), bien plus importante que des matériaux tel que le SU-8 ( $E \sim 1$  GPa) [204]. C'est pourquoi nous avons exploré cette piste et testé un nouveau modèle de MEA présentant une couche de passivation différente, moins rigide (SU-8).

### 3.3.3.2 Effet de la couche de passivation

Afin d'augmenter la durée des cultures des cellules musculaires C2C12 sur MEA, nous avons fait l'acquisition d'un nouveau modèle de MEA, commercialisé par MicroElectrodeDevices<sup>10</sup>. Ce modèle a été conçu pour être compatible avec les instruments et supports de MultiChannel Systems (MCS), et comprend donc le même nombre d'électrodes (59 électrodes et une référence), avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$ . La différence se trouve au niveau de la couche de passivation, faite en SU-8, contre une couche de passivation en SiN pour les modèles MCS. Avec le nouveau modèle (MEA60-200-30), nous avons réalisé de nouveaux tests de culture.

## Protocoles

Avant ensemencement, quatre MEA (deux modèles MicroElectrodeDevices avec une couche de passivation en SU-8 et deux modèles MCS avec une couche de passivation en SiN) ont été nettoyés dans un bain d'éthanol à 70% et stérilisés par autoclave à 56°C pendant une nuit. Le lendemain, l'étape de **coating** a consisté à déposer 200  $\mu\text{L}$  de Matrigel dilué à 5% dans du PBS et à attendre deux heures. Puis le surnageant (liquide restant) est retiré et les MEA sont laissés à température ambiante sous une hotte pour permettre le séchage du Matrigel. Ensuite, 2000 cellules musculaires

10. <https://microelectrodedevices.com/mea-products/>

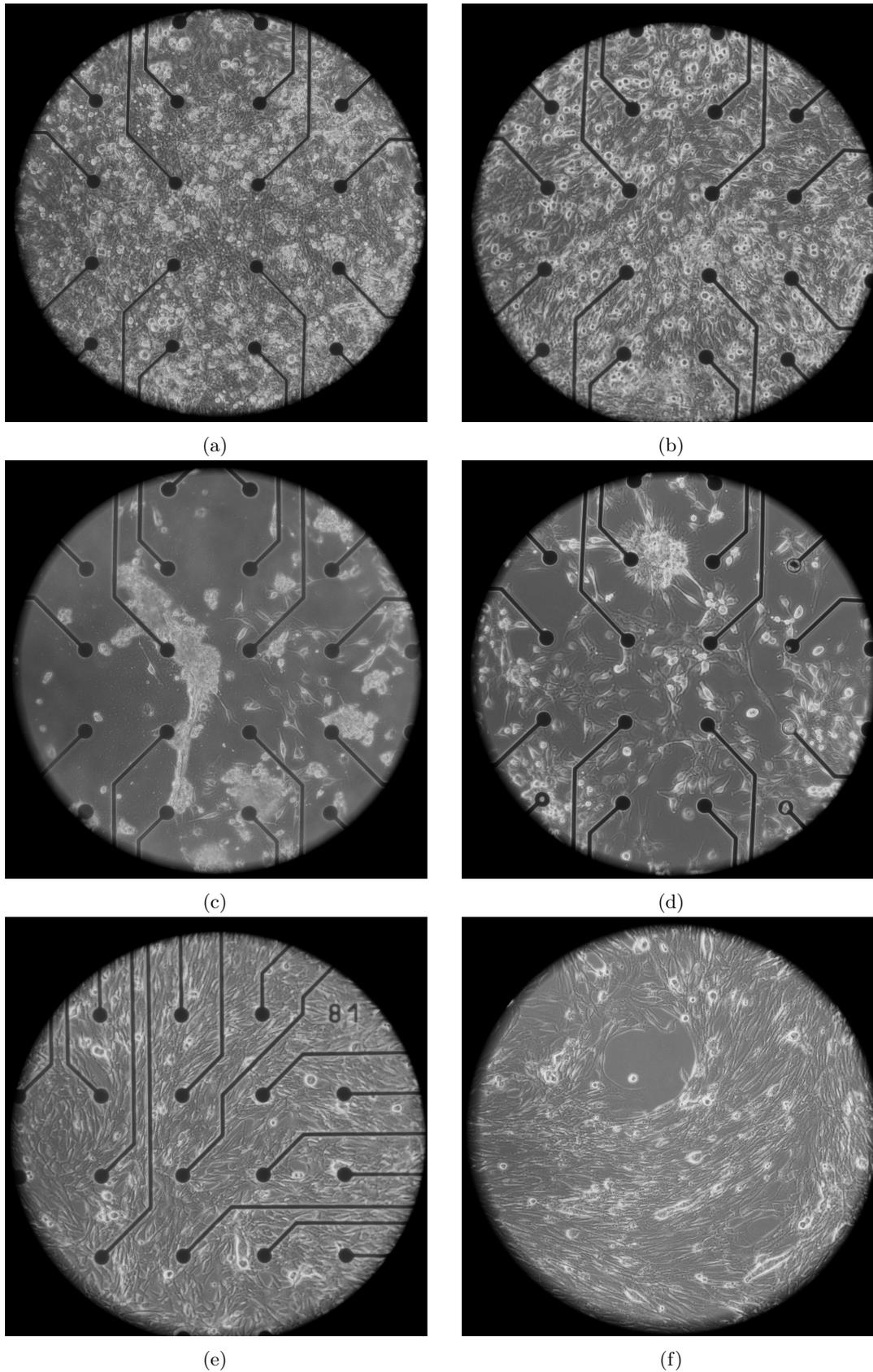


FIGURE 3.15 – Photographies des cellules C2C12 après 2 jours de culture (a) sans coating, avec coating (b) laminine, (c) PEI, (d) PLL, (e) Matrigel. (f) Photographie extraite de précédentes expérimentations, dans des puits en plastique pour comparer les morphologies des cellules dans les différentes conditions de culture.

C2C12 (passage < 10) ont étéensemencées dans chaque MEA. Après deux heures d'attente (pour permettre l'adhésion des cellules au support de culture), 1 mL de milieu de prolifération est ajouté (DMEM, 10% FBS, 1% d'antibiotiques). Comme dans les expérimentations précédentes, à environ  $\sim 90\%$  de confluence cellulaire, le milieu de prolifération est remplacé par le milieu de différenciation (DMEM, 2% HS, 1% antibiotiques) pour induire la formation de myotubes. Chaque jour, le milieu est renouvelé et les cellules sont inspectées visuellement sous microscope.

### Résultats

Après trois jours de prolifération, les cellules ont atteint  $\sim 90\%$  de confluence sur les MEA de MicroElectrodeDevices seulement (*Figure 3.16*). Les cellules cultivées sur les modèles MCS se sont décollées après seulement un ou deux jours de différenciation, tandis que celles cultivées sur les modèles de MicroElectrodeDevices ont tenu plus de dix jours après le début de la phase de différenciation. Sur ces derniers, nous avons pu observer la formation de myotubes à partir de trois jours de différenciation (*Figure 3.17*). Ils mesurent entre 200 à 800  $\mu\text{m}$  de longueur pour une largeur de 15 à 30  $\mu\text{m}$  et sont orientés aléatoirement.

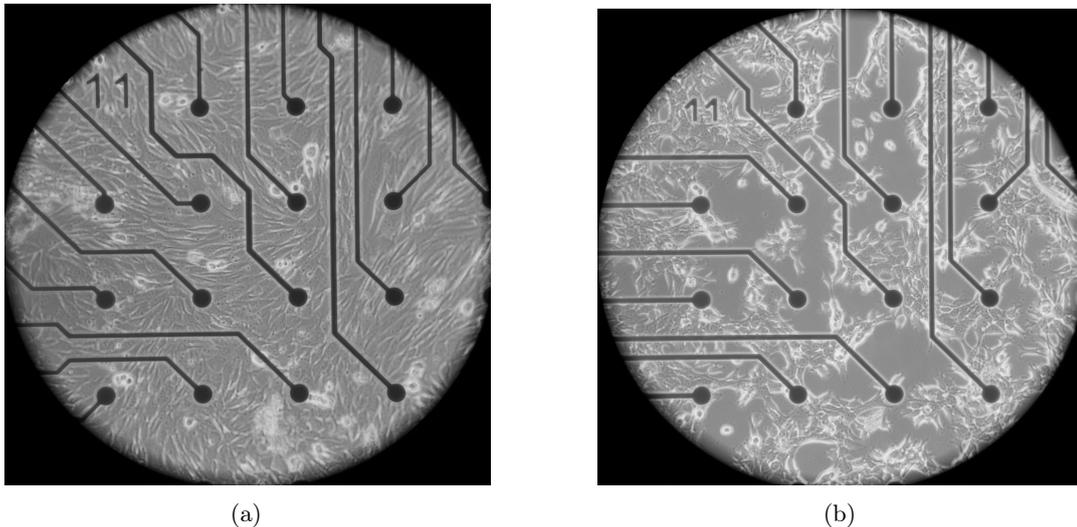


FIGURE 3.16 – Photographies des cellules C2C12 après 3 jours de prolifération sur MEA présentant une couche de passivation en (a) SU-8, ou en (b) SiN.

Ainsi, une **couche de passivation en SU-8** semble plus adaptée et permet de maintenir les cellules pendant plus de treize jours (durée totale de culture avec les phases de prolifération et différenciation) contre cinq à six jours avec une couche de passivation en SiN.

#### 3.3.4 Caractérisation du système de mesure de bioimpédance

Dans la section précédente, nous avons procédé à des essais de culture sur plusieurs modèles de MEA. Nous avons montré que celui possédant une couche de passivation en SU-8 est le plus adapté pour le maintien des cellules musculaires C2C12 sur le support. Après avoir choisi le modèle, nous avons caractérisé notre banc de test pour évaluer sa précision et identifier les éléments parasites présents dans le banc. Cela consiste à relever l'impédance réelle par des mesures pratiques et à les comparer avec les résultats attendus par la simulation.

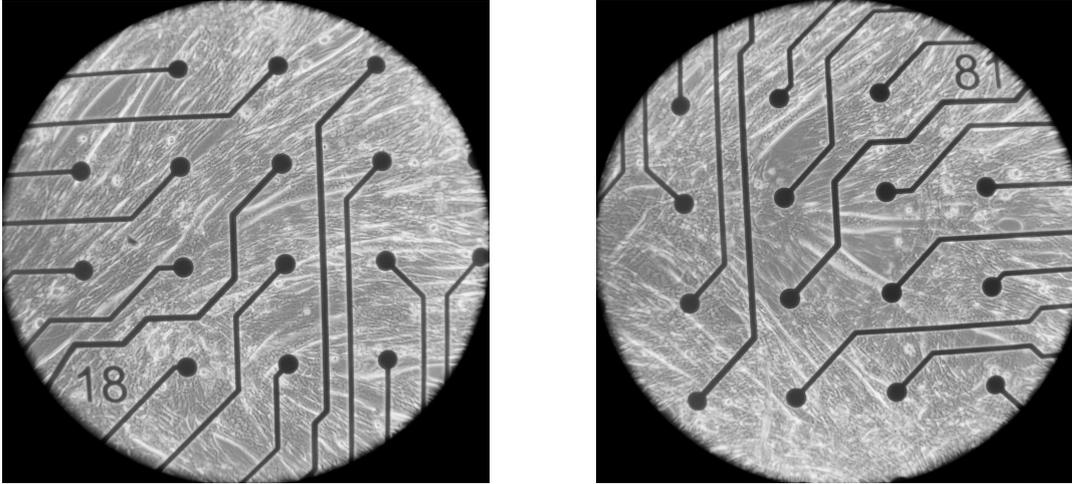


FIGURE 3.17 – Photographies des cellules C2C12 (myotubes) 5 jours de différenciation sur MEA à couche de passivation en SU-8.

### 3.3.4.1 Impédance théorique

Cette étape a été réalisée en collaboration avec l'un de nos partenaires au sein du consortium SMARTSTIM (Julien Claudel, Institut Jean Lamour, Nancy). Pour déterminer l'impédance théorique des électrodes du MEA, une première étape a consisté à caractériser électriquement les différentes solutions utilisées lors des expérimentations, à savoir :

- la solution de tampon salin (Phosphate Buffered Salin, PBS) utilisée pour la mesure de l'impédance réelle des MEA ;
- les deux milieux de culture (milieu de prolifération et milieu de différenciation) ;
- l'eau déionisée (EDI) pour valider les mesures électriques des trois autres milieux.

Pour cela, notre partenaire a utilisé l'analyseur d'impédance Keysight E4990A et une sonde de caractérisation de liquide (16452A Liquid Text Fixture). Une compensation en "court-circuit" a été effectuée avec l'appareil afin de compenser les impédances en série induites par les câbles de connexion. Une compensation de la longueur des câbles (1 m) a aussi été sélectionnée sur l'appareil pour compenser les effets inductifs parasites induits par les câbles. La sonde a été caractérisée à vide afin de déterminer la capacité électrique induite par la permittivité de l'air ( $C_{vide}$ ) et en déduire le facteur de forme ( $K_{cell}$ ) de la sonde selon la relation suivante :

$$K_{cell} = \frac{\epsilon_{r,air}\epsilon_0}{C_{vide}} \text{ avec } \epsilon_{r,air} = 1 \quad (3.1)$$

Nous avons obtenu une capacité à vide d'environ 5,3 pF correspondant à un facteur de forme de  $1,67 \text{ m}^{-1}$ .

Ensuite, les trois milieux ont été caractérisés et leurs propriétés électriques (conductivité, permittivité) ont été calculées à partir des équations suivantes :

$$\begin{aligned} \sigma(\omega) &= \sigma'(\omega) + j\sigma''(\omega) = K_{cell}Y(\omega) \\ \epsilon(\omega) &= j\omega\sigma(\omega) = \epsilon'(\omega) - j\epsilon''(\omega) \end{aligned} \quad (3.2)$$

La partie réelle de la conductivité complexe  $\sigma'(\omega)$  et de la permittivité complexe  $\epsilon'(\omega)$  permettent respectivement d'extraire la conductivité et la permittivité des différentes solutions.

Les courbes de la conductivité  $\sigma'(\omega)$  et de la permittivité relative  $\epsilon'_r(\omega)$  sont illustrées en *Figure 3.18*. Les valeurs de conductivité et de permittivité sont extraites au niveau des plateaux et sont résumées dans le *Tableau 3.4*. La permittivité relative de l'eau déionisée est très proche de celle de l'eau pure (78) et permet donc de valider le calcul du facteur de forme de la sonde utilisée. La permittivité relative d'une solution ionique très conductrice est difficile à obtenir avec la sonde utilisée puisque cela demande de mesurer des impédances très faibles en haute fréquence. Dans cette gamme de fréquence, la mesure est perturbée par les autres impédances du montage. Nous considérons donc que la permittivité relative des solutions ioniques caractérisées est proche de celle de l'eau pure (78). Les conductivités des 3 solutions ioniques (PBS, milieu de prolifération et milieu de différenciation) sont très proches, de l'ordre de 1,4 S/m. C'est pourquoi les caractérisations des MEA présentés plus loin ont été réalisées avec le tampon salin (PBS).

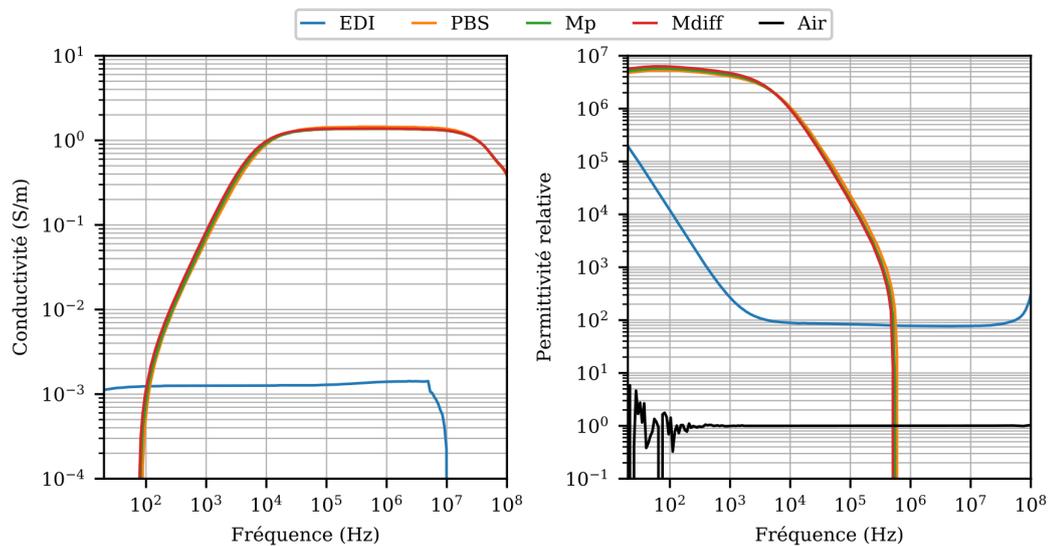


FIGURE 3.18 – Conductivité et permittivité relative de l'eau déionisée (EDI), du tampon salin (PBS), du milieu de prolifération (Mp) et du milieu de différenciation (Mdiff).

TABLEAU 3.4 – Propriétés électriques (conductivité, permittivité relative) et capacités de double couche des différents échantillons caractérisés.

Échantillon	Conductivité (S/m)	Permittivité relative	$C_{dl}$ ( $\mu\text{F}$ )	$C_{dl,S}$ ( $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )
Air	-	1	-	-
Eau déionisée	$1,26 \times 10^{-3}$	77,85	-	-
PBS	1,452	-	28,18	4,97
Milieu de prolifération	1,383	-	30,32	5,35
Milieu de différenciation	1,369	-	33,41	5,89

A partir des mesures d'impédance des solutions, il est possible d'estimer les effets d'interface de chaque milieu. Contrairement aux propriétés intrinsèques du milieu

(conductivité, permittivité), les effets d'interface dépendent de la surface des électrodes de mesure en contact avec le liquide. Le modèle le plus simple est de considérer un effet purement capacitif et de modéliser l'interface par la capacité de double couche  $C_{dl}$ . Cette dernière correspond à la capacité totale des 2 électrodes de mesure, chacune caractérisée par une surface  $S$  et une capacité de double couche surfacique  $C_{dl,S}$  :

$$\begin{aligned} C_{dl1} &= C_{dl,S}S_1 \text{ et } C_{dl2} = C_{dl,S}S_2 \\ C_{dl} &= \frac{C_{dl1}C_{dl2}}{C_{dl1} + C_{dl2}} \leftrightarrow C_{dl,S} = \frac{C_{dl}}{\frac{S_1S_2}{S_1+S_2}} \\ C_{dl} &= \frac{Im(Y(\omega))}{\omega} \end{aligned} \quad (3.3)$$

Les courbes en capacité obtenues sont données en *Figure 3.19*. Pour chaque milieu, les valeurs de capacité de double couche totale sont extraites sur le plateau en basse fréquence, et les capacités de double couche surfacique sont ensuite calculées. Les électrodes de caractérisation des liquides ont une surface de  $11,34 \text{ cm}^2$  chacune. Les valeurs obtenues pour chaque milieu sont présentées dans le *Tableau 3.4*, elles sont entre 5 et  $6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ .

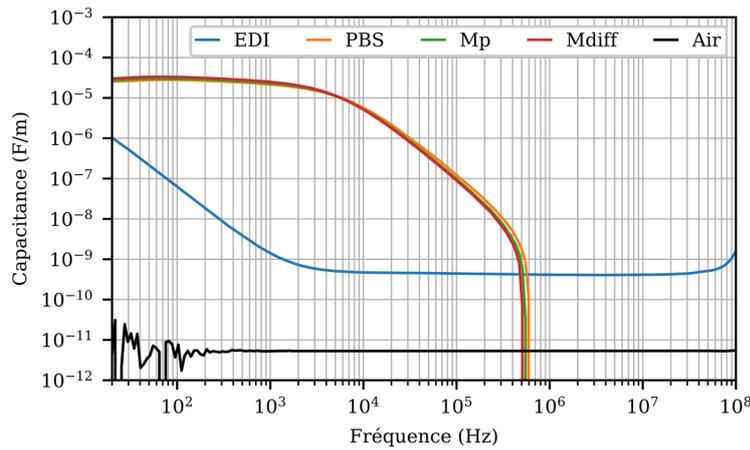


FIGURE 3.19 – Courbe de capacitance de l'air, de l'eau déionisée (EDI), du tampon salin (PBS), du milieu de prolifération (Mp) et du milieu de différenciation (Mdiff).

Finalement, à partir de l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons simuler l'impédance des différents milieux caractérisés précédemment pour différentes géométries d'électrodes :

$$Z(\omega) = Z_{sol} + Z_{interface} = \frac{K_{cell}}{\sigma_{sol} + j\omega\epsilon_r\epsilon_0} + \frac{1}{j\omega C_{dl,S} \frac{S_1S_2}{S_1+S_2}} \quad (3.4)$$

Pour déterminer le facteur de forme correspondant aux microélectrodes de MEA, une simulation par éléments finis a été réalisée avec COMSOL Multiphysics. Celle-ci considère une paire d'électrodes adjacentes de diamètre  $30 \mu\text{m}$  et espacées de  $200 \mu\text{m}$ , un milieu homogène purement résistif de conductivité  $1 \text{ S/m}$ . En courant continu et en négligeant les effets d'interface, nous avons obtenu une résistance de  $30829 \text{ k}\Omega$ , donnant ainsi un facteur de forme  $K_{cell}$  de  $30829$ . A partir de l'équation 3.4, nous avons alors calculé l'impédance théorique d'une paire de MEA dont les résultats sont présentés en *Figure 3.20*.

D'après notre modèle, une paire d'électrodes adjacentes doit présenter une impédance d'environ  $21\text{-}23 \text{ k}\Omega$  en présence de PBS ou de milieu de culture. On note des

effets d'interface importants, masquant les impédances des solutions jusqu'à quelques centaines de kilohertz.

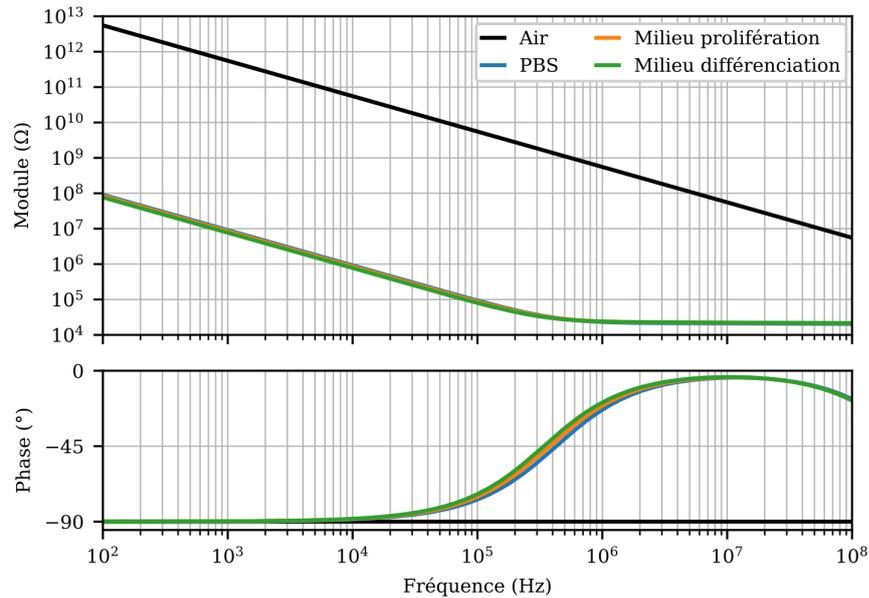


FIGURE 3.20 – Impédance simulée d'une paire de microélectrodes adjacentes de diamètre 30  $\mu\text{m}$ , espacées de 200  $\mu\text{m}$  pour les différents milieux caractérisés.

### 3.3.4.2 Impédance réelle : effet du matériau des électrodes et effets parasites

En parallèle des simulations présentées ci-dessus, nous avons caractérisé trois modèles de MEA. Ces derniers possèdent tous 59 microélectrodes de 30  $\mu\text{m}$  de diamètre, réparties sur une matrice de  $8 \times 8$  et espacées de 200  $\mu\text{m}$ . Les trois modèles se distinguent par le matériau qui constitue leurs électrodes :

- le modèle MEA60-200-30-Pt de MicroElectrodeDevices possédant des électrodes en **Platine** ;
- le modèle MEA60-200-30-PtBlack de MicroElectrodeDevices possédant des électrodes en **Noir de Platine** ;
- le modèle 60PedotMEA200/30iR-Au-gr de MultiChannel Systems possédant des électrodes en poly(3,4-éthylènedioxythiophène) et nanotubes de carbone (**PEDOT-CNT**).

Pour cela, nous avons utilisé l'analyseur d'impédance Keysight E4990A et l'interface permettant de connecter un MEA à l'analyseur (*c.f. Section 3.3.2*). De même pour que la caractérisation des solutions, une compensation en court-circuit a été réalisée, et la compensation des câbles a été sélectionnée. Les mesures ont été réalisées à température ambiante, avec 1 mL de PBS, sur une dizaine de paires d'électrodes adjacentes. Les impédances moyennes des trois modèles sont présentées en *Figure 3.21*.

Nous constatons que la valeur plateau de l'impédance réelle est légèrement supérieure à celle de l'impédance théorique (environ 27 k $\Omega$  contre 21 k $\Omega$ ) pour les électrodes en Platine ou Noir de Platine tandis que les électrodes en PEDOT-CNT présentent une impédance plus faible, d'environ 22 k $\Omega$ . Cependant, les différences majeures se trouvent surtout en basses et hautes fréquences.

En **basse fréquence**, nous remarquons que les **effets d'interface** sont bien **moins importants** sur les mesures réelles. L'effet capacitif de double couche dépend

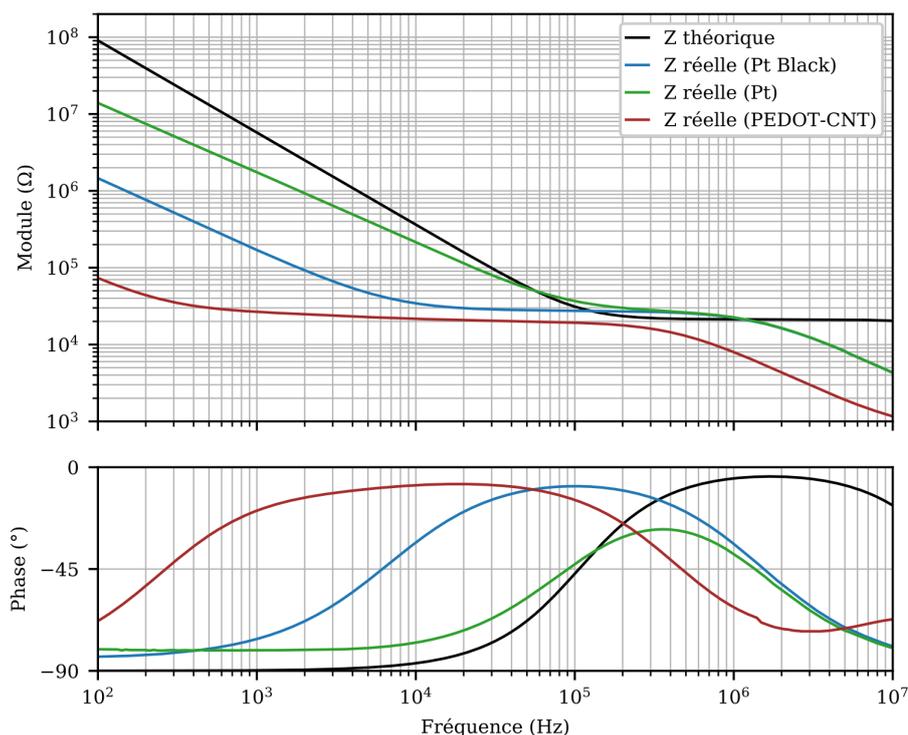


FIGURE 3.21 – Impédance théorique et impédances réelles des trois modèles de MEA considérés, dont les électrodes sont constituées de Platine (Pt), de Noir de Platine (Pt Black) ou de PEDOT-CNT.

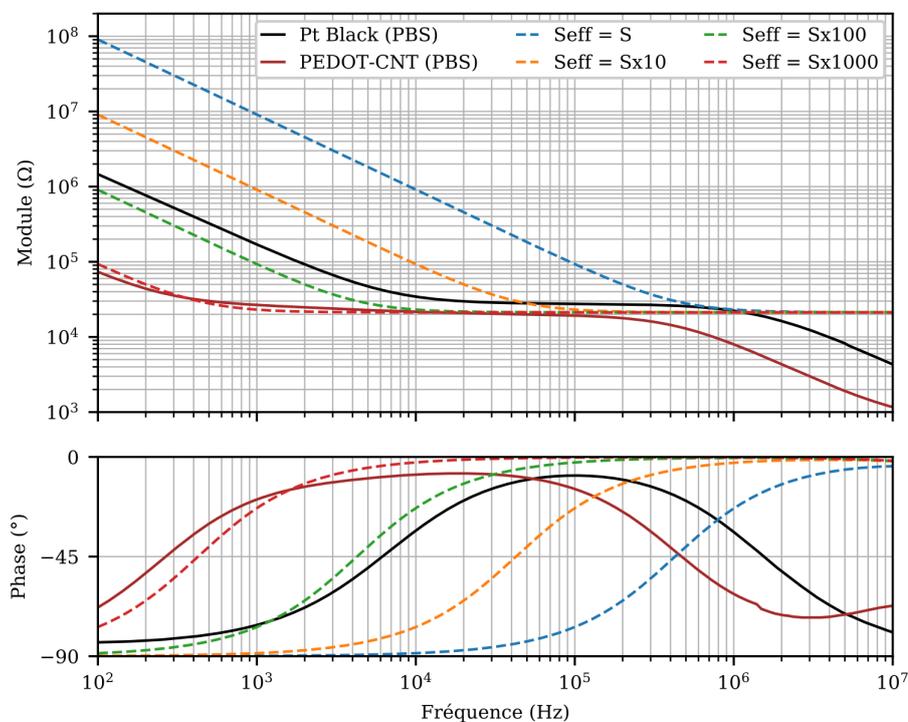


FIGURE 3.22 – Impédances théoriques avec différentes valeurs de surface effective ( $S_{eff}$ ) comprises entre  $S$  (surface réelle des électrodes) et  $S \times 1000$ , et les impédances réelles des MEA dont les électrodes sont constituées de Noir de Platine (Pt Black) ou de PEDOT-CNT.

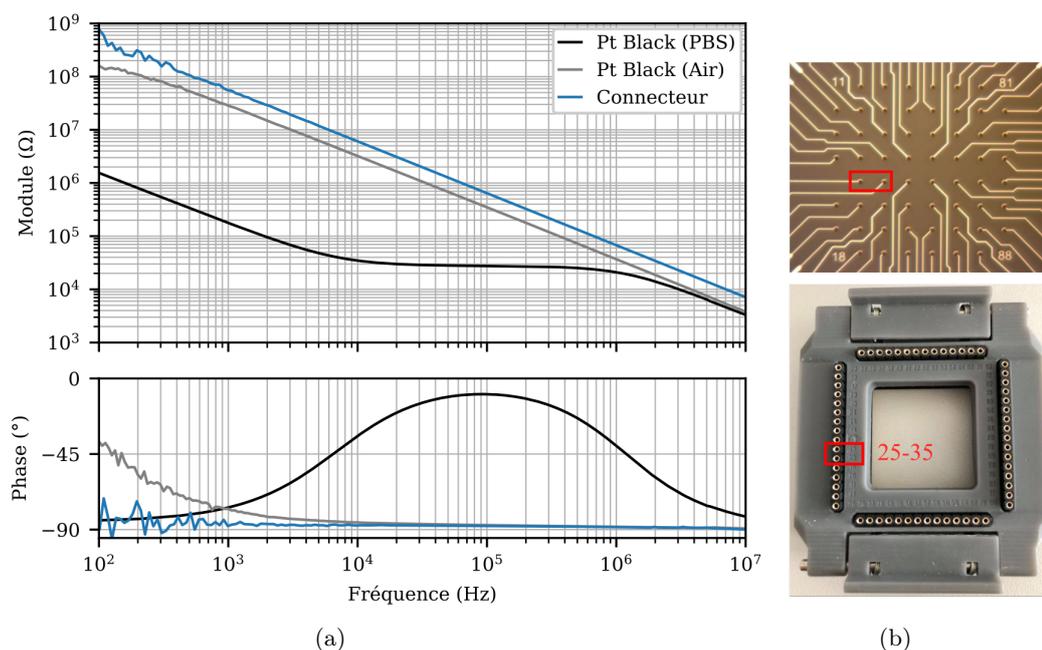


FIGURE 3.23 – (a) Impédance d’une paire d’électrodes adjacentes (25-35) en Noir de Platine (Pt Black) à vide (Air) et en présence de tampon salin (PBS), et impédance à vide au niveau des 2 contacts du connecteur correspondant aux points de connexion de la paire 25-35. (b) Emplacement des mesures d’impédances réalisées sur le MEA et sur le connecteur.

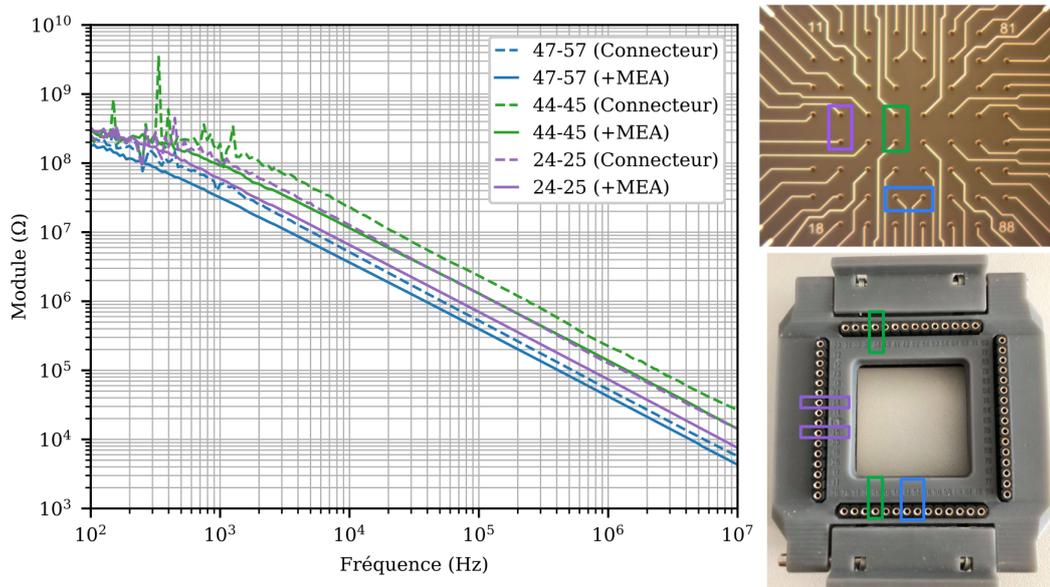


FIGURE 3.24 – Impédances de trois paires d’électrodes adjacentes (47-57, 44-45, 24-25) constituées de Noir de Platine à vide (Air) et impédances à vide des contacts du connecteur correspondant aux points de connexion des trois mêmes paires. Les emplacements des points de mesures sont indiqués à droite.

du matériau constituant les électrodes, et plus particulièrement de son état de surface (porosité). Pour une même surface d'électrodes, un matériau poreux présente une surface de contact (ou surface effective) plus importante avec la solution qu'un matériau "lisse". Ici, nous pouvons constater que les effets d'interface des électrodes en noir de platine et en PEDOT-CNT se dissipent une ou deux décades plus tôt en fréquence que pour les électrodes en platine (*Figure 3.21*). Nous avons reproduit l'effet de l'augmentation de la surface effective en simulation (*Figure 3.22*). Les résultats montrent que les électrodes en noir de platine et en PEDOT-CNT présentent une surface environ 100 et 1000 fois supérieure à la surface du masque des électrodes (cercle de  $30\ \mu\text{m}$  de diamètre).

De plus, on note une différence de pente entre le module théorique et les modules réels, et les mesures de phase n'atteignent pas  $-90^\circ$  en basse fréquence. Cela peut s'expliquer par le choix de modèle électrique de l'interface trop simpliste (capacité de double couche). Une modélisation reposant sur un élément à phase constante (CPE) serait plus approprié.

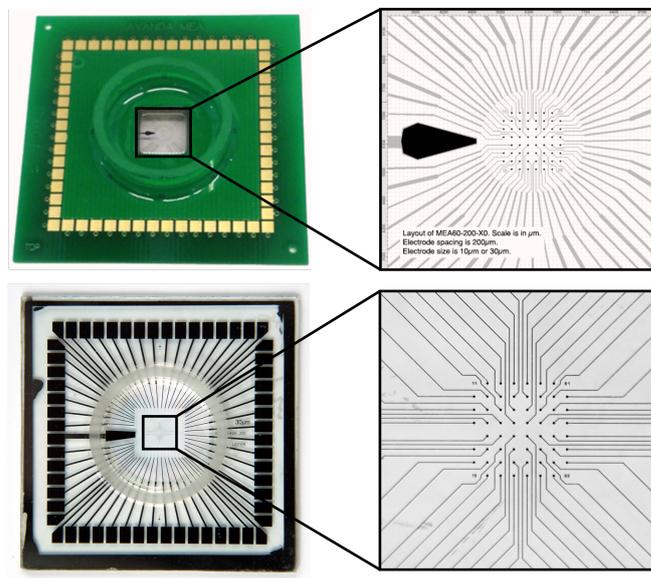


FIGURE 3.25 – Photographies des pistes de connexion des électrodes des modèles de MicroElectrode Devices (haut, électrodes Pt ou Pt Black) et de MultiChannel Systems (bas, électrodes PEDOT-CNT).

En **haute fréquence**, les impédances réelles présentent une pente à partir de 1 MHz pour les électrodes Pt et Pt Black, et à partir de 200-300 kHz pour les électrodes PEDOT-CNT (*Figure 3.21*). Afin d'identifier l'origine de cette pente, nous avons réalisé des mesures d'impédance des MEA à vide (air) et des mesures d'impédance sur le connecteur seul. Les résultats sont illustrés en *Figure 3.23* pour une paire d'électrodes donnée. Les courbes obtenues démontrent que la pente dans les hautes fréquences est due aux **effets capacitifs parasites** présents dans le banc de mesure, à savoir les capacités induites par le **connecteur** et par les **pistes** de connexion des électrodes [205]. Les courbes de la *Figure 3.24* démontrent que plus les contacts du connecteur et les pistes entre deux électrodes adjacentes sont proches, plus les effets capacitifs parasites sont importants. Dans la *Figure 3.21*, on constate que ces effets parasites apparaissent plus tôt en fréquence dans le cas des électrodes en PEDOT-CNT (MultiChannel Systems). Puisque nous avons utilisé le même banc de mesure, nous pouvons supposer que cela provient de la configuration des pistes de connexions de ce modèle de MEA. Comme le montre la *Figure 3.25*, les pistes des modèles de MicroElectrodeDevices

sont davantage concentriques et plus espacées que celles des modèles de MultiChannel Systems, permettant ainsi de réduire les effets capacitifs parasites entre les pistes.

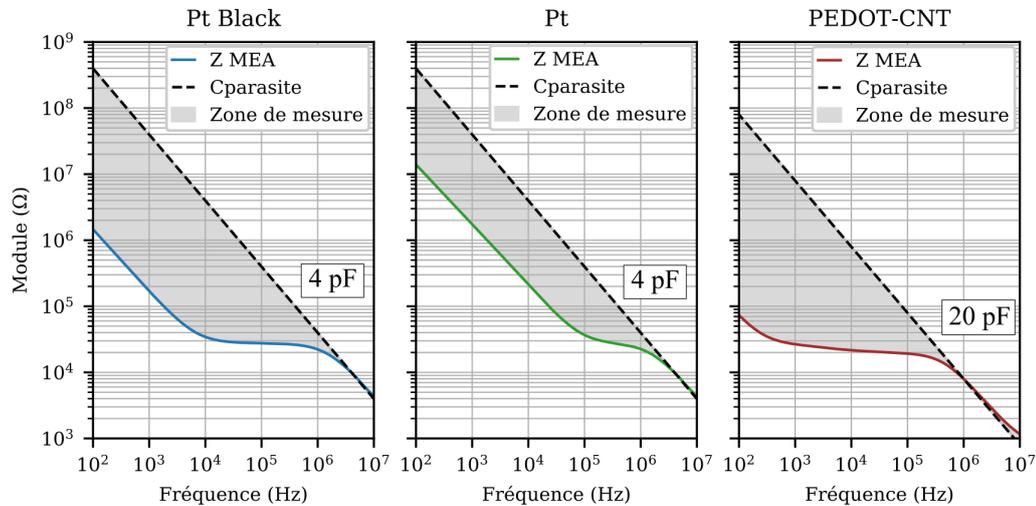


FIGURE 3.26 – Impédances et effets parasites des trois modèles de MEA (Noir de Platine Pt Black, Platine Pt et PEDOT-CNT).

**En résumé**, les électrodes en PEDOT-CNT présentent des effets d'interface les moins importants des trois modèles mais elles révèlent des effets parasites hautes fréquences apparaissant dès 200-300 kHz contre 1 MHz pour les deux autres modèles en Platine ou Noir de Platine. Comme illustré en *Figure 3.26*, les effets d'interface et les effets parasites peuvent réduire considérablement la gamme de mesure possible des électrodes en Platine et en PEDOT-CNT. Le meilleur compromis semble donc être les **électrodes en Noir de Platine (Pt Black)**.

### 3.3.4.3 Effet du coating

Dans la *Section 3.3.3.1*, nous avons montré qu'il était nécessaire d'appliquer un coating en Matrigel sur les MEA afin d'assurer une bonne adhésion des cellules musculaires C2C12 sur le support. Nous nous sommes alors questionnés sur l'impact de ces protéines extracellulaires sur la gamme de mesures d'impédance.

Pour répondre à cela, nous avons réalisé une étape de coating sur quatre MEA (modèles de MicroElectrode Devices, deux Pt Black et deux Pt), comme expliqué dans la *Section 3.3.3.1*. En résumé, nous avons déposé 200  $\mu\text{L}$  de Matrigel dilué à 5% dans du DMEM, que nous avons laissé sécher deux heures. Ensuite, nous avons retiré le surnageant, ajouté 1 mL de milieu de culture (milieu de prolifération) et procédé aux mesures d'impédance sur dix paires d'électrodes de chaque MEA.

La *Figure 3.27* présente les impédances moyennes avec et sans coating Matrigel des deux modèles de MEA considérés (Pt et Pt Black). Nous constatons que le Matrigel impacte uniquement l'impédance en basse fréquence, et **augmente les effets d'interface**. Cela a pour conséquence de réduire la gamme de mesure et nous conforte dans notre choix d'utiliser les électrodes constituées de Noir de Platine.

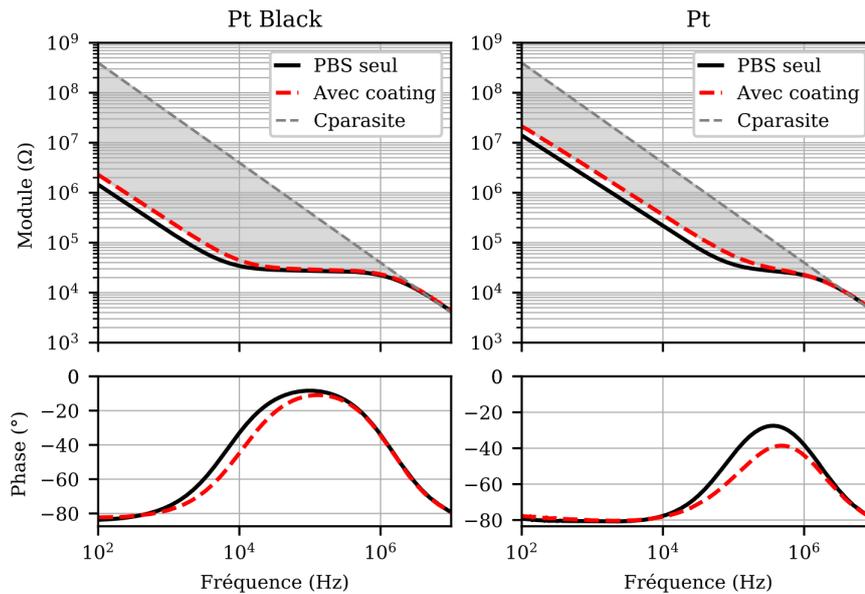


FIGURE 3.27 – Impédances moyennes des MEA avec PBS seul, ou avec coating (Matrigel) et milieu de culture (moyennes sur onze paires d'électrodes en Platine Pt ou Noir de Platine Pt Black, deux MEA pour chaque condition).

### 3.4 Évaluation de l'activité contractile *in vitro*

#### 3.4.1 État de l'art des méthodes d'évaluation de l'activité contractile *in vitro*

Dans un contexte *in vitro*, il est possible d'utiliser les trois types de mesures citées dans le *Chapitre 2* afin d'évaluer les caractéristiques de la contraction musculaire, à savoir : les mesures mécaniques, métaboliques et électriques, auxquelles s'ajoute également des méthodes optiques.

#### Mesures mécaniques

Les mesures mécaniques *in vitro* peuvent être réalisées par le biais de 3 outils : les capteurs de force, les structures déformables, les bioMEMS.

La première technique consiste à fixer une extrémité d'un tissu musculaire 3D et attacher un **capteur de force** à l'autre extrémité. La contraction du tissu exerce une force sur le capteur, qui la convertit en un signal numérique enregistré par ordinateur avec l'instrumentation appropriée [206]. Pour cela, le muscle artificiel est cultivé et construit entre deux points d'ancrage fixes, puis transféré dans un autre dispositif comprenant le capteur de force et un seul point d'ancrage fixe. Cette procédure est délicate car le muscle est susceptible de se briser au moment du transfert. Il s'agit d'une méthode qui fait appel à des protocoles de culture spécifiques pour la construction d'un tissu musculaire 3D. Il est possible de s'abstenir de la construction d'un muscle 3D en cultivant les cellules sur un film de collagène comprenant un trou à chaque extrémité, dont l'une d'entre elles est fixée et la seconde est liée à un capteur de force [207].

La deuxième technique repose sur l'utilisation de structures déformables, comme des **piliers** et des **cantilevers**, qui vont se déformer sous l'effet d'une contraction musculaire. Les premiers sont généralement faits en polydiméthylsiloxane (PDMS), un matériau très utilisé en microfluidique, car il est à bas prix, optiquement transparent, biocompatible et permet de réaliser rapidement des prototypes par micromoulage [208].

Il est également élastique et son élasticité peut facilement être modifiée en contrôlant le rapport base/agent réticulant. La mesure de force est réalisée sur une culture 3D de cellules musculaires autour de deux piliers et consiste à mesurer le déplacement de leur sommet par analyse vidéo [209]. Il est alors possible de déterminer la force exercée en connaissant la constante de raideur des piliers (*c.f. Chapitre 5*). Les cantilevers sont quant à eux des structures horizontales, fixées à une extrémité et libre de se déplacer verticalement à l'autre extrémité [206]. Les cellules sont cultivées directement sur la structure, et leurs contractions provoquent une flexion vers le haut de l'extrémité libre. La variation de la hauteur est proportionnelle à la force appliquée, et mesurée par analyse d'image, ou de manière plus précise par un laser et un photodétecteur [210]. Ils sont souvent faits de silicium ou nitrure de silicium parce qu'ils sont bien caractérisés mécaniquement et qu'ils peuvent être fabriqués à partir des techniques de microfabrication classiques [211].

Avec le développement des systèmes micro-électromécaniques (MEMS), notamment dans le domaine biomédical (bioMEMS), apparaissent des **micropoutres piézoélectriques** (cantilevers). Les matériaux piézoélectriques peuvent convertir une énergie mécanique en signal électrique, et inversement, et peuvent donc à la fois servir de capteur et d'actionneur. Une étude présente un cantilever dont le matériau piézoélectrique est le nitrure d'aluminium, pris en sandwich entre 2 électrodes en platine [212]. La contraction des cardiomyocytes induit une flexion du cantilever et une contrainte mécanique sur le matériau, qui génère alors une différence de potentiel entre les 2 électrodes. Leur rôle d'actionneur est intéressant pour stimuler mécaniquement les cellules musculaires, mais également pour l'étude des cellules mécanosensibles comme les fibres intrafusales (fibres sensibles dans les fuseaux neuromusculaires).

### Mesures métaboliques

Les mesures métaboliques visent à évaluer la consommation des **sources d'énergie** et la production de **métabolites** (espèces chimiques issues des processus métaboliques) comme le glycogène, le glucose, l'ATP ou encore le lactate [182, 186, 189]. Celles-ci sont généralement réalisées à l'aide d'un kit de dosage, spécifique à une molécule donnée, utilisable une seule fois. Ce procédé ne permet pas des mesures métaboliques en temps réel, nécessite de réaliser des prélèvements du milieu de culture qu'il faut congeler pour des analyses ultérieures et des équipements spécifiques de colorimétrie/fluorimétrie. Une alternative consiste à utiliser des capteurs électrochimiques qui comprennent des enzymes (glucose oxydase par exemple) pour métaboliser la cible correspondante et produire un signal électrique mesuré par des méthodes voltammétriques ou ampérométriques.

### Mesures électriques

La mesure d'activité électrique par réseau de microélectrodes est répandue pour l'étude de cultures de neurones *in vitro*, tandis que son application aux cellules musculaires est bien plus récente. Quelques équipes sont parvenues à mesurer des **potentiels d'action extracellulaires** de myotubes [191, 202, 213, 214]. Ces études, réalisées sur des cultures primaires de souris ou de rat, n'ont enregistré que des potentiels d'action spontanés, non induits par stimulation électrique. Contrairement aux neurones, dont les potentiels extracellulaires mesurés *in vitro* sont majoritairement biphasiques, les cellules musculaires présentent une grande diversité de formes de potentiel (monophasique et polyphasique), rendant leur analyse plus complexe [202, 213]. Les mesures d'activité électrique de cellules musculaires sont principalement

utilisées pour étudier leur développement [202], et la formation de réseaux de myotubes dans une même culture [191, 213]. Pour l'heure, la mesure d'activité électrique n'a donc jamais été utilisée *in vitro* pour quantifier leur activité contractile ou la fatigue musculaire.

### Mesures optiques

En plus des différentes techniques citées précédemment, il y a un intérêt grandissant pour les analyses d'image vidéo.

Par l'intermédiaire de logiciels tel que Tracker<sup>11</sup>, il est possible d'obtenir des informations mécaniques sans traitement vidéo spécifique, comme le **déplacement** et les **vitesse** contraction et de relaxation [189]. Cependant, son utilisation peut se révéler très chronophage car cela nécessite le pointage manuel des zones en mouvement sur chaque image. Le logiciel possède également un outil de repérage automatique qui réalise automatiquement cette opération de pointage, mais son efficacité est limitée dans le cas de mouvement de très faible amplitude. Il existe également des systèmes plus onéreux, les **motion analyzer** intégrés à des **microscopes haute vitesse**, qui mesurent la distance entre deux points sur chaque image [182].

Enfin, à partir de vidéos issues de microscopes standards, des **algorithmes** de traitement d'image permettent une analyse quantitative des contractions musculaires. Ils ne fournissent pas de mesure directe de la force de contraction mais ils quantifient les variations d'intensité des pixels, rendant possible l'extraction de certaines informations pour caractériser l'activité contractile. Par exemple, certaines équipes utilisent ces variations d'intensité pour établir un "indice de mouvement", c'est-à-dire un indice permettant d'évaluer la "quantité de mouvement" due aux contractions dans une culture de cellules musculaires [186, 196]. Ces analyses sont particulièrement utilisées pour l'étude des cellules cardiaques *in vitro* (macro open source MUSCLEMOTION [215], MYOCYTER [216], software commercial CytoMotion<sup>12</sup> de la société IonOptix). Ces programmes extraient deux informations : l'**amplitude** et la **vitesse** des variations d'intensité des pixels. L'amplitude représente la différence entre une image de référence (état de repos, sans contraction) et les images suivantes, tandis que la vitesse est extraite à partir de la différence entre deux images successives. Les images de taille  $x \times y$  pixels sont d'abord converties en niveau de gris (valeur des pixels entre 0 et 255). Ensuite les différences sont réalisées pixel par pixel, donnant naissance à une nouvelle image, de même taille, indiquant les variations d'intensité de chaque pixel. Les pixels dont l'intensité n'a pas ou peu évolué prendront une valeur proche de 0 (noir), et dans le cas contraire, une valeur proche de 255 (blanc). Le calcul de l'intensité moyenne (valeur moyenne des  $x \times y$  pixels) des images résultantes donnent alors les informations d'amplitude et de vitesse au cours du temps (instant de l'image  $i$ ) :

$$\begin{aligned} amplitude_i &= \frac{1}{xy} \sum_{xy} |img_i(x, y) - img_{ref}(x, y)| \\ vitesse_i &= \frac{1}{xy} \sum_{xy} |img_i(x, y) - img_{i-1}(x, y)| \end{aligned} \tag{3.5}$$

avec  $x, y$  les coordonnées des pixels. Les principaux inconvénients de ces méthodes proviennent de la présence d'effets parasites pouvant fausser les mesures, comme la compression vidéo entraînant la perte d'informations, le bruit de la caméra, les variations d'intensité de l'éclairage ambiant, ou encore les débris cellulaires flottant à la

11. <https://physlets.org/tracker/>

12. <https://www.ionoptix.com/products/software/cytomotion-software/>

surface [216]. En pratique, la différence entre deux images est donc toujours supérieur à 0, et ces différences peuvent s'accumuler et induire un décalage croissant de l'amplitude au cours du temps. Il est recommandé d'utiliser des vidéos non compressées avec une fréquence d'images suffisamment élevée ( $> 50$  images par secondes).

### Comparatif et choix

En résumé, les mesures mécaniques sont des mesures directes des caractéristiques des contractions, et fournissent une mesure fiable de l'état de fatigue des fibres. Elles nécessitent cependant le recours à des équipements/outils et protocoles de culture spécifiques, et ne sont pas compatibles avec l'utilisation de nos MEA commerciaux. Notre banc de test nous permet toutefois d'utiliser les trois autres types de mesure.

Les mesures métaboliques sont relativement simples à mettre en oeuvre et fournissent des informations sur l'activité métabolique des cellules musculaires. Mais elles représentent une mesure indirecte de l'activité contractile, et sont peu adaptées pour l'évaluation de la fatigue.

Les mesures d'activité électrique sont encore à un stade exploratoire pour l'étude du développement des myotubes, et n'ont jusqu'à maintenant pas permis de quantifier la fatigue. Ces mesures temps réel peuvent se révéler précieuses pour l'analyse de l'activité musculaire.

Enfin, l'analyse vidéo peut fournir des caractéristiques mécaniques de l'activité contractile (déplacement, vitesse) avec une certaine facilité de mise en oeuvre.

Puisque les MEA nous permettent une observation visuelle des cellules, nous avons choisi d'exploiter les méthodes de **mesures optiques**. Ces dernières sont exploitées dans le *Chapitre 4*. Nous avons également réalisé quelques essais de mesures d'**activité électrique** dans le *Chapitre 4*. Enfin, un type de **mesure mécanique** est exploré dans le *Chapitre 5*. Par l'utilisation des différentes méthodes, nous espérons extraire diverses informations afin d'évaluer au mieux l'activité contractile des C2C12 et d'établir un lien avec les mesures de bioimpédance.

#### 3.4.2 Matériel pour les mesures optiques

L'analyse des contractions est réalisée par l'intermédiaire d'un microscope inversé équipé d'une caméra. Cette dernière (SCOP-CAM4K, ScopPro) permet d'acquérir des vidéos avec une fréquence de 60 images par secondes et une résolution de  $3840 \times 2160$  ( $\sim 8$  MPixels). A partir du langage Python et de la librairie OpenCV, il est possible d'analyser les vidéos et d'extraire les amplitudes et vitesses de mouvement à partir des *équations 3.5*.

Comme expliqué précédemment, l'inconvénient principal de cette approche est la compression vidéo et les artefacts engendrés par les keyframes, perturbant les mesures. Une "keyframe" ou image clé est une image dont tous les pixels sont enregistrés. Les images entre deux keyframes ne sont que partiellement enregistrées. Nous avons testé les algorithmes d'analyse des *équations 3.5* sur une vidéo d'un MEA contenant des cellules musculaires ne montrant aucune contraction. La *Figure 3.28* illustre les résultats obtenus. Nous observons sur la mesure de vitesse des pics très réguliers (tous les 30 points), nous amenant à penser qu'il s'agit des artefacts produits par les keyframes. En effet, ces dernières ont généralement une fréquence d'apparition égale au double de la fréquence d'images (ici 60). On note également que ces artefacts entraîne une dérive de la mesure d'amplitude. Une dérive peut également être causée par des vibrations du MEA et des mouvements de débris cellulaires flottants lors de l'enregistrement vidéo.

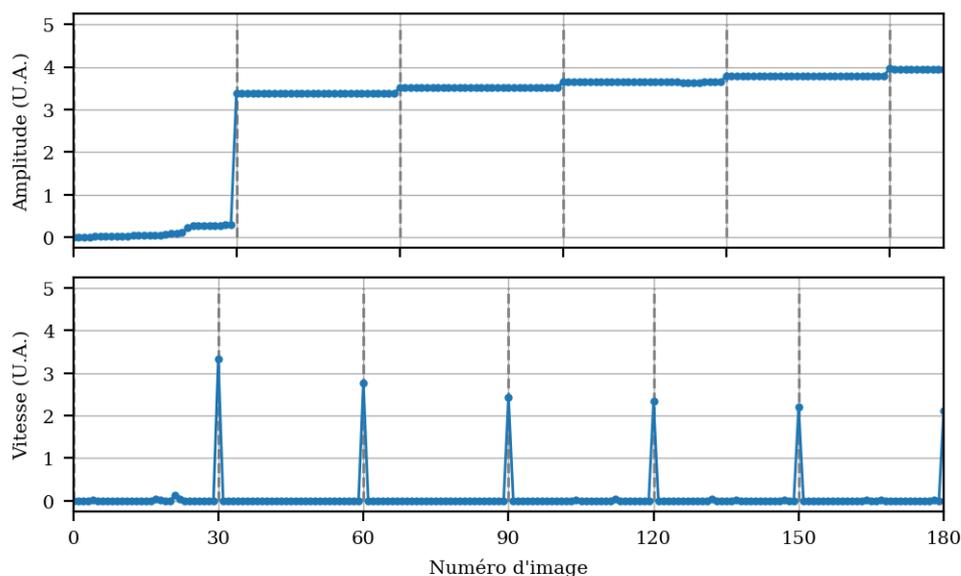


FIGURE 3.28 – Amplitude et vitesse (c.f. équations 3.5) extraits d'une vidéo enregistrée avec la caméra SCOP-CAM4K (60 images par secondes) et le microscope inversé, avec un codec h265. Les traits gris situent les artefacts des keyframes, toutes les 30 images.

### 3.4.3 Matériel pour les mesures électrophysiologiques

La mesure d'activité électrique a été réalisée à partir des microélectrodes des MEA et d'une plateforme de mesure et d'analyse de biosignaux (appelée Multimed) développée au sein de l'équipe Elibio de l'IMS dans le passé [217].



FIGURE 3.29 – Photographie du système d'acquisition d'activité électrique.

Le système d'acquisition est constitué de la plateforme Multimed (Carte Nexys 4, Digilent), de 2 pré-amplificateurs Intan RHD2132 comprenant chacun 32 voies et permettant l'acquisition de signaux à une fréquence d'échantillonnage de 10 kHz, dans une gamme de  $\pm 6,38$  mV (format 16 bits signé, LSB =  $0,195 \mu\text{V}$ ). Les données ainsi numérisées sont affichées en temps réel (port VGA) et enregistrées sur une carte SD. Une carte adaptatrice custom permet l'interface entre les pré-amplificateurs et les électrodes du MEA, et se positionne directement sur la carte d'interface comprenant les électrodes de stimulation en carbone (Figure 3.29).

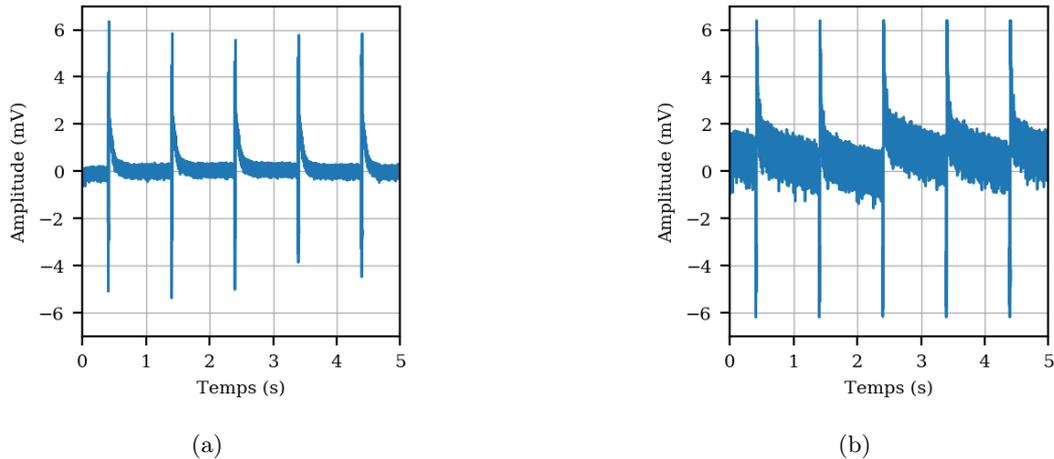


FIGURE 3.30 – Exemple de mesure électrique avec un MEA ne contenant que du milieu de culture, lors de l'application d'un signal de stimulation biphasique asymétrique d'amplitude 2 Vpp, de durée d'impulsion 5 ms et de fréquence 1 Hz sur les électrodes (a) 48 et (b) 76.

Le système ne comprend pas de méthode de "blanking" (logicielle ou matérielle) permettant la suppression des artefacts de stimulation (*Figure 3.30*). Une étape de pré-traitement des signaux est alors nécessaire pour éliminer ces artefacts (par seuillage par exemple). De plus, on constate la présence d'un bruit assez important pouvant atteindre une amplitude de 2 mVpp (*Figure 3.30(b)*). Or, la littérature mentionne des activités électriques musculaires de l'ordre de quelques centaines de microvolts à quelques millivolts [191, 202, 213]. Notre banc de test présente donc une limite importante pour l'évaluation de l'activité contractile par mesures électriques, puisque celui-ci n'est pas optimisé en termes de compatibilité électromagnétique.

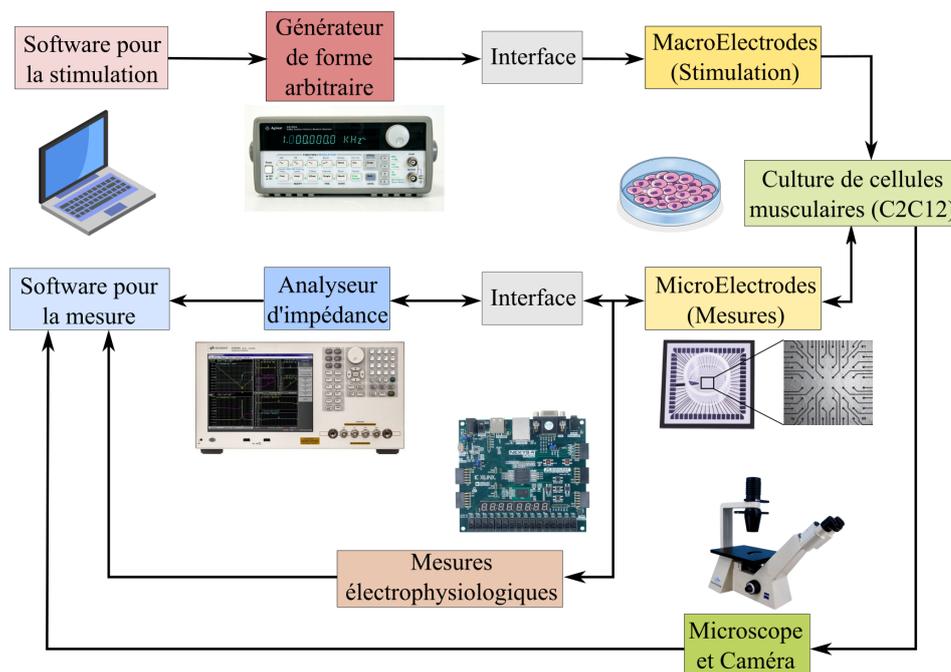
### 3.5 Bilan des caractéristiques du banc de test

Le banc de test conçu est présenté en *Figure 3.31*, avec l'ensemble des éléments le constituant, et le *Tableau 3.5* résume les caractéristiques de ces différents éléments. Chaque partie du banc de test a été validée à travers différentes expérimentations :

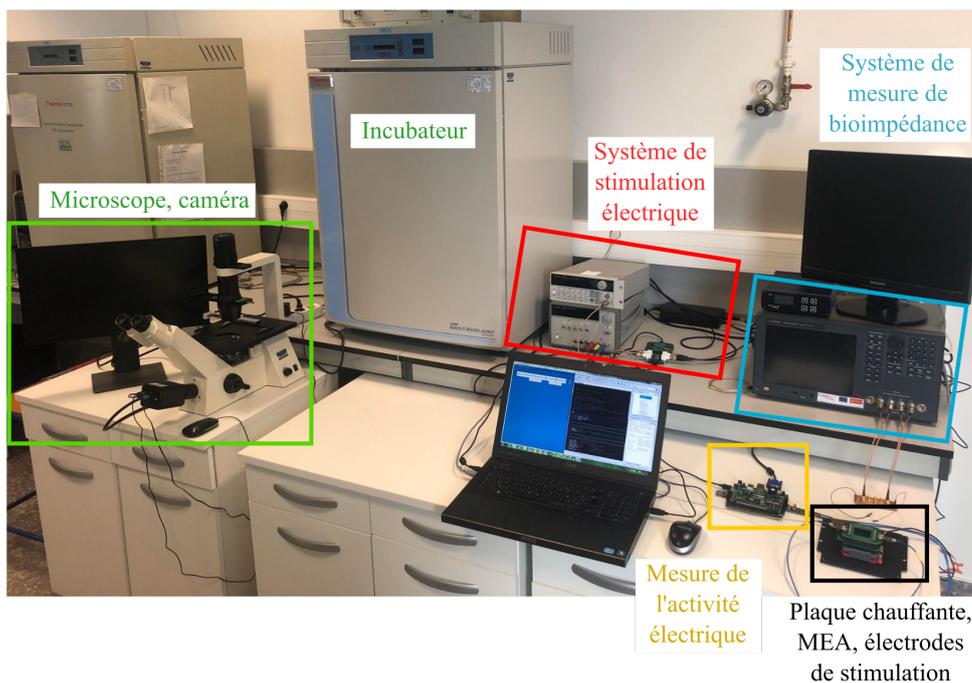
- le **modèle biologique** mis au point permet l'obtention de cellules contractiles répondant à la stimulation électrique ;
- l'**instrumentation électronique et les électrodes de stimulation** permettent l'application de signaux de stimulation programmables dans la gamme de courant et de fréquences pertinentes pour le modèle biologique ;
- la **mesure de bioimpédance** sur la gamme de fréquence d'intérêt est mise en place grâce à un MEA spécifique et un circuit de mesure relié à un analyseur d'impédance ;
- l'**évaluation optique de l'activité contractile** est réalisée par un traitement algorithmique d'images vidéo.

Ces travaux ont donc abouti à un système opérationnel combinant des éléments matériels et les protocoles associés, répondant aux attentes définies dans le cahier des charges.

La méthode et les résultats de caractérisation des MEA ont fait l'objet d'une publication et d'une présentation orale au sein de la conférence *Design of Circuits and Integrated Systems* [218].



(a)



(b)

FIGURE 3.31 – (a) Schéma et (b) photographie du banc de test proposé comprenant un système de stimulation (Générateur Agilent 33120A, électrodes de carbone custom), un système de mesure de bioimpédance (Analyseur Keysight E4990A, matrice de microélectrodes Pt Black), un système de mesures électrophysiologiques (Nexys 4, matrice de microélectrodes Pt Black) et un PC réalisant le contrôle et l'acquisition des trois systèmes. La stimulation électrique, les mesures de bioimpédance et électrophysiologiques sont réalisées sur une culture de cellules musculaires (lignée C2C12).

TABLEAU 3.5 – Composants du banc de test et leurs caractéristiques

Bloc	Composants	Caractéristiques
Modèle biologique	Lignée cellulaire C2C12	Muscle squelettique de souris A utiliser avec un nombre de passages $\leq 10$ Coating Matrigel sur substrat SU-8 Prolifération jusqu'à $\sim 90\%$ de confluence (milieu DMEM, 10% FBS, 1% pénicilline-streptomycine) Différenciation 5 jours (milieu DMEM, 2% HS, 1% pénicilline-streptomycine) Myotubes $\geq 200 \mu\text{m}$ de longueur Fréquence de fusion $\geq 10 \text{ Hz}$
Stimulation électrique	Générateur Agilent 33120A	6 canaux Signaux biphasiques symétriques ou asymétriques Tension (0,2 - 15 Vpp) Courant (0,4 - 50 mA avec les électrodes C-dish) Fréquence (0,1 - 100 Hz) Durée des impulsions ( $\geq 1 \text{ ms}$ )
	Electrodes custom	Matériau graphite Dimensions $4 \times 4 \times 22,5 \text{ mm}$
Bioimpédance	Analyseur d'impédance Keysight E4990A	Mesure 2 points Balayage logarithmique Nombre de points (2 - 1601) Fréquence de mesure (20 Hz - 50 MHz) Tension (5 mVrms - 1 Vrms) Courant (200 $\mu\text{Arms}$ - 200 Arms) Gamme d'impédance (25 m $\Omega$ - 40 M $\Omega$ )
	Electrodes MEA60-200-10-PtB MicroElectrodeDevices	Matrice de 59 microélectrodes Couche de passivation SU-8 Matériau Pt Black Diamètre 30 $\mu\text{m}$ Espacement 200 $\mu\text{m}$
Évaluation de l'activité contractile	Mesures optiques Caméra SCOP-CAM4K ScopPro	60 images par secondes Résolution $3840 \times 2160$ ( $\sim 8 \text{ MPixels}$ ) Codec h264 ou h265
	Mesures électrophysiologiques Nexys 4, Digilent 2 Intan RHD2132	64 voies Fréquence d'acquisition 10 kHz Gamme de mesure $\pm 6,38 \text{ mV}$

## Chapitre 4

# Évaluation de la fatigue musculaire *in vitro* par mesure de bioimpédance

Dans l'objectif d'évaluer la fatigue musculaire par mesure de bioimpédance, nous avons conçu un banc de test spécifique, décrit dans le *Chapitre 3*. En utilisant ce dernier, nous avons réalisé trois séries d'expérimentations afin de déterminer l'impact de la stimulation électrique et de la fatigue musculaire sur la bioimpédance de notre modèle biologique *in vitro* (lignée de cellules musculaires C2C12). La première section de ce chapitre décrit alors les grandes étapes de ces expérimentations et les protocoles associés. Les trois séries d'expérimentations sont ensuite traitées une à une, puis comparées. Finalement, la dernière section apporte des éléments de discussion et de réflexion quant aux résultats obtenus et aux améliorations possibles.

Les résultats obtenus lors des deux premières campagnes d'expérimentations ont fait l'objet d'une publication dans le journal *IEEE Access* [219].

### 4.1 Protocoles expérimentaux

Toutes les campagnes de mesure présentées dans ce chapitre ont suivi un plan commun dont les étapes sont schématisées en *Figure 4.1*.

Chaque série d'expérimentations commence par une étape de **caractérisation des MEA** afin de vérifier l'intégrité des électrodes. La caractérisation (*c.f. Section 3.3.4*) consiste à les remplir de 1 mL de tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline, PBS) et à réaliser des mesures d'impédance sur dix paires d'électrodes adjacentes, entre 10 Hz et 10 MHz et avec un signal de mesure harmonique de 100 mVpp. S'ensuit la phase de culture cellulaire et la phase d'expérimentations, détaillées dans les sous-sections suivantes.

A la fin de chaque campagne d'expérimentation, les MEA sont nettoyés avec 1 mL de Tween 80<sup>1</sup>, qu'il faut laisser agir pendant 2 heures avant de rincer abondamment à l'eau distillée et de laisser sécher à température ambiante.

#### 4.1.1 Phase de culture cellulaire

Le protocole de culture a été déterminé à partir des essais de culture décrits dans le *Chapitre 3*, et est illustré en *Figure 4.2*.

La phase de culture cellulaire nécessite d'abord une étape de **stérilisation** dans un bain d'éthanol puis par un passage dans un autoclave à 60°C pendant au moins

---

1. Détergent recommandé par le fabricant MicroElectrodeDevices pour le nettoyage des MEA. Mettre 1 goutte de Tween80 dans 100 mL d'eau distillée et remplir le MEA.

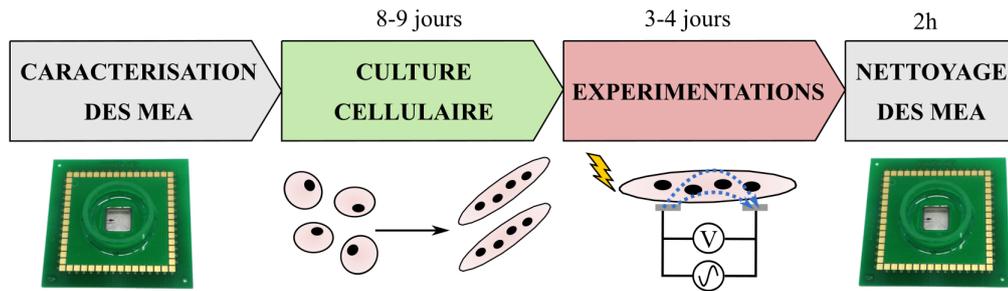


FIGURE 4.1 – Plan général des 3 séries d'expérimentations comprenant une phase de caractérisation des MEA, une phase de culture suivie de la phase d'expérimentation combinant stimulation électrique et de mesures de bioimpédance, et le nettoyage des MEA en fin de campagne.

8 heures. Le lendemain, l'étape de **coating** consiste à déposer 200  $\mu\text{L}$  de Matrigel dilué à 5% dans du PBS et à attendre 2 heures. Puis le surnageant (liquide restant) est retiré et les MEA sont laissés à température ambiante sous une hotte pour permettre le séchage du Matrigel.

Ensuite vient l'étape d'**ensemencement** consistant à déposer environ 2000 cellules musculaires C2C12 (passage < 10) dans chaque MEA, à attendre 2 heures pour permettre l'adhésion des cellules au support de culture et enfin à ajouter 1 mL de milieu de prolifération. Le milieu de prolifération se compose de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), de 10% de sérum de veau foetal (Foetal Bovine Serum, FBS) et de 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine). La phase de **prolifération** dure entre 2 à 3 jours, jusqu'à ce que les cellules atteignent environ 90% de confluence. Pour chaque série d'expériences, six MEA sont utilisés et reçoivent les étapes de stérilisation, coating et ensemencement.

Après la phase de prolifération, la **différenciation** est initiée par un changement de milieu afin d'induire la formation de myotubes (cellules musculaires contractiles, *c.f.* Chapitre 3). Le milieu de différenciation, constitué de DMEM, de 2% de sérum de cheval (Horse Serum, HS) et de 1% d'antibiotiques, remplace le milieu de prolifération. Le milieu est changé quotidiennement pendant toute la durée de la phase de différenciation.

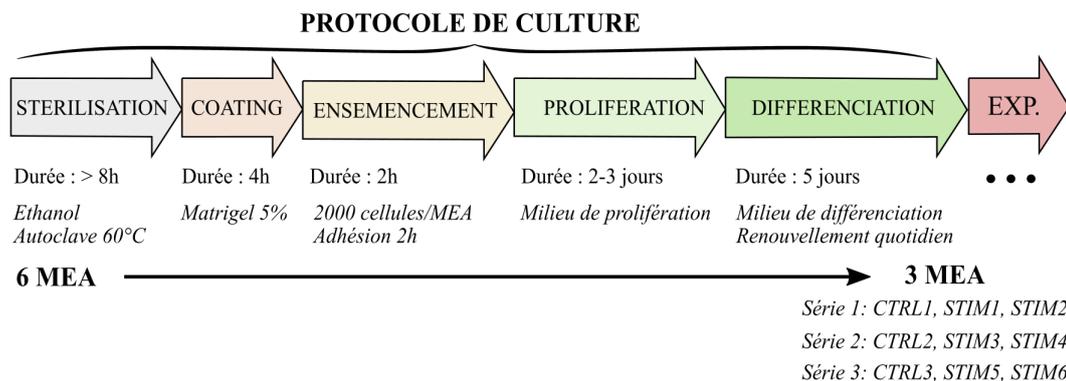


FIGURE 4.2 – Protocole de culture comprenant une étape de stérilisation, de coating des MEA, d'ensemencement, de prolifération et de différenciation des cellules musculaires, suivi de la phase d'expérimentations (EXP) sur trois MEA (un MEA contrôle CTRL et deux MEA stimulés STIM).

Après 5 jours de différenciation, **trois MEA** parmi les six **sont sélectionnés** pour les expérimentations. Le choix est réalisé selon le nombre et la morphologie des

myotubes se trouvant dans la zone couverte par les électrodes. On considère que plus ils sont nombreux, plus les cellules musculaires sont différenciées et capables de se contracter sous l'effet de stimuli électriques.

Pour chaque série, un MEA est utilisé en tant que contrôle (CTRL1, CTRL2 ou CTRL3) et ne reçoit pas de stimulation électrique tandis que les deux autres MEA (STIM1/2, STIM3/4 ou STIM5/6) sont électriquement stimulés (*Figure 4.2*). Pendant la phase de culture, les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C et sous une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.1.2 Phase d'expérimentations

La phase d'expérimentations dure entre 3 et 4 jours. L'ensemble du matériel utilisé lors des trois séries d'expériences a été présenté dans le *Chapitre 3*. Nous en faisons ici un bref rappel et nous détaillons l'élaboration des protocoles de stimulation et de mesures réalisés.

##### 4.1.2.1 Stimulation électrique

Les signaux de stimulation sont créés par l'intermédiaire d'une interface logicielle puis enregistrés dans un générateur de forme arbitraire (*Figure 4.3(a)*). Le signal de stimulation est délivré par l'intermédiaire du générateur et d'une interface hardware permettant de démultiplexer et distribuer les signaux de stimulation aux deux puits de culture (MEA STIM<sub>x</sub> et STIM<sub>(x+1)</sub>). L'instrument multifonction (Analog Discovery 2, Digilent) permet la synchronisation du générateur et des démultiplexeurs ainsi que l'acquisition de la tension et du courant de stimulation. Lors des périodes de stimulation (en dehors des périodes de mesures), les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C et sous une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>.

Étant donné que le banc de test ne comprend pas de circuit permettant l'adressage de l'ensemble des microélectrodes, les mesures sont effectuées en dehors de l'incubateur. Pour limiter l'impact de la température sur les mesures de bioimpédance, ces dernières sont réalisées sur une **plaque chauffante** réglée à **37°C**.

Nous avons imaginé différents **scénarios de stimulation** conduisant à différents degrés de fatigue que nous pensons évaluer par mesure de bioimpédance. Un scénario correspond à une **période de stimulation**, précédée et suivie par une étape de mesures de bioimpédance. Entre ces scénarios se trouvent des **périodes de repos** (sans stimulation électrique).

Un autre paramètre de ces scénarios est le **pattern** de stimulation. Un pattern est défini comme un **ensemble d'impulsions biphasiques asymétriques** répétées à une fréquence  $f$ , dont l'impulsion positive est d'amplitude  $I_p$  et de durée  $T_p$ , suivie d'une impulsion négative d'amplitude  $-I_p/2$  et de durée  $2 \times T_p$  (*Figure 4.3(b)*). Dans le *Chapitre 2*, nous avons vu que le paramètre de stimulation le plus impactant sur la fatigue musculaire est la **fréquence de stimulation** ( $f$ , *Figure 4.3(b)*). De plus, les difficultés rencontrées pour la mise au point du protocole de culture sur MEA (*c.f. Chapitre 3*) et la durée de chaque campagne d'expérimentation (*Figure 4.1*) n'ont permis de réaliser que 3 séries d'expériences. Ainsi, nous avons fait le choix de **fixer l'amplitude et la durée des impulsions** pour l'ensemble des patterns considérés ( $I_p = 20 \text{ mA}$ ,  $T_p = 5 \text{ ms}$ ), et de ne faire varier que la fréquence des impulsions ( $f$ , *Figure 4.3(b)*). Ces valeurs ont été choisies à partir des essais de stimulation réalisés dans le *Chapitre 3*. L'impact des autres paramètres de stimulation (amplitude et durée des impulsions) n'a donc pas été exploré.

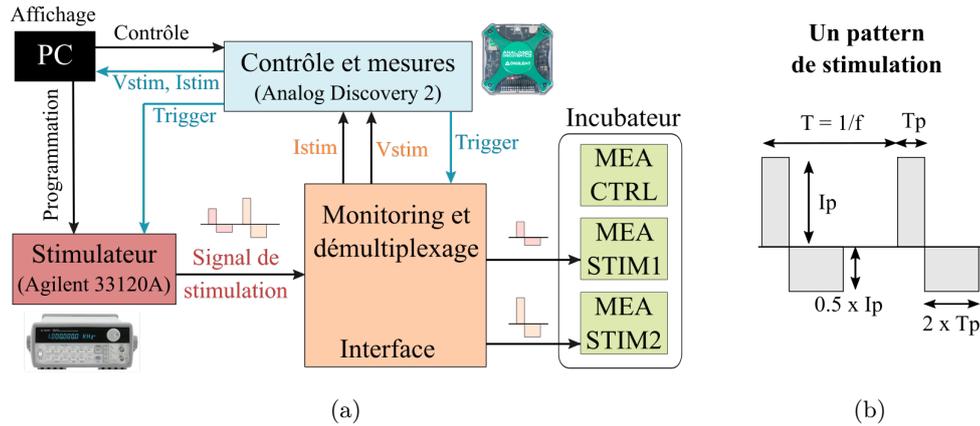


FIGURE 4.3 – (a) Schéma du système de stimulation : le signal de stimulation est généré par un générateur de forme arbitraire et délivré aux 2 MEA placés dans un incubateur. Les 2 patterns sont distribués via une interface électronique. L'Analog Discovery 2 contrôle l'interface et le générateur, et réalise l'acquisition des tensions et courants de stimulation. Un ordinateur contrôle l'Analog Discovery 2 et permet la création du signal de stimulation et son enregistrement dans le générateur. (b) Paramètres des impulsions biphasiques asymétriques constituant un pattern de stimulation (ensemble d'impulsions biphasiques) :  $I_p$ ,  $T_p$  l'amplitude et la durée de l'impulsion positive,  $T$  et  $f$  la période et la fréquence des impulsions biphasiques.

En plus de l'impact de la fréquence de stimulation, nous avons choisi d'examiner l'effet des **durées de stimulation** (à ne pas confondre avec la durée des impulsions) **et de repos**. Les phases de stimulation durent entre 2 et 8 heures, et les phases de repos durent entre 2 et environ 16 heures (une nuit). Les temps de repos nocturnes ont été imposés pour le nettoyage des électrodes de stimulation, qui consiste à les plonger dans de l'eau distillée durant une nuit, à les stériliser à l'éthanol et les laisser sécher à température ambiante sous une hotte.

Les scénarios sont variables d'une série à l'autre en termes de durée de stimulation, de durée de repos et de patterns de stimulation.

#### 4.1.2.2 Mesures de bioimpédance

Les phases de stimulation sont toujours précédées et suivies par une étape de mesure de bioimpédance. Lors de la deuxième et troisième campagne d'expérimentation, des mesures de bioimpédance ont également été effectuées juste après les périodes de repos nocturnes et avant les changements de milieu de culture quotidiens.

Pour rappel, les cellules musculaires sont cultivées sur des MEA comportant 59 électrodes en noir de platine (Platine black, Pt-Black) de  $30 \mu\text{m}$  de diamètre, espacées de  $200 \mu\text{m}$ . Les mesures de bioimpédance sont réalisées par l'analyseur d'impédance Keysight E4990A, avec un signal d'amplitude  $100 \text{ mVpp}$ . Le paramètre "Measurement Time"<sup>2</sup> est fixé à 4 pour avoir un bon compromis entre vitesse et précision de mesure. Toutes les mesures sont effectuées en configuration **2 points**, avec deux électrodes adjacentes (espacement constant de  $200 \mu\text{m}$ , Figure 4.4).

A travers ces expérimentations, nous cherchons à identifier une signature de la fatigue musculaire sur la mesure de bioimpédance. L'exploration de la bioimpédance *in*

2. Le paramètre Measurement Time de l'analyseur d'impédance Keysight E4990A détermine la vitesse et la précision de mesure, et est compris entre 1 (temps de mesure très rapide, précision faible) et 5 (temps de mesure long avec une précision maximale), *c.f. Annexe A*.

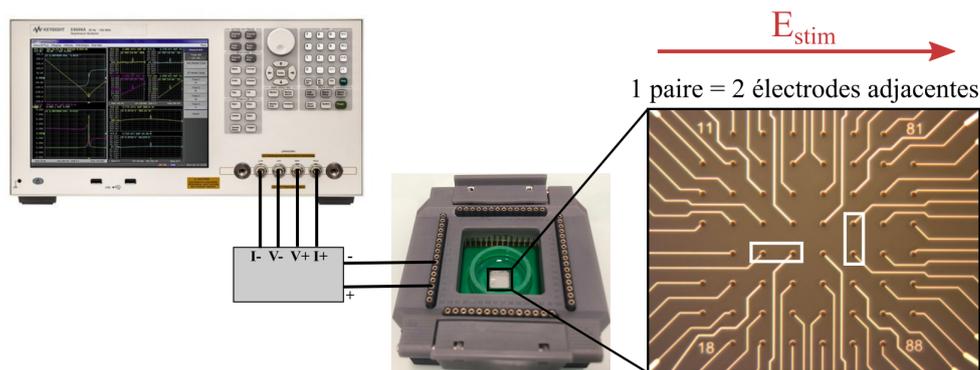


FIGURE 4.4 – Système de mesure de bioimpédance en configuration 2 points, avec une paire d'électrodes composée de 2 électrodes adjacentes horizontalement ou verticalement. La flèche rouge indique l'orientation du champ électrique de stimulation ( $E_{stim}$ ).

*in vitro* dans notre contexte expérimental n'ayant jamais été effectuée sur un large spectre, toutes les mesures sont effectuées sur un large intervalle de fréquence (**spectroscopie**), **entre 100 Hz et 10 MHz**, pour pouvoir mettre en évidence la gamme de fréquence la plus sensible.

Comme énoncé précédemment, à la fin de la phase de culture trois MEA sont sélectionnés pour la phase expérimentale. Chaque MEA est visuellement inspecté sous un microscope afin de choisir entre **15 à 20 paires d'électrodes** avec lesquelles seront réalisées les mesures de bioimpédance. Une paire d'électrodes est choisie si un ou plusieurs myotubes est en contact avec les électrodes. Après la sélection initiale, les paires d'électrodes de mesure ne changent pas au cours de la campagne d'expérimentation.

#### 4.1.2.3 Suivi vidéo et analyse de l'activité contractile

Au cours de chaque période de stimulation électrique, les MEA sont régulièrement observés sous microscope pour évaluer l'activité contractile des cellules. Des enregistrements **vidéos** d'environ 20 secondes sont réalisés toutes les heures par l'intermédiaire d'un microscope inversé et d'une caméra (SCOP-CAM4K, ScopPro). Ce modèle de caméra permet d'acquérir **60 images par secondes** avec une résolution de 8 mégapixels ( $3840 \times 2160$  pixels).

A partir de ces vidéos, il est possible d'**analyser l'activité contractile** des cellules musculaires. Pour cela, nous avons développé un programme en langage Python s'appuyant sur la librairie OpenCV. Le programme réalise la conversion en niveau de gris de chaque image d'une vidéo : chaque pixel prend alors une valeur comprise entre 0 (noir) et 255 (blanc). A partir de ces images, nous pouvons évaluer l'**amplitude des contractions**. Pour déterminer l'amplitude, le programme calcule la différence absolue entre une image de référence, choisie comme la première image où il n'y a aucune contraction, et les images suivantes (*c.f. Section 3.4.1, équation 3.5*). S'il n'y a pas de contraction, les pixels de l'image résultante ont une faible valeur (proche de 0, noir). Dans le cas contraire, les pixels ont une valeur plus élevée. Ensuite, le calcul de l'intensité moyenne de chaque image résultante donne l'amplitude des contractions : plus il y a de contractions, plus l'intensité moyenne est élevée.

Il faut noter que ces traitements sont réalisés sur tous les pixels d'une image, donnant donc une information globale sur l'activité contractile de la zone filmée. Dans ce contexte, les indicateurs d'amplitudes de contraction dans les sections "*Résultats*" présentent forcément des valeurs faibles, étant "atténués" par tous les pixels immobiles. Toutes les courbes d'amplitudes de contraction ont été resynchronisées sur l'axe des

temps et recalées sur l'axe des ordonnées pour mettre en évidence l'évolution des profils de contraction au cours du temps. Elles présentent des discontinuités en raison des artefacts de compression (*c.f. Section 3.4.2*) et parfois une dérive au cours du temps due à des vibrations de l'installation ou à des débris cellulaires flottants. Ces phénomènes perturbent les mesures et empêchent l'extraction de métriques précises pour évaluer efficacement l'activité contractile.

Pour toutes ces raisons, nous avons évalué l'activité contractile par simples observations visuelles, selon les critères suivant :

- $\emptyset$  : absence de contractions ;
- + : < 25% de la surface du MEA présente des contractions ;
- ++ : 25-50% de la surface du MEA présente des contractions ;
- +++ : 50-75% de la surface du MEA présente des contractions ;
- ++++ : >75% de la surface du MEA présente des contractions ;
- s+ : présence de quelques contractions spontanées.

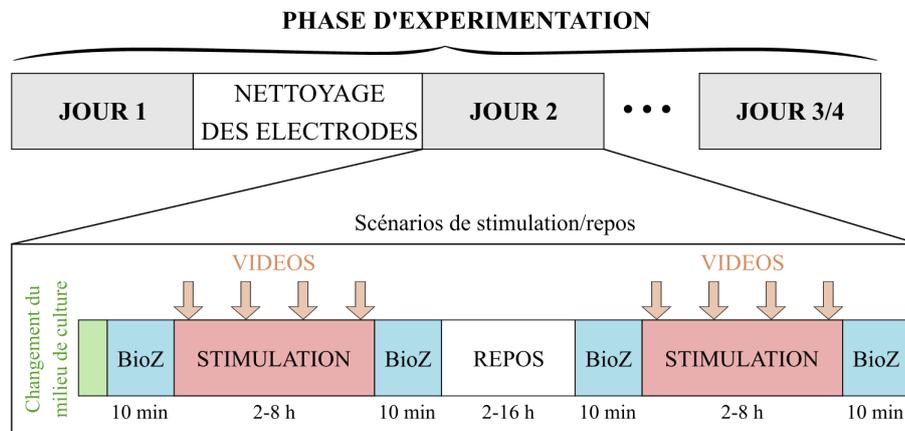


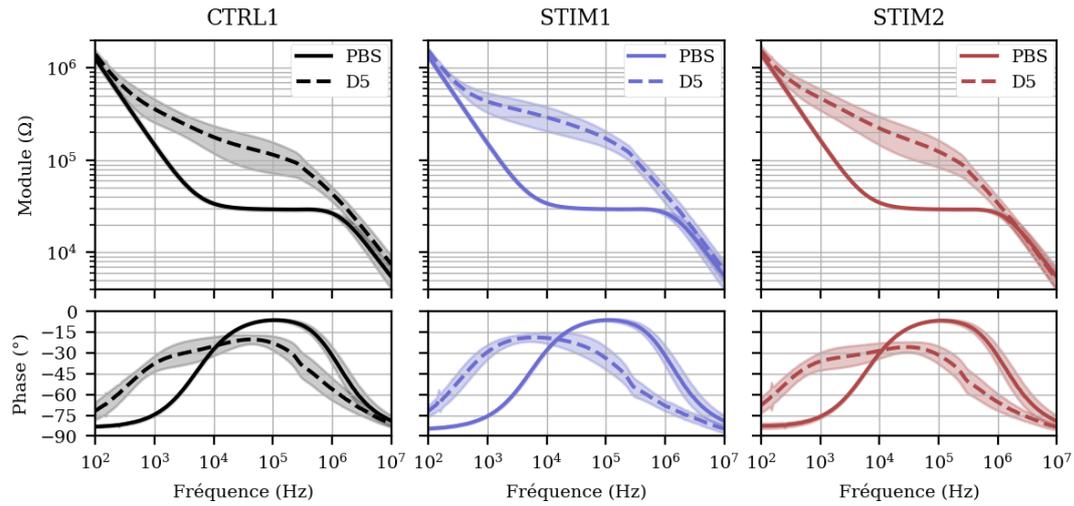
FIGURE 4.5 – Déroulement de la phase d'expérimentation sur plusieurs jours, comprenant plusieurs scénarios de stimulation électrique, et de temps de repos. Chaque période de stimulation est précédée et suivie par des étapes de mesure de bioimpédance (BioZ).

Pendant la phase de stimulation, des enregistrements vidéos sont réalisés.

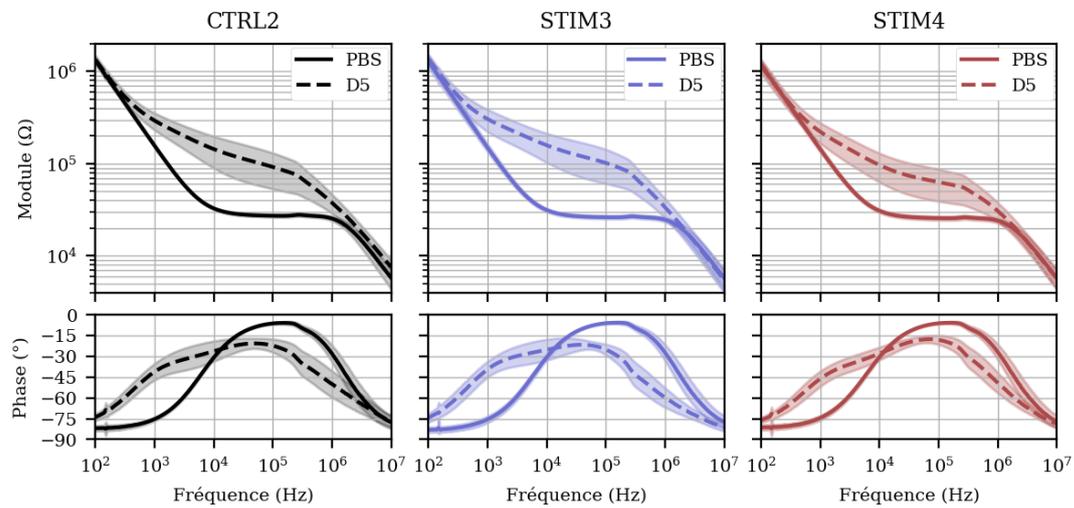
Finalement, la *Figure 4.5* résume le déroulement de la phase expérimentale. Celle-ci se déroule sur plusieurs jours, pendant lesquels des scénarios de stimulation et de repos sont appliqués à 2 MEA (un MEA contrôle ne reçoit pas de stimulation). Pendant ces phases de stimulation, des vidéos sont enregistrées toutes les heures pour évaluer l'activité contractile. Les mesures de bioimpédance sont réalisées avant et après chaque période de stimulation. Au début de chaque journée, le milieu de culture est changé. En fin de journée, les électrodes de carbone sont nettoyées et stérilisées.

## 4.2 Identification d'une métrique pour l'évaluation de la fatigue musculaire par bioimpédance

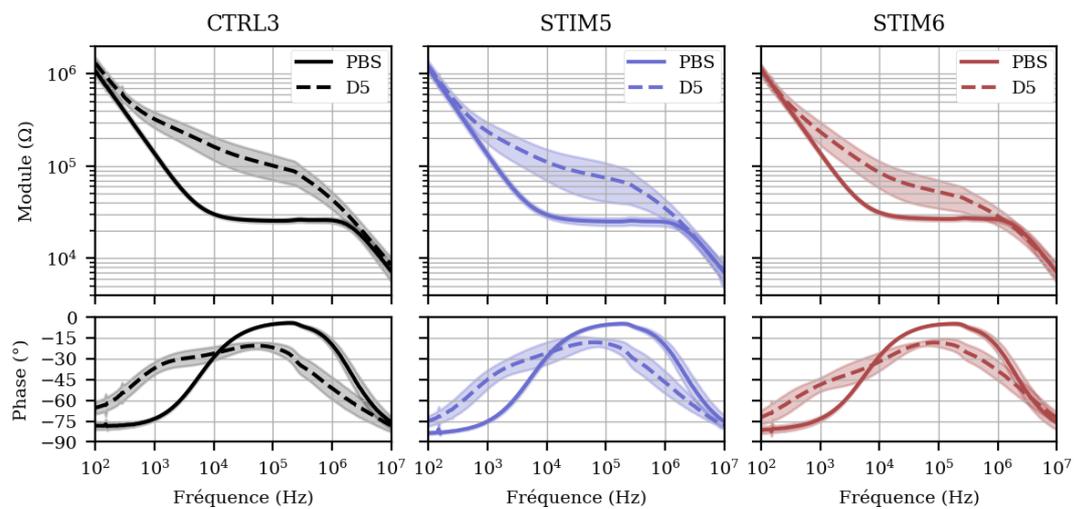
Les trois séries d'expériences réalisées impliquent chacune l'utilisation de 3 MEA. Au début de chaque campagne, les 3 MEA ont été caractérisés avec du PBS (10 paires d'électrodes par MEA) avant la phase de culture cellulaire. Puis des mesures de bioimpédance (15-20 paires d'électrodes par MEA) ont été réalisées après 5 jours de différenciation (fin de la phase de culture). La *Figure 4.6* présente les moyennes et écarts-types du module et de la phase des impédances sans cellules (PBS, trait plein) et avec cellules différenciées (D5, ligne pointillée) pour les 3 séries d'expérimentations.



(a) Série 1 (CTRL1, STIM1, STIM2)



(b) Série 2 (CTRL2, STIM3, STIM4)



(c) Série 3 (CTRL3, STIM5, STIM6)

FIGURE 4.6 – Moyennes et écarts-types du module et de la phase de l'impédance sans cellules (PBS, 10 paires d'électrodes), et avec cellules musculaires différenciées (D5 après 5 jours de différenciation, 15-20 paires d'électrodes) pour (a) la Série 1, (b) la Série 2 et (c) la Série 3.

En l'absence de cellules (courbes PBS, *Figure 4.6*), on constate que les courbes d'impédance présentent une faible dispersion et sont semblables pour les 9 MEA considérés. Comme attendu (*Chapitre 3*), en basses fréquences (100 Hz - 10 kHz) le module présente une pente décroissante et la phase est aux alentours de  $-90^\circ$ , ce qui témoigne des effets capacitifs de l'interface électrode-électrolyte. Entre 10 kHz et 1 MHz, le module et la phase montrent un plateau résistif ( $\sim 30 \text{ k}\Omega$  et  $\sim 0^\circ$ ) en lien avec à la conductivité du PBS. Enfin, en hautes fréquences, le module et la phase chutent en raison des effets capacitifs parasites des pistes de connexion des électrodes.

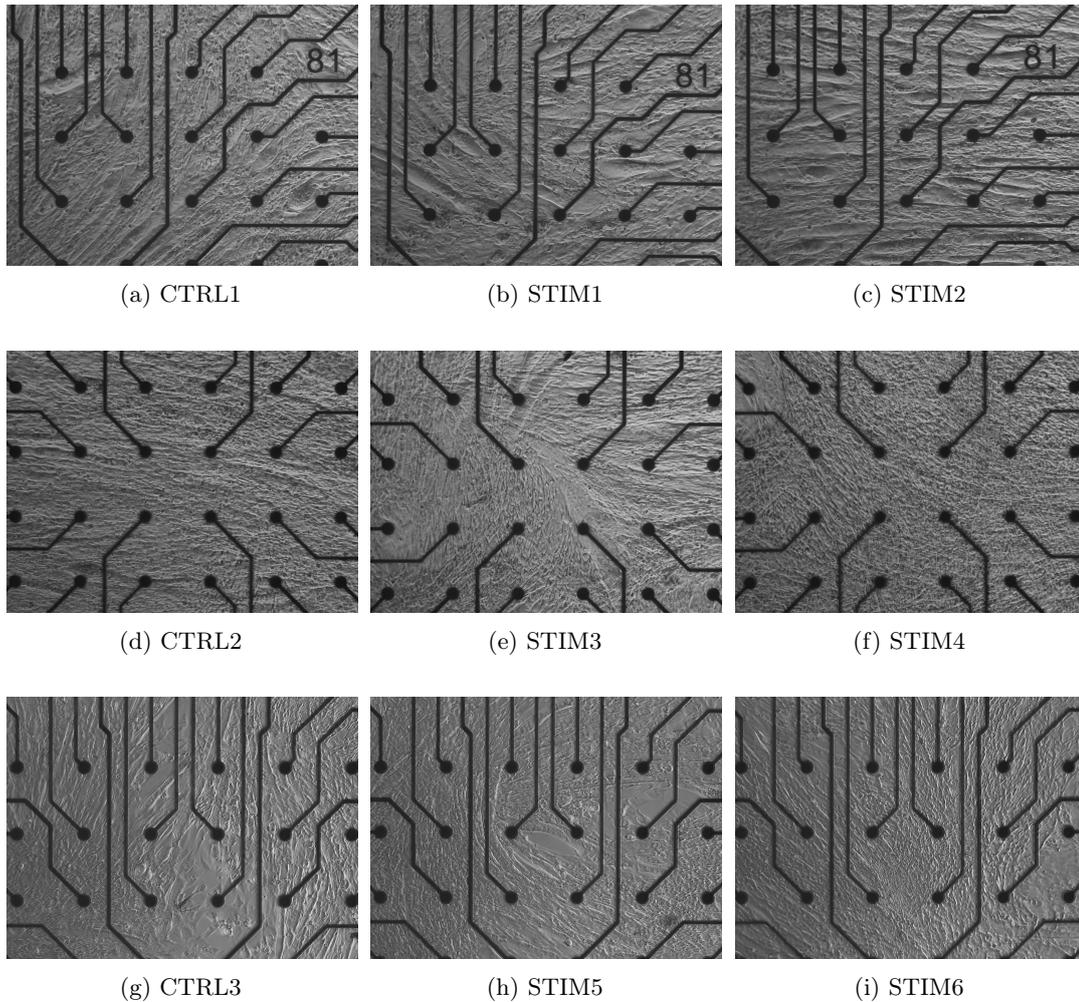


FIGURE 4.7 – Photographies des cellules musculaires C2C12 après 5 jours de différenciation (D5).

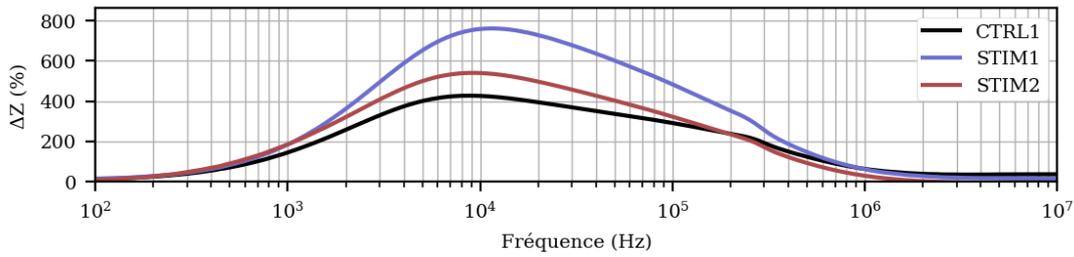
En présence des cellules musculaires différenciées (courbes D5, *Figure 4.6*), nous remarquons une forte augmentation du module moyen de l'impédance, essentiellement entre 1 kHz et 1 MHz pour les 9 MEA considérés. Nous pouvons cependant constater que les modules moyens varient d'un MEA à l'autre (entre 50 et 500 k $\Omega$ ) dans cet intervalle de fréquence. De plus, nous remarquons pour chaque MEA une dispersion des mesures beaucoup plus importante que celle des mesures sans cellules (PBS). Cela peut s'expliquer par la variabilité du nombre, de la morphologie et de l'orientation des cellules en contact avec les électrodes, comme en témoignent les photographies de la *Figure 4.7*. La phase moyenne augmente dès 100 - 200 Hz pour atteindre une valeur comprise entre  $-50^\circ$  et  $-30^\circ$  à 1 kHz et semble culminer vers une valeur de  $-20^\circ$  à 100 kHz. Pour l'ensemble des MEA, nous constatons que la valeur maximale de la

phase à D5 est toujours inférieure à celle obtenue en l'absence de cellules (PBS). De plus, on note que les mesures de bioimpédance avec cellules (D5) sont masquées à partir de 200-300 kHz par l'effet capacitif parasite des pistes. A partir de ces observations, nous pouvons supposer que dans l'intervalle de fréquence compris entre 1 kHz et 200-300 kHz, **les mesures de bioimpédance reflètent essentiellement les propriétés des membranes cellulaires et du milieu extracellulaire**, et moins les propriétés intracellulaires.

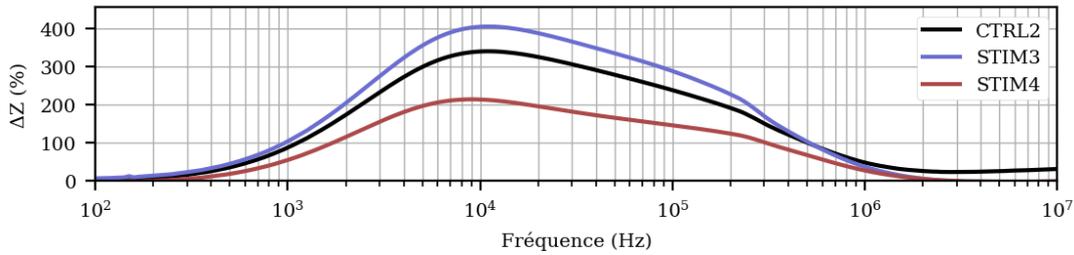
En vue de fournir une estimation du comportement typique, nous nous concentrons sur les **impédances moyennes** pour l'ensemble des analyses des mesures de bioimpédance réalisées au cours de chaque série d'expérimentations. Afin d'identifier la gamme de fréquence la plus sensible et adéquate pour analyser l'impact de la fatigue musculaire sur la bioimpédance, nous avons calculé la variation relative du module ( $\Delta|Z|$ ) sur l'ensemble du spectre :

$$\Delta|Z| (\%) = \frac{|Z|_{D5} - |Z|_{PBS}}{|Z|_{PBS}} \times 100 \quad (4.1)$$

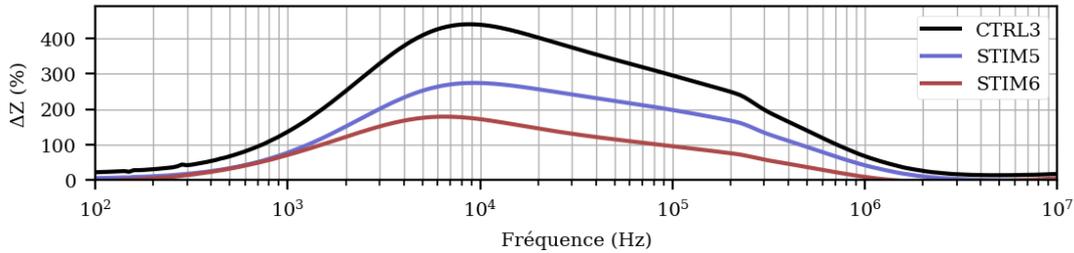
avec  $|Z|_{PBS}$  l'impédance moyenne sans cellules (PBS) et  $|Z|_{D5}$  l'impédance moyenne après 5 jours de différenciation (D5). Les résultats obtenus pour chaque série sont illustrés dans la *Figure 4.8*.



(a) Série 1 (CTRL1, STIM1, STIM2)



(b) Série 2 (CTRL2, STIM3, STIM4)



(c) Série 3 (CTRL3, STIM5, STIM6)

FIGURE 4.8 – Variation relative du module moyen de l'impédance avec cellules différenciées (D5) par rapport à l'impédance sans cellules (PBS) pour (a) la Série 1, (b) la Série 2 et (c) la Série 3.

Pour chaque série, nous constatons des variations relatives inégales entre les 3 MEA, comprises entre 400 et 600% pour la Série 1 (*Figure 4.8(a)*), entre 200 et 400% pour la Série 2 (*Figure 4.8(b)*) et entre 200 et 450% pour la Série 3 (*Figure 4.8(c)*). A nouveau, ces variabilités peuvent provenir de l'orientation aléatoire des cellules musculaires par rapport aux électrodes, de leur nombre et de leur morphologie (*Figure 4.7*). On note toutefois que, pour les 3 séries, la variation relative culmine aux alentours de 10 kHz pour les 9 MEA considérés. C'est pourquoi nous avons choisi la **variation relative** de la **bioimpédance moyenne à 10 kHz** en tant que **métrique** pour l'analyse de la fatigue musculaire.

## 4.3 Résultats expérimentaux

### 4.3.1 Série 1

La première série d'expérimentations a été réalisé sur 3 MEA : CTRL1 utilisé en tant que contrôle, STIM1 et STIM2 stimulés électriquement selon les scénarios illustrés en *Figure 4.9*.

Les objectifs de cette série sont de :

- réaliser des premiers essais de stimulation électrique de cellules C2C12 cultivées sur MEA et s'assurer qu'elles sont contractiles ;
- déclencher différents types de contractions (secousses et tétanies parfaites) ;
- obtenir une première image de l'évolution de la bioimpédance après activité contractile, selon la fréquence de stimulation, la durée de stimulation ou de repos.

#### 4.3.1.1 Scénarios et patterns de stimulation électrique

À partir des expériences réalisées dans le *Chapitre 3*, nous avons choisi d'utiliser deux patterns de stimulation, illustrés en *Figure 4.9*, dont l'amplitude et la durée des impulsions sont fixées ( $I_p = 20 \text{ mA}$ ,  $T_p = 5 \text{ ms}$ , *c.f. Section 4.1.2.1*).

Puisque le processus de différenciation des cellules musculaires C2C12 dépend du support de culture et du nombre de passages (*Chapitre 3*), nous avons choisi d'utiliser un premier pattern (**pattern 1**, *Figure 4.9*) composé d'une impulsion biphasique unique, répétée à une fréquence de **1 Hz**. Ce pattern a pour rôle de tester la réponse des cellules musculaires C2C12 à la stimulation électrique, c'est-à-dire vérifier que celles-ci sont fonctionnelles et suffisamment différenciées pour se contracter. Si ce n'est pas le cas, le pattern 1 permet alors d'accélérer l'assemblage des sarcomères (unités contractiles des cellules musculaires, *Chapitre 1*) et de les rendre contractiles [196]. Ce pattern de stimulation a été appliqué le premier jour (**J1**, *Figure 4.9*). De plus, la faible fréquence de stimulation (1 Hz) permet de déclencher des contractions musculaires appelées **secousses**<sup>3</sup> (*c.f. Section 3.2.3.2*). Son troisième rôle est alors d'étudier l'impact d'une activité musculaire à une faible fréquence de stimulation sur la bioimpédance. Nous avons choisi de l'appliquer pendant **8 heures** afin de nous assurer que les cellules C2C12 soient fonctionnelles et contractiles pour les jours suivants. Cette longue durée nous permet d'observer l'évolution de l'activité contractile au cours du temps et constater si une fatigue musculaire apparaît à basse fréquence et à quel instant. Enfin, dans le but de vérifier la reproductibilité des résultats en termes

3. Une secousse musculaire est une contraction provoquée par un seul influx nerveux (ou un seul stimulus électrique), composée d'une phase de contraction et d'une phase de relaxation.

d'activité contractile et de bioimpédance, nous avons de nouveau appliqué le pattern 1 le deuxième jour, sur la même durée (**J2**, *Figure 4.9*).

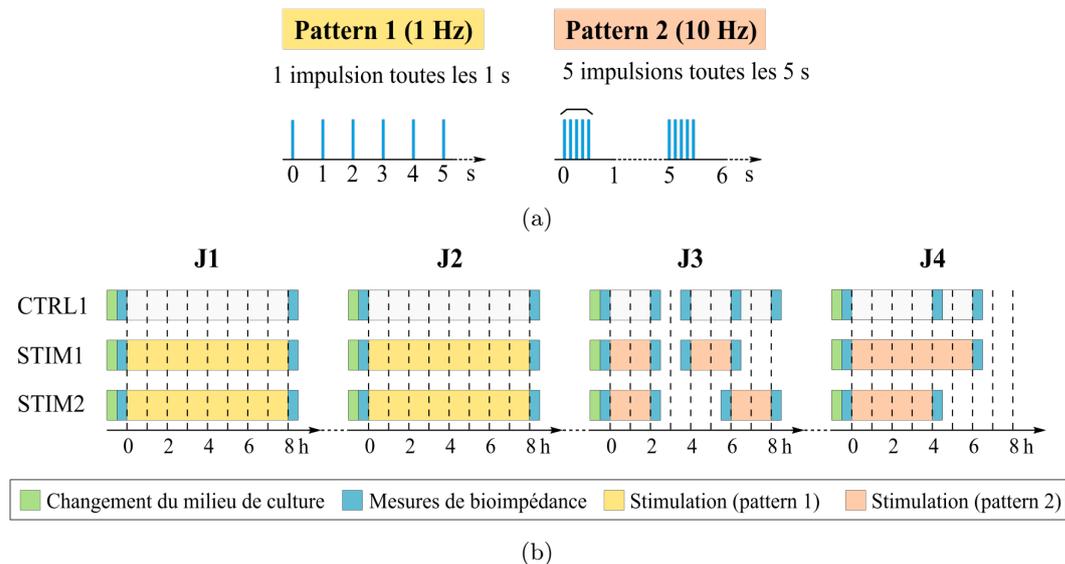


FIGURE 4.9 – (a) Patterns et (b) scénarios de stimulation utilisés lors de la série 1, et appliqués à 2 MEA (STIM1 et STIM2), tandis que CTRL1 sert de contrôle et ne reçoit pas de stimulation électrique.

Dans le but d'étudier l'effet de l'augmentation de la fréquence de stimulation, nous avons utilisé un second pattern (**pattern 2**, *Figure 4.9*), composé de 5 impulsions biphasiques de fréquence **10 Hz**. Ce dernier est répété toutes les 5 secondes de sorte que le nombre d'impulsions (et par conséquent la quantité de charges injectées) soit égal à celui du pattern 1 sur une période de 5 secondes. Nous avons choisi d'utiliser une fréquence de 10 Hz afin d'induire des **contractions téaniques parfaites**<sup>4</sup> (*Chapitre 3*). Lors du troisième jour (**J3**, *Figure 4.9*), le pattern 2 a été appliqué pendant une durée de **2 heures** à STIM1 et STIM2. Pour examiner l'effet de la **durée des temps de repos**, nous avons alloué un temps de repos de 2 heures à STIM1 et de 4 heures à STIM2, avant d'appliquer à nouveau le pattern 2 pendant **2 heures**. Enfin, pour étudier l'effet de la **durée de stimulation**, nous avons appliqué le pattern 2 sur de plus longues périodes (respectivement **6 et 4 heures** pour STIM1 et STIM2) lors du quatrième jour (**J4**, *Figure 4.9*). Nous avons choisi d'appliquer le pattern 2 sur des périodes plus courtes que le pattern 1 afin d'éviter tout risque de décollement des cellules du support de culture.

Dans cette série, les mesures de bioimpédance sont réalisées avant et après chaque scénario de stimulation (*c.f. Section 4.1.2.2*). Le milieu de culture est changé quotidiennement avant l'application des scénarios de stimulation. Enfin, les MEA sont régulièrement observés et filmés afin d'évaluer l'activité contractile des cellules musculaires pendant les phases de stimulation (*c.f. Section 4.1.2.3*).

4. Une contraction téanique est la sommation de plusieurs secousses musculaires, en réponse à des stimuli de fréquence élevée. Un stimulus unique déclenche une secousse. Lorsqu'un second stimulus excite la fibre pendant la phase de relaxation de la première contraction, cela déclenche une nouvelle contraction et empêche le relâchement complet de la fibre musculaire. Plus la fréquence des stimuli augmente, plus les secousses fusionnent en une longue contraction continue (tétanos parfait).

### 4.3.1.2 Résultats

#### Effet du pattern 1 sur la bioimpédance et l'activité contractile

Lors des deux premiers jours (J1, J2), des mesures de bioimpédance ont été réalisées sur STIM1-2 avant et après l'application du pattern 1 (1 Hz, 8 heures, voir scénarios en *Figure 4.9*). Les bioimpédances moyennes à 10 kHz et les variations d'impédance pour chaque paire d'électrodes sont présentées en *Figure 4.10* et *Figure 4.12*. L'activité contractile au cours de ces deux journées sont illustrées en *Figure 4.11* et *Figure 4.13*.

Nous rappelons que l'activité contractile est évaluée par l'analyse des images vidéos (sur image entière, *c.f. Section 4.1.2.3*), avec comme objectif de mettre en évidence les profils de contractions (secousse, tétanie imparfaite et tétanie parfaite) et l'évolution de leur amplitude au cours du temps.

À **J1**, les bioimpédances moyennes sont comprises entre 178 k $\Omega$  et 293 k $\Omega$  (*Figure 4.10*).

La *Figure 4.11* illustre l'évolution de l'activité contractile des cellules musculaires au cours des 8 heures de stimulation à 1 Hz. Comme attendu, le pattern 1 déclenche des contractions de type secousse, synchronisées sur la fréquence de stimulation. On constate que l'activité contractile augmente au cours du temps en termes d'amplitude de mouvement et de vitesse de contraction (i.e. réduction des temps de contraction et de relaxation). L'augmentation des vitesses de contractions se manifeste par des temps de contraction et de relaxation plus courts.

Après 8 heures de stimulation, on observe une diminution de la bioimpédance moyenne sur les 3 MEA, avec ou sans stimulation électrique (*Figure 4.10*). Nous remarquons cependant que la bioimpédance des cellules stimulées (STIM1-2) diminuent de manière plus importante que celle des cellules contrôle : elles varient de -19% (CTRL1), -34% (STIM1) et -33% (STIM2).

À **J2**, après un temps de repos nocturne et un changement de milieu, les bioimpédances moyennes sont comprises entre 158 k $\Omega$  et 281 k $\Omega$  (*Figure 4.12*). Le pattern 1 a de nouveau été appliqué pendant 8 heures à STIM1-2.

La *Figure 4.13* illustre l'évolution de l'activité contractile des cellules musculaires au cours des 8 heures de stimulation à 1 Hz. De même que lors du premier jour (J1), on constate la présence de secousses synchrones à la fréquence de stimulation, dont l'amplitude et la vitesse augmentent au cours du temps. On note cependant que les amplitudes de contractions de STIM1 sont plus faibles que lors du premier jour (J1).

Après les 8 heures de stimulation, nous remarquons encore une fois que la bioimpédance moyenne diminue pour les 3 MEA, avec ou sans stimulation (*Figure 4.12*). Contrairement à ce qui est observé à J1, les bioimpédances de STIM1 et STIM2 diminuent moins ou de façon similaire à celle du MEA contrôle : elles varient de -23% (CTRL1), -19% (STIM1) et -23% (STIM2).

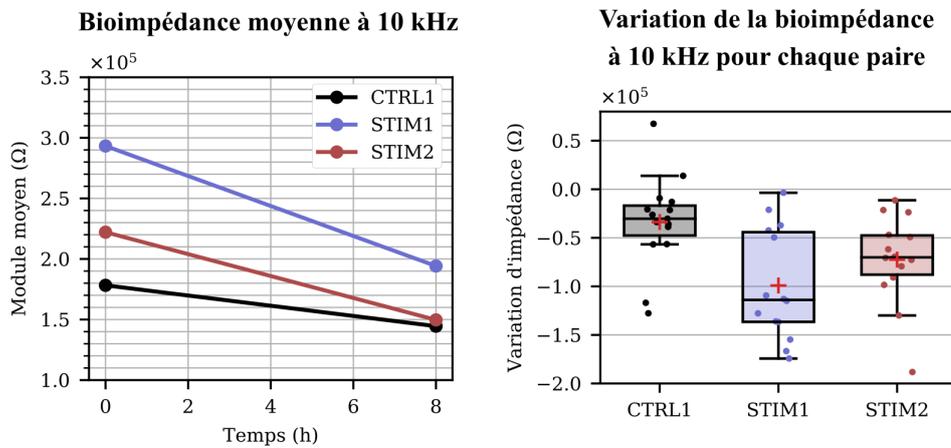


FIGURE 4.10 – Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J1 pendant laquelle le pattern 1 a été appliqué pendant 8 heures à STIM1 et STIM2. Les croix rouges sur les boxplot symbolisent la valeur moyenne des données.

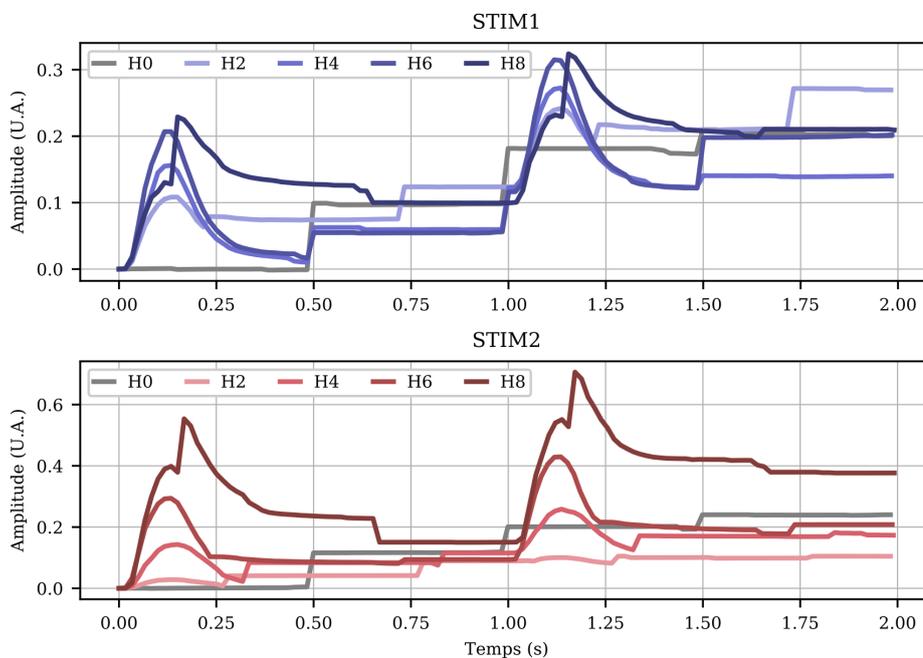


FIGURE 4.11 – Activité contractile (*c.f.* Section 4.1.2.3) des cellules musculaires C2C12 lors du J1 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz.

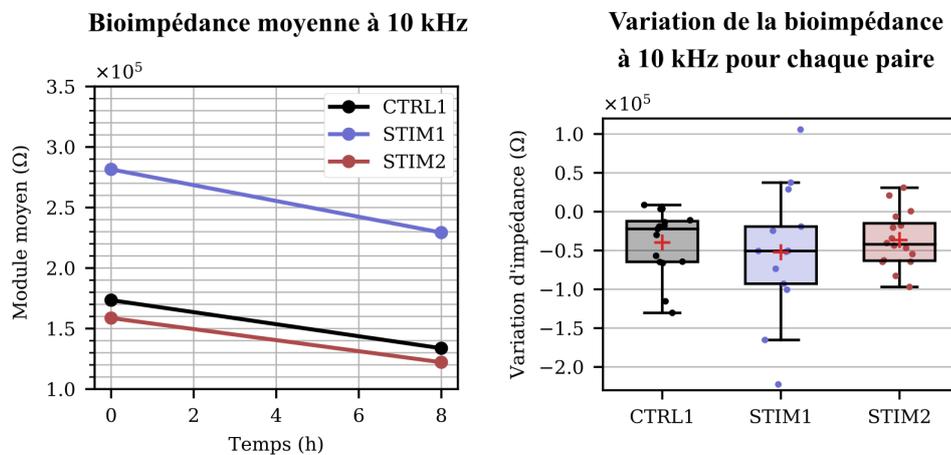


FIGURE 4.12 – Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J2 pendant laquelle le Pattern 1 a été appliqué pendant 8 heures à STIM1 et STIM2. Les croix rouges sur les boxplot symbolisent la valeur moyenne des données.

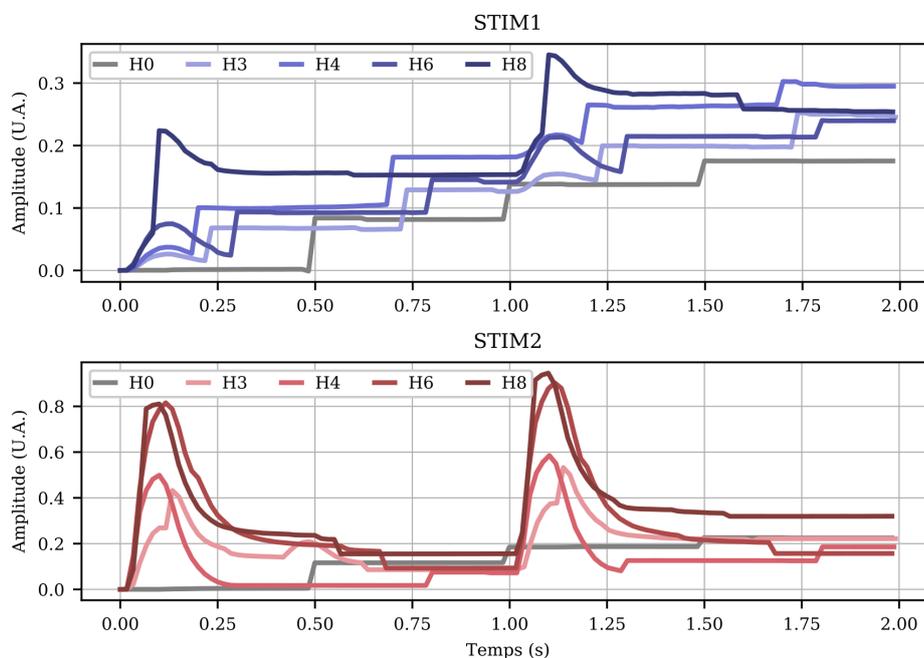


FIGURE 4.13 – Activité contractile (*c.f.* Section 4.1.2.3) des cellules musculaires C2C12 lors du J2 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz.

### Effet du pattern 2 sur la bioimpédance et l'activité contractile

Lors des deux jours suivants (J3, J4), nous avons utilisé le pattern 2 (10 Hz, voir scénarios en *Figure 4.9*).

À **J3**, après un temps de repos nocturne et un changement de milieu, les bioimpédances moyennes sont comprises entre 140 k $\Omega$  et 273 k $\Omega$  (*Figure 4.14*).

Le pattern 2 a ensuite été appliqué pendant 2 heures. À la mise en route de la stimulation, le pattern 2 déclenche des contractions tétaniques parfaites (*Figure 4.15*, H0). Après 2 heures de stimulation, on constate une augmentation de l'amplitude de mouvement ainsi que de la vitesse des contractions, se traduisant par la présence de contractions tétaniques imparfaites (*Figure 4.15*, H2), synchrones à la fréquence de stimulation.

Après les 2 heures de stimulation, on constate une diminution des bioimpédances de -8% (CTRL1), -3% (STIM1) et -10% (STIM2) (*Figure 4.14*).

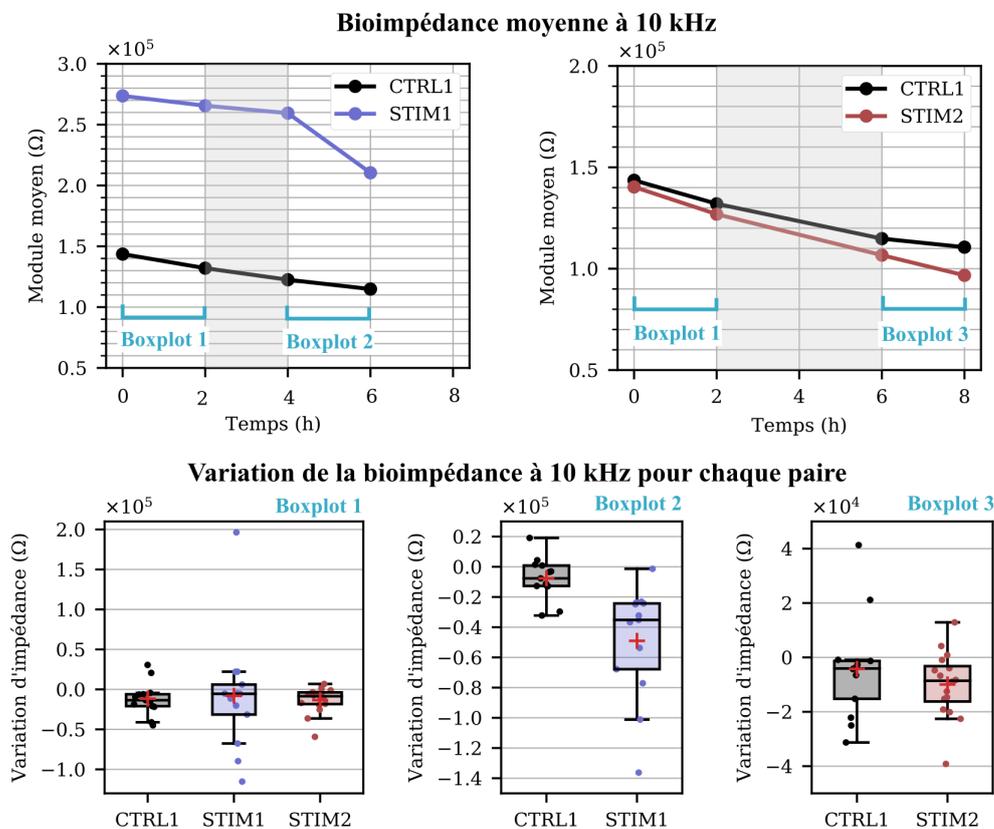


FIGURE 4.14 – Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires d'électrodes) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J3 pendant laquelle le pattern 2 a été appliqué pendant 2 heures, suivi d'un temps de repos (zones grises) de 2 (STIM1) ou 4 (STIM2) heures et de nouveau l'application du Pattern 2 pendant 2 heures.

Après un temps de repos de 2 (STIM1) ou 4 (STIM2) heures, le pattern 2 a été de nouveau appliqué pendant 2 heures.

À la reprise de la stimulation (*Figure 4.15*, H0b), on constate des contractions tétaniques parfaites d'amplitude plus faible qu'avant le temps de repos (*Figure 4.15*, H2). De même que lors de la précédente période de stimulation, l'amplitude et la vitesse des mouvements de contraction augmentent après 2 heures, induisant des contractions tétaniques imparfaites (*Figure 4.15*, H2b). Nous remarquons également que cette

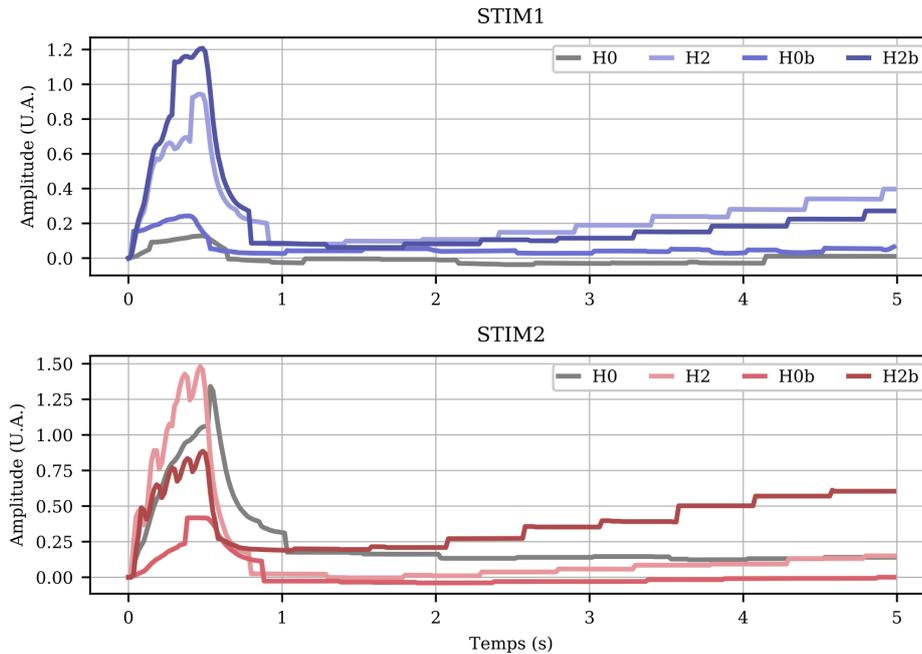


FIGURE 4.15 – Activité contractile (*c.f.* Section 4.1.2.3) des cellules musculaires C2C12 lors du J3 : à la mise en route de la stimulation à 10 Hz (H0), après 2 heures (H2), puis pendant la seconde période de stimulation à 10 Hz après un temps de repos (H0b) et 2 heures après (H2b).

augmentation de mouvement est moins importante chez STIM2, qui a bénéficié d'un temps de repos plus long que STIM1.

Au cours de ces 2 heures de stimulation, la bioimpédance de STIM1 varie de -19%, contre -6% chez CTRL1, et la bioimpédance de STIM2 diminue de -9%, contre -4% chez CTRL1 (Figure 4.14). On note donc une diminution bien plus importante de la bioimpédance de STIM1 qui n'a eu que 2 heures de pause, par rapport à celle de STIM2 qui a bénéficié de 4 heures de pause.

À J4, après un temps de repos nocturne et un changement de milieu, les bioimpédances moyennes sont comprises entre 106 k $\Omega$  et 233 k $\Omega$  (Figure 4.16).

Le pattern 2 a ensuite été appliqué pendant 4 heures (STIM2) ou 6 heures (STIM1). À la mise en route de la stimulation (Figure 4.17, H0), on note une très faible activité contractile, en comparaison des jours précédents. Comme lors des précédentes périodes de stimulation, les amplitudes et vitesses de contraction augmentent au cours du temps, menant à des contractions téaniques imparfaites (Figure 4.17). Cependant, on constate une baisse de l'activité contractile de STIM2 après 4 heures de stimulation, en raison d'un décollement important des cellules. Après stimulation, les bioimpédances des 2 MEA stimulés décroissent de façon similaire (Figure 4.16) : -31% pour STIM2 (-4% CTRL1), et -29% pour STIM1 (-13% CTRL1). Il faut cependant noter que très peu de mesures ont pu être réalisées sur STIM2 en raison du décollement des cellules après les 4 heures de stimulation électrique (4 paires d'électrodes seulement).

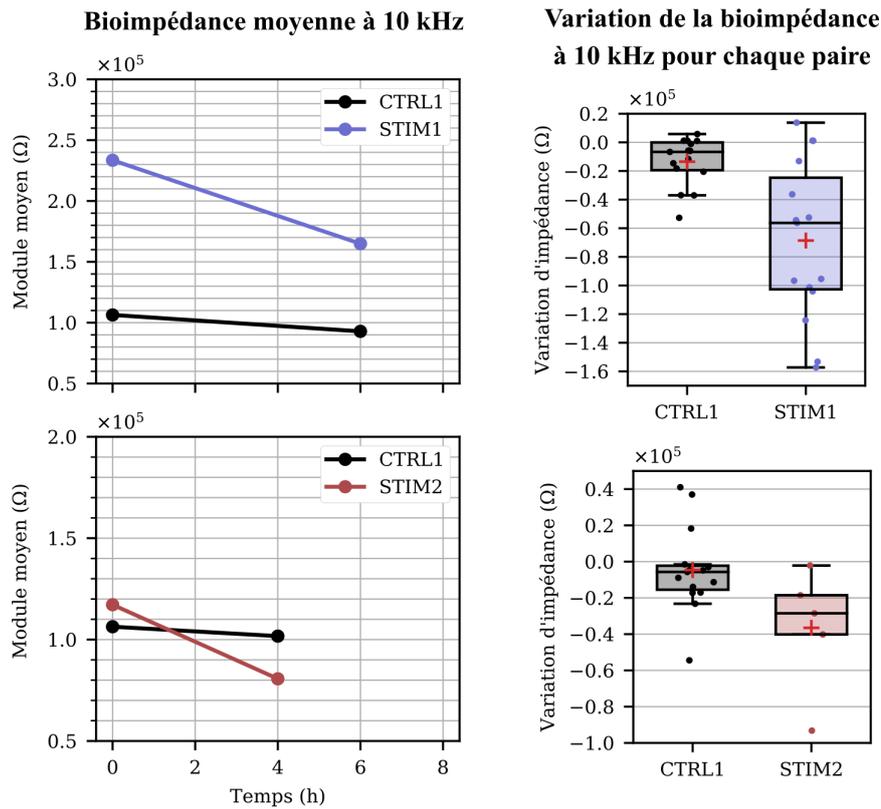


FIGURE 4.16 – Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J4 pendant laquelle le Pattern 2 a été appliqué pendant 4 (STIM2) ou 6 (STIM1) heures.

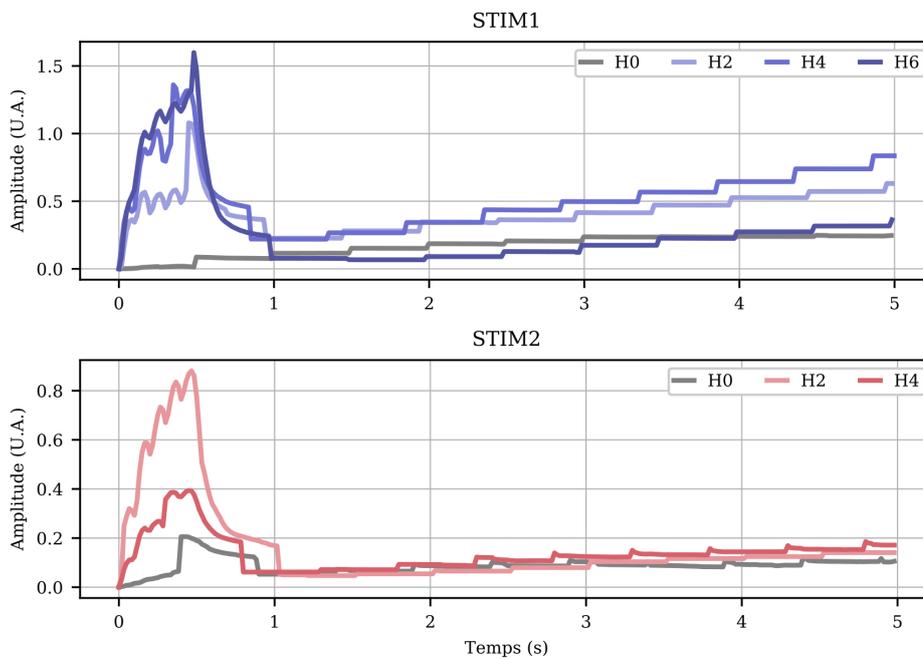


FIGURE 4.17 – Activité contractile (*c.f.* Section 4.1.2.3) des cellules musculaires C2C12 lors du J4 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4) et 6 (H6) heures de stimulation à 10 Hz.

## Synthèse

Le *Tableau 4.1* rassemble les variations relatives de bioimpédance à 10 kHz obtenues lors de cette campagne d'expérimentation. Pour comparer les effets des durées et patterns de stimulation, les variations relatives par heure sont également renseignées.

**En résumé**, nous pouvons faire plusieurs observations :

- la bioimpédance des cellules non stimulées diminue au cours d'une journée donnée, et les périodes de stimulation entraînent des variations plus importantes ;
- après le temps de repos nocturne et le changement de milieu, la bioimpédance est systématiquement plus élevée ;
- à quantité de charge égale, augmenter la fréquence de répétition des impulsions engendre des variations d'impédance plus importantes ;
- plus la durée de stimulation augmente, plus les variations d'impédance sont importantes ;
- plus le temps de pause entre deux périodes de stimulation est court, plus les variations d'impédance pendant la prochaine période de stimulation sont importantes ;
- plus le temps de pause entre deux périodes de stimulation est long, plus l'activité contractile est faible pendant la prochaine période de stimulation ;
- au cours d'une période de stimulation donnée, les amplitudes et vitesses de contraction augmentent au cours du temps.

TABLEAU 4.1 – Variations relatives de la bioimpédance moyenne à 10 kHz et activité contractile obtenus au cours de la série 1.

JOUR :	JOUR 1				JOUR 2				JOUR 3				JOUR 4									
	CTRL1	STIM1	STIM2	CTRL1	STIM1	STIM2	CTRL1	STIM1	STIM2	CTRL1	STIM1	STIM2	CTRL1	STIM1	STIM2	CTRL1	STIM1	STIM2	CTRL1	STIM1	STIM2	
Paramètres de stimulation	-	1	1	-	1	1	-	2	2	-	2	2	-	2	2	-	2	2	-	2	2	2
Fréquence (Hz)	-	1	1	-	1	1	-	10	10	-	10	10	-	10	10	-	10	10	-	10	10	10
Durée (h)	8				8				2				4				6					
Temps de repos avant stimulation (h)	-				>12h				>12h				2				>12h					
Variations de bioimpédance	-18,9	-33,8	-32,6	-22,9	-18,6	-23,0	-8,1	-3,0	-9,6	-6,3	-18,9	-3,7	-9,3	-4,4	-31,2	-12,7	-29,4	-2,4	-4,2	-4,1	-2,9	-2,3
Activité contractile	s+	+++	+++	s+	+	+++	s+	+	++	s+	+	∅	++	∅	+	++	+	∅	+	++	∅	+

### 4.3.2 Série 2

La deuxième série d'expérimentations a également été réalisée sur 3 MEA : CTRL2 utilisé en tant que contrôle, STIM3 et STIM4 stimulés électriquement selon les scénarios illustrés en *Figure 4.18*.

Les objectifs de cette série sont de :

- valider les résultats de la série 1 ;
- étudier l'effet conjoint de l'augmentation de la quantité de charge et de la fréquence de stimulation sur la bioimpédance.

#### 4.3.2.1 Scénarios et patterns de stimulation électrique

De la même façon que pour la série 1, le premier jour de la série 2 (**J1**, *Figure 4.18*) est consacré à la stimulation basse fréquence (**Pattern 1**, 1 Hz pendant 8 heures) pour tester la réponse des cellules C2C12 à la stimulation électrique et les rendre contractiles si ce n'est pas le cas. De plus, nous avons choisi de reproduire ce scénario de stimulation afin de pouvoir comparer les résultats avec la Série 1, en termes d'activité contractile et de bioimpédance.

Les jours suivants, nous avons appliqué le **pattern 3**, constitué de **10 impulsions** biphasiques de fréquence **10 Hz**, répété toutes les 5 secondes. Ce pattern nous permet d'étudier l'effet cumulé de l'augmentation de la fréquence et de la quantité de charge injectée. En effet, ce pattern a la même fréquence que le pattern 2 (10 Hz), mais une quantité de charge 2 fois supérieure à celles du pattern 1 et du pattern 2 sur une période de 5 secondes. Ainsi, les temps d'application du pattern 3 sont similaires à ceux du pattern 2. Lors du deuxième jour (J2, *Figure 4.18*), le pattern 3 a été appliqué pendant une durée de **2 heures** à STIM3 et STIM4, suivi d'un temps de repos de 2 (STIM3) ou 4 heures (STIM4), avant d'appliquer à nouveau le pattern 3 pendant **2 heures**. Enfin, lors du troisième jour (J3, *Figure 4.18*) le pattern 3 a été appliqué pendant **4 heures** à STIM3 et **6 heures** à STIM4.

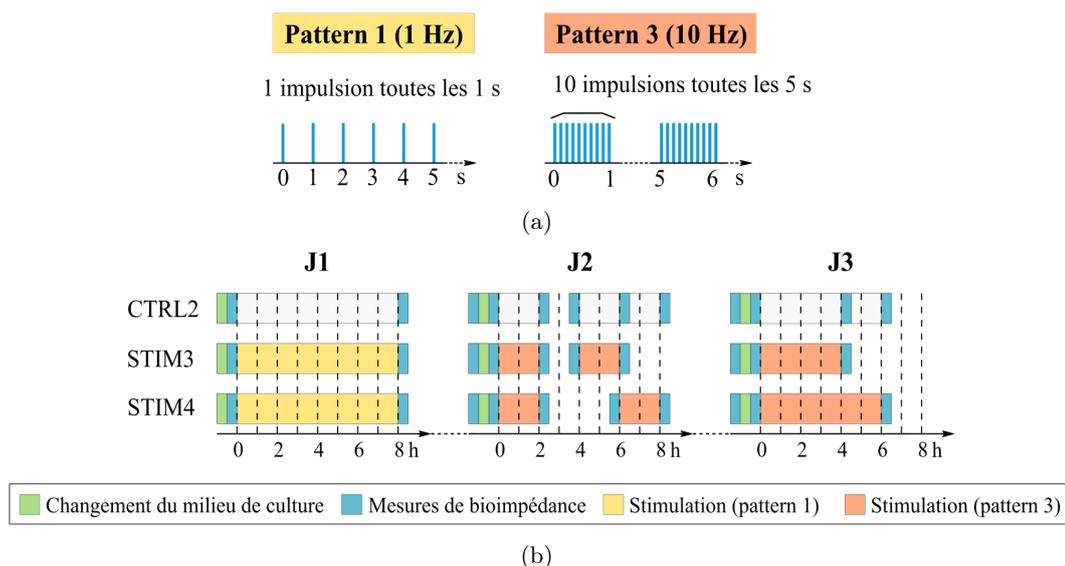


FIGURE 4.18 – (a) Patterns et (b) scénarios de stimulation utilisés lors de la série 2, et appliqués à 2 MEA (STIM3 et STIM4), tandis que CTRL2 sert de contrôle et ne reçoit pas de stimulation électrique.

Lors de cette série, les mesures de bioimpédance ont été réalisées avant et après chaque période de stimulation. De plus, afin d'observer l'évolution de la bioimpédance lors des temps de repos nocturnes, nous avons également effectué des mesures chaque matin avant le changement de milieu.

#### 4.3.2.2 Résultats

##### Effet du pattern 1 sur la bioimpédance et l'activité contractile

Lors du premier jour (J1), des mesures de bioimpédance ont été réalisées sur STIM3-4 avant et après l'application du pattern 1 (1 Hz, 8 heures, voir scénarios *Figure 4.18*). Les bioimpédances moyennes à 10 kHz et les variations d'impédance pour chaque paire d'électrodes sont présentées en *Figure 4.19*. L'activité contractile au cours de cette journée est illustrée en *Figure 4.20*.

À **J1**, les bioimpédances moyennes initiales sont comprises entre 96 k $\Omega$  et 158 k $\Omega$  (*Figure 4.19*).

La *Figure 4.20* illustre l'évolution de l'activité contractile des cellules musculaires au cours des 8 heures d'application du pattern 1. Comme attendu, le pattern 1 déclenche des contractions de type secousse, synchrones à la fréquence de stimulation. Les amplitudes de mouvement augmentent au cours du temps, pour atteindre un maximum à environ 4 heures de stimulation, et diminuent les heures suivantes.

Après 8 heures de stimulation, on note une diminution des bioimpédances moyennes des 3 MEA (*Figure 4.19*), avec ou sans stimulation électrique : elles varient de -13% (CTRL2), -24% (STIM3) et -21% (STIM4). Comme observé lors de la série 1, les bioimpédances des MEA stimulés ont davantage diminué que celle du MEA contrôle.

Des mesures de bioimpédances ont également été effectuées après le temps de repos nocturne et avant le changement de milieu. La *Figure 4.19* montre que la diminution de l'impédance est plus faible pendant cette période de repos que lors de la phase de stimulation.

##### Effet du pattern 3 sur la bioimpédance et l'activité contractile

Lors des deux jours suivants (J2, J3), nous avons utilisé le pattern 3 (10 Hz, voir scénarios en *Figure 4.18*).

À **J2**, après un temps de repos nocturne et un changement de milieu, les bioimpédances moyennes initiales sont comprises entre 93 k $\Omega$  et 176 k $\Omega$  (*Figure 4.21*) avant l'application du pattern 3 à STIM3 et STIM4 pendant 2 heures.

À la mise en route de la stimulation, le pattern 3 déclenche des contractions téaniques parfaites (*Figure 4.22*, H0). Comme observé lors de la série 1, on constate une augmentation de l'amplitude de mouvement ainsi que de la vitesse des contractions après 2 heures de stimulation, se traduisant par la présence de contractions téaniques imparfaites (*Figure 4.22*, H2), de fréquence égale à la fréquence de stimulation. De plus, nous remarquons globalement que les amplitudes de mouvement sont plus faibles que lors du premier jour (J1) pour les 2 MEA.

Après les 2 heures de stimulation, on observe une variation des bioimpédances moyennes de -4% (CTRL1), -22% (STIM3) et -16% (STIM4).

Après un temps de repos de 2 (STIM3) ou 4 heures (STIM4), le pattern 3 a de nouveau été appliqué pendant 2 heures.

À la reprise de la stimulation (*Figure 4.22*, H0bis), on observe des contractions téaniques parfaites d'amplitudes plus faibles qu'avant le temps de repos (*Figure 4.22*,

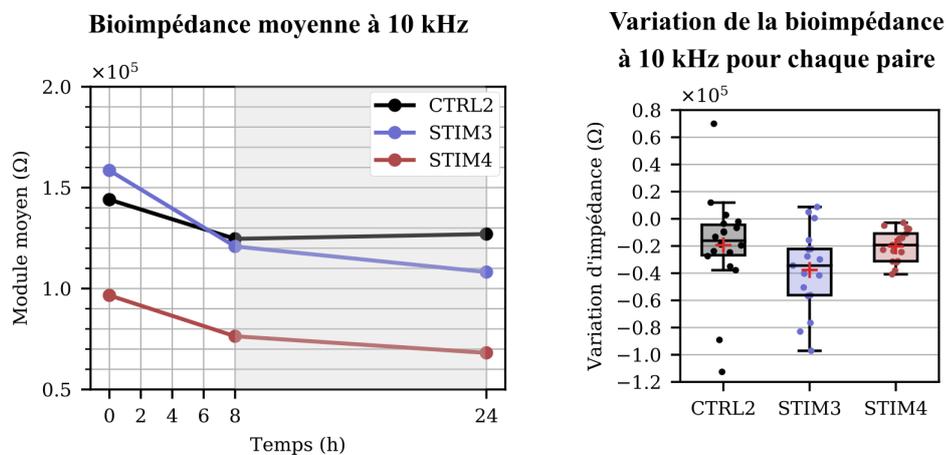


FIGURE 4.19 – Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J1 pendant laquelle le Pattern 1 a été appliqué pendant 8 heures à STIM3-4, suivi d'un temps de repos nocturne (zone grise).

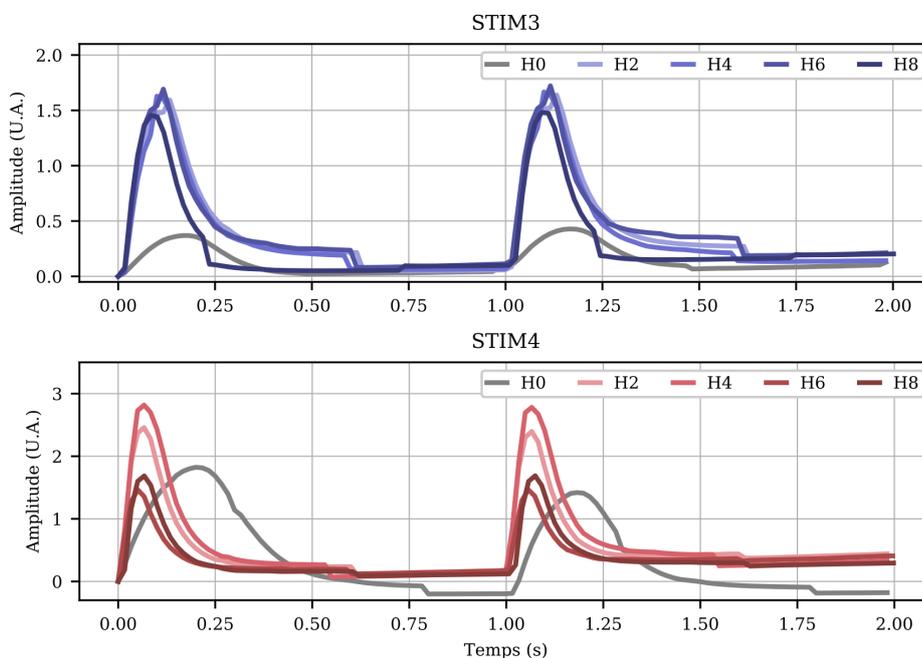


FIGURE 4.20 – Activité contractile (*c.f.* Section 4.1.2.3) des cellules musculaires C2C12 lors du J1 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz.

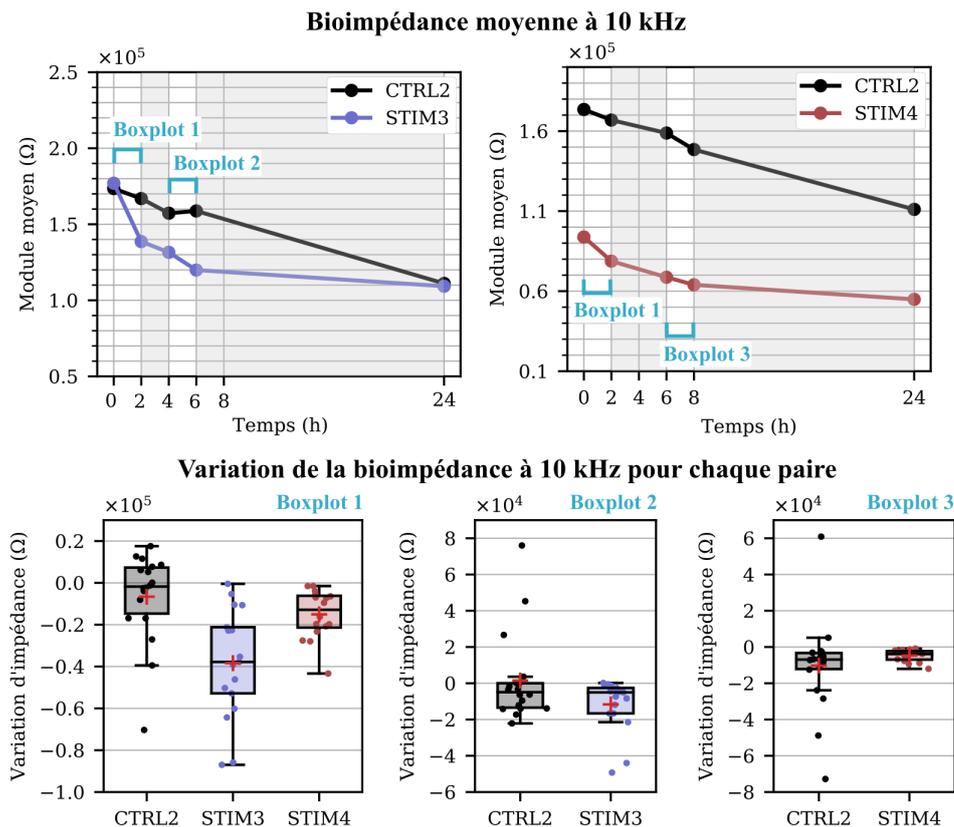


FIGURE 4.21 – Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J2 pendant laquelle le Pattern 3 a été appliqué pendant 2 heures, suivi d'un temps de repos (zones grises) de 2 (STIM3) ou 4 (STIM4) heures, puis d'une nouvelle application du Pattern 3 pendant 2 heures, et enfin un repos nocturne.

H2). De même que lors de la précédente période de stimulation, l'amplitude et la vitesse des mouvements de contraction augmentent après 2 heures, induisant des contractions téaniques imparfaites (Figure 4.22, H2bis). Nous remarquons également que cette augmentation de mouvement est moins importante chez STIM4, qui a bénéficié d'un temps de repos plus long que STIM3. Au cours de ces 2 heures, la bioimpédance de STIM3 varie de -9%, contre +1% chez CTRL1, et la bioimpédance de STIM4 diminue de -7%, contre -6% chez CTRL1 (Figure 4.21). Comme observé dans la série 1, on note une diminution plus importante de la bioimpédance de STIM3 qui n'a eu que 2 heures de pause, par rapport à celle de STIM4 qui a bénéficié de 4 heures de pause.

De plus, la Figure 4.19 montre que la diminution de l'impédance est plus faible lors des périodes de repos que lors des phases de stimulation pour STIM3 et STIM4.

À J3, après un temps de repos nocturne et un changement de milieu, les bioimpédances moyennes initiales sont comprises entre 82 k $\Omega$  et 184 k $\Omega$  (Figure 4.23) avant l'application du pattern 3 pendant 4 (STIM3) ou 6 (STIM4) heures.

À la mise en route de la stimulation (Figure 4.24, H0), on note des contractions téaniques parfaites d'amplitudes plus faibles que les jours précédents. Comme lors des précédentes périodes de stimulation, les amplitudes et vitesses de contraction augmentent au cours du temps, menant à des contractions téaniques imparfaites (Figure 4.24, H2, H4). On note une baisse de l'activité contractile de STIM4 après 6 heures de stimulation (Figure 4.24, H6).

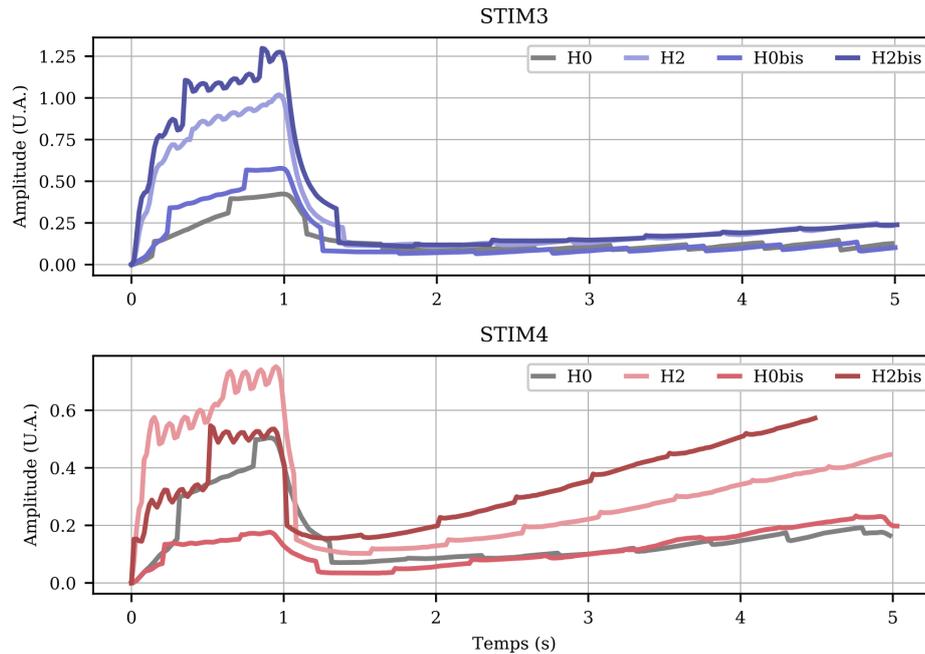


FIGURE 4.22 – Activité contractile (*c.f.* Section 4.1.2.3) des cellules musculaires C2C12 lors du J2 : à la mise en route de la stimulation à 10 Hz (H0), après 2 heures (H2), puis pendant la seconde période de stimulation à 10 Hz après un temps de repos (H0bis) et 2 heures après (H2bis).

Au cours des 4 heures de stimulation, la bioimpédance de STIM3 a varié de -24%, contre -18% chez le MEA contrôle (CTRL2), tandis que la bioimpédance de STIM4 montre une diminution plus faible de -21% (contre -25% chez CTRL2) après 6 heures de stimulation (*Figure 4.23*).

## Synthèse

Le *Tableau 4.2* rassemble les variations relatives de bioimpédance à 10 kHz obtenues lors de cette campagne d'expérimentation. Pour comparer les effets des durées et patterns de stimulation, les variations relatives par heure sont également renseignées. **En résumé**, cette série d'expérimentations a confirmé les observations faites lors de la série 1 et a permis de montrer que :

- augmenter la quantité de charge injectée et la fréquence de stimulation engendre des variations d'impédance plus importantes ;
- l'augmentation de la bioimpédance chaque matin est due au changement de milieu et n'est donc pas imputable à la période de repos nocturne.

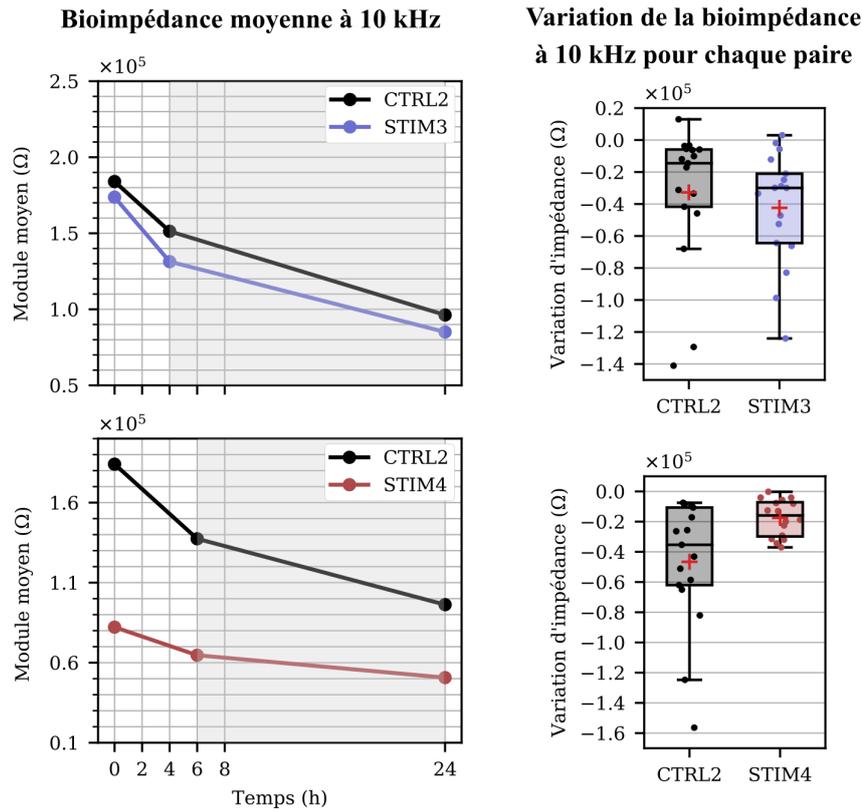


FIGURE 4.23 – Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J3 pendant laquelle le Pattern 3 a été appliqué pendant 4 (STIM3) ou 6 (STIM4) heures, suivi d'un temps de repos nocturne (zones grises).

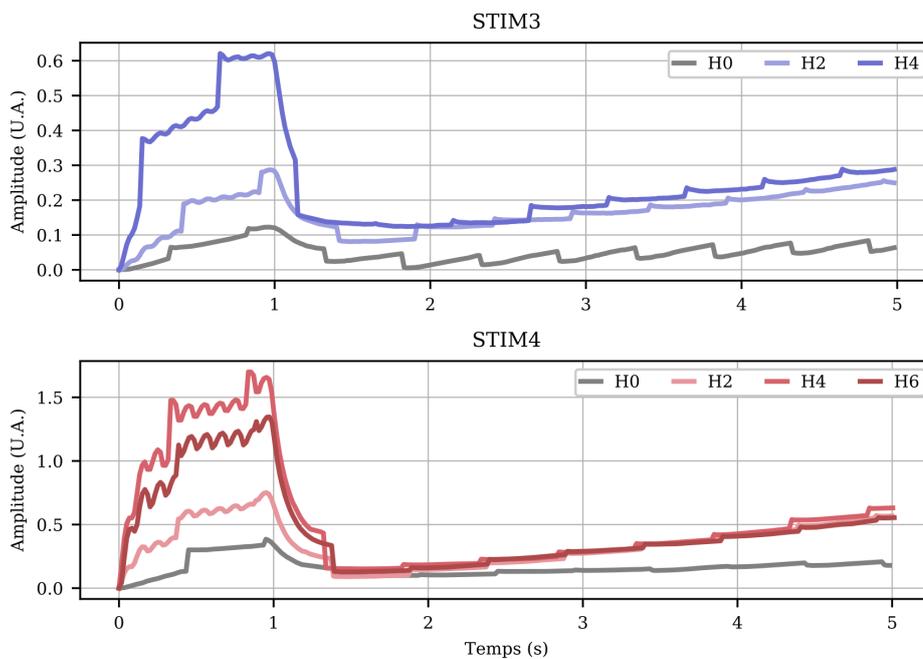


FIGURE 4.24 – Activité contractile (*c.f. Section 4.1.2.3*) des cellules musculaires C2C12 lors du J3 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4) et 6 (H6) heures de stimulation à 10 Hz.

TABLEAU 4.2 – Variations relatives de la bioimpédance moyenne à 10 kHz et activité contractile obtenus au cours de la série 2.

MEASUREMENT	JOUR 1				JOUR 2				JOUR 3							
	CTRL2	STIM3	STIM4	STIM4	CTRL2	STIM3	STIM4	STIM4	CTRL2	STIM3	STIM4	CTRL2	STIM3	STIM4		
Pattern	-	1			-	3			-	3		-	3	3		
Fréquence (Hz)	-	1			-	10			-	10		-	10	10		
Durée (h)	8				2				4				6			
Temps de repos avant stimulation (h)	-				>12h				4				>12h			
Variations de bioimpédance	-13,5	-23,8	-21,0		-3,8	-21,7	-16,1		1,0	-8,9	-6,9	-17,8	-24,4	-25,3	-21,4	
	-1,7	-3,0	-2,6		-1,9	-10,8	-8,0		0,5	-4,4	-3,4	-4,4	-6,1	-4,2	-3,6	
Activité contractile	s+	+++++	+++++	+++++	∅	+++	++	++	∅	++	+	∅	+	∅	+	

### 4.3.3 Série 3

La troisième série d'expérimentations a été réalisée sur 5 MEA : CTRL3 utilisé en tant que contrôle, STIM5, STIM6, STIM7 et STIM8 stimulés électriquement selon les scénarios illustrés en *Figure 4.25*.

Les objectifs de cette série sont de :

- valider les résultats des deux séries précédentes ;
- déclencher des contractions tétaniques parfaites ;
- étudier l'effet de fréquences de stimulation plus élevées sur la bioimpédance ;
- tester l'hypothèse de l'application d'une stimulation basse fréquence pour maintenir l'activité contractile entre deux jours d'expérimentation.

#### 4.3.3.1 Scénarios et patterns de stimulation électrique

De même que pour les 2 séries précédentes, durant le premier jour (J1, *Figure 4.25*), le pattern 1 (1 Hz) a été appliqué à STIM5 et STIM6 pendant 8 heures afin de tester la réponse des cellules musculaires C2C12 à la stimulation électrique et les rendre contractiles si ce n'est pas le cas. Ensuite, nous avons appliqué le pattern 4 (0.1 Hz) à STIM6 pendant une nuit tandis que STIM5 a bénéficié d'une pause nocturne. L'application du pattern 4 a pour but de vérifier si la baisse d'activité contractile observée dans les séries précédentes après les pauses nocturnes est due à l'arrêt de la stimulation et si cette activité peut être maintenue avec une stimulation continue basse fréquence [220, 186].

Le lendemain (J2, *Figure 4.25*), nous avons appliqué le pattern 5 constitué d'un train de 20 impulsions de fréquence 20 Hz, répété toutes les 5 secondes, afin d'induire des contractions tétaniques parfaites. Ce pattern n'a été appliqué que 2 heures en raison d'une très faible activité contractile et d'une contamination des puits de culture, nous poussant à utiliser d'autres MEA les jours suivants.

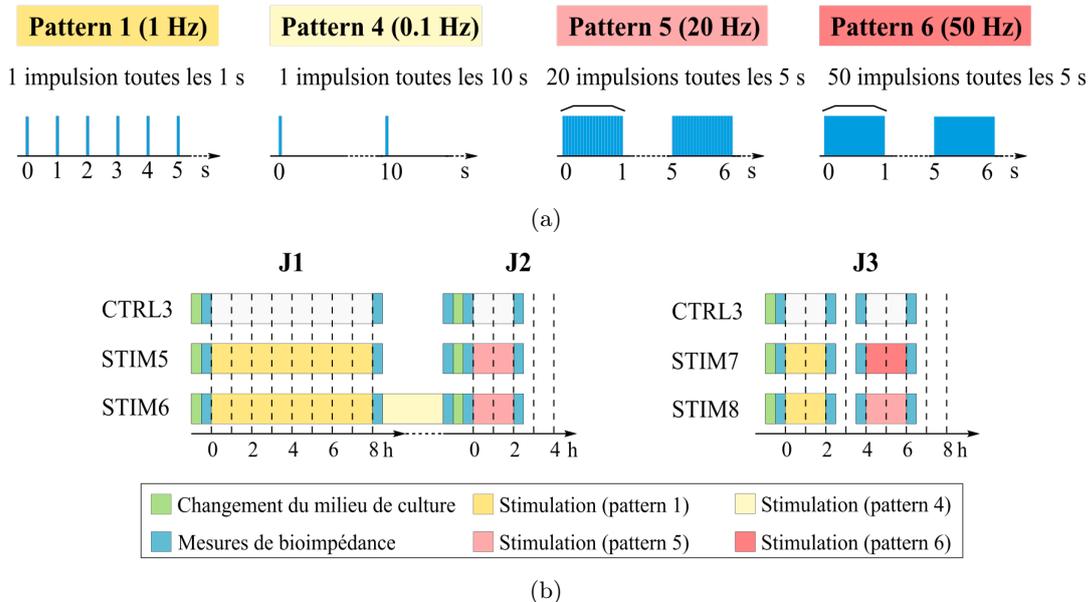


FIGURE 4.25 – (a) Patterns et (b) scénarios de stimulation utilisés lors de la série 3, et appliqués à 4 MEA (STIM5, STIM6, STIM7 et STIM8), tandis que CTRL3 sert de contrôle et ne reçoit pas de stimulation électrique.

Le dernier jour (J3, *Figure 4.25*), nous avons appliqué le pattern 1 (1 Hz) sur deux autres MEA (STIM7, STIM8) pendant 2 heures. Cette durée a été choisie à partir des observations faites lors des séries précédentes : à partir de 2 heures d'application du pattern 1, les cellules présentent une activité contractile stable. De plus, nous avons choisi de ne pas trop solliciter les cellules afin de tester ensuite leur réponse à des fréquences de stimulation plus élevées. Ainsi, après 2 heures de pause, nous avons respectivement appliqué le pattern 5 (20 Hz) et le pattern 6 (50 Hz) à STIM7 et STIM8 pendant 2 heures. Ces derniers patterns sont composés d'un train de 20 ou 50 impulsions, répété toutes les 5 secondes.

Lors de cette série, les mesures de bioimpédance ont été effectuées avant et après chaque période de stimulation ainsi qu'avant le changement de milieu qui suit le repos nocturne.

#### 4.3.3.2 Résultats

Lors du premier jour (J1), des mesures de bioimpédance ont été réalisées sur STIM5-6 avant et après l'application du pattern 1 (1 Hz, 8 heures, voir scénarios *Figure 4.18*). Les bioimpédances moyennes à 10 kHz et les variations d'impédance pour chaque paire sont présentées en *Figure 4.26*. L'activité contractile au cours de cette journée est illustrée en *Figure 4.27*.

Au début du J1, les bioimpédances moyennes initiales sont comprises entre 85 k $\Omega$  et 162 k $\Omega$  (*Figure 4.26*).

Ensuite, le pattern 1 a été appliqué pendant 8 heures. Comme attendu, le pattern 1 déclenche des contractions de type secousse, synchrones à la fréquence de stimulation (*Figure 4.27*). Les amplitudes de mouvement augmentent au cours du temps, pour atteindre un maximum à environ 2 heures de stimulation, et diminuent les heures suivantes. On observe une très faible activité contractile chez STIM5 et STIM6 après 8 heures de stimulation.

Après les 8 heures de stimulation, on observe une variation des bioimpédances moyennes de -12% (CTRL3), -52% (STIM5) et -35% (STIM6) (*Figure 4.26*). Comme observé lors des 2 séries précédentes, les bioimpédances des MEA stimulés ont davantage diminué que celle du MEA contrôle.

Durant la nuit, les bioimpédances des MEA non stimulés (CTRL3, STIM5) varient respectivement de -8% et -4% tandis que la bioimpédance de STIM6 augmente de 2% pendant l'application du pattern 4 (0,1 Hz).

À J2, après changement du milieu de culture, les bioimpédances initiales sont comprises entre 76 k $\Omega$  et 195 k $\Omega$  (*Figure 4.28*), avant l'application du pattern 5 à STIM5-6 pendant 2 heures.

À la mise en route de la stimulation, on observe des contractions téaniques parfaites au sein du MEA STIM5 et aucune activité contractile chez STIM6 (*Figure 4.29*). Après 2 heures de stimulation, l'activité contractile de STIM5 a augmenté, tandis qu'on ne distingue pas de contractions sur les analyses vidéos du MEA STIM6. La stimulation à faible fréquence (0,1 Hz) de STIM6 durant la nuit ne semble donc avoir eu aucun effet sur le maintien de l'activité contractile. Nous rappelons cependant que les analyses sont réalisées sur les images entières (tous les pixels), pouvant noyer les mouvements de contractions dans le bruit ambiant : les débris cellulaires flottants et les vibrations du montage entraînent une dérive des mesures, bien visible sur la *Figure 4.29* (panel du bas).

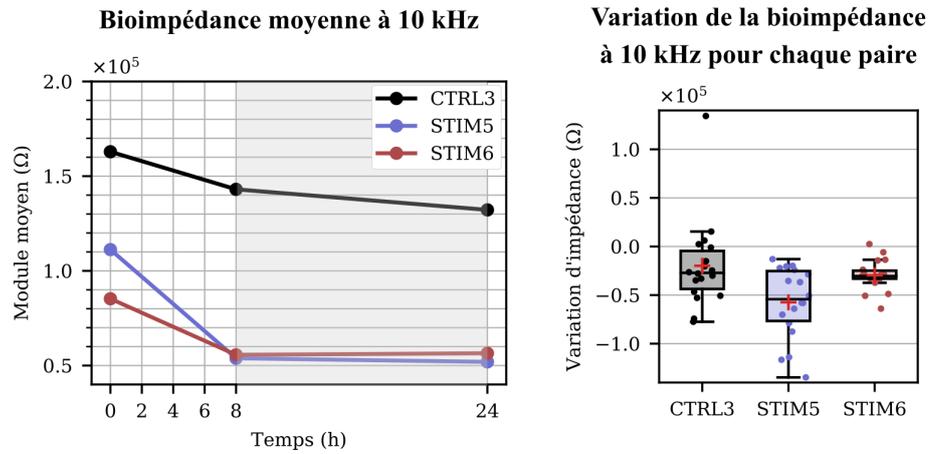


FIGURE 4.26 – Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J1 pendant laquelle le Pattern 1 a été appliqué pendant 8 heures à STIM5 et STIM6, suivi d'un temps de repos nocturne (zones grises).

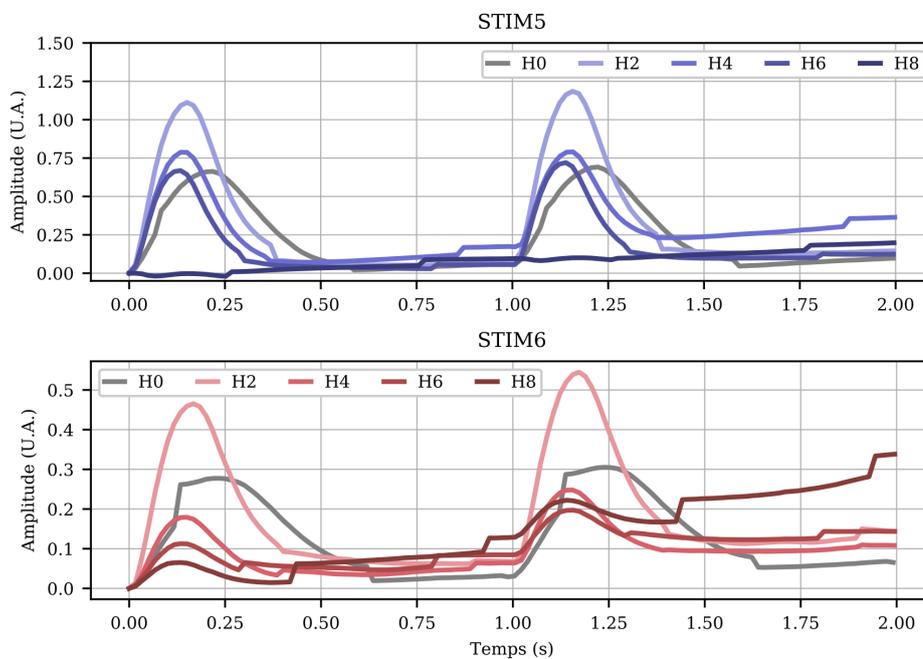


FIGURE 4.27 – Activité contractile (*c.f.* Section 4.1.2.3) des cellules musculaires C2C12 lors du J1 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz.

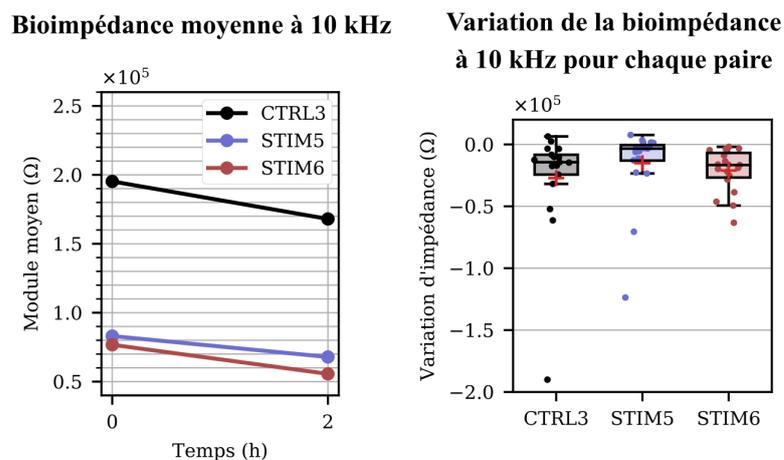


FIGURE 4.28 – Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J2 pendant laquelle le Pattern 5 a été appliqué pendant 2 heures à STIM5 et STIM6.

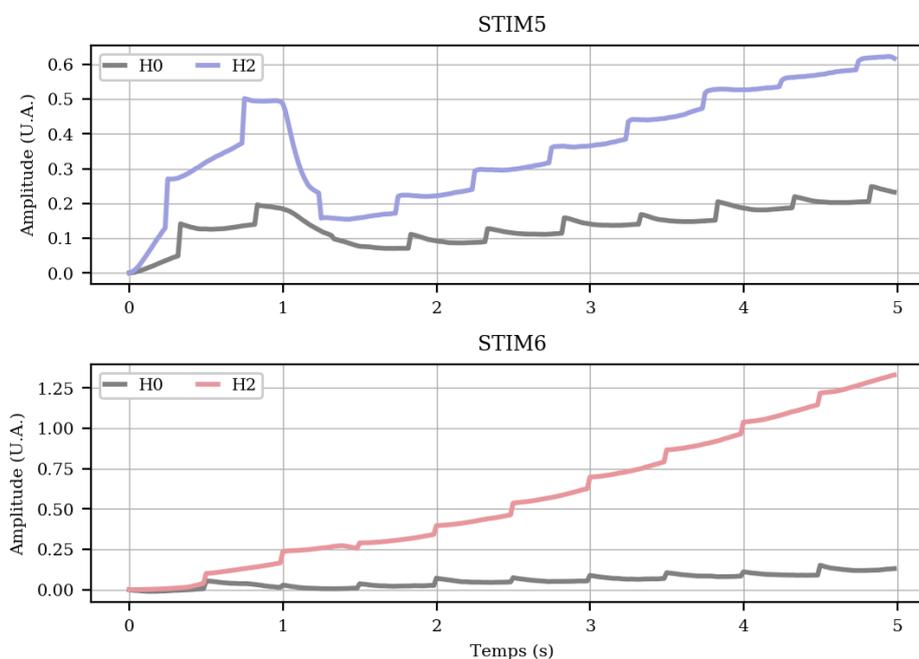


FIGURE 4.29 – Activité contractile (*c.f. Section 4.1.2.3*) des cellules musculaires C2C12 lors du J2 : à la mise en route de la stimulation (H0) et après 2 heures (H2) de stimulation à 20 Hz.

Malgré la faible activité contractile, on constate une variation des bioimpédances moyennes de -14% (CTRL3), -18% (STIM5) et -28% (STIM6) après les 2 heures de stimulation.

Finalement, la faible activité contractile nous a amené à utiliser deux autres MEA pour la suite des expérimentations.

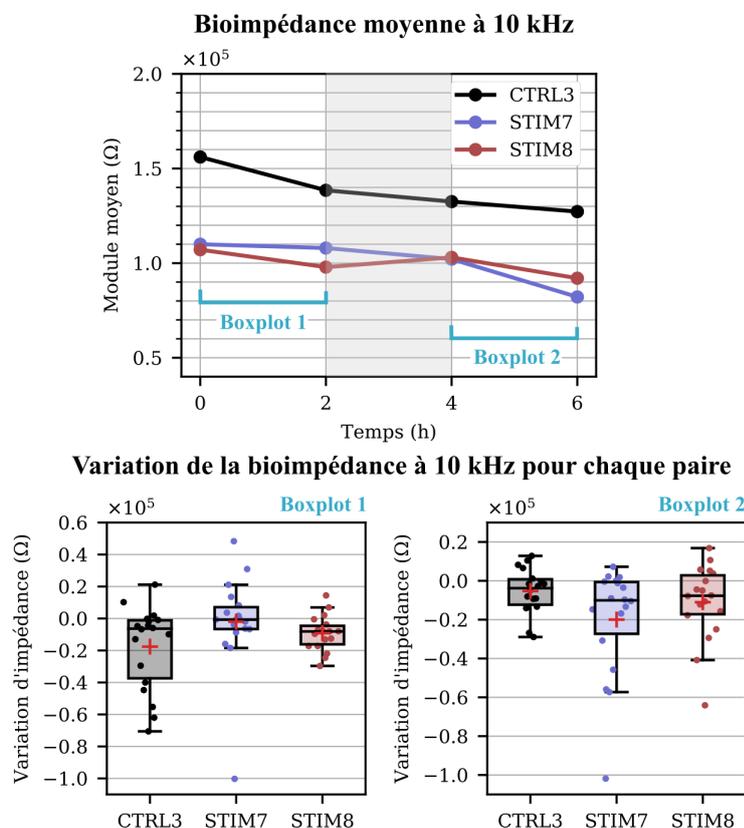


FIGURE 4.30 – Évolution de la bioimpédance moyenne à 10 kHz (moyenne calculée sur l'ensemble des paires) et boxplot représentant les variations absolues de la bioimpédance pour chaque paire d'électrodes pendant la journée J3 pendant laquelle le Pattern 1 a été appliqué pendant 2 heures à STIM7 et STIM8, suivi d'une pause de 2 heures (zone grise) avant d'appliquer le Pattern 5 à STIM8 et le Pattern 6 à STIM8.

A **J3**, les bioimpédances initiales de STIM7-8 et CTRL3 sont comprises entre 107 k $\Omega$  et 156 k $\Omega$  (Figure 4.30).

Le pattern 1 a été appliqué pendant 2 heures, déclenchant des secousses musculaires synchrones à la stimulation, dont les amplitudes et les vitesses augmentent après 2 heures de stimulation (Figure 4.31). À l'issue des 2 heures de stimulation, on observe une variation de l'impédance moyenne de -11% (CTRL3), -2% (STIM7) et -9% (STIM8) (Figure 4.30).

Durant les 2 heures de pause, les bioimpédances ont varié de -4% (CTRL3), -5% (STIM7) et +5% (STIM8). Enfin, nous avons appliqué le pattern 5 (20 Hz) à STIM8 et le pattern 6 (50 Hz) à STIM7 pendant 2 heures.

À la reprise de la stimulation (Figure 4.31, H0bis), on observe des contractions téaniques parfaites d'amplitude plus faible ou semblable à celle avant le temps de repos (Figure 4.31, H2). De même que lors de la précédente période de stimulation, l'amplitude et la vitesse des mouvements de contraction augmentent après 2 heures de stimulation (Figure 4.31, H2bis).

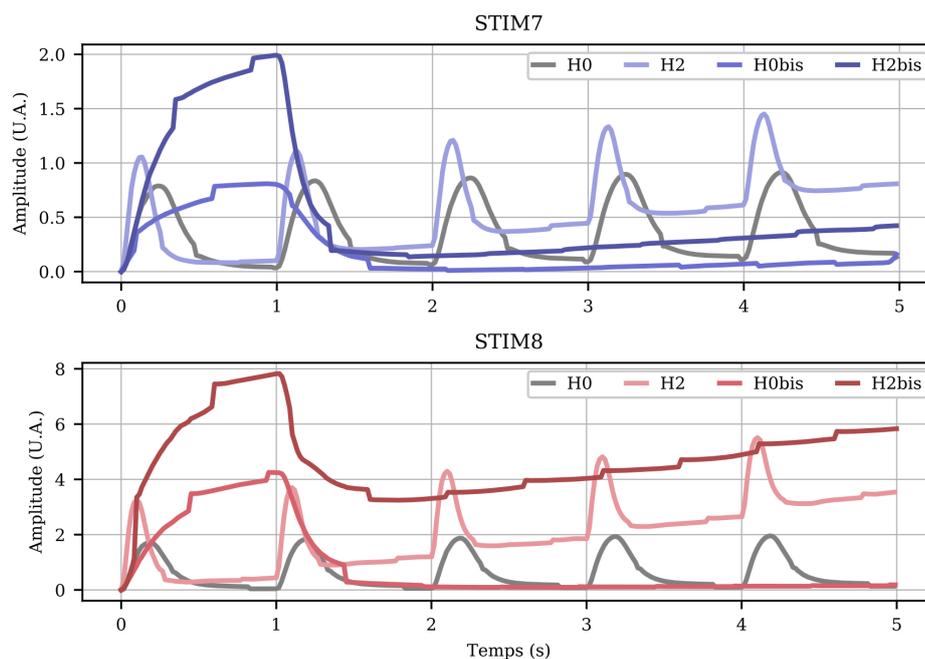


FIGURE 4.31 – Activité contractile (*c.f.* Section 4.1.2.3) des cellules musculaires C2C12 lors du J3 : à la mise en route de la stimulation à 1 Hz (H0), après 2 heures (H2), puis pendant la seconde période de stimulation à 20 Hz (STIM8) ou 50 Hz (STIM7) après 2 heures de repos (H0bis) et 2 heures après (H2bis).

Durant cette période de stimulation, les bioimpédances ont varié de -4% (CTRL3), -20% (STIM7) et -11% (STIM8).

### Synthèse

Le *Tableau 4.3* rassemble les variations relatives de bioimpédance à 10 kHz obtenues lors de cette campagne d'expérimentation. Pour comparer les effets des durées et patterns de stimulation, les variations relatives par heure sont également renseignées. **En résumé**, cette série d'expérimentations a confirmé les observations faites lors des deux séries précédentes et a également permis :

- de montrer que stimuler en continu à basse fréquence ne permet pas de maintenir l'activité contractile des cellules C2C12 sur MEA ;
- d'explorer une gamme de fréquences de stimulation plus grande, induisant des contractions tétaoniques parfaites.

TABLEAU 4.3 – Variations relatives de la bioimpédance moyenne à 10 kHz et activité contractile obtenues au cours de la série 3.

JOUR :	JOUR 1						JOUR 2						JOUR 3					
	CTRL3	STIM5	STIM6	CTRL3	STIM5	STIM6	CTRL3	STIM5	STIM6	CTRL3	STIM5	STIM6	CTRL3	STIM7	STIM8	CTRL3	STIM7	STIM8
Paramètres de stimulation	-	1		-	4		-	5		-	1		-	6		-	5	
	-	1		-	0,1		-	20		-	1		-	50		-	20	
Durée (h)	8						14						2					
Temps de repos avant stimulation (h)	-						-						>12h					
Variations de bioimpédance	-12,2	-51,6	-34,7	-7,6	-3,5	1,5	-14,0	-18,3	27,5	-11,3	-1,8	-8,6	-4,0	-19,6	-10,7			
	-1,5	-6,4	-4,3	-0,5	-0,3	0,1	-7,0	-9,1	-13,8	-5,6	-0,9	-4,3	-2,0	-9,8	-5,3			
Activité contractile	s+	++	++	∅	∅	+	∅	+	+	s+	+++	+++	s+	+++	+++	s+	+++	+++

#### 4.3.4 Synthèse des effets des paramètres de stimulation

À partir des *Tableaux 4.1, 4.2 et 4.3*, nous avons synthétisé dans le *Tableau 4.4* les variations relatives par heure obtenues pour chaque pattern de stimulation.

Pour étudier l'effet de la fréquence de stimulation, nous pouvons comparer les résultats obtenus lors des applications du pattern 1 et du pattern 2. Ces derniers possèdent le même nombre d'impulsions, i.e. la même quantité de charge, sur une période de 10 secondes (10 impulsions). Les applications du pattern 1 ont engendré des variations d'impédance comprise entre -6,4% et -0,9% par heure contre -9,5% à -1,5% pour le pattern 2. La **fréquence de stimulation** semble donc avoir un impact sur la bioimpédance.

En comparant les effets des patterns 2 et 3, nous pouvons analyser l'effet de la quantité de charge injectée : ils comprennent respectivement un train de 5 et 10 impulsions, répété toutes les 5 secondes. Pour le pattern 2 nous avons obtenu des variations relative par heure comprises entre -9,5% et -1,5% contre -10,8% et -3,4% pour le pattern 3. La quantité de charge semble donc avoir moins d'impact que la fréquence de stimulation sur la bioimpédance.

Enfin, il est possible d'analyser les effets conjoints de la fréquence de stimulation et de la quantité de charge en comparant les effets des patterns 1, 3, 4, 5 et 6. Nous constatons globalement que **plus la fréquence et la quantité de charge augmentent, plus les variations d'impédance sont importantes** (*Tableau 4.4*).

TABLEAU 4.4 – Synthèse des variations relatives minimales et maximales de bioimpédance obtenues lors des 3 séries d'expérimentations, suite à l'application des 6 patterns de stimulation.

Pattern		Pattern 4	Pattern 1	Pattern 2	Pattern 3	Pattern 5	Pattern 6
Fréquence (Hz)		0,1	1	10	10	20	50
Nombre d'impulsions sur 10 s		1	10	10	20	40	100
Variations relatives de bioimpédance (%/h)	Min	0,1	-6,4	-9,5	-10,8	-13,8	-9,8
	Max	0,1	-0,9	-1,5	-3,4	-5,3	-9,8

## 4.4 Discussion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les expérimentations réalisées avec le banc de test décrit dans le *Chapitre 3*. En raison des difficultés de mise au point des cultures et de la durée des protocoles (*c.f. Chapitre 3*), seules 3 campagnes d'expérimentations ont pu être effectuées. Nous avons malgré tout réussi à cultiver et différencier des cellules musculaires C2C12 sur des MEA, alors que la culture de cellules musculaires sur MEA est rare et se fait généralement avec des cellules primaires [202, 191, 213, 214] : très peu d'études impliquent la culture des C2C12 sur MEA, et elles n'ont pas recours à la stimulation électrique [200, 201]. Cette lignée cellulaire est majoritairement cultivée sur dans des puits en plastique, avec des électrodes C-dish (*c.f. Chapitre 3*) pour les stimuler [186, 182, 196, 221]. A notre connaissance, notre banc de test est le premier à combiner un système de stimulation électrique avec des macroélectrodes de carbone et un système de mesure de bioimpédance avec des microélectrodes. Seul [191] a utilisé les microélectrodes d'un MEA pour stimuler de manière sélective des myotubes primaires, tandis que notre système permet de stimuler l'ensemble de la culture.

Nous avons démontré que **nous pouvons induire des contractions synchrones à la fréquence de stimulation**. Comme attendu, les faibles fréquences de stimulation (0,1 et 1 Hz) déclenchent des contractions du type secousse [197]. D’après nos premiers essais de stimulation électrique (*c.f. Chapitre 2*), nous nous attendions à observer des contractions téaniques parfaites pour des fréquences supérieures ou égales à 10 Hz. Ce phénomène a été observé au début de chaque période de stimulation “haute fréquence” ( $\geq 10$  Hz). Cependant, nous avons constaté que la vitesse des contractions augmente au cours du temps (pendant une période de stimulation donnée), produisant finalement des contractions téaniques imparfaites pour une fréquence de stimulation de 10Hz. **Les contractions téaniques parfaites apparaissent pour des fréquences supérieures, en l’occurrence 20 et 50 Hz.**

Pendant chaque période de stimulation, nous avons constaté une augmentation de l’activité contractile, en termes d’amplitude et de vitesse de contraction, en accord avec la littérature [196]. L’étude [196] mentionne également une baisse de l’activité musculaire après seulement 2 heures de stimulation à 1 Hz, contrairement à nos résultats qui ne révèlent pas de net signe de fatigue musculaire. Mais cela peut provenir de l’imprécision de leur méthode d’analyse consistant à calculer les variations d’intensité entre 5 images prises à intervalle régulier de 700 ms (pour une fréquence de stimulation à 1 Hz).

Bien que les contractions électriquement induites aient été présentes pendant 3 ou 4 jours d’expérimentations, nous avons observé une **baisse de l’activité au fil des jours**. En effet, pour chaque série les cellules présentaient une forte activité contractile le premier jour, qui diminuait les jours suivants après chaque période de repos nocturne. Ce phénomène serait dû à l’arrêt de la stimulation électrique sur une longue période, qui semble induire une réponse atrophique des cellules et une dégradation de la structure des sarcomères<sup>5</sup> [207]. Une étude rapporte qu’il est nécessaire de stimuler en continu les C2C12 pour maintenir leur activité contractile [186]. Nous avons donc appliqué une période de stimulation nocturne à 0,1 Hz et n’avons pas observé d’améliorations ni de maintien d’une activité contractile suffisante pour continuer les expérimentations avec les MEA considérés (STIM5-6, série 3).

Nous supposons alors que la baisse d’activité aurait une origine “traumatique” : la rigidité des MEA est supérieure à celle des puits en plastique, entraînant davantage de contraintes mécaniques sur les cellules. Une étude a en effet démontré que la force d’adhésion des cellules musculaires sur leur support augmente avec la rigidité du substrat [222], nous amenant à penser que les contraintes mécaniques dues aux contractions entraînent des lésions et des déchirures des fibres musculaires [221]. Ce phénomène a été observé quelques fois lors des expérimentations (*Figure 4.32*), même au sein des MEA contrôle non stimulés. Après environ 10 jours (comprenant la phase de culture et la phase d’expérimentations), les cellules commencent à se détacher du support de culture. Bien que ce phénomène soit légèrement aggravé avec la stimulation électrique, il fut aussi observé au sein des MEA contrôles. L’utilisation d’un support de culture moins rigide permettrait de réduire les contraintes mécaniques, le risque de décollement des cellules et favoriserait aussi la formation des sarcomères [222]. Il existe par exemple des MEA flexibles dont le substrat est fait de PDMS (société BMSEED<sup>6</sup>).

En comparant l’impédance des MEA avec et sans cellules, nous avons montré que **la présence des cellules musculaires C2C12 impacte le spectre d’impédance** principalement entre 1 kHz et 1 MHz, avec un pic aux alentours de 10 kHz (*c.f. Section 4.2*). Les mesures de bioimpédance sont cependant très variables d’une culture

5. Un sarcomère est l’unité fonctionnelle contractile de la myofibrille d’un muscle strié squelettique.

6. <https://www.bmseed.com/electrodes>

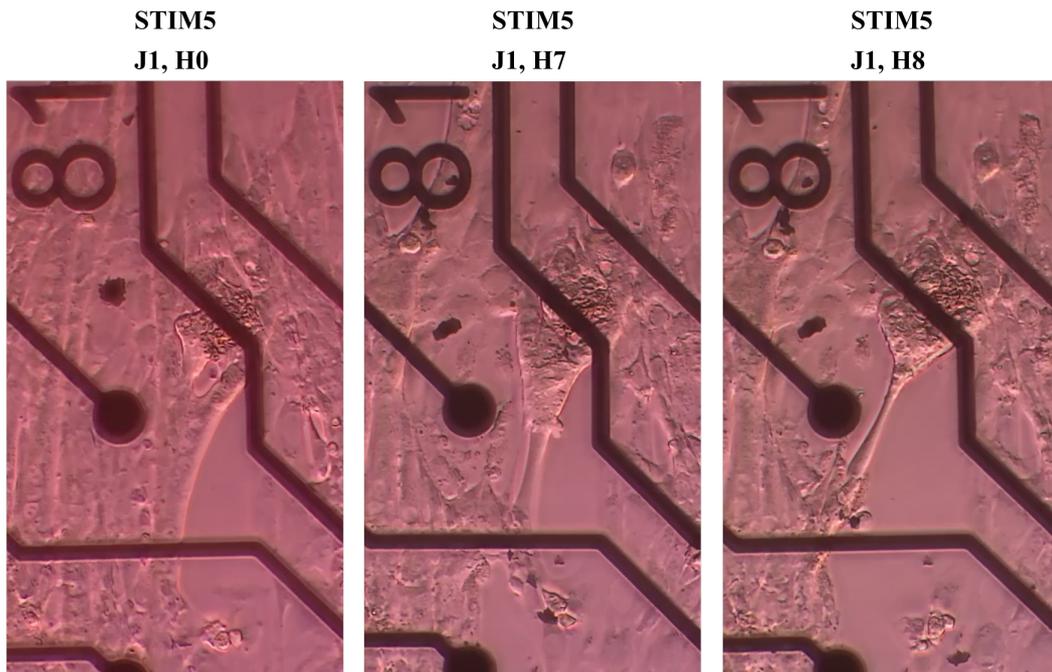


FIGURE 4.32 – Photographies de cellules musculaires C2C12 avant stimulation (gauche, H0), après 7 (milieu, H7) et 8 heures (droite, H8) de stimulation à 1 Hz.

à l'autre, probablement du fait des différences morphologiques et d'orientation des cellules. Ce dernier point pourrait être résolu en contrôlant l'orientation des cellules par l'intermédiaire de tranchées en PDMS [223] ou bien en appliquant un coating selon un motif spécifique [200, 224]. De plus, orienter les cellules parallèlement aux électrodes de stimulation pourrait accroître le recrutement des fibres musculaires [197].

A travers les trois campagnes d'expérimentations, nous avons évalué l'impact de six patterns de stimulation sur la bioimpédance des C2C12. Nous avons systématiquement constaté une baisse de l'impédance des cellules non stimulées (contrôles) au cours de chaque journée, traduisant vraisemblablement le comportement métabolique et physiologique "normal". Dans la plupart des cas, **les bioimpédances des cellules stimulées ont davantage diminué que celles des contrôles**, en accord avec la littérature (*Chapitre 2*). Nous avons également noté que **les baisses d'impédance sont plus importantes avec l'augmentation de la quantité de charge injectée et/ou de la fréquence de stimulation, ou encore de la durée de stimulation**.

### Améliorations du banc de mesure

Bien que l'on ait constaté un impact de la stimulation électrique sur la bioimpédance des cellules stimulées, il est important de noter que notre banc de mesure comprend plusieurs limitations. D'une part, la non-automatisation des mesures d'impédance les rend longues et fastidieuses ( $\sim 10-15$  min par MEA). D'autre part, bien que les mesures soient réalisées sur une plaque chauffante à  $37^{\circ}\text{C}$ , le MEA se trouve en dehors de l'incubateur et est donc sujet à des variations de températures pouvant perturber l'exactitude des mesures. L'amélioration du système de contacts et la réalisation d'un système de multiplexage des électrodes du MEA permettrait de résoudre ces deux limitations. Il est également envisageable d'utiliser un système de mesure de bioimpédance plus rapide, reposant sur une méthode de mesure dans le domaine temporel (*c.f. Section 2.2.5*) [199, 102]. Enfin, lors des périodes de stimulation, nous

avons également noté une dégradation des macroélectrodes de stimulation, se traduisant par la présence de petits morceaux de graphite au fond des puits des MEA, pouvant représenter une nouvelle source d'erreur des mesures d'impédance.

### Améliorations des analyses

Nous nous sommes concentrés sur la bioimpédance mesurée à 10 kHz, mais il serait intéressant d'exploiter l'ensemble du spectre, ou encore la phase. L'utilisation des modèles mathématiques présentés dans la *Section 2.2.4.1* pourrait permettre d'établir un lien entre l'évolution des paramètres des modèles et les différents scénarios de stimulation et d'en déduire une métrique de la fatigue musculaire [225, 226]. Par ailleurs, la configuration et le matériau des électrodes des MEA amènent des effets parasites (effets d'interface en basse fréquence et effet capacitif en haute fréquence, *c.f. Section 3.3.4.2*), limitant les mesures de bioimpédance. En particulier, les effets capacitifs induits par les pistes de connexion masquent la bioimpédance intracellulaire qui pourrait fournir davantage d'informations sur l'état physiologiques des myotubes. Pour remédier à cela, une solution consiste à fabriquer des MEA custom comprenant des électrodes plus larges pour minimiser les effets d'interface, dont les pistes de connexion sont les plus espacées possibles pour limiter les effets parasites haute fréquence [205]. Les effets d'interface peuvent également être supprimé en réalisant des mesures 4 points (*c.f. Section 2.2.5*).

### Mesures complémentaires

Afin d'identifier l'origine des variations de bioimpédance, des analyses supplémentaires sont nécessaires. La question est notamment de déterminer si ces variations sont bien dues à l'activité contractile et la fatigue musculaire. Pour évaluer l'activité contractile, nous avons réalisé des enregistrements vidéos réguliers pendant les périodes de stimulation et nous les avons analysés. L'extraction d'une métrique pour quantifier l'activité musculaire s'est avéré difficile en raison de nombreux éléments parasites : changement de luminosité, vibrations du montage, débris cellulaires flottants en surface [216].

Par ailleurs, les analyses ont été réalisées sur les images entières (tous les pixels), les mouvements de contraction étant alors noyés parmi les pixels dont l'intensité ne change pas, générant ainsi des mesures de faibles amplitudes. Des analyses plus localisées permettraient de remédier à cela. Il serait intéressant d'étudier les mouvements de contraction se produisant autour des paires d'électrodes utilisées pour les mesures de bioimpédance, et examiner pour chaque paire le lien entre l'activité contractile et les mesures de bioimpédance. Cette option a été envisagée, mais n'a pas pu aboutir, car elle requiert analyses très chronophages en raison du grand nombre de vidéos enregistrées et de paires mesurées.

De plus, la compression vidéo génère une perte d'informations et des artefacts de compression [216, 215]. Le nombre d'images par secondes (60) limite également l'analyse des contractions à des fréquences de stimulation inférieures à 30 Hz. L'idéal est alors d'avoir recours à une caméra enregistrant des vidéos non compressées, avec un plus grand nombre d'images par secondes ( $> 100$  images par secondes selon [216]). Pour toutes ces raisons, l'analyse vidéo présentées dans ce chapitre s'est limité à un examen grossier et imprécis de l'activité contractile.

Pour déterminer l'origine des variations d'impédance et évaluer l'activité musculaire, d'autres alternatives sont envisageables. D'une part, le métabolisme des cellules musculaires peut être examiné par l'intermédiaire de dosages de substrat métaboliques

(glucose, glycogène) ou de métabolites (lactate) avec des kits de dosage. Ce procédé ne permet pas des mesures métaboliques en temps réel et nécessite de réaliser des prélèvements du milieu de culture, qu'il faut congeler pour des analyses ultérieures. Ces plaques ne sont utilisables qu'une fois et peuvent alors représenter un certain coût (plusieurs centaines d'euros par kit de dosage, sans compter les instruments spécifiques de colorimétrie/fluorimétrie). Une autre possibilité consiste à utiliser des capteurs enzymatiques fournissant un monitoring temps réel des concentrations de substances telles que le glucose ou le lactate, impliquant la mise en œuvre d'un système de microfluidique.

Enfin, puisque la fatigue entraîne des altérations électriques au sein des myotubes, une dernière alternative consisterait à mesurer leur activité électrique. Pour cela, il suffirait d'utiliser les microélectrodes des MEA et la plateforme Multimed (*c.f. Section 3.4.3*). Cette méthode a été testée lors de la troisième série d'expérimentations (*Section 4.3.3*). Par manque de temps, les mesures n'ont pas été analysées, cependant nous pouvons déjà établir plusieurs constats et propositions d'améliorations. Malgré l'absence de circuit de blanking et le bruit électronique important (*c.f. Section 3.4.3*), nous avons pu constater sur l'un de nos enregistrements, la présence de signaux électrophysiologiques prenant l'allure d'ondes M (*c.f. Section 2.1.4*) d'amplitude variable. La *Figure 4.33(a)* illustre deux enregistrements d'activités électriques sur les électrodes 12 et 13. L'analyse des images vidéos dans cette même région montre une activité contractile plus importante autour de l'électrode 12 (*Figure 4.33(b)*), ce qui semble alors indiquer un lien entre l'amplitude des signaux électrophysiologiques et l'activité contractile. L'enregistrement des activités électriques sur MEA requiert de travailler l'électronique d'acquisition pour assurer un bon rapport signal-sur-bruit et éliminer les artefacts de stimulation, mais nos essais sont encourageants et permettent d'envisager une approche totalement électrique du suivi de l'activité contractile et de son lien avec la fatigue mesurée par bioimpédance.

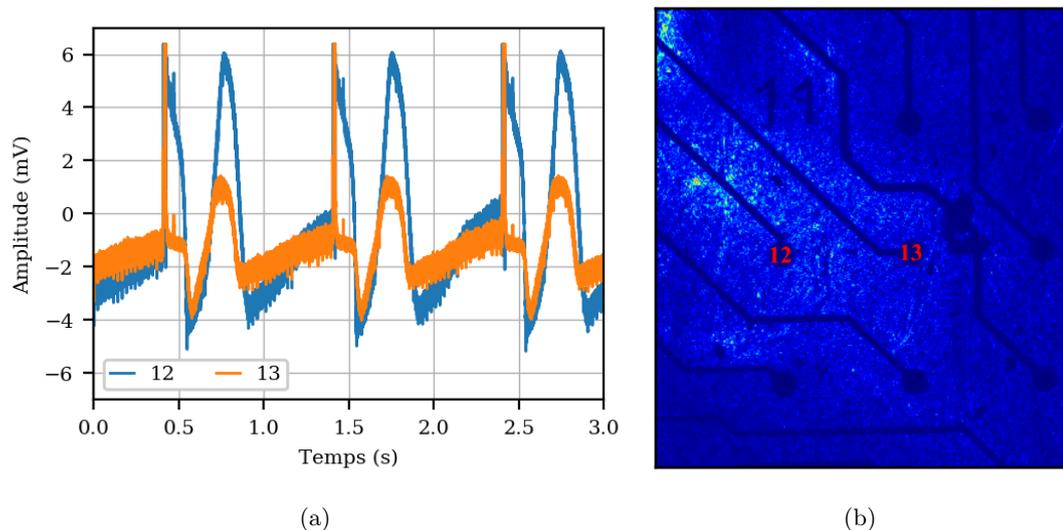


FIGURE 4.33 – (a) Activité électrique mesurée sur les électrodes 12 et 13 lors de l'application du pattern 1 (1 Hz) à STIM5, et (b) activité contractile autour des électrodes 12 et 13 (image représentant la somme des différences entre 2 images successives pendant 5 secondes). Les couleurs claires indiquent les zones présentant le plus de mouvements (contractions).

Finalement, des améliorations du banc de test et des analyses sont à effectuer avant

de pouvoir corrélérer les variations de bioimpédance avec les changements métaboliques, morphologiques et électriques liés à l'activité musculaire et la fatigue. Nous avons constaté qu'il apparaît difficile d'évaluer l'activité contractile et la fatigue de cellules musculaires *in vitro* sur un substrat planaire (2D). Ces méthodes de culture sont éloignées des conditions *in vivo*, dans lesquelles les cellules musculaires sont alignées et forment un organe 3D. La rigidité du substrat limite le processus de différenciation des myoblastes en myotubes et les contractions, entraînant la déchirure de quelques fibres musculaires. Ainsi, les recherches actuelles se tournent de plus en plus vers l'utilisation de culture de cellules musculaires en 3D, se rapprochant davantage des conditions physiologiques *in vivo*. Ce procédé permet également d'implémenter des méthodes de mesure de la force de contraction, et ainsi une évaluation plus précise de l'activité musculaire et de la fatigue. Pour toutes ces raisons, nous avons choisi d'explorer cette alternative dans le *Chapitre 5*.



## Chapitre 5

# Vers l'évaluation mécanique de la fatigue musculaire dans un modèle *in vitro* 3D

L'étude des phénomènes biologiques et le développement de thérapies débutent généralement avec des expérimentations réalisées sur des cultures cellulaires *in vitro* sur support planaire (2D). Les cultures cellulaires *in vitro* 2D présentent l'avantage d'être simples à mettre en œuvre, permettant de réaliser rapidement un grand nombre d'expériences et de contrôler l'environnement dans lequel les cellules sont cultivées [178]. Bien que ces modèles aient permis d'élucider de nombreux mécanismes biologiques, les découvertes réalisées sont difficilement transférables aux organismes *in vivo*.

Notamment, lorsqu'on considère les cultures 2D *in vitro* de cellules musculaires, il est clair que **les supports de culture planaires ne reproduisent pas fidèlement l'environnement structurel et mécanique des muscles *in vivo***. Lors des campagnes d'expérimentations précédentes (*c.f. Chapitre 4*), nous avons effectivement constaté plusieurs limites à l'utilisation d'un support de culture planaire (MEA). En particulier, la rigidité du substrat des MEA :

- entrave le processus de différenciation des myoblastes en myotubes [222] ;
- entraîne des contraintes mécaniques importantes sur les myotubes lors des contractions, limitant les amplitudes de contractions et conduisant parfois au décollement [178] et au déchirement des fibres, rendant qui plus est difficile l'évaluation de l'activité contractile par analyse vidéo ;
- limite la durée des cultures (10-12 jours maximum), ce qui est sans doute aussi lié aux points précédents.

Une étude a notamment démontré que les cellules musculaires sont sensibles à leur environnement et que l'utilisation de supports de culture moins rigides peut améliorer la formation et la structure des myotubes [222]. Bien qu'il existe des MEA plus flexibles (développés par BMSEED<sup>1</sup> par exemple) pouvant répondre à ces problématiques, les conditions de culture sur support planaire restent éloignées des conditions *in vivo*.

Notre objectif étant d'établir une signature de la fatigue musculaire, nous avons fait le choix de chercher à établir une preuve de concept avec un modèle biologique *in vitro* de cellules musculaires. S'approcher au mieux des caractéristiques de l'environnement *in vivo* reste cependant essentiel, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux solutions *in vitro* qui pallient moins certains inconvénients des MEAs.

Les limitations expérimentales des cultures *in vitro* 2D ont mené au développement de l'**ingénierie tissulaire *in vitro***, avec comme objectif de recréer des miniorganes (aussi appelés organoïdes) dont la **structure tridimensionnelle** et la physiologie se

1. <https://www.bmseed.com/electrodes>

rapprochent davantage des conditions *in vivo*. Dans le cas de tissus musculaires, des miniorganes *in vitro* 3D faciliteraient de plus l'évaluation de l'activité contractile et de la fatigue, en donnant accès à une mesure plus directe de la force de contraction [178]. Dans ce cadre, comme vu dans la *Section 3.4.1*, qui décrit les différentes mesures mécaniques permettant d'estimer la fatigue, les **piliers flexibles** nous semblent particulièrement intéressants dans notre contexte : cette technique consiste à construire un tissu musculaire 3D autour de 2 piliers et mesurer le déplacement relatif des sommets des piliers pour déterminer la force de contraction exercée. Nous nous sommes donc tournés vers cette solution, nous offrant à la fois une structuration tissulaire 3D de myotubes (de type organoïdes), et une possibilité de quantification de force des contractions par la mesure du déplacement de piliers.

A travers ce chapitre, nous explicitons le principe de fonctionnement de cette méthode de mesure et exposons un état de l'art des géométries et des différentes méthodes de fabrication des piliers flexibles. Nous décrivons ensuite la réalisation d'un premier dispositif, basé sur l'état de l'art, nous permettant de prendre en main et mettre au point les procédés de fabrication des piliers et les protocoles de culture *in vitro* 3D. A partir des résultats obtenus avec ce premier dispositif, nous proposons alors plusieurs améliorations aboutissant à la conception d'un nouveau dispositif. Avec ce dernier, il a été possible de réaliser des expérimentations de stimulation électrique et de mesure des forces de contraction, dont les résultats préliminaires sont exposés à la fin du chapitre.

## 5.1 Principe de fonctionnement et état de l'art

### Principe de fonctionnement

Quand des cellules contractiles appliquent une force sur une structure déformable, cela entraîne un déplacement visible au point où la force est appliquée (*Figure 5.1*). Selon la loi de Hooke, le déplacement  $\delta$  ( $\mu\text{m}$ ) est proportionnel à la force appliquée  $F$  ( $\mu\text{N}$ ) :

$$F = k\delta \quad (5.1)$$

avec  $k$  ( $\mu\text{N}/\mu\text{m}$ ) la constante de raideur de la structure déformable [211]. Dans le cas d'un pilier, la constante de raideur  $k$  dépend de la géométrie du pilier, du point d'application de la force et du module d'élasticité  $E$  (MPa) du matériau constituant le pilier (*Figure 5.1*) :

$$\begin{aligned} k &= \frac{3\pi E d^4}{64L^3} && (\text{pilier cylindrique}) \\ k &= \frac{6Ewt^3}{24L^3} && (\text{pilier parallélépipédique}) \end{aligned} \quad (5.2)$$

avec  $d$  le diamètre du pilier cylindrique,  $w$  et  $t$  la largeur et l'épaisseur du pilier parallélépipédique, et  $L$  la hauteur à laquelle est appliquée la force de contraction (*Figure 5.1*) [211, 227]. Les piliers sont réalisés en polydiméthylsiloxane (PDMS), un matériau biocompatible et élastique. Son élasticité est modulable selon le rapport des volumes base/agent réticulant, généralement compris entre 1 et 3 MPa [208]. Pour un ratio base/agent réticulant de 10 :1, la littérature rapporte un module élastique de 1,7 MPa [209, 228].

Dans le dispositif, des fibres musculaires sont "accrochées" autour de deux piliers flexibles. Une contraction des fibres entraîne le déplacement du sommet des piliers. La

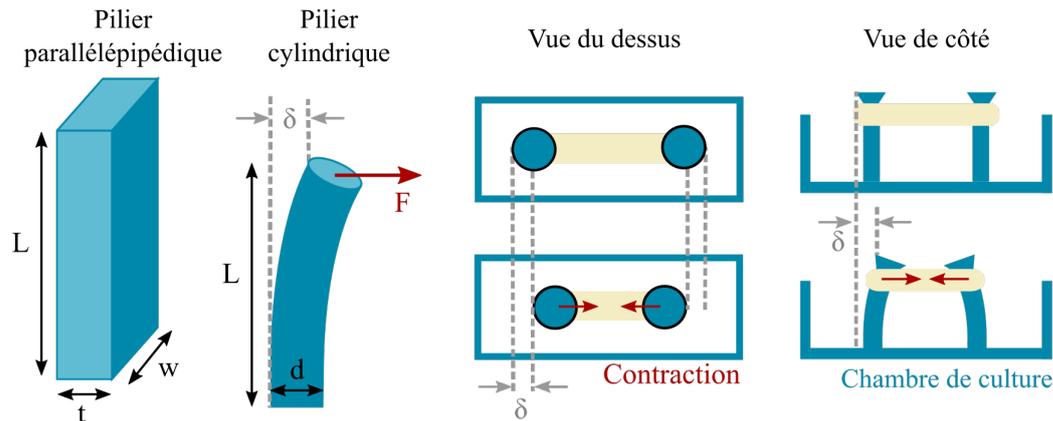


FIGURE 5.1 – Principe de la mesure de force à l'aide de piliers cylindriques ou parallélépipédiques. Les fibres musculaires (en jaune) s'entourent autour de 2 piliers (en bleu). Lors d'une contraction des fibres, la force  $F$  appliquée à une certaine hauteur ( $L$ ) entraîne un déplacement du sommet du pilier d'une distance  $\delta$ . La force est calculée à partir de la mesure du déplacement et de la constante de raideur du pilier (c.f. équations 5.2).

mesure de ce déplacement peut être réalisée optiquement, en analysant des enregistrements vidéos obtenus par l'intermédiaire d'un microscope équipé d'une caméra. Ces vidéos sont ensuite analysées par des logiciels tels que Tracker<sup>2</sup>, qui comprend un outil de repérage automatique d'une zone définie par l'utilisateur permettant de fournir le déplacement et la vitesse de déplacement de la zone considérée.

Ce dispositif de mesure de force requiert un protocole de culture *in vitro* bien spécifique, nécessitant la présence des fibres contractiles autour des piliers. Ce protocole est repris de [228] et consiste à élaborer une mixture de milieu de culture, de cellules, de protéines, de matrice extracellulaire (par exemple, Matrigel) et d'un agent permettant la polymérisation du mélange, lui donnant un aspect de gel (hydrogel). Le mélange hydrogel-cellules est placé dans des chambres de culture en PDMS : il s'agit de micropuits entourant deux piliers flexibles en PDMS, permettant le confinement des cellules autour des piliers. Après un passage en incubateur à 37°C (environ 30-45 min), le mélange se compacte et exerce une traction sur les piliers flexibles qui engendre une remontée du tissu formé vers le sommet des piliers. Quelle que soit la forme des piliers, ils doivent tous posséder un sommet plus large que leur base, en forme de cône (piliers cylindriques) ou de parallélépipède (piliers parallélépipédiques, Figure 5.1). Cela a pour objectif de maintenir le tissu contractile en place entre les deux piliers et éviter que le tissu ne s'en décroche lors des contractions musculaires.

### État de l'art des géométries, dimensions et méthodes de fabrication

Le choix de la géométrie des piliers est conditionné par les méthodes de fabrication disponibles, pour réaliser les moules. Les moules permettant la fabrication de piliers en forme de T (ou parallélépipède) sont réalisés via des méthodes de microfabrication (photolithographie) permettant de créer des piliers de dimensions micrométriques (Tableau 5.1). De telles méthodes de fabrication présentent des coûts élevés et des temps de réalisation longs. Une alternative intéressante consiste à concevoir un moule par impression 3D (stéréolithographique (SLA) ou Fused Deposition Modeling (FDM)) pour réaliser des piliers cylindriques de dimensions millimétriques.

2. Tracker est un projet Open Source Physics, accessible sur <https://physlets.org/tracker> (visité le 06/03/2023).

Le choix des dimensions détermine la raideur des piliers et la taille du tissu musculaire 3D formé. Les piliers doivent être suffisamment souples pour permettre la contraction des fibres et leurs sommets doit se déplacer suffisamment pour permettre la mesure optique du déplacement permettant l'estimation de la force. Des piliers trop rigides engendrent des tissus plus fins et augmentent les chances de rupture du tissu pendant les contractions [229]. À l'inverse, si la rigidité est trop faible, le déplacement dû aux contractions n'est plus tout à fait proportionnel à la force appliquée, faussant alors les mesures de force [229]. Enfin, la largeur et l'espacement entre deux piliers déterminent respectivement la largeur et la longueur du tissu musculaire formé.

TABLEAU 5.1 – Exemples de géométries et caractéristiques de piliers flexibles en PDMS issus de la littérature.

Forme	Dimensions	Raideur (N/m)	Méthode de fabrication	Source
Parallélépipède	(w) 128,9 × (t) 90 × (L) 192,7 $\mu\text{m}$	4	Moule négatif silicium	[209]
	(w) 100 - 200 × (t) 90 × (L) 250 $\mu\text{m}$	0,2 - 0,45	Moule positif silicium, moule négatif PDMS	[229]
Cylindre	(d) 0.5 × (L) 2 mm	$\sim$ 1-1,5	Moule positif par impression 3D (SLA), moule négatif EcoFlex	[230]
	(d) 0,5 × (L) 4 mm	0,24	Moule Teflon	[228]

### Choix de la géométrie et de la méthode de fabrication

Dans le contexte de cette thèse, il a été jugé que les **procédés de fabrication ayant recours à l'impression 3D** était préférables à ceux dépendant de photolithographie. En effet, nous engageons dans une étude à fort niveau d'incertitude qui nécessitera des conceptions et tests itératifs avec des coûts et des temps de réalisation courts, non compatibles avec les contraintes de salle blanche. De plus, le LIRMM possède plusieurs imprimantes 3D professionnelles SLA (Form 3B et 3BL, FormLabs) qui permettaient d'effectuer rapidement et à faible coût les différentes expérimentations avec des niveaux de précision satisfaisants. Nous avons donc choisi de suivre le protocole de fabrication de [230] et de concevoir des **piliers cylindriques de dimensions millimétriques**. Deux dispositifs ont été réalisés durant cette thèse. Le premier est basé sur l'état de l'art, permettant la prise en main des protocoles de fabrication et de culture *in vitro* 3D. À partir des résultats obtenus, nous avons ensuite pu apporter des améliorations et concevoir notre propre dispositif.

## 5.2 Dispositif basé sur l'état de l'art : mise au point du protocole de fabrication et essais de culture *in vitro* 3D

Afin de prendre en main les procédés de fabrication des piliers, nous avons reproduit les géométries et méthodes de fabrication décrites dans [230]. Pour les essais de culture *in vitro* 3D, nous nous sommes appuyés sur le protocole décrit par [228].

### 5.2.1 Conception et fabrication

Le premier dispositif s'inspire de celui présenté dans [230] : il se compose de chambres de culture en PDMS, comprenant des fentes sur chaque côté et contenant deux piliers cylindriques avec des cônes à leur sommet, espacés de 3,5 mm. Les dimensions des chambres, l'espacement entre deux piliers et leur hauteur ont été repris de [230]. Afin de tester l'impact des diamètres de piliers, et par conséquent des rigidités, sur la formation du tissu et l'amplitude de déplacement due aux contractions, nous avons choisi de créer des piliers de six diamètres différents. Ils sont compris entre 350 et 600  $\mu\text{m}$ , correspondant à des rigidités comprises entre 0,24 à 2,08  $N/m$ , comme rapporté dans la littérature. Les dimensions des chambres de culture et des piliers sont résumées dans le *Tableau 5.2*.

TABLEAU 5.2 – Caractéristiques des chambres de culture et des piliers du premier dispositif.

Chambre de culture	Dimensions externes (mm)	(L) 7 x (l) 3 x (h) 2.75					
	Dimensions internes (mm)	(L) 6 x (l) 2 x (h) 2.75					
Piliers	Hauteur (mm)	2.5					
	Espacement (mm)	3,5					
	Diamètre ( $\mu\text{m}$ )	350	425	475	500	550	600
	Raideur théorique ( $\mu\text{N}/\mu\text{m}$ )	0.24	0.52	0.82	1	1.47	2.08
Cônes	Hauteur ( $\mu\text{m}$ )	250					
	Diamètre haut ( $\mu\text{m}$ )	700	850	950	1000	1100	1200

Le protocole de fabrication des piliers est issu de [230], avec quelques adaptations selon les équipements disponibles au sein des laboratoires IMS et LIRMM. Il consiste à :

- concevoir un **moule maître** positif en résine, par impression 3D ;
- fabriquer un **moule intermédiaire** négatif en EcoFlex, un matériau flexible semblable au PDMS, à partir du moule maître ;
- fabriquer la **structure finale** en PDMS à partir du moule en EcoFlex.

Du fait de la présence des cônes aux sommets des piliers, il n'est pas possible de concevoir un moule maître négatif en impression 3D, puisque la rigidité de la résine ne permet pas de démouler la structure en PDMS sans risquer d'arracher les cônes. C'est pourquoi un moule intermédiaire négatif, constitué d'un matériau souple (EcoFlex), est généré à partir du moule maître positif. Le caractère élastique de l'EcoFlex permet alors de démouler plus aisément la structure finale en PDMS.

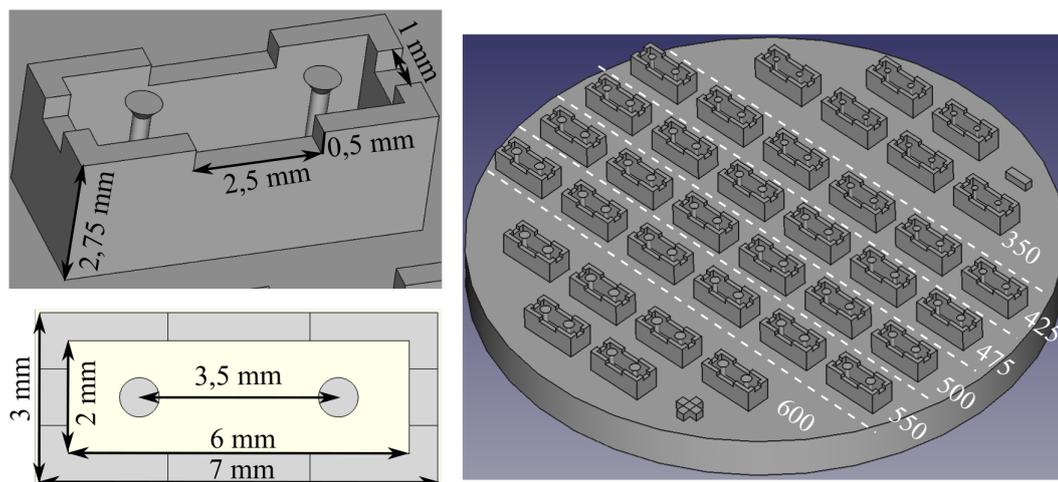


FIGURE 5.2 – Dessin CAO du moule du premier dispositif comprenant 36 chambres de culture (6 de chaque design du *Tableau 5.2*). Les signes "+" et "-", sérigraphiés sur le moule, indiquent respectivement l'emplacement des chambres de culture contenant les piliers de plus grand et de plus petit diamètre, indiqués en blanc).

### Fabrication du moule maître

La première étape a consisté à **dessiner sur un logiciel de CAO 3D** (FreeCAD<sup>3</sup>) l'ensemble des chambres de culture et de générer un fichier CAO au format STL (maillage  $1\mu\text{m}$ ). Les chambres sont disposées sur une base pleine de 5 mm de hauteur et 6,5 cm de diamètre (*Figure 5.2*) afin de produire six exemplaires de chacune des dimensions choisies précédemment (*Tableau 5.2*). Le diamètre de la base a été choisi de sorte que le moule maître puisse être placé dans une boîte de pétri de 10 cm de diamètre pour la réalisation du moule intermédiaire en EcoFlex (*c.f. Section 5.2.1*). Après avoir généré le fichier STL, celui-ci est importé dans le logiciel PreForm (FormLabs), logiciel de préparation d'impression, qui est ensuite importé sur l'imprimante Form 3B (FormLabs). L'**impression** a été réalisée en résine transparente (Formlabs Clear) avec une épaisseur de couche de  $25\mu\text{m}$ . Après impression, le moule est plongé dans un bain d'isopropanol pendant 20 min puis dans un bain d'éthanol pendant 10 min, afin de retirer la résine non polymérisée. Après séchage à l'air libre, le moule est placé dans une chambre UV pendant 10 min. Le moule maître obtenu est présenté en *Figure 5.3(a)*.

### Fabrication du moule négatif

Pour empêcher toute réaction entre la résine et l'EcoFlex, le moule maître doit d'abord subir un **coating chimique**. Le moule est alors placé dans une boîte de pétri et sa surface est activée dans une chambre UV-Ozone pendant 15 min. Ensuite, il est placé dans une chambre à vide avec  $100\mu\text{L}$  de 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltriéthoxysilane (PFOTS) et laissé sous vide statique pendant une nuit (*Figure 5.3(b)*). Le lendemain, le moule maître est passé dans un four à  $70^\circ\text{C}$  pendant 1 heure, puis rincé avec de l'éthanol et de l'isopropanol, et enfin séché avec de l'air comprimé. Le passage au four est essentiel pour assurer une meilleure liaison covalente entre le PFOTS et la résine. Une fois l'étape de coating chimique réalisée, il n'est pas nécessaire de la reproduire dans le futur : le moule peut être réutilisé à plusieurs reprises.

3. FreeCAD est un logiciel libre de modélisation 3D, accessible sur <https://freecad-france.com/> (visité le 06/03/2023).

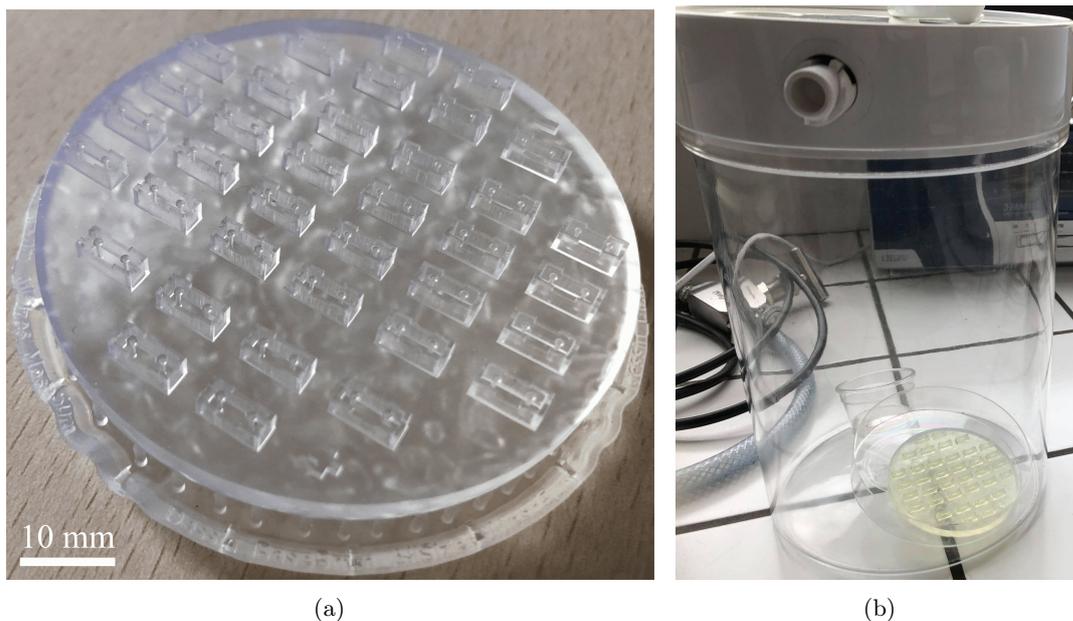


FIGURE 5.3 – Photographies (a) du moule maître imprimé en 3D comprenant 36 chambres de culture (6 de chaque design du *Tableau 5.2*), et de (b) l'étape de coating chimique du moule maître en résine.

De même que pour le PDMS, la **préparation de l'EcoFlex** (EcoFlex 00-30, Smooth on) consiste à mélanger deux liquides : la partie A et la partie B de l'EcoFlex sont mélangées avec un ratio de 50 :50 (en volume) dans un contenant. Le mélange est versé dans la boîte de pétri, directement sur le moule maître, et laissé au moins 15 min (jusqu'à disparition des bulles d'air) dans une chambre à vide pour dégazer le mélange. L'EcoFlex est ensuite laissé 8 heures à température ambiante pour permettre son durcissement (*Figure 5.4(a)*). Enfin, il est démoulé, nettoyé à l'éthanol et séché avec de l'air comprimé. Le moule intermédiaire obtenu est présenté en *Figure 5.4(b)*.

### Fabrication de la structure finale en PDMS

De même que pour le moule maître, le moule en EcoFlex doit d'abord subir un **coating chimique** pour empêcher toute réaction entre l'EcoFlex et le PDMS. L'activation de la surface du moule EcoFlex est réalisée par l'intermédiaire d'un plasma cleaner (paramètres : vacuum 0,14 mbar, gas air 0,22 mbar, générateur 55% pour une puissance maximale de 40W, durée 2 min). Puisque le moule en EcoFlex est négatif et présente des creux représentant les parois des chambres de culture et les piliers, l'UV-Ozone ne peut les atteindre et activer efficacement ces surfaces. Nous avons effectivement constaté qu'après un traitement UV-Ozone, le PDMS et l'EcoFlex avait réagi ensemble, se traduisant par l'obtention d'une structure PDMS sans pilier ni parois complètes de chambre de culture (*Figure 5.5*). Au contraire, le plasma cleaner a permis d'atteindre les creux du moule Ecoflex et d'activer efficacement la surface de l'ensemble du moule.

Après activation de la surface, le moule est placé dans une chambre à vide avec 100  $\mu$ L de PFOTS et laissé sous vide statique pendant une nuit, avant de passer 1 heure au four à 70°C. Le moule est finalement nettoyé avec de l'éthanol et de l'isopropanol, et séché avec de l'air comprimé.

La base et l'agent réticulant pour la **préparation du PDMS** (Sylgard™ 184 Silicone Elastomer Kit, Dow) sont mélangés avec un ratio 10 : 1 dans un contenant,

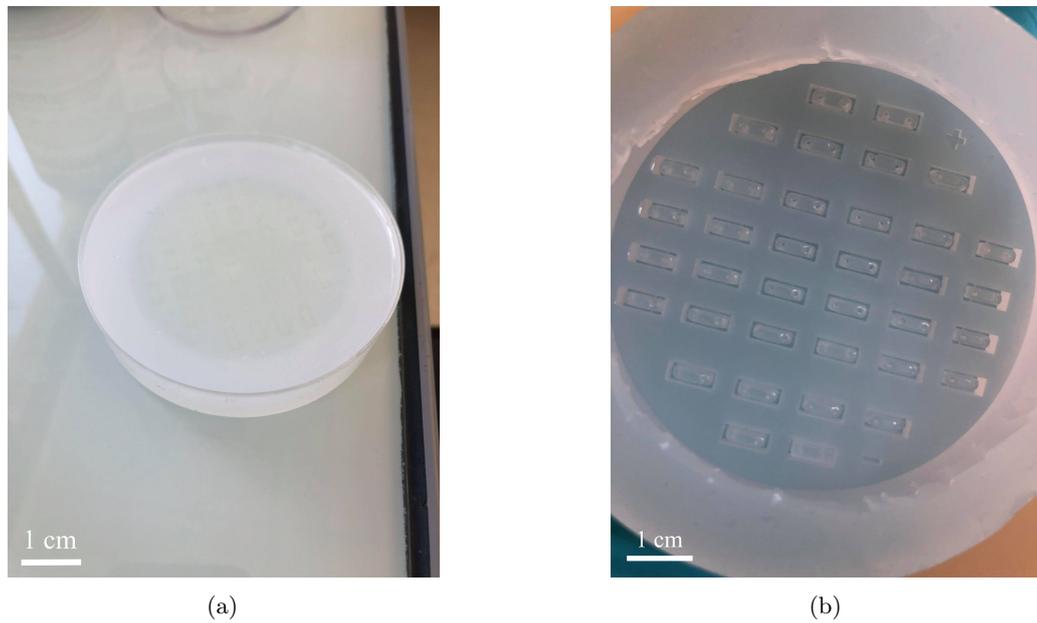


FIGURE 5.4 – Photographies de (a) de l'EcoFlex coulé sur le moule résine après dégazage, et (b) du moule en EcoFlex résultant.

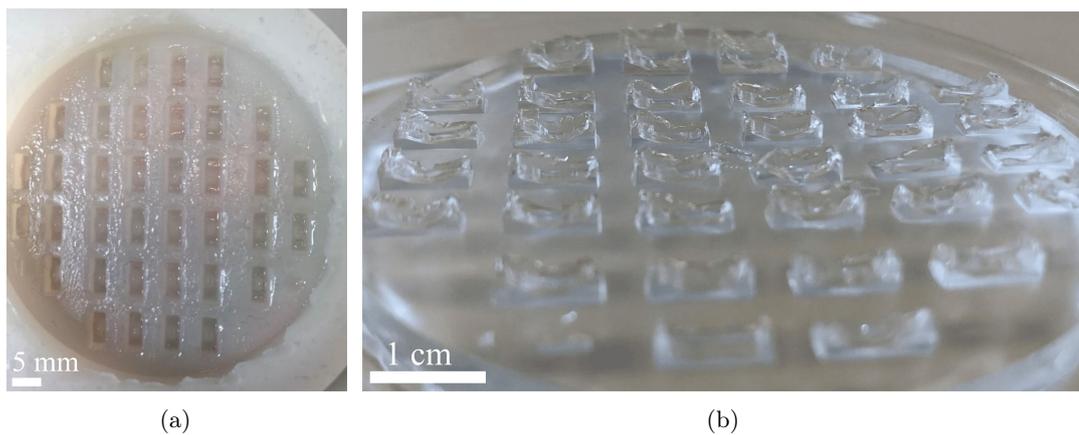


FIGURE 5.5 – Conséquences d'un mauvais coating chimique au PFOTS en raison d'une mauvaise activation de la surface du moule EcoFlex, se traduisant par une réaction du PDMS et de l'EcoFlex, (a) la détérioration du moule EcoFlex et (b) l'obtention d'une structure PDMS sans piliers ni chambres de culture.

placé dans une chambre à vide pendant au moins 15 min pour dégazer. Le mélange est versé dans le moule EcoFlex, et également placé dans une chambre à vide pendant au moins 15 min pour dégazer (*Figure 5.6(a)*). Le durcissement du PDMS est ensuite obtenu par un passage au four pendant 3 heures à 75°C. Enfin, la structure PDMS est démoulée en étirant le moule EcoFlex. La *Figure 5.6(b)* illustre la structure finale en PDMS obtenue pour le premier design.

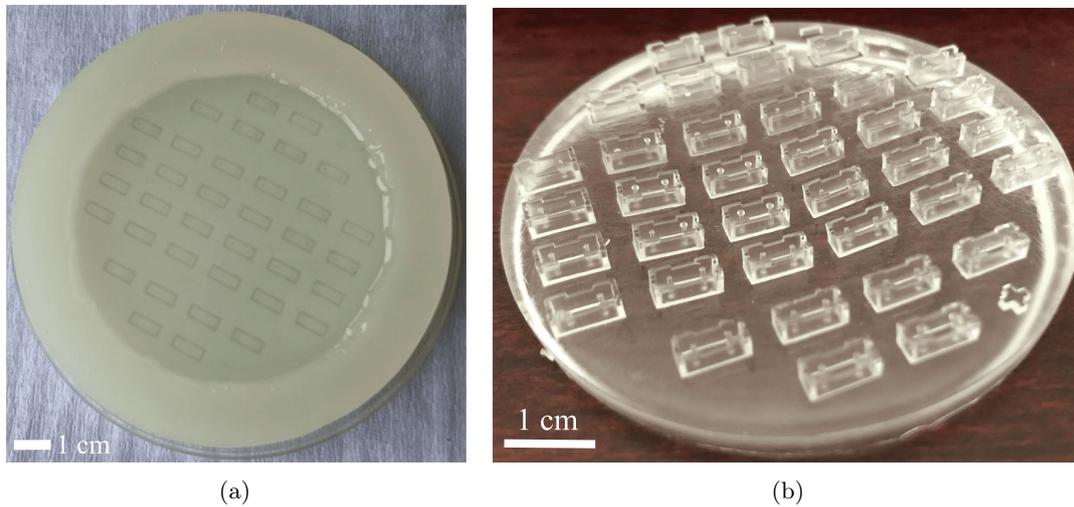


FIGURE 5.6 – Photographies (a) du PDMS coulé dans le moule EcoFlex après dégazage, et (b) de la structure finale en PDMS obtenue.

## Résultats

Les étapes de fabrication ont été réalisées deux fois pour obtenir un total de 72 chambres de culture en PDMS. Sur ces 72 chambres, seules **13 chambres de culture** comprenaient 2 piliers complets, c'est-à-dire présentant le cône à leur sommet (*Figure 5.7(a)*). Sur les 144 piliers fabriqués, 100 ne possédaient pas de cône (*Figure 5.7(b)*). On note également que l'état de surface de la structure PDMS est craquelée, en raison du mauvais réglage des paramètres du plasma cleaner. En effet, nous avons constaté que le moule EcoFlex présentait lui-même des craquelures après l'activation de sa surface au plasma cleaner.

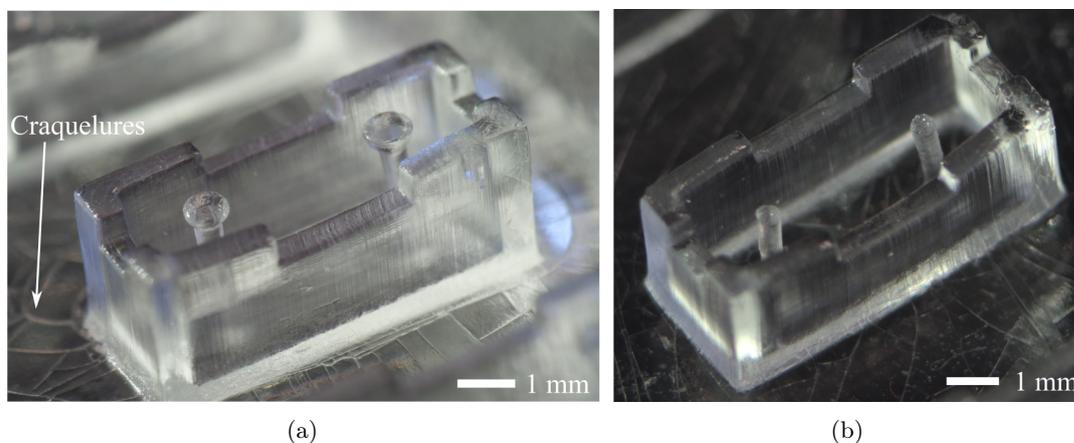


FIGURE 5.7 – (a) Zoom sur une chambre de culture avec 2 piliers complets, (b) et une chambre de culture avec des piliers partiellement arrachés

### 5.2.2 Essai de culture *in vitro* 3D

Malgré le peu de chambres de culture complètes obtenues, nous avons tout de même réalisé des premiers essais de culture *in vitro* 3D. Les objectifs de ces expérimentations étaient de :

- prendre en main un protocole de culture plus complexe que lors d'une culture sur un support planaire ;
- induire une activité contractile des muscles 3D formés par le biais de stimuli électriques.

Pour cela, nous avons suivi le protocole de culture décrit dans [228], qui utilise le même modèle biologique (lignée cellulaire C2C12).

#### 5.2.2.1 Protocoles expérimentaux

La première étape a consisté à découper puis coller avec du PDMS six chambres de culture au fond des puits d'une plaque comprenant 6 puits en plastique de 35 mm de diamètre (*Figure 5.8*). Chaque puits comprend une chambre de culture dont les diamètres des piliers sont renseignés dans le *Tableau 5.3*.

TABLEAU 5.3 – Diamètres des piliers, densités cellulaires et nombre de cellulesensemencées dans les six chambres de culture PDMS placées dans des puits en plastique.

Puits	Diamètre pilier ( $\mu\text{m}$ )	Densité cellulaire (/mL)	Nombre de cellules
W4	600	125 000	2180
W5	550		
W6	500	62 500	1090
W1	475		
W2	425	31 250	545
W3	350		

### Protocole de culture

La veille de l'ensemencement, les puits en plastique contenant les chambres de culture ont été stérilisés à l'éthanol. Pour empêcher l'adhésion des cellules musculaires au fond et aux parois des chambres de culture en PDMS, nous avons appliqué un **traitement** consistant à les remplir de **Pluronic F-127** dilué à 0,2% dans du PBS, que nous avons laissé agir 24 heures dans un incubateur.

Nos chambres de culture possèdent un volume total  $V_{tot}$  de 15  $\mu\text{L}$ . D'après [228], pour un volume  $V_{tot}$ , le protocole de culture consiste à (*Figure 5.8*) :

- élaborer un **hydrogel** ( $0,5 \times V_{tot}$ ), composé de fibrinogène, Matrigel et DMEM avec des ratio 0,2 :0,1 :0,2 en volume ;
- ajouter  $0,484 \times V_{tot}$  de **milieu de prolifération** (DMEM, 10% FBS, 1 mg/mL d'acide 6-Aminocaproïque, 1% pénicilline-streptomycine) contenant les **cellules musculaires C2C12** (densités cellulaires indiquées dans le *Tableau 5.3*, passage  $> 10$ ) ;
- ajouter  $0,016 \times V_{tot}$  de **thrombine** juste avant l'ensemencement, car il s'agit d'un agent permettant la polymérisation du mélange hydrogel-cellules.

Le milieu de prolifération est semblable à celui utilisé dans le *Chapitre 3* et le *Chapitre 4*, hormis qu'il contient également de l'acide 6-Aminocaproïque pour favoriser la cohésion du tissu 3D.

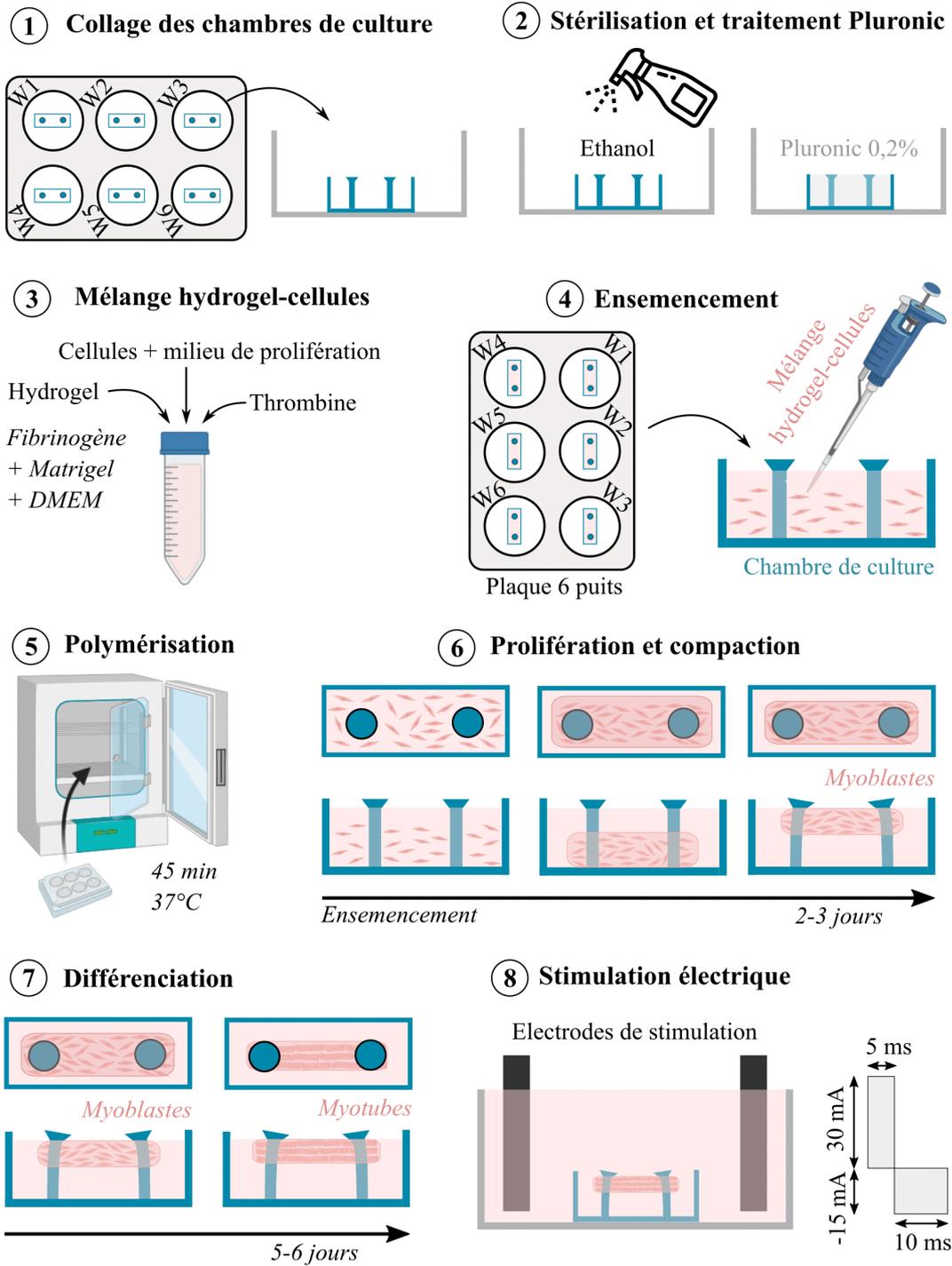


FIGURE 5.8 – Schéma du protocole de culture débutant par (1) le collage des chambres de culture au fond de puits en plastique, qui sont ensuite (2) stérilisées à l'éthanol et traitées au Pluronic F-127. Vient ensuite (3) l'élaboration d'un mélange hydrogel-cellules, (4) l'ensemencement dans les chambres de culture PDMS, (5) la polymérisation du mélange dans un incubateur, (6) une phase de prolifération des myoblastes entraînant la compaction du mélange, suivie (7) d'une phase de différenciation pour l'obtention de myotubes contractiles, et finalement (8) les expérimentations impliquant la stimulation électrique des myotubes par le biais des électrodes C-dish.

Le mélange hydrogel-cellules (myoblastes C2C12) est placé dans chaque chambre de culture PDMS (15  $\mu\text{L}$ ), et la plaque 6 puits est ensuite placée dans un incubateur à 37°C pendant au moins 45 min pour permettre la **polymérisation** du mélange hydrogel-cellules. Enfin, on ajoute 6 mL de milieu de prolifération dans chaque puits en plastique.

Les cellules (myoblastes) sont maintenues dans le milieu de **prolifération** pendant 3 jours. Durant cette phase, les myoblastes s'allongent et se répandent dans l'hydrogel polymérisé, et appliquent des forces de traction entraînant la compaction de l'hydrogel (*Figure 5.8*). Les piliers flexibles limitent la compaction de l'hydrogel et agissent comme des tendons artificiels pour ancrer le tissu à leur sommet. Les cônes au sommet des piliers garantissent le maintien du tissu entre les deux piliers.

La **différenciation** en myotubes est initiée en remplaçant le milieu de prolifération par le milieu de différenciation (DMEM, 2% HS, 1 mg/mL d'acide 6-Aminocaproïque, 1% pénicilline-streptomycine). Après six jours de différenciation, nous avons procédé à des essais de stimulation électrique (*Figure 5.8*).

### Protocole de stimulation électrique

La stimulation électrique des tissus musculaires repose sur l'utilisation des **électrodes C-dish** (adaptées aux plaques de culture 6 puits en plastique) et de notre système de stimulation présentés dans la *Section 3.2.2*.

Le protocole a consisté à appliquer un signal biphasique asymétrique d'une amplitude de 30 mA, de durée 5 ms et de fréquence 1 Hz pendant 4 jours (*Figure 5.8*). Chaque jour, les électrodes C-dish sont stérilisées à l'éthanol et par un passage sous UV pendant 15 min.

Les tissus musculaires ont été observés régulièrement chaque jour via un microscope inversé et une caméra (Canon EOS 2000D, 25 images par secondes, résolution 24,1 mégapixel).

#### 5.2.2.2 Résultats et discussion

##### Culture

La *Figure 5.9* présente l'architecture des tissus musculaires après 6 jours de différenciation. Parmi les six organoïdes, **seuls deux présentent une structure allongée, autour des deux piliers flexibles** (W1 et W3, *Figure 5.9*). Ils présentent cependant des points d'accroche sur les parois des chambres de culture en PDMS (*Figure 5.10*). Les autres tissus forment des amas désorganisés autour d'un seul pilier, ou le long d'une paroi PDMS.

De plus, nous avons observé la présence de "trous" dans les mélanges hydrogel-cellules et de bulles au fond des chambres de culture PDMS (*Figure 5.10*). Ce phénomène serait dû à la **présence de traces de Pluronic F-127**, entraînant la formation de bulles à l'interface entre le Pluronic et l'hydrogel, une mauvaise solidification de l'hydrogel et une mauvaise intégrité structurelle ou une formation incomplète du tissu [230].

Enfin, nous notons une déformation importante d'un pilier dans le puit W3, comprenant les piliers les moins raides (*Figure 5.10*). Cela nous amène alors à exclure des raideurs de l'ordre de 0.25  $\mu\text{N}/\mu\text{m}$  pour la conception de notre futur dispositif.

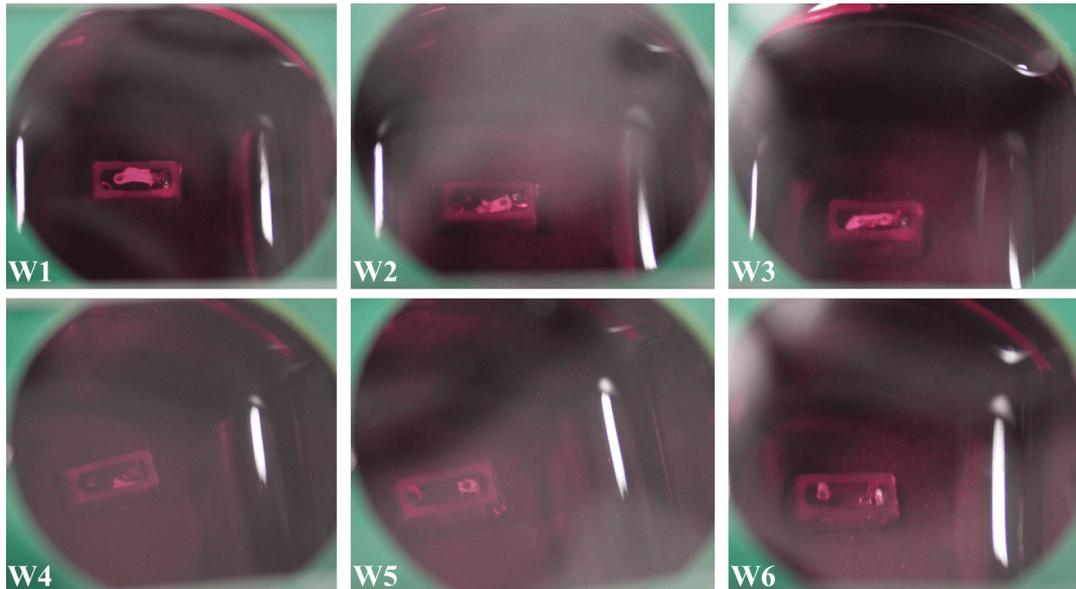


FIGURE 5.9 – Photographies des six chambres de culture PDMS (de W1 à W6) après 6 jours de différenciation. Les images sont obtenues avec appareil non professionnel pour avoir une vue d'ensemble des chambres de culture (photographies prises par le dessus).

### Stimulation électrique

Les six tissus musculaires ont été stimulés pendant quatre jours, sans interruption. Seul le tissu du puits W3 a montré une activité contractile pendant les 4 jours. Les tissus des puits W1, W5 et W2 ont présenté une très faible activité contractile à partir du deuxième, troisième et quatrième jour de stimulation. Néanmoins, les **contractions** observées dans ces quatre puits présentaient **de très faibles amplitudes**, empêchant la mesure du déplacement du sommet des piliers et par conséquent l'estimation de la force de contraction.

### Discussion

**En résumé**, nous avons observé :

- une mauvaise formation et une structure désorganisée des tissus, se traduisant par l'adhésion des cellules aux parois des chambres de culture en PDMS ;
- la présence de traces de Pluronic F-127 dans les chambres de culture PDMS, occasionnant une mauvaise intégrité des tissus musculaires 3D ;
- une très faible activité contractile en réponse à la stimulation électrique.

Les deux premiers points peuvent être corrigés en modifiant la structure des chambres de culture PDMS. En effet, celles-ci présentent des fentes sur les quatre parois, ne permettant pas de les remplir entièrement de Pluronic. Le haut des parois était donc non traité, expliquant ainsi l'adhésion des cellules à cet endroit.

Pour permettre une meilleure intégrité des tissus, il est envisageable de modifier le protocole de traitement au Pluronic, en y incluant une étape de rinçage afin d'éliminer toute trace.

Pour finir, la faible activité contractile peut s'expliquer par l'utilisation de cellules C2C12 ayant subi un grand nombre de passages (*c.f. Section 3.1*), responsables d'une diminution de leur capacité de différenciation en myotubes.

L'ensemble de ces points a donc été amélioré lors de la conception d'une nouvelle version de dispositif, présenté ci-dessous.

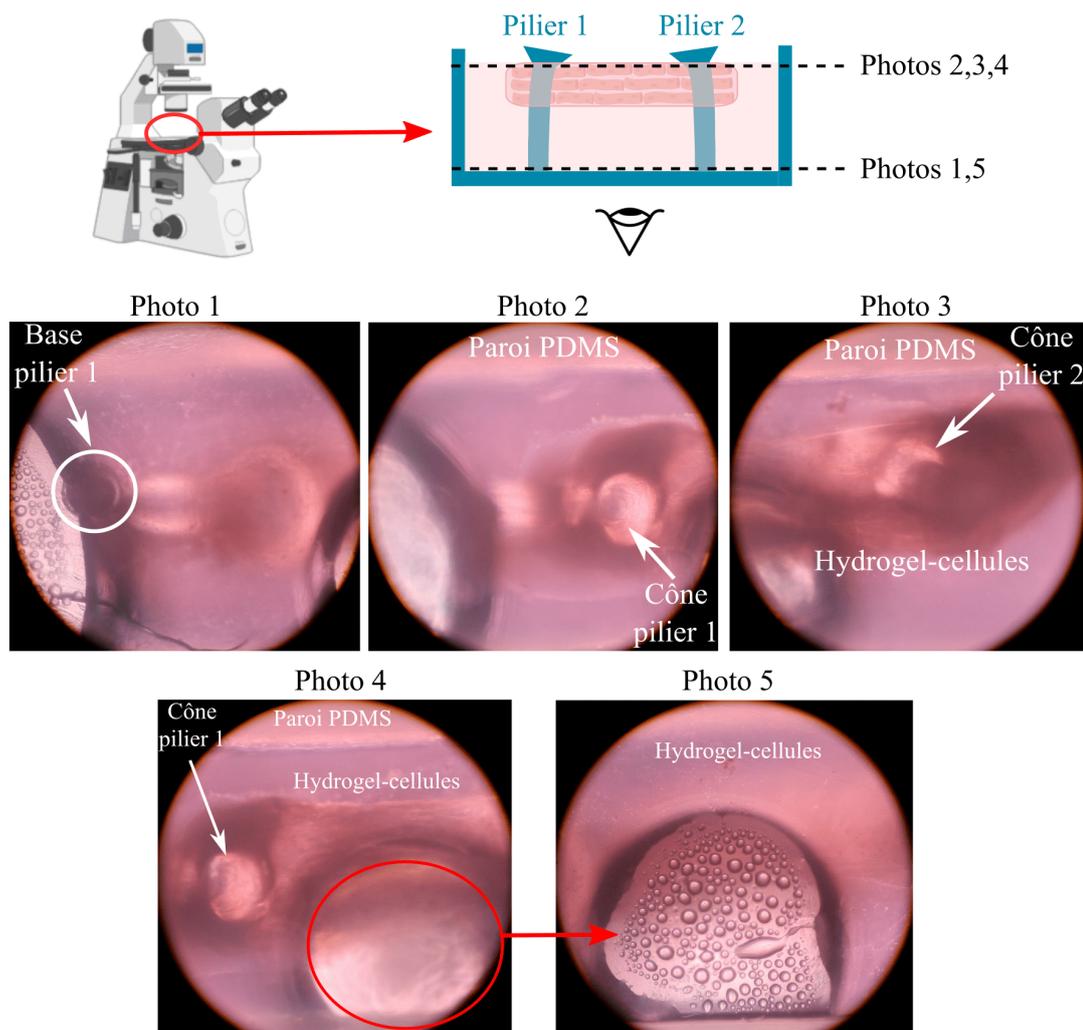


FIGURE 5.10 – Photographies du puits W3 après 6 jours de différenciation obtenues avec un microscope inversé (vues de dessous selon le schéma en haut de la figure) : (haut) vue en coupe indiquant les hauteurs du réglage focal, (centre) photographies de la base et du cône du pilier 1, et du cône du pilier 2, (bas) structure du tissu près du pilier 1 et photographie du fond de la chambre de culture PDMS.

### 5.3 Conception d'un nouveau dispositif : améliorations de la géométrie et du protocole de culture

#### 5.3.1 Modifications des dimensions des piliers et des chambres de culture

La fabrication du premier dispositif a conduit à une structure présentant de nombreux piliers incomplets, dont les sommets (cônes) étaient absents. Pour pallier cela, la géométrie des piliers a été modifiée de sorte que l'angle formé entre le cône et le pilier soit plus important (*Figure 5.11*), minimisant ainsi les risques de rupture lors du démoulage. Dans le premier dispositif, la hauteur des cônes était fixe, créant des angles cône-pilier compris entre  $129^\circ$  (pilier de diamètre  $600 \mu\text{m}$ ) et  $145^\circ$  (pilier de diamètre  $350 \mu\text{m}$ ). Nous proposons alors un nouveau dispositif, dont les hauteurs des cônes ont été calculées de telle sorte que l'angle soit d'environ  $145^\circ$  (*Figure 5.11*).

De plus, pour éviter l'adhésion des cellules aux parois des chambres de culture, ces dernières ont été élargies et la hauteur de leurs murs réduite. Les nouvelles dimensions

sont présentées en *Figure 5.11*.

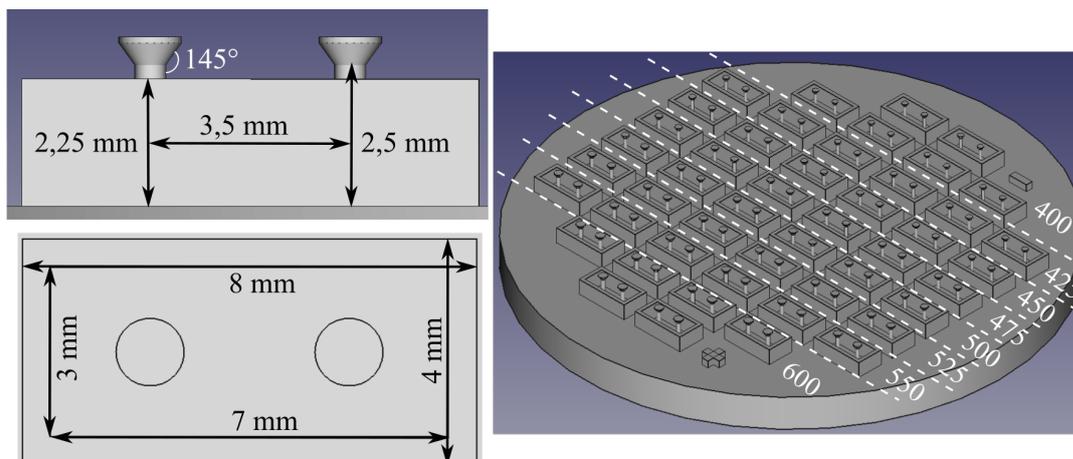


FIGURE 5.11 – Dessin CAO du second design : (gauche) dimensions d'une chambre de culture comprenant deux piliers dépassant de la chambre, et (droite) structure complète du moule comprenant 48 chambres de culture en PDMS incluant chacune 2 piliers (diamètres entre 400 et 600  $\mu\text{m}$ ).

Lors des premiers essais de culture *in vitro* 3D, nous avons constaté que les piliers de diamètre 350  $\mu\text{m}$  étaient très courbés lors de la formation du tissu musculaire 3D. C'est pourquoi ce diamètre a été exclu pour la conception de notre dispositif. Puisque nous n'avons pas pu tirer de conclusion sur l'impact des diamètres de piliers sur la formation des tissus musculaires, nous avons choisi de conserver les autres diamètres (425, 475, 500, 550 et 600  $\mu\text{m}$ ) et d'ajouter des valeurs intermédiaires (400, 450 et 525  $\mu\text{m}$ ). Les dimensions des piliers leur confèrent des raideurs comprises entre 0,41 et 2,08 N/m.

Le *Tableau 5.4* résume les dimensions des chambres de culture et des piliers du dispositif proposé.

TABLEAU 5.4 – Caractéristiques des chambres de culture et des piliers du second dispositif.

Chambre de culture	Dimensions externes (mm)	(L) 8 x (l) 4 x (h) 2,25							
	Dimensions internes (mm)	(L) 7 x (l) 3 x (h) 2,25							
Piliers	Hauteur (mm)	2,5							
	Espacement (mm)	3,5							
	Diamètre ( $\mu\text{m}$ )	400	425	450	475	500	525	550	600
	Raideur théorique (N/m)	0,41	0,52	0,66	0,82	1	1,22	1,47	2,08
Cônes	Hauteur ( $\mu\text{m}$ )	280	300	315	330	350	360	385	400
	Diamètre haut ( $\mu\text{m}$ )	800	850	900	950	1000	1050	1100	1200

## Fabrication

La fabrication de notre dispositif a été réalisée en suivant les mêmes étapes que celles décrites dans la *Section 5.2.1*, à savoir :

- impression 3D du **moule maître positif** en résine transparente (*Figure 5.12(a)*);
- fabrication du **moule intermédiaire négatif** en EcoFlex;
- fabrication de la **structure finale** en PDMS (*Figure 5.12(b)*).

La seule différence est une modification des paramètres du plasma cleaner (vacuum 0,27 mbar, gas air 0,32 mbar, générateur 55% de la puissance maximale de 40W, durée 2 min) pour l'activation de la surface du moule en EcoFlex avant l'étape de coating chimique au PFOTS.

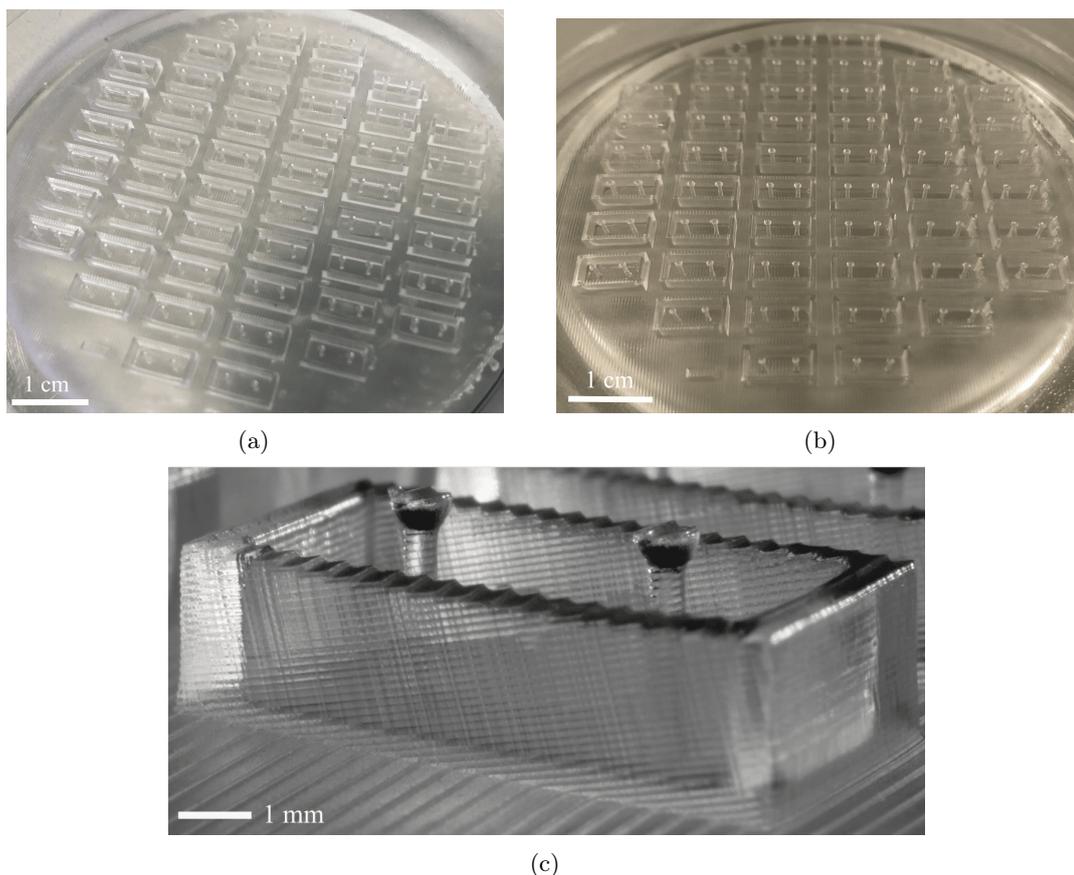


FIGURE 5.12 – Photographies (a) du moule maître en résine, (b) de la structure finale en PDMS et (c) d'une chambre de culture.

La structure finale en PDMS obtenue est présentée en *Figure 5.12(b)*, avec un gros plan sur une chambre de culture en *Figure 5.12(c)*. Un seul pilier a été arraché lors du démoulage, les autres étant tous complets avec un cône à leur sommet. Les "créneaux" sur la structure en PDMS (*Figure 5.12(c)*), sont dus à l'étape d'impression 3D du moule maître qui ne fut pas imprimé horizontalement.

## 5.3.2 Évaluation mécanique de l'activité musculaire

### 5.3.2.1 Protocoles expérimentaux

Douze chambres de culture PDMS ont été découpées et collées dans deux plaques de six puits en plastique : les diamètres des piliers sont indiqués dans le *Tableau 5.5*.

### Protocole de culture

Le protocole de culture suit les étapes décrites dans la *Figure 5.8*, avec les corrections mentionnées dans la synthèse de l'essai précédent : un **rinçage au PBS du Pluronic** est rajouté, et les cellules C2C12 utilisées ont un **nombre de passages plus faible**.

La veille de l'ensemencement, les chambres de culture ont été stérilisées à l'éthanol. Pour empêcher l'adhésion des cellules aux parois PDMS, les chambres de culture ont été remplies de Pluronic F-127 dilué à 0,2% dans du PBS, que nous avons laissé agir une heure à température ambiante, avant de rincer une fois au PBS et de laisser sécher à température ambiante.

La suite du protocole suit les étapes décrites dans la *Section 5.2.2.1* (pour un volume total  $V_{tot}$  de 40  $\mu\text{L}$  par chambre de culture), à savoir :

- élaboration du **mélange hydrogel-cellules** (myoblastes C2C12 avec passage  $< 10$ ) avec les densités cellulaires indiquées dans le *Tableau 5.5* ;
- **ensemencement** des douze chambres de culture ;
- **polymérisation** du mélange pendant au moins 45 min dans un incubateur à 37°C ;
- **prolifération** pendant 3 jours (milieu de prolifération : DMEM, 10% FBS, 1 mg/mL d'acide 6-Aminocaproïque, 1% pénicilline-streptomycine) ;
- **différenciation** pendant 6 jours (milieu de différenciation : DMEM, 2% HS, 1 mg/mL d'acide 6-Aminocaproïque, 1% pénicilline-streptomycine).

Après six jours de différenciation, nous avons appliqué les protocoles de stimulation décrits ci-après.

TABLEAU 5.5 – Diamètres des piliers, densités cellulaires et nombre de cellulesensemencées dans les douze chambres de culture PDMS placées dans des puits en plastique.

Puits	Diamètre pilier ( $\mu\text{m}$ )	Raideur pilier (N/m)	Densité cellulaire (/mL)	Nombre de cellules
W2	425	0,52	250 000	4840
W1			500 000	9680
W6	500	1,0	250 000	4840
W3			500 000	9680
W4	550	1,47	250 000	4840
W5			500 000	9680

### Protocole de stimulation électrique

La stimulation électrique a été délivrée par l'intermédiaire du système de stimulation et des électrodes C-dish décrits dans la *Section 3.2.2*. Les électrodes C-dish sont stérilisées à l'éthanol et par un passage sous UV pendant 15 min chaque jour.

Dans le but de comparer les activités contractiles entre les tissus musculaires 3D et les cultures sur support planaire, nous avons appliqué les signaux de stimulation utilisés dans le *Chapitre 4* (c.f. *Section 4.3*). L'amplitude et la durée des impulsions ont donc été fixées (20 mA pendant 5 ms pour l'impulsion positive, suivie de -10 mA pendant 10 ms pour l'impulsion négative).

Ainsi, le premier jour (**J1**, *Figure 5.13*) est consacré à l'application d'une stimulation basse fréquence (**pattern 1, 1 Hz**) pendant 8 heures. De même que pour les expérimentations sur MEA, ce pattern a pour rôle de tester la réponse des tissus

musculaires 3D à la stimulation électrique, c'est-à-dire vérifier que les myotubes sont fonctionnels et suffisamment différenciés pour se contracter. Si ce n'est pas le cas, le pattern 1 permet alors d'accélérer l'assemblage des sarcomères (unités contractiles des cellules musculaires, *Chapitre 1*) et de les rendre contractiles. Les tissus musculaires ont ensuite bénéficié d'un repos nocturne (sans stimulation), en vue de vérifier si la baisse d'activité contractile observée sur support planaire (*c.f. Section 4.3*) est due à l'arrêt de la stimulation électrique ou liée au support de culture. Le lendemain (**J2**, *Figure 5.13*), le pattern 1 a donc été de nouveau appliqué pendant 8 heures.

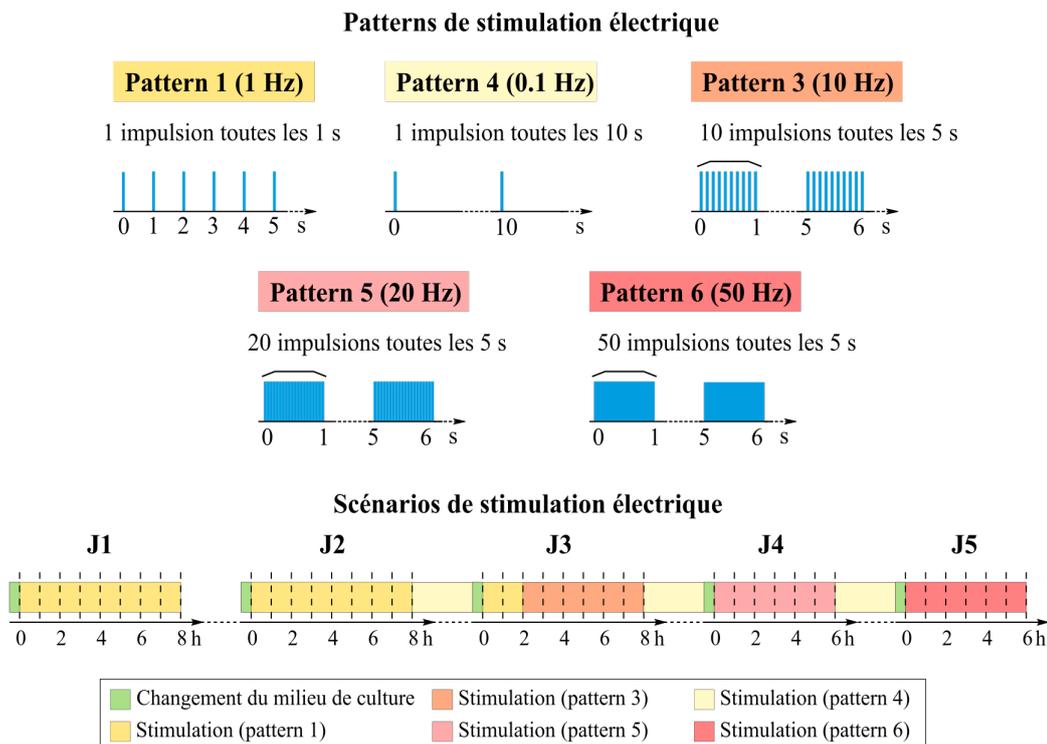


FIGURE 5.13 – Patterns et scénarios de stimulation appliqués à l'ensemble des puits (2 plaques de 6 puits) comprenant chacun un tissu musculaire 3D. Les patterns de stimulation sont ceux utilisés dans le *Chapitre 4* lors des expérimentations 2D avec des MEA.

Les signaux de fréquence plus élevée ont été appliqués les jours suivants, entre les périodes de stimulation à haute fréquence, le **pattern 4 (0,1 Hz)** a été appliqué afin de maintenir l'activité contractile. Au début du troisième jour (**J3**, *Figure 5.13*), le pattern 1 (1 Hz) est appliqué pendant 2 heures de manière à vérifier si l'application du pattern 4 permet véritablement de maintenir l'activité contractile [186, 220]. Ensuite, le **pattern 3 (10 Hz)** a été appliqué pendant 6 heures. Enfin, lors du quatrième et du cinquième jour (**J4** et **J5**, *Figure 5.13*), nous avons respectivement appliqué le **pattern 5 (20 Hz)** et le **pattern 6 (50 Hz)** pendant 6 heures.

### Suivi vidéo et analyse de l'activité contractile

Pendant les périodes de stimulation, les tissus musculaires 3D ont été observés toutes les heures par l'intermédiaire d'un microscope inversé et des **enregistrements vidéos** ont été réalisés avec un appareil non professionnel (iPhone 8, Apple) permettant d'acquérir jusqu'à 120 images par secondes, avec une résolution de 2 mégapixels.

Le déplacement du sommet des piliers, dû aux contractions musculaires, a été mesuré par l'intermédiaire du **logiciel Tracker** et de son option de "repérage automatique" : celle-ci nécessite d'entourer une zone dont on souhaite suivre la position sur chaque image d'une vidéo donnée, et le logiciel se charge de mesurer la position de la zone sélectionnée au cours du temps. Bien que l'analyse des vidéos soit partiellement automatisée avec le repérage automatique, la sélection des zones doit se faire manuellement par l'utilisateur. De plus, la rapidité des mouvements sur certaines vidéos ne permet pas d'utiliser le repérage automatique, ce qui nous contraint à procéder à un pointage manuel. L'analyse des vidéos s'est donc avérée être des plus chronophage, c'est pourquoi nous n'avons analysé que la moitié des vidéos (1 vidéo prise toutes les 2 heures).

Les mesures de déplacement obtenues par Tracker ont ensuite été multipliées par le coefficient de raideur  $k$  correspondant à chaque diamètre de pilier (*Tableau 5.5*) dans le but d'obtenir la force de contraction (*c.f. équation 5.1*). De même que dans le *Chapitre 4*, les courbes de force ont été resynchronisées sur l'axe des temps afin de mettre en évidence l'évolution des profils de contraction au cours du temps.

### 5.3.2.2 Résultats

#### Culture

Après six jours de différenciation, nous avons réussi à obtenir **sept tissus musculaires 3D** sur les douze chambres de culture (*Figure 5.14*). Trois tissus se sont rompus lors du processus de différenciation (P2 W1, P2 W3 et P2 W4) tandis que les deux autres (P1 W1 et P2 W5) n'ont pas atteint la phase de différenciation. Nous constatons alors qu'il s'agit des chambres de culture dans lesquelles nous avonsensemencé le plus de cellules (densité cellulaire initiale de 500 000 cellules/mL), quel que soit le diamètre des piliers.

D'après [229], un diamètre plus important engendre la formation d'un tissu plus large, ce qui semble se confirmer avec les tissus musculaires que nous avons obtenus (*Figure 5.14*) : à densité cellulaire initiale égale, nous constatons effectivement que **l'augmentation du diamètre des piliers entraîne la formation de tissus plus larges** : par exemple, le tissu de la chambre P2 W2 (diamètre de 425  $\mu\text{m}$ ) se trouve être plus fin que celui de la chambre P2 W6 (diamètre de 500  $\mu\text{m}$ ). Une exception déroge cependant à cette règle : à densité cellulaire initiale égale, le tissu de la chambre culture P1 W4 (diamètre de 550  $\mu\text{m}$ ) se trouve être plus fin que ceux des chambres P1 W6 (diamètre de 500  $\mu\text{m}$ ) et P1 W2 (diamètre de 425  $\mu\text{m}$ ). Toujours d'après [229], un pilier plus large, et donc plus rigide, entraîne la formation de tissus plus fins, augmentant le risque de rupture de ce dernier. Cela pourrait expliquer la finesse du tissu de la chambre P1 W4 : en effet, les chambres de culture P1 W4 et P1 W5 possèdent des piliers de même diamètre (550  $\mu\text{m}$ ), mais la densité cellulaire initialement ensemencées dans la chambre P1 W4 était moindre (250 000 cellules/mL). On peut alors supposer que les piliers sont trop rigides pour une telle densité cellulaire initiale.

Les sept tissus formés ne présentent pas de point d'accroche aux parois des chambres de culture, ou de "trous" comme observé lors des premiers essais (*c.f. Section 5.2.2.2*). De plus, aucune bulle n'a été observée au fond des chambres de culture, témoignant de l'absence de trace de Pluronic F-127. Ainsi, les améliorations apportées à la géométrie des chambres et au protocole de culture, en particulier l'abaissement de la hauteur des parois et l'étape de rinçage du Pluronic F-127, ont permis une **meilleure formation et intégrité des tissus musculaires** que les premiers essais de culture 3D réalisés.

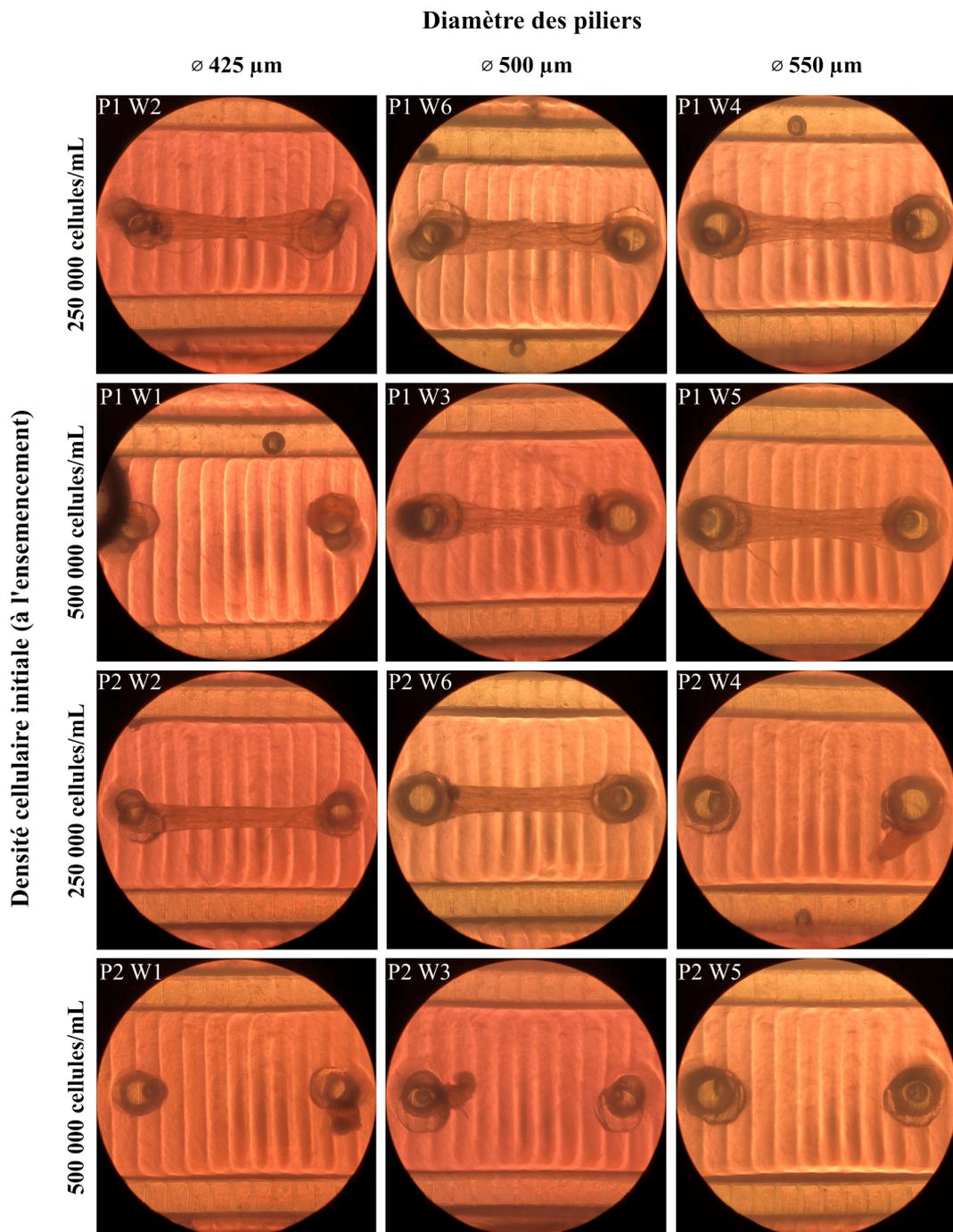


FIGURE 5.14 – Photographies des tissus musculaires 3D après six jours de différenciation (2 plaques de culture  $P_i$  comprenant chacune 6 puits  $W_j$ ). Chaque ligne (3 images) correspond à une densité cellulaire initiale (à l'ensemencement), et chaque colonne (4 images) correspond à un diamètre de piliers. Les images sont obtenues avec un microscope inversé (vue du dessous) et un appareil non professionnel.

### Stimulation électrique et mesures mécaniques

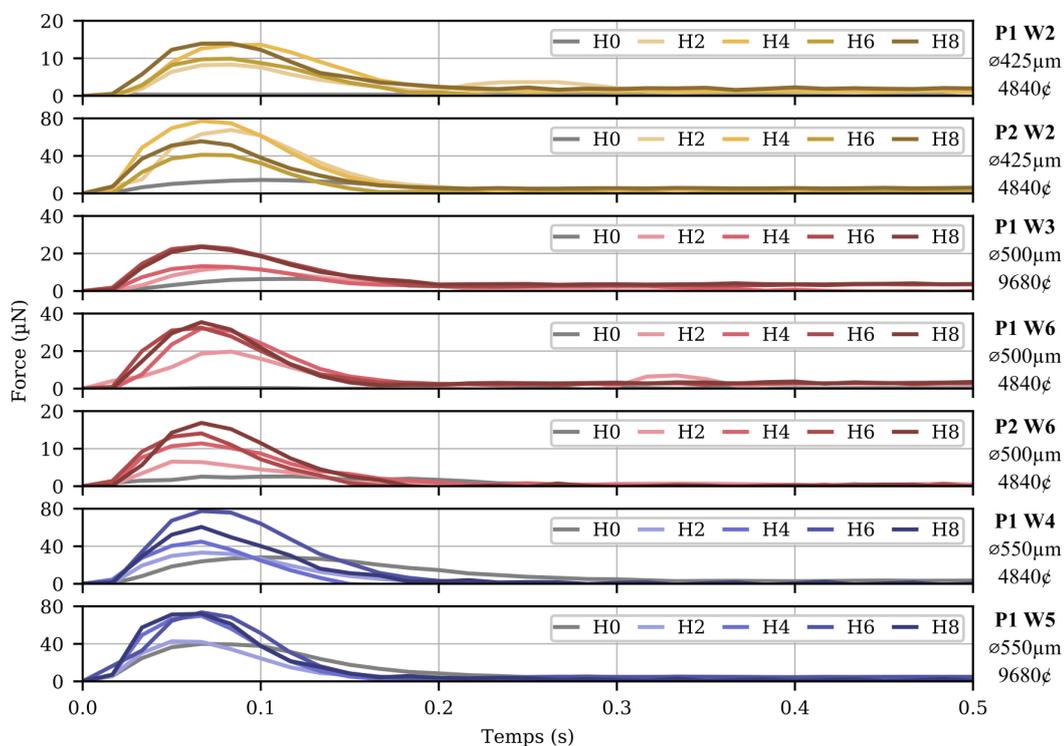
Après six jours de différenciation, nous avons procédé aux essais de stimulation électrique comme décrit en *Figure 5.13*. Pendant les essais nous avons réalisé des enregistrements vidéos dont les analyses ont permis d'extraire la force de contraction (*c.f. Section 5.3.2.1*).

Lors du **J1** nous avons appliqué le pattern 1 (1 Hz) pendant 8 heures à l'ensemble des tissus musculaires 3D. Les forces de contraction mesurées ce jour-là sont présentées en *Figure 5.15*, qui reprend l'évolution du profil de force d'une contraction en fonction de la durée de stimulation. A la mise en route de la stimulation (H0, *Figure 5.15*), nous constatons une faible activité contractile pour la plupart des tissus, se traduisant par des forces de contractions inférieures à  $10 \mu\text{N}$ , tandis que les tissus des chambres P1 W4 et P1 W5 exercent des forces de contraction de l'ordre de  $30\text{-}40 \mu\text{N}$ . Nous notons cependant une tendance générale au cours du temps : les **vitesse** (*Figure 5.15(a)*) et **forces** (*Figure 5.15(b)*) **de contraction augmentent au fil des heures de stimulation**. Après 8 heures de stimulation, les forces mesurées atteignent entre  $13$  et  $72 \mu\text{N}$ . Comme attendu, ce pattern de stimulation déclenche des **contractions du type secousse**.

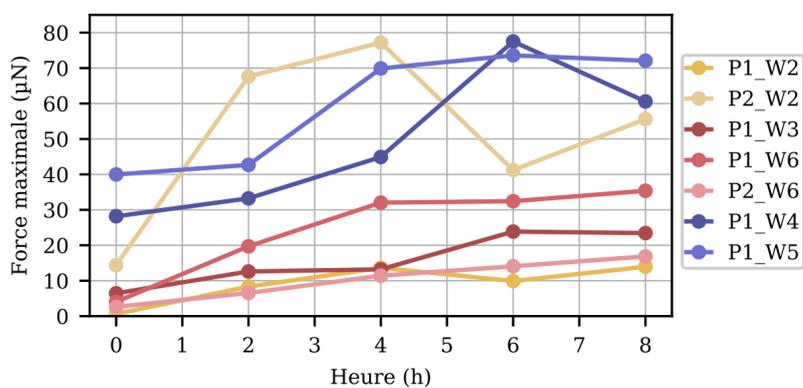
Après un **repos nocturne**, nous avons de nouveau appliqué le pattern 1 (1 Hz) pendant 8 heures lors du **J2**. A la remise en route de la stimulation (H0, *Figure 5.16*), les **forces générées** par l'ensemble des tissus musculaires 3D sont toutes **inférieures** à  $10 \mu\text{N}$ . De même que lors du J1, les forces générées augmentent au cours du temps (*Figure 5.16(b)*). Après 8 heures de stimulation (H8, *Figure 5.16*), les tissus génèrent des forces du même ordre de grandeur qu'après les 8 heures de stimulation de la veille (J1), à l'exception du tissu de la chambre P1 W6. En ce qui concerne le tissu de la chambre P2 W2, on note une chute de la force à 8 heures (H8, *Figure 5.16*). Cependant, nous ne pouvons affirmer qu'il s'agit de fatigue musculaire car les mesures de déplacement à 4 et 6 heures (H4, H6) ont été réalisés par pointage manuel, pouvant être à l'origine d'importantes imprécisions des mesures.

Dans le but de vérifier si l'**application de stimuli électriques sans interruption** (sans période de repos) permet de maintenir l'activité contractile des cellules C2C12, nous avons appliqué le pattern 4 (0,1 Hz) pendant une nuit, avant d'appliquer à nouveau le pattern 1 (1 Hz) pendant 2 heures lors du **J3**. A la reprise de la stimulation à 1 Hz (H0, *Figure 5.17*), les force de contraction sont comprises entre  $8$  et  $67 \mu\text{N}$ , tandis qu'elles étaient toutes inférieures à  $10 \mu\text{N}$  après le repos nocturne entre J1 et J2. Néanmoins, après les 8 heures de stimulation à 1 Hz lors du J2 et avant l'application du pattern 4 (0,1 Hz) pendant une nuit, les forces de contraction étaient comprises entre  $11$  et  $77 \mu\text{N}$ . **L'application d'une stimulation électrique durant la nuit n'a donc pas complètement maintenu l'activité contractile des cellules, mais a tout de même permis de fortement limiter sa baisse.**

Après les 2 heures de stimulation à 1 Hz (H2, *Figure 5.17*), l'ensemble des tissus musculaires exercent des forces de contraction plus importantes, comprises entre  $20$  et  $116 \mu\text{N}$ . Ensuite, le pattern 3 (10 Hz) a été appliqué pendant 6 heures. Au début de son application (H0b, *Figure 5.17*), les forces générées vont de  $10$  à  $97 \mu\text{N}$ . Seuls les tissus des chambres P1 W6 et P1 W4 exercent une force supérieure lors de l'application d'un pattern plus haute fréquence (10 Hz) en comparaison de celle produite avec le pattern 1 (1 Hz). Dans tous les cas, nous constatons que les tissus génèrent tous des **contractions tétaniques imparfaites**. Nous notons aussi que lors du passage de la stimulation 1 Hz à la stimulation 10 Hz, les valeurs de force maximale ont momentanément diminué. Ce

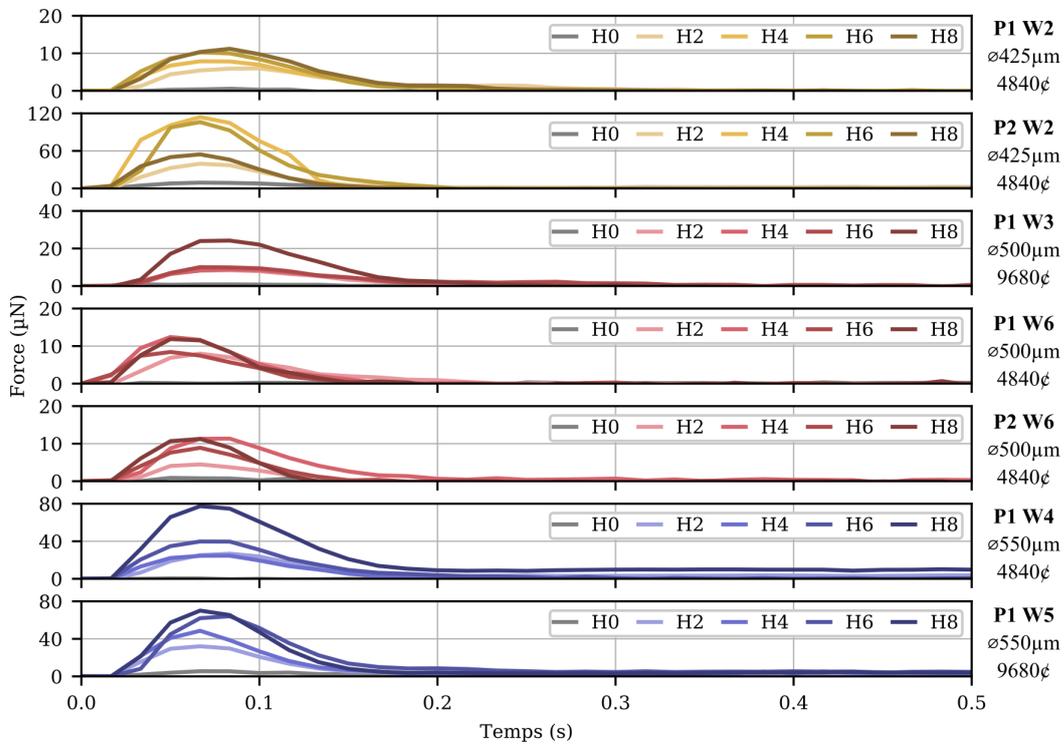


(a)

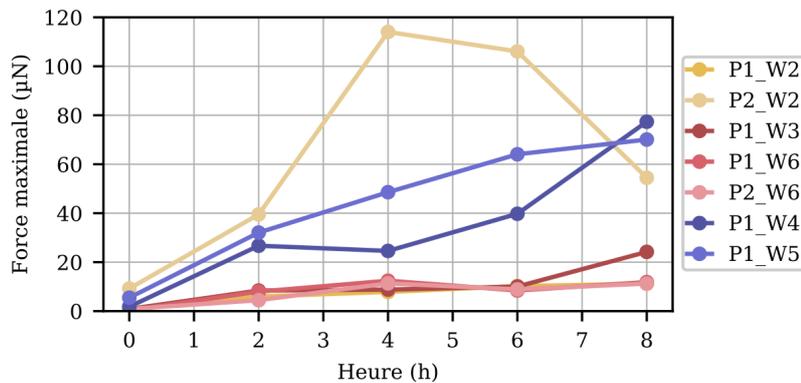


(b)

FIGURE 5.15 – (a) Force de contraction des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J1 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz. A droite sont indiqués le diamètre des piliers et le nombre initial de cellulesensemencées. (b) Forces maximales des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J1, au cours des 8 heures de stimulation à 1 Hz.



(a)



(b)

FIGURE 5.16 – (a) Force de contraction des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J2 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4), 6 (H6) et 8 (H8) heures de stimulation à 1 Hz. A droite sont indiqués le diamètre des piliers et le nombre initial de cellulesensemencées. (b) Forces maximales des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J2, au cours des 8 heures de stimulation à 1 Hz.

phénomène n'a pas été confirmé car les protocoles des jours suivants n'incluaient pas de changement de fréquence de stimulation sans repos intermédiaire.

Après 6 heures de stimulation à 10 Hz (H6b, *Figure 5.17*), les forces mesurées se trouvent entre 15 et 114  $\mu\text{N}$ . A l'exception des tissus des chambres P1 W3 et P1 W6, les forces de contraction produites par les tissus ont augmenté au cours du temps de stimulation à 10 Hz (*Figure 5.17(b)*). Quatre des sept tissus présentent une baisse de leur force de contraction maximale entre 6 et 8 heures.

Lors du **J4**, nous avons appliqué le pattern 5 (20 Hz) pendant 6 heures. Au début de son application (H0, *Figure 5.18*), les contractions produites semblent s'approcher du **tétanos parfait**, générant pourtant de faibles forces (entre 0 et 32  $\mu\text{N}$ ). Pour l'ensemble des tissus, nous observons la même tendance au cours du temps : les **vitesse**s (*Figure 5.18(a)*) et **forces** (*Figure 5.18(b)*) **de contraction augmentent** au fil des heures de stimulation. Après 6 heures de stimulation, les tissus produisent des **contractions tétaniques imparfaites** et les forces mesurées atteignent entre 19 et 72  $\mu\text{N}$ .

Enfin, à **J5** nous avons appliqué le pattern 6 (50 Hz) pendant 6 heures. A la mise en route de la stimulation (H0, *Figure 5.19(a)*), les **contractions tétaniques** génèrent une force comprise entre 9 et 68  $\mu\text{N}$ . Après 6 heures de stimulation (H6, *Figure 5.19(a)*), on remarque des **contractions tétaniques imparfaites** d'amplitude allant de 24 à 78  $\mu\text{N}$ . Trois tissus présentent une augmentation ou une stabilisation de leur force maximale après 4 heures, tandis que les trois autres tissus voient leur force légèrement diminuer à 6 heures (*Figure 5.19(b)*).

Le *Tableau 5.6* rassemble les forces de contractions maximales et minimales mesurées sur l'ensemble des puits au cours des 5 jours d'expérimentations. En **résumé**, cette série d'expérimentations nous permet de faire plusieurs observations :

- la force de contraction exercée par les muscles électriquement stimulés augmente au cours d'une période de stimulation donnée ;
- après le temps de repos nocturne, la force de contraction à la reprise de la stimulation est inférieure à celle produite la veille avant arrêt de la stimulation (pour un pattern donné, ici 1 Hz) ;
- appliquer un pattern basse fréquence (0,1 Hz) à la place d'un repos nocturne permet de limiter la baisse des forces de contraction à la reprise de la stimulation le lendemain (pour un pattern donné, ici 1 Hz) ;
- les patterns de stimulation 5 (20 Hz) et 6 (50 Hz) déclenchent des contractions tétaniques parfaites à la mise en route de la stimulation, puis des contractions tétaniques imparfaites au-delà de 2 heures de stimulation ;
- augmenter la fréquence de stimulation (dans la gamme considérée ici) semble générer des forces maximales plus importantes.

## 5.4 Discussion générale

En vue de développer un dispositif se rapprochant des conditions *in vivo*, nous nous sommes tournés vers la fabrication de piliers flexibles permettant la formation de tissus musculaires tridimensionnels.

Pour cela, nous avons d'abord reproduit les méthodes présentées dans la littérature afin de prendre en main les protocoles de fabrication des piliers [230] et de culture des tissus musculaires [228]. Les premiers essais de culture 3D ont conduit à une mauvaise formation et intégrité des tissus musculaires, se traduisant par des "trous" au sein des

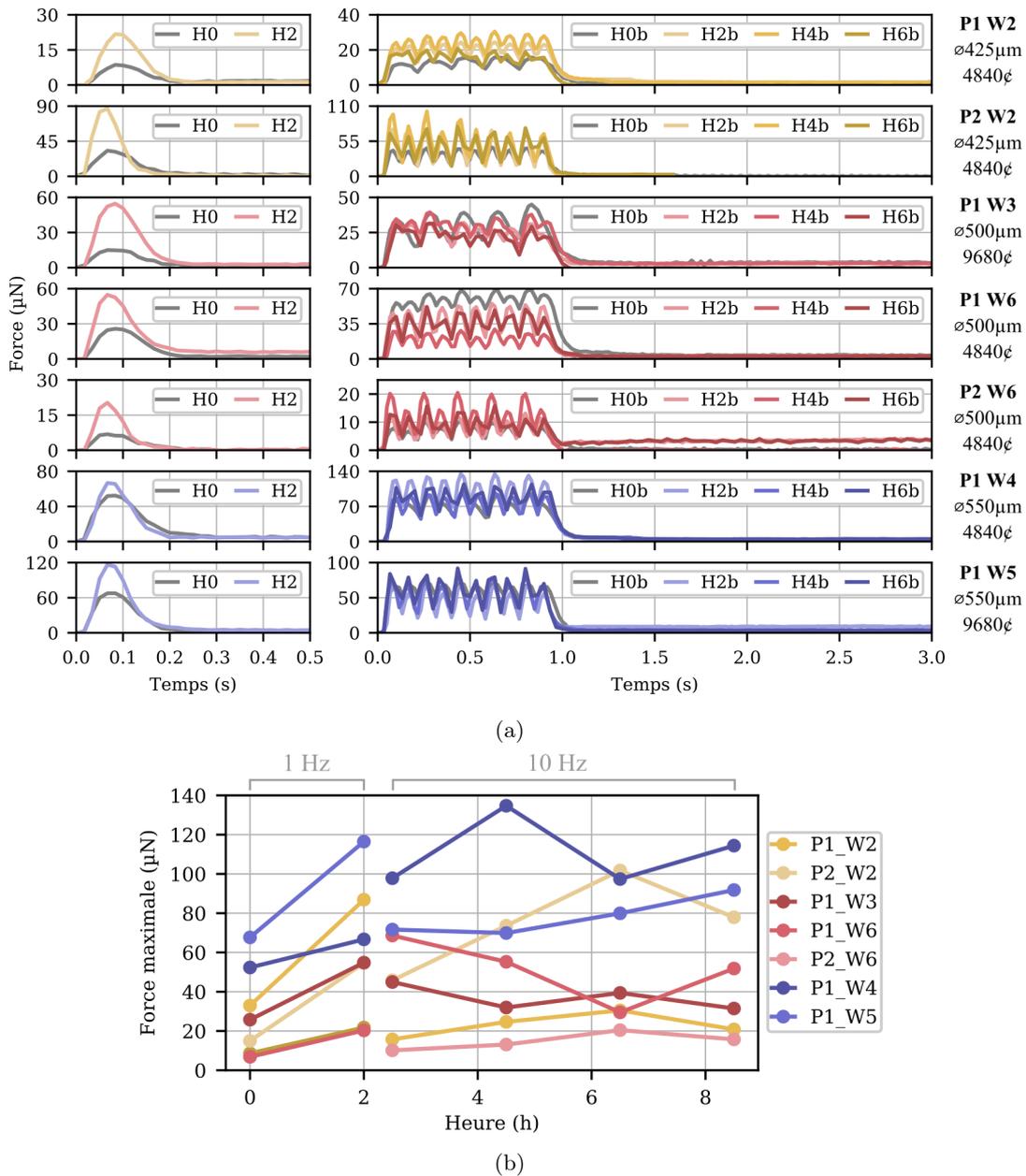
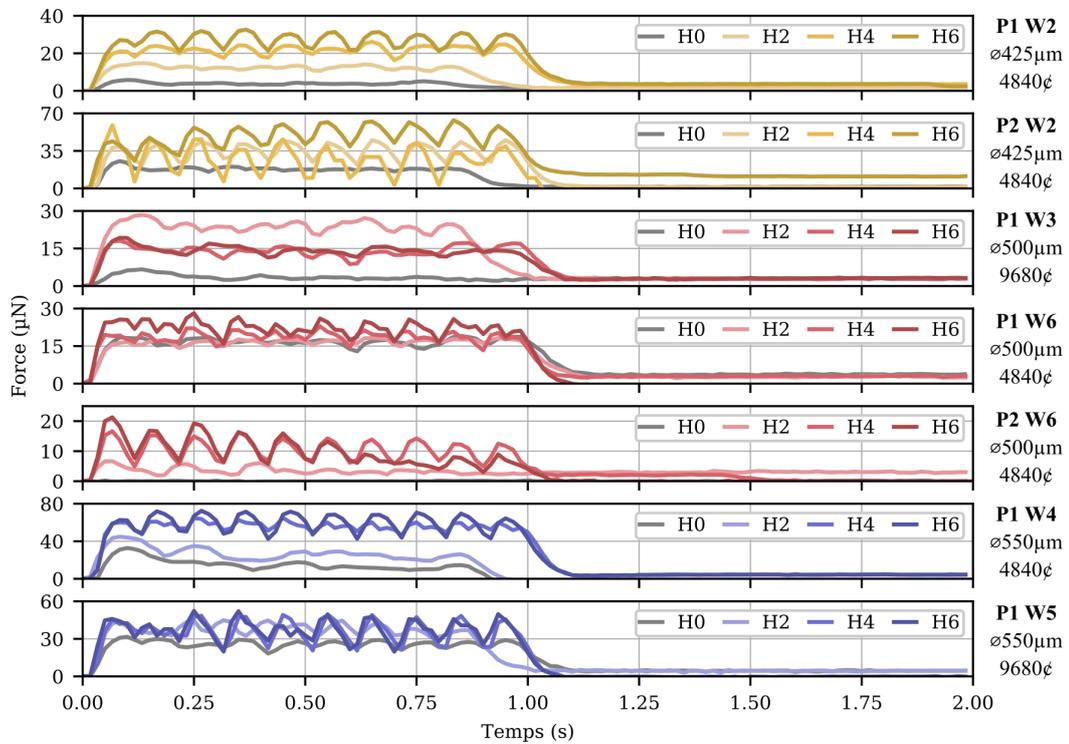
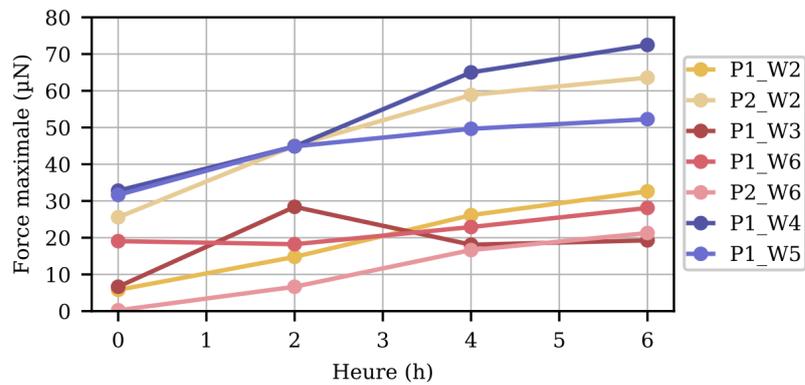


FIGURE 5.17 – (a) Force de contraction des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J3 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2) heures de stimulation à 1 Hz, puis à la mise en route de la stimulation à 10 Hz (H0b), et après 2 (H2b), 4 (H4b) et 6 (H6b) heures. A droite sont indiqués le diamètre des piliers et le nombre initial de cellules ensemencées. (b) Forces maximales des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J3, au cours des 2 heures de stimulation à 1 Hz et des 6 heures de stimulation à 10 Hz.

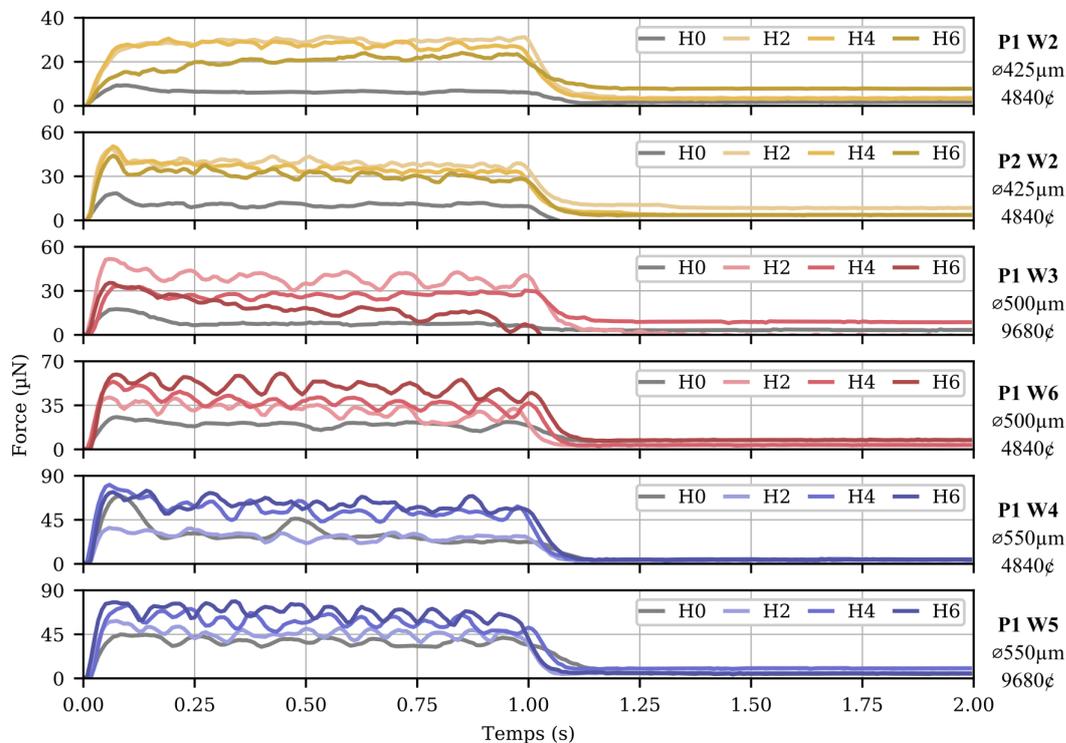


(a)

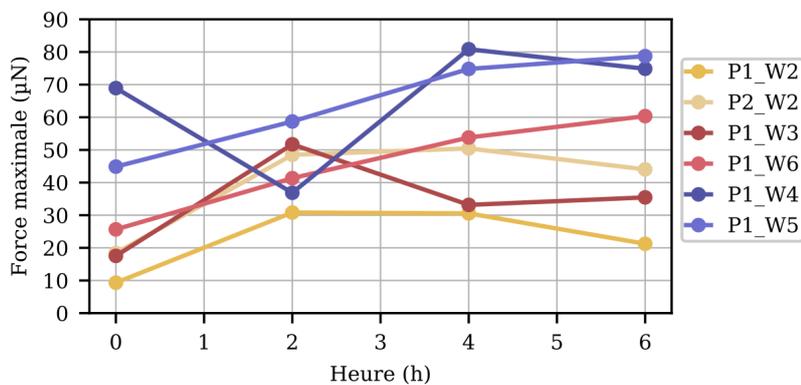


(b)

FIGURE 5.18 – (a) Force de contraction des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J4 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4) et 6 (H6) heures de stimulation à 20 Hz. A droite sont indiqués le diamètre des piliers et le nombre initial de cellulesensemencées. (b) Forces maximales des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J4, au cours des 6 heures de stimulation à 20 Hz.



(a)



(b)

FIGURE 5.19 – (a) Force de contraction des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J5 : à la mise en route de la stimulation (H0), après 2 (H2), 4 (H4) et 6 (H6) heures de stimulation à 50 Hz. A droite sont indiqués le diamètre des piliers et le nombre initial de cellulesensemencées. (b) Forces maximales des tissus musculaires de cellules C2C12 lors du J5, au cours des 6 heures de stimulation à 50 Hz.

TABLEAU 5.6 – Synthèse des forces minimales (Fmin) et maximales (Fmax) mesurées lors des expérimentations, lors de l’application des 4 patterns de stimulation.

Jour et pattern		P1 W2	P2 W2	P1 W3	P1 W6	P2 W6	P1 W4	P1 W5
J1 pattern 1 (1 Hz)	Fmin ( $\mu$ N)	0,63	14,39	6,46	4,06	2,61	28,19	39,98
	Fmax ( $\mu$ N)	13,95	77,21	23,86	35,38	16,86	77,5	73,59
J2 pattern 1 (1 Hz)	Fmin ( $\mu$ N)	0,55	9,23	0,9	0,34	0,89	1,8	5,5
	Fmax ( $\mu$ N)	11,2	114,02	24,21	12,42	11,34	77,36	70,1
J3 pattern 1 (1 Hz)	Fmin ( $\mu$ N)	8,64	32,95	14,98	25,76	6,85	52,35	67,68
	Fmax ( $\mu$ N)	21,76	86,87	54,66	54,82	20,3	66,67	116,46
J3 pattern 3 (10 Hz)	Fmin ( $\mu$ N)	15,75	45,79	31,47	29,5	10,15	97,39	69,89
	Fmax ( $\mu$ N)	30,49	101,73	44,93	68,62	20,45	134,71	91,81
J4 pattern 5 (20 Hz)	Fmin ( $\mu$ N)	5,8	25,55	6,65	18,22	0,27	32,8	31,64
	Fmax ( $\mu$ N)	32,62	63,58	28,4	28,11	21,27	72,48	52,27
J5 pattern 5 (50 Hz)	Fmin ( $\mu$ N)	9,33	18,42	17,53	25,66	-	36,86	44,88
	Fmax ( $\mu$ N)	31,5	50,45	51,71	60,35	-	80,85	78,72

tissus qui présentaient des points d’accroche sur les parois des chambres de culture. Les cellules utilisées lors des premiers essais présentaient également une très faible activité contractile, en raison du grand nombre de passages (supérieur à 10).

L’ensemble de ces points ont alors été corrigés lors de la conception de **notre propre dispositif**. Nous avons ainsi ajouté une étape de rinçage du Pluronic F-127, afin d’en éliminer toute trace et garantir une bonne intégrité des tissus. Ensuite, afin de s’assurer que les tissus ne se forment qu’autour des piliers, nous avons réduit la hauteur des parois des chambres de culture PDMS. Ces améliorations ont effectivement **permis une meilleure formation et intégrité des tissus musculaires**. Avec ce dispositif, nous avons alors procédé à des expérimentations impliquant la stimulation électrique des tissus formés de cellules C2C12, dont le nombre de passages est inférieur à 10, et à des premiers essais de mesures mécaniques de l’activité contractile.

Afin de comparer l’activité musculaire d’une culture 3D avec celle d’une culture 2D (MEA, *c.f. Chapitre 4*), nous avons appliqué les mêmes patterns de stimulation sur les deux types de culture. Le principe même de l’accrochage des myotubes autour de piliers flexibles facilite l’expression des contractions et nous permet l’extraction d’un marqueur de force de contraction, que nous utilisons pour quantifier les activités contractiles. Comme observé lors des expérimentations sur MEA, l’activité contractile augmente au cours d’une période de stimulation donnée. Dans le cas des expérimentations 3D, l’augmentation de l’activité contractile peut être mesurée par une **hausse de la force de contraction au cours des heures de stimulation**. Nous avons également constaté qu’un **repos nocturne engendre une baisse de la force de contraction à la reprise de la stimulation** (le lendemain). Pour limiter ce phénomène, nous avons appliqué un pattern de stimulation basse fréquence (0,1 Hz) les nuits suivantes [186]. Bien que l’application de ce pattern n’ait pas permis de maintenir totalement l’activité contractile (i.e. la force de contraction) entre deux jours d’expérimentations, la baisse de force à la reprise de la stimulation était néanmoins bien moindre qu’après un repos nocturne (pour un pattern de stimulation donné, ici 1 Hz).

Comme ce qui a été observé sur les MEA, les patterns 1 (1 Hz) et 3 (10 Hz) déclenchent respectivement des contractions de type secousse et tétaniques imparfaites.

Les patterns 5 (20 Hz) et 6 (50 Hz) engendrent des contractions téaniques parfaites, qui au-delà de 2 heures de stimulation deviennent des contractions téaniques imparfaites. Ce phénomène n'a pas été observé sur les MEA, possiblement en raison des durées d'application de ces patterns qui ont été limitées à 2 heures seulement sur MEA. De manière générale, nous avons pu observer que **l'augmentation de la fréquence de stimulation permettait la génération de forces de contraction plus importantes.**

Il faut toutefois noter qu'il s'agit de résultats préliminaires d'une seule campagne d'expérimentations, comprenant quelques limites et incertitudes. D'une part, il est **difficile d'évaluer la précision des mesures de déplacement réalisées avec le logiciel Tracker** : en effet, c'est à l'utilisateur que revient la tâche de tracer une échelle de distance sur chaque vidéo, pouvant engendrer des imprécisions. Pour faciliter cette action, une solution consisterait à ajouter une structure ou un "repère" dans chaque chambre de culture, de longueur choisie lors de la conception du moule et servant d'étalon. D'autre part, bien que l'option de "repérage automatique" du logiciel permette un suivi des positions d'une zone donnée de façon automatique, son bon fonctionnement est limité en cas de mouvements trop rapides, ou d'un faible contraste. Dans ce cas, l'utilisateur doit procéder à un pointage manuel des positions, pouvant engendrer également des erreurs de mesures. Une solution consiste à intégrer des microbilles fluorescentes dans les piliers pour faciliter le suivi automatique de la déviation des piliers [229]. Malgré cela, les analyses restent longues et fastidieuses à effectuer puisque le logiciel n'est capable d'analyser qu'une vidéo à la fois. Pour palier cela, il serait intéressant de concevoir des piliers à base de matériaux piézoélectriques [212], permettant de fournir une mesure de la force de contraction en temps réel, sans avoir recours à de l'analyse vidéo.

Néanmoins, notre dispositif offre la possibilité d'évaluer plus aisément l'activité contractile des cellules musculaires. En effet, les **mesures de déplacement réalisées ne souffrent pas des inconvénients des analyses vidéos** effectuées dans le *Chapitre 4*, à savoir : pertes d'informations dues à la compression, ou encore dérives des mesures en lien avec des changements de luminosité et la présence de débris cellulaires flottants. Ainsi, il est possible d'en extraire davantage de métriques comme les durées et vitesses de contraction et de relaxation, apportant plus d'informations sur l'activité musculaire et la fatigue. Par manque de temps, ces données n'ont pas été extraites ici. Cependant, nous avons rempli notre objectif consistant à proposer un **nouveau dispositif pour l'évaluation mécanique** de l'activité musculaire *in vitro*, dont les conditions physiologiques se rapprochent davantage des conditions *in vivo* que les cultures cellulaires 2D. En comparaison des supports planaires, notre dispositif permet d'**allonger le temps des cultures des cellules** musculaires C2C12 (supérieur à 15 jours contre seulement 10 jours sur MEA) et par conséquent les durées d'expérimentations.



# Conclusion

Ce manuscrit de thèse résume trois années de recherche sur une étude innovante de la fatigue musculaire induite par stimulation électrique dans un contexte *in vitro*. À travers ce travail, nous cherchions à caractériser la fatigue musculaire électriquement induite par l'intermédiaire d'une mesure électrique, la bioimpédance. Pour cela, nos objectifs ont été de développer un modèle *in vitro* de muscle squelettique, l'instrumentation permettant la stimulation électrique et les mesures de bioimpédance et enfin réaliser la preuve de concept de mesure de fatigue par bioimpédancemétrie dans un contexte *in vitro* 2D. L'ensemble de ces objectifs ont été atteints, bien que nous ayons conscience des limites des dispositifs et expérimentations réalisées, discutées plus bas. Il faut souligner que ce projet a été le premier des groupes BioElectronique (IMS) et SmartIES (LIRMM) consacré à l'étude des tissus musculaires : si ces équipes ont une longue expérience dans le développement de circuits et systèmes interfacés avec le vivant, elles n'avaient pas encore abordé la problématique de la stimulation et de la caractérisation des tissus musculaires.

À titre personnel, ce sujet réellement interdisciplinaire m'a permis de développer des connaissances et savoirs-faire multiples : grâce à ma formation d'ingénieur, j'ai pu mettre à profit mes compétences déjà acquises en électronique et en informatique ; ce travail m'a aussi permis de me former à la culture cellulaire *in vitro*, aux méthodes de fabrication microtechnologiques. Mais, j'ai surtout pu intégrer toutes ces connaissances pour l'élaboration et la réalisation d'expérimentations complexes combinant des savoirs-faire des domaines de la biologie et des sciences de l'ingénieur.

## Synthèse

**Chapitre 1 :** Ce premier chapitre retrace l'histoire de la stimulation électrique, son principe de fonctionnement et ses multiples applications thérapeutiques et fonctionnelles. Parmi celles-ci nous nous sommes concentrés sur la stimulation électrique fonctionnelle visant à restaurer les fonctions motrices chez les patients atteints de paralysie. Pour cela, l'anatomie et la physiologie du système neuromusculaire est décrite dans le but d'expliquer comment la stimulation électrique fonctionnelle permet de restaurer la motricité. Mais ce paradigme de stimulation, qui ne reproduit pas fidèlement le fonctionnement physiologique du système neuromusculaire, induit une fatigue musculaire dont la caractérisation via un modèle *in vitro* est l'enjeu de cette thèse.

**Chapitre 2 :** Le second chapitre précise les mécanismes biologiques à l'origine de la fatigue musculaire lors d'une activité musculaire volontaire, mais également lors de l'application d'une stimulation électrique. Un état de l'art des méthodes de mesures de la fatigue est ensuite exposé. Dans une seconde partie, nous définissons la notion de bioimpédance et les principes électrochimiques mis en jeu et faisons un état de l'art des modèles électriques équivalents des tissus biologiques ainsi que des méthodes de mesure et des applications de la bioimpédance. Finalement, nous discutons la pertinence de

l'utilisation de la bioimpédance que nous proposons comme mesure objective de la fatigue musculaire.

Ces deux premiers chapitres illustrent bien le caractère interdisciplinaire du projet, qui demande de comprendre la physiologie du système neuromusculaire, les principes de la stimulation électrique ainsi que la notion et les principes de mesures de la bioimpédance.

**Chapitre 3 :** Le troisième chapitre présente les étapes de conception et de validation d'un banc de test spécifique à notre problématique : mesurer sur un modèle musculaire *in vitro* un marqueur de la fatigue musculaire induite par stimulation électrique. Nous proposons tout d'abord un modèle de muscle squelettique *in vitro*. Puis, nous présentons la conception et la réalisation d'un système de stimulation, validé par des essais de stimulation électrique sur des cultures *in vitro* de cellules musculaires. Nous explicitons ensuite le développement et la caractérisation du système de mesure de bioimpédance, reposant sur l'utilisation de matrices à microélectrodes. Finalement, nous présentons les méthodes d'évaluation de l'activité musculaire *in vitro* choisies parmi l'état de l'art, à savoir les mesures optiques et électrophysiologiques.

**Chapitre 4 :** Le quatrième chapitre est consacré à l'élaboration des protocoles expérimentaux mis en place avec le banc de test conçu au chapitre 3, et à la présentation des résultats obtenus lors de trois séries de campagnes d'expérimentations. À travers l'application de divers scénarios de stimulation, nous montrons que notre banc est capable d'induire une activité musculaire et que celle-ci engendre des variations de la bioimpédance des cellules musculaires stimulées. En comparant l'impédance des MEA avec et sans cellules, nous avons montré que la fréquence de mesure à 10 kHz est la plus sensible et adéquate pour analyser l'impact de la fatigue musculaire sur la bioimpédance. Avec cette métrique, nous avons effectivement constaté que les baisses de bioimpédance à 10 kHz, dues à l'activité musculaire, sont plus importantes avec l'augmentation de la quantité de charge injectée et/ou de la fréquence de stimulation, ou encore de la durée de stimulation. Le chapitre fournit finalement une discussion des résultats mettant en lumière les difficultés et limites rencontrées. Une des conclusions de cette étude est que les supports de culture planaires et rigides, qui entraînent des contraintes mécaniques importantes sur les cellules musculaires, rendent difficile l'évaluation de l'activité contractile des myotubes et peuvent fausser les marqueurs de bioimpédance obtenus.

**Chapitre 5 :** Ce dernier chapitre propose une alternative 3D au modèle biologique *in vitro* 2D du chapitre 4. Il s'agit d'un dispositif comprenant des piliers flexibles, autour desquels sont cultivées des cellules musculaires, formant finalement un minimuscle tridimensionnel, et qui permet une évaluation mécanique de l'activité musculaire. Nous exposons le principe de fonctionnement de ce dispositif et faisons un état de l'art des méthodes de fabrication associées. Deux séries d'expérimentations sont décrites : elles combinent la stimulation électrique des tissus musculaires 3D et la mesure optique permettant l'estimation des forces de contraction. Les résultats préliminaires obtenus sont concluants et ont permis de valider notre dispositif, et plus particulièrement les protocoles de culture 3D et de fabrication des piliers.

## Perspectives

Les résultats obtenus dans cette thèse sont une avancée vers la mise au point de modèles musculaires contractiles *in vitro* caractérisés par bioimpédance. Si des tendances répétables de variations de la bioimpédance en fonction des paramètres de la stimulation électrique ont été obtenues, nous ne pouvons pas pour le moment établir une signature électrique formelle de la fatigue musculaire. Nos travaux offrent cependant plusieurs perspectives de recherche.

D'une part, afin d'améliorer la répétabilité et surtout simplifier les mesures, qui sont actuellement extrêmement complexes, il est souhaitable d'aller vers une instrumentation embarquée et temps réel et de proposer l'automatisation des mesures. Pour cela, le laboratoire IMS dispose d'ores et déjà d'un stimulateur portable [101], et d'un système de mesure de bioimpédance [102] capable de réaliser des mesures rapides à l'aide de signaux multifréquentiels, que nous pourrions intégrer à court terme à notre dispositif.

D'autre part, malgré les inconvénients attribués aux matrices de microélectrodes (MEA), des pistes de recherche restent à explorer avec ces derniers qui ont l'avantage de permettre la mesure directe et de l'activité cellulaire des cellules cultivées. Certes, la rigidité du support entrave la bonne formation des cellules musculaires et leurs contractions, mais il existe des MEA flexibles qui pourraient pallier cet inconvénient. Associés à une instrumentation de mesures électrophysiologiques et de bioimpédance, ces MEA permettraient une exploration et une caractérisations plus poussées et précises de la fatigue musculaire à l'échelle cellulaire. Il est aussi envisageable de réaliser des MEA sur mesure, dont l'agencement optimisé des pistes de connexion offrirait la possibilité de mesurer la bioimpédance intracellulaire des cellules musculaires et fournir davantage d'informations sur l'impact de la fatigue à cette échelle.

En termes de mesure de la contractilité, l'évaluation de l'activité musculaire *in vitro* sur un support planaire 2D s'est avérée difficile à effectuer par analyse vidéo. En particulier, la compression vidéo génère des pertes d'informations et des artefacts qui dégradent la qualité des mesures. En remplacement des caméras optiques, nous envisageons à court terme d'exploiter le potentiel des caméras événementielles (*event-based cameras*) : ces dernières produisent des données visuelles sous la forme d'un flux d'événements asynchrones apparaissant uniquement lors des changements d'intensité, avec une résolution temporelle de l'ordre de la microseconde.

Enfin, dans le but de toujours mieux s'approcher de la physiologie musculaire *in vivo*, il apparaît essentiel de développer et d'améliorer le dispositif présenté dans le dernier chapitre (*Chapitre 5*) : ce modèle 3D présente l'avantage de permettre à un tissu musculaire 3D bien différencié de maintenir une activité contractile de longue durée, ce qui est très enviable dans le cadre d'une étude de la fatigue musculaire. Ce dernier comprend deux piliers flexibles en PDMS, permettant seulement l'évaluation mécanique de la force de contraction. La poursuite logique de notre travail est la réalisation de piliers présentant des zones conductrices, pouvant servir d'électrodes pour des mesures de bioimpédance et électrophysiologiques mais également pour la stimulation [137].



## Annexe A

## Data sheet du Keysight E4990A

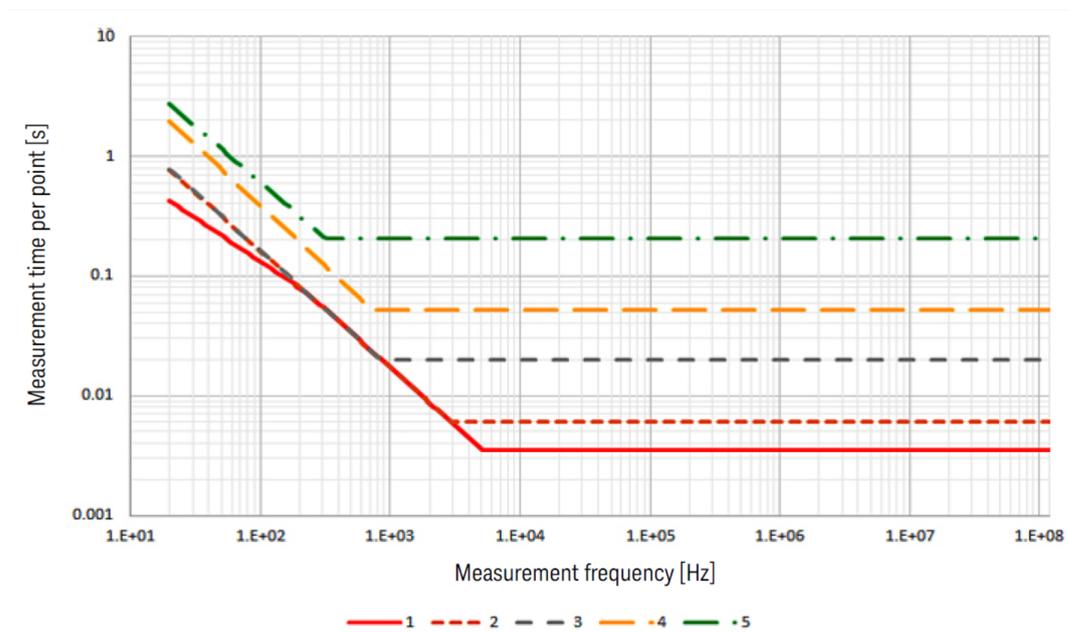


FIGURE A.1 – Temps de mesure par point en fonction du paramètres "Measurement Time" de l'analyseur Keysight E4990A

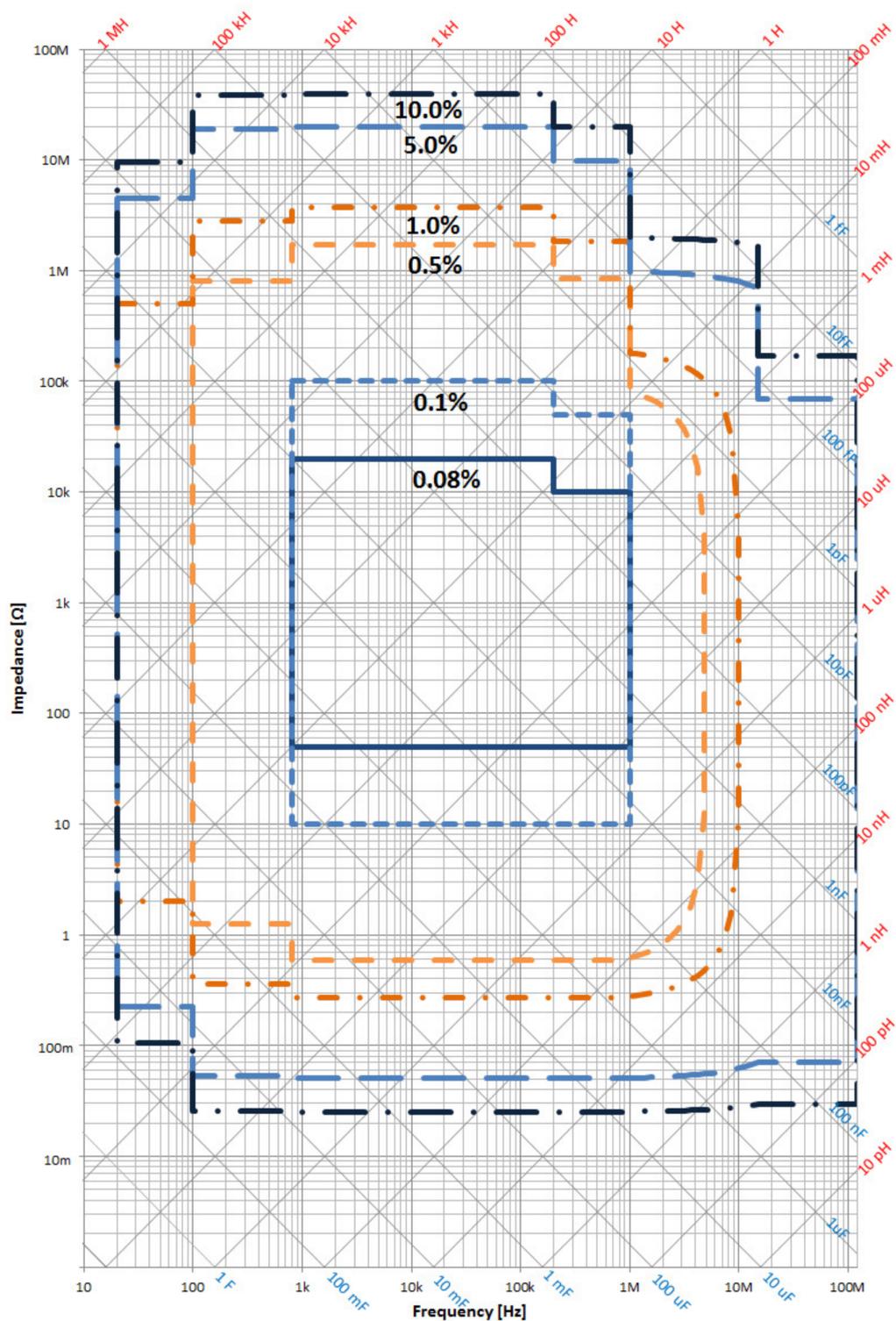


FIGURE A.2 – Précision des mesures d'impédance au niveau des 4 ports du panneau avant du Keysight E4990A (pour un signal de 0,5 Vrms, et Measurement Time = 5).

# Liste des publications

A. Bailleul et al., "In vitro impedance spectroscopy : A MEA-based measurement bench for myoblasts cultures monitoring," *2021 XXXVI Conference on Design of Circuits and Integrated Systems (DCIS)*, Vila do Conde, Portugal, 2021, pp. 1-6, doi : [10.1109/DCIS53048.2021.9666172](https://doi.org/10.1109/DCIS53048.2021.9666172).

A. Bailleul et al., "Bioimpedance Spectroscopy Helps Monitor the Impact of Electrical Stimulation on Muscle Cells," in *IEEE Access*, vol. 10, pp. 131430-131441, 2022, doi : [10.1109/ACCESS.2022.3228479](https://doi.org/10.1109/ACCESS.2022.3228479).



# Bibliographie

- [1] Peter KELLAWAY. « The part played by electric fish in the early history of bioelectricity and electrotherapy ». In : *Bulletin of the History of Medicine* 20.2 (1946), 112–137. ISSN : 00075140, 10863176.
- [2] Jaakko MALMIVUO, Robert PLONSEY et al. *Bioelectromagnetism : principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields*. Oxford University Press, USA, 1995.
- [3] Matthew COBB. « Exorcizing the animal spirits : Jan Swammerdam on nerve function ». In : *Nature Reviews Neuroscience* 3.5 (mai 2002), 395–400. ISSN : 1471-0048. DOI : [10.1038/nrn806](https://doi.org/10.1038/nrn806).
- [4] J. A. MALMIVUO, J. HONKONEN et K. E. WENDEL. « Did Jan Swammerdam Do the First Electric Stimulation over 100 Years before Luigi Galvani ? » In : *XIII Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing 2013*. Sous la dir. de Laura M. ROA ROMERO. Cham : Springer International Publishing, 2014, 13–16. ISBN : 978-3-319-00846-2.
- [5] Jean JALLABERT. *Expériences sur l'électricité avec quelques conjectures sur la cause de ses effets*. Durand, 1749.
- [6] Luigi GALVANI. *De viribus electricitatis in motu musculari commentarius*. Apud Societatem Typographicam, 1792.
- [7] L. A. GEDDES et H. E. HOFF. « The discovery of bioelectricity and current electricity The Galvani-Volta controversy ». In : *IEEE Spectrum* 8.12 (1971), p. 38-46. DOI : [10.1109/MSPEC.1971.5217888](https://doi.org/10.1109/MSPEC.1971.5217888).
- [8] Alessandro VOLTA. « XVII. On the electricity excited by the mere contact of conducting substances of different kinds. In a letter from Mr. Alexander Volta, FRS Professor of Natural Philosophy in the University of Pavia, to the Rt. Hon. Sir Joseph Banks, Bart. KBPR S ». In : *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 90 (1800), p. 403-431.
- [9] Carlo MATTEUCCI. *Deuxième mémoire sur le courant électrique propre de la grenouille et sur celui des animaux à sang chaud*. Imprimerie de Bachelier, 1841.
- [10] Emil Heinrich DU BOIS-REYMOND. *Untersuchungen über thierische elektricität : bd., 1. abth.* T. 2. 2. G. Reimer, 1884.
- [11] Hermann von HELMHOLTZ. « Note sur la vitesse de propagation de l'agent nerveux dans les nerfs rachidiens ». In : *Hermann von Helmholtz : Versuche zur Fortpflanzungsgeschwindigkeit der Reizung in den Nerven*. Sous la dir. d'Henning SCHMIDGEN. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2021, 57–61. ISBN : 978-3-662-63833-0. DOI : [10.1007/978-3-662-63833-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-63833-0_3). URL : [https://doi.org/10.1007/978-3-662-63833-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-63833-0_3).
- [12] Hebbel E HOFF et Leslie A GEDDES. « The rheotome and its prehistory : A study in the historical interrelation of electrophysiology and electromechanics ». In : *Bulletin of the History of Medicine* 31.3 (1957), p. 212-234.

- [13] Julius BERNSTEIN. « Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme ». In : *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 92.10 (nov. 1902), 521–562. ISSN : 1432-2013. DOI : [10.1007/BF01790181](https://doi.org/10.1007/BF01790181).
- [14] A. L. HODGKIN et A. F. HUXLEY. « Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre ». In : *Nature* 144.3651 (oct. 1939), 710–711. ISSN : 1476-4687. DOI : [10.1038/144710a0](https://doi.org/10.1038/144710a0).
- [15] Alan L HODGKIN et Andrew F HUXLEY. « A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve ». In : *The Journal of physiology* 117.4 (1952), p. 500.
- [16] ERWIN NEHER et BERT SAKMANN. « Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres ». In : *Nature* 260.5554 (avr. 1976), 799–802. ISSN : 1476-4687. DOI : [10.1038/260799a0](https://doi.org/10.1038/260799a0).
- [17] Marco PICCOLINO. « Luigi Galvani and animal electricity : two centuries after the foundation of electrophysiology ». In : *Trends in Neurosciences* 20.10 (oct. 1997), 443–448. ISSN : 0166-2236. DOI : [10.1016/S0166-2236\(97\)01101-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01101-6).
- [18] A DJOURNO, Ch EYRIES et B VALLANCIEN. « DE L'EXCITATION ÉLECTRIQUE DU NERF COCHLEAIRE CHEZ L'HOMME, PAR INDUCTION À DISTANCE À L'AIDE D'UN MICRO-BOBINAGE INCLUS À DEMEURE ». In : *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* 151.3 (1957), p. 423-425.
- [19] Rune ELMGVIST et al. « Artificial pacemaker for treatment of Adams-Stokes syndrome and slow heart rate ». In : *American Heart Journal* 65.6 (juin 1963), 731–748. ISSN : 0002-8703. DOI : [10.1016/0002-8703\(63\)90239-4](https://doi.org/10.1016/0002-8703(63)90239-4).
- [20] A-S FEINER et AJ MCEVOY. « The nernst equation ». In : *Journal of chemical education* 71.6 (1994), p. 493.
- [21] David E GOLDMAN. « Potential, impedance, and rectification in membranes ». In : *The Journal of general physiology* 27.1 (1943), p. 37-60.
- [22] Robert PLONSEY, Roger C BARR et A BIOELECTRICITY. *Quantitative Approach*. Springer, 2007.
- [23] Sébastien JOUCLA et Blaise YVERT. « Modeling extracellular electrical neural stimulation : From basic understanding to MEA-based applications ». In : *Neuronal Ensemble Recordings in Integrative Neuroscience* 106.3 (mai 2012), 146–158. ISSN : 0928-4257. DOI : [10.1016/j.jphysparis.2011.10.003](https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2011.10.003).
- [24] Donald R MCNEAL. « Analysis of a model for excitation of myelinated nerve ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 4 (1976), p. 329-337.
- [25] Frank RATTAY. « Analysis of models for external stimulation of axons ». In : *IEEE transactions on biomedical engineering* 10 (1986), p. 974-977.
- [26] B. BEZEKCI et V.N. BIKTASHEV. « Strength-Duration relationship in an excitable medium ». In : *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation* 80 (jan. 2020), p. 104954. ISSN : 1007-5704. DOI : [10.1016/j.cnsns.2019.104954](https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2019.104954).
- [27] Nicolas BRUNEL et Mark C. W. van ROSSUM. « Quantitative investigations of electrical nerve excitation treated as polarization ». In : *Biological Cybernetics* 97.5 (déc. 2007), 341–349. ISSN : 1432-0770. DOI : [10.1007/s00422-007-0189-6](https://doi.org/10.1007/s00422-007-0189-6).

- [28] J. Thomas MORTIMER. « Motor Prostheses ». In : *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2011, p. 155-187. ISBN : 9780470650714. DOI : <https://doi.org/10.1002/cphy.cp010205>. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cphy.cp010205>. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphy.cp010205>.
- [29] Archibald Vivian HILL. « Excitation and accommodation in nerve ». In : *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* 119.814 (fév. 1936), 305–355. DOI : [10.1098/rspb.1936.0012](https://doi.org/10.1098/rspb.1936.0012).
- [30] Leslie A GEDDES. « Accuracy limitations of chronaxie values ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 51.1 (2004), p. 176-181.
- [31] WAH RUSHTON. « The effect upon the threshold for nervous excitation of the length of nerve exposed, and the angle between current and nerve ». In : *The Journal of physiology* 63.4 (1927), p. 357.
- [32] Daniel R MERRILL, Marom BIKSON et John G R JEFFERYS. « Electrical stimulation of excitable tissue : design of efficacious and safe protocols ». In : *Journal of Neuroscience Methods* (2005), p. 28.
- [33] S. B. BRUMMER et M. J. TURNER. « Electrochemical Considerations for Safe Electrical Stimulation of the Nervous System with Platinum Electrodes ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* BME-24.1 (jan. 1977), 59–63. ISSN : 1558-2531. DOI : [10.1109/TBME.1977.326218](https://doi.org/10.1109/TBME.1977.326218).
- [34] Susan L. MORTON, Mark L. DAROUX et J. Thomas MORTIMER. « The Role of Oxygen Reduction in Electrical Stimulation of Neural Tissue ». In : *Journal of The Electrochemical Society* 141.1 (jan. 1994), 122–130. ISSN : 0013-4651. DOI : [10.1149/1.2054671](https://doi.org/10.1149/1.2054671).
- [35] P Hunter PECKHAM, Jayme S KNUTSON et al. « Functional electrical stimulation for neuromuscular applications ». In : *Annual review of biomedical engineering* 7.1 (2005), p. 327-360.
- [36] Lynne R. SHEFFLER et John CHAE. « Neuromuscular electrical stimulation in neurorehabilitation ». In : *Muscle & Nerve* 35.5 (2007), p. 562-590. DOI : <https://doi.org/10.1002/mus.20758>. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mus.20758>. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mus.20758>.
- [37] Emil H RIJNBEEK, Nick ELEVELD et Wouter OLTHUIS. « Update on peripheral nerve electrodes for closed-loop neuroprosthetics ». In : *Frontiers in neuroscience* 12 (2018), p. 350.
- [38] Tim BORETIUS et al. « A transverse intrafascicular multichannel electrode (TIME) to interface with the peripheral nerve ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 26.1 (sept. 2010), 62–69. ISSN : 0956-5663. DOI : [10.1016/j.bios.2010.05.010](https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.05.010).
- [39] John C. LILLY et al. « Brief, Noninjurious Electric Waveform for Stimulation of the Brain ». In : *Science* 121.3144 (avr. 1955), 468–469. DOI : [10.1126/science.121.3144.468](https://doi.org/10.1126/science.121.3144.468).
- [40] J. Thomas MORTIMER, C. Norman SHEALY et Connie WHEELER. « Experimental Nondestructive Electrical Stimulation of the Brain and Spinal Cord ». English. In : *Journal of Neurosurgery* 32.5 (jan. 1970), 553–559. DOI : [10.3171/jns.1970.32.5.0553](https://doi.org/10.3171/jns.1970.32.5.0553).

- [41] P. H. GORMAN et J. T. MORTIMER. « The Effect of Stimulus Parameters on the Recruitment Characteristics of Direct Nerve Stimulation ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* BME-30.7 (juill. 1983), 407–414. ISSN : 1558-2531. DOI : [10.1109/TBME.1983.325041](https://doi.org/10.1109/TBME.1983.325041).
- [42] Mesut SAHIN et Yanmei TIE. « Non-rectangular waveforms for neural stimulation with practical electrodes ». In : *Journal of Neural Engineering* 4.3 (mai 2007), 227–233. ISSN : 1741-2560. DOI : [10.1088/1741-2560/4/3/008](https://doi.org/10.1088/1741-2560/4/3/008).
- [43] MéliSSa DALI et al. « Comparison of the efficiency of chopped and non-rectangular electrical stimulus waveforms in activating small vagus nerve fibers ». In : *Journal of Neuroscience Methods* 320 (mai 2019), 1–8. ISSN : 0165-0270. DOI : [10.1016/j.jneumeth.2019.02.017](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.02.017).
- [44] D. R. CANTRELL et J. B. TROY. « Extracellular stimulation of mouse retinal ganglion cells with non-rectangular voltage-controlled waveforms ». In : *2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. journalAbbreviation : 2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Sept. 2009, 642–645. ISBN : 1558-4615. DOI : [10.1109/IEMBS.2009.5333464](https://doi.org/10.1109/IEMBS.2009.5333464).
- [45] Marcus YIP et al. « Energy-efficient waveform for electrical stimulation of the cochlear nerve ». In : *Scientific Reports* 7.1 (oct. 2017), p. 13582. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-017-13671-y](https://doi.org/10.1038/s41598-017-13671-y).
- [46] F. RATTAY. « Analysis of the electrical excitation of CNS neurons ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 45.6 (1998), p. 766–772. DOI : [10.1109/10.678611](https://doi.org/10.1109/10.678611).
- [47] Daria Nesterovich ANDERSON et al. « Anodic stimulation misunderstood : preferential activation of fiber orientations with anodic waveforms in deep brain stimulation ». In : *Journal of Neural Engineering* 16.1 (jan. 2019), p. 016026. DOI : [10.1088/1741-2552/aae590](https://doi.org/10.1088/1741-2552/aae590). URL : <https://doi.org/10.1088/1741-2552/aae590>.
- [48] J Patrick REILLY. *Applied bioelectricity : from electrical stimulation to electropathology*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [49] Warren M. GRILL et J. THOMAS MORTIMER. « Electrical properties of implant encapsulation tissue ». In : *Annals of Biomedical Engineering* 22.1 (jan. 1994), 23–33. ISSN : 1573-9686. DOI : [10.1007/BF02368219](https://doi.org/10.1007/BF02368219).
- [50] Daniel A. WAGENAAR, Jerome PINE et Steve M. POTTER. « Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays ». en. In : *Journal of Neuroscience Methods* 138.1–2 (sept. 2004), 27–37. ISSN : 01650270. DOI : [10.1016/j.jneumeth.2004.03.005](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.03.005).
- [51] Cesar MARQUEZ-CHIN et Milos R. POPOVIC. « Functional electrical stimulation therapy for restoration of motor function after spinal cord injury and stroke : a review ». In : *BioMedical Engineering OnLine* 19.1 (mai 2020), p. 34. ISSN : 1475-925X. DOI : [10.1186/s12938-020-00773-4](https://doi.org/10.1186/s12938-020-00773-4).
- [52] D. N. RUSHTON. « Electrical stimulation in the treatment of pain ». In : *Disability and Rehabilitation* 24.8 (jan. 2002), 407–415. ISSN : 0963-8288, 1464-5165. DOI : [10.1080/09638280110108832](https://doi.org/10.1080/09638280110108832).
- [53] Alim Louis BENABID. « Deep brain stimulation for Parkinson’s disease ». In : *Current Opinion in Neurobiology* 13.6 (déc. 2003), 696–706. ISSN : 09594388. DOI : [10.1016/j.conb.2003.11.001](https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.11.001).

- [54] Michael C. H. LI et Mark J. COOK. « Deep brain stimulation for drug-resistant epilepsy ». In : *Epilepsia* 59.2 (2018), 273–290. DOI : <https://doi.org/10.1111/epi.13964>.
- [55] Helen S. MAYBERG et al. « Deep Brain Stimulation for Treatment-Resistant Depression ». In : *Neuron* 45.5 (mars 2005), 651–660. ISSN : 08966273. DOI : [10.1016/j.neuron.2005.02.014](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.02.014).
- [56] Rhaya L JOHNSON et Christopher G WILSON. « A review of vagus nerve stimulation as a therapeutic intervention ». In : *Journal of inflammation research* 11 (2018), p. 203.
- [57] Klaus Daniel MARTIN et al. « Restoration of ankle movements with the ActiGait implantable drop foot stimulator : a safe and reliable treatment option for permanent central leg palsy ». English. In : *Journal of Neurosurgery JNS* 124.1 (jan. 2016), 70–76. DOI : [10.3171/2014.12.JNS142110](https://doi.org/10.3171/2014.12.JNS142110).
- [58] Samar HAMID et Ray HAYEK. « Role of electrical stimulation for rehabilitation and regeneration after spinal cord injury : an overview ». In : *European Spine Journal* 17.9 (sept. 2008), 1256–1269. ISSN : 0940-6719, 1432-0932. DOI : [10.1007/s00586-008-0729-3](https://doi.org/10.1007/s00586-008-0729-3).
- [59] Kevin L. KILGORE et al. « An Implanted Upper-Extremity Neuroprosthesis Using Myoelectric Control ». In : *The Journal of Hand Surgery* 33.4 (avr. 2008), 539–550. ISSN : 0363-5023. DOI : [10.1016/j.jhsa.2008.01.007](https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2008.01.007).
- [60] Christine Azevedo COSTE et al. « Activating effective functional hand movements in individuals with complete tetraplegia through neural stimulation ». In : *Scientific Reports* 12.1 (oct. 2022), p. 16189. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-022-19906-x](https://doi.org/10.1038/s41598-022-19906-x).
- [61] Andreas ROWALD et al. « Activity-dependent spinal cord neuromodulation rapidly restores trunk and leg motor functions after complete paralysis ». In : *Nature Medicine* 28.2 (fév. 2022), 260–271. ISSN : 1546-170X. DOI : [10.1038/s41591-021-01663-5](https://doi.org/10.1038/s41591-021-01663-5).
- [62] James G. NAPLES et Michael J. RUCKENSTEIN. « Cochlear Implant ». In : *Otolaryngologic Clinics of North America* 53.1 (fév. 2020), 87–102. ISSN : 0030-6665. DOI : [10.1016/j.otc.2019.09.004](https://doi.org/10.1016/j.otc.2019.09.004).
- [63] A. MITCHELL-INNES, S.R. SAEED et R. IRVING. « The Future of Cochlear Implant Design ». In : *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*. T. 81. journalAbbreviation : Advances in Oto-Rhino-Laryngology. 2017, 105–113. ISBN : 0065-3071. DOI : [10.1159/000485540](https://doi.org/10.1159/000485540). URL : <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000485540>.
- [64] James D. WEILAND, Steven T. WALSTON et Mark S. HUMAYUN. « Electrical Stimulation of the Retina to Produce Artificial Vision ». In : *Annual Review of Vision Science* 2.1 (oct. 2016), 273–294. ISSN : 2374-4642, 2374-4650. DOI : [10.1146/annurev-vision-111815-114425](https://doi.org/10.1146/annurev-vision-111815-114425).
- [65] Edward J TEHOVNIK et al. « Microstimulation of visual cortex to restore vision ». In : *Progress in brain research* 175 (2009), p. 347-375.
- [66] O FOERSTER. « Beitrage zur pathophysiologie der sehbahn und der spehsphare ». In : *J Psychol Neurol* 39 (1929), p. 435-463.
- [67] G. S. BRINDLEY et W. S. LEWIN. « The sensations produced by electrical stimulation of the visual cortex ». In : *The Journal of Physiology* 196.2 (mai 1968), 479–493. ISSN : 0022-3751. DOI : [10.1113/jphysiol.1968.sp008519](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008519).

- [68] Yvonne Hsu-Lin LUO et Lyndon da CRUZ. « The Argus® II Retinal Prosthesis System ». In : *Progress in Retinal and Eye Research* 50 (jan. 2016), 89–107. ISSN : 1350-9462. DOI : [10.1016/j.preteyeres.2015.09.003](https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.09.003).
- [69] Cristian PASLUOSTA, Patrick KIELE et Thomas STIEGLITZ. « Paradigms for restoration of somatosensory feedback via stimulation of the peripheral nervous system ». In : *Clinical Neurophysiology* 129.4 (2018), 851–862. ISSN : 1388-2457. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2017.12.027>.
- [70] Stanisa RASPOPOVIC et al. « Restoring Natural Sensory Feedback in Real-Time Bidirectional Hand Prostheses ». In : *Science Translational Medicine* 6.222 (2014), 222ra19-222ra19. DOI : [10.1126/scitranslmed.3006820](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006820). eprint : <https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/scitranslmed.3006820>. URL : <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/scitranslmed.3006820>.
- [71] Sašo JEZERNIK et al. « Electrical stimulation for the treatment of bladder dysfunction : Current status and future possibilities ». In : *Neurological Research* 24.5 (2002). PMID : 12117310, p. 413-430. DOI : [10.1179/016164102101200294](https://doi.org/10.1179/016164102101200294). eprint : <https://doi.org/10.1179/016164102101200294>. URL : <https://doi.org/10.1179/016164102101200294>.
- [72] Graham CREASEY et al. « Electrical stimulation to restore respiration ». In : *Journal of rehabilitation research and development* 33 (1996), p. 123-132.
- [73] Wayne SCOTT, Jennifer STEVENS et Stuart A BINDER-MACLEOD. « Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications ». In : *Physical Therapy* 81.11 (nov. 2001), p. 1810-1816. ISSN : 0031-9023. DOI : [10.1093/ptj/81.11.1810](https://doi.org/10.1093/ptj/81.11.1810). eprint : <https://academic.oup.com/ptj/article-pdf/81/11/1810/31661405/ptj1810.pdf>. URL : <https://doi.org/10.1093/ptj/81.11.1810>.
- [74] Dirk PETTE et Robert S. STARON. « Mammalian Skeletal Muscle Fiber Type Transitions ». In : sous la dir. de Kwang W. JEON. T. 170. *International Review of Cytology*. Academic Press, 1997, p. 143-223. DOI : [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61622-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61622-8). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074769608616228>.
- [75] Alexander SANDOW. « Excitation-contraction coupling in muscular response ». In : *The Yale journal of biology and medicine* 25.3 (1952), p. 176.
- [76] Philip M HOPKINS. « Skeletal muscle physiology ». In : *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 6.1 (fév. 2006), p. 1-6. ISSN : 1743-1816. DOI : [10.1093/bjaceaccp/mki062](https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mki062). eprint : <https://academic.oup.com/bjaed/article-pdf/6/1/1/993377/mki062.pdf>. URL : <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mki062>.
- [77] Ole BÆKGAARD NIELSEN et al. « Chloride Channels Take Center Stage in Acute Regulation of Excitability in Skeletal Muscle : Implications for Fatigue ». In : *Physiology* 32.6 (2017). PMID : 29021362, p. 425-434. DOI : [10.1152/physiol.00006.2015](https://doi.org/10.1152/physiol.00006.2015). eprint : <https://doi.org/10.1152/physiol.00006.2015>. URL : <https://doi.org/10.1152/physiol.00006.2015>.
- [78] Dmitry SHISHMAREV. « Excitation-contraction coupling in skeletal muscle : recent progress and unanswered questions ». In : *Biophysical Reviews* 12.1 (2020), p. 143-153.
- [79] Håkan WESTERBLAD, Joseph D BRUTON et Abram KATZ. « Skeletal muscle : energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability ». In : *Experimental cell research* 316.18 (2010), p. 3093-3099.

- [80] Elwood HENNEMAN et Camille B OLSON. « Relations between structure and function in the design of skeletal muscles ». In : *Journal of neurophysiology* 28.3 (1965), p. 581-598.
- [81] Elwood HENNEMAN. « Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge ». In : *Science* 126.3287 (1957), p. 1345-1347.
- [82] F. BELLEMARE et al. « Motor-unit discharge rates in maximal voluntary contractions of three human muscles ». In : *Journal of Neurophysiology* 50.6 (1983). PMID : 6663333, p. 1380-1392. DOI : [10.1152/jn.1983.50.6.1380](https://doi.org/10.1152/jn.1983.50.6.1380). eprint : <https://doi.org/10.1152/jn.1983.50.6.1380>. URL : <https://doi.org/10.1152/jn.1983.50.6.1380>.
- [83] Trevor S. BARSS et al. « Utilizing Physiological Principles of Motor Unit Recruitment to Reduce Fatigability of Electrically-Evoked Contractions : A Narrative Review ». In : *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 99.4 (avr. 2018), 779–791. ISSN : 00039993. DOI : [10.1016/j.apmr.2017.08.478](https://doi.org/10.1016/j.apmr.2017.08.478).
- [84] Yoshino OKUMA et al. « Electrical stimulation site influences the spatial distribution of motor units recruited in tibialis anterior ». In : *Clinical Neurophysiology* 124.11 (2013), p. 2257-2263. ISSN : 1388-2457. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2013.04.015>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388245713003155>.
- [85] M JUBEAU et al. « Random motor unit activation by electrostimulation ». In : *International journal of sports medicine* 28.11 (2007), p. 901-904.
- [86] Bo BIERING-SØRENSEN et al. « Muscle after spinal cord injury ». In : *Muscle & Nerve : Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine* 40.4 (2009), p. 499-519.
- [87] Dirk PETTE et Gerta VRBOVÁ. « The contribution of neuromuscular stimulation in elucidating muscle plasticity revisited ». In : *European Journal of Translational Myology* 27.1 (2017).
- [88] Nur Azah HAMZAID et Glen DAVIS. « Health and fitness benefits of functional electrical stimulation-evoked leg exercise for spinal cord–Injured individuals : A position review ». In : *Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation* 14.4 (2009), p. 88-121.
- [89] J. MIZRAHI. « Fatigue in Muscles Activated by Functional Electrical Stimulation ». In : *Critical Reviews™; in Physical and Rehabilitation Medicine* 9.2 (1997), p. 93-129. ISSN : 0896-2960.
- [90] Sudip NAG et Nitish V THAKOR. « Implantable neurotechnologies : electrical stimulation and applications ». In : *Medical & biological engineering & computing* 54.1 (2016), p. 63-76.
- [91] Hannah L. COMBS et al. « Cognition and Depression Following Deep Brain Stimulation of the Subthalamic Nucleus and Globus Pallidus Pars Internus in Parkinson’s Disease : A Meta-Analysis ». In : *Neuropsychology Review* 25.4 (déc. 2015), 439–454. ISSN : 1573-6660. DOI : [10.1007/s11065-015-9302-0](https://doi.org/10.1007/s11065-015-9302-0).
- [92] M. Mc LAUGHLIN et al. « Towards a Closed-Loop Cochlear Implant System : Application of Embedded Monitoring of Peripheral and Central Neural Activity ». In : *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 20.4 (juill. 2012), 443–454. ISSN : 1558-0210. DOI : [10.1109/TNSRE.2012.2186982](https://doi.org/10.1109/TNSRE.2012.2186982).
- [93] CL LYNCH et MR POPOVIC. « Closed-loop control for FES : Past work and future directions ». In : Citeseer.

- [94] Morufu Olusola IBITOYE et al. « Strategies for Rapid Muscle Fatigue Reduction during FES Exercise in Individuals with Spinal Cord Injury : A Systematic Review ». In : *PLOS ONE* 11.2 (fév. 2016), e0149024. DOI : [10.1371/journal.pone.0149024](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149024).
- [95] R. J. DOWNEY et al. « Comparing the Induced Muscle Fatigue Between Asynchronous and Synchronous Electrical Stimulation in Able-Bodied and Spinal Cord Injured Populations ». In : *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 23.6 (nov. 2015), 964–972. ISSN : 1558-0210. DOI : [10.1109/TNSRE.2014.2364735](https://doi.org/10.1109/TNSRE.2014.2364735).
- [96] Gustavo P. BRAZ, Michael RUSSOLD et Glen M. DAVIS. « Functional Electrical Stimulation Control of Standing and Stepping After Spinal Cord Injury : A Review of Technical Characteristics ». In : *Neuromodulation : Technology at the Neural Interface* 12.3 (2009), p. 180-190. ISSN : 1094-7159. DOI : <https://doi.org/10.1111/j.1525-1403.2009.00213.x>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1094715910600359>.
- [97] Florian KÖLBL et al. « An Embedded Deep Brain Stimulator for Biphasic Chronic Experiments in Freely Moving Rodents ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems* 10.1 (2016), p. 72-84. DOI : [10.1109/TBCAS.2014.2368788](https://doi.org/10.1109/TBCAS.2014.2368788).
- [98] Ricardo SIU et al. « Autonomous control of ventilation through closed-loop adaptive respiratory pacing ». In : *Scientific Reports* 10.1 (déc. 2020), p. 21903. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-020-78834-w](https://doi.org/10.1038/s41598-020-78834-w).
- [99] Amélie DEGACHE. « Spectroscopie d'impédance appliquée au suivi chronique de la fibrose induite par implants cardiaques actifs ». Thèse de doct. Université de Bordeaux, 2019.
- [100] Amélie DEGACHE et al. « In vitro differentiation of human cardiac fibroblasts into myofibroblasts : characterization using electrical impedance ». In : *Biomedical Physics & Engineering Express* 8.5 (2022), p. 055007.
- [101] Florian KOLBL et al. « IC-Based Neuro-Stimulation Environment for Arbitrary Waveform Generation ». In : *Electronics* 10.15 (2021). ISSN : 2079-9292. DOI : [10.3390/electronics10151867](https://doi.org/10.3390/electronics10151867). URL : <https://www.mdpi.com/2079-9292/10/15/1867>.
- [102] Louis REGNACQ et al. « BIMMS : A versatile and portable system for biological tissue and electrode-tissue interface electrical characterization ». In : *HardwareX* 13 (mars 2023), e00387. ISSN : 2468-0672. DOI : [10.1016/j.ohx.2022.e00387](https://doi.org/10.1016/j.ohx.2022.e00387).
- [103] Jane A. KENT-BRAUN, Robert H. FITTS et Anita CHRISTIE. « Skeletal Muscle Fatigue ». In : *Comprehensive Physiology*. Sous la dir. de Ronald TERJUNG. John Wiley & Sons, Inc., avr. 2012, p. c110029. ISBN : 978-0-470-65071-4. DOI : [10.1002/cphy.c110029](https://doi.org/10.1002/cphy.c110029). URL : <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c110029>.
- [104] Richard HT EDWARDS. « Human muscle function and fatigue ». In : *Human muscle fatigue : physiological mechanisms* 82 (1981), p. 1-18.
- [105] B. BIGLAND-RITCHIE et J. J. WOODS. « Changes in muscle contractile properties and neural control during human muscular fatigue ». In : *Muscle & Nerve* 7.9 (déc. 1984), 691–699. ISSN : 0148-639X, 1097-4598. DOI : [10.1002/mus.880070902](https://doi.org/10.1002/mus.880070902).
- [106] ROGER M ENOKA et Douglas G STUART. « Neurobiology of muscle fatigue ». In : *Journal of applied physiology* 72.5 (1992), p. 1631-1648.

- [107] D. G. ALLEN, G. D. LAMB et H. WESTERBLAD. « Skeletal Muscle Fatigue : Cellular Mechanisms ». In : *Physiological Reviews* 88.1 (2008). PMID : 18195089, p. 287-332. DOI : [10.1152/physrev.00015.2007](https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007). eprint : <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007>. URL : <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007>.
- [108] Roger M ENOKA et Jacques DUCHATEAU. « Translating fatigue to human performance ». In : *Medicine and science in sports and exercise* 48.11 (2016), p. 2228.
- [109] JANET L. TAYLOR et al. « Neural Contributions to Muscle Fatigue : From the Brain to the Muscle and Back Again ». In : *Medicine & Science in Sports & Exercise* 48.11 (2016). ISSN : 0195-9131. URL : [https://journals.lww.com/acsm-msse/Fulltext/2016/11000/Neural\\_Contributions\\_to\\_Muscle\\_Fatigue\\_From\\_the.27.aspx](https://journals.lww.com/acsm-msse/Fulltext/2016/11000/Neural_Contributions_to_Muscle_Fatigue_From_the.27.aspx).
- [110] S. BOYAS et A. GUÉVEL. « Neuromuscular fatigue in healthy muscle : Underlying factors and adaptation mechanisms ». In : *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 54.2 (mars 2011), 88–108. ISSN : 1877-0657. DOI : [10.1016/j.rehab.2011.01.001](https://doi.org/10.1016/j.rehab.2011.01.001).
- [111] Nicolas PLACE et al. « Muscle fatigue : from observations in humans to underlying mechanisms studied in intact single muscle fibres ». In : *European Journal of Applied Physiology* 110.1 (sept. 2010), 1–15. ISSN : 1439-6327. DOI : [10.1007/s00421-010-1480-0](https://doi.org/10.1007/s00421-010-1480-0).
- [112] DE RASSIER et BR MACINTOSH. « Coexistence of potentiation and fatigue in skeletal muscle ». In : *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33 (2000), p. 499-508.
- [113] CK KIM et al. « Metabolic response and muscle glycogen depletion pattern during prolonged electrically induced dynamic exercise in man ». eng. In : *Scand J Rehabil Med* 27.1 (mars 1995), 51–58. ISSN : 0036-5505.
- [114] Jean THEUREL et al. « Differences in cardiorespiratory and neuromuscular responses between voluntary and stimulated contractions of the quadriceps femoris muscle ». en. In : *Respiratory Physiology & Neurobiology* 157.2–3 (août 2007), 341–347. ISSN : 15699048. DOI : [10.1016/j.resp.2006.12.002](https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.12.002).
- [115] M. VANDERTHOMMEN et al. « A comparison of voluntary and electrically induced contractions by interleaved 1 H- and 31 P-NMRS in humans ». en. In : *Journal of Applied Physiology* 94.3 (mars 2003), 1012–1024. ISSN : 8750-7587, 1522-1601. DOI : [10.1152/jappphysiol.00887.2001](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00887.2001).
- [116] Taku HAMADA et al. « Electrical stimulation of human lower extremities enhances energy consumption, carbohydrate oxidation, and whole body glucose uptake ». en. In : *Journal of Applied Physiology* 96.3 (mars 2004), 911–916. ISSN : 8750-7587, 1522-1601. DOI : [10.1152/jappphysiol.00664.2003](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00664.2003).
- [117] Maria PAPAORDANIDOU, David GUIRAUD et Alain VARRAY. « Kinetics of neuromuscular changes during low-frequency electrical stimulation ». In : *Muscle & Nerve : Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine* 41.1 (2010), p. 54-62.
- [118] Maria PAPAORDANIDOU, David GUIRAUD et Alain VARRAY. « Does central fatigue exist under low-frequency stimulation of a low fatigue-resistant muscle ? » In : *European journal of applied physiology* 110.4 (2010), p. 815-823.

- [119] Jane E. BUTLER et Christine K. THOMAS. « Effects of sustained stimulation on the excitability of motoneurons innervating paralyzed and control muscles ». In : *Journal of Applied Physiology* 94.2 (fév. 2003), 567–575. ISSN : 8750-7587. DOI : [10.1152/japplphysiol.01176.2001](https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01176.2001).
- [120] Maria PAPAIOORDANIDOU et al. « Neural and muscular mechanisms of electrically induced fatigue in patients with spinal cord injury ». In : *Spinal Cord* 52.3 (2014), p. 246-250.
- [121] J MIZRAHI et al. « EMG as an indicator of fatigue in isometrically FES-activated paralyzed muscles ». In : *IEEE Transactions on Rehabilitation Engineering* 2.2 (1994), p. 57-65.
- [122] Michael BEHRINGER et al. « Effects of stimulation frequency, amplitude, and impulse width on muscle fatigue ». In : *Muscle & nerve* 53.4 (2016), p. 608-616.
- [123] Ashraf S. GORGEY et al. « Effects of Electrical Stimulation Parameters on Fatigue in Skeletal Muscle ». In : *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy* 39.9 (2009). PMID : 19721215, p. 684-692. DOI : [10.2519/jospt.2009.3045](https://doi.org/10.2519/jospt.2009.3045). eprint : <https://doi.org/10.2519/jospt.2009.3045>. URL : <https://doi.org/10.2519/jospt.2009.3045>.
- [124] Monique BADIÉ et al. « M-wave changes after high-and low-frequency electrically induced fatigue in different muscles ». In : *Muscle & Nerve : Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine* 22.4 (1999), p. 488-496.
- [125] Jean-Luc DARQUES et al. « Combined in situ analysis of metabolic and myoelectrical changes associated with electrically induced fatigue ». In : *Journal of Applied Physiology* 95.4 (2003), p. 1476-1484.
- [126] E ISAKOV, J MIZRAHI, T NAJENSON et al. « Biomechanical and physiological evaluation of FES-activated paraplegic patients ». In : *J Rehabil Res Dev* 23.3 (1986), p. 9-19.
- [127] Gisela SJØGAARD, Gabrielle SAVARD et Carsten JUEL. « Muscle blood flow during isometric activity and its relation to muscle fatigue ». In : *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 57.3 (mai 1988), 327–335. ISSN : 1439-6327. DOI : [10.1007/BF00635992](https://doi.org/10.1007/BF00635992).
- [128] Yiran YANG et Wei GAO. « Wearable and flexible electronics for continuous molecular monitoring ». In : *Chemical Society Reviews* 48.6 (2019), p. 1465-1491.
- [129] Josef FINSTERER. « Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise ». In : *BMC Musculoskeletal Disorders* 13.1 (nov. 2012), p. 218. ISSN : 1471-2474. DOI : [10.1186/1471-2474-13-218](https://doi.org/10.1186/1471-2474-13-218).
- [130] Minoru SHINOHARA et Karen SØGAARD. « Mechanomyography for studying force fluctuations and muscle fatigue ». In : *Exercise and sport sciences reviews* 34.2 (2006), p. 59-64.
- [131] Massimiliano GOBBO et al. « Torque and surface mechanomyogram parallel reduction during fatiguing stimulation in human muscles ». In : *European journal of applied physiology* 97.1 (2006), p. 9-15.
- [132] Thomas SCHAUER. « Sensing motion and muscle activity for feedback control of functional electrical stimulation : Ten years of experience in Berlin ». In : *Annual Reviews in Control* 44 (2017), p. 355-374. ISSN : 1367-5788. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.arcontrol.2017.09.014>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367578817301141>.

- [133] Roberto MERLETTI et Dario FARINA. *Surface electromyography : physiology, engineering, and applications*. John Wiley & Sons, 2016.
- [134] Hayder A. YOUSIF et al. « Assessment of Muscles Fatigue Based on Surface EMG Signals Using Machine Learning and Statistical Approaches : A Review ». In : *IOP Conference Series : Materials Science and Engineering* 705.1 (nov. 2019), p. 012010. ISSN : 1757-899X. DOI : [10.1088/1757-899X/705/1/012010](https://doi.org/10.1088/1757-899X/705/1/012010).
- [135] Mario CIFREK et al. « Surface EMG based muscle fatigue evaluation in biomechanics ». en. In : *Clinical Biomechanics* 24.4 (mai 2009), 327–340. ISSN : 02680033. DOI : [10.1016/j.clinbiomech.2009.01.010](https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2009.01.010).
- [136] Raphael UWAMAHORO, Kenneth SUNDARAJ et Indra Devi SUBRAMANIAM. « Assessment of muscle activity using electrical stimulation and mechanomyography : a systematic review ». In : *BioMedical Engineering OnLine* 20.1 (jan. 2021), p. 1. ISSN : 1475-925X. DOI : [10.1186/s12938-020-00840-w](https://doi.org/10.1186/s12938-020-00840-w).
- [137] Qin ZHANG et al. « FES-Induced Torque Prediction With Evoked EMG Sensing for Muscle Fatigue Tracking ». In : *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics* 16.5 (2011), p. 816-826. DOI : [10.1109/TMECH.2011.2160809](https://doi.org/10.1109/TMECH.2011.2160809).
- [138] Sverre GRIMNES et Ørjan Grøttem MARTINSEN. *Bioimpedance and bioelectricity basics*. 2nd ed. Academic Press, 2008. ISBN : 978-0-12-374004-5.
- [139] Jan PICÁLEK et Jiří KOLAFA. « Molecular dynamics study of conductivity of ionic liquids : The Kohlrausch law ». In : *Journal of Molecular Liquids* 134.1 (2007). EMLG/JMLG 2005 Special Issue, p. 29-33. ISSN : 0167-7322. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2006.12.015>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732206003278>.
- [140] Herman P SCHWAN. « Electrical properties of tissue and cell suspensions ». In : *Advances in biological and medical physics*. T. 5. Elsevier, 1957, p. 147-209.
- [141] Shiro TAKASHIMA. « Passive electrical properties and voltage dependent membrane capacitance of single skeletal muscle fibers ». In : *Pflügers Archiv* 403.2 (1985), p. 197-204.
- [142] Herman P SCHWAN. « Electrical properties of tissues and cell suspensions : mechanisms and models ». In : *Proceedings of 16th annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology society*. T. 1. IEEE, 1994, A70-A71.
- [143] Camelia GABRIEL, Sami GABRIEL et YE CORTHOUT. « The dielectric properties of biological tissues : I. Literature survey ». In : *Physics in medicine & biology* 41.11 (1996), p. 2231.
- [144] R AARON, M HUANG et C A SHIFFMAN. « Anisotropy of human muscle via non-invasive impedance measurements ». en. In : *Physics in Medicine and Biology* 42.7 (juill. 1997), 1245–1262. ISSN : 0031-9155, 1361-6560. DOI : [10.1088/0031-9155/42/7/002](https://doi.org/10.1088/0031-9155/42/7/002).
- [145] B. R. EPSTEIN et K. R. FOSTER. « Anisotropy in the dielectric properties of skeletal muscle ». In : *Medical and Biological Engineering and Computing* 21.1 (jan. 1983), 51–55. ISSN : 1741-0444. DOI : [10.1007/BF02446406](https://doi.org/10.1007/BF02446406).
- [146] Sami GABRIEL, RW LAU et Camelia GABRIEL. « The dielectric properties of biological tissues : II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz ». In : *Physics in medicine & biology* 41.11 (1996), p. 2251.

- [147] Sami GABRIEL, RW LAU et Camelia GABRIEL. « The dielectric properties of biological tissues : III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues ». In : *Physics in medicine & biology* 41.11 (1996), p. 2271.
- [148] Hugo FRICKE et Sterne MORSE. « The electric resistance and capacity of blood for frequencies between 800 and 41/2 million cycles ». In : *The Journal of general physiology* 9.2 (1925), p. 153.
- [149] Kenneth S COLE. *Membranes, ions and impulses : a chapter of classical biophysics*. T. 1. Univ of California Press, 1972.
- [150] Kenneth S COLE. « Electric phase angle of cell membranes ». In : *The Journal of general physiology* 15.6 (1932), p. 641.
- [151] ET MCADAMS et J JOSSINET. « Tissue impedance : a historical overview ». In : *Physiological measurement* 16.3A (1995), A1.
- [152] Kenneth S COLE. « Permeability and impermeability of cell membranes for ions ». In : *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. T. 8. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1940, p. 110-122.
- [153] Allen J. BARD et Larry R. FAULKNER. *Electrochemical methods : fundamentals and applications*. en. 2nd ed. New York : Wiley, 2001. ISBN : 978-0-471-04372-0.
- [154] Paul Ben ISHAI et al. « Electrode polarization in dielectric measurements : a review ». In : *Measurement Science and Technology* 24.10 (oct. 2013), p. 102001. ISSN : 0957-0233, 1361-6501. DOI : [10.1088/0957-0233/24/10/102001](https://doi.org/10.1088/0957-0233/24/10/102001).
- [155] HP SCHWAN. « Electrode polarization impedance and measurements in biological materials ». In : *Annals of the New York Academy of Sciences* 148.1 (1968), p. 191-209.
- [156] E.T. MCADAMS et al. « The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 10.1 (1995), p. 67-74. ISSN : 0956-5663. DOI : [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(95\)96795-Z](https://doi.org/10.1016/0956-5663(95)96795-Z). URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656639596795Z>.
- [157] Sami F. KHALIL, Mas S. MOHKTAR et Fatimah IBRAHIM. « The Theory and Fundamentals of Bioimpedance Analysis in Clinical Status Monitoring and Diagnosis of Diseases ». In : *Sensors* 14.6 (2014), 10895–10928. ISSN : 1424-8220. DOI : [10.3390/s140610895](https://doi.org/10.3390/s140610895).
- [158] Fabien SOULIER et al. « A multitone analysis for bioimpedance spectroscopy using minimal digital ressource ». In : *2018 12th International Conference on Sensing Technology (ICST)*. IEEE. 2018, p. 315-318.
- [159] B SANCHEZ et al. « Basics of broadband impedance spectroscopy measurements using periodic excitations ». In : *Measurement Science and Technology* 23.10 (août 2012), p. 105501. ISSN : 0957-0233. DOI : [10.1088/0957-0233/23/10/105501](https://doi.org/10.1088/0957-0233/23/10/105501).
- [160] Achraf LAMLIH et al. « A hybrid bioimpedance spectroscopy architecture for a wide frequency exploration of tissue electrical properties ». In : *2018 IFIP/IEEE International Conference on Very Large Scale Integration (VLSI-SoC)*. IEEE. 2018, p. 168-171.
- [161] Sverre GRIMNES et Ørjan G MARTINSEN. « Sources of error in tetrapolar impedance measurements on biomaterials and other ionic conductors ». In : *Journal of Physics D : Applied Physics* 40.1 (2006), p. 9.

- [162] Benjamin SANCHEZ et Seward B. RUTKOVE. « Electrical Impedance Myography and Its Applications in Neuromuscular Disorders ». In : *Neurotherapeutics* 14.1 (jan. 2017), 107–118. ISSN : 1933-7213, 1878-7479. DOI : [10.1007/s13311-016-0491-x](https://doi.org/10.1007/s13311-016-0491-x).
- [163] L NESCOLARDE et al. « Effects of muscle injury severity on localized bioimpedance measurements ». In : *Physiological measurement* 36.1 (2014), p. 27.
- [164] Yosuke YAMADA et al. « Electrical Properties Assessed by Bioelectrical Impedance Spectroscopy as Biomarkers of Age-related Loss of Skeletal Muscle Quantity and Quality ». In : *The Journals of Gerontology : Series A* 72.9 (nov. 2016), 1180–1186. ISSN : 1079-5006. DOI : [10.1093/gerona/glw225](https://doi.org/10.1093/gerona/glw225).
- [165] A. ADLER et A. BOYLE. « Electrical Impedance Tomography : Tissue Properties to Image Measures ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 64.11 (nov. 2017), 2494–2504. ISSN : 1558-2531. DOI : [10.1109/TBME.2017.2728323](https://doi.org/10.1109/TBME.2017.2728323).
- [166] Charles R KEESE et Ivar GIAEVER. « A biosensor that monitors cell morphology with electrical fields ». In : *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 13.3 (1994), p. 402-408.
- [167] Ebru URCAN et al. « Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts ». In : *Dental Materials* 26.1 (2010), 51–58. ISSN : 0109-5641. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.08.007>.
- [168] Alexandre JOUSHOMME et al. « Label-Free Study of the Global Cell Behavior during Exposure to Environmental Radiofrequency Fields in the Presence or Absence of Pro-Apoptotic or Pro-Autophagic Treatments ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 23.2 (2022). ISSN : 1422-0067. DOI : [10.3390/ijms23020658](https://doi.org/10.3390/ijms23020658).
- [169] Sergey RAKHILIN et al. « Electrical Impedance as a Novel Biomarker of Myotube Atrophy and Hypertrophy ». In : *Journal of Biomolecular Screening* 16.6 (2011). PMID : 21493966, p. 565-574. DOI : [10.1177/1087057111401392](https://doi.org/10.1177/1087057111401392). eprint : <https://doi.org/10.1177/1087057111401392>. URL : <https://doi.org/10.1177/1087057111401392>.
- [170] Sylvia M. MURPHY et al. « Optimization of an in vitro bioassay to monitor growth and formation of myotubes in real time ». In : *Bioscience Reports* 36.3 (mai 2016). e00330. ISSN : 0144-8463. DOI : [10.1042/BSR20160036](https://doi.org/10.1042/BSR20160036). eprint : <https://portlandpress.com/bioscierep/article-pdf/36/3/e00330/807555/bsr036e330.pdf>. URL : <https://doi.org/10.1042/BSR20160036>.
- [171] Carl A SHIFFMAN, Ronald AARON et Seward B RUTKOVE. « Electrical impedance of muscle during isometric contraction ». In : *Physiological Measurement* 24.1 (2003), p. 213.
- [172] Le LI et al. « Localized electrical impedance myography of the biceps brachii muscle during different levels of isometric contraction and fatigue ». In : *Sensors* 16.4 (2016), p. 581.
- [173] Bo FU et Todd J FREEBORN. « Biceps tissue bioimpedance changes from isotonic exercise-induced fatigue at different intensities ». In : *Biomedical Physics & Engineering Express* 4.2 (2018), p. 025037.
- [174] Todd J FREEBORN et Bo FU. « Time-course bicep tissue bio-impedance changes throughout a fatiguing exercise protocol ». In : *Medical engineering & physics* 69 (2019), p. 109-115.

- [175] Benjamin SANCHEZ et al. « Impedance alterations in healthy and diseased mice during electrically induced muscle contraction ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 63.8 (2014), p. 1602-1612.
- [176] ABB COUTINHO et al. « Invasive electrical impedance myography at different levels of contraction of gastrocnemius muscle of rat ». In : *Review of Scientific Instruments* 91.8 (2020), p. 084103.
- [177] Todd J FREEBORN, Gabriella REGARD et Bo FU. « Localized bicep tissue bioimpedance alterations following eccentric exercise in healthy young adults ». In : *IEEE Access* 8 (2020), p. 23100-23109.
- [178] Alastair KHODABUKUS et al. « In Vitro Tissue-Engineered Skeletal Muscle Models for Studying Muscle Physiology and Disease ». In : *Advanced Healthcare Materials* 7.15 (2018), p. 1701498. DOI : <https://doi.org/10.1002/adhm.201701498>. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/adhm.201701498>. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adhm.201701498>.
- [179] Steven CARTER et Thomas P. J. SOLOMON. « In vitro experimental models for examining the skeletal muscle cell biology of exercise : the possibilities, challenges and future developments ». en. In : *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 471.3 (mars 2019), 413–429. ISSN : 0031-6768, 1432-2013. DOI : [10.1007/s00424-018-2210-4](https://doi.org/10.1007/s00424-018-2210-4).
- [180] Nataša NIKOLIĆ et al. « Electrical Pulse Stimulation of Cultured Human Skeletal Muscle Cells as an In Vitro Model of Exercise ». In : *PLOS ONE* 7.3 (mars 2012), p. 1-10. DOI : [10.1371/journal.pone.0033203](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033203). URL : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033203>.
- [181] Simeon P CAIRNS et al. « Evaluation of models used to study neuromuscular fatigue ». In : *Exercise and sport sciences reviews* 33.1 (2005), p. 9-16.
- [182] Yasuko MANABE et al. « Characterization of an Acute Muscle Contraction Model Using Cultured C2C12 Myotubes ». In : *PLoS ONE* 7.12 (déc. 2012). Sous la dir. d'Harpal Singh RANDEVA, e52592. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0052592](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052592).
- [183] N. NIKOLIĆ et al. « Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for in vitro exercise – possibilities and limitations ». In : *Acta Physiologica* 220.3 (2017), p. 310-331. DOI : <https://doi.org/10.1111/apha.12830>. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/apha.12830>. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apha.12830>.
- [184] Marc H. M. THELEN, Warner S. SIMONIDES et Cornelis van HARDEVELD. « Electrical stimulation of C2C12 myotubes induces contractions and represses thyroid-hormone-dependent transcription of the fast-type sarcoplasmic-reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene ». In : *Biochemical Journal* 321.3 (fév. 1997), p. 845-848. ISSN : 0264-6021. DOI : [10.1042/bj3210845](https://doi.org/10.1042/bj3210845). eprint : <https://portlandpress.com/biochemj/article-pdf/321/3/845/623633/bj3210845.pdf>. URL : <https://doi.org/10.1042/bj3210845>.
- [185] Ahmed M ABDELMOEZ et al. « Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism ». In : *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 318.3 (2020), p. C615-C626.

- [186] Taku NEDACHI, Hideaki FUJITA et Makoto KANZAKI. « Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle ». In : *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295.5 (nov. 2008), E1191–E1204. ISSN : 0193-1849, 1522-1555. DOI : [10.1152/ajpendo.90280.2008](https://doi.org/10.1152/ajpendo.90280.2008).
- [187] Nathalie BURCH et al. « Electric Pulse Stimulation of Cultured Murine Muscle Cells Reproduces Gene Expression Changes of Trained Mouse Muscle ». In : *PLOS ONE* 5.6 (juin 2010), p. 1-11. DOI : [10.1371/journal.pone.0010970](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010970). URL : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010970>.
- [188] Alastair KHODABUKUS et al. « Electrical stimulation increases hypertrophy and metabolic flux in tissue-engineered human skeletal muscle ». In : *Biomaterials* 198 (2019), p. 259-269.
- [189] Yuki TAMURA et al. « Electrically stimulated contractile activity-induced transcriptomic responses and metabolic remodeling in C2C12 myotubes : twitch vs. tetanic contractions ». In : *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 319.6 (2020), p. C1029-C1044.
- [190] SABRINA BURATTINI et al. « C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development : morpho-functional characterization ». In : *European Journal of Histochemistry* 48.3 (2004), p. 223-234.
- [191] Christopher G. LANGHAMMER et al. « Skeletal myotube integration with planar microelectrode arrays in vitro for spatially selective recording and stimulation : A comparison of neuronal and myotube extracellular action potentials ». In : *Biotechnology Progress* 27.3 (2011), p. 891-895. DOI : <https://doi.org/10.1002/btpr.609>. eprint : <https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/btpr.609>. URL : <https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.609>.
- [192] Micha E. SPIRA et Aviad HAI. « Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology ». In : *Nature Nanotechnology* 8.2 (fév. 2013), 83–94. ISSN : 1748-3395. DOI : [10.1038/nnano.2012.265](https://doi.org/10.1038/nnano.2012.265).
- [193] Marie Engeline J. OBIEN et al. « Revealing neuronal function through microelectrode array recordings ». In : *Frontiers in Neuroscience* 8 (2015), p. 423. ISSN : 1662-453X. DOI : [10.3389/fnins.2014.00423](https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00423).
- [194] Mario MAROTTA, Ramón BRAGÓS et Anna M. GÓMEZ-FOIX. « Design and performance of an electrical stimulator for long-term contraction of cultured muscle cells ». en. In : *BioTechniques* 36.1 (jan. 2004), 68–73. ISSN : 0736-6205, 1940-9818. DOI : [10.2144/04361ST01](https://doi.org/10.2144/04361ST01).
- [195] Samad AHADIAN et al. « Interdigitated array of Pt electrodes for electrical stimulation and engineering of aligned muscle tissue ». In : *Lab on a Chip* 12.18 (2012), p. 3491-3503.
- [196] Hideaki FUJITA, Taku NEDACHI et Makoto KANZAKI. « Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes ». In : *Experimental Cell Research* 313.9 (2007), p. 1853-1865. ISSN : 0014-4827. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.002>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482707001061>.
- [197] Ken-ichi YAMASAKI et al. « Control of myotube contraction using electrical pulse stimulation for bio-actuator ». In : *Journal of Artificial Organs* 12.2 (2009), p. 131-137.

- [198] Vijay VISWAM et al. « Impedance Spectroscopy and Electrophysiological Imaging of Cells With a High-Density CMOS Microelectrode Array System ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems* 12.6 (2018), p. 1356-1368. DOI : [10.1109/TBCAS.2018.2881044](https://doi.org/10.1109/TBCAS.2018.2881044).
- [199] Achraf LAMLIH. « Design of an Integrated Bioimpedance Measurement System for Chronic Monitoring of Biological Tissue Composition ». Thèse de doct. Université Montpellier, 2018.
- [200] Peter MOLNAR et al. « Photolithographic Patterning of C2C12 Myotubes using Vitronectin as Growth Substrate in Serum-Free Medium ». In : *Biotechnology Progress* 23.1 (2007), p. 265-268. DOI : <https://doi.org/10.1021/bp060302q>. eprint : <https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1021/bp060302q>. URL : <https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1021/bp060302q>.
- [201] Michael GABI et al. « Influence of applied currents on the viability of cells close to microelectrodes ». In : *Integrative Biology* 1.1 (nov. 2008), p. 108-115. ISSN : 1757-9708. DOI : [10.1039/b814237h](https://doi.org/10.1039/b814237h). eprint : <https://academic.oup.com/ib/article-pdf/1/1/108/27327041/b814237h.pdf>. URL : <https://doi.org/10.1039/b814237h>.
- [202] Marta K. LEWANDOWSKA et al. « Long-Term High-Density Extracellular Recordings Enable Studies of Muscle Cell Physiology ». In : *Frontiers in Physiology* 9 (2018). ISSN : 1664-042X. DOI : [10.3389/fphys.2018.01424](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01424). URL : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01424>.
- [203] Ilhwan PARK et al. « Electrical Impedance Monitoring of C2C12 Myoblast Differentiation on an Indium Tin Oxide Electrode ». In : *Sensors* 16.12 (2016). ISSN : 1424-8220. DOI : [10.3390/s16122068](https://doi.org/10.3390/s16122068). URL : <https://www.mdpi.com/1424-8220/16/12/2068>.
- [204] Giuseppe SCHIAVONE et al. « Guidelines to Study and Develop Soft Electrode Systems for Neural Stimulation ». In : *Neuron* 108.2 (2020), p. 238-258. ISSN : 0896-6273. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.10.010>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627320308060>.
- [205] Arthur Luiz Alves de ARAUJO et al. « Influence of Electrode Connection Tracks on Biological Cell Measurements by Impedance Spectroscopy ». In : *Sensors* 19.13 (2019). ISSN : 1424-8220. DOI : [10.3390/s19132839](https://doi.org/10.3390/s19132839). URL : <https://www.mdpi.com/1424-8220/19/13/2839>.
- [206] Camila VESGA-CASTRO et al. « Contractile force assessment methods for in vitro skeletal muscle tissues ». In : *eLife* 11 (mai 2022). Sous la dir. de Christopher L-H HUANG et Mone ZAIDI, e77204. ISSN : 2050-084X. DOI : [10.7554/eLife.77204](https://doi.org/10.7554/eLife.77204).
- [207] Hideaki FUJITA, Kazunori SHIMIZU et Eiji NAGAMORI. « Novel method for measuring active tension generation by C2C12 myotube using UV-crosslinked collagen film ». In : *Biotechnology and Bioengineering* 106.3 (2010), p. 482-489. DOI : <https://doi.org/10.1002/bit.22705>. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.22705>. URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.22705>.

- [208] Marc P. WOLF, Georgette B. SALIEB-BEUGELAAR et Patrick HUNZIKER. « PDMS with designer functionalities—Properties, modifications strategies, and applications ». In : *Progress in Polymer Science* 83 (2018), p. 97-134. ISSN : 0079-6700. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.06.001>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670017300783>.
- [209] Onur AYDIN et al. « Development of 3D neuromuscular bioactuators ». In : *APL Bioengineering* 4.1 (2020), p. 016107. DOI : [10.1063/1.5134477](https://doi.org/10.1063/1.5134477). eprint : <https://doi.org/10.1063/1.5134477>. URL : <https://doi.org/10.1063/1.5134477>.
- [210] AST SMITH et al. « A multiplexed chip-based assay system for investigating the functional development of human skeletal myotubes in vitro ». In : *Journal of biotechnology* 185 (2014), p. 15-18.
- [211] Ava M OBENAU, Molly Y MOLLICA et Nathan J SNIADOCKI. « (De) form and function : measuring cellular forces with deformable materials and deformable structures ». In : *Advanced healthcare materials* 9.8 (2020), p. 1901454.
- [212] Elizabeth A COLN et al. « Piezoelectric bioMEMS cantilever for measurement of muscle contraction and for actuation of mechanosensitive cells ». In : *MRS communications* 9.4 (2019), p. 1186-1192.
- [213] Noha RABIEH et al. « On-chip, multisite extracellular and intracellular recordings from primary cultured skeletal myotubes ». In : *Scientific Reports* 6.1 (jan. 2016), p. 36498. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/srep36498](https://doi.org/10.1038/srep36498).
- [214] Pauline DUC et al. « Human neuromuscular junction on micro-structured microfluidic devices implemented with a custom micro electrode array (MEA) ». In : *Lab Chip* 21.21 (2021), 4223–4236. DOI : [10.1039/D1LC00497B](https://doi.org/10.1039/D1LC00497B).
- [215] Luca SALA et al. « MUSCLEMOTION : A Versatile Open Software Tool to Quantify Cardiomyocyte and Cardiac Muscle Contraction In Vitro and In Vivo ». en. In : *Circulation Research* 122.3 (fév. 2018). ISSN : 0009-7330, 1524-4571. DOI : [10.1161/CIRCRESAHA.117.312067](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312067). URL : <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.117.312067>.
- [216] Tilman GRUNE et al. « The “MYOCYTER” – Convert cellular and cardiac contractions into numbers with ImageJ ». en. In : *Scientific Reports* 9.1 (déc. 2019), p. 15112. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-019-51676-x](https://doi.org/10.1038/s41598-019-51676-x).
- [217] Antoine PIROG et al. « Multimed : An integrated, multi-application platform for the real-time recording and sub-millisecond processing of biosignals ». In : *Sensors* 18.7 (2018), p. 2099.
- [218] Alexia BAILLEUL et al. « In vitro impedance spectroscopy : A MEA-based measurement bench for myoblasts cultures monitoring ». In : *2021 XXXVI Conference on Design of Circuits and Integrated Systems (DCIS)*. IEEE. 2021, p. 1-6.
- [219] Alexia BAILLEUL et al. « Bioimpedance Spectroscopy Helps Monitor the Impact of Electrical Stimulation on Muscle Cells ». In : *IEEE Access* 10 (2022), p. 131430-131441. DOI : [10.1109/ACCESS.2022.3228479](https://doi.org/10.1109/ACCESS.2022.3228479).
- [220] Hideaki FUJITA et al. « Rapid decrease in active tension generated by C2C12 myotubes after termination of artificial exercise ». In : *Journal of muscle research and cell motility* 31.4 (2010), p. 279-288.

- [221] Zacharias ORFANOS et al. « Breaking sarcomeres by in vitro exercise ». In : *Scientific Reports* 6 (2016).
- [222] Adam J ENGLER et al. « Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness : pathological implications for soft or stiff microenvironments ». In : *The Journal of cell biology* 166.6 (2004), p. 877-887.
- [223] Christopher G. LANGHAMMER et al. « A Topographically Modified Substrate-Embedded MEA for Directed Myotube Formation at Electrode Contact Sites ». In : *Annals of Biomedical Engineering* 41.2 (fév. 2013), 408–420. ISSN : 1573-9686. DOI : [10.1007/s10439-012-0647-8](https://doi.org/10.1007/s10439-012-0647-8).
- [224] Piyush BAJAJ et al. « Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts ». In : *Integrative Biology* 3.9 (2011), p. 897-909.
- [225] Norbert HERENC SAR. « An Empirical Study of Fatigue-Induced Electrical Impedance Models of Biceps Tissues ». In : *2020 12th International Congress on Ultra Modern Telecommunications and Control Systems and Workshops (ICUMT)*. 2020, p. 58-61. DOI : [10.1109/ICUMT51630.2020.9222426](https://doi.org/10.1109/ICUMT51630.2020.9222426).
- [226] Todd J. FREEBORN et Bo FU. « Fatigue-Induced Cole Electrical Impedance Model Changes of Biceps Tissue Bioimpedance ». In : *Fractal and Fractional* 2.4 (2018). ISSN : 2504-3110. DOI : [10.3390/fractalfract2040027](https://doi.org/10.3390/fractalfract2040027).
- [227] Alexandre RAMADE et al. « Microfabrication of a platform to measure and manipulate the mechanics of engineered microtissues ». In : *Methods in cell biology*. T. 121. Elsevier, 2014, p. 191-211.
- [228] Kazunori SHIMIZU et al. « Three-dimensional culture model of skeletal muscle tissue with atrophy induced by dexamethasone ». In : *Bioengineering* 4.2 (2017), p. 56.
- [229] Mahmut Selman SAKAR et al. « Formation and optogenetic control of engineered 3D skeletal muscle bioactuators ». In : *Lab on a Chip* 12.23 (2012), p. 4976-4985.
- [230] Alessandro IULIANO et al. « Coupling 3D printing and novel replica molding for in house fabrication of skeletal muscle tissue engineering devices ». In : *Advanced Materials Technologies* 5.9 (2020), p. 2000344.



## Stimulation bioélectrique à retour objectif

### Résumé :

Les accidents vasculaires cérébraux et les lésions de la moelle épinière sont les deux principales causes de paralysie. Une récupération complète des fonctions motrices n'est pas possible à l'heure actuelle, mais un rétablissement partiel de ces fonctions peut être atteint grâce à la stimulation électrique : cette approche permet déjà une amélioration de la qualité de vie de patients en leur rendant une certaine indépendance. La stimulation électrique consiste à exciter des tissus biologiques à l'aide d'un courant électrique pour activer une réponse physiologique ou motrice. Plus particulièrement, la stimulation électrique fonctionnelle se concentre sur les troubles neuromusculaires et vise à restaurer la motricité. Cependant, les implants présentent encore des limites qui empêchent leur utilisation chronique.

La stimulation électrique ne recrée pas fidèlement le fonctionnement du système neuromusculaire : en particulier, elle ne respecte pas l'ordre de recrutement naturel des fibres musculaires et active d'abord les plus larges et les plus fatigables, aboutissant à une fatigue musculaire prématurée. Actuellement, la majorité des systèmes de stimulation fonctionne en boucle ouverte, c'est-à-dire que les paramètres de stimulation sont pré-programmés et ne s'adaptent pas automatiquement à l'état physiologique des tissus stimulés, soit de leur fatigue. Ce type de fonctionnement non-adaptatif limite l'efficacité du système et son utilisation à long terme. De ce constat émerge le besoin d'un contrôle en boucle fermée, qui nécessite un retour objectif permettant d'évaluer l'efficacité de la stimulation et d'ajuster ses paramètres en fonction de la fatigue musculaire. Comme phénomène complexe, multifactoriel et dynamique, la fatigue se traduit par diverses altérations physiologiques, métaboliques, mécaniques et électriques. Celles-ci affectent alors les propriétés électriques passives des tissus (conductivité, permittivité), qui peuvent être évaluées par une mesure de bioimpédance.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est alors d'étudier la pertinence de la bioimpédance comme marqueur objectif de la fatigue musculaire. Pour cela, un premier axe détaille la conception d'un banc de test spécifique reposant sur l'utilisation d'un modèle biologique de muscle squelettique *in vitro*. Ensuite, des campagnes expérimentales caractérisent la bioimpédance de ce modèle biologique au cours de divers scénarios d'activité musculaire électriquement induite. Enfin, un dernier axe élargit l'étude à un modèle 3D plus proche de l'*in vivo*.

**Mots-clés :** Stimulation électrique, Bioimpédance, MEA, *In vitro*, Fatigue musculaire, Muscle squelettique

---

## Bioelectrical stimulation with objective feedback

### Abstract:

Cerebrovascular accidents and spinal cord injuries are the leading cause of paralysis. While full restoration of motor functions is yet unattainable, partial recovery is made possible thanks to electrical stimulation : as of today, this approach is already improving the quality of life of paralyzed patients and restoring partial independence. Electrical stimulation consists in exciting biological tissues with an electrical current to elicit a physiological or a motor response. In particular, functional electrical stimulation focuses on restoring motor function in neuromuscular disorders. However, modern implants still have flaws that limit chronic use.

Electrical stimulation does not faithfully mimic the function of the neuromuscular system : particularly, it does not follow the natural order of recruitment of muscle fibers. Instead, it activates the largest and most-fatigable fibers first, leading to premature muscle fatigue. Currently, most electrical stimulation devices operate in open-loop, meaning their stimulation parameters are preprogrammed and do not adjust with respect to the physiological state of the stimulated tissues (ie. their fatigue). This lack of adaptability greatly hinders the efficacy of the system, as well as its long-term usability. This matter motivates the development of closed-loop controlled systems, that will monitor the efficacy of stimulation and adapt their parameters with respect to muscle fatigue. As a complex, multifactorial, and dynamic phenomenon, muscle fatigue translates to diverse physiological, metabolic, mechanical, and electrical alterations. In turn, these affect the passive electrical properties of muscle tissues (conductivity, permittivity), which can be evaluated through bioimpedance measurements.

In this context, this thesis studies the adequacy of bioimpedance as an objective marker for muscle fatigue. To this end, the current work firstly describes an experimental setup designed for the study of an *in vitro* skeletal muscle cell model. Then, the changes in bioimpedance of said cell model are reported during experimental campaigns that subject them to a variety of electrically-induced muscle activity. Finally, the study is expanded to a 3D cell model, which addresses the limitations of 2D and better transfers to *in vivo* models.

**Keywords:** Electrical stimulation, Bioimpedance, MEA, *In vitro*, Muscle fatigue, Skeletal muscle

---