



HAL
open science

Microspectrométrie d'impédance basses fréquences : application à la mesure de milieux biologiques

Cédric Margo

► **To cite this version:**

Cédric Margo. Microspectrométrie d'impédance basses fréquences : application à la mesure de milieux biologiques. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10051 . tel-01748395

HAL Id: tel-01748395

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748395>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

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

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Microspectrométrie d'impédance basses fréquences : application à la mesure de milieux biologiques

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 8 juillet 2009

pour l'obtention du

Doctorat de l'université Henri Poincaré – Nancy 1

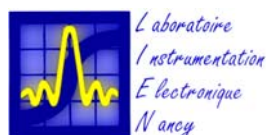
(spécialité Instrumentation et Micro-Électronique)

par

Cédric MARGO

Composition du jury

<i>Président :</i>	M. Marcel GINDRE	Professeur, Université de Cergy-Pontoise
<i>Rapporteurs :</i>	M. Bernard RIGAUD M. Tayeb MOHAMED BRAHIM	Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse 3 Professeur, Université de Rennes 1
<i>Examineurs :</i>	Mme Martine LUMBRERAS M. Amar ROUANE M. Mustapha NADI	Professeure, Université Paul Verlaine, Metz Professeur, Nancy Universités Professeur, Nancy Universités



Remerciements

J'adresse de sincères remerciements à Monsieur Bernard Rigaud, Professeur à l'Université Paul Sabatier, Toulouse 3, ainsi qu'à Monsieur Tayeb Mohammed-Brahim, Professeur à l'université de Rennes 1, qui ont bien voulu juger ce travail en qualités de rapporteurs.

Je remercie également Madame Martine Lumbreras, Professeure à l'université Paul Verlaine de Metz et Monsieur Marcel Gindre, Professeur à l'Université de Cergy-Pontoise, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime mes remerciements à Monsieur Mustapha Nadi, Professeur à Nancy Universités, pour avoir dirigé ces travaux de thèse et pour son soutien dans les bons comme les mauvais moments.

Je tiens également à remercier Monsieur Amar Rouane, Professeur à Nancy Universités, et co-directeur de ma thèse.

Le travail sur la caractérisation des cellules ovocytes de Xénope n'aurait pas été possible sans la contribution et la générosité de Monsieur Stéphane Flament, Professeur au Aspects Cellulaires et Moléculaires de la reproduction et du développement de Nancy Université. A ce titre, je tiens à l'en remercier.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Badredine Assouar, Chargé de recherche CNRS au LPMIA pour son aide et ses conseils concernant les manipulations des microélectrodes.

Pour les manipulations sur les échantillons sanguins, je veux adresser des remerciements aux membres du service UNT du centre de l'Etablissement Français du Sang pour leurs conseils utiles et leur disponibilité.

J'adresse également de sincères remerciements à Melle Marie Hacquard, du Laboratoire Hématologie Biologique, INSERM U681, pour ses efforts de vulgarisation et le temps qu'elle m'a consacré.

Pour ses réalisations techniques et sa bonne humeur tout au long de ces années (sans oublier son expertise martiale!), je tiens également à remercier Patrice Roth, technicien du laboratoire.

D'une manière générale, je veux adresser de vifs remerciements aux nombreux collègues et maintenant amis qui ont contribué à l'ambiance chaleureuse dans laquelle j'ai pu évoluer durant ces années.

Table des matières

Introduction générale	vii
Chapitre 1 Propriétés électriques des milieux biologiques	1
1.1 Introduction	3
1.2 Concepts généraux	4
1.2.1 Comportement diélectrique	5
1.2.2 Comportement conducteur	7
1.2.3 Pertes diélectriques et permittivité complexe	8
1.2.4 Courant de déplacement et conductivité complexe	9
1.2.5 Formulation générale pour un milieu mixte diélectrique conducteur	11
1.2.6 Relaxations diélectriques	13
1.2.7 Impédance électrique	20
1.3 Les milieux biologiques	22
1.3.1 Liquides extra-cellulaires	23
1.3.2 La cellule	23
1.4 Spectre diélectrique caractéristique des tissus biologiques	28
1.4.1 Conductivité	28
1.4.2 Permittivité	29
1.4.3 Dispersion α	29
1.4.4 Dispersion β	29
1.4.5 Dispersion γ	30
1.5 Conclusion	30
Chapitre 2 Microsystèmes de mesure d'impédance : Etat de l'art	33
2.1 Introduction	35
2.2 Microtechnologies associées	35

2.2.1	Technologies " dures " (silicium, verre)	36
2.2.2	Technologies molles (plastiques)	46
2.2.3	Conclusion partielle	50
2.3	Positionnement des cellules biologiques	51
2.3.1	Focalisation hydrodynamique	51
2.3.2	Positionnement par aspiration	52
2.3.3	Lévitiation par cages électromagnétiques	54
2.3.4	Conclusion partielle	55
2.4	L'interface micro-électrodes-cellule biologique	56
2.4.1	Introduction	56
2.4.2	Impédances d'interface métal-milieu	56
2.4.3	Géométrie d'analyse, facteur de cellule	59
2.4.4	Modèle électrique de l'interface électrode-cellule(s)	60
2.5	Exemples de configuration	62
2.5.1	Structures interdigitées	62
2.5.2	ECIS ("Electrode Cell-substrate Impedance Sensing)	64
2.5.3	Structure matricielle	66
2.5.4	Structures capillaires	68
2.6	Conclusion	71

Chapitre 3 Spectroscopie de bio-impédance basses fréquences par électrodes bipolaires ... 73

3.1	Introduction	74
3.2	La chaîne de mesure	75
3.2.1	Les cellules	76
3.2.2	Le dispositif de mesure	77
3.2.3	L'impédancemètre HIOKI-3532	78
3.2.4	Acquisition et traitement des données	79
3.2.5	Modélisation électrique du dispositif de mesure	80
3.3	Resultats et discussion	83
3.3.1	Résultats de simulation	84
3.3.2	Résultats expérimentaux	90
3.4	Conclusion et perspectives	95

Chapitre 4 Microspectrométrie de bioimpédance à configuration tétrapolaire	99
4.1 Introduction	101
4.2 La chaîne de mesure	101
4.2.1 Les électrodes	102
4.2.2 Circuit de conditionnement	104
4.2.3 Acquisition et traitement des données	115
4.3 Validation de la chaîne de mesure	116
4.3.1 Introduction	116
4.3.2 Modélisation électromagnétiques des électrodes	116
4.3.3 Etalonnage du conditionneur électronique	128
4.3.4 Apport de la configuration tétrapolaire	135
4.3.5 Accès à l'échantillon fluide	136
4.3.6 Influence de la température	142
4.3.7 Conclusion	144
4.4 Validation expérimentale du microspectromètre	144
4.4.1 Mesures sur solutions salines calibrées	145
4.4.2 Mesures sur échantillons sanguins	147
4.5 Conclusion	152
Conclusion générale	155
Annexes	159
Annexe A Conduction ionique	159
A.1 Constitution d'une solution ionique	159
A.2 Mobilité ionique	160
A.3 Conductivité ionique	161
Annexe B Paramètres électriques caractéristiques des matériaux - Terminologie	163
Annexe C Principaux mécanismes de relaxations	167
C.1 Relaxation dipolaire	167
C.2 Relaxation d'interface : effet Maxwell-Wagner	168

C.2.1	Modèles de relaxation d'interface pour des suspensions de particules sphériques	170
C.3	Relaxation des contres-ions	173
Annexe D	Spécifications techniques des microélectrodes Abtech	175
Annexe E	RLC-mètre HIOKI 3532 - Résumé des spécifications techniques	179
Bibliographie		185

Introduction générale

Contexte

Les interactions entre les rayonnements non ionisants et la matière biologique font l'objet de nombreux travaux de modélisation expérimentale et théorique. Ces deux objectifs passent par la détermination des propriétés électromagnétiques du milieu de propagation. La connaissance de ces paramètres, permittivité diélectrique et conductivité électrique, est déterminante en dosimétrie électromagnétique ou pour la distribution du champ électrique et/ou magnétique au sein du tissu cible. Les problèmes de santé publique liés à la présence de champs électromagnétiques (dosimétrie, diagnostic ou thérapie) constituent un autre aspect applicatif pour lequel les valeurs diélectriques des tissus biologiques sont nécessaires tant en simulation qu'en expérimentation. Les valeurs des permittivités et conductivité des tissus biologiques aux fréquences d'intérêt restent mal connues. Ces paramètres ne peuvent être mesurés directement et sont obtenus par la mesure de l'impédance du milieu d'investigation (organe, milieu cellulaire). La définition d'une chaîne de mesure sur le vivant se heurte à trois grandes difficultés :

- D'ordres éthique et législatif. La mise en place d'un protocole d'expérimentation humaine s'effectue sous contrainte législative. Les limites d'une expérimentation humaine et les démarches préalables à la mise en place d'un protocole sont fixées par la loi de bioéthique (loi Huriet de 1988 modifiée en 1994). Ainsi, toute mesure in-vivo ou ex-vivo ne peut s'effectuer que suivant un protocole drastique. Nous nous contenterons ici de mesures in vitro ou ex vivo .
- De définition de l'instrumentation. De nombreuses difficultés expérimentales et instrumentales compliquent la mesure des propriétés diélectriques des tissus biologiques. Pour des raisons d'invasivité, les mesures in-vivo ne sont que rarement pos-

sibles et ce point se vérifie en particulier dans le cas de la caractérisation basse fréquence où des électrodes supplémentaires sont nécessaires (mesure à quatre électrodes). Les mesures sur échantillons doivent être accompagnées d'un protocole rigoureux de préparation de ces derniers afin de les altérer le moins possible. Ce dernier point est également nécessaire afin de permettre la comparaison des résultats issus de différentes campagnes de mesures [Nad08].

- D'interprétation des résultats car leur validation est problématique car il n'existe pas d'étalon de bioimpédance sur le vivant. La comparaison avec les résultats issus des travaux antérieurs doit être effectuée avec précaution car ces données sont éparées et souvent sujettes à caution en raison du manque de précisions quant à la validation des chaînes de mesure.

Les problèmes posés relèvent de la métrologie (modélisation des électrodes chaîne d'acquisition, instrumentation fiable s'affranchissant des problèmes de polarisation) ou de la modélisation expérimentale (difficultés d'accès aux grandeurs d'intérêt, problème inverse bioimpédance-paramètres diélectriques, absence de références et difficultés d'étalonnage des sondes et cellules de mesure). Les enjeux scientifiques sont la mise à disposition de la communauté scientifique de bases de données exhaustives et robustes en vue d'applications ou d'études en bio électromagnétisme. Ces données sont nécessaires à l'échelle cellulaire aussi bien qu'à celle des organes. La caractérisation de milieux biologiques tire profit depuis une vingtaine d'années de la méthode de spectroscopie d'impédance. A l'origine la mesure d'impédance d'un milieu biologique visait à déduire leurs propriétés électromagnétiques. Par la suite, plusieurs applications ont pu tirer profit des techniques de caractérisation électrique des tissus biologiques. Citons par exemple la tomographie d'impédance pour l'étude du mouvement respiratoire et cardiaque, ou encore les balances impédancemétriques utilisées pour mesurer le pourcentage de masse grasse d'un individu.

Miniaturisation des techniques de spectroscopie d'impédance

Depuis une dizaine d'années, des méthodes ont été utilisées pour développer des biopuces en vue de caractériser électromagnétiquement les milieux biologiques à l'échelle

cellulaire [MPKN06]. Les analyses biologiques nécessitent de plus en plus d'outils pour manipuler et étudier des cellules isolées. Les mesures à l'échelle cellulaire permettent de négliger les effets d'interactions (entre cellules, avec les constituants des tissus biologiques, etc...) qui existent dans les techniques de caractérisation macroscopique en travaillant sur des cellules isolées ou en faibles population. Ce type de mesures peut constituer une bonne alternative aux méthodes d'analyse traditionnelles chimiques ou optiques utilisées en biologie cellulaire. Cela peut également s'appliquer à l'étude de cellules en culture. Plusieurs applications rapportent des mesures d'impédances sur des réseaux cellulaires cultivés sur des électrodes spécifiques. Différentes phases d'évolution ou les interactions entre elles peuvent être ressenties par une modification de l'impédance de l'électrode de mesure recouverte par les cellules. La spectroscopie d'impédance à l'échelle microscopique peut fournir un outil de tri, d'analyse, de comptage, de discrimination de cellules malades, ou bien encore être utilisée comme une méthode d'analyse des effets de certaines thérapies sur des cellules individuelles ou en culture. Le développement de telles techniques permet déjà une meilleure compréhension des fonctions et de la structure de la cellule. Par exemple, il a été montré que le phénomène d'apoptose(vieillissement programmé des cellules) peut être identifié par une modification de la réponse spectrale de cellules en culture sur des électrodes. Si beaucoup de méthodes développées ne sont encore qu'expérimentales, une technique aujourd'hui bien établie reposant sur la mesure d'impédance est le Coulter Counter dont l'invention remonte à 1948 et qui est reconnue comme la méthode de référence à travers le monde pour la mesure de la taille et le comptage de particules biologiques (spécialement pour les cellules sanguines). Nous avons ainsi orienté notre recherche vers les techniques de caractérisation du vivant à l'échelle microscopique (cellule ou agrégat de cellules). Ce travail de thèse s'inscrit dans cet objectif de miniaturisation des techniques de caractérisation par spectroscopie d'impédance.

Plan de la thèse

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres. Le premier chapitre *Propriétés électriques des milieux biologiques* synthétise les notions fondamentales à connaître sur les propriétés électriques des tissus biologiques. Celles-ci constituent un préalable indispen-

sable pour toute étude visant au développement de techniques de mesure appropriées. Les propriétés diélectriques et conductrices des milieux biologiques ainsi que leur dépendance fréquentielle du fait des phénomènes de relaxations sont énoncées et discutées sur la base de la description des principaux constituants des tissus influençant le comportement électrique.

Dans un deuxième chapitre *Microspectromètre de mesure d'impédance : état de l'art*, les aspects plus spécifiques liés à la miniaturisation des techniques de mesures seront abordés. Cela passera par une synthèse bibliographique des microtechnologies applicables à la réalisation d'une biopuce dédiée. Puis le problème du positionnement des cellules dans un tel dispositif sera abordé pour enfin s'attacher à la description de réalisations existantes avec comme critère de comparaison la configuration des électrodes utilisées.

Le troisième chapitre *Spectroscopie de bio-impédance basses fréquences par électrodes bipolaires : application aux ovocytes de Xénope* traitera d'une réalisation expérimentale entreprise pour la caractérisation par spectroscopie d'impédance d'une cellule ovocyte de Xénope isolée dans une bande de fréquences allant de 50 Hz à 5 MHz, à l'aide d'un appareil impédancemètre commercial et d'un dispositif de mesure intégrant deux électrodes coplanaires. La démarche expérimentale ainsi que la modélisation électrique du dispositif de mesure par la méthode numérique des éléments finis seront discutées.

Enfin, le quatrième chapitre *Microspectromètre de bioimpédance à configuration tétrapolaire* concerne l'étude d'une chaîne de mesure complète pour la caractérisation de faibles volumes de fluides biologiques à l'aide d'une matrice d'électrodes dans une configuration tétrapolaire (4 électrodes) choisie pour faire face aux contraintes métrologiques liées à la l'influence d'impédances de polarisation aux interfaces métal-milieu propre aux configurations bipolaires. Les différents éléments de la chaîne (circuit électronique de conditionnement, électrodes, etc..) seront présentées, puis la chaîne de mesure sera validée et des résultats préliminaires obtenus sur des solutions salines et échantillons sanguins humains seront discutés.

Chapitre 1

Propriétés électriques des milieux biologiques

Sommaire

1.1	Introduction	3
1.2	Concepts généraux	4
1.2.1	Comportement diélectrique	5
1.2.2	Comportement conducteur	7
1.2.3	Pertes diélectriques et permittivité complexe	8
1.2.4	Courant de déplacement et conductivité complexe	9
1.2.5	Formulation générale pour un milieu mixte diélectrique conducteur	11
1.2.6	Relaxations diélectriques	13
1.2.7	Impédance électrique	20
1.3	Les milieux biologiques	22
1.3.1	Liquides extra-cellulaires	23
1.3.2	La cellule	23
1.4	Spectre diélectrique caractéristique des tissus biologiques	28
1.4.1	Conductivité	28
1.4.2	Permittivité	29
1.4.3	Dispersion α	29

1.4.4	Dispersion β	29
1.4.5	Dispersion γ	30
1.5	Conclusion	30

1.1 Introduction

Dès les principes de l'électromagnétisme établis, les scientifiques s'intéressèrent aux interactions entre les champs électriques et/ou magnétiques avec les milieux biologiques [MJ95]. Galvani montra par exemple dès 1786 l'effet de l'électricité sur les fonctions motrices des animaux. Au fur et à mesure des évolutions technologiques et scientifiques au cours du 19^{ème} siècle, de célèbres physiciens, physiologistes et ingénieurs (tel que Wien, Nernst, et Tesla) ont étudié les propriétés électriques des tissus biologiques en basses fréquences, et ont développé des théories permettant d'expliquer des phénomènes biologiques tels que l'excitation nerveuse et la dépendance fréquentielle du seuil d'excitation. Hober en 1911 observa que la résistivité du sang présentait une dépendance fréquentielle et estima la résistivité interne de cellules érythrocytes. Son travail fut pionnier dans la mise en évidence expérimentale de l'existence d'une membrane cellulaire. La connaissance d'une conduction électrique dans les tissus biologiques était déjà établie avant la première guerre mondiale [FS96]. On savait notamment que leur résistance variait avec la fréquence et que le mécanisme de conduction est de nature ionique. On avait également compris que les structures cellulaires et les membranes déterminent les propriétés électriques des tissus. Hugo Fricke, dans les années 1920 proposa le premier modèle théorique rigoureux mettant en évidence la relaxation diélectrique de suspensions cellulaires. Son travail permit la première estimation fiable de la capacité de la membrane cellulaire (0.001 F/m^2). Un de ses articles théoriques sur ce sujet a été cité plus de 450 fois. En 1926, Fricke et Morse [FM26] ont reporté que la permittivité des tissus mammaires cancéreux (à 20 kHz) était plus élevée que celle de tissus sains et stipulèrent alors la faisabilité d'un outil diagnostique basé sur cette différence. Une des conséquences de ce constat fut le début de l'imagerie par impédance. Dès 1929, plusieurs scientifiques contribuèrent à améliorer la compréhension des phénomènes de relaxation diélectrique observables dans les tissus biologiques. Le travail du biophysicien Kacy Cole est majeur à ce sujet. Il proposa en 1941-1942 dans deux articles [CC41], [CC42] (dont le premier fut cité environ 3000 fois) écrits en collaboration avec son frère Robert ce qui est maintenant reconnu universellement comme la fonction de Cole-Cole. Cette relation décrit la relaxation diélectrique dans les

milieux biologiques par une distribution des temps de relaxation autour d'une valeur centrale. Une autre contribution importante dans le domaine fut celle de Herman P Schwan à l'université de Pennsylvanie, dont les travaux contribuèrent grandement à une meilleure compréhension des propriétés électriques des tissus biologiques sur une large gamme de fréquences [Fos02]. De nombreuses revues sur les propriétés électriques des tissus ont été proposées par différents auteurs. Les propriétés électriques des tissus biologiques sont aujourd'hui bien comprises, même si plusieurs points restent à éclaircir. Le lecteur intéressé souhaitant approfondir ou compléter les explications données dans ce chapitre pourra se reporter aux références suivantes [Pet79] [Duc90] [PK87] [Stu79] [FS96] [Sch57].

Ce chapitre traite des bases théoriques permettant d'appréhender les mécanismes à l'origine des propriétés observées. Pour cela, on commencera pas décrire synthétiquement les phénomènes produits par l'interaction des champs électriques avec les matériaux en général, et les outils mathématiques utilisés pour décrire ces phénomènes. Puis, à travers la présentation des principaux constituants biologiques d'influence, on s'intéressera au cas particulier des milieux biologiques.

1.2 Concepts généraux

Lorsqu'un champ électrique est appliqué à un matériau, l'énergie dans le champ peut être perdue par les mouvements de friction des porteurs de charges et transformée en chaleur et(ou) stockée par la polarisation des constituants du matériau. Théoriquement, un stockage d'énergie peut aussi se produire dans les champs magnétiques, mais ce phénomène est négligeable pour la plupart des éléments biologiques car leur perméabilité magnétique est quasiment égale à μ_0 . Les matériaux, et plus particulièrement les milieux biologiques peuvent donc avoir un comportement à la fois diélectrique et conducteur. De plus, du fait des différents phénomènes de relaxation qui peuvent exister dans le milieu, les propriétés électriques des matériaux sont dépendantes de la fréquence du champ électrique appliqué. Ces différents aspects seront abordés dans cette partie.

1.2.1 Comportement diélectrique

On dit qu'un milieu est *diélectrique* ou *isolant* s'il ne contient pas de charges libres susceptibles de se déplacer de façon macroscopique par opposition à un conducteur (voir § 1.2.2) qui, lui, présente des porteurs de charges (électrons ou ions) capables de migrer librement. Néanmoins, comme toute matière, un tel milieu est formé de charges positives et négatives liées à l'intérieur d'atomes et de molécules. Si ces charges ne peuvent pas migrer librement, elles sont néanmoins susceptibles de se déplacer dans un volume confiné sous l'effet d'un champ électrique appliqué. Aucune charge ne peut entrer ni sortir du matériau mais certaines charges peuvent se déplacer localement et créer ainsi des dipôles électriques. Lorsqu'un tel milieu est soumis à un champ électrique, on dit qu'il est polarisé. D'une manière générale la polarisation est définie comme étant *une perturbation locale de la distribution des charges électriques provoquée par l'application d'un champ électrique*. Au sens mathématique, la polarisation globale d'un milieu \vec{P} représente la densité volumique des moments dipolaires du milieu. Elle s'exprime en $[C/m^2]$. Dans le cas d'un milieu isotrope celle-ci peut être considérée comme étant directement proportionnelle au champ électrique appliqué :

$$\vec{P} = \chi \cdot \varepsilon_0 \cdot \vec{E} \quad (1.1)$$

Avec ε_0 la permittivité du vide ($\varepsilon_0 \approx 8,854187817 \times 10^{-12}$) et χ la susceptibilité du matériau. La susceptibilité χ décrit la capacité du matériau à se polariser en réponse à un champ électrique (polarisabilité). Une susceptibilité nulle engendre une polarisation nulle. Des charges liées qui peuvent être déplacées sur une longue distance entraînent un moment dipolaire important et donc une grande susceptibilité. La polarisation n'est pas une grandeur mesurable directement. Pour caractériser la perturbation induite par le champ électrique, on utilise plutôt la notion de déplacement électrique ou flux électrique \vec{D} , qui est le produit de la quantité de charges déplacées par la distance parcourue, et qui s'exprime donc en $[C \cdot m]$. Dans le cas d'un milieu linéaire, homogène et isotrope le déplacement électrique est donné par :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad (1.2)$$

Où le terme $\varepsilon_0 \vec{E}$ caractérise le déplacement électrique dans le vide d'après le formalisme de Maxwell. En remplaçant \vec{P} par son expression en fonction de \vec{E} (Equ 1.1), on obtient :

$$\vec{D} = \varepsilon_0(1 + \chi) \cdot \vec{E} = \varepsilon \cdot \vec{E} \quad (1.3)$$

Où $\varepsilon = \varepsilon_0(1 + \chi)$ désigne la permittivité du matériau. La connaissance de cette grandeur pour un matériau renseigne donc sur le déplacement électrique \vec{D} qui sera occasioné par l'action d'un champ électrique. En pratique on définit souvent la permittivité relativement à celle du vide :

$$\varepsilon_r = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} \quad (1.4)$$

ε_r est une grandeur caractéristique utilisée pour décrire les propriétés polarisantes des matériaux. Une permittivité relative ε_r égale à 1 ne produit aucune polarisation. Une valeur de ε_r s'éloignant de 1 témoigne d'un matériau possédant une plus grande capacité à se polariser. Dans le but de simplifier la notation, dorénavant, dans le reste de ce document, la permittivité relative sera désignée simplement par ε .

1.2.1.1 Principaux mécanismes de polarisation

La polarisation résultante de l'application d'un champ électrique (Equ 1.1) dans un milieu peut avoir des origines variées, et les mécanismes de polarisation ne sont pas propres qu'aux matériaux possédant des charges liées. Dans une certaine mesure des charges libres dans un matériau peuvent aussi contribuer à la polarisation globale du matériau. De plus, les mécanismes ne sont pas tous aussi rapides les uns que les autres. Certains réagissent instantanément, d'autres nécessitent un certain temps avant que la polarisation ne s'établisse. Ceci introduit la notion de *relaxation* (voir § 1.2.6). On dénombre 4 mécanismes principaux de polarisation :

- *La polarisation électronique* : Il s'agit de la polarisation induite par le faible déplacement des nuages électroniques par rapport au noyau des atomes que cela soit à l'échelle de l'atome ou d'une molécule. Le déplacement des électrons est un processus très rapide (de l'ordre de la pico seconde).

- *La polarisation ionique* : Elle provient du déplacement relatif des ions de signes opposés en présence d'un champ.
- *La polarisation d'orientation* : Celle-ci est liée à l'orientation des dipôles permanents. Elle est le plus souvent rencontrée dans les gaz et les liquides (ex : orientation des molécules d'eau). Dans les solides, la rotation des dipôles est en générale bloquée. Le processus d'orientation est relativement rapide et n'occasionne des fréquences de relaxations qu'à partir de quelques GHz (voir Annexe C.1).
- *La polarisation d'interface* : Ce type de polarisation est lié à la présence de charges mobiles qui s'accumulent aux interfaces séparant différentes régions d'un milieu (voir Annexe C.2). Elle ne peut donc exister que dans un milieu possédant des charges libres de migrer, au moins localement, et est inexistante dans un milieu diélectrique pur ne possédant que des charges liées.

1.2.2 Comportement conducteur

Outre son aspect diélectrique, tout matériau est également susceptible de contenir des charges libres capables de se déplacer sous l'effet d'un champ électrique. La conductivité électrique est définie comme étant *l'aptitude d'un matériau à laisser les charges électriques se déplacer librement, autrement dit à permettre le passage d'un courant électrique*. Cette aptitude du matériau à conduire l'électricité en réponse à un champ électrique est formalisée par la loi d'Ohm :

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

Où \vec{J} est la densité de courant, c'est-à-dire la quantité de charges traversant une section du milieu par unité de surface et de temps (en $[A/m^2]$ ou $[C/s \cdot m^2]$), \vec{E} est le champ électrique appliqué au matériau, σ est la conductivité électrique du milieu qui s'exprime en $[S/m]$. Dans un conducteur, un courant électrique s'accompagne toujours d'un dégagement de chaleur par effet Joule, qui est caractérisé par sa puissance :

$$P = E^2 \cdot \sigma \quad (1.6)$$

En régime sinusoïdal, cela donne :

$$P = \frac{1}{2} E^2 \cdot \sigma \quad (1.7)$$

Les charges électriques libres contribuant à la conductivité électrique peuvent être de différents types. Dans les métaux par exemple, les charges libres sont des électrons qui ne sont pas liés à des atomes particuliers et donc libres de se déplacer. Ce type de conduction n'entraîne pas de réel déplacement de matière. Dans une solution ionique les porteurs de charges sont des ions libres de se déplacer. Les porteurs de charges sont donc des atomes ou des molécules entières ionisées et non pas seulement des électrons comme dans les métaux. Le courant génère un réel transport de matière. Typiquement, il s'agit du type de conduction électrique (conduction ionique) rencontrée dans les liquides corporels. La valeur de la conductivité pour de telles solutions est liée à la nature des ions dissous ainsi qu'à leur concentration (voir Annexe A).

1.2.3 Pertes diélectriques et permittivité complexe

La notion de permittivité définie auparavant convient bien au cas d'une polarisation par un champ électrique statique ou variable mais suffisamment lentement pour que la polarisation ait le temps de s'établir entre chaque cycle du champ électrique. En réalité, les déplacements de charges menant à la polarisation ne sont pas instantanés (voir § 1.2.6). Les interactions entre molécules tendent à ralentir l'orientation des dipôles qui ne peuvent pas suivre les orientations du champ électrique si celles-ci sont trop rapides. L'existence de cette inertie dans le milieu a une double conséquence :

- Premièrement, le travail développé pour aligner les dipôles malgré les forces qui s'opposent à ce déplacement consomme de l'énergie prélevée sur le champ électrique. Cette énergie se dissipe dans le matériau sous forme de chaleur. Un diélectrique absorbant de l'énergie par cette manière est qualifié de *diélectrique à pertes*.
- Deuxièmement, l'orientation des dipôles se fait avec un certain retard par rapport à l'application du champ électrique. Si ce dernier est alternatif, alors les champs \vec{D} et \vec{E} ne sont pas en phase.

En régime alternatif la permittivité ne peut alors plus être représentée par un simple réel et doit être définie comme une grandeur complexe dépendant de la fréquence du champ appliqué :

$$\vec{D}(\omega) = \underline{\varepsilon}(\omega) \cdot \varepsilon_0 \cdot \vec{E}(\omega) \quad (1.8)$$

Avec :

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon'(\omega) - j\varepsilon''(\omega) \quad (1.9)$$

Et :

$$\tan \delta = \frac{\varepsilon''(\omega)}{\varepsilon'(\omega)} \quad (1.10)$$

Où la partie réelle $\varepsilon'(\omega)$ est la permittivité et a la même signification que la permittivité ε en régime statique (polarisabilité du matériau), si ce n'est qu'elle peut varier avec la fréquence. La partie imaginaire $\varepsilon''(\omega)$ est appelée *facteur de pertes*, elle témoigne de l'existence des pertes énergétiques dans le matériau. Les pertes occasionnées sont aussi souvent représentées par l'angle de pertes δ . La réponse fréquentielle d'un diélectrique est liée aux différents mécanismes de polarisation qui y siègent et plus précisément aux constantes de temps qui caractérisent ces mécanismes (voir Annexe C). Typiquement, le terme $\varepsilon''(\omega)$ passe par un maximum à la fréquence caractéristique de relaxation (voir § 1.2.6) et tend vers zéro pour les fréquences inférieures et supérieures.

1.2.4 Courant de déplacement et conductivité complexe

Dans un diélectrique, les charges ne sont pas libres de migrer comme dans un conducteur. Néanmoins l'application d'un champ électrique entraîne un déplacement local de ces charges. Ce déplacement est matérialisé par la quantité \vec{D} (Equ 1.3). Si le champ varie dans le temps, sinusoidalement par exemple, un mouvement oscillatoire des dipôles apparaît, et donc si on se place à une section particulière du milieu, on observe que la quantité de charges traversant la section par unité de temps n'est pas nulle, autrement dit qu'il existe un courant électrique traversant la section. Ce courant résultant du déplacement alternatif des charges liées est appelé *courant de déplacement*, et n'est donc finalement que la dérivée temporelle du déplacement électrique \vec{D} :

$$\vec{J}_d = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (1.11)$$

En régime harmonique, cela devient :

$$\underline{\vec{J}}_d(\omega) = j\omega \cdot \underline{\vec{D}}(\omega) \quad (1.12)$$

En remplaçant $\underline{\vec{D}}(\omega)$ par son expression en fonction du champ électrique, on obtient :

$$\underline{\vec{J}}_d(\omega) = j\omega \cdot \underline{\varepsilon}(\omega) \cdot \varepsilon_0 \cdot \underline{\vec{E}} \quad (1.13)$$

Cette expression décrit la dépendance qui existe entre le champ électrique appliqué et la densité de courant (de déplacement) générée dans le milieu. Il est intéressant de constater que d'un point de vue formel, elle est analogue à la loi d'Ohm définie pour les milieux conducteurs (Equ 1.5) dans le sens où elle décrit la dépendance entre le champ électrique appliqué à un milieu et la densité de courant en résultant. En élargissant le concept de conductivité au régime sinusoïdal dans un diélectrique on introduit la notion de conductivité complexe définie par :

$$\underline{\sigma}(\omega) = j\omega \underline{\varepsilon}(\omega) \cdot \varepsilon_0 \quad (1.14)$$

En développant l'expression, nous obtenons :

$$\underline{\sigma}(\omega) = \omega \varepsilon_0 \cdot \varepsilon''(\omega) + j\omega \varepsilon_0 \cdot \varepsilon'(\omega) \quad (1.15)$$

Si le diélectrique est sans pertes ($\varepsilon''(\omega) = 0$), la conductivité complexe est purement imaginaire, le courant de déplacement est alors déphasé de $-\pi/2$ par rapport au champ électrique, et son amplitude est proportionnelle à la fréquence du champ électrique appliqué (courant circulant dans une capacité pure). S'il y a des pertes, la conductivité complexe est composée d'un terme imaginaire et d'un terme réel. La partie réelle est formellement identique à la conductivité définie en § 1.2.2 car elle génère un courant proportionnel et en phase avec le champ. On nomme conductivité dynamique cette grandeur :

$$\sigma_d(\omega) = \omega \varepsilon_0 \cdot \varepsilon''(\omega) \quad (1.16)$$

Dans un conducteur, nous savons qu'un courant électrique s'accompagne toujours d'un dégagement de chaleur par effet Joule caractérisé par sa puissance en régime sinusoïdal (Equ 1.7). Par analogie, on dira qu'un diélectrique est, lorsqu'il est soumis à un champ

électrique variable d'amplitude E , le siège de pertes diélectriques correspondant à une puissance dissipée :

$$P = \frac{1}{2} \sigma_d E^2 = \frac{1}{2} \omega \varepsilon_0 \varepsilon'' \cdot E^2 \quad (1.17)$$

La conductivité dynamique $\sigma_d(\omega)$ est donc une grandeur proportionnelle à la puissance dissipée dans le diélectrique. Même s'il décrit le même phénomène, le facteur de pertes $\varepsilon''(\omega)$ revêt une information légèrement différente. Il est proportionnel à la quantité d'énergie perdue par cycle du signal alternatif. Dans le domaine fréquentiel, cela implique que s'il y a des pertes, la conductivité dynamique $\sigma_d(\omega)$ augmente continuellement avec la fréquence, alors que le facteur de pertes $\varepsilon''(\omega)$ passe par un maximum à la fréquence pour laquelle la quantité d'énergie perdue par cycle du champ alternatif est maximale.

1.2.5 Formulation générale pour un milieu mixte diélectrique conducteur

De nombreux matériaux possèdent des comportements électriques mixtes : à la fois conducteur et diélectrique à pertes. Une solution ionique classique telle que l'eau salée par exemple présente une conductivité ionique du fait de la présence d'ions libres de se déplacer mais est également polarisable car les molécules d'eau sont polaires et peuvent donc s'orienter en présence d'un champ électrique. De plus celle-ci peut être également le siège de pertes diélectriques quand la fréquence du champ atteint des fréquences voisines de 25 GHz (voir Annexe C.1). Il est alors utile de disposer d'une description mathématique globale prenant en considération toutes ces caractéristiques (conductivité, permittivité et pertes). Dans un tel matériau, deux types de courant coexistent : le courant de conduction dû aux déplacements des charges libres et le courant de déplacement lié à l'oscillation des dipôles. La contribution globale du courant peut s'écrire :

$$\vec{J} = \vec{J}_c + \vec{J}_d \quad (1.18)$$

En remplaçant l'expression des densité de courant de conduction et de déplacement en fonction du champ électrique (Equ 1.5, Equ 1.14) on obtient :

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} + j\omega \varepsilon_0 \cdot \underline{\varepsilon}(\omega) \vec{E} = (\sigma + j\omega \varepsilon_0 \underline{\varepsilon}(\omega)) \vec{E} \quad (1.19)$$

Le terme $(\sigma + j\omega\varepsilon_0 \cdot \underline{\varepsilon}(\omega))$ définit la dépendance qui existe entre le champ électrique et la densité de courant totale dans le matériau. C'est la *conductivité complexe* définie pour un milieu à la fois conducteur et diélectrique (à pertes) :

$$\underline{\sigma}(\omega) = (\sigma + j\omega\varepsilon_0 \cdot \underline{\varepsilon}(\omega)) \quad (1.20)$$

En développant, cela donne :

$$\begin{aligned} \underline{\sigma}(\omega) &= \sigma + \sigma_d(\omega) + j\omega\varepsilon_0 \cdot \varepsilon'(\omega) \\ \underline{\sigma}(\omega) &= \sigma'(\omega) + j\sigma''(\omega) \end{aligned} \quad (1.21)$$

Avec :

- $\sigma'(\omega) = \sigma + \sigma_d(\omega)$: la partie réelle représentant l'ensemble des pertes dans le matériau, les pertes ohmiques par σ et les pertes diélectriques par σ_d . La puissance totale dissipée dans un matériau conducteur et diélectrique à pertes peut donc être exprimée par :

$$P = \frac{1}{2}\sigma'(\omega) \cdot E^2 = \frac{1}{2}\sigma E^2 + \frac{1}{2}\sigma_d(\omega)E^2 \quad (1.22)$$

Une partie de la puissance dissipée étant indépendante de la fréquence (puissance dissipée par effet Joule) et une autre partie étant directement proportionnelle à la fréquence (puissance dissipée par pertes diélectriques).

- $\sigma''(\omega) = \omega\varepsilon_0\varepsilon'$: la partie imaginaire qui est l'image du courant de déplacement généré dans le milieu du fait de la polarisabilité du matériau, une partie de ce courant étant réduite dans le cas de pertes diélectriques.

Ce mode de représentation (conductivité complexe), est subjectif. Il est à utiliser plutôt lorsque l'on souhaite mettre en avant les propriétés conductrices du matériau (apparaissant dans la partie réelle) tout en décrivant les propriétés diélectriques (apparaissant dans la partie imaginaire). Etant donné que le milieu à décrire n'est ni un diélectrique pur ni un conducteur pur, rien n'empêche d'utiliser la terminologie des diélectriques (permittivité complexe) pour le décrire. Il suffit pour cela d'opérer la transformation suivante qui existe entre la permittivité et la conductivité (Equ 1.14) :

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \frac{(\underline{\sigma}\omega)}{j\omega\varepsilon_0} \quad (1.23)$$

La nouvelle expression de la permittivité complexe prenant en compte la conductivité statique σ est alors donnée par :

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon'(\omega) - j \left(\frac{\sigma}{\omega \varepsilon_0} + \varepsilon''(\omega) \right) \quad (1.24)$$

Où encore :

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon'(\omega) - j \frac{\sigma'(\omega)}{\omega \varepsilon_0} \quad (1.25)$$

Ainsi la permittivité complexe (Equ 1.25) ou la conductivité complexe (Equ 1.21) définies ci-dessus suffisent à la caractérisation électrique d'un milieu. Remarquons tout de même la diversité des termes utilisés pour décrire les propriétés électriques des matériaux qui peut parfois prêter à confusion. Dans un soucis de synthèse, la signification des différents termes utilisés pour la formulation de ces propriétés est fournie en annexe B.

1.2.6 Relaxations diélectriques

1.2.6.1 Introduction

La relaxation est un concept très important pour comprendre la dépendance fréquentielle des propriétés électriques des matériaux. Enonçons la définition générale au sens de la physique : *L'ensemble des phénomènes qui se produisent spontanément lorsque l'équilibre d'un système physique a été rompu et grâce auxquels le système revient progressivement à l'état d'équilibre.* Dans un matériau soumis à un champ électrique, cette notion de relaxation indique le retour à une position d'équilibre du système de charges après l'excitation électrique [PCF90], autrement dit, si le milieu est un diélectrique, à l'établissement de la polarisation du milieu. Le nouvel état stable étant obtenu pour un diélectrique lorsque l'ensemble des dipôles se sont orientés dans la direction du champ. Ce concept de relaxation est donc lié à l'étude d'un matériau perturbé par un échelon de champ électrique. La grandeur caractéristique du phénomène est la *durée de relaxation* τ qui informe du temps nécessaire pour le retour à l'équilibre. Ce temps varie en fonction du mécanisme de polarisation concerné (voir Annexe C). Par exemple, la polarisation des nuages électroniques des atomes est un processus très rapide (de l'ordre de la picoseconde) et se caractérise donc par une durée de relaxation très courte. En revanche, la polarisation liée à l'orientation de molécules polaires (polarisation d'orientation), ou encore à l'accumulation de

charges à des interfaces (polarisation interfaciale) est beaucoup plus lente, et ce temps ne peut pas être négligé surtout si les cycles de variations du champ électrique sont du même ordre de grandeur. La relaxation est donc un phénomène temporel caractérisé par sa durée τ . Lorsque l'on s'intéresse à l'impact dans le domaine fréquentiel du phénomène de relaxation, on parle de dispersion diélectrique. A une durée de relaxation τ dans le domaine temporel, correspond une fréquence caractéristique $f_c = 1/(2\pi\tau)$ dans le domaine fréquentiel. Dans le domaine fréquentiel, une dispersion se caractérise alors par une chute de permittivité $\varepsilon'(\omega)$ autour de la fréquence caractéristique f_c traduisant la perte d'un processus de polarisation au fur et à mesure que la fréquence augmente, et par le passage par un maximum du facteur de pertes $\varepsilon''(\omega)$ à la fréquence caractéristique f_c . Dans les milieux biologiques, les phénomènes de relaxations sont variés. Ce sont principalement les relaxations dipolaires liées typiquement à l'orientation des molécules d'eau, les relaxations d'interfaces type Maxwell-Wagner, on encore les relaxations des contre-ions. Pour information, une description plus détaillée des différents types de relaxation est fournie en annexe C. Dans ce paragraphe, nous traiterons de l'approche théorique générale pour décrire les relaxations diélectriques selon le formalisme de Debye qui consiste à décrire la relaxation comme un système du premier ordre avec une constante de temps unique, puis nous aborderons un mode de description plus adapté à la réalité des milieux biologiques : le modèle de Cole-Cole qui repose sur la description du phénomène de relaxation non plus par une constante de temps unique mais par une distribution statistique des constantes de temps.

1.2.6.2 Modèle de relaxation du 1er ordre : Formalisme de Debye

Le formalisme de Debye a été à l'origine développé pour décrire les relaxations liées à l'orientation des molécules polaires (relaxation dipolaire, voir Annexe C.1) mais il constitue une approche théorique générale pour décrire les relaxations diélectriques des matériaux. Il considère simplement qu'en réponse à un échelon de champ électrique, le milieu se polarise en suivant une loi du 1er ordre qui peut donc être représentée par la réponse temporelle ci-dessous :

$$P(t) = P_\infty + (P_s - P_\infty)(1 - e^{-t/\tau}) \quad (1.26)$$

Où τ est la constante de temps de relaxation, P_∞ la polarisation dite *instantanée* et P_s la polarisation *statique*. La polarisation *instantanée* P_∞ permet de rendre compte des mécanismes de polarisation qui peuvent être considérés comme simultanés à l'apparition du champ électrique car très rapides (polarisation des nuages électroniques par exemple). La polarisation *statique* P_s correspond à la nouvelle polarisation atteinte une fois le régime établi. Le profil d'évolution temporelle de la polarisation en réponse à un échelon de champ électrique selon le modèle de Debye est donné en Fig 1.1.

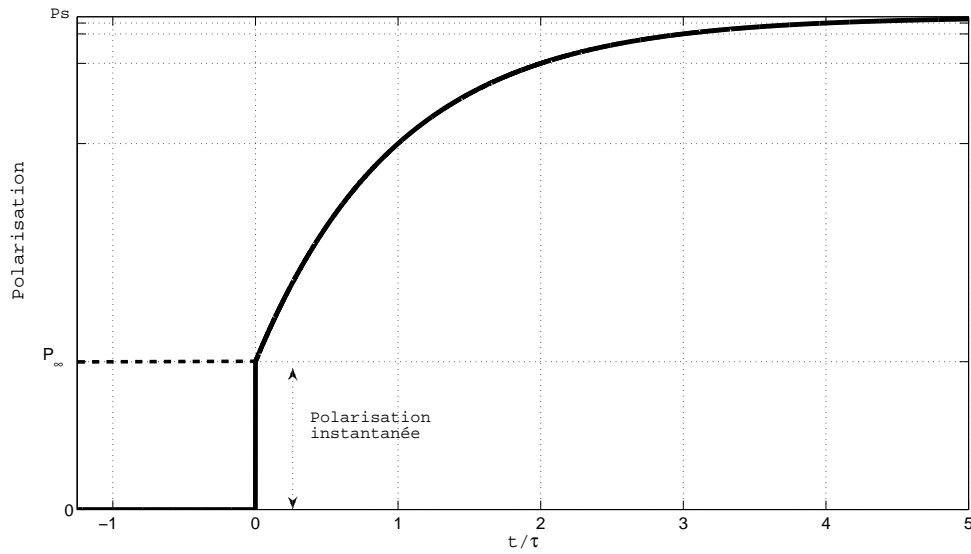


FIGURE 1.1 – Evolution temporelle de la polarisation dans un matériau en réponse à un échelon de champ électrique, selon l'équation de Debye

En opérant une transformation de Laplace sur l'expression 1.26, il est possible de déduire la réponse du milieu en régime harmonique :

$$\underline{P}(\omega) = P_\infty + \frac{P_s - P_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad (1.27)$$

Soit, pour la permittivité (équation de Debye)

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad (1.28)$$

Où $f_c = 1/(2\pi\tau)$ est la fréquence caractéristique de relaxation, ε_s la permittivité statique c'est à dire la permittivité existante pour des fréquences très inférieures à la

fréquence caractéristique f_c , et ε_∞ est la limite de permittivité atteinte pour des fréquences très supérieures à la fréquence caractéristique f_c . Cette équation (Equ 1.28) décrit le phénomène de relaxation en considérant un diélectrique pur. En réalité, on sait qu'un courant de conduction peut coexister dans le matériau. Pour traduire ce comportement mixte, la contribution de la conductivité statique σ peut être alors insérée dans l'équation de Debye qui devient l'équation de Debye modifiée :

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} - j \frac{\sigma}{\omega\varepsilon_0} \quad (1.29)$$

De cette expression on peut extraire la permittivité ε' , le facteur de pertes diélectriques ε'' et la conductivité globale σ' :

$$\varepsilon'(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (1.30)$$

$$\varepsilon''(\omega) = (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \frac{\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (1.31)$$

$$\sigma'(\omega) = \omega\varepsilon_0\varepsilon''(\omega) + \sigma \quad (1.32)$$

De plus, en observant les expressions obtenues, on peut écrire :

$$\sigma'(\omega) - \sigma = \omega\varepsilon_0\varepsilon''(\omega) = \omega^2\tau\varepsilon_0(\varepsilon'(\omega) - \varepsilon_\infty) \quad (1.33)$$

Cette relation (relation de Kronig-Kramer) montre que la variation de conductivité et de permittivité sont interdépendantes. Lors d'une relaxation diélectrique une chute de ε' est forcément associée à une augmentation de σ' selon la relation 1.33 (voir Fig 1.2). Ceci constitue une équation de contrôle utile en pratique pour vérifier la cohérence des résultats expérimentaux [Bur81] [FS96]. La représentation dans le domaine fréquentiel d'une relaxation modélisée par le modèle de Debye est donnée en Fig 1.2 par le spectre de conductivité et de permittivité et par le diagramme de Nyquist correspondant. La lecture du diagramme de Nyquist (Fig 1.2) (a) permet de déduire graphiquement les paramètres caractéristiques de la dispersion :

- *La fréquence caractéristique f_c* : c'est la fréquence pour laquelle le facteur de pertes diélectriques est maximal, c'est-à-dire la fréquence correspondant au sommet du demi-cercle. A cette fréquence la permittivité est réduite de moitié.
- *La chute $\Delta\varepsilon'$ de la permittivité* liée à la dispersion : c'est le diamètre du demi-cercle.
- *Le facteur de pertes maximal $\Delta\varepsilon''$* : c'est le rayon du demi-cercle
- *la permittivité statique ε_S et instantanée ε_∞* : ce sont les intersections du cercle avec l'axe des abscisses.

Dans les matériaux, tous les dipôles n'ont pas les mêmes durées de relaxations. Afin de considérer plusieurs phénomènes de relaxation distincts, l'équation de Debye peut s'écrire :

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 + j\omega\tau_1} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + j\omega\tau_2} + \frac{\Delta\varepsilon_3}{1 + j\omega\tau_3} + \dots \quad (1.34)$$

Où chaque relaxation est caractérisée par sa chute de permittivité ($\Delta\varepsilon_1$, $\Delta\varepsilon_2$, $\Delta\varepsilon_3$, etc..) et sa durée de relaxation propre (τ_1 , τ_2 , τ_3 , etc...). Deux exemples de représentations pour ce type de réponse sont donnés en Fig 1.2 (b,c,d,e). Le premier (Fig 1.2 (c, d)) illustre le cas où les constantes de temps sont parfaitement distinctes. Le deuxième (Fig 1.2 (e, f)) présente une situation où les constantes de temps sont relativement proches les unes des autres.

1.2.6.3 Distribution des constantes de temps : Approche empirique de Cole-Cole

En pratique, l'observation de la dépendance fréquentielle des milieux biologiques montre que ceux-ci obéissent rarement à un modèle de relaxation basé sur une constante de temps unique comme l'indique le formalisme de Debye. En général on observe plutôt dans le diagramme de Nyquist que la représentation de $\varepsilon(\varepsilon')$ ne correspond pas à un demi-cercle dont le centre est placé sur l'axe des abscisses mais plutôt à un demi-cercle dont le centre se situe en dessous de l'axe des abscisses. Dans le mode de représentation fréquentielle (Fig 1.3 (a)), cela correspond à des dispersions s'étendant sur une plus large gamme de fréquences. Cette constatation était évidente depuis les années 1920 [GM00] et est généralisable pour une large gamme de matériaux [JA77] (pas seulement les tissus biologiques).

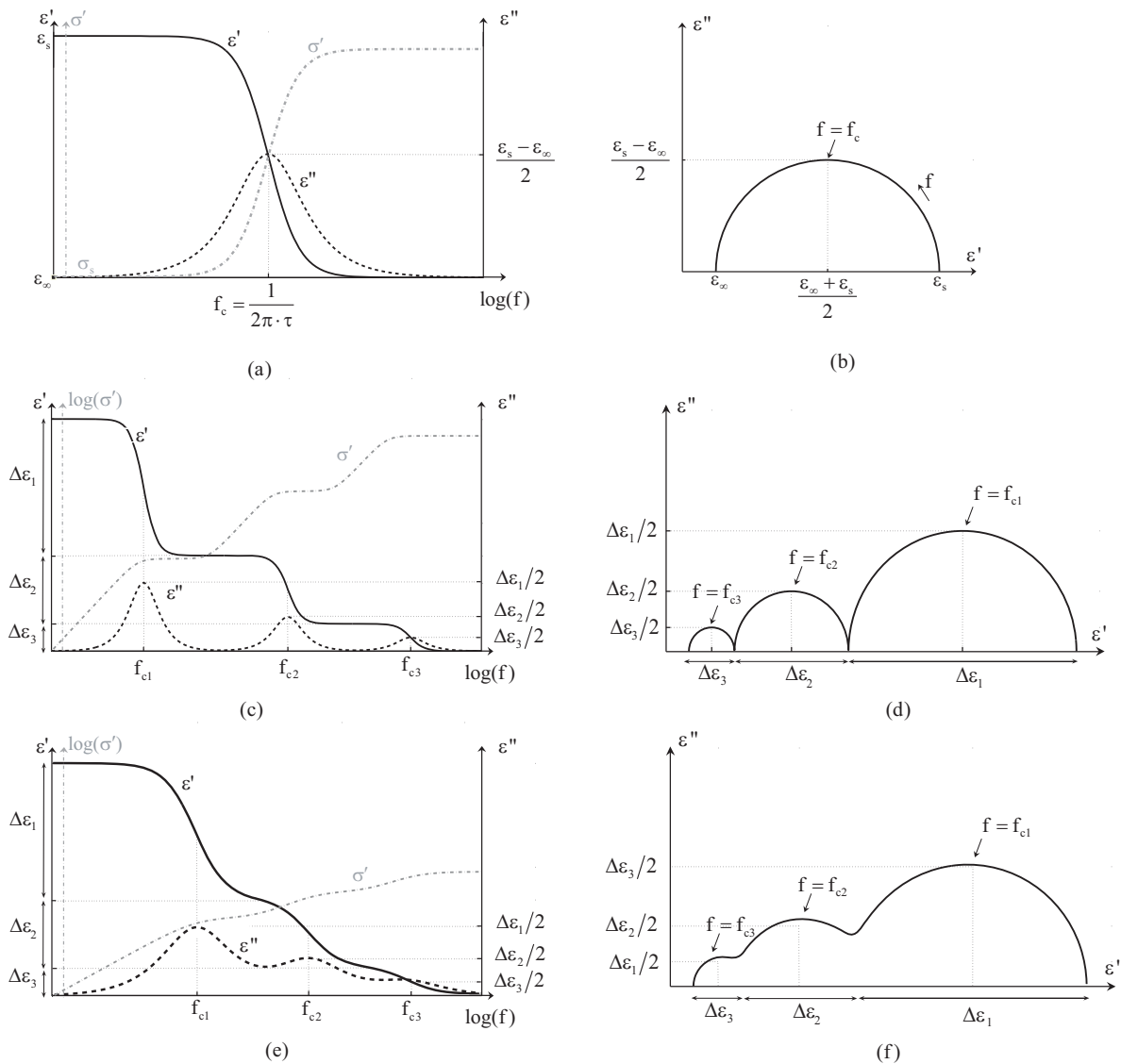


FIGURE 1.2 – Représentations de l'équations de Debye - (a)(b) Diagramme de Bode et de Nyquist pour une relaxation - (c) (d) Diagramme de Bode et de Nyquist pour trois relaxations parfaitement distinguables - (e) (f) Diagramme de Bode et de Nyquist pour trois relaxations ayant des fréquences caractéristiques proches les unes des autres

De nombreuses tentatives d'explication ont été faites pour décrire cette tendance. Néanmoins, les mécanismes impliqués restent en général assez mal identifiés et complexes à modéliser [FS96]. C'est pourquoi on a souvent recours à des modèles de relaxations empiriques qui permettent de paramétrer les données expérimentales sans explication formelle des phénomènes. Le modèle qui fut sans doute le plus utilisé, du fait de sa simplicité, est

celui proposé par les frères Cole en 1941 [CC41] [CC42]. La permittivité complexe pour ce modèle (appelée équation de Cole-Cole) est donnée par :

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau_0)^{(1-\alpha)}} - j\frac{\sigma_s}{\omega\varepsilon_0} \quad (1.35)$$

Avec $0 \leq \alpha \leq 1$. La spécificité de cette équation par rapport à l'équation de Debye est la dépendance en puissance fractionnelle du terme $(j\omega\tau_0)$. L'utilisation de cette approche mathématique a provoqué de nombreux débats [FS96] et peut être corrélée à différentes origines [MPH06] [GM00]. Souvent, on la voit comme une manière de mimer le comportement fréquentiel que suivrait la permittivité complexe si la relaxation n'était pas liée à une constante de temps unique mais plutôt à une distribution statistique de constantes de temps. La fonction de distribution des temps de relaxations correspondant au modèle de Cole-Cole peut être donnée par :

$$P(\ln(\tau)) = \frac{1}{2\pi} \frac{\sin(\alpha\pi)}{\cosh((1-\alpha)\ln(\tau/\tau_0)) - \cos(\alpha\pi)} \quad (1.36)$$

Où τ_0 est la constante de temps centrale de la distribution. La distribution est logarithmiquement symétrique par rapport à τ_0 (Fig 1.3). Le paramètre α caractérise la largeur de la distribution. $\alpha = 0$ correspond à une constante de temps unique (équivalent au modèle de Debye, Equ 1.28). Lorsque α s'approche de 1, la distribution des temps de relaxation devient plus large et donc la dispersion dans le domaine fréquentiel également (Fig 1.3 (a, c)). Ceci se traduit dans le diagramme de Nyquist par un aplatissement du demi-cercle (Fig 1.3 (b)), traduisant une dispersion plus étendue sur la bande de fréquences. Dans les tissus biologiques, la valeur de α est généralement comprise entre 0.3 et 0.5. La distribution des temps de relaxations est parfois expliquée par la présence dans le milieu de dipôles différents, chacun ayant son propre temps de relaxation, ou par l'existence dans le milieu d'une distribution des paramètres morphologiques, comme par exemple les différentes tailles de cellules (la durée de relaxation étant liée à la taille pour l'effet Maxwell-Wagner, voir Annexe C.2) [FS96] [GM00]. Néanmoins, en l'absence de preuves satisfaisantes sur ces phénomènes, il convient de garder à l'esprit que l'équation de Cole-Cole n'est rien d'autre qu'un outil mathématique pour exprimer les résultats expérimentaux [MJ96] [MJL95]. En Fig 1.3 (d) est également représenté le modèle électrique à composants discrets basé sur l'équation de Cole-Cole.

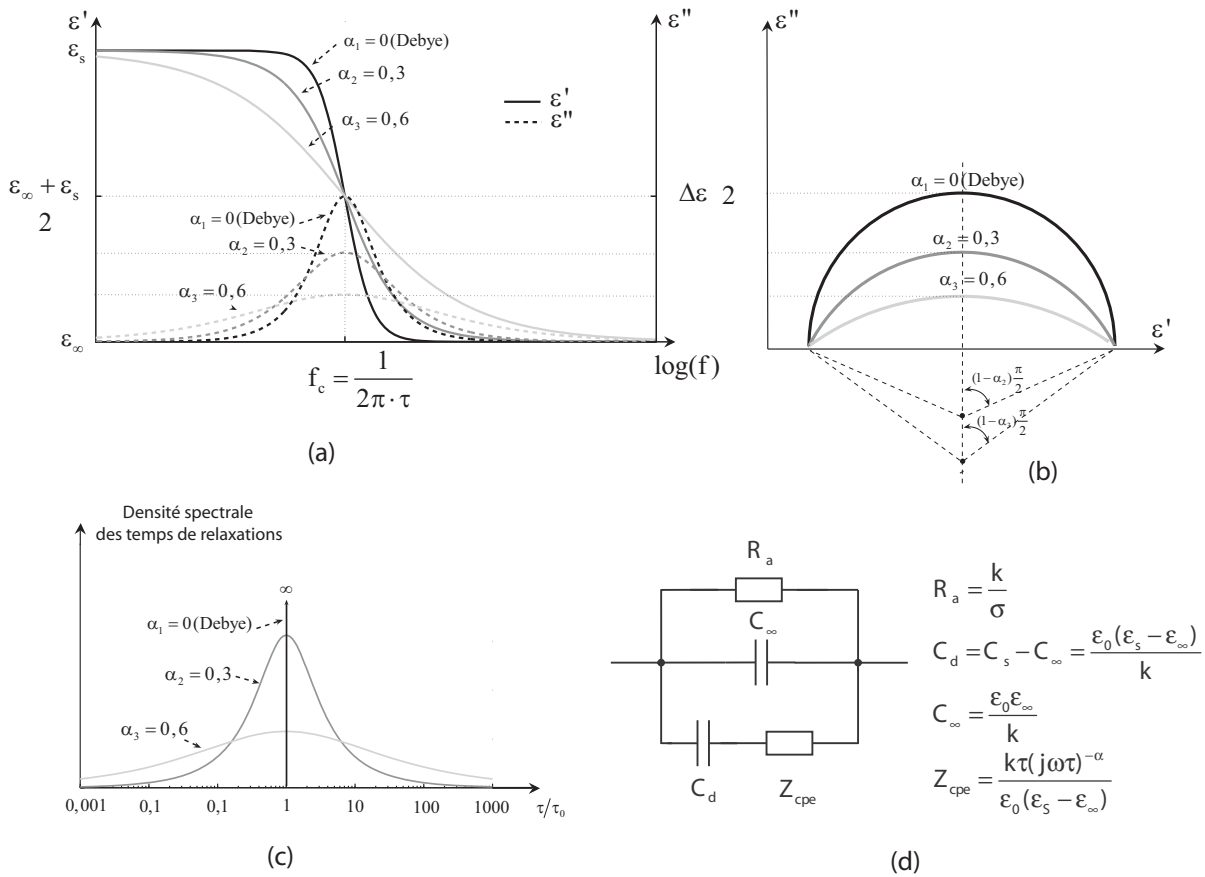


FIGURE 1.3 – Représentation d’une relaxation selon le modèle Cole-Cole pour différentes valeurs du paramètre α - (a) représentation fréquentielle, (b) Diagramme de Nyquist, (c) fonction distribution des temps de relaxations, (d) Modèle électrique équivalent

1.2.7 Impédance électrique

La détermination des différents termes composant la permittivité ou conductivité complexe suffit à la caractérisation électrique complète d’un matériau. Cependant, ces grandeurs ne sont pas accessibles directement. A l’échelle macroscopique, l’impédance \underline{Z} traduit la relation qui existe entre la tension aux bornes d’un circuit et le courant le traversant suivant la relation bien connue de la loi d’Ohm (loi d’Ohm intégrale) :

$$\underline{U} = \underline{Z} \cdot \underline{I} \quad (1.37)$$

Toutes les grandeurs de ces relations sont complexes ce qui garantit un éventuel dépha-

sage entre la tension et le courant. Considérons la configuration classique d'une géométrie de type condensateur plan d'épaisseur e et de section S telle que celle représentée en Fig 1.4. Le courant électrique circulant dans le condensateur peut s'écrire simplement :

$$I = \left| \vec{J} \right| \cdot S \quad (1.38)$$

Et la différence de potentiel entre les deux armatures est donnée par :

$$U = \left| \vec{E} \right| \cdot e \quad (1.39)$$

D'où, l'impédance complexe :

$$\underline{Z} = \frac{U}{I} = \frac{\left| \vec{E} \right| \cdot e}{\left| \vec{J} \right| \cdot S} = \frac{1}{\underline{\sigma}(\omega)} \cdot \frac{e}{S} \quad (1.40)$$

Ou encore :

$$\underline{Z}(\omega) = \frac{1}{\underline{\sigma}(\omega)} \cdot K = \frac{K}{j\omega\varepsilon_0\underline{\varepsilon}(\omega)} \quad (1.41)$$

Avec :

$$K = \frac{e}{S} \quad (1.42)$$

K étant le facteur géométrique de cellule en m^{-1} . La notion d'impédance peut être étendue à d'autres géométries plus complexes que la géométrie de type condensateur plan. Retenons simplement que l'expression reste la même et que seul le facteur de cellule K change selon les différentes géométries. En pratique, l'admittance (inverse de l'impédance) donne une représentation plus significative des comportements électriques microscopiques des matériaux :

$$\underline{Y}(\omega) = \frac{1}{\underline{Z}(\omega)} = \underline{\sigma}(\omega) \cdot \frac{1}{K} = j\omega\varepsilon_0\underline{\varepsilon}(\omega) \cdot \frac{1}{K} \quad (1.43)$$

Celle-ci est l'image de la conductivité complexe au facteur géométrique K près. Le calcul inverse (passage des propriétés macroscopiques aux propriétés microscopiques) est alors facilité.

En développant l'expression de l'admittance en fonction des caractéristiques du milieu, nous obtenons une admittance composée de 3 termes :

$$\underline{Y}(\omega) = \frac{1}{K} \cdot \sigma + \frac{1}{K} \cdot \sigma_d(\omega) + j \frac{1}{K} \cdot \varepsilon'(\omega) \quad (1.44)$$

L'admittance totale peut alors être vue comme l'association en parallèle des trois admittances (deux conductances et une capacitance) représentées en Fig 1.4.

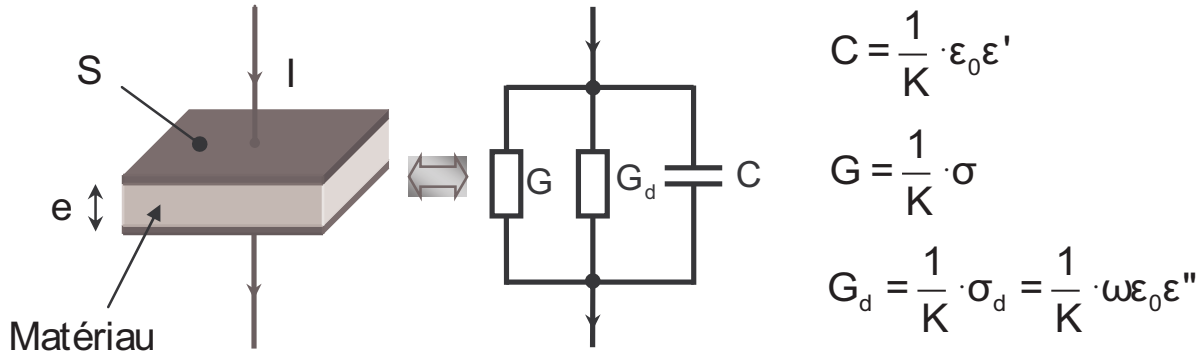


FIGURE 1.4 – (a)Modèle type "condensateur plan" d'un matériau (b) modèle électrique équivalent

Dans ce modèle G représente la conductance liée aux déplacements des charges libres (courant de conduction) et traduit donc le comportement ohmique du matériau. G_d est la conductance matérialisant les pertes diélectriques, et C est la capacité représentant la tendance diélectrique (sans les pertes) autrement dit la capacité à se polariser du matériau. On notera cependant que les composants G_d et C ne sont toutefois pas des composants ordinaires car ils présentent une dépendance fréquentielle si le diélectrique présente des pertes.

1.3 Les milieux biologiques

Les tissus biologiques sont composés d'environ 60% d'eau. Deux tiers de cette eau se situe à l'intérieur des cellules (cytoplasme), et le tiers restant dans le milieu extracellulaire (milieu interstitiel) [AAG⁺82]. Les propriétés électriques de cette eau sont principalement influencées par des espèces ioniques dissoutes. Les tissus biologiques ont donc un comportement fortement électrolytique. Cependant, l'intérieur des cellules est isolé du milieu extra-cellulaire par une membrane entourant la cellule. Cette membrane constitue une barrière presque infranchissable pour les espèces ioniques présentes de part et d'autre, et confère au tissu biologique un comportement fortement capacitif. D'un point de vue

électrique, il est souvent convenu, en première approche de voir le tissu comme une suspension de cellules dans le milieu liquide extracellulaire. Le sang contenant des cellules érythrocytes est l'exemple naturel le plus proche de cette représentation [GM00]. On traitera dans les paragraphes qui suivent, du rôle des principaux constituants énoncés (cytoplasme, liquide extracellulaire et membrane) dans le comportement électrique global d'un tissu biologique.

1.3.1 Liquides extra-cellulaires

Les cellules doivent contrôler une gamme de substances chimiques. Pour réguler leurs concentrations, les cellules effectuent des échanges de substances qui interviennent dans leur fonctionnement. Les liquides extracellulaires peuvent être considérés dans la majorité des cas comme des solutions aqueuses. On donne dans le tableau 1.1 la nature ainsi que la concentration des ions majoritaires composant le milieu extra-cellulaire. Les plus nombreux sont de loin les ions Na^+ et Cl^- . La conductivité moyenne de ces liquides est de l'ordre 1.8 S/m [Pet84]. On peut remarquer également que des protéines libres dans le plasma forment des porteurs de charges négatifs (macro-ions) pouvant contribuer à la conductivité globale. La permittivité d'un tel milieu est quasiment celle de l'eau, à savoir environ 80 même si celle-ci peut avoir tendance à diminuer légèrement par la présence d'une grande quantité d'ions [Pet84].

1.3.2 La cellule

La cellule est la plus petite unité capable de manifester les propriétés d'un être vivant : se nourrir, croître et se développer. Mis à part les virus, tous les tissus biologiques sont composés de cellules ayant une structure similaire faite de trois éléments principaux : la membrane plasmique, le cytoplasme et le noyau. Les deux premiers ont une influence prépondérante sur le comportement électrique passif global d'un tissu biologique.

Ion	Concentration extracellulaire (<i>mM</i>)
Na^+	142
Cl^-	103
HCO_3^-	24
Protéines ⁻	16
$HPO_4^{2-} + SO_4^{2-} +$ acides organiques	10
Ca^{2+}	5
K^+	4
Mg^{2+}	2
H^+ (<i>pH</i> 7.4)	$4 \cdot 10^{-5}$

TABLE 1.1 – Concentration des ions majoritaires dans le milieu extracellulaire, d’après [GM00]

1.3.2.1 Cytoplasme

Le cytoplasme désigne le contenu de la cellule. Plus exactement, il s’agit de la totalité du matériel cellulaire contenu par la membrane plasmique, excepté le noyau. Il a une structure complexe. Composé à 80 % d’eau, il contient également une grande quantité de sels, de protéines, d’acides nucléides, et de petites molécules et dans la plupart des cas des structures de membranes variées (organelles) qui peuvent également affecter les propriétés diélectriques. La valeur de la permittivité relative du cytoplasme s’est vue attribuée des valeurs allant de 50 à 200 [MD99]. Dans de nombreux cas, le cytoplasme peut cependant être considéré simplement comme un électrolyte (voir Tab 1.2). A des fréquences élevées (> 20 MHz), des dispersions liées aux mouvements des petites molécules à l’intérieur du cytoplasme peuvent commencer à apparaître. La nature des ions majoritaires dans le cytoplasme est présentée dans le tableau 1.2.

Ion	Concentration extracellulaire (<i>mM</i>)
K^+	140
$HPO_4^{2-} + SO_4^{2-} +$ acides organiques	130
Protéines ⁻	36
Mg^{2+}	30
Na^+	10
HCO_3^-	10
Cl^-	4
Ca^{2+}	10^{-4}
$H^+(pH7.4)$	$4 \cdot 10^{-5}$

TABLE 1.2 – Concentration des ions majoritaires dans le milieu intracellulaire, d’après [GM00]

1.3.2.2 Membrane

La membrane cellulaire est un constituant essentiel dans une cellule. Elle a un double rôle de protection du cytoplasme et de zone d’échanges entre le milieu intracellulaire et extracellulaire. Elle est principalement constituée à partir d’une double couche de lipides, qui dans la majorité des cas sont des phospholipides. Ceux-ci sont les composants-clé de la membrane biologique. Ils sont caractérisés par une tête polaire hydrophile (c’est-à-dire une extrémité portant une charge électrique négative soluble dans l’eau), et de longues queues apolaires hydrophobes (lesquelles, n’ayant pas de charge électrique, ne se mélangent pas avec l’eau) (Fig 1.5). Ces caractéristiques moléculaires font que les phospholipides, plongés dans une solution aqueuse, forment spontanément une bicouche fluide (ou micelle) dans laquelle les têtes hydrophiles entrent en contact avec l’eau, tandis que les longues queues hydrophobes se disposent vers l’intérieur, s’isolant du milieu aqueux. Cette bicouche lipidique mesurant approximativement 7 nm d’épaisseur sert, pour la cellule de barrière presque imperméable au passage de substances solubles dans l’eau. La figure 1.6 illustre les transports possibles à travers une membrane lipidique. Ceux-ci se limitent à

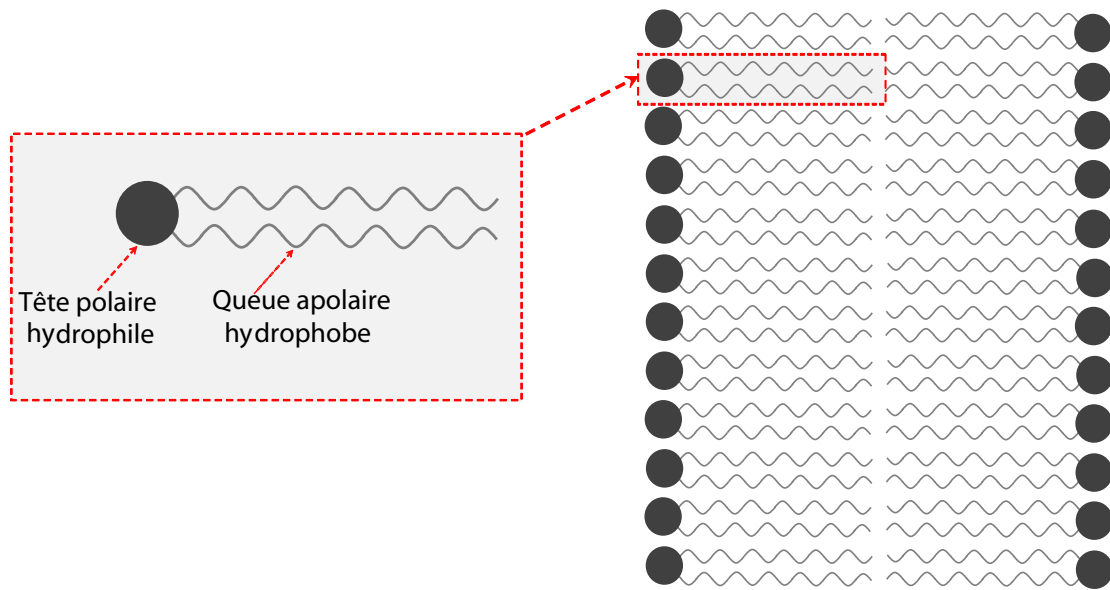


FIGURE 1.5 – A gauche, un phospholipide seul représenté par sa tête polaire et sa queue hydrophobe. A droite, membrane formée par une double couche de phospholipides.

des gaz, des petites molécules polaires non chargées, et dans une moindre mesure, aux molécules d'eau. Cette structure basique de la membrane permet à la cellule de survivre dans un milieu aqueux tout en maintenant indépendant son milieu interne (cytoplasme). D'un point de vue électrique, de par sa composition la membrane constitue une interface particulièrement isolante électriquement séparant deux milieux conducteurs (fluide intra et extra-cellulaire), et peut donc être assimilée à une capacité (C_m). En supposant que la permittivité relative de la double couche est proche de celle des lipides (soit environ 3) [RMC96], la valeur de la capacité membranaire peut alors être approchée par :

$$C_m = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_m}{d} \approx 1 \mu F / cm^2 \quad (1.45)$$

Où ε_m est la permittivité relative de la membrane, ε_0 est la permittivité du vide, et d est l'épaisseur de la membrane. Même si, par nature, les membranes sont largement hydrophobes, des molécules d'eau peuvent néanmoins être présentes à l'intérieur de la membrane [Pet84]. La présence de ces molécules ainsi que de toutes autres petites molécules polaires dans la membrane peut avoir tendance à augmenter la valeur de la capacité annoncée ci-dessus. D'autre part, des protéines présentes intégrées à la membrane pré-

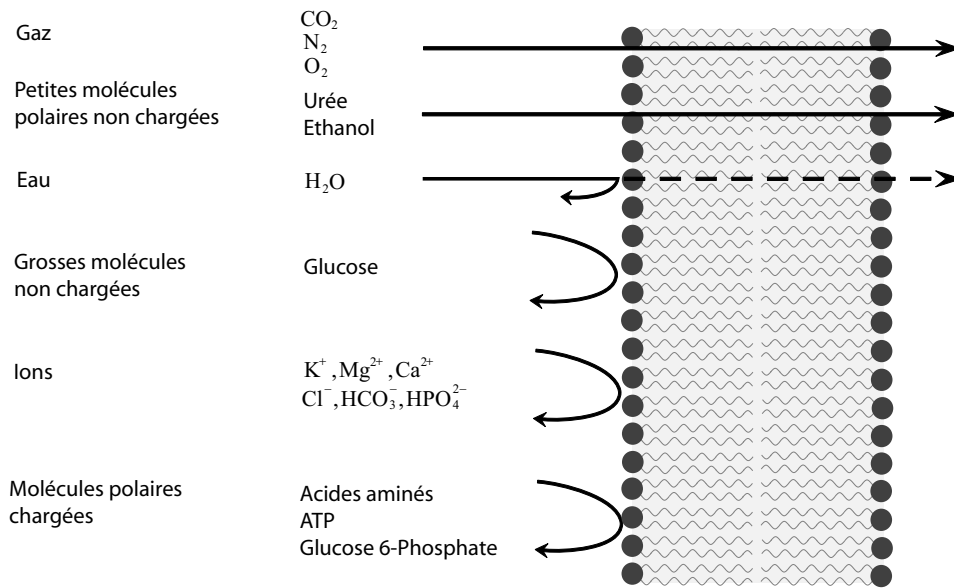


FIGURE 1.6 – Transport à travers une membrane lipidique pure. La membrane est perméable à de petites molécules non polaires (O_2 , N_2) ainsi qu'à de petites molécules polaires non chargées (Urée, Ethanol). Elle est très légèrement perméable aux molécules d'eau et complètement imperméable aux grosses molécules polaires chargées ou non ainsi qu'aux ions.

sentent intrinsèquement de grands moments dipolaires mais leur contribution globale à la polarisabilité de la membrane est négligeable car leurs mouvements de rotation sont en grande partie bloqués par les lipides avoisinants [Pet84].

1.3.2.3 Surface de la cellule

La surface de la cellule est le premier contact avec l'environnement, et sa structure peut être très compliquée [MD99]. La surface est chargée négativement pour presque toutes les cellules en raison de la prédominance des charges négatives (carboxylates, phosphates). Cela entraîne que les ions positifs du milieu extracellulaire (contre-ions) sont attirés à la surface de la cellule formant ainsi une double couche.

1.4 Spectre diélectrique caractéristique des tissus biologiques

Le comportement électrique fréquentiel d'un milieu biologique est lié à la combinaison de plusieurs mécanismes de relaxations. Même si chaque tissu présente ses spécificités en terme de propriétés électriques [GM00] [RMC96], il existe néanmoins une tendance globale que l'on peut retrouver dans de nombreux tissus. Cette tendance est représentée sur la figure 1.7.

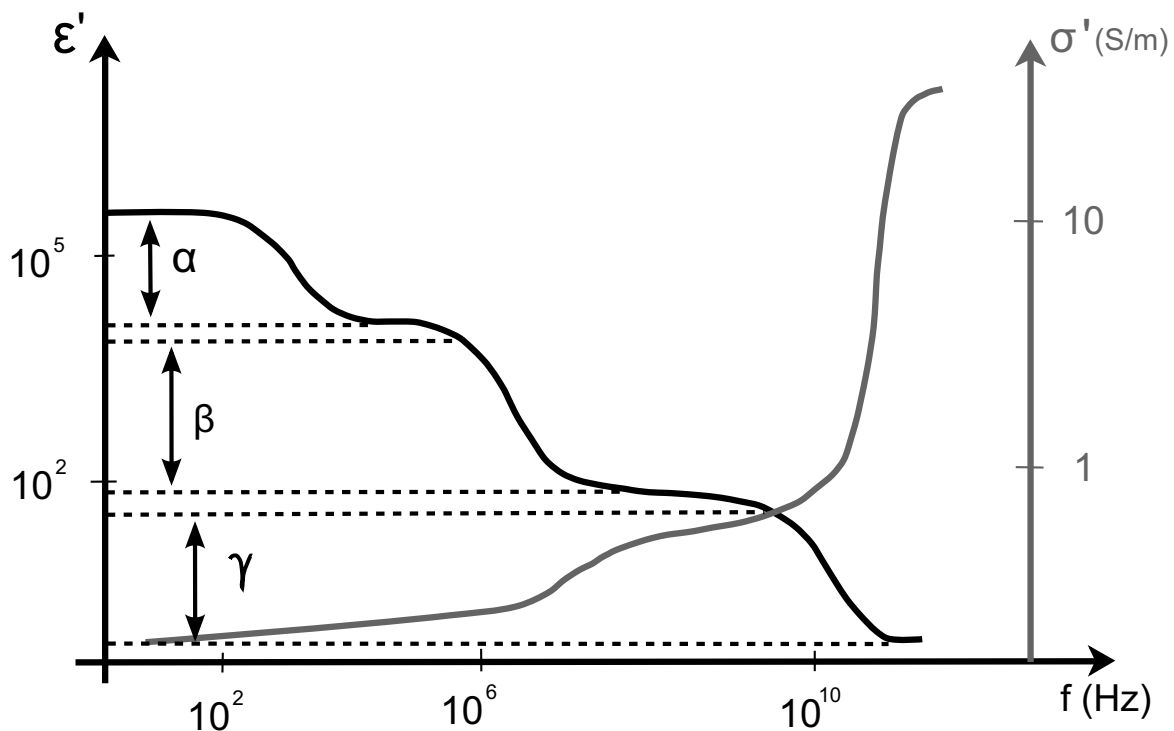


FIGURE 1.7 – Spectre diélectrique caractéristique des tissus biologiques, courbe typique pour un tissu contenant beaucoup d'eau tel que le muscle [Sch85].

1.4.1 Conductivité

Pour de basses fréquences, le tissu est caractérisé par une conductivité ionique (conductivité statique) qui dépend fortement du volume de fluide extra-cellulaire présent (les cellules pouvant être considérées comme isolantes). Lorsque la fréquence augmente, la

conductivité augmente progressivement jusqu'à atteindre un palier entre 10 à 100 MHz. Ensuite, aux fréquences micro-ondes une large augmentation de la conductivité est visible du fait de la relaxation diélectrique de l'eau.

1.4.2 Permittivité

L'augmentation de la conductivité est inévitablement associée à une chute de permittivité (selon la relation de Kronig-Kramer, Equ 1.33). En basses fréquences, la permittivité relative peut être incroyablement élevée (de l'ordre de 10^5 à 10^6 ou plus). Au fur et à mesure que la fréquence augmente, trois régions principales de dispersions entraînant une chute de permittivité peuvent être distinguées. Ces dispersions sont nommées respectivement α , β et γ , selon la terminologie de Schwan [Fos02]. Lorsque la fréquence augmente, les dispersions observées sont associées à des structures de plus en plus petites, en commençant par les cellules et leur environnement en basses fréquences, puis les organelles subcellulaires et de larges molécules pour des fréquences intermédiaires, puis finalement les molécules d'eau pour les fréquences les plus élevées.

1.4.3 Dispersion α

La dispersion α , observable pour des fréquences allant de 10 Hz à 1 kHz fut découverte pour la première fois par Schwan en 1948 sur des muscles [Sch94]. Celle-ci entraîne une large chute de la permittivité. Plusieurs mécanismes peuvent contribuer à cette dispersion. Le plus connu est celui lié à la diffusion des nuages de contre-ions à proximité des surfaces de cellules, décrit par la théorie de Schwartz (voir Annexe C.3).

1.4.4 Dispersion β

La dispersion apparaît généralement pour des fréquences allant de 0.1 à 10 MHz. Elle fut analysée pour la première fois par Hugo Fricke et K. S Cole [Col68]. On l'attribue principalement à la charge capacitive des membranes cellulaires via le milieu extra et intra-cellulaire et se décrit donc assez bien par la théorie des mélanges de Maxwell-Wagner. Une approche plus détaillée de cette dispersion est fournie en annexe C.2, en

particulier pour les suspensions cellulaires. Elle se caractérise par une large chute de permittivité de l'ordre de 1000 à 10000. En général d'autres petites dispersions de plus faible amplitude se superposent à la fin de dispersion β . Ce sont entre autres des phénomènes liés à des effets Maxwell-Wagner à l'échelle des organelles à l'intérieur des cellules (noyau et mitochondries) ou à la relaxation dipolaire des protéines.

1.4.5 Dispersion γ

Les milieux biologiques sont composés majoritairement d'eau. La dispersion γ traduit la relaxation dipolaire de ces molécules d'eau. Elle apparaît pour des fréquences situées autour de 25 GHz et occasionne une chute de permittivité de l'ordre de 50 pour une large augmentation de la conductivité d'environ 70 S/m. On observe en général dans les milieux biologiques une autre dispersion (invisible dans l'eau pure), plus petite, pour des fréquences allant de 0.1 à 3 GHz, parfois appelée dispersion δ . Celle-ci est attribuée en partie à la relaxation dipolaire des molécules d'eau liées à des protéines qui est plus lente (τ plus grand, f_c plus petit) que celle des molécules d'eau " libres ".

1.5 Conclusion

Dans ce chapitre, ont été abordés les concepts de base permettant de comprendre les propriétés électriques des milieux biologiques. Les outils de description des aspects conducteurs et diélectriques des milieux ont été présentés. Le comportement fréquentiel des milieux lié aux phénomènes de relaxations diélectriques a également été discuté. L'origine du comportement électrique d'un tissu biologique a été discutée à travers la description de ses principaux constituants (liquides extra-cellulaire, cytoplasme, membrane), pour enfin aboutir à la description des spectres de conductivité $\sigma'(\omega)$ et permittivité $\varepsilon'(\omega)$ typiquement rencontrés dans un tissu biologique. La compréhension des différents aspects abordés dans ce chapitre est une condition préalable à une étude visant à la caractérisation des milieux biologiques. Dans le prochain chapitre, des aspects plus spécifiques liés à la caractérisation de milieux biologiques à l'échelle cellulaire seront discutés grâce à un état de l'art des microtechnologies existantes et des réalisations concrètes de mesures

d'impédances sur cellules au sein de micro-dispositifs de mesure.

Chapitre 2

Microsystèmes de mesure d'impédance : Etat de l'art

Sommaire

2.1	Introduction	35
2.2	Microtechnologies associées	35
2.2.1	Technologies " dures " (silicium, verre)	36
2.2.2	Technologies molles (plastiques)	46
2.2.3	Conclusion partielle	50
2.3	Positionnement des cellules biologiques	51
2.3.1	Focalisation hydrodynamique	51
2.3.2	Positionnement par aspiration	52
2.3.3	Lévitiation par cages électromagnétiques	54
2.3.4	Conclusion partielle	55
2.4	L'interface micro-électrodes-cellule biologique	56
2.4.1	Introduction	56
2.4.2	Impédances d'interface métal-milieu	56
2.4.3	Géométrie d'analyse, facteur de cellule	59
2.4.4	Modèle électrique de l'interface électrode-cellule(s)	60
2.5	Exemples de configuration	62

2.5.1	Structures interdigitées	62
2.5.2	ECIS ("Electrode Cell-substrate Impedance Sensing)	64
2.5.3	Structure matricielle	66
2.5.4	Structures capillaires	68
2.6	Conclusion	71

2.1 Introduction

La détermination des paramètres électriques à l'échelle microscopique par spectroscopie d'impédance passe par la mise en oeuvre d'une chaîne d'instrumentation spécifique. Les contraintes dimensionnelles impliquent des difficultés de conception tant géométriques que de niveau de signal très faible. Le but reste de déterminer les valeurs de la permittivité et de la conductivité de l'échantillon avec une incertitude la plus faible possible. Le développement d'une technique de mesure adaptée aux échelles de micro-échantillons biologiques nécessite de se pencher sur le problème de la fabrication d'un micro-système (choix des matériaux, gravure de micro-canaux, insertion de microélectrodes, etc..). Etant donné le haut niveau de technologie associé, la tâche peut s'avérer compliquée pour un non-spécialiste. Nous tentons dans une première partie de ce chapitre de faire une rapide synthèse des microtechnologies applicables à la réalisation d'un micro-dispositif adapté à la caractérisation de cellules biologiques. Lors d'une mesure sur une cellule biologique dans un micro-système, se pose le problème du positionnement de la cellule dans la zone de mesure. Cet aspect sera abordé à travers quelques exemples. Ensuite seront discutées brièvement les contraintes métrologiques de mesures sur des cellules biologiques à l'aide d'électrodes. Enfin, la dernière partie du chapitre sera consacrée à la description d'exemples concrets de réalisations permettant la caractérisation par impédancemétrie de cellules biologiques.

2.2 Microtechnologies associées

Pour caractériser l'impédance électrique de cellules biologiques, il est nécessaire de confiner la mesure sur des volumes relativement petits pour avoir une bonne sensibilité. Lorsque une cellule biologique isolée doit être analysée, les dimensions des électrodes et des canaux ou réservoirs hébergeant les dimensions du capteur doivent être du même ordre de grandeur, soit quelques micromètres seulement. De telles dimensions ne peuvent être obtenues que par l'utilisation de procédés de fabrication spécifiques. Quelques notions seront rappelées ici sur les principales techniques mises en oeuvre pour la réalisation de

ce type de microstructures. On distinguera entre des technologies dites "dures" associées à la fabrication de micro objets à partir de substrats durs tels que du silicium ou du verre (technologies issues de l'industrie des semi-conducteurs), et les technologies dites "molles" qui sont plus récentes et adaptées à la réalisation de structures déformables à base de plastiques. Des informations plus complètes pourront être trouvées dans [ZBL⁺04] [Pat03] [MB99] [Sal02].

2.2.1 Technologies "dures" (silicium, verre)

La fabrication de micro-systèmes pour des applications en biologie repose en grande partie sur des méthodes technologiques standards héritées de l'industrie des semi-conducteurs. Ces méthodes s'appliquent principalement sur des substrats de verre, de silicium ou de quartz. Pour ce qui nous intéresse, les principales techniques impliquées sont :

- La photolithographie.
- Le dépôt de couches minces.
- La gravure.
- Le collage de substrat.
- Le report de contact électrique.

2.2.1.1 La photolithographie

La photolithographie est le processus central dans toute microfabrication sur des matériaux durs. Elle consiste en l'exposition à la lumière ultraviolette, à travers un masque d'une fine couche de résine photosensible étalée à la surface du wafer. Le masque est généralement une plaque transparente de quartz sur laquelle les motifs à transférer sont en chrome. Selon le type de résine utilisée (positive ou négative), les rayons vont rendre dissolvable ou non vis-à-vis d'un solvant particulier les zones irradiées. Un révélateur vient ensuite dissoudre les zones solubles. Ainsi la couche de résine réalisée sert de masque photographique pour la gravure d'un matériau situé sous la résine ou pour un dépôt. Suite à cela, la résine est complètement nettoyée de la surface.

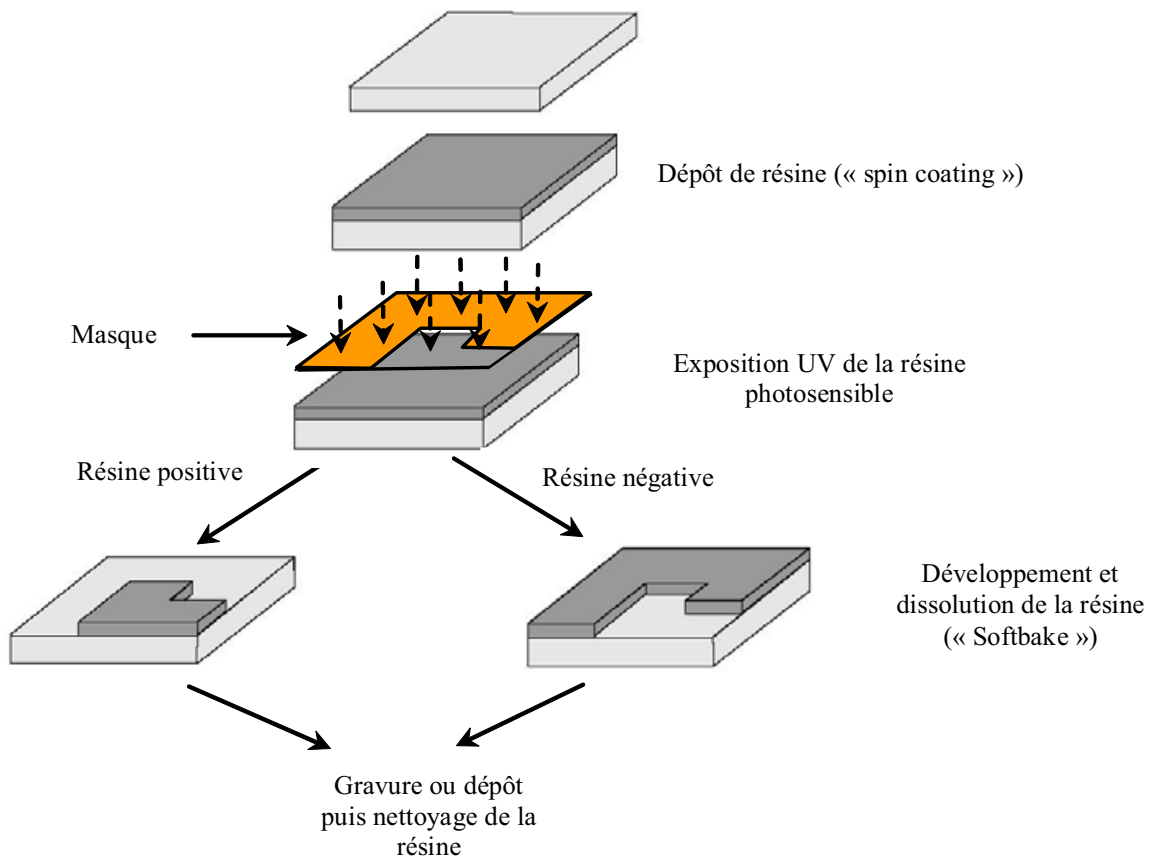


FIGURE 2.1 – Processus de photolithographie

2.2.1.2 Le dépôt de couches minces

Pour ce qui nous concerne, le dépôt de matériaux de faibles épaisseurs à la surface du substrat a plusieurs rôles importants. Il peut servir d'isolant électrique entre les électrodes. Ceci est particulièrement nécessaire lorsque le substrat utilisé est du silicium qui présente un comportement conducteur non négligeable. Ceci est en revanche moins critique pour un substrat de verre qui est un bon isolant. Les matériaux déposés peuvent également servir de support pour la structuration (par gravure) de micro-canaux ou micro-cavités ou pour la culture directe de cellules à sa surface. Enfin, c'est généralement grâce à un dépôt de métal que sont réalisées les électrodes de mesure. On notera également que parfois les matériaux déposés peuvent servir de masque pour des étapes de gravures d'autres couches. Les techniques de dépôt les plus courantes sont récapitulées ci-dessous.

2.2.1.2.1 Oxydation

L'oxydation est typiquement réalisée sur des substrats semi-conducteurs en les chauffant à des températures allant de 800 à 1200 °C dans une atmosphère contenant de la vapeur de O₂ ou H₂O. Par exemple, la réalisation d'un film d'oxyde à la surface du silicium (oxyde de silicium) par cette technique est facile et très répandue pour l'isolation de structures métalliques ou pour servir de masque à la gravure du silicium.

2.2.1.2.2 Le dépôt chimique en phase vapeur (CVD : Chemical Vapor Deposition)

Cette approche inclut toutes les techniques de dépôt qui utilisent les réactions de composés chimiques en phase gazeuse pour former des couches minces à la surface du substrat. Les réactions à l'oeuvre dans un réacteur CVD se font à basse pression (LPCVD : Low pressure Chemical Vapor Deposition), ou assistées par plasma (PECVD : Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition). Dans le premier cas, les pressions mises en jeu sont comprises entre 13.3 et 133.3 Pa et les températures entre 550 et 900 °C. Les matériaux déposés par cette technique sont généralement bien répartis sur la surface du substrat, le dépôt est conforme. La technique PECVD est réalisée dans des systèmes plasma à de plus faibles températures. C'est généralement ce qui justifie le choix de cette méthode. Les techniques CVD sont typiquement utilisées pour déposer des matériaux inorganiques comme le dioxyde de silicium, le nitrure de silicium, ou le silicium poly cristallin (poly silicium). On notera cependant que les vitesses de dépôt sont assez lentes ($\approx 1 \mu\text{m}/\text{heure}$), ce qui pose parfois un problème pour fabriquer des structure épaisses.

2.2.1.2.3 Le dépôt physique en phase vapeur (PVD : Physical Vapor Deposition)

Les techniques de dépôt physique en phase vapeur sont généralement adaptées aux dépôts de métaux. Elles font intervenir deux principes différents : l'évaporation et la pulvérisation. Dans les systèmes à évaporation, le métal qui doit être déposé est placé dans un creuset dans une chambre sous vide en vue directe du support cible (substrat). Le métal est porté à haute température et par évaporation vient se déposer à la surface du

substrat. On dépose assez facilement de l'aluminium, de l'argent, du chrome ou de l'or par cette méthode avec des vitesses de quelques $\text{\AA}/\text{s}$. La méthode de dépôt par pulvérisation est souvent préférée à la méthode d'évaporation thermique car elle permet de déposer une plus grande variété de matériaux, et leur adhérence sur le support est meilleure. Dans cette technique, le matériau source est bombardé par des ions d'Argon, ce qui a pour effet d'éjecter des atomes du matériau qui vont venir s'adsorber à la surface du substrat placé en face.

2.2.1.2.4 Dépôt électrolytique (ou galvanoplastie)

Le dépôt électrolytique est un procédé utilisé pour obtenir des couches de métal relativement épaisses ($\approx 10 \mu\text{m}$). Cette technique électrochimique consiste à appliquer une différence de potentiel entre une électrode (anode) et le substrat qui joue le rôle de cathode dans une solution contenant une forme réductible d'ions du métal à déposer. Ainsi, les ions métalliques migrent vers l'anode, y capturent des électrons, et forment des molécules qui s'adsorbent sur le substrat.

2.2.1.2.5 Dépôt par tournette ("spin coating")

Le dépôt par tournette ou "spin coating" est la technique utilisée pour déposer des polymères photosensibles qui sont souvent utilisés comme masques pour la gravure. Certains d'entre eux peuvent également servir de couches sacrificielles pour la structuration de canaux ou cavités ou même de couche de passivation pour la culture de cellules. Dans la technique de dépôt par tournette, le substrat est déposé sur un disque tournant à grande vitesse (entre 1000 et 10000 tours/minute), quelques gouttes de la résine sont déposées au centre du substrat, et par force centrifuge celle-ci va alors l'étaler sur toute la surface. L'épaisseur et l'homogénéité de la couche de résine dépendent de la vitesse de centrifugation, de la viscosité de la solution ainsi qu'à un certain degré, de la température et de l'humidité ambiante. L'étape de "spin coating" est généralement suivie par un recuit de la résine ("softbake") pour réduire les solvants retenus dans le polymère, améliorer l'adhésion sur le substrat, la photosensibilité et la résistance de la couche.

2.2.1.3 La gravure

La gravure permet de modeler toutes sortes de structures en surface sur les couches minces (micro-usinage de surface) ou en profondeur dans le substrat (micro-usinage de volume) en attaquant différents matériaux suivant les masques définis à la lithographie. Pour la réalisation d'une puce d'analyse de cellules biologiques par exemple, c'est cette étape qui va permettre de créer un canal ou des cavités pour héberger les cellules. La performance d'une gravure se mesure principalement selon deux critères qui sont la sélectivité et la directivité. La sélectivité traduit le degré avec lequel le procédé de gravure utilisé permet d'attaquer le matériau à graver tout en laissant intact le matériau réalisant le masque. La directivité quant à elle indique le profil de gravure en dessous du masque. Dans une gravure isotrope, la gravure attaque dans toutes les directions à la même vitesse, et donc crée un profil en forme de demi cercle en dessous du masque. Dans une gravure anisotrope, l'attaque dépend de la direction, et donc des parois latérales verticales peuvent être réalisées. Les techniques de gravure peuvent être classées en deux grandes familles : les gravures humides et les gravures sèches. Les gravures humides sont en général isotropes et sélectives, les gravures sèches sont moins sélectives mais présentent une meilleure anisotropie.

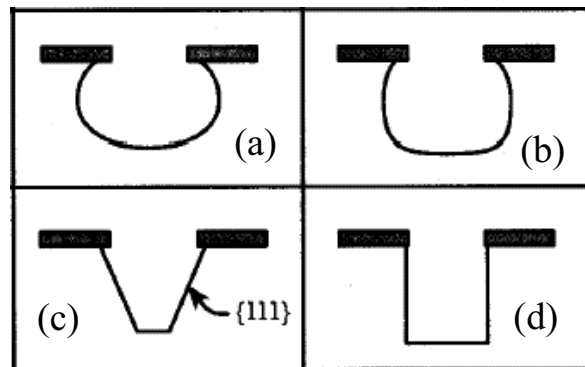


FIGURE 2.2 – Différents profils de gravure pouvant être obtenus - (a) gravure humide isotrope - (b) gravure sèche isotrope - (c) gravure humide anisotrope (sur silicium uniquement) - (d) gravure sèche anisotrope

2.2.1.3.1 Gravure humide

Les gravures humides consistent à utiliser différentes solutions chimiques en phase liquide pour attaquer le matériau. Les solutions couramment utilisées sont des acides comme l'acide fluorhydrique (HF) pour l'oxyde de silicium (SiO_2) et le verre, le HNA (mélange HF/ HNO_3 / CH_3COOH) pour le silicium, l'acide phosphorique (H_3PO_4) pour le nitrure de silicium et l'aluminium, ou encore l'acide perchlorique (HClO_4) pour le chrome.

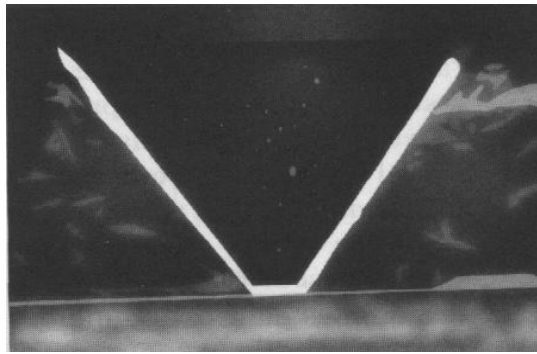


FIGURE 2.3 – Profil de Gravure anisotrope du Silicium (attaque au KOH) d'après [Pat03]

Le plus souvent, la gravure humide donne un profil isotrope en dessous du masque (Fig 2.2 (a)). Néanmoins, sur le silicium, des gravures humides anisotropes sont possibles du fait des orientations cristallines de ce dernier. En effet certaines solutions liquides attaquent le silicium préférentiellement dans certaines orientations cristallines. La gravure humide anisotrope du silicium permet ainsi d'obtenir des parois planes mais trapézoïdales (Fig 2.3). Elle est très utilisée dans la fabrication des microsystemes. Les solutions les plus utilisées pour ce type de gravure sont l'hydroxyde de potassium (KOH), l'éthylène diamine pirochathécol (EDP), ou l'hydroxyde de tétra-méthyle ammonium (TMAH).

2.2.1.3.2 Gravure sèche

La gravure sèche est l'attaque d'un substrat par une espèce ionique contenue dans une phase gazeuse ou un plasma. Ce type de gravure est très riche : suivant les conditions de gravure, les formes obtenues peuvent être anisotropes ou isotropes avec une anisotropie contrôlée par le système et non par la structure cristalline. On peut par exemple graver des canaux droits dans du verre. Cependant la sélectivité est en général moins bonne que

les gravures humides. Les quatre techniques principales de gravure sèche sont la gravure ionique (IM : Ion Milling), la gravure plasma haute pression (HPPE : High-Pressure Plasma Etching), la gravure ionique réactive (RIE : Reactive Ion Etching), la gravure profonde ionique réactive (DRIE : Deep Reactive ion Etching). La figure 2.4 illustre les différents principes mis en oeuvre par ces techniques de gravure.

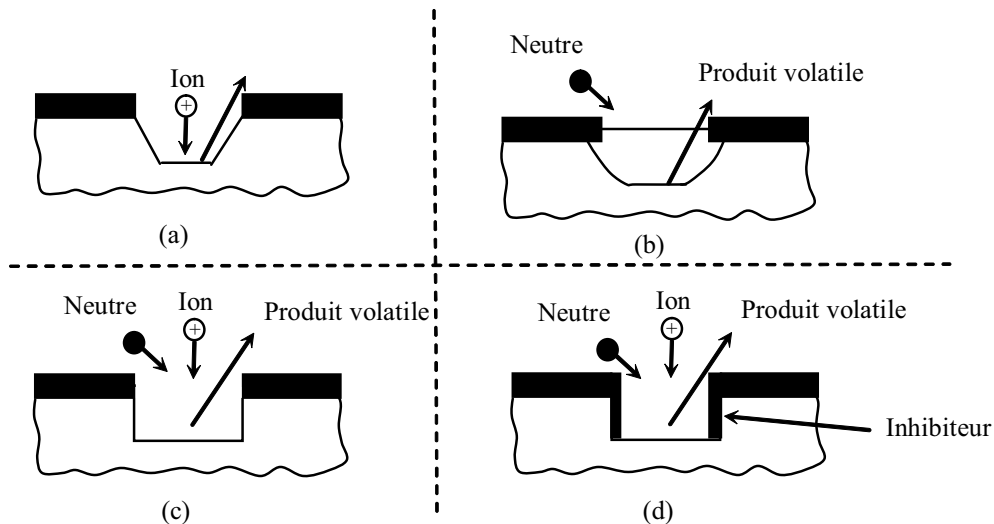


FIGURE 2.4 – Différents principes mis en jeu dans les gravures sèches - (a) Bombardement ionique : Ion Milling - (b) Réaction chimique : HPPE - (c) Bombardement ionique + réaction chimique : RIE - (d) Bombardement ionique + réaction chimique avec protection des parois (DRIE) d'après [Pat03]

Gravure ionique (IM) La gravure ionique (IM) est un processus purement physique (Fig 2.4 (a)). Des ions (d'Argon en général) sont accélérés par un champ électrique dans une chambre à basse pression, et bombardent la surface de la cible. Il en résulte un effet de gravure par l'action physique du flux d'ions incidents. Ce type de gravure est anisotrope, peu sélectif et assez lent (0.6 à 18 $\mu\text{m}/\text{heure}$).

Gravure Plasma haute pression (HPPE) La gravure HPPE est une gravure chimique. Des espèces sont créées dans une chambre haute pression (13 - 670 Pa) et réagissent avec le matériau à creuser (Fig 2.4 (b)). Les produits de la réaction sont

volatiles et donc se diffusent plus loin. Du fait des réactions chimiques, la gravure est isotrope.

Gravure ionique réactive (RIE) Les techniques RIE sont très répandues. Ici, les processus physiques et chimiques sont combinés (Fig 2.4 (c)). Les espèces chimiques réagissent avec le matériau uniquement lorsque la surface est activée par la collision des ions du plasma. La directivité des ions produit beaucoup plus de collisions avec les surfaces horizontales qu'avec les parois. Ainsi, des structures avec des flancs verticaux peuvent être obtenues avec cette gravure plus rapidement ($\approx 6 \mu\text{m}/\text{heure}$) qu'avec la gravure physique seule.

Gravure ionique réactive profonde (DRIE) Pour améliorer encore l'anisotropie de la technique précédente, dans certains cas, des méthodes de passivation des parois sont utilisées pendant la gravure. Dans les appareillages DRIE, un second gaz est utilisé dans la chambre de réaction. Il est injecté périodiquement et dépose un polymère dans la tranchée qui n'est gravée que par la composante physique de la gravure (bombardement ionique). Le polymère restant protège les flancs verticaux et permet ainsi d'obtenir de très grands rapports d'aspects (30 :1) avec des vitesses de gravure de l'ordre de 120 à 180 $\mu\text{m}/\text{heure}$.

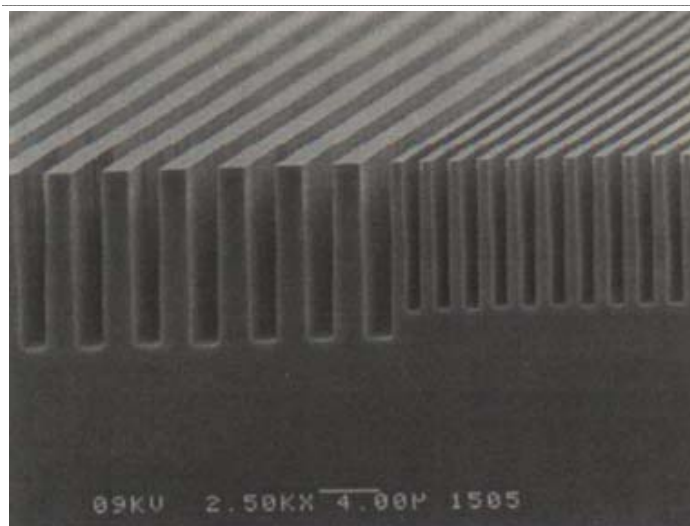


FIGURE 2.5 – Exemple de structure silicium obtenue par DRIE. Les canaux font $2.5 \mu\text{m}$ de large et $25 \mu\text{m}$ de profondeur. D'après [MB99]

2.2.1.4 Collage de substrat (" wafer bonding ")

Le collage de substrats joue un rôle fondamental dans la fabrication des microsystèmes. Il est souvent utilisé pour fabriquer des structures complexes en 3D. Dans le cas d'un microsystème appliqué aux cellules biologiques, le rôle du collage sera principalement de fermer le canal ou réservoir créé afin d'avoir un système étanche pour l'acheminement des cellules. Les deux techniques les plus utilisées pour le collage de substrats de verre ou de silicium sont le collage anodique et le collage par fusion. Dans les deux cas, l'opération se déroule en trois phases : la préparation de la surface, la mise en contact sous pression et le recuit. La première étape est d'importance cruciale car la qualité du collage dépend énormément de la qualité de la surface. Une particule de $1 \mu\text{m}$ à l'interface peut créer une zone de non contact de 1 cm de diamètre. Les deux techniques de collage sont illustrées en Fig 2.6 et succinctement décrites dans le paragraphe qui suit.

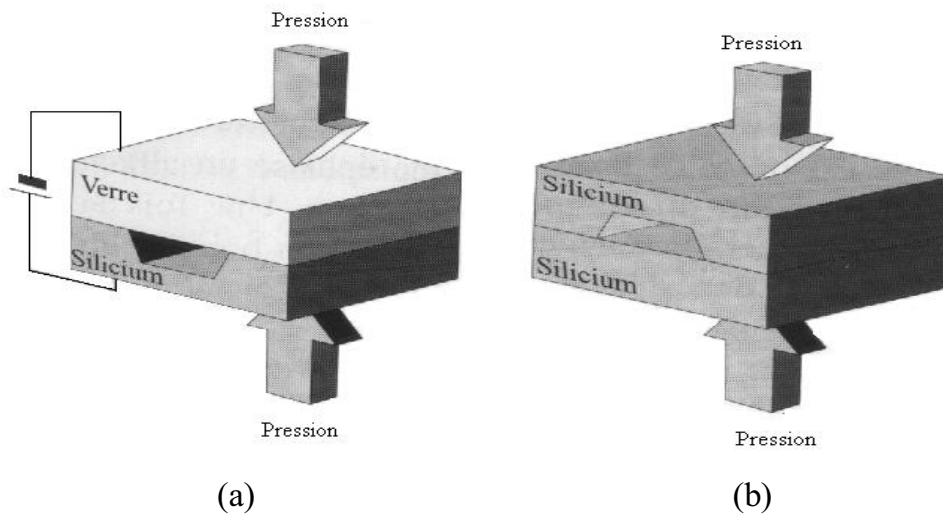


FIGURE 2.6 – - Fermeture d'une cavité par collage de substrats - (a) Collage anodique verre-silicium - (b) Collage silicium-silicium par fusion. D'après [Sal02]

2.2.1.4.1 Collage par fusion

Le collage par fusion est une technique employée pour fusionner deux matériaux à température élevée. Une large variété de matériaux peuvent être collés par cette méthode. Pour des substrats de silicium, le procédé basique consiste à mettre en contact les deux

wafers et cuire au four à plus de 1000 °C. Le principal inconvénient de la technique est la température élevée nécessaire. Cela empêche l'utilisation de certains matériaux et procédés avant cette étape. Les wafers doivent absolument être propres, lisses et plats avant le collage.

2.2.1.4.2 Collage anodique

Le collage anodique est typiquement adapté pour le collage d'un matériau conducteur ou semi-conducteur (silicium) avec du verre riche en sodium. Le substrat de verre est placé au dessus du substrat de silicium, le tout étant chauffé à une température d'environ 450 °C. A ces températures, le verre est légèrement conducteur. Une différence de potentiel d'environ 1 kV est appliqué à l'ensemble. Les ions positifs Na^+ du verre migrent sous l'effet du champ et créent une zone de déplétion à l'interface verre-silicium. La différence de potentiel dans cette région crée un champ intense qui pousse les plaques en contact intime. L'oxygène du verre est alors transporté vers la jonction et forme une fine couche de d'oxyde de silicium (SiO_2) qui soude les matériaux. Les avantages de cette méthode sont la plus faible température utilisée, le faible stress résiduel, et des conditions moins rigoureuses pour le traitement des surfaces avant le collage.

2.2.1.5 Report de contact (" wire bonding ")

Typiquement, un microsystème adapté à la mesure d'impédance doit intégrer des microélectrodes. Leur rôle est l'excitation par une tension ou un courant électrique , et la mesure d'un courant ou d'une tension résultant de l'excitation. Ces microélectrodes doivent être interfacées avec un circuit de conditionnement électronique. Pour cela des fils électriques doivent généralement être soudés sur les dépôts métalliques du substrat et connectés à des supports macroscopiques (boîtier, connecteur, circuits intégrés, etc..). La technique la plus répandue pour ce faire est la soudure thermosonique (" ball bonding "). Cette méthode utilise la chaleur et des ultrasons pour créer une soudure métallurgique. Le fil de connexion le plus souvent en or ou en aluminium (diamètre standard = 25 μm) est inséré dans un capillaire placé au dessus du pad. Une boule est formée au bout du fil par chauffage ($100\text{ °C} < T < 500\text{ °C}$), puis une pression est exercée par le capillaire, ce qui

écrase la boule sur le pad. Enfin, une vibration ultrasonore est appliquée, le capillaire est déplacé et la même procédure est reproduite sur l'autre pastille puis le fil est sectionné. Le procédé est illustré sur la figure Fig 2.7.

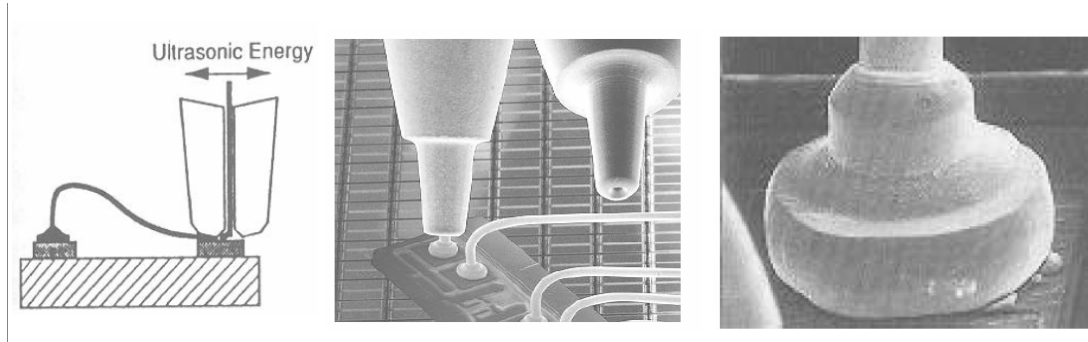


FIGURE 2.7 – - Report de contact par la technique du " ball bonding " (soudure thermo-sonique)

2.2.2 Technologies molles (plastiques)

Historiquement, le silicium et le verre ont été abondamment utilisés pour réaliser des microsystèmes. Les technologies associées sont bien établies et permettent de fabriquer une grande variété de micro-objets. Néanmoins, de plus en plus d'efforts sont consacrés aux développements de technologies alternatives à base de polymères (technologies molles ou technologies plastiques). Les polymères sont plus économiques (100 fois moins cher que le silicium par unité de poids) et peuvent être usinés assez facilement et rapidement. Ils peuvent exister dans un état dur (état vitreux) ou mou (état caoutchouteux). De plus, ils constituent une bonne interface vis-à-vis des milieux biologiques. Une grande variété de technologies de structuration des polymères sont apparues ces dernières années. On peut les classer en deux grandes familles : les techniques directes, pour lesquelles chaque micro-objet est fabriqué séparément, et les techniques de réplcation, ou les structures sont formées à partir d'un moule de base ("master"). Dans le paragraphe suivant, quelques techniques directes seront rapidement décrites, puis les trois principales méthodes de réplcation seront présentées : le moulage, le matriçage et la micro-injection.

2.2.2.1 Techniques directes

Les techniques les plus répandues pour le micro-usinage direct des plastiques sont la micro-stéréolithographie et l'ablation laser. Ces méthodes s'appliquent principalement à la réalisation de petites séries (prototypes).

2.2.2.1.1 Micro stéréo-lithographie

Ici, on polymérise des résines photosensibles couche après couche, en appliquant un spot laser UV. Les matériaux usinés sont des résines époxy et des acryliques. Cette technique est complexe à mettre en oeuvre. L'équipement inclut un contrôle sophistiqué du mouvement du faisceau. La précision est de l'ordre de quelques microns. Néanmoins, elle constitue la méthode de micro-fabrication tridimensionnelle la plus achevée à ce jour. Un exemple remarquable de l'utilisation de cette technique est donné en Fig 2.8.

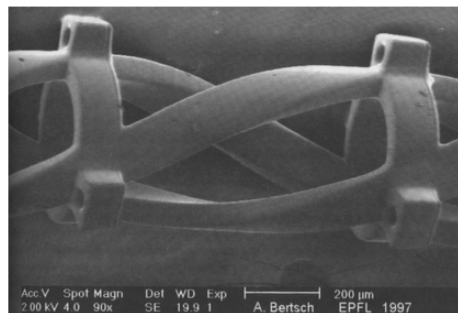


FIGURE 2.8 – - Exemple de structure réalisée par Micro stéréolithographie. D'après [Pat03]

2.2.2.1.2 Ablation laser

Dans cette technique, le matériau est sublimé par l'application localisée d'un faisceau laser intense. Les lasers utilisés sont des lasers UV et femtoseconde. La précision est de l'ordre de quelques microns et la rugosité des surfaces de 200 à 500 nm. La taille minimale pouvant être obtenue est limitée par la diffraction et le transport de chaleur et de masse. Sur la figure 2.9, on peut observer quelques exemples de microstructures réalisées par ablation laser.

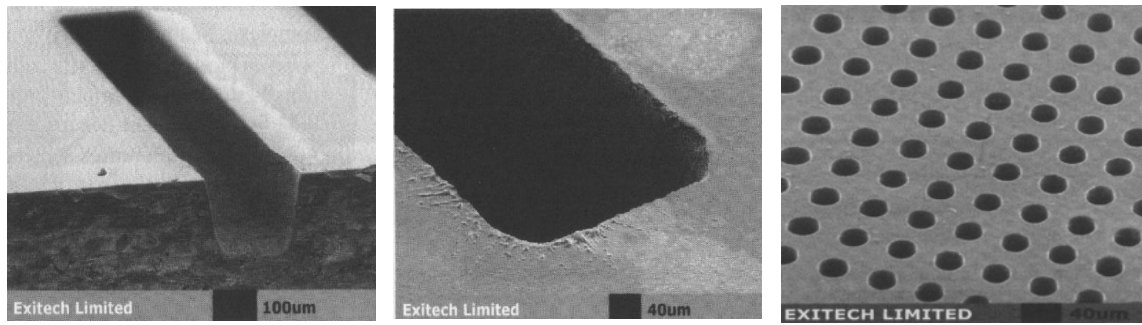


FIGURE 2.9 – - Exemple de structure réalisée par ablation laser. D'après [Pat03]

2.2.2.2 Techniques de réplcation

Les techniques de réplcation permettent de structurer un plastique grâce à un moule ayant la structure inverse de celle désirée (négatif). La première étape est donc la réalisation du moule généralement fabriqué via des technologies dures telles que celles décrites précédemment (cf. § 2.2.1). Le principal avantage de la technique de moulage est le faible coût associé à la fabrication. En effet, une fois le moule fabriqué, une grande quantité d'objets identiques peuvent être produits avec des coûts et des difficultés de réalisation réduites. Pour donner au plastique la forme du moule, les trois techniques les plus connues sont le moulage, le matriçage et le moulage par injection représentées en Fig 2.10.

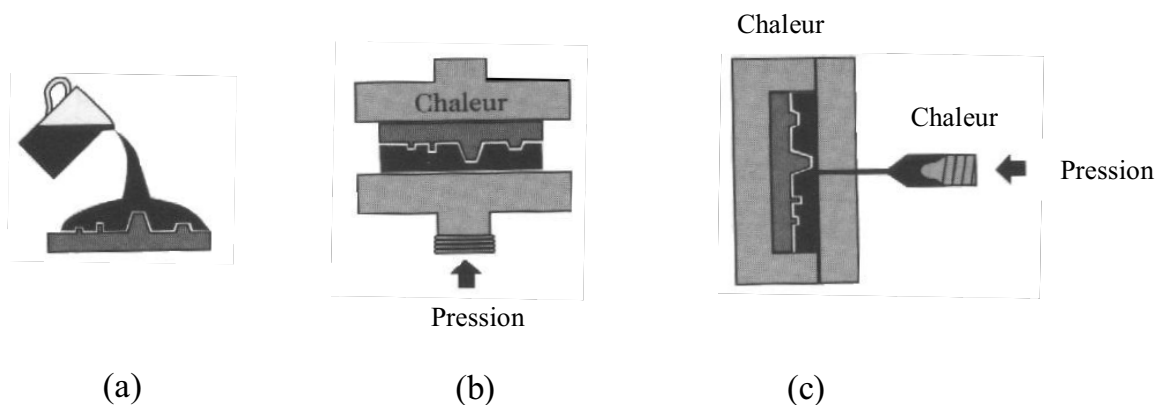


FIGURE 2.10 – - Trois principales techniques de réplcation des MEMS plastiques - (a) Moulage - (b) Matriçage - (c) Micro injection [Pat03]

2.2.2.2.1 Moulage ("Micromolding")

La technique de moulage est typiquement adaptée au prototypage rapide de structures PDMS (Polydiméthylsiloxane). Le PDMS est un élastomère qui présente des propriétés remarquables. Il est peu cher, transparent, bon isolant, biocompatible. Il présente de bonnes propriétés d'étanchéité le rendant bien adapté aux applications où des fluides doivent être manipulés (microfluidique). De plus, le PDMS peut être collé à basse température à lui-même, au verre ou au silicium grâce à un traitement par plasma d'oxygène. La première étape pour la fabrication d'une structure PDMS par moulage est la fabrication du moule. Le moule peut être fabriqué en silicium par les technologies évoquées précédemment, en métal électrodéposé, ou encore à base d'un polymère réticulé comme le SU8. Ensuite vient l'étape du moulage proprement dit. Le mélange comprenant le PDMS et un agent réticulant sont versés sur le moule (voir Fig. 2.10 (a)). L'ensemble est porté à température modérément élevée (70 °C). Pendant cette phase, le PDMS polymérise, réticule et le mélange devient solide. La structure peut ensuite être démoulée soigneusement. On obtient ainsi un objet représentant la structure du moule mais en négatif. On remarquera que, si la fabrication du moule nécessite souvent le recours à une salle blanche et à des équipements spécifiques, le moulage, lui, peut s'effectuer dans une atmosphère ordinaire, dont la température et le degré d'hygrométrie sont grossièrement contrôlés, ce qui permet un prototypage assez rapide. Plusieurs structures peuvent être collées ensemble pour former des réseaux microfluidiques 3D. La précision des structures obtenues est bonne. Il a été montré qu'il est possible d'obtenir des structures légèrement submicrométriques. On considère cependant, compte tenu du caractère élastomère du matériau et de phénomènes de vieillissement, que des dimensions de microcanaux plus adaptées aux caractéristiques du PDMS se situent entre 5 et 500 μm . Le PDMS permet d'obtenir des géométries à rapport d'aspect élevé. Cependant, à cause de la déformabilité du PDMS, la plupart des réalisations microfluidiques donnent lieu à des rapports d'aspect, pour les microcanaux, par exemple supérieurs à 1/10.

2.2.2.2.2 Matricage ("hot embossing")

Le matériau principalement utilisé pour cette technique est le PMMA (Polyméthacrylate de méthyle).

thacrylate), qui à l'état solide, ressemble à un plastique transparent, comme le plexiglas. Porté à température modérément élevée (≈ 170 °C), et soumis à des contraintes de quelques dizaines de bars, le matériau peut se déformer considérablement. De cette façon, il est possible d'imposer une structuration à partir d'un moule s'appuyant à l'intérieur d'une presse, sur une plaque de PMMA contrôlée en température (Fig 2.10 (b)). Le moule est fabriqué dans un matériau rigide comme le silicium ou un métal. Les motifs obtenus peuvent avoir une précision remarquable, de l'ordre de quelques nm. L'épaisseur des structures a une grande étendue (de quelques nm au mm), et les facteurs de forme peuvent être élevés (plusieurs centaines). Cette technique est bien appropriée au prototypage et aux productions de moyennes séries. Elle bénéficie d'un savoir faire important acquis dans le domaine de la plasturgie sur des dizaines d'années.

2.2.2.2.3 Micro-injection

La micro-injection est une technique héritée de la plasturgie. Le matériau plastique liquide est injecté dans un moule sous vide et sous pression (Fig 2.10 (c)), à température supérieure à la température de transition vitreuse du plastique considéré. Le système est ensuite refroidi au dessous de la température de transition, puis la pièce devenue solide démoulée. La technique est lente, les moules sont délicats à réaliser, et l'optimisation est complexe. Néanmoins, cette technique est intéressante du point de vue industriel, pour les productions de série. Elle bénéficie par ailleurs d'un savoir-faire important dans le domaine de la plasturgie, et, dans un certain nombre de cas, il suffit de modifier légèrement des machines existantes pour développer une production de masse.

2.2.3 Conclusion partielle

Dans cette première partie, un rapide tour d'horizon des microtechnologies associées à la fabrication d'un microdispositif de mesure a été fait. Une grande partie des techniques énoncées est issue des procédés industriels standards hérités de la microélectronique. Aujourd'hui, ces approches deviennent adaptées à la réalisation des microdispositifs mixtes intégrant des fonctions électriques, chimiques, microfluidiques, biologiques et autres. Ont ensuite été présentées des technologies alternatives plus récentes basées sur la microstruc-

turation de polymères (technologies molles). Pour les applications biologiques, celles-ci sont avantageuses de par la biocompatibilité des matériaux utilisés, le prototypage rapide rendu possible, ou encore pour la réalisation de microdispositifs à usage unique, du fait des faibles coûts des matériaux utilisés. Dans la suite du chapitre, nous aborderons plus spécifiquement les aspects métrologiques liés à la manipulation et la caractérisation de cellules biologiques au sein d'un micro-dispositif avant de décrire des applications concrètes de caractérisation à l'échelle cellulaire.

2.3 Positionnement des cellules biologiques

Une étape préalable à la mesure d'impédance est le positionnement de l'échantillon à analyser dans la zone de mesure constituée principalement par les électrodes d'excitation et de mesure (confondues ou séparées). La manipulation des cellules biologiques est une étape délicate, car celles-ci sont très sensibles et un simple contact peut entraîner une chaîne de réactions complexes. Nous décrirons dans ce paragraphe trois solutions assez différentes les unes des autres pour le déplacement et le positionnement de cellules. La première est une approche dynamique en ce sens que la cellule ne peut pas être immobilisée et ne nécessite pas de contact entre les électrodes et les échantillons. La deuxième solution est une méthode de positionnement statique (la cellule est immobilisée) et il y a contact entre l'électrode de mesure et la cellule mesurée (adhésion). Enfin la dernière méthode permet des mesures dynamiques ou statiques et sans contact (lévitation).

2.3.1 Focalisation hydrodynamique

La ou les particules(s) à analyser sont généralement en suspension dans un fluide électrolyte. Pour pouvoir faire des mesures sur des échantillons particulièrement petits, on applique souvent le principe de focalisation hydrodynamique [LHK⁺01] [WN05] [19775] [RTMSG07]. Ce principe se retrouve notamment dans des composants de type "micro Coulter Counter" [GSR01] pour le comptage et la détermination de la taille de particules. Par cette méthode, les caractéristiques d'écoulement du flux d'échantillons à analyser peuvent être contrôlées par des flux s'écoulant de chaque côté de ce dernier (Fig 2.11).

Généralement deux flux différents sont utilisés pour la focalisation, un liquide conducteur

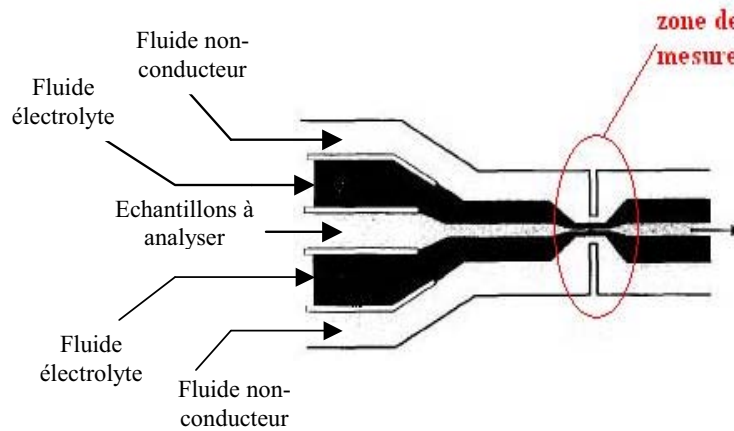


FIGURE 2.11 – Focalisation hydrodynamique

et un autre non-conducteur. En fonction du débit imposé pour ces deux fluides, le débit et la largeur du flux central contenant les particules en suspension peuvent être contrôlés dans le micro-canal. De cette manière il est possible de réduire l'épaisseur du faisceau central aux dimensions d'une seule particule et donc de faire des mesures sur des cellules individuelles. Cette méthode, et plus généralement les méthodes hydrodynamiques, nécessitent des outils performants pour le contrôle précis des flux dans des micro-canaux.

2.3.2 Positionnement par aspiration

D'autres techniques de positionnement existent. Par exemple, l'équipe de Hagen Thielecke [TSB⁺99] a proposé une méthode rapide de positionnement de cellules individuelles sur une matrice d'électrodes.

Les microélectrodes utilisées sont cylindriques et des micro-trous sont créés au milieu de chacune d'entre elles (Fig 2.12) pour pouvoir provoquer l'aspiration des cellules depuis la partie inférieure du dispositif. La figure 2.13 illustre la méthode de positionnement des cellules.

Les cellules sont insérées par la partie supérieure du dispositif et immédiatement après, une succion est provoquée sous la matrice, les cellules sont aspirées et étant de taille supérieure au diamètre des micro-trous, se positionnent sur les électrodes. La force d'aspiration

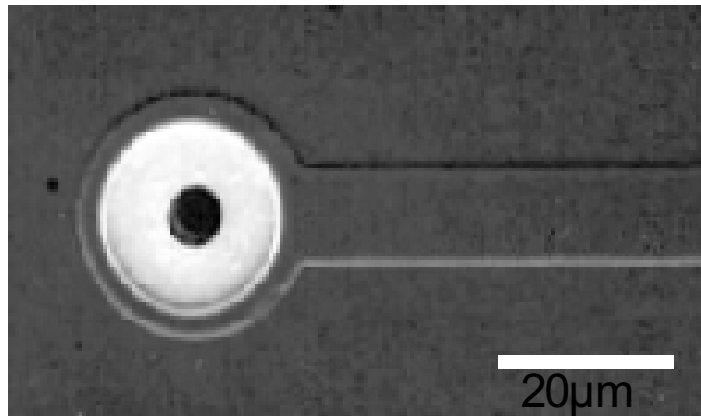


FIGURE 2.12 – Micro-électrode intégrant un trou d’aspiration au centre [TSB⁺99]

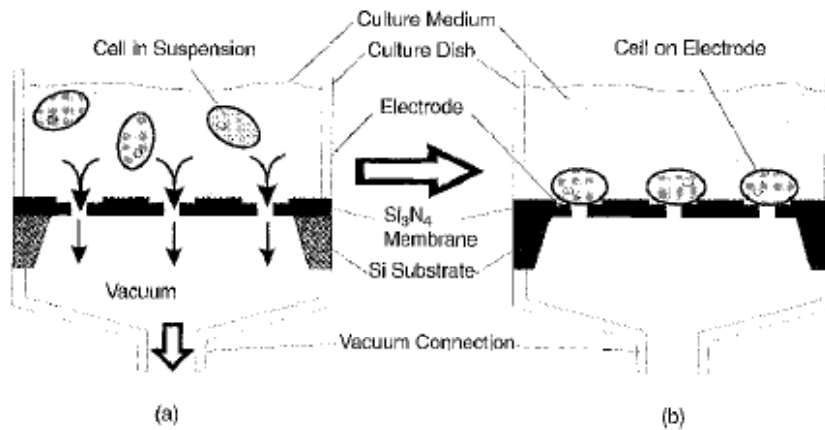


FIGURE 2.13 – Positionnement des cellules en suspension - (a) vue en coupe du dispositif avec les cellules en suspension - (b) vue en coupe du dispositif après le positionnement des cellules. D’après [TSB⁺99]

doit être contrôlée avec précision pour éviter des dommages sur les cellules (chocs sur bords des électrodes, ou pression hydrodynamique trop forte). Un des avantages de ce type de positionnement est qu’il permet d’acheminer des cellules en parallèle et donc d’utiliser des dispositifs de mesure à géométrie matricielle. Dans cette technique de mesure, il y a un contact entre la cellule et l’électrode et un phénomène d’adhésion entre les deux matériaux se produit [Bor98]. Une fois ce processus initié, toute manipulation artificielle de la cellule peut entraîner des dommages irréversibles. La rapidité du positionnement présenté

ici permet d'assurer que la cellule soit complètement positionnée sur l'électrode avant que le phénomène d'adhésion ne se produise. Cette méthode peut par exemple permettre de créer des réseaux organisés de cellules car le positionnement est maîtrisé avant même que la culture puisse se développer. Typiquement, l'approche est adaptée pour le contrôle de l'activité électrique de cellules individuellement isolées sur les électrodes [GLK⁺07], car elle permet un bon couplage électrode-cellule.

2.3.3 Lévitiation par cages électromagnétiques

Même si les techniques utilisées pour le déplacement et le positionnement des cellules font souvent intervenir des procédés hydrodynamiques, il existe quelques alternatives. Une méthode plus douce pour les cellules est possible par l'utilisation de champs électromagnétiques. Il s'agit de la diélectrophorèse, qui est la capacité de polariser des particules diélectriques dans un champ électrique non uniforme et ainsi de générer des forces d'attraction ou de répulsion sur cette particule [Poh78] [Pet96] [PM97] [GV02]. Le principe de base de manipulation d'une particule par diélectrophorèse est représenté en Fig 2.14.

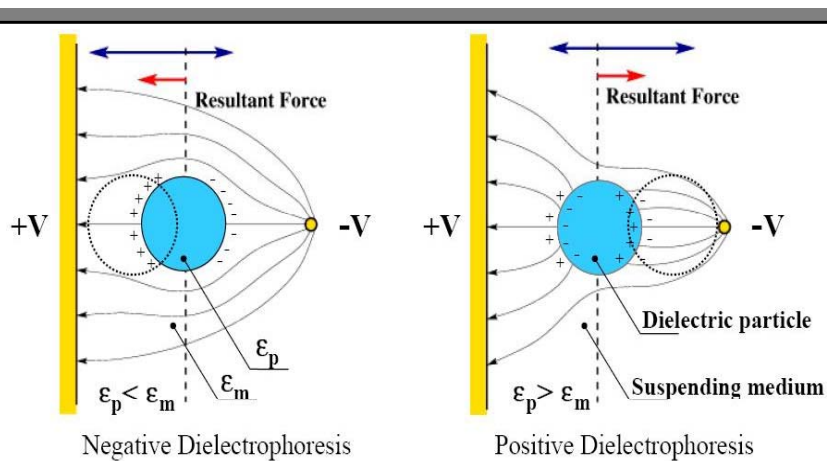


FIGURE 2.14 – Principe de base des forces diélectrophorétiques [MMT⁺02]

Selon les propriétés diélectriques des particules et du milieu de suspension, des forces différentes peuvent être appliquées. Ces propriétés électriques étant intimement liées à la fréquence, la variation de la fréquence peut permettre de séparer des particules de nature différentes. Les cellules biologiques sont relativement insensibles aux rayonnements

électromagnétiques dans le domaine des radiofréquences. Avec de telles techniques les cellules peuvent être piégées dans des "cages électromagnétiques" et ainsi être maintenues en lévitation ou déplacées dans des micro-canaux sans subir de contact. Un manipulateur basé sur ces techniques a notamment été décrit par G. Medoro et associés [MML⁺03] en technologie CMOS. G. Medoro et associés combinent par l'utilisation de rayonnements électromagnétiques des fonctionnalités de piégeage, déplacement ou de séparation sur des critères diélectriques [MMTG00]. Dans le même ordre d'idée, citons le projet européen Medics qui concerne la réalisation d'un prototype de manipulation de cellules individuelles sur ce principe. Le prototype est constitué d'une matrice de 320×320 électrodes (soit plus de 100 000 électrodes), sur une surface de 0.4 cm^2 . Des milliers de cages indépendantes peuvent ainsi être créées sur la structure pour déplacer et trier des cellules dans le dispositif sans contacts mécaniques et sans altérer les fonctions vitales des cellules [FRF⁺06]. Ce type de manipulation par champs alternatifs commence à se développer de plus en plus au sein des microsystèmes [FSSF98] [MHG99] [FFLP⁺03]. Les principaux avantages pouvant être cités sont :

- L'absence de contact mécanique avec les cellules. En ce sens, la technique est réellement "douce" pour les cellules et n'altère pas les fonctions vitales.
- La flexibilité d'usage. En effet, les cages électromagnétiques permettant de déplacer les cellules peuvent être reconfigurées à volonté par simple automatisation des séquences d'excitation des électrodes via un dispositif électronique. De plus, la technique ne nécessite pas de flux de liquide.
- La manipulation individuelle des cellules.

2.3.4 Conclusion partielle

Nous avons abordé dans ce paragraphe des approches envisageables (liste non exhaustive) pour la manipulation de cellules individuelles au sein d'un micro-système de mesure. Bien qu'elles ne concernent pas directement la mesure des paramètres électriques de cellules, ces considérations sont importantes puisque le positionnement adéquat de l'échantillon à caractériser au sein d'une configuration d'électrodes donnée est une étape préliminaire primordiale pour pouvoir espérer obtenir une mesure pertinente, et à ces

échelles, le positionnement de l'échantillon n'est pas une étape anodine comme il pourrait l'être dans un système macroscopique.

2.4 L'interface micro-électrodes-cellule biologique

2.4.1 Introduction

Dans ce paragraphe nous abordons succinctement quelques contraintes liées à l'interface d'une microélectrode avec un milieu biologique, puis nous donnons finalement un modèle électrique équivalent de cette interface. Précisons ici que l'objectif n'est pas de faire une revue bibliographique des techniques de mesure de la bioimpédance qui ont déjà été abondamment décrites dans la littérature, et qui, dans bien des cas, sont applicables dans les approches microscopiques. De plus amples détails sur les différents types de réalisations adaptées à la mesure de cellules seront donnés au paragraphe suivant.

2.4.2 Impédances d'interface métal-milieu

Lorsqu'une électrode est immergée dans un électrolyte, une impédance apparaît à l'interface. Les mécanismes à l'origine de cette impédance sont complexes et des modèles électriques plus ou moins complexes peuvent être utilisés pour la décrire [Bor98] [MJ91] [MLM⁺95] [Scw63]. Toujours est-il que, dans bien des cas, la présence de ces impédances limite l'investigation possible des milieux à caractériser. On retiendra simplement que l'impédance de polarisation dépend de plusieurs facteurs. Ce sont principalement la nature du couple métal-électrolyte, l'état de surface des électrodes, leur géométrie, la densité de courant les traversant et la fréquence d'excitation.

2.4.2.1 Influence de la surface des électrodes

L'impédance de polarisation diminue quand la surface de l'interface électrode-électrolyte augmente. Elle peut donc être minimisée en utilisant des électrodes de relativement grandes dimensions. Ceci est contradictoire avec notre objectif de microspectromètre (par exemple dans le cas de l'étude de cellules individuelles). Une alternative à cette première

solution consiste généralement à déposer une fine couche de métal supplémentaire sur l'électrode de telle sorte que cette couche ait un profil rugueux. De cette façon, la surface effective de l'interface peut être augmentée sans modifier les dimensions géométriques. Souvent, on utilise du platine déposé par un procédé électrolytique. On parle alors de dépôt de " platine noir " car la surface obtenue est visuellement sombre. Des dépôts de ce type peuvent facilement réduire l'impédance de polarisation d'un facteur 2 [Bor98] [PNMR07].

2.4.2.2 Influence du couple métal-électrolyte

L'impédance de polarisation dépend largement du couple métal-électrolyte. L'électrolyte ne pouvant être contrôlé que dans certaines limites, le choix du matériau constituant l'électrode est primordial. De plus, le matériau doit être biocompatible. De multiples matériaux, métaux ou alliages ont déjà été utilisés pour réaliser des électrodes de mesure de bioimpédance. Ce sont par exemple l'inox, le platine, le platine noir, l'argent, le palladium, l'aluminium, le rhodium, le cuivre, l'or, le carbone vitreux, les fibres de carbone, le Tantale, le Titane, l'Iridium ou la céramique. Les métaux les plus adaptés aux mesures de bioimpédance se révèlent être le platine noir et l'or.

2.4.2.3 Influence de la densité de courant

Lorsque la densité de courant est relativement faible, une relation linéaire peut être considérée entre la tension et le courant à l'interface. Au dessus d'une certaine limite variant de 1 à 10 mA/cm² selon le système en présence, l'impédance de polarisation devient dépendante de la densité de courant appliquée, et des non linéarités apparaissent alors.

2.4.2.4 Dépendance fréquentielle

Globalement, l'impédance de polarisation diminue lorsque la fréquence augmente, et dans la majorité des cas, elle est négligeable pour des fréquences supérieures à 100 kHz. En pratique, pour une configuration donnée, la dépendance fréquentielle de l'impédance

de polarisation est assez bien représentée par la relation empirique [RMC96] :

$$\underline{Z}_p = Z_0(j\omega)^{-\beta} \quad (2.1)$$

Ou ω est la pulsation (en *rad/s*), Z_0 est la valeur du module d'impédance pour $\omega = 1$ et β une constante comprise entre 0 et 1, avec une valeur typique de 0.8 pour de nombreuses électrodes. Ce coefficient dépend étroitement de l'état de surface des électrodes.

2.4.2.5 Méthodes de correction des impédances de polarisation

L'impédance à l'interface métal-milieu constitue une contrainte métrologique pour la caractérisation d'un milieu par spectroscopie d'impédance, spécialement aux basses fréquences. En pratique, des solutions existent pour la réduire ou limiter son influence sur la mesure. Le choix du matériau des électrodes, l'élargissement ou le traitement de leur surface permet de limiter les impédances d'interfaces. Néanmoins, l'ajustement de ces paramètres n'est parfois pas suffisant, ou tout simplement pas possible (ex : la surface des microélectrodes doit être adaptée aux dimensions du microsystème et des échantillons à caractériser). Dans ce cas, des techniques de correction peuvent être employées pour limiter son effet. Ce sont par exemple la technique de variation de la distance inter-électrodes [Sch63] qui consiste à réaliser deux mesures distinctes sur le même milieu avec des distances inter-électrodes différentes. Les impédances d'interfaces étant censées être identiques entre les deux mesures (mêmes électrodes, mêmes surfaces, même milieu), il est possible de les éliminer en faisant la différence des deux mesures. Cette méthode peut être efficace, mais sa mise en oeuvre est parfois contraignante. Une autre méthode de correction couramment utilisée consiste à utiliser deux paires d'électrodes différentes pour l'excitation et la mesure. On parle d'une configuration tétrapolaire car elle fait intervenir 4 électrodes. Son principe est illustré en Fig 2.15. Avec cette approche , deux électrodes servent à injecter le courant dans l'échantillon et deux autres servent à mesurer la chute de potentiel à un endroit choisi dans le volume. Les impédances de polarisation des électrodes d'injection ne perturbent pas la mesure car elles sont seulement dans le circuit d'injection du courant. Les électrodes de mesure présentent également des électrodes de polarisation. Cependant, si l'étage amplificateur différentiel qui suit présente une grande impédance

d'entrée, la chute de potentiel aux bornes de ces impédances de polarisation peut être négligeable et donc la mesure faiblement parasitée.

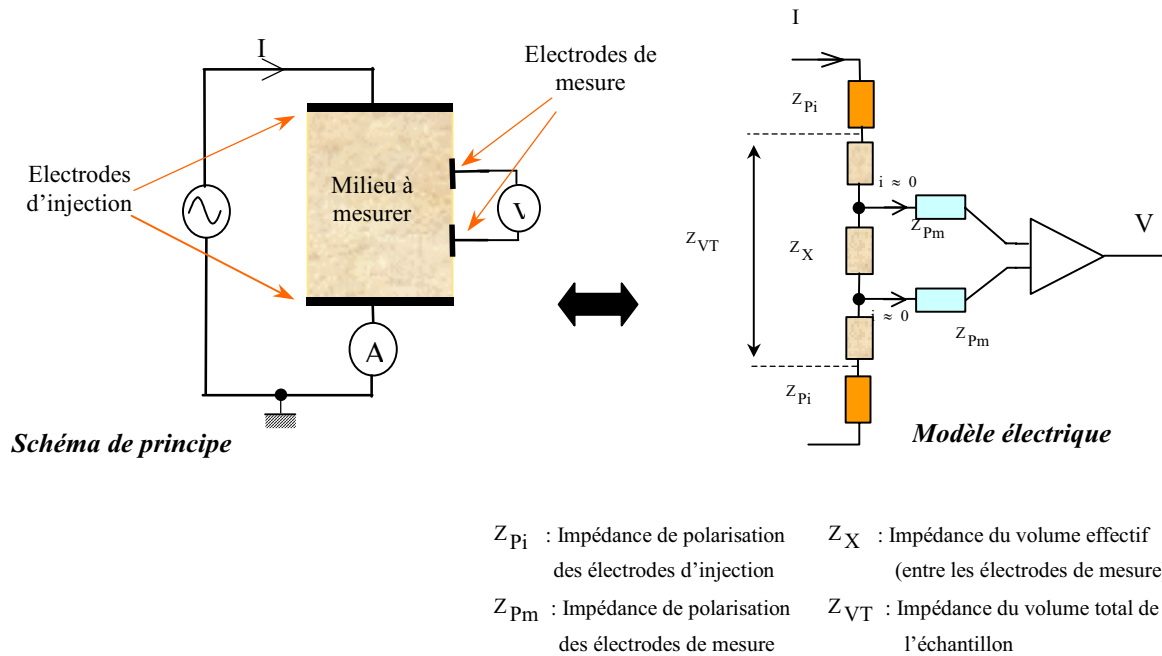


FIGURE 2.15 – Schéma de principe et modèle électrique d'une configuration tétrapolaire ou "technique des 4 électrodes" utilisée pour limiter l'influence des impédances d'interfaces

2.4.3 Géométrie d'analyse, facteur de cellule

L'écart entre les électrodes, leur forme et leurs dimensions doivent être adaptés aux contraintes géométriques intrinsèques de l'échantillon et les géométries utilisées sont généralement spécifiques. Néanmoins, quelques conditions doivent être respectées. La géométrie d'analyse doit permettre que le champ généré dans l'échantillon soit uniforme sans quoi une relation linéaire entre le courant et la tension ne peut être appliquée. Des effets de bords dus à la fuite des lignes de courants à l'extérieur du volume considéré doivent être minimisés au moment de la réalisation (isolation des électrodes avec des matériaux de faibles constantes électriques ϵ et σ , utilisation d'électrodes de gardes, etc...). Enfin, le facteur géométrique de cellule K (Equ 1.42) doit pouvoir être connu si l'on souhaite remonter aux propriétés électriques du milieu à partir de la l'impédance mesurée. Etant

donné les incertitudes liées à la fabrication et à la propagation des champs électriques dans la zone de mesure, il est parfois préférable de déterminer ce facteur par des mesures sur des produits étalons lorsque le reste de la chaîne instrumentale est bien caractérisée. Des exemples de quelques géométries utilisées pour la mesure sur des cellules seront présentés par la suite (§ 2.5).

2.4.4 Modèle électrique de l'interface électrode-cellule(s)

Nous tentons ici d'établir un premier modèle électrique simple de l'interface électrode-cellule(s). En supposant une configuration à deux électrodes, le schéma représenté en Fig 2.16 illustre quelques influences parasites pouvant gêner la mesure. Ce sont les impédances de polarisation, le sérum physiologique de suspension des ou de la cellule(s), et les effets de bords liés à la fuite des lignes de courant hors du volume considéré. Même si le modèle électrique présenté peut subir des changements en fonction de la configuration des électrodes (ici la configuration est de type " condensateur plan "), il permet néanmoins d'indiquer les principales sources d'erreur de la mesure. En se basant sur ce modèle, on peut établir plusieurs conditions pour que la mesure soit la plus reproductible et sensible possible.

- **Impédances de polarisation** Z_p : bien sûr, celles-ci doivent être les plus faibles possible afin de ne pas masquer l'impédance de l'échantillon à caractériser. Des techniques de réduction ou de corrections doivent être envisagées (voir § 2.4.2.5).
- **Impédances capacitives résiduelles** Z_{STRAY} : ces impédances peuvent être gênantes pour des mesures à relativement hautes fréquences. Elle doivent être rendues les plus grandes possibles. Cela implique l'isolation des électrodes entre elles par des matériaux de faibles constantes électriques et /ou des techniques appropriées pour confiner les lignes de courants dans la zone voulue (électrodes de garde, etc...) [Cha00].
- R_S et R_{SHUNT} : le problème avec les mesures d'impédance sur cellules biologiques est que, contrairement aux mesures sur tissus mous par exemple ou l'échantillon peut occuper tout le volume entre les électrodes, un sérum physiologique est tou-

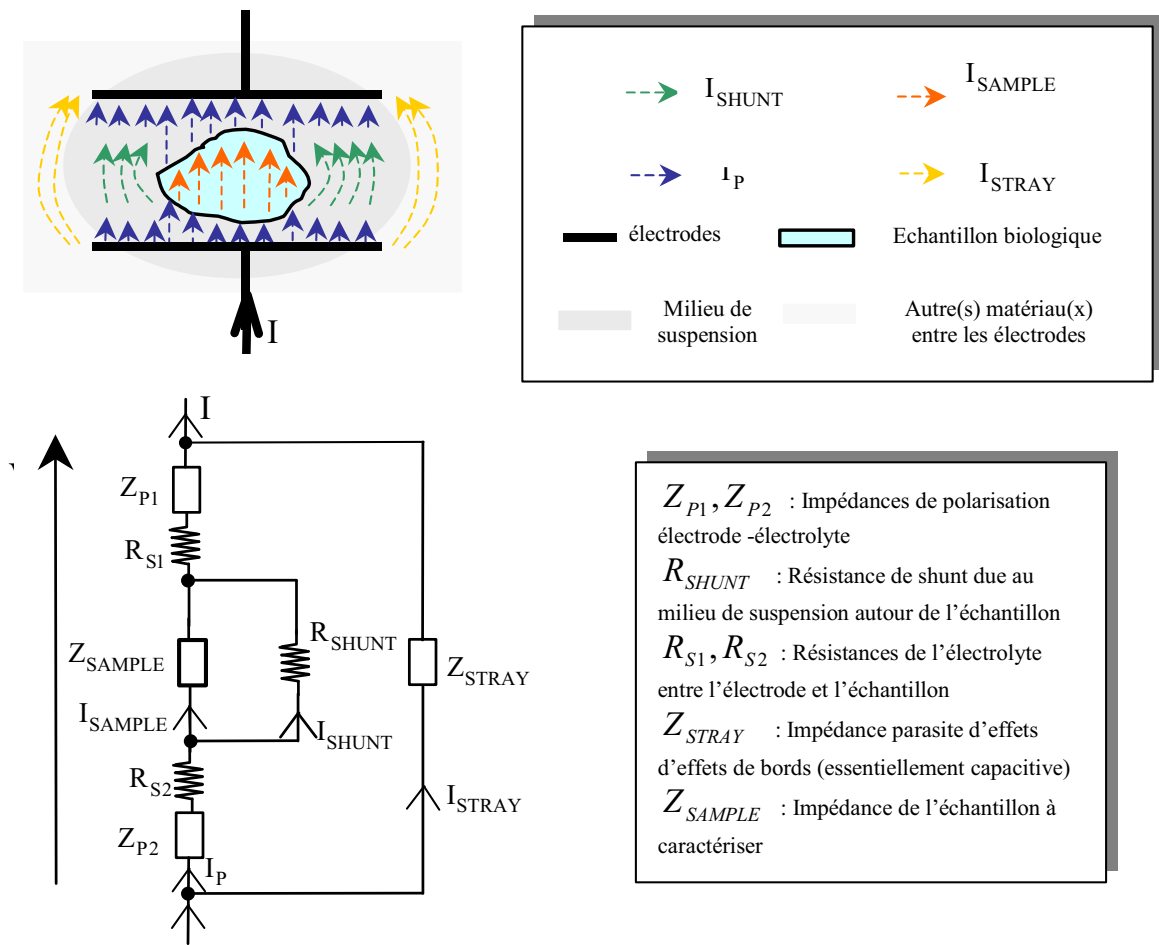


FIGURE 2.16 – Représentation schématique et modèle électrique de l'interface électrode-cellule(s) incluant les impédances de polarisation des électrodes, la conductivité du sérum physiologique, l'impédance de l'échantillon, et l'impédance d'effets de bords. Adapté de [Thi03]

jours intercalé entre les électrodes et la ou les cellules. De ce fait, la mesure d'impédance, même si elle est faite dans un cas idéal où les autres influences parasites n'interviennent pas, reflète l'impédance du milieu associée à celle de l'échantillon. Par conséquent, il faut soit minimiser l'influence du milieu de suspension, soit corriger son effet pour que la mesure reflète au plus les propriétés de l'échantillon. En se basant sur le modèle électrique décrit plus haut, où R_S traduit le passage du courant dans l'écart laissé entre l'échantillon et l'électrode, et R_{SHUNT} traduit

un passage possible du courant entre les deux électrodes sans passer par l'échantillon, idéalement R_S doit être nul et R_{SHUNT} infini. La condition pour que R_S soit faible est par exemple assez bien remplie lorsque la ou les cellules à mesurer adhèrent sur l'électrode. Cependant elle(s) n'adhère(nt) généralement que sur une seule électrode, et le chemin offert pour le passage du courant entre la deuxième électrode et l'échantillon peut réduire la sensibilité [Bor98]. Une autre solution est d'augmenter la conductivité du milieu si cela est possible, avec en contrepartie une diminution de R_{SHUNT} qui peut devenir gênante. D'une manière générale, pour minimiser R_S et maximiser R_{SHUNT} , il faut faire en sorte que l'échantillon occupe le maximum de volume par rapport au volume effectif de mesure.

2.5 Exemples de configuration

Les considérations précédentes restaient assez générales. Nous nous proposons dans ce paragraphe d'étudier quelques exemples de configurations développées par différents auteurs, pour la caractérisation par spectroscopie d'impédance de cellules ou de cultures cellulaires. En pratique, les solutions adoptées sont souvent spécifiques aux applications visées, ce qui rend la classification des méthodes employées difficile. Nous optons ici pour une classification considérant la configuration géométrique des électrodes utilisées pour la mesure.

2.5.1 Structures interdigitées

Les structures interdigitées sont très répandues et trouvent des applications dans de nombreux domaines. Une revue détaillée de ce type de structures pourra être trouvée dans [MSRY⁺04]. Basiquement, il s'agit d'une structure à deux électrodes coplanaires parallèles dont le motif (largeur, écart entre les électrodes, longueur) est répété périodiquement. Il en résulte deux électrodes en forme de "peignes" imbriquées l'une dans l'autre (voir Fig 2.17). Les "branches" des "peignes" formées par chacune des électrodes sont parfois appelées "doigts" (ou digits en anglais).

Dans le cas d'une application en impédancemétrie, une différence de potentiel est ap-

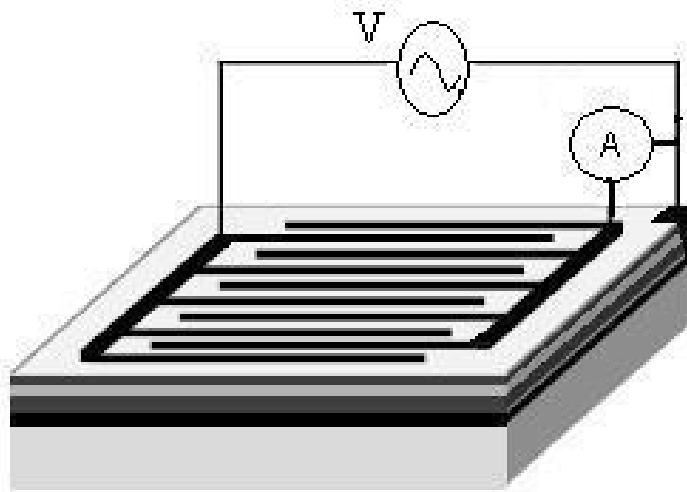


FIGURE 2.17 – Paire d'électrodes formant une structure interdigitée

pliquée entre les deux électrodes et l'impédance électrique entre les électrodes est mesurée.

Les paramètres caractéristiques d'une telle paire d'électrodes sont :

- Le nombre de digits.
- La longueur des digits.
- La largeur des digits
- La distance séparant un digit d'une électrode au digit le plus proche de l'autre électrode.

Ce type de structure utilisée en impédancemétrie présente plusieurs avantages. Citons par exemple :

- L'accès à l'échantillon à caractériser par un seul côté. Ceci est rendu possible par la géométrie coplanaire des électrodes. Ceci permet de réaliser une mesure de manière moins contraignante qu'avec une géométrie à électrodes parallèles de type "condensateur plan" par exemple, car l'autre côté du milieu peut être laissé libre.
- La flexibilité d'usage : en effet l'ajustement des paramètres cités plus haut (nombre de digits, longueur et largeur des digits, écart inter-digits) offre la possibilité de répondre à des applications spécifiques. Par exemple, on pourra choisir de travailler avec des distances inter-électrodes faibles pour caractériser de fines structures, car la

profondeur de pénétration des lignes de champ électrique est directement liée à cette distance. Technologiquement ce gap peut être réduit à des distances très faibles [LNVG⁺00]. Si l'on souhaite dans le même temps limiter les impédances d'interfaces métal-milieu, on pourra choisir d'augmenter la surface globale des électrodes en jouant sur le nombre de digits. L'amplitude du signal récupéré (donc le rapport signal sur bruit) peut également être réglée par l'ajustement de ces paramètres.

- Modélisation simple : Quand la longueur des digits est suffisamment grande comparativement aux écarts inter-électrodes, la modélisation par voie analytique ou numérique de la structure interdigitée peut être réalisée en deux dimensions.

L'application de ce type de structures pour la mesure d'impédance des milieux biologiques a déjà été démontrée. Par exemple, l'équipe de R.Ehret [EBB⁺97] [EBB⁺98] a utilisé une paire d'électrodes interdigitées pour étudier des cultures cellulaires. La culture cellulaire est développée à la surface des électrodes. Typiquement des paramètres tels que la densité de cellules présentes, leur adhésion et leur croissance sur la surface ou l'influence de certaines substances toxiques sur la culture peuvent être détectés par la mesure de l'impédance globale de la structure. Le principe de base est que l'adhésion des cellules à la surface augmente l'impédance de l'interface électrode-milieu pour des fréquences suffisamment faibles (lorsque les cellules peuvent être considérées comme isolantes) [BHV⁺06] [CCD⁺05].

2.5.2 ECIS ("Electrode Cell-substrate Impedance Sensing")

Les configurations interdigitées ne sont pas les seules utilisées pour l'étude de cellules en culture par mesure d'impédance. Il existe aujourd'hui une technique bien établie pour contrôler le comportement de cultures cellulaires sur la base d'une mesure d'impédance. La technique est brevetée sous l'acronyme de ECIS pour "Electrode Cell-substrate Impedance Sensing". Des appareils utilisant cette technique sont déjà commercialisés¹. Le principe repose sur la modification de l'impédance mesurée entre deux électrodes coplanaires cylindriques (de taille différentes) sur lesquelles sont cultivées des cellules (voir

1. Applied Biophysics - <http://biophysics.com/index.html>

Fig 2.18). Typiquement une chambre de culture se compose d'une électrode cylindrique centrale de $250 \mu\text{m}$ de diamètre isolée d'une électrode périphérique beaucoup plus large. Un courant alternatif (4 kHz) de l'ordre de $1 \mu\text{A}$ est appliqué entre ces 2 électrodes et la différence de potentiel résultante (qq mV) est mesurée afin de déterminer l'impédance.

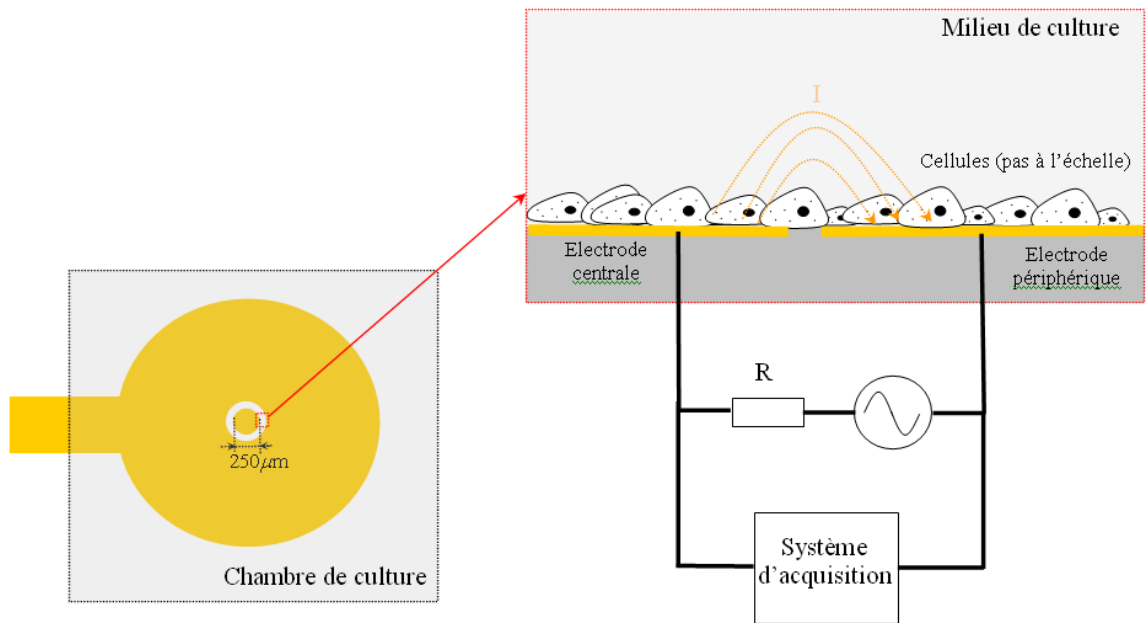


FIGURE 2.18 – Principe de mesure de la technique ECIS (Electrical Cell-Substrate Impedance Sensing)

En l'absence de cellule (milieu de culture seul), le courant peut circuler librement entre les deux électrodes et l'impédance mesurée est relativement faible. Lorsque les cellules sont insérées, celles-ci tendent à adhérer à la surface des électrodes. La présence des cellules sur les électrodes contraint alors le courant à circuler par un chemin plus restreint par dessous et entre les cellules. Même si ce phénomène existe sur la petite comme sur la grande électrode, l'impédance de la plus petite électrode est par nature déjà beaucoup plus grande que celle de la grande électrode, et les variations d'impédances liées à l'adhésion des cellules sur la grande électrode sont négligeables devant celles liées à l'adhésion des cellules sur la petite électrode. Lors de l'adhésion ou la croissance des cellules, le module et la phase mesurés s'en trouvent affectés. La croissance de la culture de cellules et son attachement à la surface peuvent ainsi être surveillés en temps réel. La méthode de mesure

est capable de détecter des changements subtils dans la culture cellulaire liés par exemple à l'ajout de toxines, de médicaments ou d'autres substances chimiques. Sur la base de ce principe, des études variées ont pu être menées sur des cultures cellulaires [WKG00] [GK91] [MW05] [XLSL98] [ASP⁺04].

2.5.3 Structure matricielle

Lorsque des cellules individuelles doivent être analysées, il convient d'utiliser des électrodes du même ordre de grandeur que la cellule pour concentrer la densité de courant dans la zone où est placée la cellule. L'utilisation d'électrodes à l'échelle de la cellule ne signifie pas forcément que les cellules sont isolées les unes des autres. Il peut y avoir des interactions entre les cellules mais simplement la mesure d'impédance est confinée sur des volumes très petits. Des géométries d'analyse matricielles peuvent être utilisées pour caractériser de telles cultures cellulaires. David A. Borkholder [Bor98] par exemple a développé une matrice de 36 électrodes de mesure en platine d'un diamètre minimal de $4.4 \mu\text{m}$ et espacées de $100 \mu\text{m}$ les unes des autres (voir Fig 2.19). Une électrode commune pour fermer le circuit de courant est insérée par la partie supérieure du dispositif. La conception a été optimisée pour permettre à la fois des mesures de spectroscopie d'impédance dans la bande 100 - 100 KHz et des enregistrements de l'activité électrique intrinsèque des cellules.

L'organisation matricielle permet d'obtenir une "image" en deux dimensions du réseau cellulaire cultivé. Les 36 microélectrodes sont excitées et interrogées l'une après l'autre par un multiplexage temporel. Pour la culture et l'adhésion des cellules, une couche de nitrure de silicium a été déposée à la surface. Les électrodes métalliques et les interconnexions se situent en dessous de cette couche (interconnexions isolées du milieu électrolyte) et la zone active de chaque microélectrode est réalisée par un micro-via (voir Fig 2.20) Les écarts entre les électrodes doivent être suffisamment grands pour minimiser les interférences inter-sites et les capacités parasites.

Selon les dimensions des électrodes et des cellules étudiées, une ou plusieurs cellules peuvent recouvrir un site de mesure. Un modèle simplifié en considérant une cellule recouvrant une microélectrode peut être celui de la figure 2.21 (a).

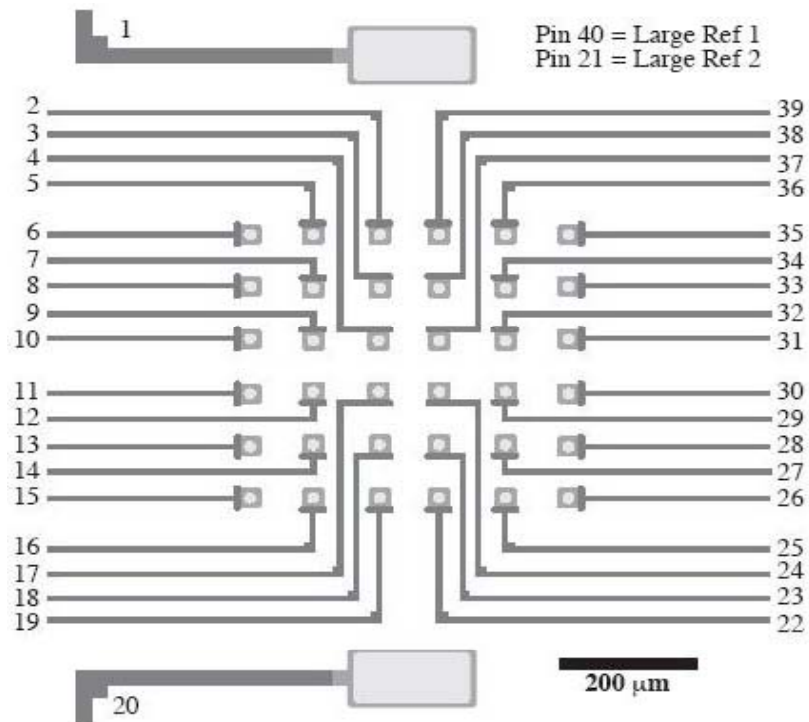


FIGURE 2.19 – Géométrie matricielle adoptée par David A. Borkholder [Bor98] -36 électrodes de mesure + 2 électrodes de référence.

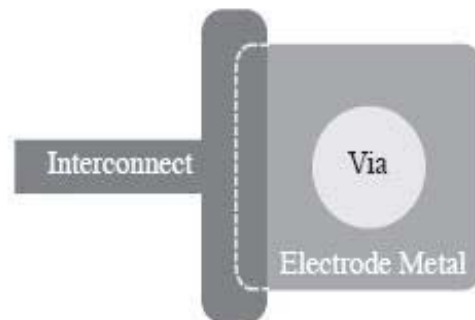


FIGURE 2.20 – Zone active de mesure : un micro-trou créé à travers la couche de nitrure de silicium définit la zone active de la microélectrode ($15 \mu\text{m}^2$ au minimum), la surface métallique restante de l'électrode et les interconnexions sont isolées du milieu de culture des cellules [Bor98]

Dans la bande de fréquence utilisée (100 - 100 KHz), le milieu intra-cellulaire a une influence négligeable sur l'impédance totale mesurée. Ce modèle simple (Fig 2.21 (a))

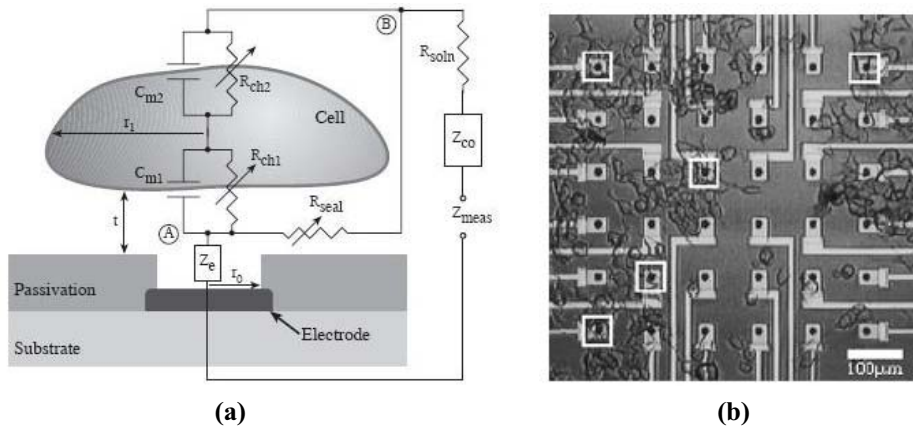


FIGURE 2.21 – (a) Modèle électrique simplifié d'une cellule positionnée sur un site de mesure. (b) Vue microscopique de la matrice d'électrodes avec des cellules en culture. Les zones encadrées correspondent aux électrodes recouvertes [Bor98]

prend en considération l'impédance d'interface électrode-milieu Z_e , la résistance de shunt R_{SEAL} , la capacité de membrane de la cellule C_m , et la résistance de canaux ioniques R_{ch} de chaque côté de la cellule, la résistance du milieu R_{SOL} et l'impédance de l'électrode qui récolte le courant ("counter electrode"). Un des problèmes dans cette configuration est dû au fait que le positionnement des cellules n'est pas maîtrisé. Toutes les électrodes ne sont pas systématiquement recouvertes ou sont partiellement recouvertes (Fig 2.21 (b)) et donc il est souvent nécessaire d'utiliser un microscope pour contrôler la localisation des cellules. La méthode de positionnement présentée en § 2.3.2 peut en partie résoudre ce problème car elle permet d'acheminer des cellules en parallèle sur les micro-sites de mesures par aspiration [TSB⁺99].

2.5.4 Structures capillaires

Les structures capillaires sont des structures utilisant des micro-canaux pour faire des mesures sur des échantillons isolés. Divers auteurs proposent ce type d'approches [CGR05] [CGR04] [RTCFG⁺08] [SSF⁺00] [KEB99]. Un exemple de configuration est celui développé par S.Gawad [GSR01]. En se basant sur le principe du micro Coulter Counter [LBB97], S.Gawad a réalisé une puce micro-fluidique avec des micro-canaux intégrant des électrodes

de quelques μm de diamètre. Un flux laminaire transporte les cellules en suspension (isolées individuellement car en faible concentration dans le liquide) à travers la zone de mesure avec une vitesse maximale de 100 cellules/s. L'impédance de chaque cellule passant dans la zone d'analyse est mesurée par une paire d'électrodes différentielles en utilisant le milieu entourant la cellule comme référence. La spectroscopie d'impédance peut être réalisée rapidement en utilisant plusieurs fréquences d'excitation simultanément (sinusoïdes de différentes fréquences ajoutées les unes aux autres) dans une bande allant de 100 KHz à 15 MHz. La méthode différentielle présentée ici est intéressante car elle permet de mesurer

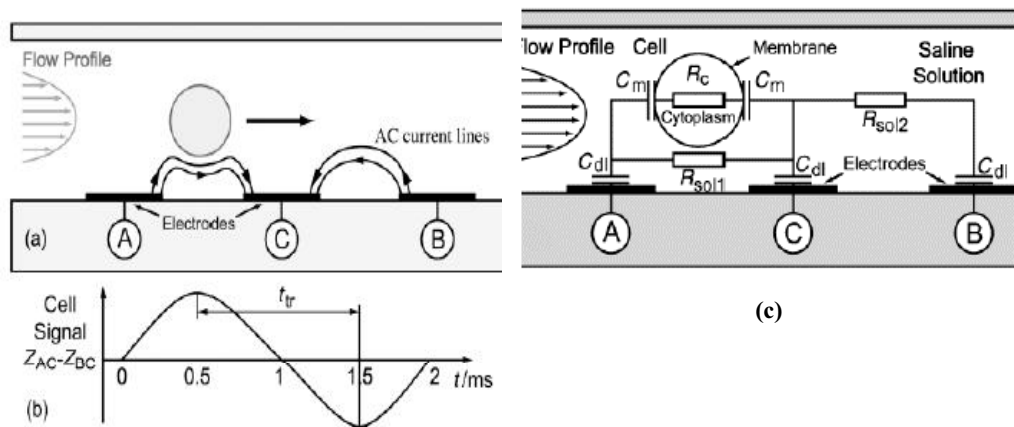


FIGURE 2.22 – (a) Représentation schématique du micro-canal ($20 \mu\text{m}$ de diamètre) montrant une particule passant dans la zone de mesure composée de 3 électrodes (A, B et C). Le signal d'impédance utile est la différence $Z_{AC} - Z_{BC}$. La particule est positionnée au centre du canal par focalisation hydrodynamique - (b) Evolution temporelle du signal d'impédance différentiel : la distance séparant les deux électrodes étant connue, la vitesse de la particule peut être déduite de la mesure du temps séparant les deux extremums de la réponse temporelle. - (c) Modèle électrique simplifié de la variation d'impédance due au passage de la cellule

directement l'influence du passage de la cellule sans pendre en considération les différentes influences parasites. De plus, la vitesse de la particule peut être facilement déduite en mesurant le temps séparant les deux extremums du signal mesuré. Ici, S.Gawad a placé les électrodes uniquement en bas du canal (plus facile technologiquement), la hauteur

de la cellule dans le canal a donc une influence direct sur le signal mesuré. D'autres auteurs proposent par exemple de placer les électrodes de part et d'autre du canal en vis à vis [FHA⁺00] [KAB⁺02]. Dans ce cas, il est important que la cellule soit placée au centre du canal là où le champ est le plus homogène. La solution proposée par S.Gawad est typiquement adaptée lorsqu'un débit d'analyse élevé est nécessaire. Cela peut être le cas par exemple lorsqu'un échantillon hétérogène contenant une population de cellules assez élevée doit être caractérisé (ex : détection du pourcentage de cellules malades dans un échantillon, séparation de cellules, analyse d'échantillons sanguins, etc...). Une autre approche pour la caractérisation de cellules individuelles est celle développée par Ayliffe et al [AFR99]. Dans cette configuration la mesure est réalisée par des microélectrodes en or isolées par une résine époxy dans laquelle est également creusé le microcanal, un réservoir pour l'insertion des cellules et un autre pour leur aspiration à l'autre bout du canal, le tout étant recouvert par un couvercle en verre avec des cavités débouchantes pour un accès fluidique externe. La particularité de cette configuration réside dans les faibles dimensions de la zone de mesure qui ont pu être obtenues. Ainsi, l'épaisseur du canal est d'environ 4.3 μm , celle des électrodes d'environ 4 μm , l'écart entre les électrodes est approximativement de 7 μm et leur largeur de 8 μm (Fig 2.23). Avec ces dimensions, il est possible de faire des mesures sur des cellules isolées avec une bonne sensibilité. Les cellules à analyser sont placées dans le réservoir supérieur et acheminées une à une dans la zone de mesure par le contrôle de l'aspiration depuis le réservoir inférieur. Le positionnement de la cellule est contrôlé par microscope et la mesure est réalisée en statique (cellule immobilisée). Les premières évaluations faites avec cette puce de mesure ont permis d'observer des différences significatives entre deux types de cellules différentes (érythrocytes et leucocytes) grâce à la comparaison de leur spectre d'impédance relevé dans la gamme 10 KHz - 1 MHz. Les méthodes d'analyse utilisant des configurations capillaires ne sont pas limitées à des mesures sur des cellules isolées. Par exemple, Hagen Thielecke [Thi03, TMR01] a utilisé également une structure type "capillaire" (Fig 2.24) pour faire des mesures sur des modèles sphériques de tumeurs ("sphéroïdes" [RMTR02]) afin évaluer l'influence de thérapies anti-cancéreuses. Un dispositif de verre en forme de "sablier" a été fabriqué. Le canal formé au centre a une épaisseur comprise entre 300 à 400 μm d'épaisseur. Le milieu de culture

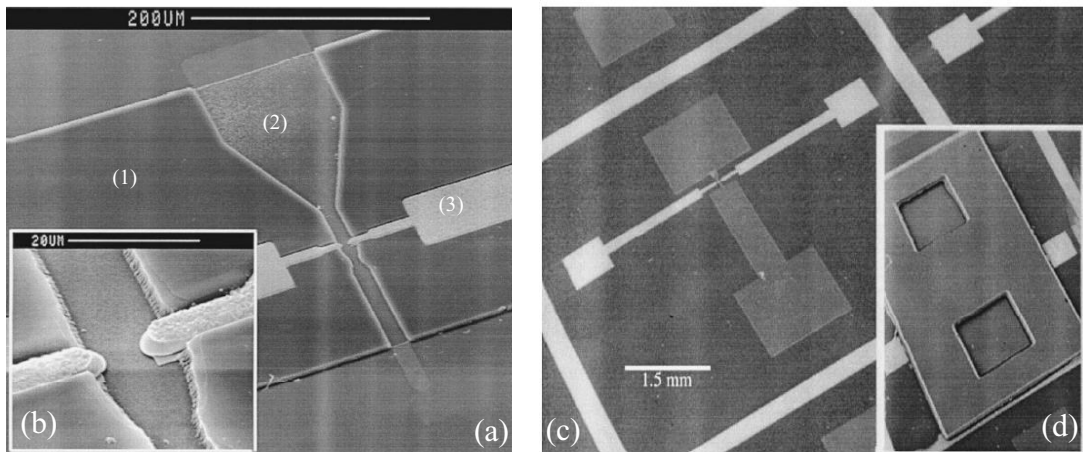


FIGURE 2.23 – Puce de mesure réalisée par [AFR99] - (a) Vue du microcanal et une partie des réservoirs (parties supérieure et inférieure) avant le collage du couvercle : (1) résine époxy, (2) substrat quartz-verre, (3) électrodes et pistes d’interconnexions (or) - (b) Agrandissement ($\times 10$) de la zone de mesure - (c) vue d’ensemble montrant les deux réservoirs, le microcanal et les contacts électriques avant le collage du couvercle de verre - (d) après le dépôt du couvercle de verre avec cavités pour l’accès aux réservoirs.

est tout d’abord injecté dans le tube de mesure par l’action d’une valve dans la partie inférieure du dispositif. L’échantillon (sphéroïde) est inséré par l’ouverture supérieure à l’aide d’une pipette. Cette même ouverture est ensuite raccordée à une pompe de précision qui peut aspirer le milieu de culture pour placer la sphère au centre du canal. La mesure d’impédance est réalisée dans la gamme 50 Hz -100 KHz par une configuration tétrapolaire avec 4 fils de platine de $300\ \mu\text{m}$ de diamètre insérés dans le tube de mesure. Le principal avantage de cette configuration est la grande résistance de shunt (cf 2.4.4) du système. En effet, dans une configuration idéale, l’échantillon occupe tout l’espace dans le tube de mesure, et donc la totalité du courant qui circule entre les électrodes traverse le sphéroïde.

2.6 Conclusion

Le but de ce chapitre était de faire un état de l’art sur les microtechnologies existantes et les possibilités offertes pour la réalisation d’un micro-dispositif de mesure d’impédance

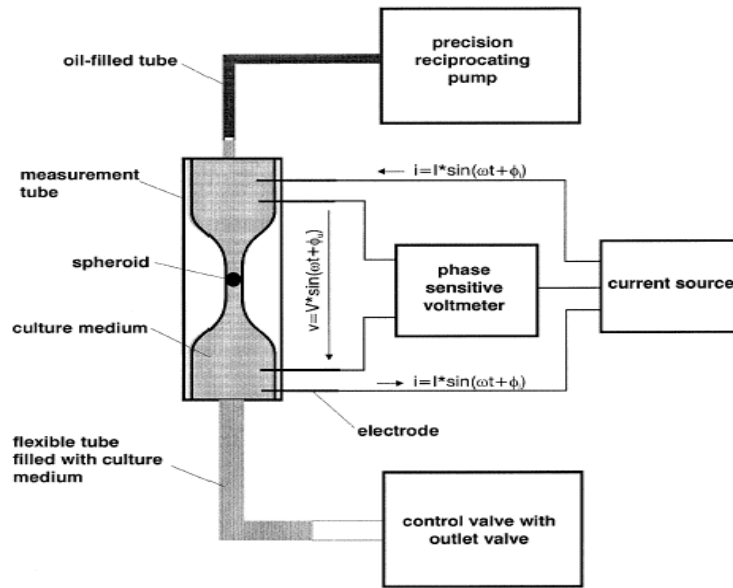


FIGURE 2.24 – Schéma simplifié du système de mesure d'impédance de modèle de tumeurs 3D ("sphéroïdes"). Dans le canal, la sphère est maintenue en position par le niveau du milieu de culture

sur des cellules biologiques. Après un rappel des procédés microtechnologiques plus ou moins standards applicables, le problème du positionnement d'une cellule dans un micro-dispositif a également été abordé. Quelques considérations générales sur les contraintes métrologiques liées au couplage électrode-cellule ont ensuite été présentées. Enfin, la faisabilité d'une mesure d'impédance sur des cellules biologiques au sein d'un micro-système a été discutée à travers des exemples concrets de réalisations. Le prochain chapitre traite de la réalisation expérimentale et de la modélisation d'un dispositif de mesure (associé à son banc de mesure) spécialement dédié à la caractérisation d'une cellule isolée.

Chapitre 3

Spectroscopie de bio-impédance basses fréquences par électrodes bipolaires : Application aux ovocytes de Xénope

Sommaire

3.1	Introduction	74
3.2	La chaîne de mesure	75
3.2.1	Les cellules	76
3.2.2	Le dispositif de mesure	77
3.2.3	L'impédancemètre HIOKI-3532	78
3.2.4	Acquisition et traitement des données	79
3.2.5	Modélisation électrique du dispositif de mesure	80
3.3	Resultats et discussion	83
3.3.1	Résultats de simulation	84
3.3.2	Résultats expérimentaux	90
3.4	Conclusion et perspectives	95

3.1 Introduction

Les valeurs de permittivité et conductivité des tissus biologiques restent encore mal connues en basses fréquences. Aujourd’hui, les progrès réalisés dans les micro-technologies apportent de nouvelles approches à vocation biologique par la caractérisation de cellules individuelles. Parmi les intérêts, l’absence d’interactions intercellulaires intrinsèques aux agrégats et aux tissus biologiques constitue un avantage majeur. Au sein de tels dispositifs, des micro-électrodes intégrées dans des micro-cavités ou canaux peuvent permettre de mesurer les caractéristiques électriques de cellules isolées en fonction de la fréquence. Les paramètres électriques mesurés reflètent différentes propriétés intrinsèques de la cellule telle que sa forme, sa taille, la morphologie de sa membrane ou encore sa composition interne lorsque la fréquence d’excitation devient suffisamment élevée (voir Fig 3.1).

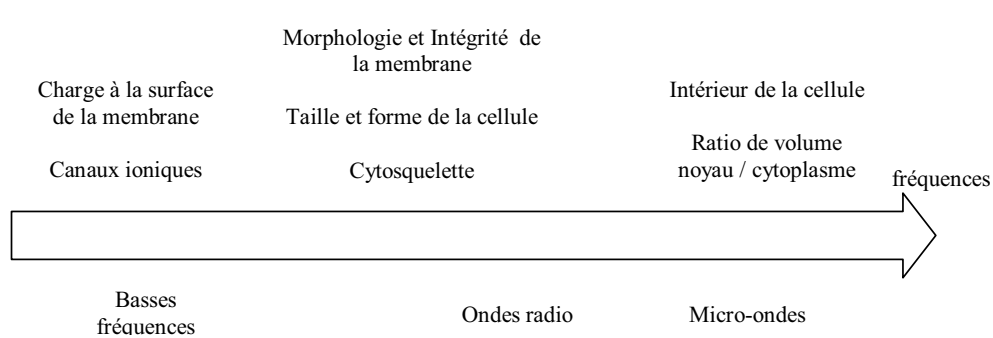


FIGURE 3.1 – Résumé des différents aspects de la structure cellulaire qui peuvent être détectés par des mesures de leur comportement électrique en fonction des fréquences d’analyse

Pour étudier le comportement électrique de cellules biologiques isolées, plusieurs grandes approches existent. Une première catégorie de techniques repose sur l’observation des comportements électrocinétiques des cellules (électrophorèse, diélectrophorèse, électrorotation, etc..) qui dépendent des propriétés électriques intrinsèques des cellules. Nous nous intéressons, quant à nous, à une approche de mesure plus directe qui consiste simplement à évaluer la relation courant-tension dans l’échantillon à l’aide d’électrodes d’excitation et de mesure. Le choix de la configuration des électrodes d’excitation et de mesure joue un rôle important sur l’efficacité de la méthode et peut être assisté par des simulations

numériques de manière à prévoir le comportement des champs électriques dans la cellule de mesure.

Dans ce chapitre une première approche de caractérisation par spectroscopie d'impédance d'une cellule isolée est présentée [MPK⁺06] [MNR08]. L'étude porte plus spécifiquement sur la caractérisation d'une cellule ovocyte de Xénope isolée. Nous avons choisi de travailler avec ce type de cellules qui sont des modèles cellulaires standards répandus dans le domaine de la biologie, et qui de plus présentent l'avantage d'être manipulables sans techniques ni instruments sophistiqués. Le but n'est pour l'instant pas applicatif. Notre équipe ayant jusqu'à présent opéré surtout sur des échantillons macroscopiques, il s'agit là d'une première approche dont l'idée est de vérifier les contraintes et les limites technologiques. L'objectif vise à vérifier la possibilité de détecter des paramètres électriques caractéristiques de la cellule (résistivité du cytoplasme, capacité de la membrane, etc..) conditionnée dans un état physiologique stable. La chaîne de mesure repose sur l'utilisation d'un impédancemètre commercial travaillant dans une gamme de fréquences allant de 50 Hz à 5 MHz d'une part et sur la fabrication d'un dispositif adapté intégrant des électrodes de mesure et capable d'héberger une cellule isolée. La description des différents éléments constituant la chaîne de mesure fera l'objet de la première partie de ce chapitre. L'étude a été complétée par une modélisation électrique par la méthode des éléments finis de la zone sensible du dispositif de mesure réalisée dans le but de prévoir sa sensibilité à différents paramètres caractéristiques (taille de la cellule, conductivité du cytoplasme, capacité membranaire). Cette approche sera décrite dans un deuxième temps. Enfin les résultats de simulation et expérimentaux seront discutés sur la base des spectres d'impédances mesurés ou simulés avec ou sans cellule positionnée dans le dispositif.

3.2 La chaîne de mesure

La chaîne de mesure proposée est illustrée en Fig 3.2. Elle se compose des éléments suivants :

- Un impédancemètre RLC commercial HIOKI 3532 couvrant une gamme de fréquences de 50 HZ à 5MHz.

- Le dispositif de mesure intégrant les deux électrodes de mesures et un orifice pour contenir la cellule sous investigation.
- Une loupe binoculaire pour le contrôle du positionnement de la cellule
- Un ordinateur pour le contrôle des acquisitions et le traitement des données
- La cellule biologique placée dans le dispositif de mesure pour investigation.

Les différents éléments composant la chaîne de mesure sont décrits dans cette partie.

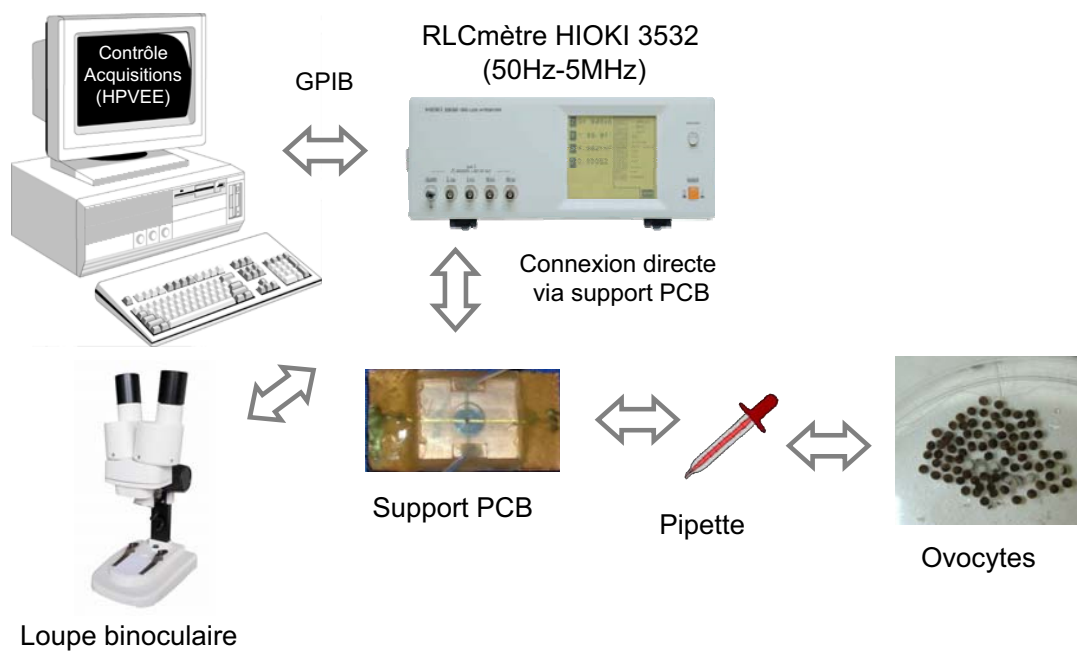


FIGURE 3.2 – Système instrumental composé de l’ordinateur pour le pilotage des acquisitions, du pont RLC-mètre HIOKI 3532, d’une carte PCB supportant le dispositif de mesure à électrodes et d’une loupe binoculaire pour le contrôle du placement de l’ovocyte.

3.2.1 Les cellules

Afin de valider notre premier système de mesure, nous avons choisi de travailler avec des cellules qui peuvent être manipulées rapidement et facilement. Les ovocytes de Xénope permettent de satisfaire ces critères puisqu’ils peuvent être manipulés sans procédure de

stérilisation et à température ambiante, et présentent des diamètres suffisamment importants (1 à 1.3 mm) pour être mesurés à l'aide d'électrodes réalisables au laboratoire avec une technologie simple. Les ovocytes de Xénope manipulés ont été fournis par le laboratoire Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Reproduction et du Développement de l'Université Henri Poincaré de Nancy. Une femelle adulte de Xénope est anesthésiée, et ses lobes ovariens sont prélevés et placés dans un tampon ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES/NAOH, PH 7.5). Le stade 6 de croissance complète des ovocytes est obtenu avec une défoliculation après traitement de 45 min au collagénase A et gardé à 12 °C dans le tampon ND96 jusqu'à utilisation. Les ovocytes obtenus ont des diamètres approximatifs de 1.2 mm. Ils sont insérées dans le dispositif de mesure à l'aide de micropipettes.

3.2.2 Le dispositif de mesure

Le dispositif de mesure réalisé repose sur une configuration à électrodes coplanaires situées de part et d'autre de la cellule à mesurer. Il est fabriqué par usinage traditionnel sur des pièces de plexiglas. Les électrodes sont réalisées à partir de fils d'or. Deux fils d'or (d'un diamètre de 200 μ m) sont aplatis à leurs extrémités formant de fines lamelles de 1 mm de largeur. Ces dernières sont collées avec une colle biocompatible², sur une surface de plexiglas formant ainsi des électrodes coplanaires. Ensuite, une très petite cavité est réalisée entre les deux électrodes pour permettre le positionnement de la cellule et son maintien durant la mesure. Enfin deux trous sont percés dans une autre pièce de plexiglas pour réaliser la chambre de la cellule (voir Fig 3.3). Le premier trou a un diamètre et une hauteur de 1.6 mm, le choix de ces dimensions vise à limiter les shunts d'impédances entre les électrodes tout en maintenant suffisamment d'espace autour de la cellule pour le sérum physiologique. Le deuxième trou de 20 mm de diamètre et 2 mm de hauteur est créé d'une part pour permettre l'accès à une pipette pour l'aspiration de la cellule, et d'autre part pour éviter une trop rapide évaporation du sérum pendant la mesure. Finalement, la deuxième pièce de plexiglas est assemblée à la première en utilisant la colle

2. Nusil Silicon Technology, MED1- 4213, <http://www.nusil.com/>

biocompatible citée précédemment.

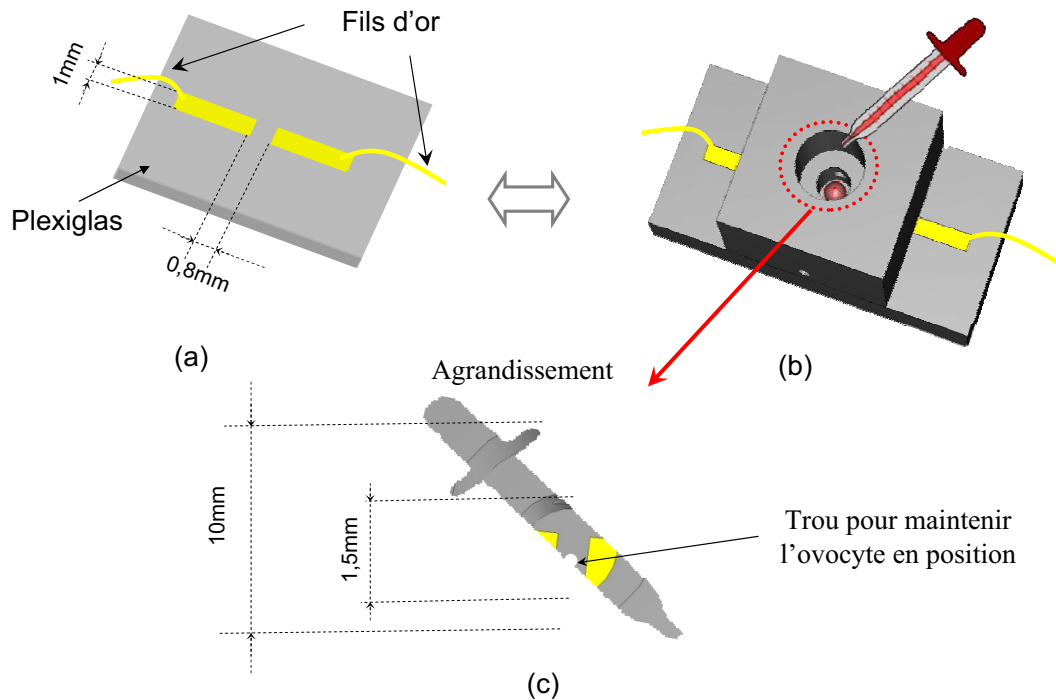


FIGURE 3.3 – Croquis du dispositif de mesure à électrodes coplanaires - (a) partie inférieure du dispositif avant collage - (b) vue d'ensemble après assemblage des deux pièces (avec cellule insérée) - (d) vue agrandie de la zone de mesure (sans cellule)

3.2.3 L'impédancemètre HIOKI-3532

L'appareil utilisé pour réaliser les mesures d'impédances est un pont RLC commercialisé par la société HIOKI³ opérant dans la gamme 50 Hz - 5 MHz. Le dispositif de mesure est monté sur un support PCB et branché directement au pont RLC (sans câbles) via une connectique type BNC. Le but est ici de réduire au maximum l'influence parasite d'impédances résiduelles de câbles de liaison. Les spécifications techniques principales de l'appareil sont résumées en annexe E. Son originalité est qu'il permet de travailler sur une bande de fréquences basses plus large que d'autres appareils. Son principe de fonctionnement repose sur la méthode du pont auto-équilibré dont le schéma de principe simplifié

3. Hioki Inc., <http://www.hioki.com/>

est donné en Fig 3.4. Un signal d'excitation à la fréquence souhaitée (symbolisé par OSC1

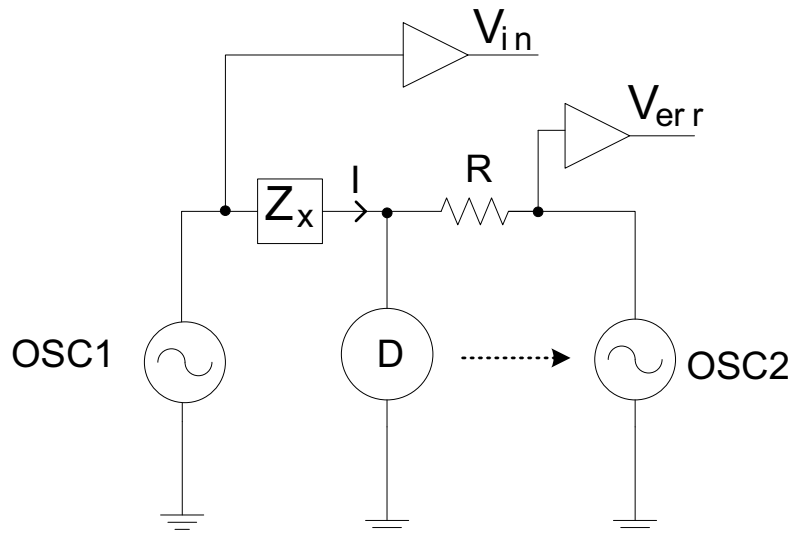


FIGURE 3.4 – Schéma de principe de la mesure par pont auto-équilibré [OS06]

sur le schéma de la figure 3.4) est synthétisé et appliqué à une borne de l'impédance complexe à mesurer Z_X . L'autre borne de l'impédance est reliée d'une part à un détecteur de zéro (D) et d'autre part à la résistance de mesure R . Le détecteur de zéro combiné à l'oscillateur piloté OSC2 agit en boucle de rétroaction qui tend à maintenir le potentiel à la borne inférieure de Z_X toujours nul. Lorsque le pont est équilibré, le courant I circulant dans R est alors le même que celui dans Z_x [OS06] :

$$I = \frac{V_{in}}{Z_x} = \frac{V_{err}}{R} \quad (3.1)$$

L'impédance complexe est alors déduite par :

$$Z_x = \frac{V_{in}}{I} = R \cdot \frac{V_{in}}{V_{err}} \quad (3.2)$$

3.2.4 Acquisition et traitement des données

Dans le but d'automatiser les acquisitions de spectres d'impédances, un logiciel d'acquisition a été développé sous Agilent Vee. Celui-ci pilote le pont RLC via un bus GPIB. Le logiciel permet un balayage fréquentiel ou temporel (à fréquence fixe), le réglage de l'en-

semble des paramètres de configuration de l'appareil et l'enregistrement des acquisitions réalisées dans des fichiers. L'interface utilisateur du logiciel est représentée en Fig 3.5.

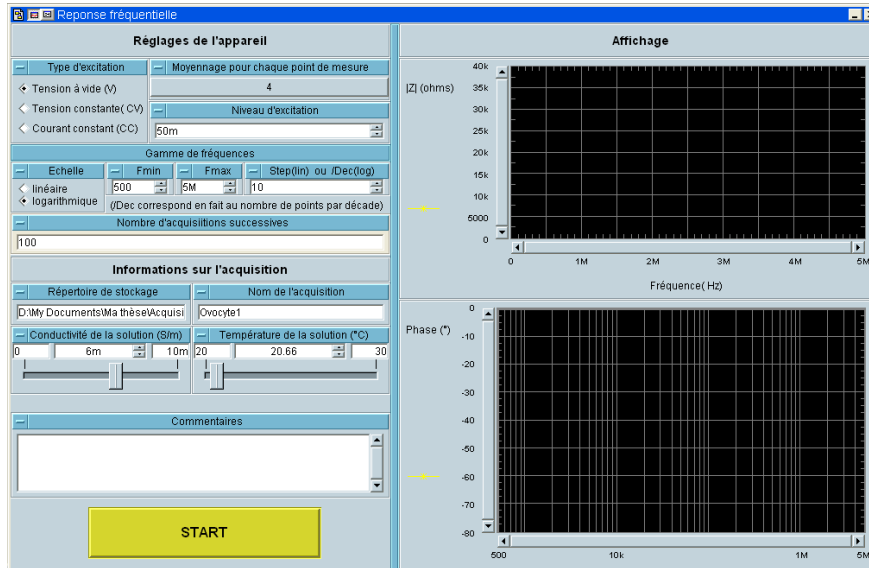


FIGURE 3.5 – Interface utilisateur du logiciel d'acquisition Agilent Vee

3.2.5 Modélisation électrique du dispositif de mesure

Afin de mieux évaluer les performances du dispositif, une modélisation électrique de la zone de mesure a été effectuée par la méthode des éléments finis à l'aide du logiciel Comsol Multiphysics 3.2 (module électromagnétique 3D). Nous utilisons le module électromagnétique 3D (mode quasi-statique, réponse harmonique) proposé par le logiciel. Etant donné les dimensions de notre modèle et les gammes de fréquences d'analyse, l'utilisation de l'hypothèse quasi-statique est justifiée.

3.2.5.1 Définition de la géométrie

La géométrie du dispositif est définie à l'aide de l'éditeur graphique de COMSOL, puis le modèle est exporté sous forme de script Matlab. Le script est ensuite réédité de telle sorte à pouvoir avoir un paramétrage plus aisé des dimensions caractéristiques du modèle (ex : écarts entre les électrodes, diamètres de la cellule). Le recours au script Matlab dans ce cas permet d'éviter de redessiner l'ensemble du modèle chaque fois qu'une

dimension doit être changée. La définition géométrique du modèle consiste à représenter les différents sous-domaines et frontières qui composent le dispositif de mesure global. En ce qui nous concerne, les différents sous-domaines considérés sont le volume occupé par le milieu de suspension, la membrane de l'ovocyte et le volume interne de l'ovocyte. Quant à la structure en plexiglas du dispositif, celle-ci est simplement considérée comme une frontière isolante.

3.2.5.1.1 Ovocyte

D'un point de vue électrique, un ovocyte de Xénope peut être approché par un modèle électrique classique de cellule biologique, à savoir un cytoplasme conducteur entouré par une membrane isolante (Fig 1.3.2). Dans la définition géométrique du modèle de l'ovocyte, il convient donc de distinguer ces deux structures. Or, le rapport entre les dimensions de la membrane et du cytoplasme est très grand. En effet, l'épaisseur de la membrane pour un ovocyte est de l'ordre de 75 Å comparée à son diamètre qui est de l'ordre de 1.2 mm. La modélisation d'une structure avec un tel rapport entre des volumes adjacents est inconcevable et cela se traduirait par un calcul irréalisable par l'ordinateur du fait du nombre excessif d'éléments de maillage. Nous contournerons ce problème en augmentant conjointement l'épaisseur de la membrane et sa permittivité de telle sorte à garder la capacité surfacique de la membrane à une valeur proche de celle rencontrée dans la littérature [AI00] [BIS99] [CC38] [GM00]. L'épaisseur de la membrane modélisée reste néanmoins faible devant le diamètre considéré de l'ovocyte (rapport de 1/20, voir Fig 3.6).

3.2.5.1.2 Les électrodes

On considère pour notre modèle que les électrodes sont idéalement planaires et donc que leur épaisseur est nulle. En pratique leur épaisseur est de l'ordre d'une dizaine de μm obtenue après aplatissage du fil d'or, ce qui reste relativement négligeable par rapport aux dimensions de la zone de mesure. Leur définition géométrique dans le modèle ne consiste donc qu'en une frontière séparant deux sous-domaines.

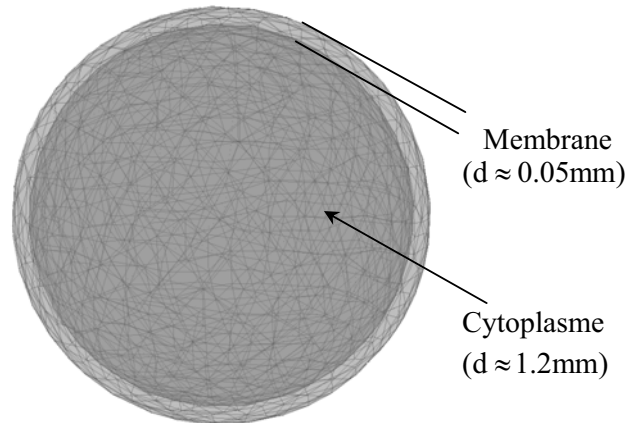


FIGURE 3.6 – Vue du maillage de l’ovocyte, le cytoplasme et la membrane constituent deux sous-domaines distincts

3.2.5.2 Définition des propriétés électriques

Dans le cas de notre configuration, l’équation aux dérivées partielles gouvernant les propriétés électriques du domaine d’étude est donnée par :

$$-\nabla \cdot ((\sigma + j\omega\varepsilon_r\varepsilon_0)\nabla V) = 0 \quad (3.3)$$

La conductivité σ du milieu de suspension est fixée à 1.3 S/m en se basant sur les valeurs obtenues lors de mesures préliminaires sur le sérum physiologique. Sur les frontières définissant les électrodes, un potentiel de 200 mV est fixé pour une électrode, et de 0 V pour l’autre. La permittivité relative ε du sérum physiologique comme celle du milieu de suspension sont fixées à 80 [GM00]. Une condition de continuité électrique est imposée sur les frontières entre le sérum et l’ovocyte et entre le plexiglas et le sérum. Sur toutes les autres frontières, une condition d’isolation électrique est imposée. La conductivité du cytoplasme, et la permittivité de la membrane sont les paramètres électriques variables du modèle.

3.2.5.3 Résolution du modèle

Le modèle composé de 41 567 éléments est résolu en mode d’analyse harmonique pour 17 fréquences discrètes entre 50 Hz et 5 MHz. La grandeur à laquelle on s’intéresse après

la résolution du modèle est la densité de courant aux frontières définissant les électrodes. Celle-ci est intégrée sur la surface de l'électrode considérée afin d'obtenir le courant électrique complexe \underline{I} . Connaissant le potentiel électrique appliqué, on déduit l'impédance complexe $\underline{Z} = \underline{V}/\underline{I}$ pour chaque fréquence discrète considérée et on peut ainsi reconstituer le spectre d'impédance complexe pour le dispositif considéré. Les paramètres que l'on fait varier lors de la résolution du modèle sont : la taille de la cellule, la conductivité du cytoplasme, la permittivité de la membrane. Le modèle est également résolu en l'absence de cellule dans un souci comparatif. Nous donnons sur la figure 3.7 une vue d'ensemble du dispositif modélisé après maillage. Nous constatons que le maillage est raffiné au niveau des électrodes et dans le modèle de la cellule. Les spectres d'impédances calculés seront présentés et discutés dans le prochain paragraphe.

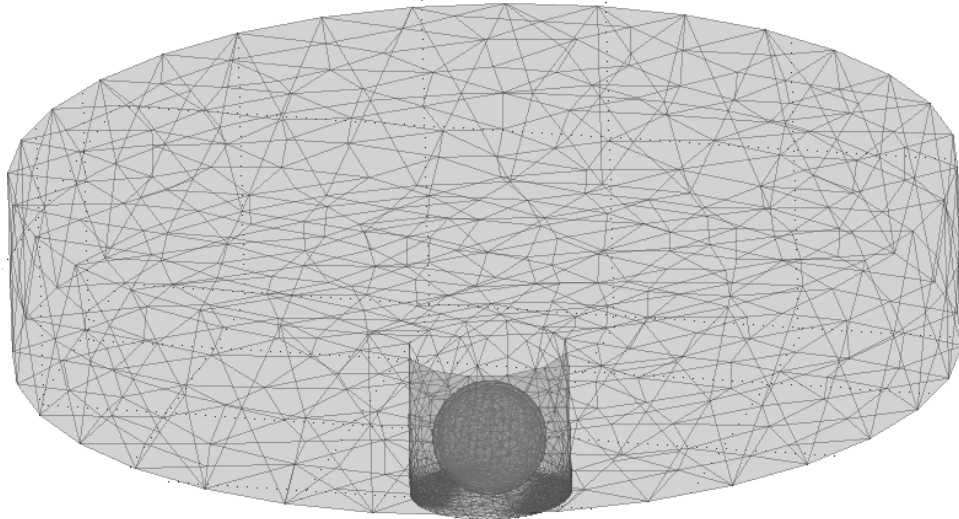


FIGURE 3.7 – Vue d'ensemble du dispositif modélisé (après maillage). On distingue les deux orifices, l'ovocyte et les électrodes coplanaires pour lesquelles un maillage plus fin est réalisé

3.3 Resultats et discussion

Les résultats expérimentaux et ceux obtenus par le biais de la modélisation numérique sont présentés et discutés dans cette partie. La simulation est utilisée pour étudier plu-

sieurs facteurs d'influence tels que la taille, la valeur de conductivité du cytoplasme ou la capacité membranaire de la cellule. Expérimentalement, les résultats présentés illustrent tout d'abord les spectres d'impédance obtenus lors de l'étalonnage de la chaîne de mesure sur des solutions salines calibrées. Enfin, l'influence de la présence de la cellule sur le spectre d'impédance est étudiée.

3.3.1 Résultats de simulation

3.3.1.1 Grandeurs simulées

Nous étudions ici par modélisation numérique l'effet de la présence d'une cellule. Afin de faciliter la lecture des résultats, l'impédance n'est pas représentée en valeur absolue sur les courbes. Ainsi, les courbes qui suivent représentent la variation relative du module :

$$\Delta|Z|(\%) = \frac{|Z|_{avec\ ovocyte} - |Z|_{sans\ ovocyte}}{|Z|_{sans\ ovocyte}} \quad (3.4)$$

Pour la phase, on représente son écart entre une mesure ou une simulation avec ou sans cellule :

$$\Delta\phi(^{\circ}) = \phi_{avec\ ovocyte} - \phi_{sans\ ovocyte} \quad (3.5)$$

En spectroscopie d'impédance, il est usuel de faire correspondre un modèle à composants électriques discrets aux résultats obtenus. [GM00]. Dans notre cas, un modèle classique utilisé en bioimpédancemétrie décrit la tendance obtenue pour l'ensemble des spectres obtenus grâce à la modélisation numérique. Celui-ci est représenté en Fig 3.8. Dans ce modèle, R_C et R_S représentent respectivement les milieux intra et extra cellulaires. La capacité C_m quant à elle permet de rendre compte du comportement fortement isolant de la membrane lipidique entourant la cellule (voir § 1.3.2.2). Toutes les courbes de simulation obtenues s'inscrivent bien dans la réponse fréquentielle de ce réseau électrique dont le diagramme de Bode est donné en figure Fig 3.8 (b). Le spectre est caractérisé par deux fréquences caractéristiques f_{C1} et f_{C2} dont les expressions sont données ci dessous :

$$f_{C1} = \frac{1}{2\pi(R_S + R_C)C_m} \quad (3.6)$$

$$f_{C2} = \frac{1}{2\pi R_S C_m} \quad (3.7)$$

En basses fréquences ($f \ll f_{c1}$) l'impédance est purement résistive et vaut R_S . A ces fréquences, la cellule est simplement assimilable à une sphère isolante et la totalité du courant passe par le milieu extra-cellulaire. Une première fréquence de coupure apparaît lorsqu'un courant capacitif non négligeable commence à traverser la membrane : le module et la phase diminuent alors. Puis le comportement résistif du cytoplasme commence à devenir prépondérant devant l'impédance capacitive de la membrane : la phase tend vers zéro, et le module tend à se stabiliser à un nouveau palier correspondant à la contribution en parallèle des résistances du cytoplasme et du milieu de suspension ($R_S // R_C$).

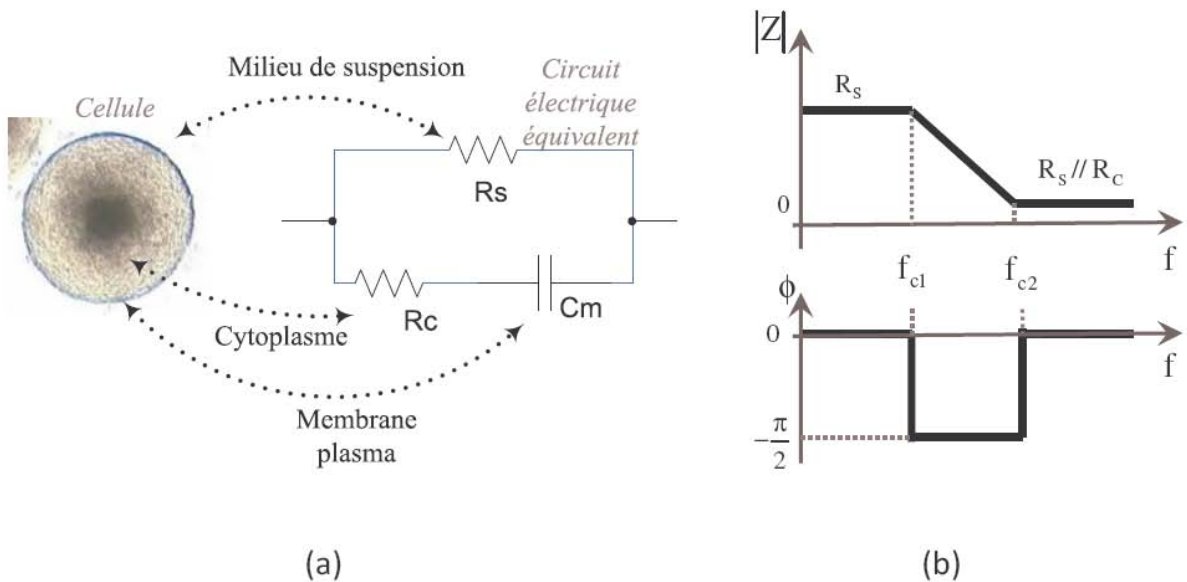


FIGURE 3.8 – (a) Modèle électrique cellulaire, (b) Diagramme de Bode décrivant le comportement fréquentiel de ce modèle.

3.3.1.2 Influence de la taille de la cellule

La figure 3.9 illustre l'influence du diamètre de la cellule sur les spectres calculés. Les résultats sont donnés pour trois diamètres (0.8 mm, 1 mm, et 1.2 mm) de cellules proches du diamètre réel de la cellule. On observe que la présence de la cellule augmente de 20 à plus de 60 % le module de l'impédance complexe sans cellule entre les électrodes

selon le diamètre considéré. Plus le diamètre est gros, plus l'augmentation du module est importante, ce qui est prévisible car la cellule ayant un comportement isolant en basses fréquences, si sa taille augmente, le passage offert pour le courant dans le sérum avoisinant est réduit, et donc l'impédance augmente. Si on se réfère au modèle électrique, d'une part la variation de la taille de la cellule aura tendance à augmenter la capacité C_m de par la surface de contact qui augmente, et d'autre part à augmenter R_s du fait du chemin plus restreint offert pour le passage du courant. En hautes fréquences, le module atteint un palier lié aux contributions en parallèle des conductivités du milieu intra et extracellulaire. Concernant la phase, l'augmentation du diamètre de la cellule se traduit logiquement par une augmentation de l'amplitude de la variation de la phase entre les deux fréquences f_{C1} et f_{C2} .

3.3.1.3 Influence de la capacité de la membrane

Lorsque l'on varie la capacité surfacique de la membrane dans le modèle numérique, le comportement est différent. Pour le module comme pour la phase, l'amplitude de la variation n'est pas altérée par la valeur de la capacité. Ceci concorde avec le modèle électrique de la figure 3.8 pour lequel cette amplitude de variation est liée au rapport des résistances R_S et R_C . En effet la variation de C_m n'influence pas le passage de courant en basses et hautes fréquences qui est dominé par R_S et R_C . Par contre, les fréquences auxquelles se produisent les coupures (f_{C1} et f_{C2}) dans le spectre sont affectées par la valeur de C_m et, sur les courbes de la figure 3.10, on observe clairement que lorsque C_m augmente, la bande de fréquences à laquelle se produit la transition est décalée vers la partie basse du spectre.

3.3.1.4 Influence de la conductivité du cytoplasme

Etudions maintenant comment la conductivité du cytoplasme influence le spectre d'impédance calculé par modélisation numérique. Premièrement, en basses fréquences, lorsque la membrane isole parfaitement le cytoplasme du milieu extra cellulaire, le module d'impédance est quasi constant quelle que soit la valeur de la conductivité du cytoplasme et est lié à la conductivité du milieu extracellulaire. Ensuite on observe que la chute de l'impédance

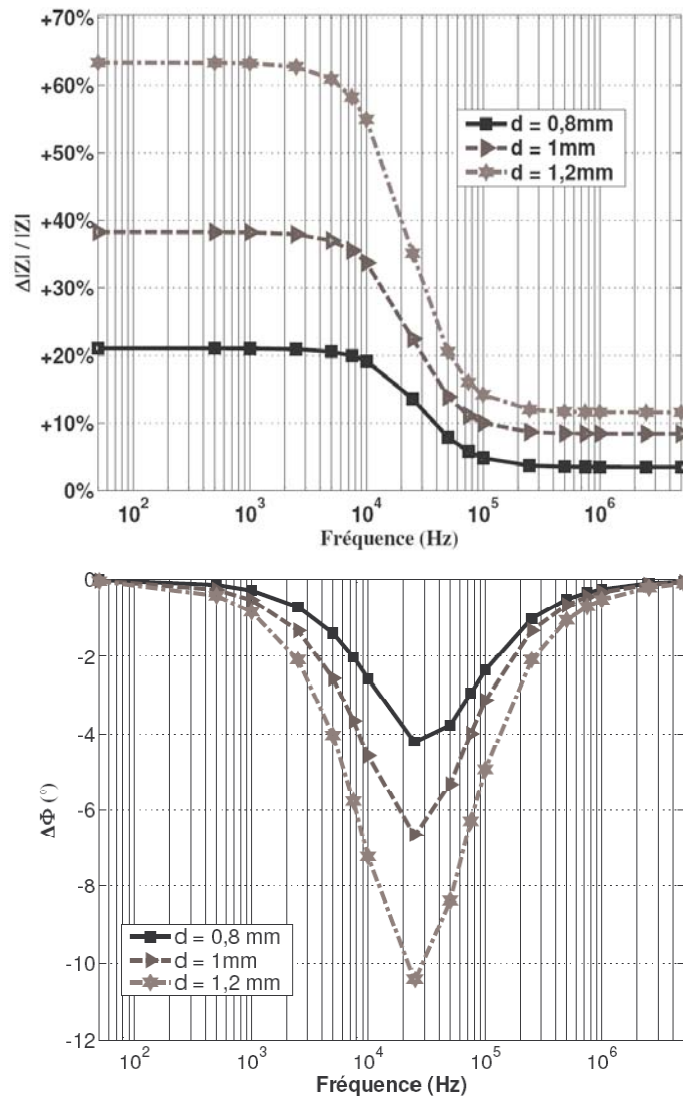


FIGURE 3.9 – . Résultats de modélisation numérique. Influence de la taille de la cellule. Variation de l'impédance complexe pour trois diamètres de cellules : $d = 0.8\text{mm}$, $d = 1\text{mm}$, $d = 1.2\text{mm}$. La conductivité du cytoplasme (σ_C), du milieu extracellulaire (σ_S) et de la capacité surfacique membranaire (C_m) sont fixées : $\sigma_C = 1.3\text{ S/m}$, $\sigma_S = 1\text{ S/m}$, $C_m = 1\text{ }\mu\text{F/cm}^2$

tout comme la variation de phase sont d'autant plus importantes que la conductivité du cytoplasme est faible devant la conductivité du milieu extracellulaire. Ceci est en accord avec le modèle électrique de la figure 3.8.

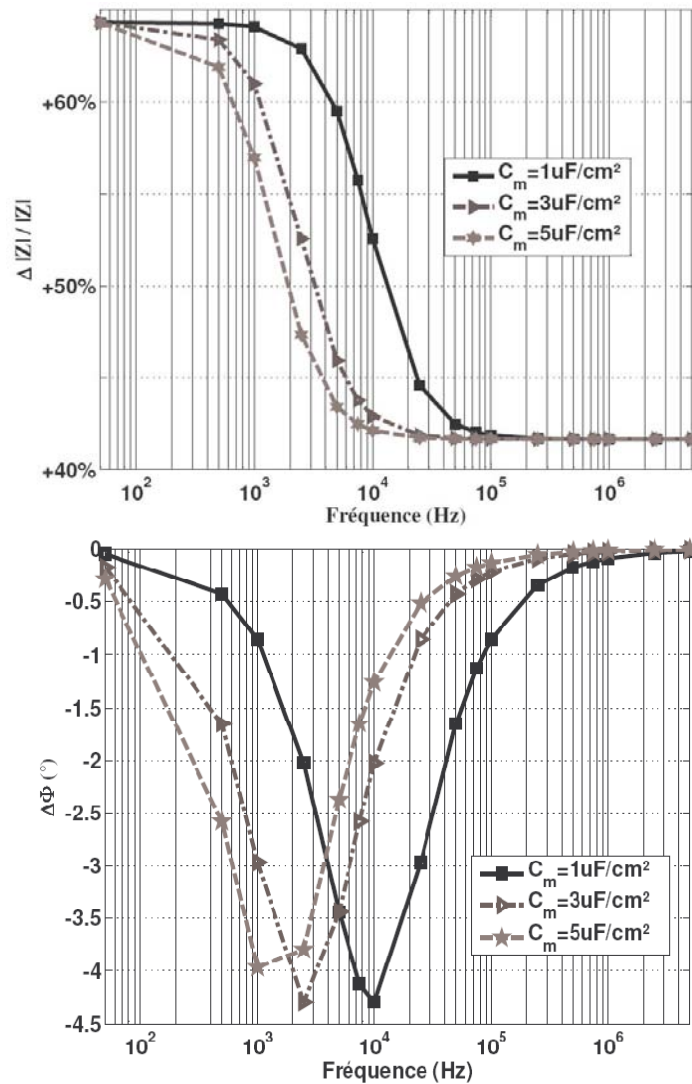


FIGURE 3.10 – Résultats de modélisation numérique. Influence de la capacité surfacique de la membrane. Variation de l'impédance complexe pour trois capacités surfaciques de membrane différentes : $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $C_m = 3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $C_m = 5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. La conductivité du cytoplasme (σ_C), du milieu extracellulaire (σ_S) et le diamètre de la cellule (d) sont fixés : $\sigma_C = 0.3 \text{ S/m}$, $\sigma_S = 1.3 \text{ S/m}$, $d = 1 \text{ mm}$

3.3.1.5 Conclusion

La modélisation numérique du dispositif de mesure nous a permis d'évaluer l'influence de plusieurs facteurs sur la mesure d'impédance. Des faibles variations de la taille, de

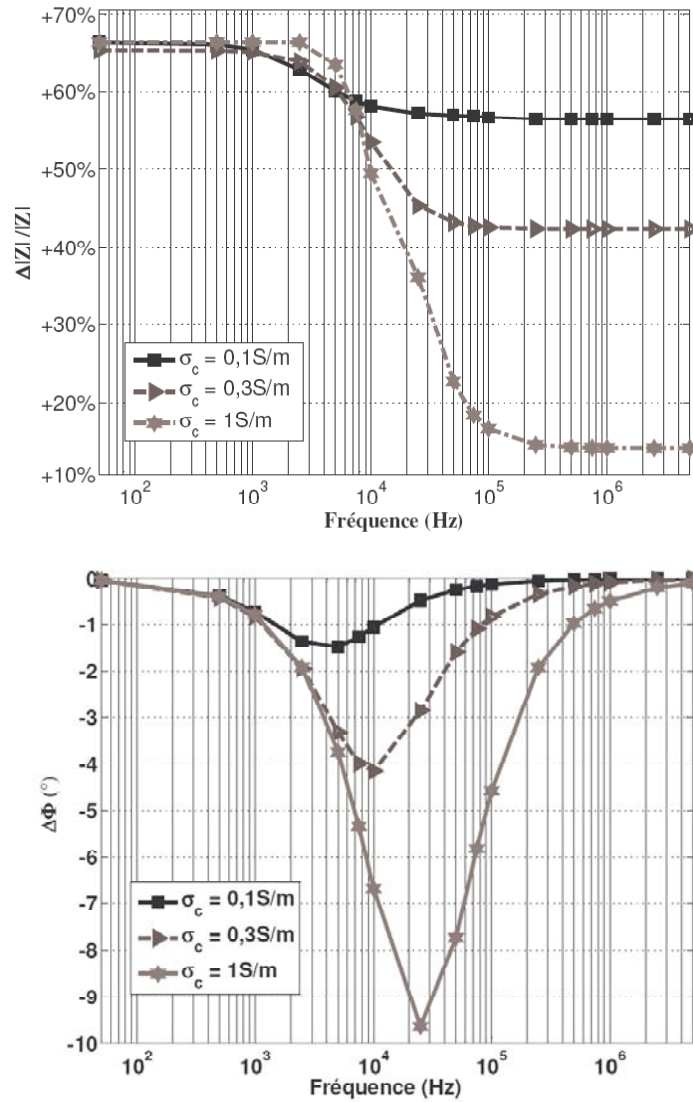


FIGURE 3.11 – Résultats de modélisation numérique. Influence de la conductivité du cytoplasme. Variation de l'impédance complexe pour trois valeurs de conductivité du cytoplasme différentes : $\sigma_C = 1 \text{ S/m}$, $\sigma_C = 0.3 \text{ S/m}$, $\sigma_C = 0.1 \text{ S/m}$. La conductivité du milieu extracellulaire (σ_S), la capacité surfacique de la membrane et le diamètre de la cellule (d) sont fixés : $\sigma_S = 1.3 \text{ S/m}$, $C_m = 1 \mu\text{F/cm}^2$, $d = 1 \text{ mm}$.

la conductivité du cytoplasme sur la base de valeurs proches de celles trouvées dans la littérature ont pu être détectées. Nous remarquons que les variations observées sont en accord avec la réponse fréquentielle d'un modèle électrique composé d'une résistance (traduisant la résistivité du cytoplasme) en série avec un condensateur (pour le comportement

capacitif de la membrane), le tout en parallèle avec une résistance (traduisant le passage du courant par le milieu de suspension avoisinant). Le but n'était pas ici de déduire une valeur absolue d'impédance électrique à comparer avec les résultats expérimentaux car des facteurs d'incertitude subsistent (dimensions exactes des électrodes, variabilité des paramètres électriques caractéristiques), mais plutôt d'observer les tendances de variations des spectres d'impédances calculés en fonction des paramètres d'intérêt (conductivité du cytoplasme, capacité de la membrane, taille de la cellule). Cette première étude nous laisse supposer que le dispositif proposé pourra être sensible aux paramètres électriques caractéristiques de la cellule. Ces remarques doivent néanmoins être nuancées car des contraintes métrologiques, qui n'apparaissent pas dans le cadre idéal de la modélisation électrique proposée, pourront limiter la sensibilité de mesure dans la configuration réelle (impédances d'interfaces métal-milieu, sensibilité de mesure de la phase, impédances résiduelles, etc...). Les résultats expérimentaux font l'objet du prochain paragraphe.

3.3.2 Résultats expérimentaux

Nous traitons dans cette partie des résultats expérimentaux obtenus avec la chaîne de mesure décrite ci-dessus. En premier lieu, l'étalonnage de la chaîne de mesure est présenté à travers des mesures sur des solutions salines calibrées, puis nous discutons l'influence de la présence d'un ovocyte dans le dispositif de mesure sur le spectre d'impédance mesuré.

3.3.2.1 Mesures préliminaires sur solutions étalons

Une première série de mesures a été réalisée sur des solutions salines étalonnées et comparée aux résultats obtenus par modélisation numérique. Le niveau du signal d'excitation est fixé à 200 mV après avoir vérifié que ce niveau d'excitation n'introduit pas de non-linéarités dans la caractéristique courant/tension pour la gamme de fréquences d'analyse. La figure 3.12 représente les mesures d'impédances sur solutions salines à des valeurs de conductivité calibrée ainsi que les résultats de simulation pour les mêmes valeurs de conductivité fixées dans le modèle numérique. Le module $|Z|$ et la phase Φ de l'impédance complexe sont présentés. Sur ces courbes, il apparaît que toutes les mesures expérimentales

tales affichent une tendance similaire, à savoir un module et une phase de grande valeur aux basses fréquences (en dessous de 100 kHz), et des valeurs relativement plus stables pour des fréquences allant de 100 kHz à 5 MHz. Ce comportement en basses fréquences correspond typiquement aux impédances d'interface métal-électrolyte (voir § 2.4.2) qui rendent la mesure difficile à basses fréquences. Cet effet n'est pas pris en compte par le modèle numérique dont les courbes sont tracées en pointillés sur la figure 3.12. C'est pourquoi les résultats de simulation se traduisent par un comportement quasi-constant sur toute la bande de fréquences. Le modèle numérique par éléments finis Comsol s'attache uniquement à la description purement " électrique " du dispositif de mesure sans intégrer ce phénomène. Pour des fréquences plus élevées (> 100 kHz), les effets des impédances d'interfaces deviennent négligeables et l'impédance mesurée reflète bien les différentes solutions mesurées. Les propriétés électriques intrinsèques des différentes solutions aqueuses peuvent être intégralement définies par la conductivité complexe $\underline{\sigma}$ qui est fonction de la fréquence :

$$\underline{\sigma} = \sigma + j\omega\varepsilon\varepsilon_0 \quad (3.8)$$

Les pertes diélectriques sont négligeables dans une telle solution (les relaxations diélectriques n'apparaissant que pour des fréquences supérieures au GHz dans l'eau). Le terme σ désigne alors uniquement la conductivité ionique (en [S/m]), liée à la concentration molaire d'ions NaCl dans la solution. Le terme ε quant à lui désigne la permittivité relative du milieu qui engendre un courant " capacitif " d'autant plus important que la fréquence est élevée. Pour les solutions considérées, la valeur de ε est très proche de celle de l'eau (~ 80). L'impédance complexe est donnée par (cf. Equ 1.40) :

$$\underline{Z} = \frac{K}{\underline{\sigma}} \quad (3.9)$$

Avec K le facteur de cellule. La détermination du facteur géométrique n'est pas aisée par voie analytique étant donné la géométrie particulière de notre dispositif. En revanche, connaissant les conductivités des solutions calibrées mesurées, il est possible de déterminer ce facteur de manière empirique et par modélisation numérique. Si on se place à une fréquence ou l'impédance mesurée est purement résistive, on peut considérer que le facteur

de cellule est fonction uniquement du module d'impédance $|Z|$ et de la conductivité ionique de la solution σ :

$$K \approx |Z| \cdot \sigma \quad (3.10)$$

3.3.2.1.1 Résultats et discussion

Pour chaque spectre considéré, on détermine le facteur de cellule pour une fréquence particulière à laquelle le comportement est considéré comme quasi purement résistif. Dans le cas des modélisations numériques, le choix de la fréquence n'a pas d'influence car le module est quasi constant sur toute la bande de fréquences. Ainsi, on trouve un facteur de cellule K moyen de $1580 \pm 5 \text{ m}^{-1}$ d'après les résultats de modélisation numérique, et de $1627 \pm 220 \text{ m}^{-1}$ d'après les résultats expérimentaux.

Même si la disparité est assez grande pour les résultats expérimentaux, on peut constater néanmoins qu'il existe une bonne adéquation entre le facteur de cellule expérimental et le facteur de cellule déterminé par la voie de la modélisation numérique. L'écart entre le facteur calculé par les deux méthodes est de l'ordre de 15 %, ce qui est acceptable sachant que de légères incertitudes existent entre les dimensions réelles du dispositif (largeur des électrodes, gap interélectrodes, etc...) et les dimensions paramétrées dans le modèle. Sur la solution de plus faible conductivité (0.02 S/m) il apparaît un déphasage négatif relativement important associé à une chute du module d'impédance dans la partie haute du spectre. Ce déphasage peut s'expliquer par la permittivité de la solution qui commence à avoir son influence. Pour une conductivité de 0.02 S/m et une permittivité de 80, le déphasage introduit à 5 MHz devrait être approximativement de :

$$\Phi = -\arctan\left(\frac{\omega \cdot \varepsilon \cdot \varepsilon_0}{\sigma}\right) \approx -48^\circ \quad (3.11)$$

C'est bien l'ordre de grandeur du déphasage que l'on observe en pratique comme en simulation. Pour résumer, les investigations faites sur des solutions salines en vue d'étalonner la chaîne de mesure suscitent plusieurs commentaires :

- En basses fréquences, l'impédance mesurée est dominée par les effets d'interfaces métal-milieu et non par la conductivité de la solution testée. Ces effets sont d'autant plus influents (en proportion) que la conductivité est faible.

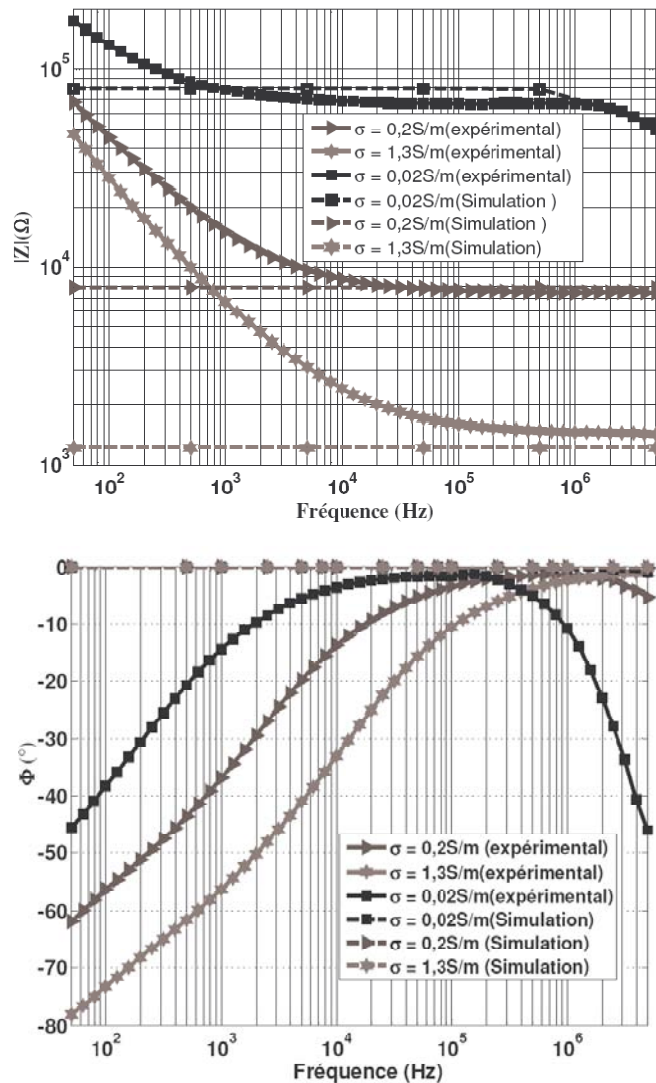


FIGURE 3.12 – Résultats expérimentaux et simulés numériquement pour des solutions de conductivités calibrées. Module et phase de l'impédance complexe.

- Pour des fréquences supérieures à 10 kHz les impédances mesurées se stabilisent, et le module reflète bien la valeur de la conductivité de la solution.
- Pour une solution de faible conductivité (0.02 S/m), l'influence de la permittivité semble être perçue par une chute du module et de la phase pour les fréquences hautes. L'adéquation entre les valeurs théoriques, les résultats de simulation et expérimentaux conforte cette hypothèse.

Cet étalonnage a donc permis de valider en partie la chaîne de mesure réalisée, du moins

pour des fréquences supérieures à 10 kHz. Pour les fréquences inférieures, la reproductibilité obtenue sera certainement un facteur limitant.

3.3.2.2 Résultats de mesures avec un ovocyte

Nous présentons dans cette partie les spectres d'impédances mesurés lorsqu'un ovocyte est placé entre les électrodes du dispositif de mesure. Les courbes de la figure 3.13 représentent la moyenne de 15 spectres obtenus sur 15 ovocytes distincts, chaque spectre représentant la variation de l'impédance complexe entre deux relevés de spectre : un premier réalisé sur le sérum physiologique seul (sans l'ovocyte) et un deuxième réalisé lorsque l'ovocyte est placé entre les électrodes. Les mesures sont réalisées à une température ambiante non régulée mais stable (25 °C). Le niveau d'excitation est toujours de 200 mV. L'ovocyte est placé dans le dispositif de mesure à l'aide d'une pipette et son positionnement est contrôlé par loupe binoculaire. Les disparités entre les 15 spectres obtenus sont visibles par les barres d'erreurs représentées sur les courbes de la figure 3.13.

3.3.2.2.1 Discussion

On peut constater que la présence de la cellule n'affecte pas significativement le spectre d'impédance en basses fréquences. A ces fréquences, l'impédance est principalement dominée par celle de polarisation à l'interface électrode-métal. Les faibles variations de l'impédance liées à la présence de la cellule ne peuvent pas être clairement distinguées des variations liées aux erreurs de reproductibilité de mesures à ces fréquences. Par contre, lorsque la fréquence augmente les variations deviennent de plus en plus détectables. On peut voir à la fin du spectre une variation d'environ 20 à 40% sur le module d'impédance. Pour la phase, on observe également une variation d'une amplitude maximale d'environ -5 ° pour une fréquence d'environ 400 kHz. Si on se réfère aux résultats de modélisation et au modèle électrique, cette transition sur la phase est similaire à celle observée en simulation et témoigne donc de l'effet capacitif de la membrane de l'ovocyte. Cet effet capacitif s'estompe ensuite lorsque la fréquence augmente. Ensuite, le palier atteint pour le module d'impédance est assimilable à la contribution en parallèle des conductivités des milieux intra et extracellulaire. Si les résultats expérimentaux peuvent être comparables

aux résultats de modélisation dans la partie haute du spectre, on notera cependant que, de par l'absence de données fiables en basses fréquences, la méconnaissance de la taille exacte de la cellule, et la disparité des valeurs de propriétés électriques de la cellule rencontrées dans la littérature, une comparaison directe des courbes expérimentales avec les simulations reste limitée. L'écart de phase mesuré est relativement faible pour notre dispositif. Ceci s'explique par le fait qu'une grande partie du courant circule autour de la cellule et non pas à travers la cellule. En effet, à travers le modèle de la figure Fig 3.8, il est facile de se rendre compte que plus R_S est faible, plus l'amplitude de variation de phase et du module sera faible, et donc la sensibilité du dispositif réduite.

3.4 Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre la démarche de conception d'une chaîne instrumentale pour la caractérisation par spectroscopie d'impédance d'une cellule isolée a été détaillée . Il s'agissait d'une première approche dont le but principal était de mettre en évidence les problèmes inhérents à ce type de mesures, et les critères d'optimisation. Le choix s'est porté sur la caractérisation de cellules ovocytes de Xénope qui sont des modèles largement répandus dans le domaine des études pharmacologiques et le développement de médicaments, et qui présentent, en ce qui nous concerne, l'avantage d'être de relativement grandes dimensions. Ce dernier point nous dispense de l'expertise nécessaire en microtechnologie afin de nous placer dans le cadre d'un prototypage rapide "fait maison". Nous avons opté pour une configuration à électrodes coplanaires réalisées par des fils d'or écrasés à leurs extrémités, et insérés au fond d'une chambre de mesure en plexiglas. Cette solution apporte simplicité technologique et libère un accès à la cellule pour d'autres instruments. De plus, elle est facilement applicable dans le domaine des microtechnologies en vue d'une application future. La première étape de validation a consisté à modéliser le dispositif de mesure réalisé par la méthode des éléments finis à l'aide du logiciel COMSOL, dans l'objectif d'évaluer la sensibilité de la mesure aux paramètres électriques caractéristiques de la cellule. Nous avons pu vérifier l'influence de la taille de la cellule, de la conductivité du cytoplasme, et de la capacité membranaire sur les spectres d'impédances calculés. Ont

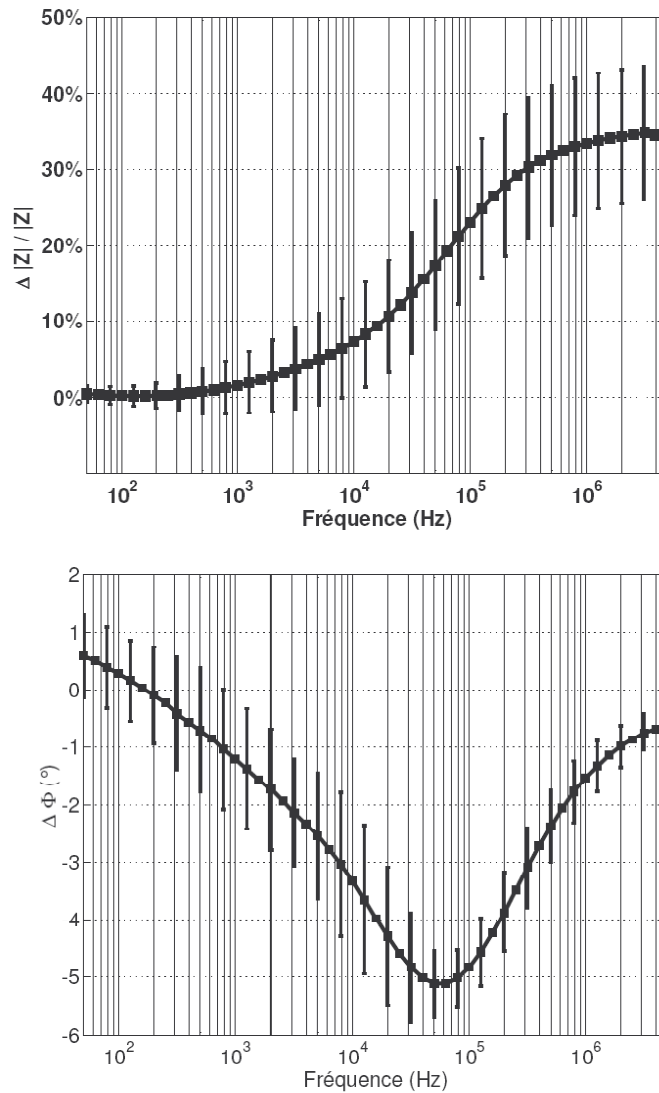


FIGURE 3.13 – Résultats de mesures expérimentales. Moyenne de Variation de l'impédance complexe (avec et sans cellule dans le dispositif de mesure) pour 15 spectres successifs mesurés.

ensuite été présentées les mesures d'étalonnage sur solutions salines calibrées qui nous ont permis de constater la sensibilité à la conductivité et à la permittivité des milieux en hautes fréquences et la faible sensibilité en basses fréquences du fait des phénomènes d'impédances d'interfaces métal-milieu. Enfin les résultats expérimentaux obtenus sur des cellules insérées dans le dispositif ont été discutées. Ils semblent présenter un profil analogue à ceux obtenus par la modélisation dans la partie haute du spectre, mais l'absence de

données fiables en basses fréquences rend difficile l'interprétation des résultats. Plusieurs conclusions peuvent être tirées de cette tentative. Premièrement, les impédances aux interfaces métal-milieu constituent une contrainte métrologique majeure qu'il conviendra de corriger lors d'une prochaine réalisation (traitement de surface, méthode tétrapolaire, etc...). Deuxièmement la sensibilité offerte par le dispositif reste limitée. Les variations de phases et de module liées à la présence de la cellule sont encore de faibles amplitudes. La principale raison invoquée pour cela est le chemin préférentiel offert pour le passage du courant par le sérum physiologique au voisinage de la cellule. Autrement dit, la valeur de R_S , dans le modèle électrique de la figure 3.8) devrait être rendue la plus grande possible pour pouvoir mesurer des variations de phase et de modules significatives. La valeur de R_S est liée à la conductivité du sérum physiologique et au volume de sérum autour de la cellule. La conductivité du sérum est en général un facteur non paramétrable puisque celle-ci est liée à la concentration des espèces ioniques dans le sérum qui permettent de maintenir la cellule dans un état physiologique stable. L'autre solution plus envisageable consiste à limiter au maximum le sérum qui "court-circuite" la cellule. Les réalisations techniques nécessaires deviennent alors plus complexes. Il est par exemple possible de recourir à une géométrie type entonnoir ou capillaire [CC38] [AI00] [Thi03] de telle sorte à confiner la cellule entre deux parois isolantes. Plusieurs problèmes se posent alors : la réalisation technique du dispositif, le positionnement reproductible de la cellule et l'évaluation du gap existant entre les parois et la cellule, car même un gap infime peut provoquer une impédance de shunt non négligeable.

Chapitre 4

Microspectrométrie de bioimpédance à configuration tétrapolaire

Sommaire

4.1	Introduction	101
4.2	La chaîne de mesure	101
4.2.1	Les électrodes	102
4.2.2	Circuit de conditionnement	104
4.2.3	Acquisition et traitement des données	115
4.3	Validation de la chaîne de mesure	116
4.3.1	Introduction	116
4.3.2	Modélisation électromagnétiques des électrodes	116
4.3.3	Etalonnage du conditionneur électronique	128
4.3.4	Apport de la configuration tétrapolaire	135
4.3.5	Accès à l'échantillon fluide	136
4.3.6	Influence de la température	142
4.3.7	Conclusion	144
4.4	Validation expérimentale du microspectromètre	144
4.4.1	Mesures sur solutions salines calibrées	145
4.4.2	Mesures sur échantillons sanguins	147

4.5 Conclusion 152

4.1 Introduction

Dans ce chapitre nous proposons une chaîne de conditionnement adaptée à la caractérisation par spectroscopie d'impédance de fluides biologiques de faibles volumes en basses fréquences (1 kHz - 100 kHz). Par l'intermédiaire d'un dispositif à microélectrodes suivant une configuration tétrapolaire. Cette configuration permet de corriger le problème rencontré (impédances d'interfaces) avec le dispositif de caractérisation du chapitre précédent basé sur une configuration bipolaire. Il nécessite néanmoins de repenser l'électronique de conditionnement pour l'adapter à une configuration tétrapolaire. Dans une première partie, les différents éléments (circuit de conditionnement, microélectrodes, logiciel d'acquisition) composant la chaîne de mesure sont décrits. Une deuxième partie traite de la validation de la chaîne de mesure via différents aspects (modélisation des électrodes, étalonnage du circuit de conditionnement). Enfin, dans une troisième partie, les résultats obtenus sur des solutions calibrées et échantillons sanguins sont présentés puis discutés.

4.2 La chaîne de mesure

Elle se compose de la matrice d'électrodes, d'un circuit électronique de conditionnement et d'un ordinateur (voir Fig 4.1). La chaîne d'acquisition est pilotée par un PC portable via un protocole Bluetooth qui gère les signaux, l'acquisition et le traitement des données. Le circuit électronique réalisé est basé autour d'un circuit intégré spécialement dédié à la spectroscopie d'impédance. Une connectique ad hoc permet le montage et démontage du microcapteur pour le nettoyage et rangement après mesure, celui-ci étant très fragile. Dans cette partie nous nous attachons à décrire les différents éléments constituant la chaîne de mesure.

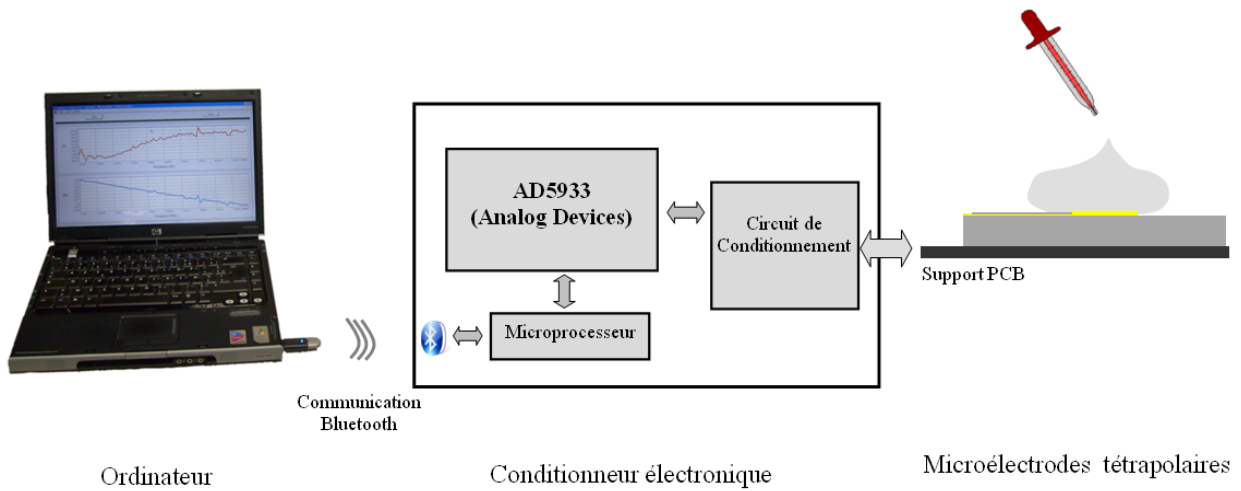


FIGURE 4.1 – Chaîne de mesure

4.2.1 Les électrodes

Les mesures d'impédances qui seront présentées par la suite ont été réalisées à l'aide d'une matrice d'électrodes commercialisée par la société Abtech⁴. Cette matrice se compose de 4 microbandes de platine de 3 mm de longueur, 20 μm de large et séparées les unes des autres par un gap de 20 μm . Un croquis de la matrice d'électrodes ainsi que des photos explicatives sont donnés en Fig 4.2. Les électrodes de platine sont obtenues par un procédé standard de dépôt métallique par évaporation par canon à électrons sur un substrat de verre. Les surfaces métalliques servant de connexions électriques aux microélectrodes sont isolées électriquement par une couche de nitrure de silicium (Si_3N_4) d'environ 500 nm d'épaisseur déposée à la surface de la matrice. La partie sensible de la matrice d'électrodes se limite à la zone délimitant les 4 microbandes (3 mm \times 100 μm) qui n'est pas recouverte par cette couche isolante (voir Fig 4.2). Les spécifications techniques plus complètes de la matrice d'électrodes sont fournies en annexe D.

4. Applications Development ABTECH Scientific, Inc. 911 East Leigh Street G24, Richmond, Virginia 23219

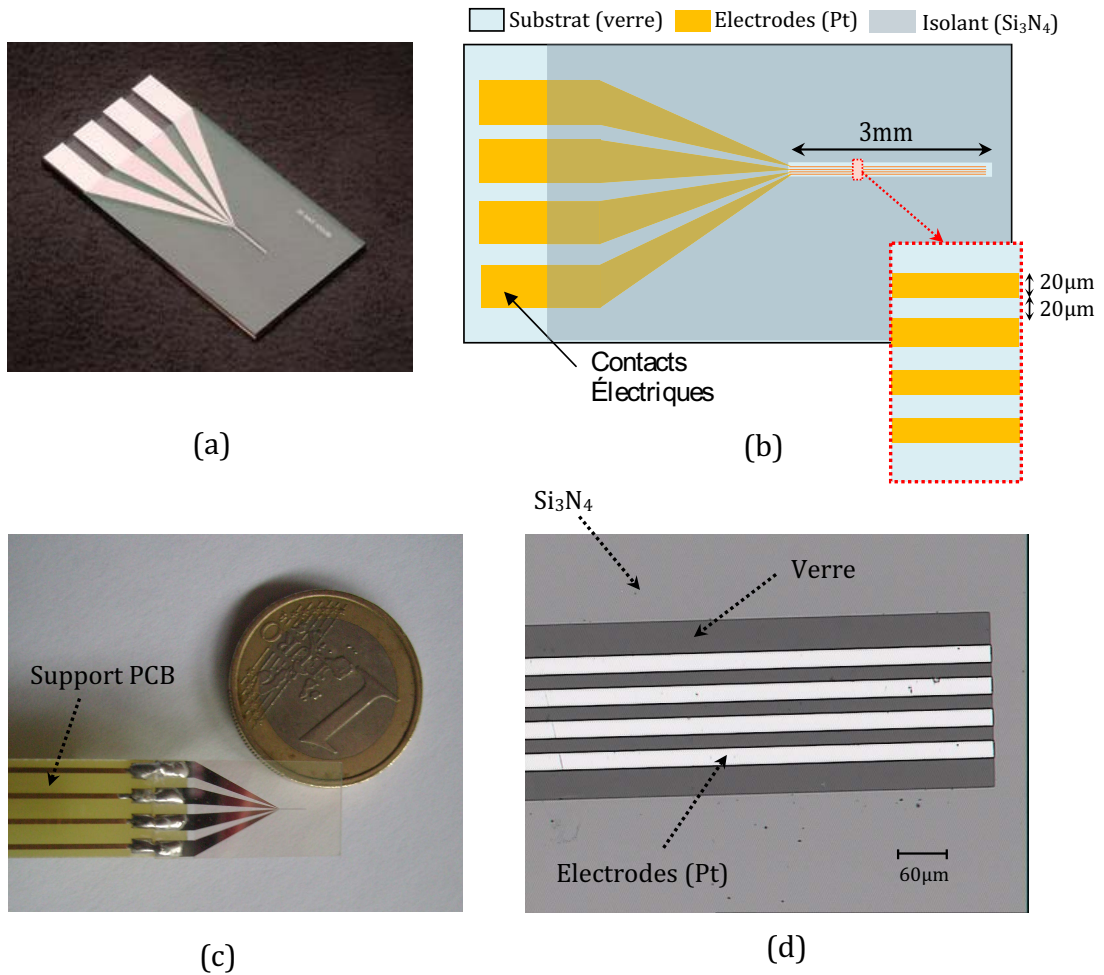


FIGURE 4.2 – (a) Photo de la matrice d'électrodes avant montage. (b) Croquis représentant la matrice d'électrodes (c) Photo de la matrice d'électrodes attachée à son support PCB (d) Photo prise au microscope électronique : extrémité de la zone sensible faisant apparaître les microbandes.

4.2.2 Circuit de conditionnement

4.2.2.1 Introduction

La matrice d'électrodes utilisée est composée de 4 microbandes de platine. Cette configuration permet d'envisager une configuration tétrapolaire avec l'avantage de réduire grandement l'influence des impédances d'interfaces métal-milieu. Pour ce faire, une électronique de conditionnement doit être conçue. Elle doit disposer d'un circuit d'excitation et d'un circuit de mesure de tension distincts. Le conditionnement électronique est basé sur un circuit spécifiquement dédié à la spectroscopie d'impédance récemment commercialisé par Analog Devices [Dev08] [Dev06a] [Dev07] [Dev06b]. Dans cette partie nous présenterons dans un premier temps le principe de fonctionnement de ce circuit puis l'adaptation qui a été réalisée pour répondre à nos objectifs.

4.2.2.2 Le circuit AD5933 de Analog Devices

Le circuit AD5933 est un circuit dédié à la spectroscopie d'impédance proposé récemment par Analog Devices. Il intègre les principaux éléments présents dans une chaîne de conditionnement de spectroscopie d'impédance dans un boîtier CMS MSOP de 10 broches. Il présente, entre autres, l'avantage d'être entièrement pilotable par bus *i2C*. Le principe de mesure repose sur l'estimation de la puissance spectrale du courant circulant dans l'impédance à caractériser lorsque celle-ci est soumise à une tension d'excitation sinusoïdale d'amplitude et de fréquence connue, l'analyse spectrale se limitant au calcul de la puissance du signal de courant à la fréquence d'excitation considérée. La chaîne de mesure constituée par le circuit peut se diviser en trois sous-parties que l'on peut distinguer sur le schéma synoptique de la Fig 4.3 : l'étage d'excitation, l'étage de mesure du courant et l'algorithme de calcul de la TFD sur l'enregistrement du signal de courant mesuré.

4.2.2.2.1 Etage d'excitation

L'étage d'excitation permet de générer la tension sinusoïdale d'excitation à appliquer à l'impédance à caractériser (pin Vout, Fig 4.3). Il se compose d'un accumulateur de phase DDS 27 bits qui permet de synthétiser le signal sinusoïdal à la fréquence programmée

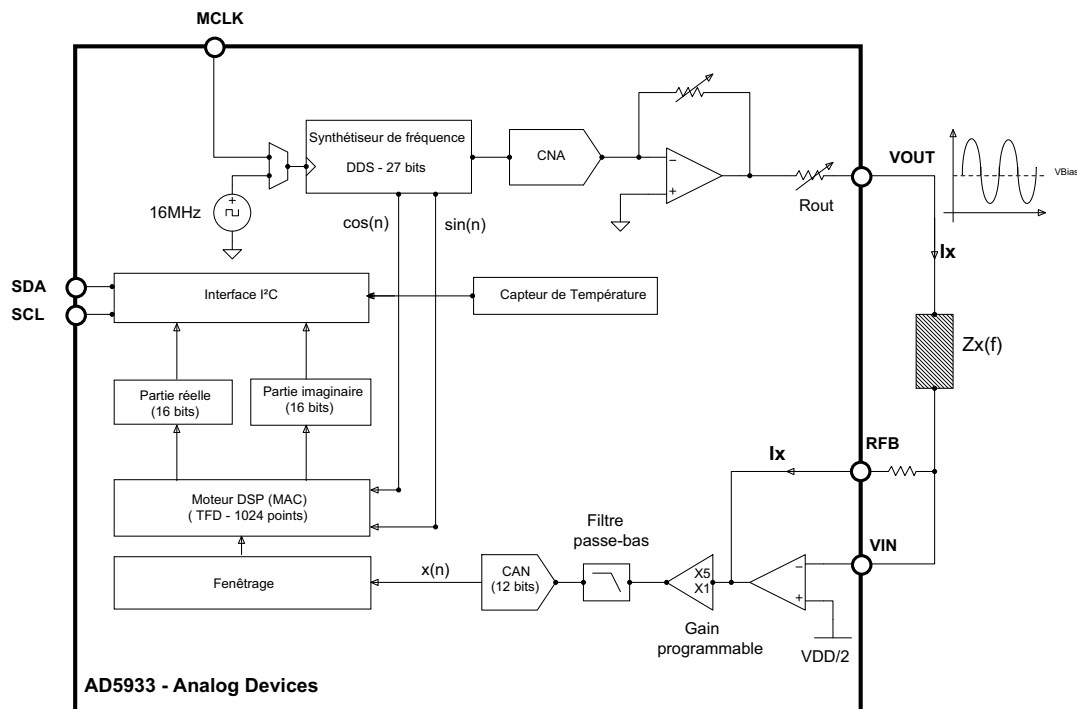


FIGURE 4.3 – Schéma synoptique du circuit AD5933 de Analog Devices

par l'utilisateur, d'un convertisseur numérique analogique, et d'un étage de gain. L'étage de gain ainsi que la fréquence du signal synthétisé sont paramétrables par l'utilisateur par programmation de registres via le bus i2C. La programmation permet ainsi le réglage d'une fréquence maximale de 100 kHz et de quatre valeurs possibles de niveau d'excitation : 1.98 V_{pp}, 0.97 V_{pp}, 383 mV_{pp} et 198 mV_{pp}. Le circuit étant alimenté en 0-5 V, le signal généré comporte toujours une composante continue. L'accumulateur de phase DDS fournit également en parallèle les signaux phaseurs de tests (*cos* et *sin*) nécessaires à l'algorithme TFD.

4.2.2.2 Etage de mesure du courant

Le rôle de cet étage est la mesure du courant I_x circulant dans l'impédance Z_x (voir Fig 4.3), lorsque celle-ci est soumise à l'excitation en tension. Il se compose d'un amplificateur courant-tension, d'un étage de gain programmable, d'un filtre anti-repliement et d'un convertisseur analogique numérique 12 bits. L'amplificateur courant-tension est formé par un amplificateur intégré (montage trans-impédance) et la résistance de conversion R_{FB}

qui est fixée par l'utilisateur à l'extérieur du circuit. Le courant I_x circule dans RFB et développe une différence de potentiel à la sortie de l'amplificateur. L'étage de gain programmable qui suit permet d'ajouter un facteur d'amplification supplémentaire sur le signal récupéré paramétrable à 1 ou à 5 par programmation via l'interface i2C. Après avoir traversé le filtre passe-bas anti-repliement, la tension analogique est alors convertie en mots numériques sur 12 bits. Une conversion analogique numérique nécessite 16 cycles de l'horloge générale du circuit MCLK. La fréquence de MCLK étant de 16.776 MHz par défaut, la fréquence d'échantillonnage f_e du CAN est de $16.776 \text{ MHz}/16 = 1.0485 \text{ MHz}$. Les échantillons numériques sont fournis directement à l'algorithme de calcul de TFD qui suit.

4.2.2.2.3 Algorithme de calcul de la TFD

Le principe de détermination de l'impédance du circuit AD5933 repose sur l'analyse de la puissance spectrale du signal de courant mesuré grâce à un algorithme de transformée de Fourier Discrète (TFD). Cette approche offre de nombreux avantages comme par exemple :

- Une très bonne réjection DC
- Un moyennage des erreurs
- L'information de phase

Dans un algorithme de TFD conventionnel, un enregistrement numérique d'un signal continu est corrélé à un ensemble de phaseurs tests à des fréquences multiples d'un pas fréquentiel donné par :

$$\Delta f = f_e/N = 1/T \quad (4.1)$$

Où N désigne le nombre d'échantillons prélevés sur le signal temporel (taille du fenêtrage), f_e désigne la fréquence d'échantillonnage et T la durée d'enregistrement (durée du fenêtrage). La corrélation effectuée pour chaque fréquence test multiple du pas fréquentiel Δf donne une mesure de la puissance du signal à cette fréquence discrète. Un enregistrement temporel de N échantillons produit donc un spectre de N fréquences discrètes séparées par un pas Δf . La méthode employée par le circuit diffère légèrement de cette approche conventionnelle. En effet, l'algorithme implanté se limite au calcul de puissance du

signal à une seule fréquence de test qui n'est autre que le fréquence du signal d'excitation généré. L'expression de l'algorithme implanté est donnée ci-dessous :

$$\underline{X}(f) = \sum_{n=0}^{1023} x(n) \cdot (\cos(2\pi f \cdot n \cdot T_e) - j \sin(2\pi f \cdot n \cdot T_e)) \quad (4.2)$$

Où $\underline{X}(f)$ est la puissance du signal calculé à la fréquence f , $x(n)$ sont les échantillons numériques du signal fournis par le CAN, et $\cos(2\pi f \cdot n \cdot T_e)$ et $\sin(2\pi f \cdot n \cdot T_e)$ sont les échantillons des vecteurs test fournis simultanément par le synthétiseur de fréquences. Le fait que les échantillons des vecteurs de test soient générés par le même synthétiseur de fréquences que les échantillons du signal d'excitation garantit que la fréquence d'analyse correspond exactement à la fréquence du signal d'excitation. La relation 4.2 correspond bien à la forme générale de la transformée de Fourier Discrète [TPS08] pour laquelle le nombre d'échantillons prélevés est limité à 1024 et le phaseur est écrit sous sa forme trigonométrique. Le calcul est réalisé à l'aide d'une architecture MAC (Multiply-Accumulate) qui accumule en temps réel le résultat de la multiplication des échantillons avec les échantillons des vecteurs de tests. Au bout de 1024 multiplications successives ($n = 1023$), le résultat du calcul est disponible est accessible par l'utilisateur (via l'interface i2C) dans deux registres 16 bits contenant respectivement la partie réelle et la partie imaginaire de $\underline{X}(f)$. L'instant de démarrage de l'algorithme ($n = 0$) peut être programmé par l'utilisateur (via l'interface i2c) en nombres de cycles postérieurs au positionnement du signal d'excitation, ceci afin de garantir un temps de stabilisation suffisant (voir Fig 4.4). La précision de l'algorithme dépend principalement de la qualité de l'enregistrement réalisé. En particulier, il faut veiller à ce que le fenêtrage temporel réalisé sur les 1024 échantillons contienne un nombre entier de périodes du signal d'excitation sans quoi la valeur calculée risque d'être entachée d'erreurs liées au phénomène de fuites spectrales.

4.2.2.2.4 Détermination de l'impédance complexe à partir du calcul de TFD

Considérons une admittance complexe $\underline{Y}(f)$ placée entre les pins V_{out} et V_{in} du circuit (voir Fig 4.3). Soit $\underline{I}(f)$ le courant complexe circulant dans l'admittance. En notation harmonique, on peut écrire :

$$\underline{I}(f) = \underline{V}_{out}(f) \cdot \underline{Y}(f) \quad (4.3)$$

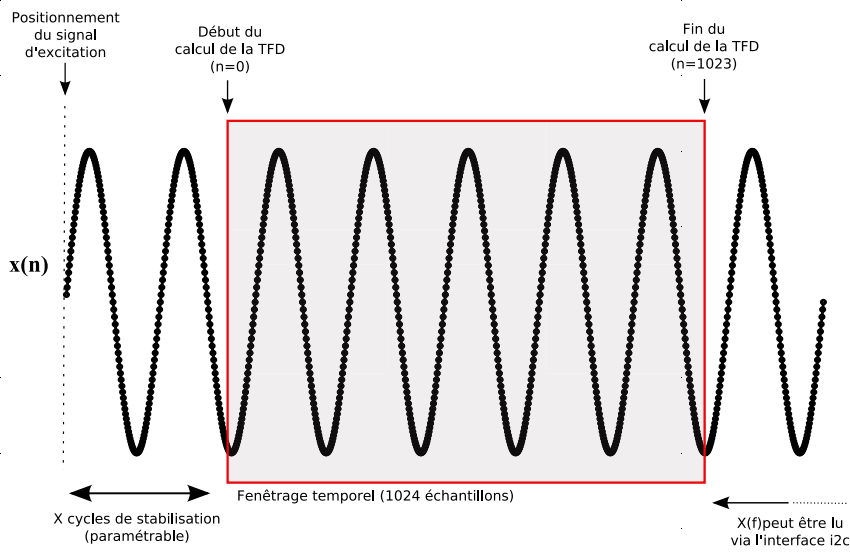


FIGURE 4.4 – Illustration du fenêtrage sur le signal $x(n)$

La valeur $\underline{X}(f)$ calculée par l'algorithme de TFD est l'image de la puissance du signal de courant mesuré à la fréquence d'excitation considérée :

$$\underline{X}(f) = \underline{I}(f) \cdot \underline{K}(f) = \underline{V}_{out}(f) \cdot \underline{Y}(f) \cdot \underline{K}(f) \quad (4.4)$$

Avec $\underline{K}(f)$ un facteur de gain sur la mesure de courant fonction du gain programmé, de la résistance de conversion R_X utilisée, et du facteur de conversion du convertisseur analogique numérique. Pour un réglage donné, le facteur $\underline{K}(f) \cdot \underline{V}_{out}(f)$ est constant, et la valeur $\underline{X}(f)$ est alors proportionnelle à l'admittance complexe à caractériser. Soit $\underline{C}(f) = \underline{K}(f) \cdot \underline{V}_{out}(f)$ le facteur de proportionnalité (ou facteur de calibration) entre l'admittance complexe et la valeur $\underline{X}(f)$. On a alors :

$$\underline{X}(f) = \underline{C}(f) \cdot \underline{Y}(f) \quad (4.5)$$

Pour déterminer l'admittance complexe à caractériser à la fréquence f , il est donc nécessaire de connaître au préalable le facteur de calibration $\underline{C}(f)$ pour cette fréquence. Celui-ci doit être déterminé expérimentalement avant la mesure réelle en réalisant une mesure sur une admittance parfaitement connue. Il s'agit de la procédure de calibration.

4.2.2.3 Dispositif électronique complet

Le circuit d'Analog Devices permet d'envisager d'embarquer un système de spectroscopie d'impédance dans un encombrement réduit car il intègre l'essentiel de l'électronique nécessaire. Néanmoins, son application dans le domaine de la bio-impédance nécessite quelques adaptations. Trois caractéristiques intrinsèques font que le circuit n'est pas, a priori, adapté pour une mesure de bio-impédance :

- Premièrement, le circuit est alimenté par une tension positive uniquement, ce qui signifie que le signal d'excitation fourni varie autour d'une composante continue. Dans de nombreuses applications de spectroscopie d'impédance, ceci ne constitue pas un problème, mais cette composante continue présente à l'interface entre une électrode métallique et une solution aqueuse entraîne un processus électrochimique qui, s'il est entretenu suffisamment longtemps peut altérer le milieu à caractériser [GM00]. Pour éviter ce phénomène "d'électrolyse" le signal d'excitation doit être couplé alternativement.
- Deuxièmement, le circuit est typiquement prévu pour une mesure d'impédance dans une configuration bipolaire, où l'excitation et la mesure sont dans le même circuit. Dans le domaine de la bio-impédance, il est souvent préférable de se placer dans une configuration tétrapolaire afin de limiter la sensibilité aux problèmes d'impédances d'interfaces métal-milieu (voir § 2.4.2). C'est d'ailleurs la configuration de la matrice d'électrodes utilisée pour notre application.
- Enfin, le niveau d'excitation minimal paramétrable pour le circuit est de l'ordre de 200 mVpp. Ce niveau minimal, acceptable pour de nombreuses applications, peut s'avérer limitatif pour des mesures d'impédances à des échelles microscopiques. En effet, une telle tension appliquée à une électrode dont la surface de contact est réduite à des dimensions micrométriques peut induire une densité de courant non linéaire avec la tension, et suffisamment élevée pour perturber l'échantillon sous test d'autant plus s'il s'agit d'une mesure sur du vivant.

On notera également que, par défaut le circuit d'excitation du AD5933 possède une impédance de sortie non-nulle. Elle peut varier de 200 à 2.4 k Ω en fonction de l'un des quatre

niveaux d'excitation choisi (voir § 4.2.2.2.1). Celle-ci peut devenir une source d'erreur lorsque l'impédance à mesurer se ramène au même ordre de grandeur. L'intervalle nominal de mesure se situe entre 1 k et 10 M Ω . Pour des valeurs inférieures à 1 k Ω , un circuit bufferisé externe devient nécessaire selon les préconisations d'Analog Devices. Afin d'utiliser au mieux ce composant, un circuit de conditionnement électronique d'adaptation a été associé au circuit AD5933. Les fonctions qu'il remplit sont les suivantes :

- Adaptation de la configuration bipolaire en tétrapolaire.
- Couplage alternatif du signal d'excitation
- Réduction du niveau d'excitation et amplification complémentaire dans la chaîne de mesure.

Pour le problème de l'adaptation en configuration tétrapolaire, une première solution technologique consisterait à convertir la source de tension du circuit AD5933 en source de courant et à mesurer non plus le courant (qui dans ce cas est la référence connue) mais la tension aux bornes des électrodes entre les électrodes 2 et 3 (voir Fig 4.5). Cette approche a été utilisée par [SFSB08]. La principale difficulté ici réside dans la complexité technologique de mise en oeuvre d'une source de courant stable en fonction de la fréquence d'excitation et de l'impédance à caractériser [RMC96] [RSNI03]. La solution retenue pour notre application repose sur la mesure consécutive du courant et de la tension par multiplexage. Par cette approche, la qualité de la mesure réalisée ne repose pas sur la source utilisée mais uniquement sur la qualité de la mesure réalisée sur la tension et le courant. Nous donnons le schéma électronique global du circuit de conditionnement conçu en Fig 4.5 ainsi qu'une photographie de la carte réalisée en Fig 4.6. Sur le schéma, l'objet à caractériser est représenté par la zone grisée (DUT) et les bornes nommées de 1 à 4 représentent les 4 points de test sur l'objet (les 4 microélectrodes dans notre cas). Les détails de réalisations des différentes parties sont précisés par la suite.

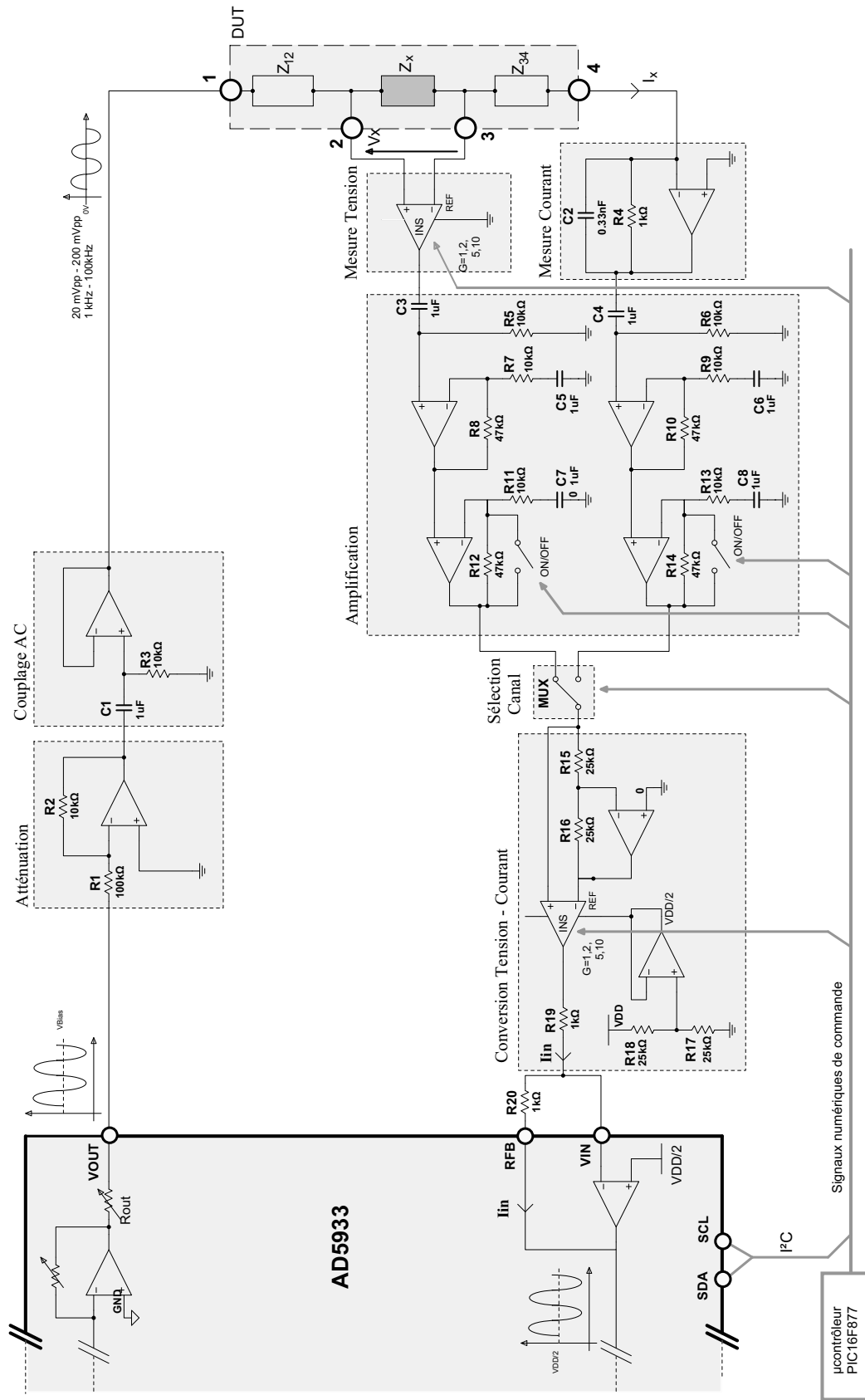


FIGURE 4.5 – Schéma du circuit de conditionnement

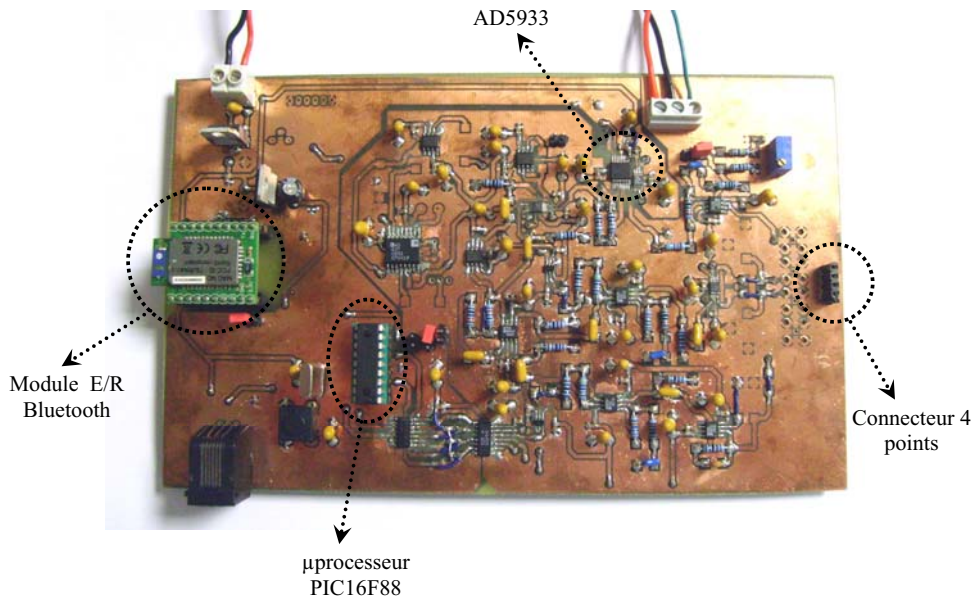


FIGURE 4.6 – Photographie de la carte électronique réalisée

Le signal d'excitation fourni par le circuit AD5933 est tout d'abord atténué puis filtré pour être appliqué à l'électrode d'excitation (borne 1). La différence de potentiel entre les bornes 2 et 3 est mesurée à l'aide d'un amplificateur d'instrumentation puis amplifiée. Le courant circulant dans l'objet sous test est quant à lui converti en tension puis amplifié également. A l'entrée du multiplexeur analogique (MUX) apparaissent donc deux tensions : une première tension qui est l'image de la différence de potentiel V_X présente entre les bornes 2 et 3 de l'objet sous test, et une deuxième tension qui est l'image du courant I_X circulant dans l'objet sous test. Ces deux tensions sont sélectionnées successivement à l'aide du multiplexeur analogique, puis converties en courant pour être mesurées par le circuit AD5933. Donc, finalement, pour chaque fréquence de test, deux mesures successives dans les deux positions du commutateur analogique sont réalisées, l'une correspondant à la mesure du courant I_X et l'autre à la mesure de la tension V_X . Pour chacune des deux mesures, la valeur complexe calculée et enregistrée dans les registres de circuit AD5933, est récupérée. On obtient donc deux valeur complexes, l'une correspondant au calcul de

la *TFD* lorsque la tension V_X est mesurée et l'autre lorsque le courant I_X est mesuré. Le rapport de ces deux grandeurs nous donne l'impédance complexe de l'échantillon à un facteur de calibration près qu'il convient de déterminer expérimentalement. Les détails de réalisations des différentes parties sont donnés ci-dessous.

4.2.2.3.1 Atténuation et couplage AC

Cette partie concerne la mise en forme du signal pour l'excitation. Elle est nécessaire pour diminuer le niveau d'excitation en tension et éliminer la composante continue du signal fourni par le AD5933. L'atténuation est réalisée à l'aide du montage inverseur constitué par U1, R1 et R2 (Fig 4.5). Le choix du rapport $R1/R2$ est un compromis entre le rapport d'atténuation désiré et la limitation du courant fourni par le circuit AD5933. Le signal atténué est ensuite couplé alternativement à l'aide du condensateur $C1$. $R3$ fournit un chemin pour les courants de polarisation de l'ampli-op. Le montage suiveur (U2) a pour effet de réduire la résistance de source vue par le DUT à une valeur quasi-nulle (impédance de sortie de l'ampli-op), et permet d'envisager des mesures sur des faibles impédances. Finalement, le signal appliqué au DUT (sur la borne 1) est alternatif et peut varier entre des amplitudes allant de 20 mVpp à 200 mVpp selon le réglage de calibre choisi pour le circuit AD5933.

4.2.2.3.2 Préamplificateur de courant

La mesure du courant est réalisée à l'aide d'un montage classique convertisseur courant-tension à masse virtuelle. Le courant I_X circulant dans l'impédance à caractériser traverse également $R4$ (voir Fig 4.5). Le montage fournit donc une tension proportionnelle au courant mesuré. Le condensateur $C2$ limite la bande passante de bruit de l'étage d'amplification. Enfin, signalons également que même si un bruit non négligeable est présent en sortie de l'étage, le signal utile pourra toujours être discriminé grâce à l'algorithme TFD implanté dans le circuit AD5933 qui focalise l'analyse sur la fréquence discrète d'excitation.

4.2.2.3.3 Préamplificateur de tension

La mesure de la différence de potentiel entre les bornes 2 et 3 (voir Fig 4.5) est réalisée

à l'aide d'un amplificateur d'instrumentation intégré à gain programmable de 1 à 10 (AD8250, Analog Device). Les impédances d'entrées très élevées ($1.5 \text{ G}\Omega \parallel 2 \text{ pF}$) ainsi que le fort taux de réjection de mode commun (90 dB min à 50 kHz) de l'amplificateur utilisé permettent de limiter les sources d'erreurs en ce qui concerne la mesure de la tension.

4.2.2.3.4 Amplification

Cet étage permet d'apporter une amplification supplémentaire aux signaux de courant et tension mesurés. Identique pour les deux voies (courant et tension), il consiste en deux montages amplificateurs non-inverseurs montés en cascade. Le premier amplificateur a un gain fixé de 4.7 par le choix des résistances $R7$ à $R10$, et le deuxième a un gain configurable à 4.7 ou à 1 en fonction de la position d'un interrupteur commandé numériquement (Fig 4.5). Les capacités $C5$ à $C8$ permettent de minimiser la présence éventuelle de tensions d'offset dans la chaîne de mesure.

4.2.2.3.5 Multiplexage

Le multiplexage permet la sélection de la voie de mesure : tension ou courant. Pour ce faire, un multiplexeur analogique intégré a été utilisé (AD8170, Analog Devices). Celui-ci est piloté numériquement depuis le microcontrôleur.

4.2.2.3.6 Conversion Courant/Tension Le circuit AD5933 est fait pour mesurer un courant du fait de sa topologie d'étage d'entrée (amplificateur trans-impédance). Or, à la sortie du multiplexeur, nous récupérons une tension proportionnelle au courant ou à la tension mesurée (selon la voie sélectionnée). Cette tension doit donc être convertie en courant pour pouvoir être mesurée par le circuit. Cette conversion est opérée à l'aide d'un montage à amplificateur d'instrumentation (voir Fig 4.5). Le gain programmable de l'amplificateur permet d'ajuster un gain supplémentaire sur la chaîne de mesure totale.

4.2.3 Acquisition et traitement des données

La carte électronique est pilotée et configurée depuis un ordinateur distant via une communication sans fil Bluetooth. Cet accès sans fil apporte une flexibilité d'usage et permet d'envisager l'application du système électronique réalisé dans un environnement ou l'accès par fils peut être restreint (ex : mesure sur sujets vivants). Un microcontrôleur embarqué sur la carte joue le rôle de noeud de communication entre le logiciel de pilotage sur le PC et les différentes parties électroniques configurables (AD5933, gains programmables, sélection de canal) de la carte. Le logiciel de pilotage a été développé en C++.NET. Il permet entre autres :

- Le paramétrage intuitif de l'ensemble des fonctionnalités du circuit AD5933 (balayage fréquentiel, niveaux d'excitations, etc..) et des différents gains de la chaîne de mesure.
- Le contrôle visuel du spectre d'impédance (module et phase) en cours de mesure.
- Le choix d'un balayage fréquentiel (spectroscopie) ou temporel (à fréquence fixe) pour l'étude d'un milieu évoluant dans le temps.
- La gestion automatisée de la phase de calibration sur composants étalons.
- L'enregistrement des acquisitions sous formes de fichiers.

La fenêtre de configuration principale du logiciel est présentée en Fig 4.7. Celle-ci fait apparaître certaines des fonctionnalités énoncées ci-dessus. La fenêtre d'affichage des courbes d'impédances apparaît en Fig 4.8. La stabilité des échantillons biologiques dans le temps conditionne fortement les mesures comme nous le verrons. L'ergonomie recherchée pour ce prototype via ce logiciel d'acquisition va de pair avec l'objectif d'effectuer des mesures et leur stockage rapide en vue d'un traitement ultérieur. La simplicité d'utilisation du logiciel facilite son utilisation par d'autres personnes.

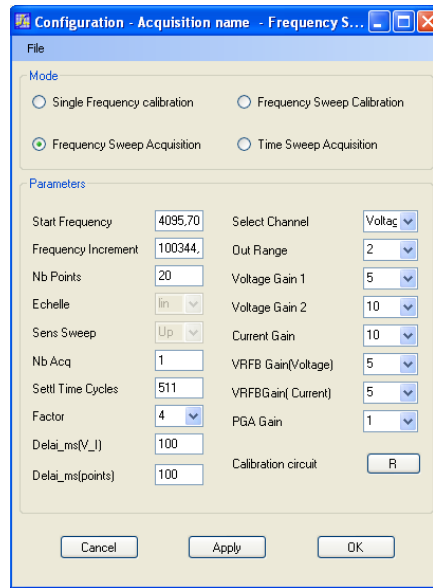


FIGURE 4.7 – Fenêtre de configuration principale du logiciel d’acquisition

4.3 Validation de la chaîne de mesure

4.3.1 Introduction

A terme, l’un des objectifs de la spectroscopie de bioimpédance consiste à déterminer les valeurs de permittivité et de conductivité de l’échantillon caractérisé. Il s’agit là d’un problème inverse consistant à déduire ces grandeurs à partir de la valeur de Z et de la géométrie des microélectrodes. Nous avons modélisé par la méthode des éléments finis à l’aide du logiciel COMSOL leur comportement électromagnétique en vue d’études préliminaires de validation de la chaîne de mesure. A titre d’élément de validation du capteur nous comparerons plus loin les valeurs du facteur de cellule déterminé théoriquement ici avec les mesures.

4.3.2 Modélisation électromagnétiques des électrodes

Dans cette partie, nous nous intéressons à la modélisation électromagnétique de la matrice d’électrodes par la méthode des éléments finis. On se place dans le cas d’un milieu présentant des propriétés électriques homogènes, le principal but étant de déduire par la

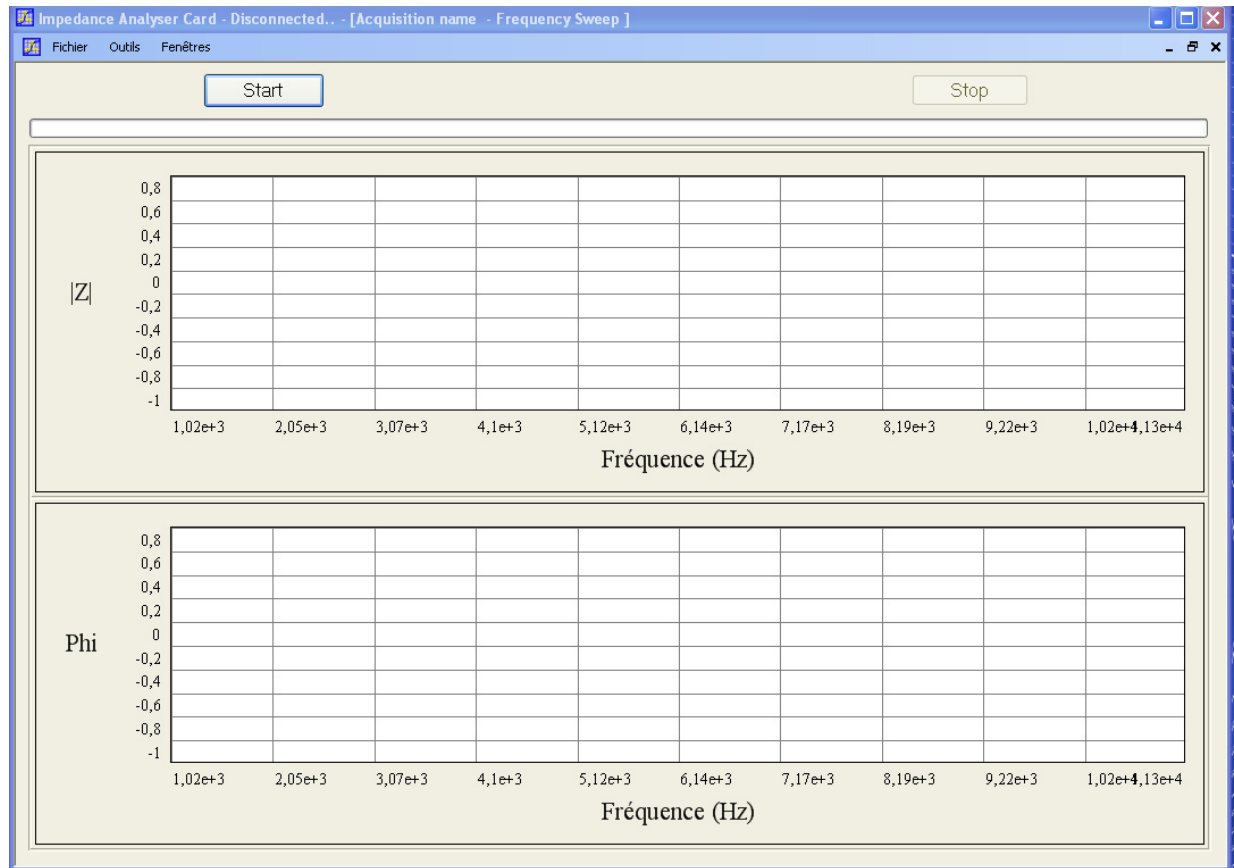


FIGURE 4.8 – Fenêtre de tracé des courbes d'impédances du logiciel d'acquisition

méthode numérique utilisée une estimation du facteur géométrique de cellule. L'influence des dimensions du volume du milieu sur le facteur de cellule déterminé est également étudiée.

4.3.2.1 Formulation du problème

La méthode des éléments finis permet de résoudre des systèmes physiques pouvant être décrits par des équations aux dérivées partielles. Elle consiste à utiliser une approximation simple des variables inconnues pour transformer les équations aux dérivées partielles en équations algébriques [DTL05] [Zim06]. La modélisation d'un système physique par cette méthode repose donc en premier lieu, sur un choix approprié, des équations aux dérivées partielles décrivant le problème. Dans le cas des problèmes liés aux phénomènes électromagnétiques, les équations sous-jacentes décrivant le problème sont les équations de

Maxwell. Sous certaines conditions, ces équations peuvent être simplifiées. Dans notre cas, les milieux d'étude peuvent être considérés comme amagnétiques. De plus les dimensions du domaine modélisé sont très petites devant les longueurs d'ondes des champs électriques utilisés justifiant l'hypothèse d'une approximation quasi-statique. Nous utilisons le module AC/DC du logiciel COMSOL, qui est plus spécifiquement dédié à la modélisation des phénomènes électromagnétiques. A l'intérieur même de ce module, plusieurs modes d'applications sont également proposés, chaque mode spécifiant les équations aux dérivées partielles ainsi que les variables dépendantes que l'on veut résoudre. Nous utilisons pour notre modèle le mode *2D Quasi Statics Electric Currents* qui découple les vecteurs champs magnétiques et électriques. L'équation aux dérivées partielles à résoudre à l'intérieur du domaine d'étude est alors simplement donnée par :

$$-\nabla(\sigma + j\omega\varepsilon_0\varepsilon)\nabla V = 0 \quad (4.6)$$

Où σ et ε désignent respectivement la conductivité et la permittivité relative du milieu du domaine considéré et V désigne le potentiel électrique en tout point du domaine. Le choix d'un type d'analyse (temporel ou harmonique) est paramétrable dans le logiciel COMSOL. Nous avons choisi un mode d'analyse en régime harmonique de sorte que la fréquence soit un paramètre d'entrée de notre modèle.

4.3.2.2 Définition de la géométrie

Un premier choix important à faire lors de la modélisation d'un système électromagnétique par la méthode des éléments finis est la dimension du modèle souhaité. En effet c'est ce paramètre qui définira le maillage et par la même les temps de calcul et les précisions. Un modèle en 3 dimensions permet de s'approcher du système réel à modéliser, mais en contrepartie nécessite une puissance de calcul parfois exagérée. Dans notre cas, nous avons choisi de simplifier la géométrie en modélisant uniquement une section transversale de la matrice d'électrodes dans le plan XY , la dimension Z représentant la longueur des électrodes (voir Fig 4.9). Une condition pour que ce modèle soit valide est qu'il n'y ait pas ou peu de variations de la solution le long de l'axe Z . En réalité, la propagation des lignes de champs est légèrement différente aux deux extrémités des électrodes à cause des effets de

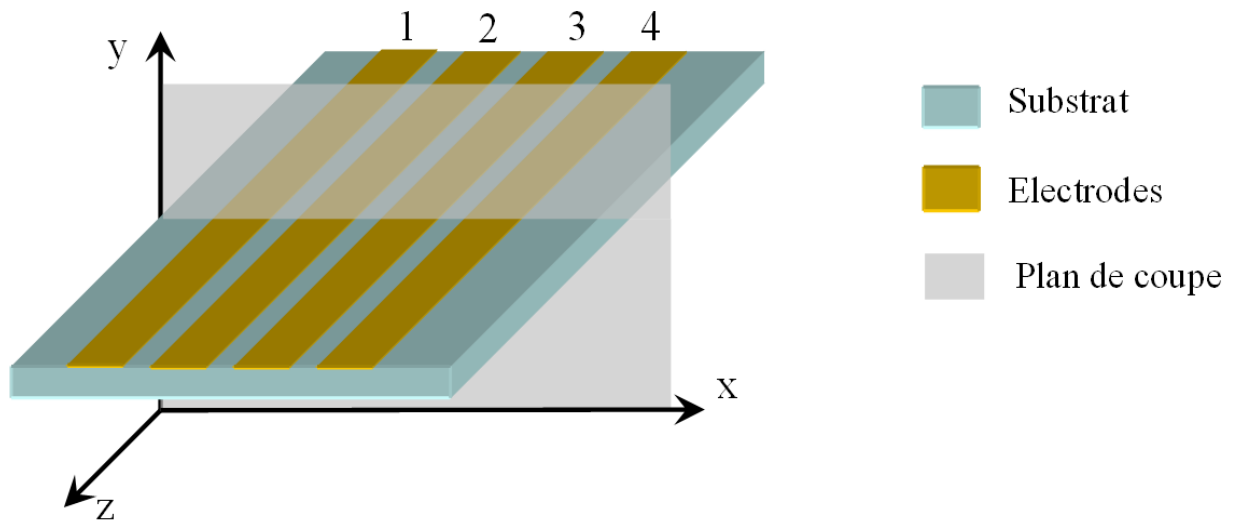


FIGURE 4.9 – Représentation en trois dimensions d'une partie de matrice d'électrodes et de la section considérée dans le plan XY pour la modélisation sous COMSOL.

bords. Néanmoins, étant donné le rapport des dimensions entre la longueur des électrodes (3 mm) et la largeur globale des 4 électrodes ($2 \times 4 \times 20 \mu\text{m}$, cf. Fig 4.2), cette condition de constance de la solution le long de l'axe Z est assez bien vérifiée. La géométrie du modèle ainsi définie en deux dimensions est illustrée en Fig 4.10. Le domaine d'étude est représenté par un simple demi-disque de rayon R dont la frontière basse se confond avec la base des électrodes. Les électrodes sont quant à elles considérées comme de simples frontières d'épaisseur nulle. Cette approximation est assez raisonnable car l'épaisseur réelle des dépôts métalliques constituant les électrodes est de l'ordre de 1000 \AA contre $20 \mu\text{m}$ pour leur largeur.

4.3.2.3 Définition des propriétés électriques

La variable de sortie de la résolution du modèle est le potentiel électrique V déduit en tout point x, y, z du domaine d'étude. Ce potentiel calculé numériquement dépend des propriétés électriques fixées pour le domaine en lui-même, à savoir sa conductivité σ et sa permittivité ε , ainsi que des conditions imposées aux frontières à l'ensemble du domaine d'étude. La conductivité et la permittivité du domaine sont des paramètres d'entrée du

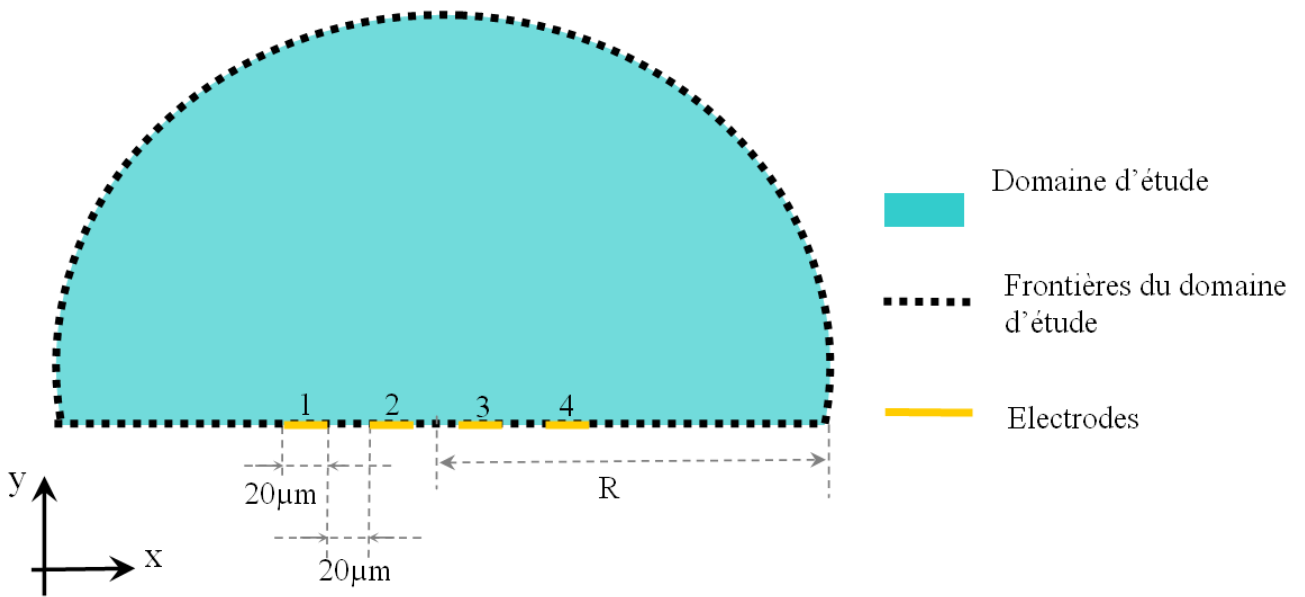


FIGURE 4.10 – Représentation du domaine modélisé. Apparaissent le milieu modélisé sous forme d’un demi-disque et ses frontières, et les 4 électrodes.

modèle qui peuvent être variées pour observer la réponse du capteur en fonction des propriétés électriques du milieu simulé. Pour ce qui concerne les frontières, les conditions imposées sont énumérées ci-dessous :

- Pour les frontières du domaine d’étude (représentées en pointillés en Fig 4.10) une condition d’isolation électrique est imposée :

$$\vec{n} \cdot \vec{J} = 0 \quad (4.7)$$

Où \vec{n} est le vecteur normal à la surface et \vec{J} est la densité de courant.

- Pour les électrodes d’excitation (désignées 1 et 4 en Fig 4.10), nous imposons un potentiel fixe sur l’une des électrodes :

$$V = V_0 \quad (4.8)$$

Et un potentiel nul sur l’autre électrode :

$$V = 0 \quad (4.9)$$

- Enfin pour les électrodes de la mesure de la différence de potentiel (2 et 3) nous imposons une condition dite de potentiel flottant qui s'écrit :

$$\int -\vec{n} \cdot \vec{J} = I_0 \quad (4.10)$$

Où I_0 est un courant considéré nul avec l'hypothèse que les électrodes de mesure ne consomment aucun courant (configuration tétrapolaire).

4.3.2.4 Maillage

Le maillage constitue une étape essentielle dans la modélisation. Un maillage approprié contribue à optimiser grandement la précision de calcul du domaine. Dans le cas de notre configuration, l'utilisation d'un modèle en deux dimensions permet d'appliquer un maillage relativement fin sans entraîner des temps de calculs prohibitifs. Le maillage a été particulièrement affiné à proximité des électrodes pour garantir une bonne précision. En pratique, on peut considérer que le maillage choisi est approprié lorsque l'affinage de ce dernier ne contribue plus à changer les résultats obtenus. Le maillage réalisé pour ce modèle a été fait de sorte à satisfaire ce critère. Ainsi, à proximité des électrodes la taille des mailles est limitée à $0.1 \mu\text{m}$. La taille des éléments croît ensuite lorsque l'on s'éloigne des électrodes pour atteindre une taille de $5 \mu\text{m}$ à l'intérieur du domaine. Au total, pour un milieu de rayon de $500 \mu\text{m}$, le domaine est découpé en 60 992 éléments triangulaires. Le maillage obtenu est illustré en Fig 4.11.

4.3.2.5 Résultats

L'impédance électrique \underline{Z} du système à 4 électrodes est déterminée à partir du courant \underline{I} (résultant de l'excitation en tension entre les électrodes 1 et 4, voir Fig 4.10) et de la différence de potentiel $d\underline{V}$ mesurée entre les électrodes de mesures (2 et 3, voir Fig 4.10). La résolution du modèle dans le mode d'application utilisé nous donne accès au potentiel complexe $\underline{V}(x, y, z)$ ainsi qu'à la densité de courant complexe $\vec{\underline{J}}(x, y, z)$ (en A/m^2) et champ électrique $\vec{\underline{E}}(x, y, z)$ (en V/m) en tout point du domaine. Le courant \underline{I} circulant réellement entre les deux électrodes d'excitation (1 et 4) peut s'obtenir en intégrant la densité de courant $\vec{\underline{J}}$ sur la surface de l'une ou l'autre des électrodes. En considérant que la

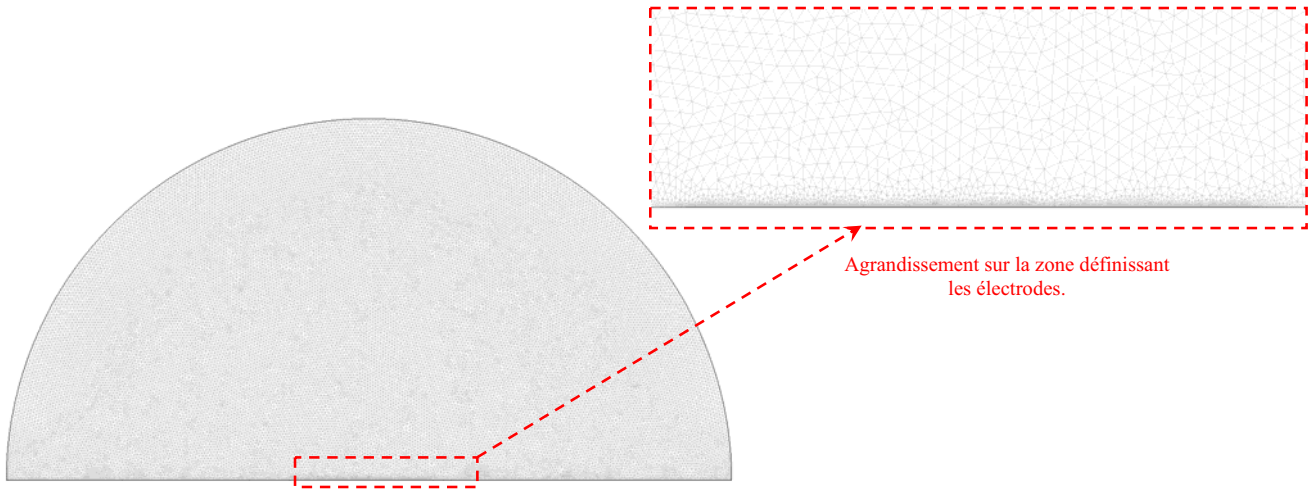


FIGURE 4.11 – Illustration du maillage du domaine d’étude modélisé, la taille des éléments est affinée jusqu’à $0.1 \mu\text{m}$ à proximité des électrodes

densité de courant ne varie pas selon l’axe Z (modèle 2D) le courant \underline{I} peut alors s’écrire :

$$\underline{I} = d \cdot \int_{x_0}^{x_1} \underline{\vec{J}} \cdot dx \quad (4.11)$$

Où x_0 et x_1 désignent respectivement les bornes gauche et droite de l’électrode considérée et d la longueur des électrodes suivant la dimension Z soit 3 mm. En pratique, il est vérifié que le courant \underline{I} calculé est identique pour les deux électrodes (1 et 4). Pour un maillage grossier, les résultats ne donnent pas une densité de courant uniforme à la surface des électrodes. Spécialement, des discontinuités peuvent être visibles à l’intersection entre l’électrode, la frontière isolante et le milieu (voir Fig 4.12). En adoptant un maillage suffisamment fin, la densité de courant peut être quasiment uniforme sur toute la surface des électrodes, et les discontinuités introduites n’influencent que de manière négligeable le courant calculé \underline{I} . Pour ce qui concerne la différence de potentiel mesurée entre les électrodes (2 et 3), nous constatons que celle-ci est répartie de manière uniforme sur toute la surface des électrodes de mesures (voir Fig 4.13). La différence de potentiels mesurée peut alors simplement se déduire par :

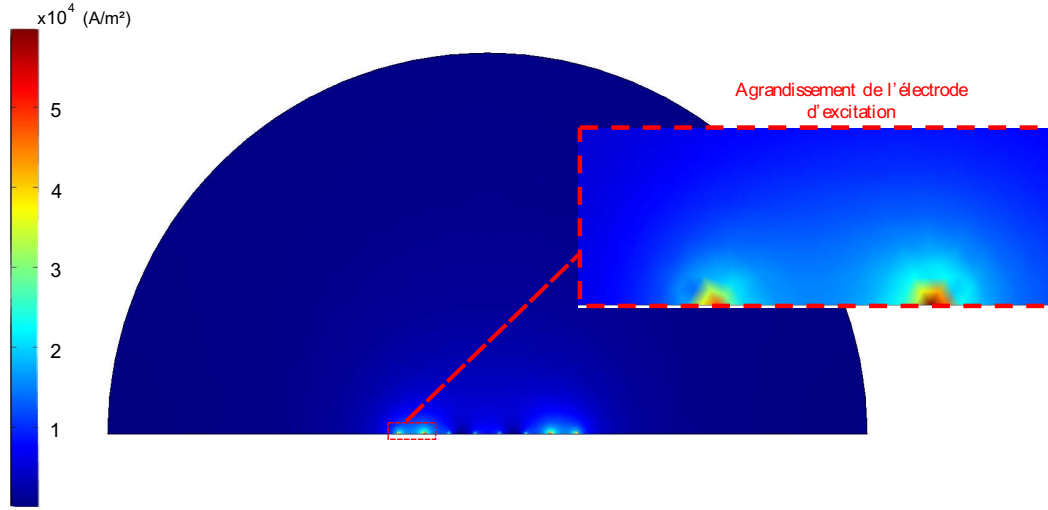


FIGURE 4.12 – Répartition de la densité de courant dans le domaine pour un maillage grossier. Des discontinuités de la densité de courant apparaissent aux jonctions électrode - isolant - milieu.

$$d\underline{V} = \underline{V}(x_2) - \underline{V}(x_3) \quad (4.12)$$

Où $\underline{V}(x_2)$ et $\underline{V}(x_3)$ désignent respectivement les potentiels obtenus sur l'électrode 2 et 3.

Le profil de distribution des potentiels selon l'axe X est illustré sur la figure 4.13 pour trois cas particuliers. Un premier cas représente le profil obtenu à la surface ($y = 0$) en l'absence d'électrodes de mesure). Le deuxième cas illustre cette fois-ci le potentiel, toujours à la surface, mais lorsque les électrodes de mesures sont présentes. Enfin le troisième cas illustre la perturbation introduite par les électrodes de mesure dans la répartition des potentiels à une hauteur de $5 \mu m$. Logiquement, les électrodes de mesure, du fait de leur largeur non nulle introduisent une discontinuité dans la répartition des potentiels à hauteur nulle. A une hauteur de $5 \mu m$, on peut observer (Fig 4.13) que la discontinuité de potentiels n'est quasiment plus perceptible au voisinage des électrodes de mesures. En comparant le profil obtenu avec et sans électrodes à une hauteur nulle (Fig 4.13), on remarque que les potentiels mesurés par les électrodes de mesure correspondent aux potentiels qui auraient été présents aux mêmes endroits (plus exactement à la position

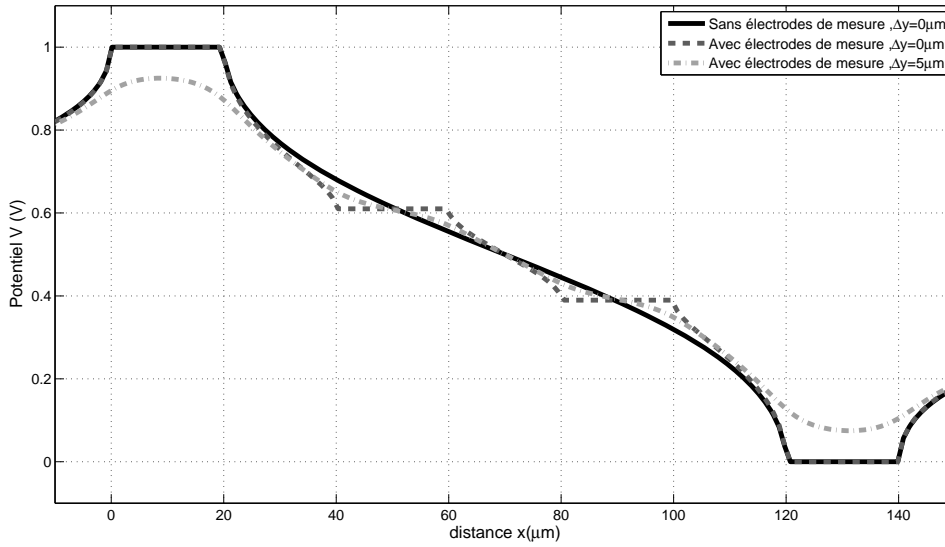


FIGURE 4.13 – Profils des potentiels obtenus suivant l’axe X . La position $x = 0 \mu\text{m}$ sur l’axe des abscisses indique l’extrémité gauche de l’électrode d’excitation 1.

centrale des électrodes) en leur absence. En ce sens, on peut conclure sur le fait que les électrodes de mesure jouent assez bien leur rôle puisqu’elles se contentent de prélever le potentiel à une position donnée sans perturber le milieu. Lors des simulations, il a été vérifié que le courant (calculé) traversant les électrodes de mesure restait toujours négligeable. Finalement l’impédance \underline{Z} peut être donnée par :

$$\underline{Z} = \frac{dV}{\underline{I}} \quad (4.13)$$

Le calcul de l’impédance \underline{Z} à partir du modèle COMSOL est automatisé via un script MATLAB pour plusieurs fréquences discrètes. Notons que la tension d’excitation utilisée est fixée à 1 V par soucis de simplification. Sa valeur n’a de toute manière pas d’influence détectable sur la validité du modèle. En Fig 4.14, nous donnons, dans la gamme de fréquences 1 kHz - 100 kHz les spectres d’impédances obtenus après résolution du modèle pour quelques valeurs de conductivité et permittivité susceptibles d’être rencontrées lors de mesures sur des milieux réels. Les deux premiers milieux simulés correspondent typiquement à des électrolytes, l’un ayant une conductivité σ de 0.4 S/m, l’autre de 1.2 S/m, avec une permittivité de 80 qui est approximativement celle de l’eau.

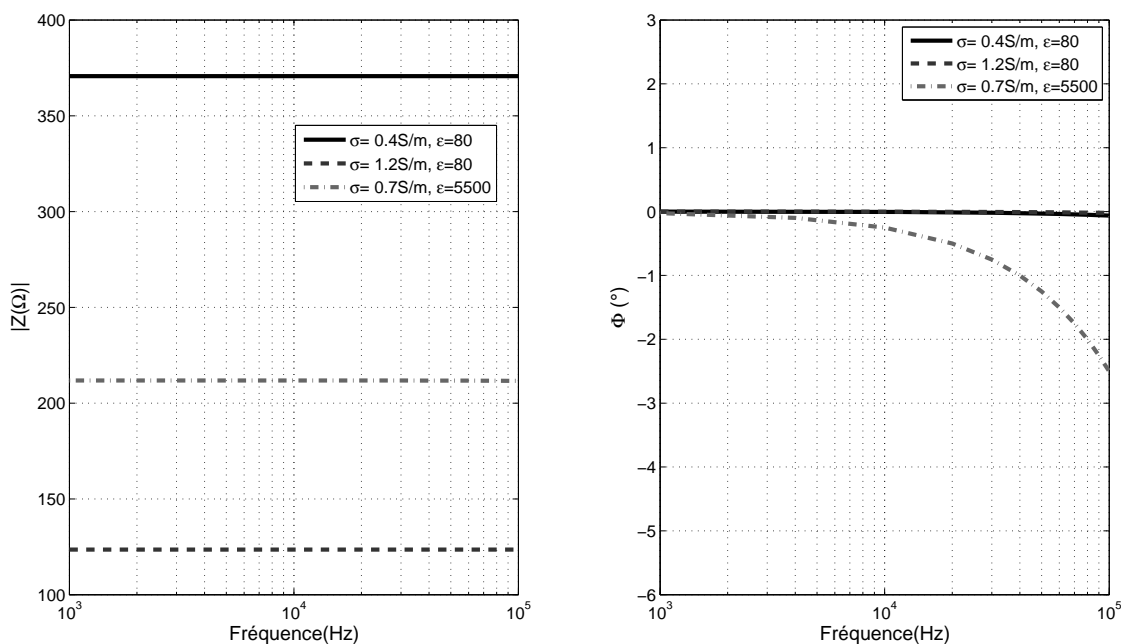


FIGURE 4.14 – Spectres d'impédances obtenus par modélisation pour quelques milieux simulés

Pour le troisième milieu les propriétés électriques approximatives du sang en basses fréquences [Gab96] [GGC96] [GLG96a] [GLG96b] ont été imposées soit une conductivité σ de 0.7 S/m et une permittivité relative ϵ de 5500, afin d'étudier l'influence d'un échantillon sanguin sur la matrice d'électrodes. Les résultats ont été obtenus pour un milieu de 500 μm de rayon qui peut comme nous le verrons par la suite être considéré comme un milieu semi-infini. Le premier milieu ($\sigma = 0.4 \text{ S/m}, \epsilon = 80$) produit un module de l'ordre de 370 Ω et une phase nulle sur toute la bande de fréquences. Le deuxième milieu provoque également une phase quasi nulle sur toute la gamme de fréquences avec un module de l'ordre de 125 Ω . Quant au milieu simulant les propriétés électriques du sang, il provoque également un module quasi-constant sur toute la gamme de fréquences de l'ordre de 210 Ω . On constate néanmoins sur ce milieu un léger déphasage dans la partie haute du spectre ($\approx -2.5^\circ$ à 100 kHz) traduisant l'influence de la valeur élevée de la permittivité du sang. De ces courbes, nous pouvons déduire le facteur géométrique de cellule K . Du fait du comportement purement résistif en basses fréquences, celui-ci peut

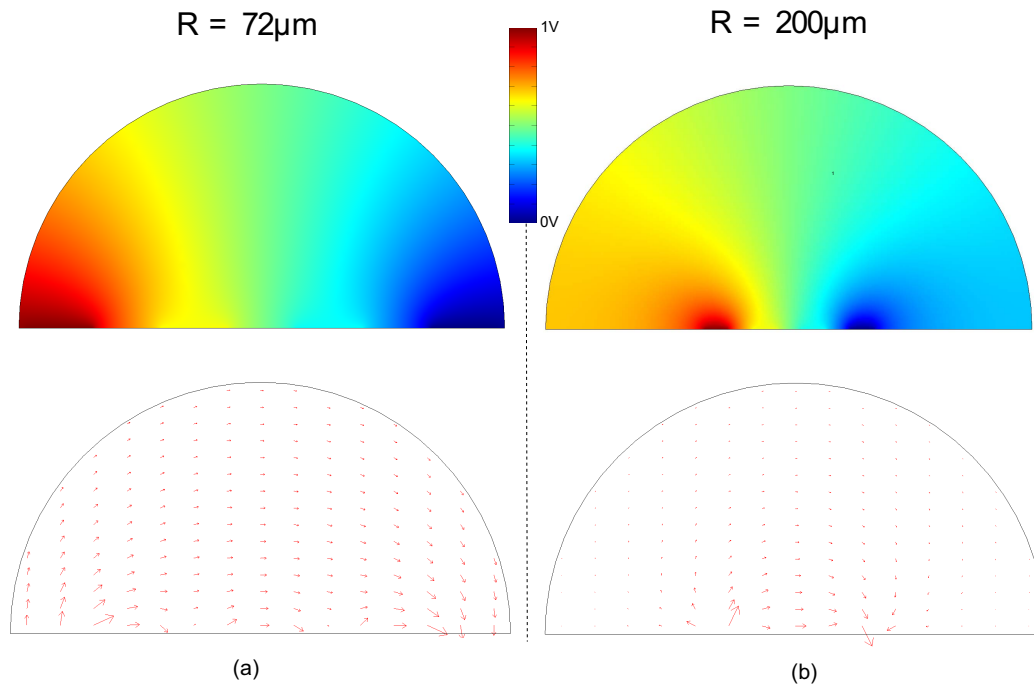


FIGURE 4.15 – Répartition des champs électriques dans le domaine pour deux dimensions différentes du milieu (a) $R = 72 \mu\text{m}$, (b) $R = 200 \mu\text{m}$

être simplement déduit par :

$$K = \sigma \cdot |Z| \quad (4.14)$$

Le calcul donne alors un facteur de cellule de 148 m^{-1} . Il est important de constater que l'estimation faite du facteur de cellule n'a de sens que si le milieu peut être considéré comme semi-infini, autrement dit si une augmentation des dimensions du milieu ne modifie plus la distribution des lignes de champ électrique. Observons justement l'influence des dimensions du domaine d'étude. Sur la figure 4.15 nous représentons la distribution des potentiels et des champs électriques pour deux dimensions différentes de milieux : un milieu de rayon $R=72 \mu\text{m}$ qui correspond à la limite minimale, et un rayon $R = 200 \mu\text{m}$.

Nous constatons dans le premier cas que les frontières du milieu confinent le champ électrique dans un espace restreint. Il en résulte une distribution de champ électrique moins dense autour des électrodes de mesure. Dans le deuxième cas, un champ électrique plus intense est observé au centre du domaine là où sont placées les électrodes, puis celui-ci s'atténue jusqu'à devenir presque négligeable aux frontières extérieures du domaine. Dans

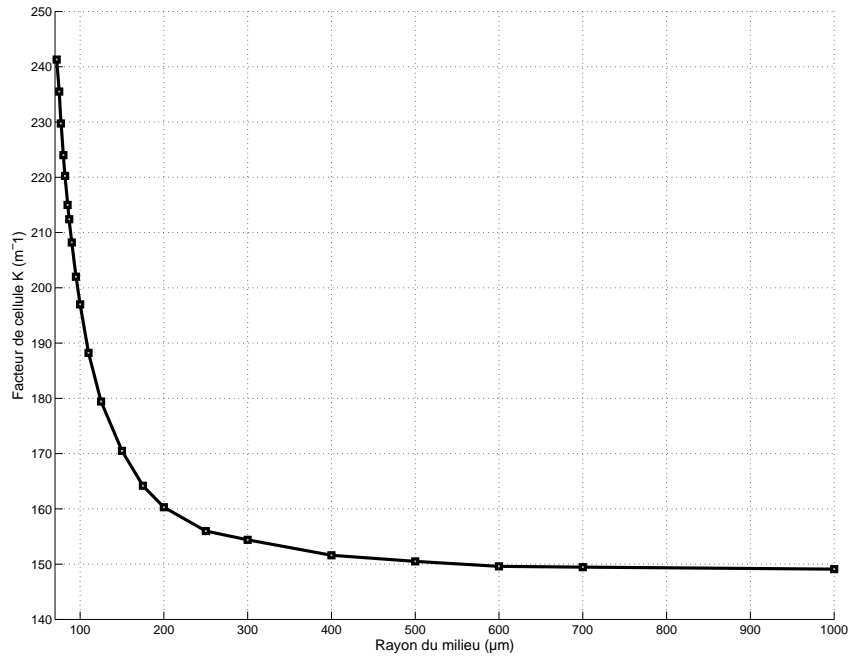


FIGURE 4.16 – Evolution du facteur géométrique de cellule K déterminé par modélisation en fonction de la dimension du milieu

ce cas un courant plus important peut s'établir, et le facteur de cellule est alors proche de sa valeur minimale. L'étude de l'impact des dimensions du milieu sur le facteur de cellule a été menée de cette manière pour plusieurs dimensions du milieu. Nous obtenons la réponse représentée en Fig 4.16. Pour un milieu de rayon d'environ $70 \mu\text{m}$, le facteur de cellule obtenu est de 240 m^{-1} . Ce facteur de cellule décroît exponentiellement lorsque les dimensions du milieu augmentent. Finalement, il se stabilise à 150 m^{-1} lorsque le rayon du milieu devient supérieur à $500 \mu\text{m}$. Autrement dit, un milieu dont les dimensions sont de l'ordre de $70 \mu\text{m}$ produira des impédances environ 1.6 fois plus grandes qu'un milieu pouvant être considéré comme semi-infini. Les considérations précédentes sont importantes puisqu'elles permettent de définir un critère de dimensions minimales du volume garantissant la stabilité de la mesure lors de mesures sur des milieux réels. On pourra considérer par la suite qu'un rayon supérieur à $500 \mu\text{m}$ suffit à assimiler le milieu comme semi-infini. Nous comparerons nos calculs aux valeurs de K déterminées expérimentalement par la suite sur la base de ces remarques.

4.3.3 Etalonnage du conditionneur électronique

4.3.3.1 Méthode

La précision du circuit de conditionnement est difficile à quantifier de manière globale car celle-ci dépend de plusieurs facteurs d'influence tels que la gamme d'impédance à mesurer, la configuration des impédances entre les différentes paires d'électrodes, ou encore le niveau d'excitation utilisé. Néanmoins, il est possible d'observer la précision de mesure en se plaçant dans des conditions proches de celles rencontrées lors de la mesure sur un milieu liquide (sang ou sérum physiologique), par l'utilisation de composants étalons. Ceci s'effectuera sans le capteur connecté de sorte à valider le conditionneur indépendamment. Différentes mesures ont été entreprises sur le modèle électrique à composants discrets de la figure 4.17 (a) dans lequel l'impédance Z_X (grisée sur la figure 4.17) représentant l'impédance du milieu à caractériser est remplacée par des composants étalons de test. En se basant sur l'hypothèse que l'impédance du milieu entre les différentes paires d'élec-

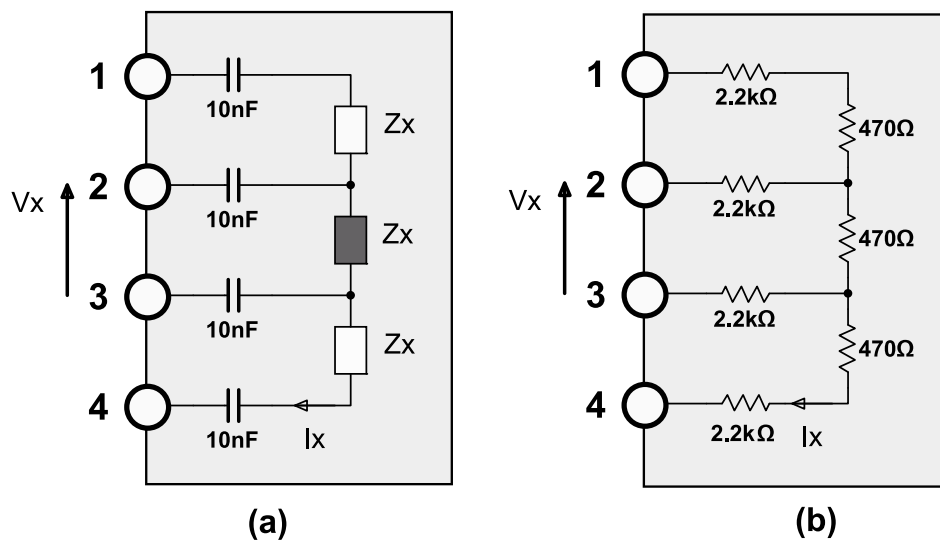


FIGURE 4.17 – (a) circuit utilisé pour la validation de mesures sur composants étalons, l'impédance Z_X grisée représente l'impédance étalon à mesurer (b) Circuit utilisé pour réaliser la calibration préliminaire à la mesure.

trodes est du même ordre de grandeur, Z_X est reproduit à l'identique entre les différentes paires de connexions (1-2, 2-3, 3-4). Les condensateurs de 10 nF présents sur chaque

borne de connexion ont pour rôle de modéliser les impédances d'interfaces métal-milieu. La valeur de 10 nF choisie simule assez bien le comportement de l'impédance d'interface observée lors de mesures préliminaires avec les électrodes. Il est important de prendre en considération ces impédances si l'on veut évaluer les performances du dispositif dans des conditions proches de la réalité car celles-ci peuvent avoir une influence non négligeable sur la précision de mesure en basses fréquences. En effet, du fait de leurs grandes valeurs en basses fréquences elles tendent à réduire le courant et la tension différentielle mesurés tout en augmentant les tensions de mode commun. Il en résulte donc une précision moindre sur la mesure du courant et de la tension, et une sensibilité accrue à l'erreur de mode commun de l'amplificateur d'instrumentation. Au vu du facteur de cellule déterminé par modélisation et des valeurs de conductivités du sang et des sérums physiologiques utilisés, on peut s'attendre à mesurer des impédances comprises entre quelques dizaines d'ohms et quelques kilo ohms. Les valeurs de Z_X mesurées seront donc comprises dans ces ordres de grandeurs. Lors de la phase de calibration, un circuit légèrement différent est volontairement utilisé (Fig 4.17 (b)). Les capacités de 10 nF sont remplacées par leurs valeurs de module intermédiaire dans le spectre d'impédance considéré ($4\text{ kHz} - 100\text{ kHz}$), ceci afin d'évaluer la précision dans un cas non idéal.

4.3.3.2 Spectres d'impédances mesurés

Nous donnons ici les spectres d'impédances obtenus sur divers circuits de test. Les précisions des composants étalons sont de 1% pour les résistances et de 10% pour les condensateurs mais leurs valeurs réelles (celles figurant dans les tracés des figures 4.18 à 4.27) sont préalablement mesurées à l'aide d'un RLCmètre. Les niveaux de tension d'excitation utilisés pour l'ensemble des mesures faites sur les composants étalons sont compris entre 20 et 100 mV . Chaque courbe tracée (Fig 4.18 à 4.27) représente les moyennes et écart-types (représentés par les barres d'erreurs) des points de mesures obtenus pour 10 acquisitions successives sur le circuit test. Les résultats seront discutés dans la partie suivante.

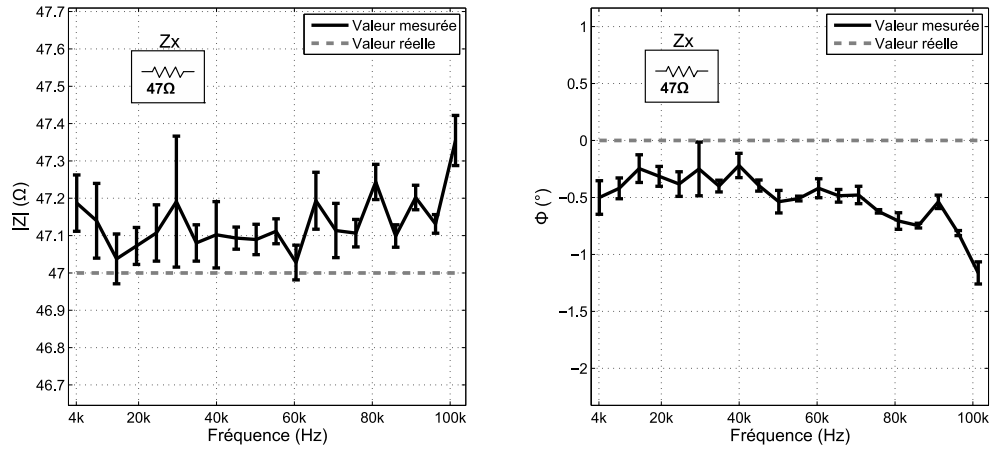


FIGURE 4.18 – Mesure d'une résistance étalon

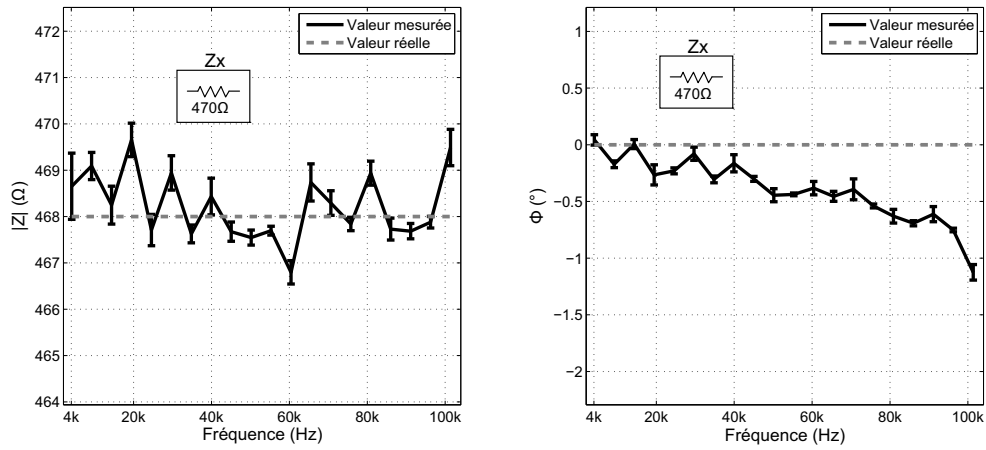


FIGURE 4.19 – Mesure d'une résistance étalon

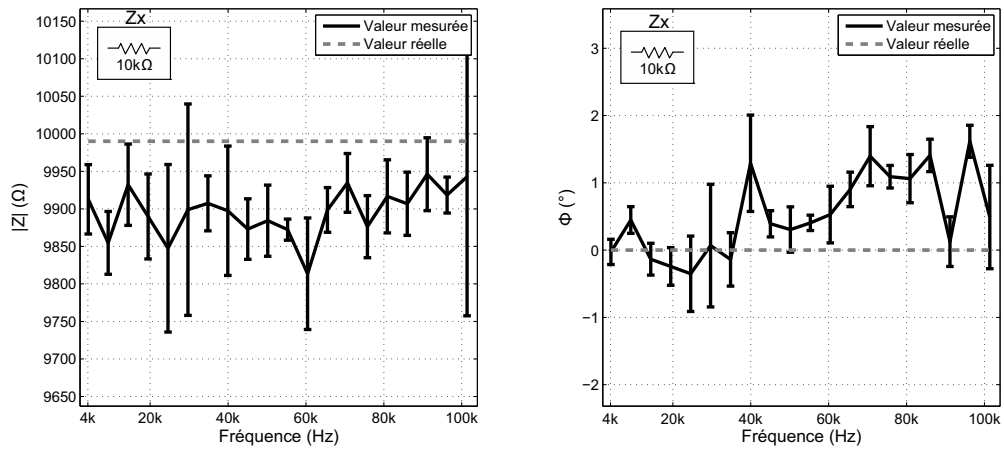


FIGURE 4.20 – Mesure d'une résistance étalon

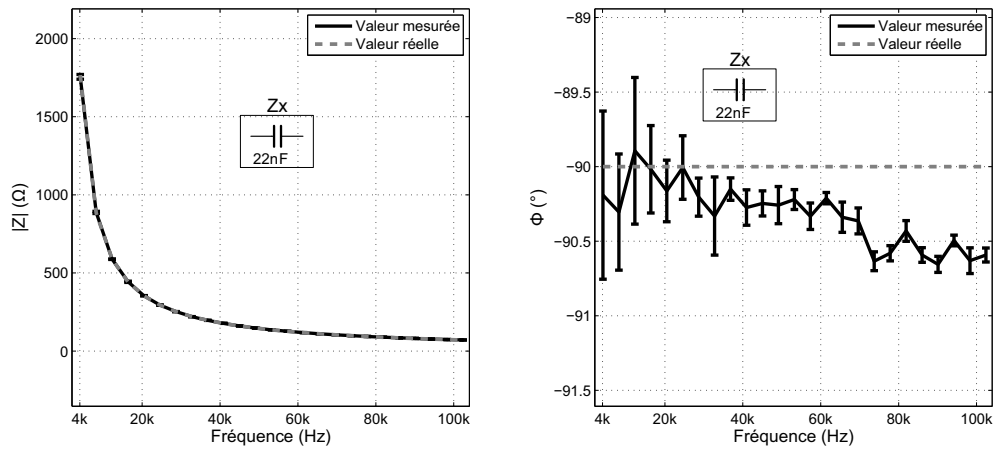


FIGURE 4.21 – Mesure d'une capacité étalon

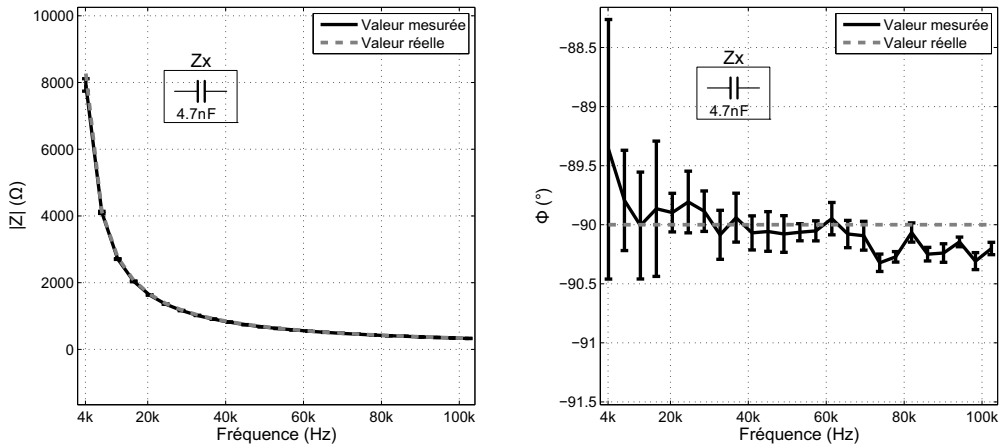


FIGURE 4.22 – Mesure d'une capacité étalon

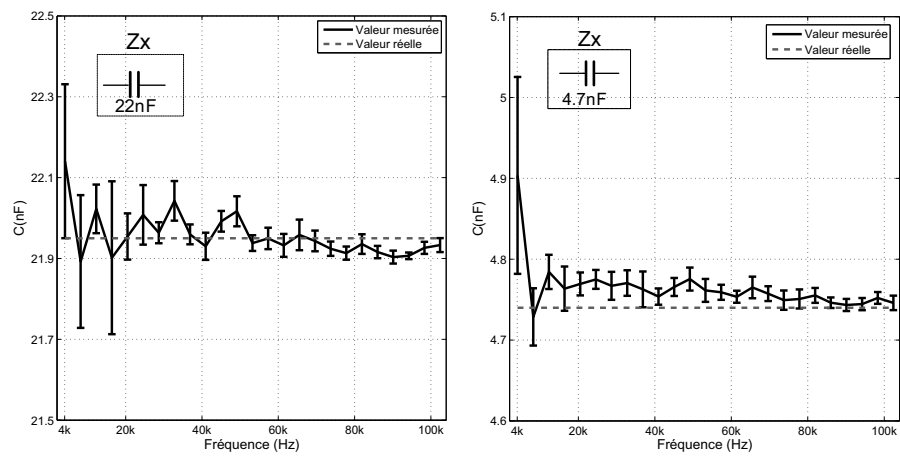


FIGURE 4.23 – Capacités équivalentes déduites à partir de la mesure du module

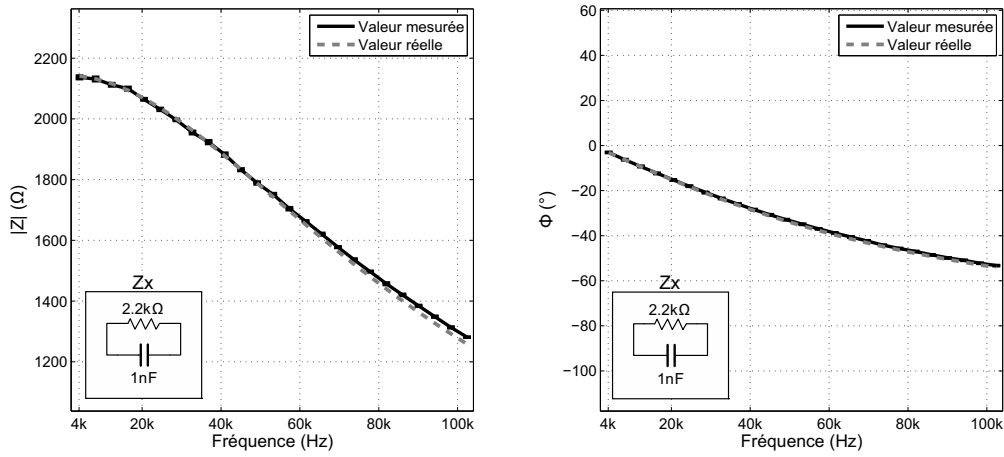


FIGURE 4.24 – Mesure sur circuit RC parallèle

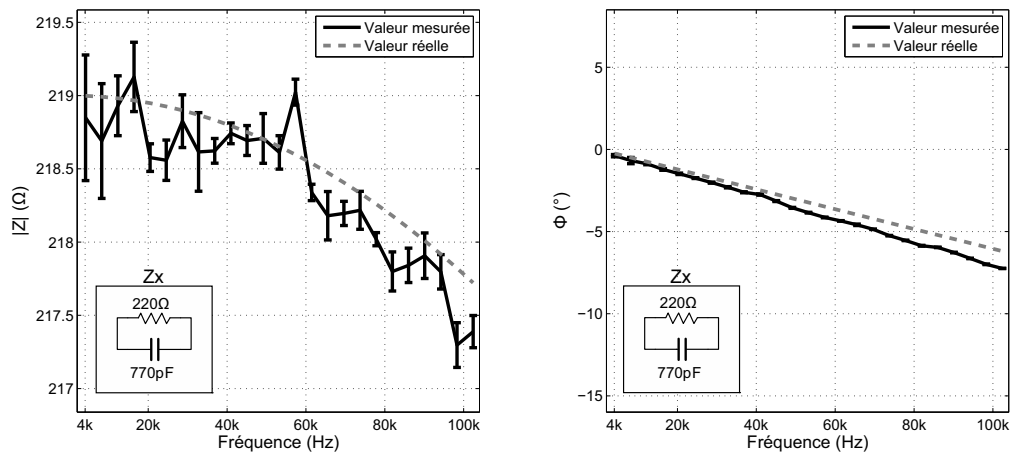


FIGURE 4.25 – Mesure sur circuit RC parallèle

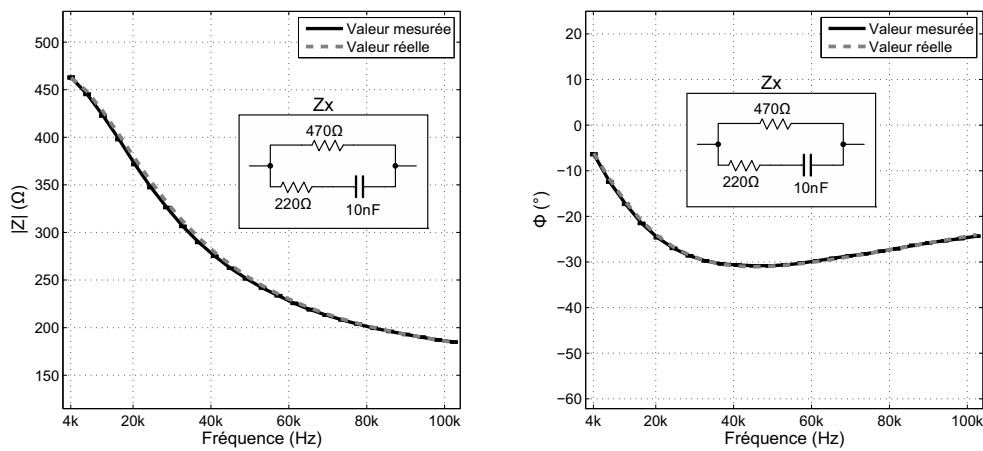


FIGURE 4.26 – Mesure sur circuit $R \parallel (RC)$.

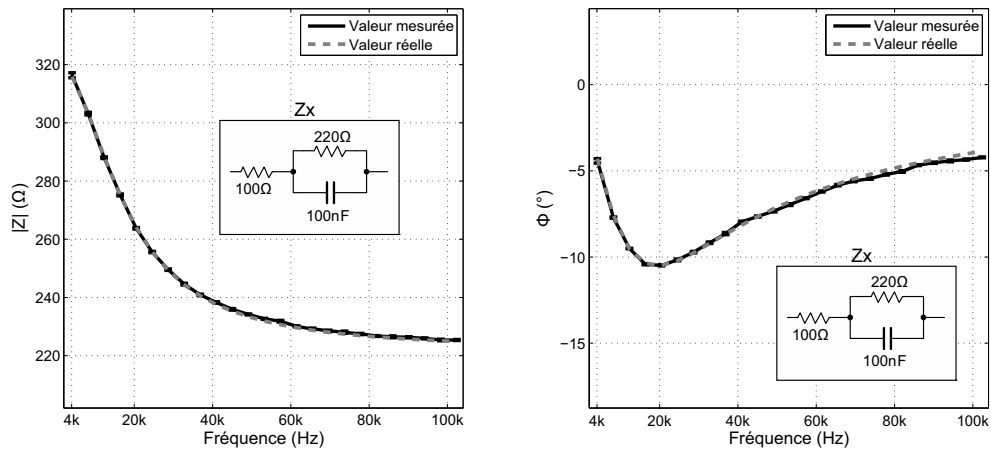


FIGURE 4.27 – Mesure sur circuit (R||C)R.

4.3.3.3 Discussion

Nous discutons ici les différents résultats présentés dans le paragraphe précédent.

4.3.3.3.1 Mesures sur résistances étalons

En Fig 4.18, on observe le spectre d'impédance obtenu sur une résistance de 47Ω . La valeur du module mesurée est très proche de la valeur réelle sur l'ensemble du spectre, et l'erreur maximale est de l'ordre de 0.9% , ce qui est très acceptable. Pour ce qui concerne la phase, celle-ci reste assez proche de la valeur attendue (à 0.5° près). Une erreur d'environ 1.25° est néanmoins observée dans la partie haute du spectre. Sur la figure 4.19, le spectre obtenu sur une résistance étalon de 470Ω est donné. Cette configuration correspond normalement à une situation optimale, puisque le circuit mesuré est quasiment identique au circuit de calibration (voir Fig 4.17). Là encore, l'erreur sur le module est faible ($< 0.5 \%$), et l'erreur de phase est au maximum de 1.3° à 100 kHz . Enfin, les résultats obtenus pour une résistance de $10 \text{ k}\Omega$ sont présentés en Fig 4.20. Ici, bien qu'elle reste raisonnable, la précision de mesure est dégradée. L'erreur sur le module est au maximum de 3% , et sur la phase de 2° . Ceci était prévisible étant donnée la faiblesse des courants mesurés dans ce cas, et la valeur éloignée de la résistance mesurée par rapport à la résistance utilisée pour la calibration (470Ω , voir Fig 4.17 (b)).

4.3.3.3.2 Mesure sur capacités étalons

Observons maintenant la précision du conditionneur pour la mesure de composants capacitifs. En Fig 4.21, on représente le spectre obtenu en module et en phase sur une capacité de 22 nF. La phase mesurée est très proche de -90° dans toute la gamme de fréquences avec une erreur maximale de l'ordre du degré en basses fréquences. Le module, quant à lui suit bien la réponse fréquentielle attendue. Une autre mesure réalisée sur une capacité de 4.7 nF est représentée en Fig 4.22. Dans ce cas, l'erreur sur la mesure de phase est légèrement plus importante en basses fréquences (au maximum de 2.3°), et le module suit également assez bien le profil fréquentiel estimé. Notons que l'existence d'erreurs éventuelles sur la mesure du module n'est pas significativement perceptible sur les courbes des figure 4.22 et 4.21 étant donnée la plage de variation du module déjà importante dans la gamme de fréquences. Les erreurs de mesure peuvent être mieux mises en évidence si on trace les capacités équivalentes obtenues à partir des module mesurés ($C = 1/(2\pi f|Z|)$). Les capacités équivalentes obtenues en fonction de la fréquence sont tracées en Fig 4.23. Dans les deux cas, la précision obtenue est correcte dans la partie haute du spectre ($< 1\%$). Pour les basses fréquences, la valeur de capacité estimée est erronée d'environ 1.7 % pour le condensateur étalon de 22 nF, et de plus de 6 % pour le condensateur étalon de 4.7 nF. En basses fréquences, le module d'impédance produit par la capacité devient trop élevé et donc le courant mesuré trop faible.

4.3.3.3.3 Mesures sur circuits complexes

Le modèle électrique d'un milieu réel peut avoir des formes plus variées qu'un simple composant unique (résistance ou condensateur). Dans les figures 4.24 à 4.27 sont compilées quelques spectres d'impédances sur des circuits différents associant résistances et condensateurs en série et(ou) en parallèle. Pour l'ensemble des spectres d'impédances obtenus, les profils d'impédances complexes mesurés reproduisent assez bien les profils attendus. Une limite de sensibilité du dispositif peut être observée lors de la mesure du circuit test associant une résistance de 220 Ω en parallèle avec un condensateur de 220 pF. Pour ce circuit, la variation de module attendu n'est que de quelques Ω , et la variation de phase d'environ 6° entre 4 et 100 kHz. Ici, l'erreur sur la phase d'environ 1° est perceptible, et

les erreurs de reproductibilité de la mesure sur le module se situent dans le même ordre de grandeur que la variation du module à observer.

4.3.3.4 Conclusion

Les résultats de mesures présentés ci-dessus montrent que par le choix d'une calibration appropriée, il est possible d'estimer une précision satisfaisante pour le domaine biomédical bien que difficile à quantifier car elle dépend de divers paramètres (calibration, valeur de l'impédance mesurée, niveaux d'excitations, etc.). Dans l'ensemble, les mesures concordent bien avec l'impédance théorique des réseaux électriques mesurés. Les circuits tests ont été choisis pour être assez proches des impédances pouvant être rencontrées sur les milieux réels compte-tenu des gammes de conductivités et permittivité testées et du facteur géométrique de cellule déterminé par simulation numérique. A titre d'exemple, si l'on considère un milieu sanguin ayant une conductivité de 0.7 S/m et une permittivité relative de 5500 [Gab96], le module produit à 4 kHz avec le facteur de cellule théorique déterminé serait de l'ordre de :

$$|Z(4kHz)| = \frac{K}{\sigma} \approx 215\Omega \quad (4.15)$$

Au vu des résultats obtenus sur les circuits étalons, cet ordre de grandeur de module devrait alors pouvoir être mesuré avec une précision suffisante. Et la phase, qui est indépendante du facteur de cellule, serait, pour la fréquence haute du spectre (100 kHz) :

$$\Phi = -\arctan\left(\frac{\omega \cdot \varepsilon \cdot \varepsilon_0}{\sigma}\right) \approx -2.5^\circ \quad (4.16)$$

En revanche, il est probable que la résolution de mesure sur la phase soit un facteur limitant qui ne permette pas de détecter avec précision la permittivité du milieu sanguin. Cette constatation est encore plus vraie pour la mesure sur les électrolytes qui présentent des permittivité relatives bien plus faibles ($\varepsilon \approx 80$).

4.3.4 Apport de la configuration tétrapolaire

Le but d'une configuration tétrapolaire est de s'affranchir de l'influence des impédances d'interfaces entre les électrodes et le milieu à mesurer qui, dans bien des cas, dominant

l'impédance totale mesurée en basses fréquences. Même s'il s'agit d'un résultat prévisible, nous vérifions ici le bénéfice apporté par la configuration tétrapolaire utilisée. Sur la figure 4.28, sont comparées deux mesures faites sur une même solution saline calibrée de conductivité 0.4 S/m : l'une est réalisée dans une configuration bipolaire en connectant les électrodes 2 et 3 (voir Fig 4.5) simultanément au circuit d'excitation et de mesure du circuit de conditionnement, l'autre est réalisée dans la configuration tétrapolaire pour laquelle le circuit a été conçu.

L'observation de ces courbes montre, premièrement, que les impédances d'interface dans le cas de la mesure en configuration bipolaire sont clairement perceptibles sur la quasi-totalité du spectre d'impédance. En basse fréquence ceci se caractérise par un module environ 6 fois plus élevé qu'en hautes fréquences, et par un déphasage élevé de l'ordre de -70° qui traduit le comportement capacitif de l'interface métal-électrolyte. L'importance de ces impédances d'interfaces rend l'impédance du milieu à caractériser quasiment inaccessible, spécialement dans la partie basse du spectre. A contrario, dans la configuration tétrapolaire, le déphasage mesuré en basse fréquence est proche de 0 et le module assez stable. Dans cette configuration, la mesure en basses fréquences reflète bien l'impédance réelle du milieu à caractériser. Cette constatation permet de prévoir que la mesure dans une telle configuration sera sensible à des variations de conductivité du milieu d'étude. Pour la configuration bipolaire, on peut considérer que l'impédance atteinte dans la partie haute du spectre n'est quasiment plus influencée par les impédances d'interfaces. On constate néanmoins un écart avec le module mesuré dans la configuration tétrapolaire. Ceci s'explique par le fait que le facteur géométrique de cellule produit n'est pas le même dans les deux configurations. En effet, même pour un écart identique entre les électrodes, la propagation des lignes de courants diffère dans les deux cas. La configuration tétrapolaire correspond à un facteur de cellule plus faible que la configuration bipolaire.

4.3.5 Accès à l'échantillon fluide

Nous avons déjà précisé que la nature de l'échantillon sous test et son état physique sont critiques en termes de validité des caractérisations. Le but de ce paragraphe est de discuter l'influence du mode d'accès à l'échantillon sur la stabilité et la reproductibilité des

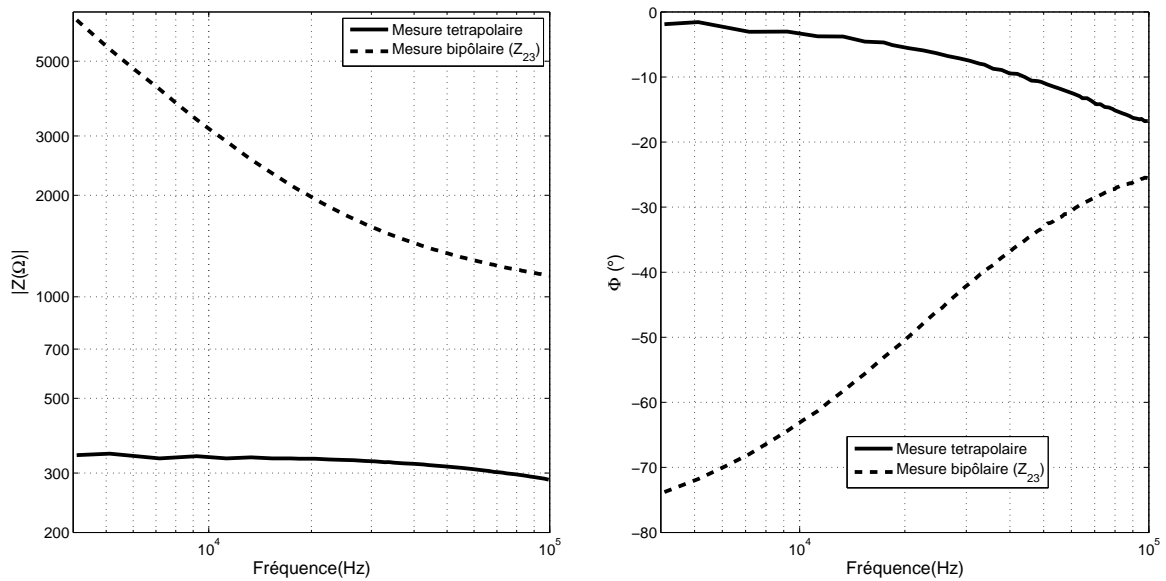


FIGURE 4.28 – – Comparaison d’une mesure bipolaire et tétrapolaire sur une solution saline calibrée, $\sigma = 0,4$ S/m

mesures. Plusieurs modes d’accès au milieu à caractériser ont été envisagés. Idéalement, le mode d’accès le plus ” pratique ” d’un point de vue applicatif serait de simplement déposer une goutte à la surface des électrodes puis de réaliser la mesure. C’est là un objectif à moyen terme en vue d’une biopuce. Cette solution a été testée mais en pratique, il s’avère que la méthode ne permet pas d’obtenir des résultats stables dans le temps. Ceci s’explique par plusieurs phénomènes physiques :

- L’étalement de la goutte par gravité
- L’évaporation non négligeable qui modifie constamment le volume et la densité.
- Une modification de l’homogénéité du milieu sous investigation par sédimentation au niveau des électrodes

Une autre solution consiste à immerger la matrice d’électrodes dans un béccher contenant le milieu à caractériser. Un des inconvénients de ce mode d’accès est la quantité de liquide nécessaire pour réaliser une mesure ce qui n’était pas le but recherché en vue d’une application de type biopuce à l’avenir. Cependant, cela permet dans l’immédiat dans cette étude préliminaire de s’affranchir des problèmes précités en effectuant des mesures localisées.

De plus, il autorise un contrôle plus précis sur l'échantillon (ex : maintien en température, homogénéisation par agitation pour un échantillon sanguin). Enfin, le dernier mode consiste à limiter le volume du milieu à celui de la taille d'une goutte mais isolé du milieu ambiant par l'utilisation d'une microchambre de mesure . Les photos de la figure 4.29 illustrent les 3 modes d'accès que nous avons essayés pour le cas d'échantillons sanguins. En se basant sur les résultats de modélisation, on peut considérer qu'un milieu dont les

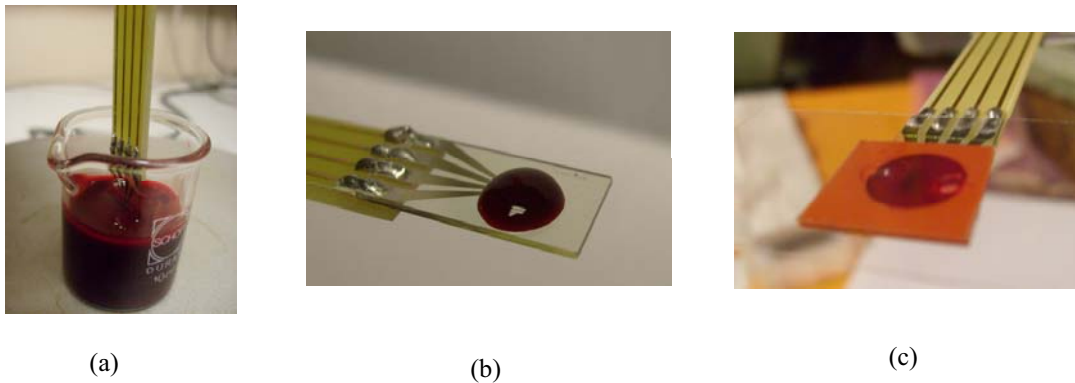


FIGURE 4.29 – Différents modes d'accès à l'échantillon utilisés - (a) Electrodes plongées dans un bécher contenant l'échantillon - (b) Goutte calibrée déposée à la surface des électrodes - (c) Echantillon conditionné dans un micro-réservoir

dimensions sont supérieures à $500 \mu\text{m}$, se comporte comme un milieu semi-infini en ce qui concerne la propagation des lignes de champ électrique. Autrement dit, pour de tels volumes, le facteur de cellule doit avoir une valeur stable proche de celle correspondant à un milieu infini et doit être insensible à de faibles variations du volume. Ce critère de volume minimal a été respecté quel que soit le mode d'accès utilisé. Typiquement, une goutte de $50 \mu\text{l}$ recouvre la surface des électrodes sur une hauteur de l'ordre de 2 mm et s'étale sur une surface d'environ 5 mm de diamètre (voir Fig 4.30)

4.3.5.1 Résultats et discussion

Sur la figure 4.31 nous comparons les profils temporels d'impédances (pour $f = 8 \text{ kHz}$) obtenus lors de mesures sur solutions salines selon les trois modes d'accès cités ci-dessus.

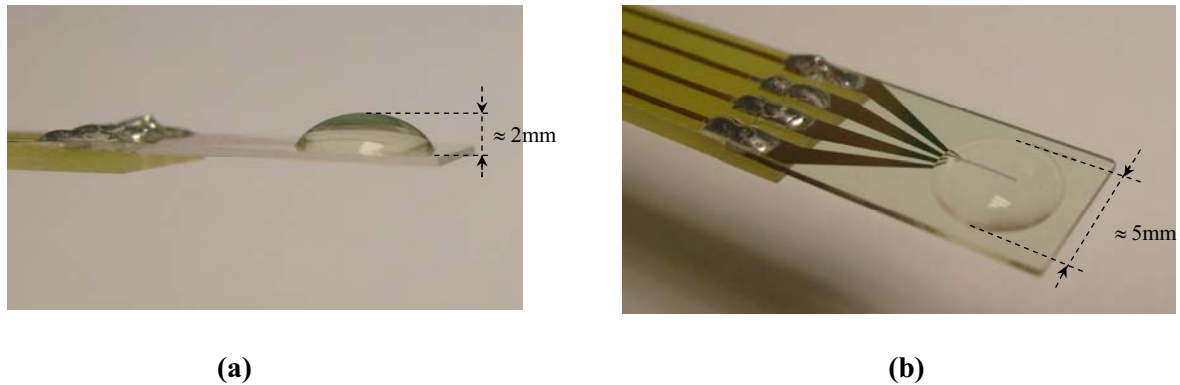


FIGURE 4.30 – Profil d'étalement d'une goutte calibrée ($50\mu\text{l}$) de solution saline à la surface de la matrice d'électrodes - (a) Vue de profil - (b) Vue de dessus

La conductivité de la solution utilisée est de 1.3 S/m . Sur ces courbes, nous pouvons

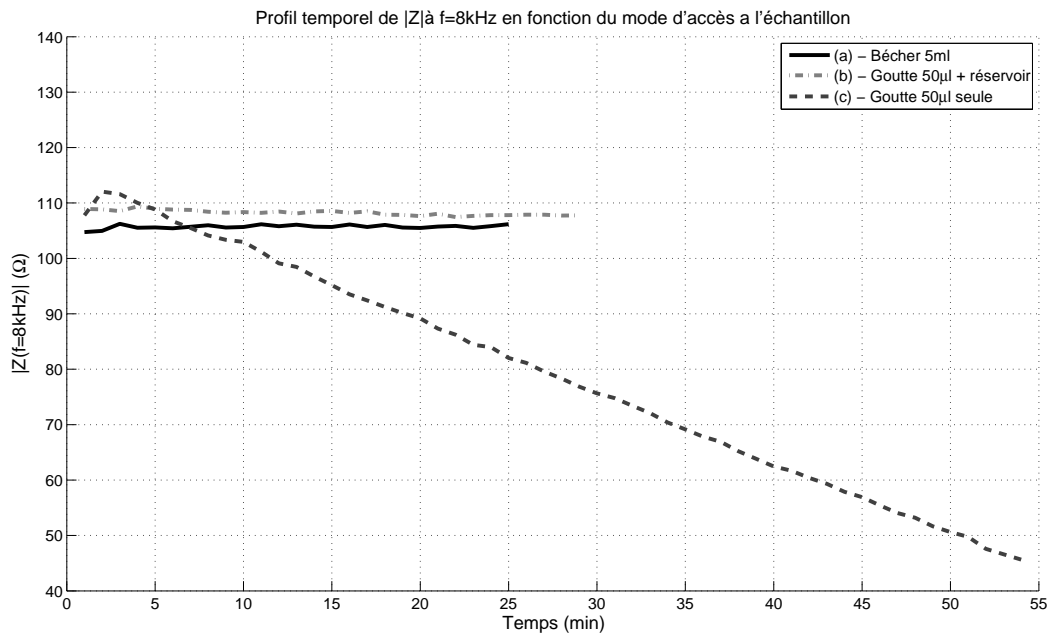


FIGURE 4.31 – Comparaison des profils temporels d'impédances obtenus en fonction du mode d'accès à l'échantillon (a) - les électrodes sont immergées dans un béccher , (b) le milieu liquide est conditionné dans un microréservoir d'une contenance de $50\mu\text{l}$ et recouvert par une lamelle de verre, (c) le milieu est une goutte calibrée de $50\mu\text{l}$ recouvrant les électrodes. $\sigma = 1.2\text{ S/m}$

constater que les mesures réalisées avec un bécher et avec un micro-réservoir donnent des résultats attendus. Même si un léger écart entre ces deux configurations est perceptible, celui-ci reste acceptable. En revanche, dans le cas où une simple goutte calibrée est déposée à la surface des électrodes, une dérive notable est observée sur l'évolution temporelle du module d'impédance mesuré. Au bout de 20 min de mesure, le module mesuré a déjà diminué d'environ 20% par rapport à sa valeur initiale. Au bout de 50 min, la dérive par rapport à la valeur initiale est de plus de 50%. A cette échelle, il est fort probable que l'évaporation joue un rôle non négligeable sur la diminution de l'impédance observée. En effet, si le volume d'eau pure perdue par évaporation est non négligeable par rapport à la taille de la goutte, la concentration ionique dans le micro-volume restant de la goutte s'en trouve significativement modifiée et donc la conductivité électrique par la même occasion. Sous l'hypothèse d'une linéarité entre la concentration molaire ionique et la conductivité électrique, vérifiée pour de faibles concentrations (voir Annexe A), une diminution du volume de la goutte de moitié suffirait donc à engendrer une augmentation de la conductivité d'un facteur 2. En pratique, la diminution du volume de la goutte par évaporation n'est pas visuellement perceptible. En moyenne, pour une goutte de 50 μl , il a été constaté que pour atteindre une évaporation quasi-totale, une durée d'environ 90 minutes était nécessaire. Au bout de ce temps, la mesure se caractérise par une augmentation plus rapide du module d'impédance traduisant certainement le confinement du courant électrique dans un volume inférieur au volume minimal garantissant un facteur géométrique de cellule stable (cf § 4.3.2). Ceci est vérifié sur les courbes de la figure 4.32 où l'on compare les profils temporels mesurés sur deux gouttes de volumes différents (50 μl et 100 μl). D'autre part, on remarque également sur ces courbes la dérive plus lente de mesure réalisée sur la goutte de plus gros volume.

Pour ce qui concerne la mesure sur des échantillons sanguins, nous observons un comportement assez similaire lors de mesures sur des gouttes déposées à la surface des électrodes sans réservoir, avec néanmoins une différence au début de la mesure. Le module d'impédance a dans un premier temps tendance à croître jusqu'à une valeur maximale atteinte au bout d'une durée approximative de 20 à 30 min, puis diminue continuellement. On donne dans la figure 4.33 les profils temporels d'impédances obtenus pour trois gouttes prélevées

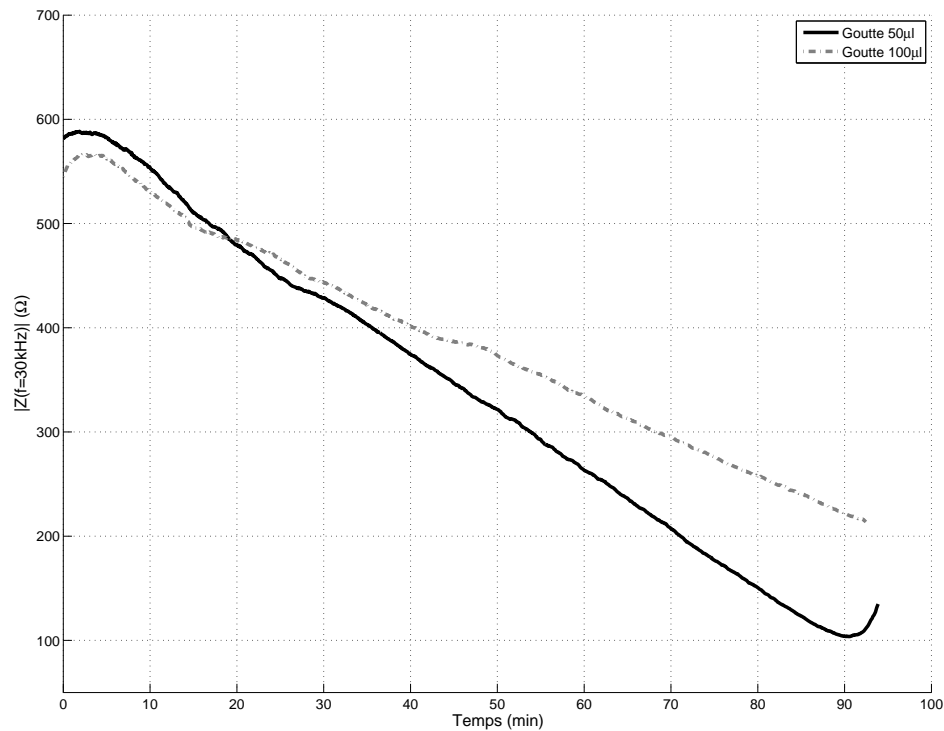


FIGURE 4.32 – Comparaison des profils temporels obtenus pour deux gouttes calibrées de volumes différents, 50 et 100 μl

sur le même échantillon sanguin. Le laps de temps entre le prélèvement et le début de la mesure est identique pour les trois profils, soit environ 3 min. La phase descendante des profils observés peut éventuellement être expliquée par l'évaporation de la goutte qui produirait le même comportement que celui observé sur une goutte d'eau saline. Quant à la croissance du module d'impédance mesuré au début, une explication envisageable pourrait être un phénomène de sédimentation ou d'agrégation des plaquettes sanguines à la surface des électrodes qui tendrait à limiter le passage du courant donc à augmenter l'impédance électrique mesurée.

Lors de l'utilisation de réservoir avec les échantillons sanguins, les mesures obtenues n'ont pas été aussi stables que pour le cas de solutions salines. Néanmoins le comportement observé a pu être reproduit lors de mesures successives. Pour ce qui concerne le conditionnement des échantillons sanguins sous bécher, une absence de reproductibilité des

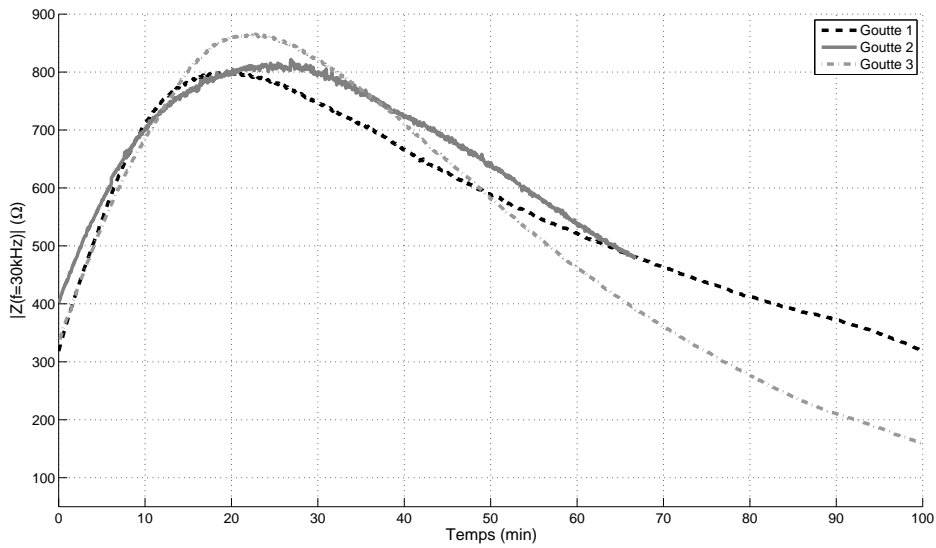


FIGURE 4.33 – Comparaison des profils temporels obtenus pour trois gouttes de sang

mesures a été constatée, qui n'a pas pu être éliminée même par un contrôle plus précis des échantillons (coïncidence du temps entre le début de la mesure et le prélèvement entre les échantillons, maintien en T° , homogénéisation du mélange par agitation). Ces résultats ne sont pas présentés ici mais il en résulte (les biologistes le savent bien) que le changement d'état d'échantillons sanguins (coagulation, sédimentation, etc...) [BO08] impose des précautions importantes avant de pouvoir valider des mesures d'impédance.

4.3.6 Influence de la température

Afin d'évaluer l'influence de la température sur les dérives temporelle constatées, une variation de température a été provoquée pendant une mesure sur un échantillon sanguin. Pour des raisons pratiques (nécessité d'imposer un échelon de température brusque) l'échantillon a été placé dans un bécher. Précisons, comme dit auparavant, que les mesures effectuées dans un bécher ne sont pas stables mais qu'ici nous nous intéressons à une comparaison qualitative du comportement du module de l'impédance en cas de forte variation de température. La variation de la température est provoquée par une plaque chauffante. La température de l'échantillon est contrôlée continuellement à l'aide d'une sonde. La figure 4.34 illustre le profil d'impédance obtenu.

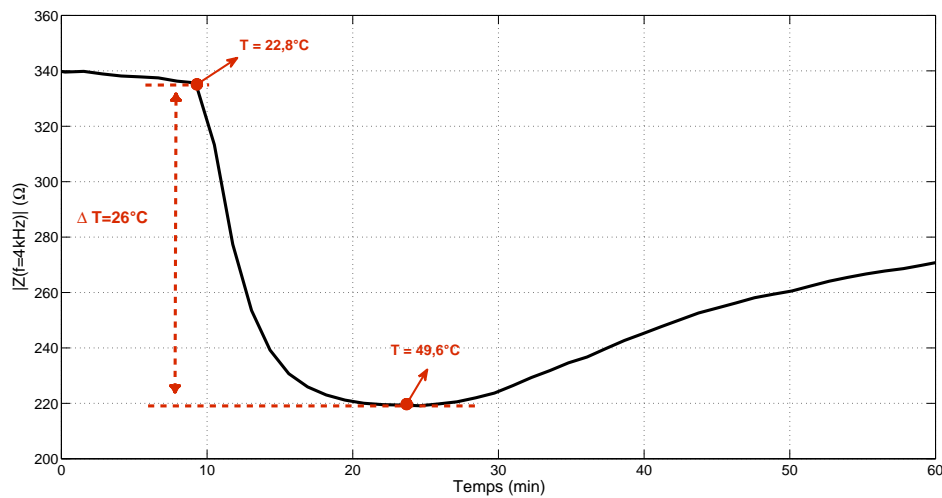


FIGURE 4.34 – Evolution temporelle du module d'impédance en réponse à une variation de température - $f = 4 \text{ kHz}$

Une élévation de température d'environ 26°C en une dizaine de minutes est provoquée dans l'échantillon. Ceci se traduit par une variation négative du module de l'impédance d'environ 115Ω . Puis la température décroît lentement. Nous ne nous intéressons qu'à la phase montante de la température, car pendant la phase descendante il est fort probable que l'impédance mesurée subisse l'effet cumulé de la variation de température et de la dérive énoncée précédemment. En revanche la variation observée pendant la phase d'augmentation de la température est relativement rapide comparée à la dérive de la mesure, et peut être donc considérée comme principalement influencée par la température. Si on assimile la variation du module observée à la variation de la conductivité du sang sous l'effet de la température, alors cela correspond à une variation de la conductivité de l'ordre de 55.4% pour un saut de température de 26°C , soit en supposant une caractéristique conductivité/Température linéaire dans cette plage [GLK⁺07] [JN02], un taux de variation de la conductivité d'environ $-2.13 \text{ \%/}^\circ\text{C}$, ce qui correspond aux données de la littérature [Sch63] [GM00]. Cette étude sur l'influence de la température permet de retrouver un taux de variation habituel pour les milieux biologiques, et permet dans le même temps d'éliminer le facteur température comme pouvant être à l'origine des dérives observées qui sont bien plus significatives. Dorénavant, dans les mesures présentées, la température sera un facteur constant (à 1 ou 2°C près).

4.3.7 Conclusion

Dans cette partie, la chaîne de mesure réalisée a été caractérisée sous différents aspects. Dans un premier temps, une modélisation électromagnétique de la matrice d'électrodes a été faite sous COMSOL. Cette étape a permis de déterminer une estimation du facteur géométrique de cellule, ainsi que d'observer l'influence de la dimension du milieu à étudier. Le circuit électronique de conditionnement basé autour du circuit AD5933 a ensuite été étalonné en vue de valider ses performances. Des mesures sur des circuits tests étalons ont démontré une bonne précision sur les gammes d'impédances susceptibles d'être rencontrées lors de la mesure de milieux réels. Nous avons ensuite vérifié l'efficacité de la configuration tétrapolaire adoptée en constatant que la mesure en basses fréquences est quasiment insensible aux phénomènes d'interfaces électrodes-milieu. Il en résulte que pour de très basses fréquences nous aurons accès à la conductivité du milieu sous investigation. L'accès à la permittivité quant à elle est plus délicate du fait des basses fréquences d'excitation utilisées. Nous avons ensuite étudié l'influence du conditionnement de l'échantillon sur la stabilité de la mesure. Il s'est avéré que la solution la plus appropriée est celle qui consiste à placer le milieu à caractériser dans un microréservoir attachée à la matrice d'électrodes. Enfin, l'influence de la température a été évaluée. Au regard des commentaires concernant le conditionnement de l'échantillon (§ 4.3.5), il apparaît tout à fait envisageable de réaliser un microcapteur pour la spectrométrie d'impédance de type biopuce intégrant un micro-réservoir. Les progrès de la microfluidique devraient permettre d'éviter les contraintes de manipulation du sang par circulation contrôlée. Ceci se place dans les perspectives des travaux de l'équipe.

4.4 Validation expérimentale du microspectromètre

Nous présentons ici les résultats expérimentaux obtenus avec le prototype de microspectromètre que nous avons réalisé précédemment. Dans un premier temps, une procédure, complémentaire de celle précédemment décrite avec des composants discrets est présentée. Elle porte sur la calibration à l'aide de solutions étalons. Dans un deuxième temps, sont présentées les courbes obtenues *ex vivo* sur des échantillons sanguins humains.

4.4.1 Mesures sur solutions salines calibrées

Afin de valider le système instrumental, des mesures ont été entreprises sur des solutions étalons à différentes conductivités. Les mesures sont réalisées à une température ambiante stable. Le système instrumental est à chaque fois calibré avec un réseau d'impédances présentant un comportement proche de l'impédance à caractériser. Les courbes de la figure Fig 4.35 représentent le module et la phase d'impédance obtenus pour différentes solution étalons calibrées à des conductivités différentes. Chaque courbe représentée correspond à la moyenne de 10 acquisitions successives. Les barres d'erreurs indiquent les écarts types aux différents points de mesure. Sur ces courbes, nous pouvons observer un

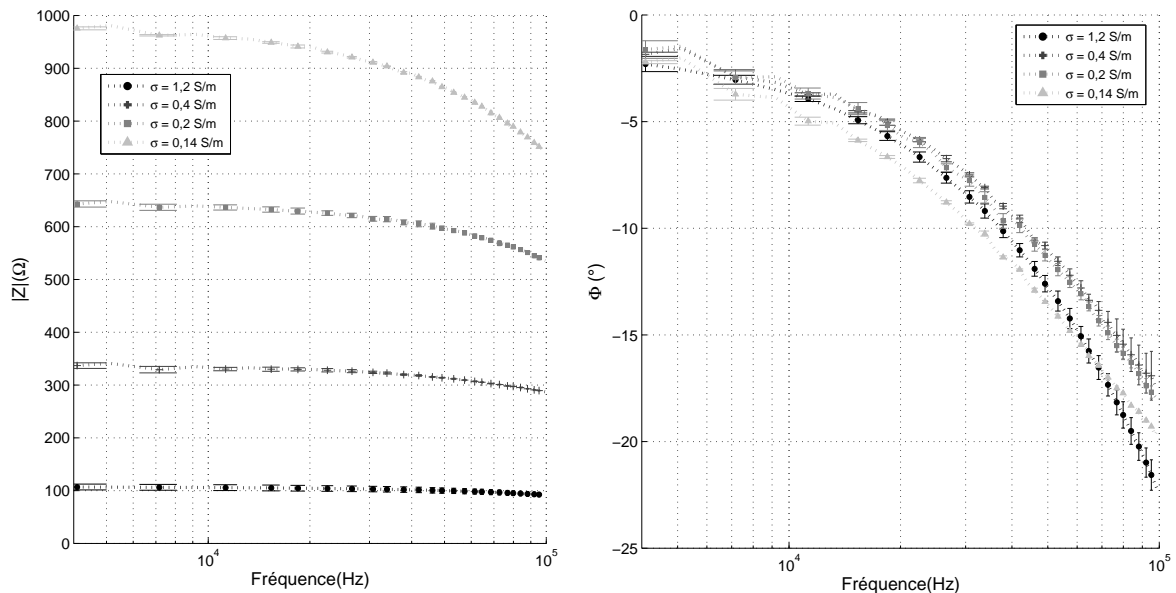


FIGURE 4.35 – Relevés de spectres d'impédances complexes mesurés sur des solutions salines calibrées

comportement quasi-similaire pour les trois solutions, à savoir un module quasi-constant en basses fréquences puis une chute pour les fréquences les plus hautes associée à une décroissance de la phase. Compte-tenu des évaluations faites auparavant, il est peu probable que ces variations de phase observées dans la partie haute du spectre soient liées à la valeur de permittivité des solutions calibrées mesurés. Celle-ci n'étant que de 80, les déphasages produits devraient être en théorie négligeables pour les valeurs de conduc-

tivités considérées. L'existence de capacités parasites en parallèle avec le milieu d'étude pourrait être à l'origine de ce déphasage en hautes fréquences. Néanmoins, lors de mesures préliminaires des capacités parasites de l'ordre de quelques pF ont été déterminées entre les différentes paires d'électrodes. Ces faibles valeurs ne permettent pas d'expliquer un tel déphasage observé à 100 kHz. En basses fréquences, la solution de 0.4 S/m produit un module d'impédance d'environ 340 Ω , celle de 0.25 S/m un module de 650 Ω , et celle de 0.1413 S/m un module de 980 Ω . La distinction entre les différentes conductivités des solutions utilisées est ainsi clairement perceptible. A ces fréquences, le comportement est quasi purement résistif et le rapport des modules d'impédances est proche de l'inverse du rapport des conductivités. En connaissant la valeur des conductivités des solutions utilisées, il est ainsi possible d'estimer la valeur du facteur géométrique de cellule K par :

$$K = R \cdot \sigma \approx |Z(4kHz)| \cdot \sigma \quad (4.17)$$

Sur la base de cette approximation, nous donnons dans la figure 4.36 les facteurs de cellule déterminés expérimentalement à partir des mesures sur les différentes solutions. Ces valeurs sont également comparées à celle obtenue par le biais de la modélisation électromagnétique sous COMSOL (cf. § 4.3.2).

Au regard des facteurs de cellules déterminés empiriquement représentés en Fig 4.36, on constate une assez bonne concordance sur la détermination du facteur en fonction de la conductivité de la solution. Il se situe approximativement entre des valeurs allant de 130 m^{-1} à 150 m^{-1} . On remarque également une bonne adéquation entre le facteur de cellule empirique et le facteur de cellule déterminé par la modélisation COMSOL, même si la valeur théorique est légèrement surestimée par rapport à la valeur expérimentale. Plusieurs explications peuvent être avancées sur l'écart entre le facteur de cellule théorique et expérimental. Il est possible, par exemple que les effets de bords aux extrémités des électrodes non pris en comptes via la modélisation ne soient pas négligeables dans la configuration réelle. De plus l'épaisseur non nulle du dépôt métallique constituant les électrodes peut également avoir une influence sur la distribution du courant électrique dans le milieu.

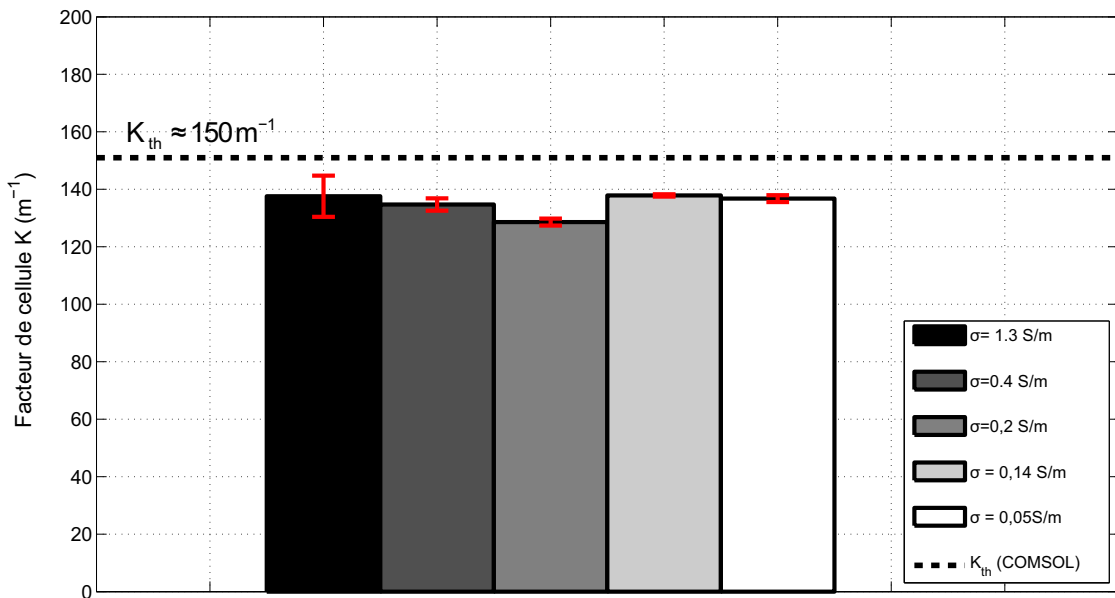


FIGURE 4.36 – Comparaison des valeurs du facteur de cellule obtenues expérimentalement pour différentes conductivités avec la valeur théorique obtenue au paragraphe 4.3.2

4.4.2 Mesures sur échantillons sanguins

Dans ce paragraphe nous présentons des résultats obtenus avec le prototype de microspectromètre sur des échantillons sanguins. Seuls les plus significatifs et reproductibles sont résumés ici. Ainsi les évolutions fréquentielle et temporelle sont présentées pour des échantillons sanguins placés dans des microréservoirs étanches.

4.4.2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons sanguins que nous avons testés proviennent de l'établissement français du sang. Ils ont été conditionnés sous formes de tubes de 5 ml avec comme anticoagulant de l'EDTA. L'EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique) est employé pour le comptage des plaquettes et dans tous les cas où les fonctions plaquettaires n'ont pas à être préservées. L'EDTA provoque un changement de forme disque-sphère, et un effet osmotique créant un transport d'eau de l'intérieur vers l'extérieur des plaquettes. Certaines fonctions plaquettaires sont alors inhibées, en particulier l'agrégation et l'adhésion. Les mesures présentées dans cette partie correspondent toutes à un même prélèvement effectué

sur un sujet masculin de 37 ans avec un taux d'hématocrite de 47 %. Comme évoqué dans le paragraphe 4.3.5, les résultats les plus reproductibles ont été obtenus par l'utilisation d'une chambre de perfusion. Cette chambre, fut de plus recouverte par une lamelle de verre pour éviter l'évaporation et le séchage du sang. Avant chaque mesure, les tubes sont agités lentement (3 min avant le prélèvement), les mesures étant effectuées rapidement afin d'éviter les sédimentations pouvant générer des hétérogénéités entre échantillons.

4.4.2.2 Evolution fréquentielle

Afin d'envisager une comparaison entre différents prélèvements, un effort a été consacré à répéter les procédures de manipulation pour chaque échantillon testé. Les courbes de la figure 4.37 représentent la moyenne(avec barres d'erreurs) des spectres d'impédances obtenus sur 5 prélèvements différents à différents instants (à quelques heure d'intervalles). La procédure suivante est répétée pour chaque mesure :

- Le tube de prélèvement est agité lentement 3 min avant le prélèvement, dans un but d'homogénéisation.
- Une dose (50 μ l) est prélevée dans le tube puis insérée dans le micro réservoir recouvrant la matrice d'électrodes, à l'aide d'une micropipette.
- 3 min plus tard, l'acquisition du spectre d'impédance est lancée.

Le respect de ces délais fut nécessaire pour la comparaison étant donné l'instabilité de l'impédance mesurée dans le temps. Evidemment, les électrodes sont nettoyées et séchées après chaque usage.

Le spectre d'impédance obtenu est assez proche d'un spectre d'impédance typiquement obtenu sur une solution saline calibrée. Sous l'hypothèse que l'impédance mesurée suit une dépendance linéaire entre la conductivité et le facteur géométrique de cellule déterminé auparavant (numériquement et empiriquement), la conductivité calculée de l'échantillon peut être approximée par :

$$\sigma \approx \frac{K}{|Z(4kHz)|} \quad (4.18)$$

En utilisant le facteur de cellule déterminé expérimentalement, la conductivité ainsi estimée est de l'ordre de 0.38 S/m. En utilisant le facteur de cellule déterminé par modélisation numérique nous trouvons une conductivité de l'ordre de 0.41 S/m. Dans tous les

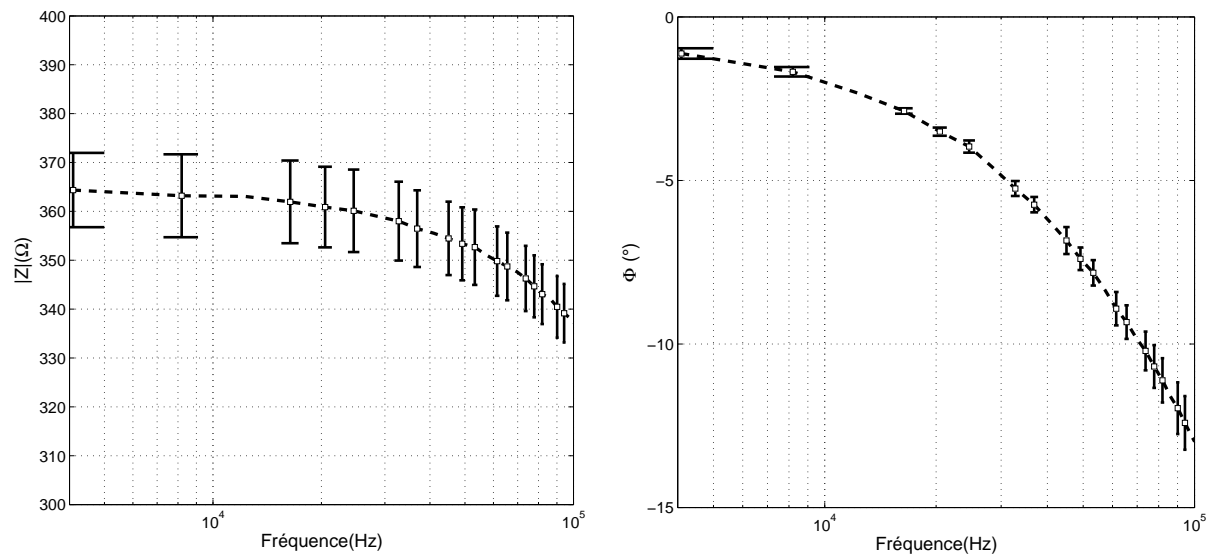


FIGURE 4.37 – Moyenne avec barres d’erreurs des spectres d’impédances obtenus sur 5 prélèvements d’un même échantillon sanguin. Le délai entre le prélèvement et le début de la mesure est constant (3 min)

cas, la valeur déterminée est inférieure à la valeur de la conductivité du sang généralement annoncée [Gab96] de 0.7 S/m. Reste à savoir si cette différence observée est attribuable à une réelle différence de conductivité de l’échantillon, ou plus probablement à des hétérogénéités à la surface des électrodes qui peuvent influencer de manière notable le facteur de cellule. On sort, dans ce cas, du modèle classique d’un milieu homogène. A ces échelles, les cellules sanguines constituent des hétérogénéités, et le sang ne peut probablement pas être assimilé une masse liquide homogène. Rappelons que les valeurs obtenues par d’autres auteurs jusqu’à présent portaient sur des échantillons macroscopiques pour lesquels l’homogénéité était assurée par des dispositifs classiques en laboratoire d’hématologie. Aux dimensions où nous travaillons cela n’est plus possible. Un autre paramètre est la nature de l’anticoagulant et son influence. Notre équipe [Jas01] avait déjà montré qu’il n’y a pas d’influence notable mais là aussi il s’agissait de macroéchantillons. L’erreur relative maximale entre les valeurs obtenues sur ce microéchantillon et celles données par exemple par Gabriel [Gab96] est de $(0.7-0.41)/0.7$ soit 40 %. Cet ordre de grandeur reste compréhensible dès lors que l’on mesure sur le vivant. Cette première approche présente le mérite de dégager les points critiques et les verrous métrologiques à étudier avant toute investigation

future d'une application biomédicale. Une modélisation numérique plus poussée introduisant les modèles cellulaires aux interfaces électrodes-milieu pourrait aider à prévoir les mesures observées. A noter qu'il aurait été tout de même difficile de connaître avec précision la densité des agrégats de cellules sur les électrodes. Les phénomènes électrochimiques à l'interface métal-milieu sanguin peuvent accélérer le processus de sédimentation à leur voisinage. En tout état de cause, vu les volumes mis en jeu, une micro-sédimentation reste envisageable en cas d'échantillon statique. Une circulation permettrait d'effectuer à l'aide d'une micropompe et une microfluidique adaptée une homogénéisation continue du milieu sous test et de ralentir aussi le changement d'état (coagulation) si le circuit est de plus thermostaté.

4.4.2.3 Evolution temporelle

Dans ce paragraphe, l'analyse porte sur les mêmes échantillons mais cette fois-ci, on s'intéresse à l'évolution temporelle de l'impédance mesurée. Sur les courbes des figures 4.38 et 4.39, on observe l'évolution temporelle du module d'impédance et de la phase pour les deux fréquences extrêmes du spectre (4 kHz et 100 kHz). Les deux courbes présentées correspondent à respectivement 30 et 350 mn. L'objectif étant de vérifier la dégradation de la mesure au delà des durées communément admises de conservation à l'ambiante. Précisons d'ores et déjà qu'au delà de la dizaine de minutes, l'échantillon sanguin commence à se dégrader notablement du point de vue biologique.

Sur ces courbes on observe une augmentation continue du module de l'impédance durant la mesure. Cette tendance est générale quelle que soit la fréquence d'excitation. Cette évolution s'explique par le changement d'état de l'échantillon car nous sommes dans des durées exagérées pour lesquelles le fluide se coagule au fur et à mesure malgré la présence d'anticoagulant dont les effets sont limités. Pour la phase, la dérive se caractérise par une légère diminution tout au long de la mesure. Ces variations continues peuvent se discuter si l'on se limite aux courbes d'une durée de 30 mn. Sur la courbe du module de la figure 4.39, on constate que le comportement est quasi linéaire au delà des cinq premières minutes qui correspondent à un transitoire cependant presque linéaire aussi. On constate une diminution de l'impédance avec la fréquence (ce qui est cohérent avec une augmen-

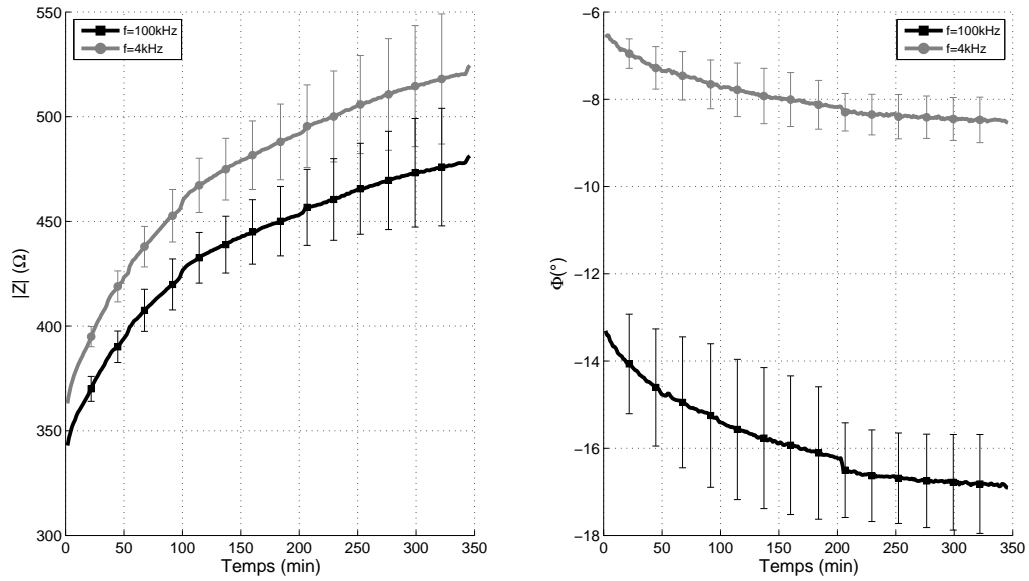


FIGURE 4.38 – Evolution temporelle de l'impédance mesurée (moyenne de 5 prélèvements conditionnés sous micro-réservoir, 350 min)

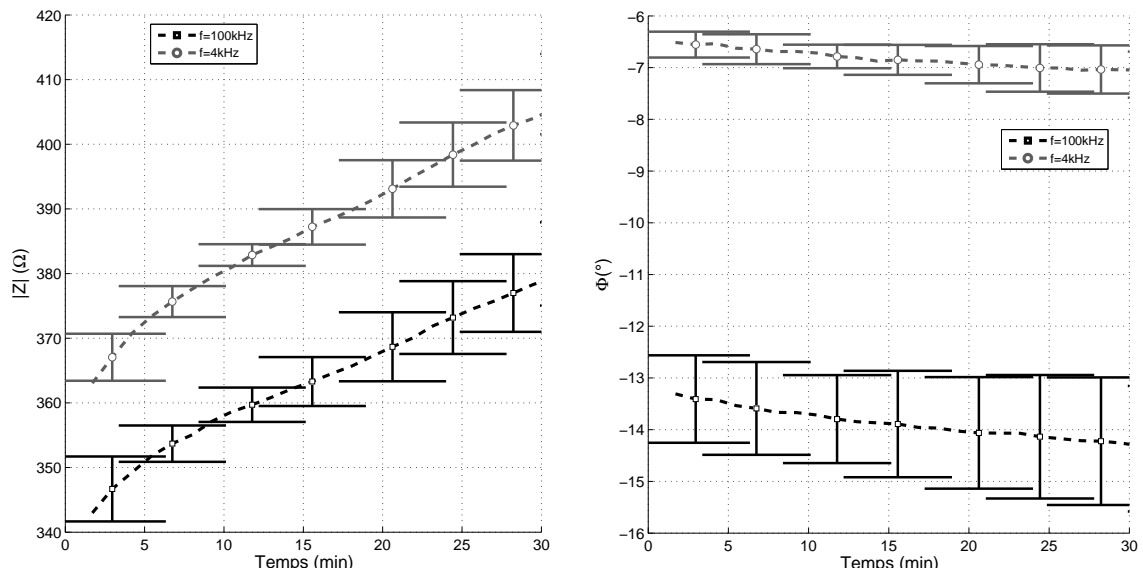


FIGURE 4.39 -- Evolution temporelle de l'impédance mesurée (moyenne de 5 prélèvements conditionnés sous micro-réservoir, 30 premières minutes

tation de la conductivité). Du point de vue de l'évolution temporelle, au fur et à mesure de la dégradation de l'échantillon due à différents phénomènes physiques, l'impédance

augmente selon une pente de $1 \Omega/\text{min}$ au delà du transitoire des cinq premières minutes. Concernant la phase, le comportement capacitif diminue avec la fréquence ce qui est aussi cohérent. Cependant on constate que les variations sont moins prononcées que pour le module. L'échantillon statique de sang présente un comportement diélectrique macroscopique quasi constant (inférieur à $-0,1^\circ/\text{mn}$). Nous n'en dirons pas plus sur la phase et nous considérerons le comportement fréquentiel en basses fréquences comme étant essentiellement résistif. Si l'on tente quelques éléments d'explication, il apparaît à première vue que les phénomènes qui président au changement d'état du milieu sanguin peuvent justifier ces comportements. D'une part, l'anticoagulant perd de son efficacité au delà de quelques heures de conservation in vitro d'autant plus que l'échantillon est petit ($50 \mu\text{l}$). Ceci se traduit par une densification du milieu (début de coagulation) accentuée par des phénomènes électrochimiques incontrôlés au niveau des électrodes. La mobilité des charges en est diminuée provoquant ainsi une augmentation de l'impédance. Si l'on s'intéresse maintenant aux évolutions sur une longue durée (Fig 4.38), on constate, au delà d'une heure environ, que le module de l'impédance continue à croître mais plus lentement ($0,25 \Omega/\text{mn}$) avec une tendance à un palier qui se situerait au delà de quelques heures! Le comportement biologique du sang statique dans ces conditions est tel que nous ne pouvons rien en conclure. Ces premières investigations montrent que le conditionnement du milieu sanguin est évidemment critique. Les variations temporelles sont cohérentes et quasi linéaires avec un comportement faiblement capacitif et presque constant ($-0,005^\circ/\text{mn}$ à 100 kHz). A long terme et en perspective, il semble donc envisageable de mener une étude pour approfondir l'exploitation des variations temporelles et fréquentielles en vue de réaliser un outil diagnostique de suivi de la dégradation d'un fluide biologique.

4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons proposé un prototype de microspectromètre. L'instrumentation électronique utilisée repose sur l'utilisation d'un circuit intégré adapté au domaine des basses fréquences ($1\text{kHz}-100\text{kHz}$) : le AD5933 de Analog Devices. Cette configuration a permis d'envisager une portabilité par la miniaturisation de l'électronique et un accès

sans fil depuis un ordinateur distant. De plus l'instrumentation a été conçue pour opérer dans une configuration tétrapolaire, permettant ainsi de corriger les erreurs liées aux impédances d'interfaces. L'instrumentation a été appliquée pour la mesure de faibles volumes de fluides (solutions étalons, sang humain) à l'aide d'une matrice de microélectrodes tétrapolaire. Cette matrice de microélectrodes a tout d'abord été décrite et modélisée et son facteur de cellule déterminé théoriquement et expérimentalement. L'intérêt bien connu de la configuration tétrapolaire a été confirmé de sorte à valider les performances métrologiques en basses fréquences. Celles-ci ont été évaluées au regard des problèmes de polarisation et grâce à une méthode d'étalonnage du circuit sur composants discrets. La validation sur des solutions étalons a montré une bonne sensibilité à la conductivité des solutions testées. Enfin, les résultats préliminaires obtenus sur des échantillons de sang humain ont été présentés et discutés selon les paramètres fréquentiels et temporels. Pour cela une étude du conditionnement de l'échantillon a montré qu'un microréservoir ad hoc permet de s'affranchir des phénomènes d'instabilité et de dérives rencontrés sur des gouttes simplement posées sur les électrodes.

Conclusion générale

La caractérisation des milieux biologiques peut tirer profit de la spectroscopie d'impédance. Jusqu'à présent essentiellement orientée vers les mesures macroscopiques, des applications visant les niveaux cellulaires sont en développement croissant depuis une dizaine d'années. Les contraintes liées aux mesures en basses fréquences constituent également un défi pour la caractérisation diélectrique des milieux biologiques. Les phénomènes de polarisation bien connus en spectroscopie d'impédance deviennent très limitants pour des applications à l'échelle cellulaire. En effet, les dimensions des microélectrodes et le niveau du signal à mesurer constituent alors un verrou technologique fort qui ne permet pas d'effectuer les mesures en dessous de la dizaine de kiloHertz. Le principe de base d'une chaîne de spectroscopie de bioimpédance consiste en un microcapteur chargé par un échantillon de tissu biologique, dont l'influence des différents paramètres (géométrie, nature des électrodes, matériaux, etc...) sur les caractéristiques électriques est formalisée et quantifiée. Les valeurs de l'intensité et de la densité de courant, du potentiel électrique et du champ électrique, permettent de déduire l'impédance complexe de l'échantillon sous test. Le facteur de cellule permet de remonter aux valeurs électriques du milieu (permittivité et conductivité). La diversité des possibilités ainsi que les difficultés métrologiques et instrumentales nous ont imposé une revue de l'existant qui fait l'objet des deux premiers chapitres. Le premier chapitre synthétise les caractéristiques électromagnétiques des milieux biologiques. Le deuxième chapitre traite des micro-technologies développées potentiellement utilisables pour la spectroscopie de bioimpédance et illustre des exemples concrets de réalisations à l'échelle cellulaire. Par la suite, sont décrites et discutées (chapitres 3 et 4) la conception et la réalisation de deux approches de mesures par spectroscopie d'impédance que nous avons développées. La première méthode est basée sur deux élec-

trodes en or permettant d'analyser des cellules biologiques isolées à l'aide d'un pont de mesure auto-équilibré du commerce. La deuxième, utilisant un microcapteur tétrapolaire et un microspectromètre que nous avons réalisé, a permis d'effectuer des mesures sur des échantillons sanguins humains. Nous avons notamment proposé des méthodes d'étalonnage de l'appareillage réalisé. Les modèles théoriques (par la méthode des éléments finis) et expérimentaux sont présentés dans les deux cas. Les résultats obtenus sont décrits et analysés avec une discussion des limites constatées, notamment pour la méthode bipolaire (clairement inutilisable en basses fréquences avec des microélectrodes). Les avantages potentiels du microcapteur tétrapolaire en vue d'applications diagnostiques potentielles par biopuce sont également analysés, cette approche étant compatible avec les difficultés liées aux basses fréquences. Ce sont les possibilités de mesure dans ce domaine (1 kHz à 5 MHz) qui ont été explorées car cette bande fréquentielle dispose de très peu de résultats expérimentaux. Il apparaît que des difficultés essentiellement techniques limitent l'exploitation de ces méthodes et qu'il sera possible de les résoudre à terme. La campagne de mesures effectuée sur des échantillons de sang humain, après calibration du microspectromètre, a permis de valider le banc de mesure. L'étude réalisée sur les facteurs d'influence majeurs a permis de qualifier et de quantifier leur incidence sur les résultats. Cette première approche nous a fourni des résultats préliminaires permettant d'envisager un passage à des mesures plus systématiques par une optimisation du prototype de microspectromètre réalisé pour cette bande de fréquences. Les perspectives issues de ces conclusions sont évoquées dans le cadre de travaux futurs au laboratoire.

Perspectives de ce travail

Les travaux présentés dans ce manuscrit constituent une première investigation vers la caractérisation à l'échelle microscopique d'échantillons biologiques. Les réalisations faites dans ce sens ont permis de dégager des critères qui serviront de guide lors de travaux futurs. Par exemple, dans le but d'aboutir à une méthode de caractérisation plus optimale à l'échelle d'une cellule unique en basses fréquences, il sera judicieux de travailler sur la réalisation d'un dispositif mieux adapté. Dans l'idéal celui-ci présentera une géométrie contraignant la cellule entre des parois isolantes afin de limiter au maximum les

impédances de shunt. Ce positionnement optimal de la cellule pourra être assisté par l'utilisation d'une micro-pompe. De plus, une configuration d'électrodes tétrapolaire sera adoptée afin de limiter les phénomènes d'interface métal-milieu. Sa réalisation pourra tirer profit des microtechnologies existantes. Pour ce qui concerne la mesure sur des micro-échantillons sanguins, un contrôle plus précis des échantillons sera nécessaire, et il serait intéressant d'étudier l'apport d'une circulation microfluidique du sang. Précisons également que des premiers essais non présentés dans ce manuscrit ont été menées sur des paires d'électrodes interdigitées réalisées par nos collègues du LPMIA de l'UHP. Ces types d'électrodes constituent potentiellement de bonnes candidates pour les applications visées. L'ajustement de différents paramètres (gap inter-digits, nombre de digits, largeur des digits, etc...) rendent leur utilisation flexible. De plus, leur réalisation ne fait appel qu'à des procédés microtechnologiques bien maîtrisés. L'application de ce type de structure pour la surveillance d'échantillons sanguins à l'échelle microscopique (agrégation plaquettaire, micro-sédimentation, coagulation, etc..) au sein de canaux microfluidiques est une des perspectives envisagée à moyen terme.

Enfin, précisons que le système de conditionnement électronique réalisé dans ce travail de thèse constitue un premier effort de miniaturisation d'une chaîne de spectroscopie de bio-impédance en configuration tétrapolaire. Les possibilités offertes aujourd'hui en terme d'intégration de circuit mixtes (analogique/numérique) permettent largement d'envisager l'intégration de l'ensemble du système électronique de conditionnement sur une seule puce. Comme perspective à plus long terme et après validation d'une configuration d'analyse adaptée, la combinaison du circuit de conditionnement et du microsystème de mesure intégrant les électrodes sur le même substrat pourra être envisagée, afin de disposer d'un outil d'analyse autonome. Ces objectifs, atteignables à plus ou moins long terme, concordent bien avec les besoins croissants d'outils d'analyse biologiques déportés dans le domaine du diagnostic biomédical.

Annexe A

Conduction ionique

A.1 Constitution d'une solution ionique

Une solution ionique est obtenue en dissolvant une substance appelée soluté dans un liquide appelé solvant. Le soluté peut être un solide, un liquide ou un gaz. Si le solvant est l'eau la solution obtenue est appelée solution aqueuse. Prenons l'exemple de la solution aqueuse de chlorure de sodium. Lorsque un cristal NaCl est placé dans l'eau, du fait de la grande constante diélectrique de l'eau ($\epsilon = 80$), les forces de cohésions entre les ions Na^+ et Cl^- sont réduites et les atomes finissent par se détacher (dissolution). Puis, les molécules d'eau étant polaires, un petit nombre d'entre elles sont attirés vers les ions. Elles forment ainsi une couche autour de l'ion appelée gaine d'hydratation. C'est le phénomène de solvatation. Le nombre de molécules dans la couche hydratante est variable selon l'ion (voir Tab A.1). En général, plus l'ion est petit plus il sera hydraté. Paradoxalement, les ions de petites tailles deviennent donc les plus encombrants dans la solution une fois hydratés. Finalement la solution se compose donc d'une suspension de cations Na^+ et d'anions Cl^- en quantités égales (respect du principe de neutralité électrique), hydratés et répartis uniformément dans le volume d'eau.

Ion	Nombre de molécules d'hydratation	Rayon à l'état hydraté (nm)	$U_i (m^2/s \cdot V)$	$\lambda_i (S \cdot m^2/mol)$
Li^+	6	0,236	$40,1 \cdot 10^{-9}$	$3,87 \cdot 10^{-3}$
Na^+	5	0,180	$51,9 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-3}$
K^+	4	0,121	$76,2 \cdot 10^{-9}$	$7,35 \cdot 10^{-3}$
Cl^-	3	0,120	$79,1 \cdot 10^{-9}$	$7,63 \cdot 10^{-3}$
Br^-	2	0,116	$80,9 \cdot 10^{-9}$	$7,80 \cdot 10^{-3}$
I^-	1	0,116	$79,6 \cdot 10^{-9}$	$7,68 \cdot 10^{-3}$

TABLE A.1 – Caractéristiques de quelques ions en solution : nombres de molécules d'eau hydratantes, rayon à l'état hydraté, mobilité ionique et conductivité molaire ionique [AAG⁺82]

A.2 Mobilité ionique

Sous l'effet d'un champ électrique \vec{E} , les ions hydratés se déplacent au milieu d'une foule compacte de molécules d'eau ($\approx 55 \text{ mol/l}$) qui gênent leur progression. La facilité avec laquelle l'ion peut se déplacer dépend principalement de la viscosité du milieu, de la taille de l'ion hydraté et de sa charge. Elle est définie par la mobilité ionique U qui exprime le coefficient de proportionnalité entre le champ électrique appliqué et la vitesse de déplacement $\vec{v}(m/s)$ de l'ion en résultant :

$$\vec{v} = U \times \vec{E} \quad (\text{A.1})$$

Pour un ion particulier i , la mobilité ionique U_i peut s'écrire :

$$U_i = \frac{q_i}{6\pi\eta r_i} \quad (\text{A.2})$$

Où q_i est la charge de l'ion considéré, η est le coefficient de viscosité du milieu (inversement proportionnel à la température), et r_i est le rayon de l'ion hydraté. On donne dans le

tableau A.1 la valeur de la mobilité ionique pour quelques ions. Il est intéressant de noter que la mobilité de l'ion ne dépend pas seulement de sa charge mais aussi de sa taille à l'état hydraté, et donc différents types d'ions même à charge égale et en quantité identique pourront un courant électrique différent.

A.3 Conductivité ionique

Finalement, connaissant la mobilité ionique, la conductivité électrique $\sigma_i(S/m)$ pour une concentration connue $C_i(mol/m^3)$ d'un ion i s'exprime par :

$$\sigma_i = F \cdot U_i \cdot |z_i| \cdot C_i \quad (\text{A.3})$$

En pratique, on préfère définir une notion de conductivité propre à une espèce ionique indépendamment de sa concentration. C'est la *conductivité molaire ionique* :

$$\lambda_i = \frac{\sigma_i}{C_i} = F \cdot U_i \cdot |z_i| \quad (\text{A.4})$$

Cette grandeur est donc exprimée en $S \cdot m^2/mol$. Des valeurs de λ_i sont données pour quelques ions caractéristiques dans le tableau A.1. La conductivité électrique totale d'une solution (en S/m) correspond à la somme des contributions de chaque espèce ionique :

$$\sigma = \sum_i \sigma_i = \sum_i C_i \lambda_i \quad (\text{A.5})$$

Par exemple, pour une solution aqueuse de NaCl de concentration $C_{Na^+} = C_{Cl^-} = 154 mol/m^3$, cela donne :

$$\sigma_{NaCl} = C_{Na^+} \cdot \lambda_{Na^+} + C_{Cl^-} \cdot \lambda_{Cl^-} = 154 \cdot (5 \cdot 10^{-3} + 7,63 \cdot 10^{-3}) \quad (\text{A.6})$$

$$\sigma_{NaCl} \approx 1,94 S/m \quad (\text{A.7})$$

Ainsi, il est relativement aisé de déduire, grâce à la connaissance de la concentration des différentes espèces ioniques la conductivité de la solution qui en résultera. Néanmoins, il faut préciser que les relations données sont valables sous certaines conditions. Premièrement, la totalité de l'électrolyte doit être bien dissocié dans la solution. Deuxièmement, la

concentration ionique doit être inférieure à une certaine limite sans quoi les interactions entre les ions peuvent réduire leur mobilité, et la conductivité n'est alors plus linéaire avec la concentration [MMM91] [GM00]. De plus la mobilité des ions est dépendante de la température. Une différence de température de 1°C peut engendrer une variation de conductivité de l'ordre de %. La conductivité ionique σ en (S/m) est une grandeur caractéristique du comportement électrolytique d'un matériau. Elle est parfois appelée également conductivité statique (σ_s) pour la distinguer de la conductivité liée aux pertes diélectriques (Equ 1.16)

Annexe B

Paramètres électriques caractéristiques des matériaux - Terminologie

Dans la littérature, les méthodes de représentation des propriétés électriques des matériaux ne sont pas toujours identiques, celles-ci diffèrent selon les phénomènes à mettre en évidence. De plus, les termes utilisés n'ont pas toujours la même signification. Sans une bonne compréhension de ce que représentent les différents termes et expressions utilisées pour représenter ces propriétés, la compréhension peut alors être parfois confuse. Il arrive par exemple que le terme ε'' soit utilisé pour décrire la partie imaginaire de la permittivité complexe en prenant en compte la composante statique des pertes (pertes ohmiques), soit $\varepsilon'' = \sigma'/\omega$. Nous réservons ce terme pour décrire les pertes diélectriques uniquement soit la partie imaginaire de la permittivité complexe d'un diélectrique pur. Souvent le comportement électrique fréquentiel d'un milieu est donné par le tracé de la conductivité σ' (partie réelle de la conductivité complexe) et de la permittivité ε' (partie réelle de la permittivité complexe) en fonction de la fréquence. Par souci de simplification, il arrive fréquemment que ces grandeurs soient représentées simplement par les symboles σ et ε . Pour évoquer la conductivité liée aux déplacements de charges libres (ions, électrons) σ , il n'est pas rare que l'on parle de conductivité statique σ_s par opposition à une conductivité variable avec la fréquence liée aux pertes diélectriques. Enfin, la permittivité est la

plupart du temps exprimée par rapport à celle du vide (ε_0) et donc les grandeurs ε , ε'' et $\underline{\varepsilon}$ sont souvent interprétées comme des valeurs relatives même si l'indice r n'apparaît pas. Afin de clarifier la compréhension des principaux paramètres caractéristiques décrivant les propriétés électriques d'un milieu en fonction de la fréquence, nous résumons ci-dessous la signification des différents termes généralement rencontrés.

- σ : Conductivité statique. Traduit la conduction liée aux déplacements des charges libres (ions, électrons). Proportionnelle à la puissance dissipée par effet Joule (pertes ohmiques) dans un conducteur. Apparaît parfois avec la notation σ_s . Par abus de langage σ est parfois utilisé pour désigner la conductivité globale σ' prenant en considération les pertes ohmiques et diélectriques.
- ε' : Permittivité. Pour un milieu diélectrique ne présentant pas de dépendance fréquentielle (sans pertes), la permittivité ε' désigne simplement la constante diélectrique du matériau et a la même signification que ε . Pour un diélectrique à pertes, ε' peut varier avec la fréquence. Plus précisément, ε' chute lorsque une partie de la polarisation ne peut plus répondre assez rapidement aux variations du champ électrique. ε' est la partie réelle de la permittivité complexe $\underline{\varepsilon}$. L'indice r est normalement ajouté pour indiquer qu'il s'agit d'une permittivité relative à celle du vide (ε'_r), mais en pratique celui-ci est souvent omis.
- ε'' : Facteur de pertes diélectriques. Traduit les pertes diélectriques du matériau. Proportionnel à la quantité d'énergie perdue dans le milieu pendant un cycle $T = 2\pi/\omega$ du champ électrique. Cette grandeur varie avec la fréquence. Typiquement, elle passe par un maximum à la (aux) fréquence(s) caractéristiques de relaxation, et tend vers zéro pour les fréquences inférieures et supérieures. ε'' est la partie imaginaire de la permittivité complexe $\underline{\varepsilon}$ d'un diélectrique pur. Il peut arriver que le symbole soit utilisé pour désigner la partie imaginaire de la permittivité complexe d'un milieu mixte diélectrique/conducteur. Dans ce cas, elle inclut également les pertes ohmiques.
- $\sigma_d = \omega\varepsilon_0\varepsilon''$: Conductivité dynamique. Proportionnelle à la puissance dissipée dans un diélectrique pur. Traduit les pertes diélectriques. Dans un milieu à pertes, σ_d augmente avec la fréquence. Lorsque le facteur de pertes ε'' passe par un maximum, la

-
- conductivité dynamique σ_d croît pour atteindre un palier supérieur.
- $\sigma' = \sigma_d + \sigma$: Conductivité globale. Contribution globale des deux conductivités (statique et dynamique). Proportionnelle à la puissance totale dissipée dans un milieu mixte diélectrique/conducteur. Partie réelle de la conductivité complexe.
 - σ'' : Partie imaginaire de la conductivité complexe. Traduit le facteur de proportionnalité entre le champ électrique appliqué et le courant de déplacement généré.
 - $\underline{\sigma} = \sigma' + j\sigma''$: Conductivité complexe globale d'un milieu mixte diélectrique (à pertes) et conducteur. Caractérise complètement les propriétés électriques d'un matériau. Utilisé plutôt pour décrire un matériau à "tendance" conducteur.
 - $\underline{\varepsilon} = \varepsilon' + j\frac{\sigma'}{\omega\varepsilon_0}$: Permittivité complexe globale d'un milieu mixte diélectrique (à pertes) et conducteur. Caractérise complètement les propriétés électriques d'un matériau. Contient les mêmes informations que la conductivité complexe $\underline{\sigma}$. Utilisé plutôt pour décrire un matériau à "tendance" diélectrique.
 - $\underline{\sigma}(\omega) = j\omega\varepsilon_0\underline{\varepsilon}(\omega)$: Relation liant la permittivité et la conductivité complexe.
 - $\underline{Z} = \frac{1}{\underline{\sigma}(\omega)} \cdot K$: Impédance électrique complexe. Avec K le facteur géométrique de cellule en m^{-1} .

Annexe C

Principaux mécanismes de relaxations

Nous abordons ici les 3 principaux phénomènes de relaxation susceptibles d'être rencontrés dans les tissus biologiques, à savoir :

- Les relaxations dipôlares (ou relaxations d'orientation).
- Les relaxations d'interfaces ou relaxations dites de Maxwell-Wagner.
- Les relaxations des contre-ions.

C.1 Relaxation dipolaire

En présence d'un champ alternatif, les molécules polaires telles que les molécules d'eau ou certaines protéines, subissent une rotation. Cette rotation n'est pas instantanée et donc un phénomène de relaxation est inhérent à ce mouvement de charges. Debye [Deb29] [Frö49] décrit l'orientation des dipôles permanents (telles que les molécules d'eau) comme un phénomène purement visqueux, sans force de rappels, qui peut être approché par un système du premier ordre avec une constante de temps de relaxation τ donnée par [FS96] :

$$\tau = \frac{4\pi\eta a^3}{kT} \quad (\text{C.1})$$

Avec η la viscosité, a le rayon du dipôle, k la constante de Boltzmann et T la température. Notons que la taille du dipôle considéré a une influence majeure dans la durée de

relaxation. En effet, il apparaît avec une puissance 3 dans l'expression de la constante de temps de relaxation. Typiquement, l'orientation des molécules d'eau (eau pure) se produit avec des temps de relaxation de l'ordre de quelques picosecondes, soit de fréquences caractéristiques de relaxations voisines de 20 GHz . Pour comparaison, les protéines polaires présentes dans les tissus biologiques sont en général bien plus grandes que des molécules d'eau et les fréquences caractéristiques de relaxations sont alors bien plus faibles (quelques MHz)

C.2 Relaxation d'interface : effet Maxwell-Wagner

La relaxation d'interface appelée également *relaxation de Maxwell-Wagner* est un phénomène qui se produit dans les matériaux hétérogènes, plus précisément dans des matériaux où le courant doit traverser des interfaces séparant des milieux possédant des propriétés électriques différentes. Afin d'illustrer ce phénomène, considérons dans un premier temps un milieu simple composé de deux couches juxtaposées (voir Fig C.1) de propriétés électriques différentes et indépendantes de la fréquence ($\varepsilon'' = 0 \rightarrow \sigma' = \sigma$).

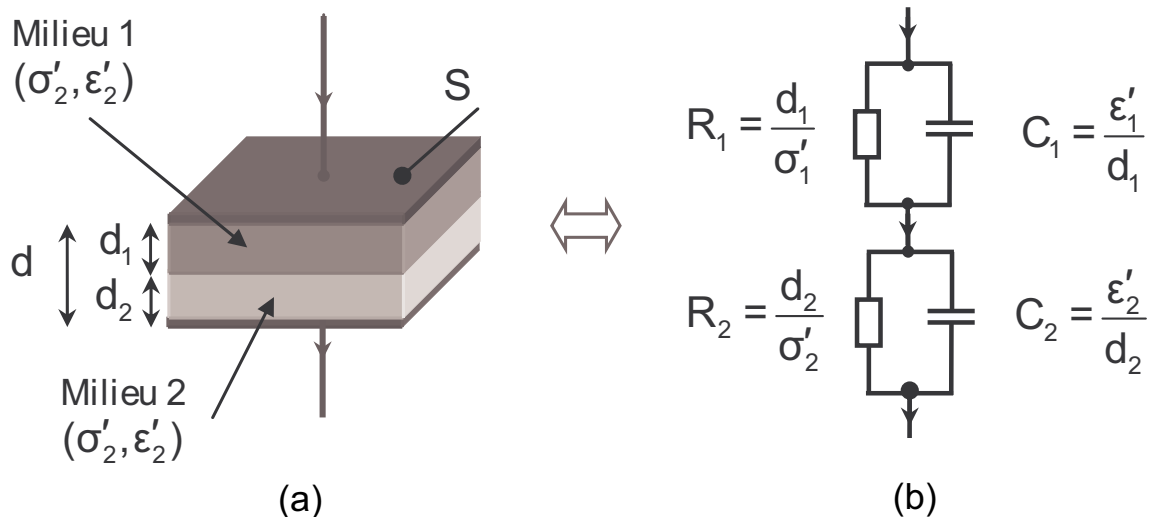


FIGURE C.1 – (a) Illustration de la relaxation d'interface de Maxwell-Wagner pour un modèle de matériau composé de deux couches de propriétés électriques différentes (b) Modèle électrique équivalent

Supposons que l'ensemble soit soumis à un échelon de champ électrique. Initialement, si l'interface entre les deux milieux n'est pas chargée la loi de Poisson [PCF90] impose que le déplacement électrique \vec{D} soit constant à l'interface et on peut donc écrire :

$$\vec{D} = \varepsilon'_1 \vec{E}_1 = \varepsilon'_2 \vec{E}_2 \quad (\text{C.2})$$

Les densités de courant des deux milieux peuvent alors être reliées par :

$$\frac{\vec{J}_1}{\vec{J}_2} = \frac{\sigma'_1 \vec{E}_1}{\sigma'_2 \vec{E}_2} = \frac{\sigma'_1 \varepsilon'_2}{\sigma'_2 \varepsilon'_1} \quad (\text{C.3})$$

Ainsi, si $\sigma'_1 \varepsilon'_2 \neq \sigma'_2 \varepsilon'_1$, les densités de courant \vec{J}_1 et \vec{J}_2 ne sont pas égales. Ce déséquilibre entraîne une accumulation de charges à l'interface séparant les deux couches, ce qui entraîne l'apparition d'un dipôle induit à l'interface (polarisation d'interface). Ce processus d'accumulation n'est cependant pas instantané et prendra d'autant plus de temps que la différence entre \vec{J}_1 et \vec{J}_2 est grande. Le matériau est donc le siège d'une relaxation liée au retard d'accumulation des charges à l'interface. La permittivité complexe du mélange formé par les deux milieux peut être calculée en considérant le modèle électrique donné en Fig C.1 - (b). Ce dernier représente les propriétés conductrices des milieux par $R_i = d_i/\sigma'_i$ et les propriétés diélectriques par $C_i = \varepsilon'_i/d_i$ (F/m^2), où i désigne le milieu (1 ou 2) et d_i l'épaisseur du milieu considéré [RMC96] [GM00] [MGS02]. L'admittance globale \underline{Y} du mélange est donnée par :

$$\underline{Y} = \underline{Y}_1 + \underline{Y}_2 \quad (\text{C.4})$$

\underline{Y}_1 et \underline{Y}_2 désignant les admittance de chaque couche obtenues par l'association en parallèle des éléments $R_1//C_1$ et $R_2//C_2$. La permittivité complexe globale de la double couche peut alors être déduite par la transformation suivante :

$$\underline{\varepsilon}(\omega) = \frac{\underline{\sigma}(\omega)}{j\omega\varepsilon_0} = \frac{S}{d} \cdot \frac{\underline{Y}}{j\omega\varepsilon_0} = \frac{S}{d} \cdot \frac{\underline{Y}_1 + \underline{Y}_2}{j\omega\varepsilon_0} \quad (\text{C.5})$$

En remplaçant \underline{Y}_1 et \underline{Y}_2 par leurs expressions fonctions des propriétés intrinsèques de chaque milieu (σ'_i , ε'_i , d_i) et en développant le calcul on obtient pour la permittivité complexe une expression identifiable à l'équation de Debye améliorée (Equ 1.29) avec les paramètres caractéristiques suivants :

$$\sigma = \frac{d\sigma'_1\sigma'_2}{d_2\sigma'_1 + d_1\sigma'_2} \quad (\text{C.6})$$

$$\tau = \frac{\varepsilon'_1 d_2 + \varepsilon'_2 d_1}{d_2 \sigma'_1 + d_1 \sigma'_2} \quad (\text{C.7})$$

$$\varepsilon_s = \frac{d \cdot (\varepsilon_1 d_1 \sigma_2'^2 + \varepsilon_2 d_2 \sigma_1'^2)}{(d_2 \sigma_1' + d_1 \sigma_2')^2} \quad (\text{C.8})$$

$$\varepsilon_\infty = \frac{d \varepsilon'_1 \varepsilon'_2}{d_1 \varepsilon'_2 + d_2 \varepsilon'_1} \quad (\text{C.9})$$

Ainsi, il apparaît que la permittivité complexe du mélange des deux couches présente un comportement dispersif avec la fréquence assimilable au modèle de relaxation du premier ordre de Debye (mais sans relation avec la relaxation dipolaire) alors que les propriétés des deux milieux sont indépendantes de la fréquence. Les paramètres caractéristiques de cette relaxation dépendant des propriétés du mélange, à savoir de la permittivité et la conductivité de chaque milieu et de leur épaisseur. Bien sur, si les milieux possèdent eux-mêmes des propriétés dispersives (dues à une relaxation dipolaire par exemple), les phénomènes sont cumulables, et le mélange présentera plusieurs relaxations distinctes. Il est également possible d'étendre ce modèle à un nombre de couches n en combinant deux à deux successivement les différentes couches [Sch57], la relaxation serait alors caractérisée par une distribution de $n - 1$ constantes de temps.

C.2.1 Modèles de relaxation d'interface pour des suspensions de particules sphériques

La géométrie multi-couches présentée constitue un exemple simple d'hétérogénéité. D'autres modèles de mélanges ont été développés pour étudier des hétérogénéités plus proches des matériaux rencontrés dans la réalité. En particulier, d'importants travaux ont été menés pour décrire les phénomènes d'interface dans des suspensions de particules sphériques dans un milieu aqueux. Les principaux modèles apparus dans cette branche sont issus du travail de Maxwell [Max73] qui commença par étudier le comportement de tels milieux en réponse à un champ statique. Il dérivait une expression analytique permettant de retrouver la conductivité globale d'une suspension en fonction de la conductivité de chaque particule et de leur fraction volumique dans la suspension :

$$\frac{\sigma - \sigma_2}{\sigma + 2\sigma_2} = \frac{p(\sigma_1 - \sigma_2)}{\sigma_1 - \sigma_2} \quad (\text{C.10})$$

Où σ_1 désigne la conductivité de chaque particule, σ_2 la conductivité du milieu de suspension, et p la fraction volumique de particules en suspension. Plus tard, le concept a été étendu par Wagner [Wag14] pour des champs alternatifs (d'où la dénomination de Maxwell-Wagner), puis par Fricke [Fri24] [Fri25] pour des particules ayant des formes non-sphériques (équation de Maxwell-Fricke). La relation qui est en fait l'extension en écriture complexe du modèle de Maxwell s'écrit :

$$\frac{\underline{\sigma} - \underline{\sigma}_2}{\underline{\sigma} + 2 \cdot \underline{\sigma}_2} = p \cdot \frac{(\underline{\sigma}_1 - \underline{\sigma}_2)}{\underline{\sigma}_1 - \gamma \cdot \underline{\sigma}_2} \quad (\text{C.11})$$

Où γ est un facteur de forme égal à 2 pour des sphères et 1 pour des cylindres dans la direction du champ. Par la suite, dans le but de modéliser des milieux biologiques tels que le sang ou les suspensions cellulaires, Fricke [Fri55] a proposé un modèle analytique de cellule composé d'une sphère entourée par une membrane dont l'épaisseur est très faible par rapport au rayon de la sphère :

$$\underline{\sigma}_1 = \frac{\underline{\sigma}_i - (2d/r)(\underline{\sigma}_i - \underline{\sigma}_{sh})}{(1 + d/r)(\underline{\sigma}_i - \underline{\sigma}_{sh})/\underline{\sigma}_{sh}} \quad (\text{C.12})$$

Où $\underline{\sigma}_i$ désigne la conductivité complexe de la sphère, $\underline{\sigma}_{sh}$ la conductivité complexe de la membrane, d l'épaisseur de la membrane, r le rayon de la sphère, et $\underline{\sigma}_1$ la conductivité complexe de la sphère homogène équivalente. Cette expression une fois insérée dans l'équation de Maxwell-Fricke (Equ C.11) permet d'obtenir la conductivité complexe globale d'une suspension de sphères entourées par une membrane. En assimilant le mélange à des sphères purement conductrices entourées par une membrane (non conductrice) de capacité C_m et en faible concentration ($p < 20\%$, [MDK91]) dans un milieu purement conducteur (voir Fig C.2), et en opérant quelques approximations [FS96] Pauly et Schwan [PS59] ont abouti à un modèle simplifié de relaxation pouvant être représenté par le formalisme de Debye avec les paramètres caractéristiques suivants :

$$\Delta\varepsilon' = \frac{9prC_m}{4\varepsilon_0} \quad (\text{C.13})$$

$$\sigma_S = \sigma_2(1 - 3p/2) \quad (\text{C.14})$$

$$\tau = aC_m \left(\frac{1}{2\sigma_2} + \frac{1}{\sigma_1} \right) \quad (\text{C.15})$$

L'indice 1 étant pour la particule, et l'indice 2 pour le milieu de suspension. On donne à titre illustratif en Fig C.3, un exemple de relaxation modélisée par cette approximation pour différentes concentrations cellulaires. Les équations complètes peuvent être trouvées dans [PS59]. Elles traduisent en fait deux dispersions : une grande dispersion due à la charge et décharge des membranes des cellules et une plus petite à des fréquences plus élevées liée à la différence de conductivité entre l'intérieur des cellules et les liquides extracellulaires. L'équation C.13 indique que la chute de permittivité est liée à la capacité des cellules C_m , à leur taille et à leur concentration dans le milieu. Sachant que des cellules vivantes ont des membranes intactes alors que des cellules mortes sont caractérisées par des membranes détruites (lysées), la mesure de $\Delta\varepsilon'$ est mise à profit en pratique pour mesurer la quantité de cellules vivantes dans une suspension (biomasse) et plusieurs appareils commerciaux existent à ce jour pour ce faire⁵ [MDK91].

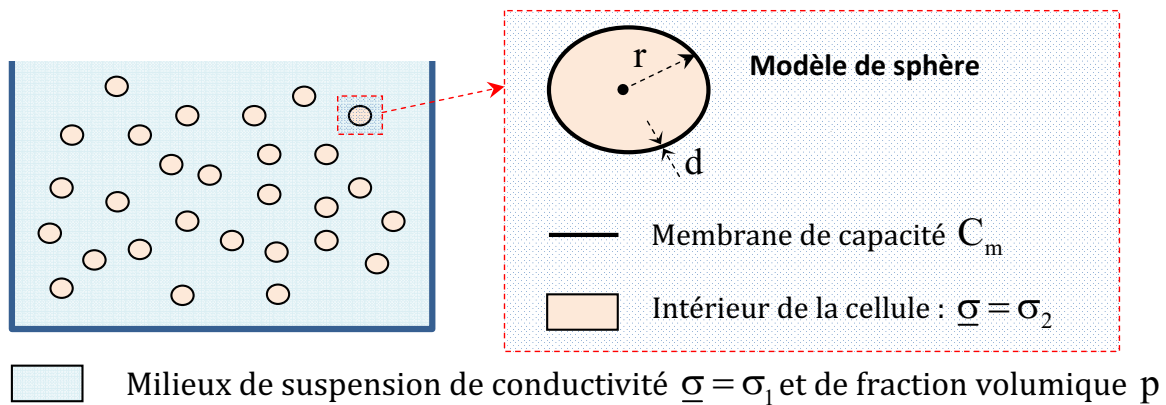


FIGURE C.2 – Modèle de suspension cellulaire prenant en considération la conductivité du milieu de suspension, la capacité des membranes et la conductivité interne des cellules. Approximation de Pauly et Schwan [PS59]

Même si le modèle simplifié proposé par Pauly et Schwan (Equ C.13 à C.15) repose sur plusieurs approximations, il présente l'avantage de relier les mécanismes des relaxations à des formulations simples et reste utilisable pour de nombreux cas pratiques de suspensions cellulaires [FS96] et ceux même pour de fortes concentrations. Pour satis-

5. Aber Instruments(Biomass Monitor)

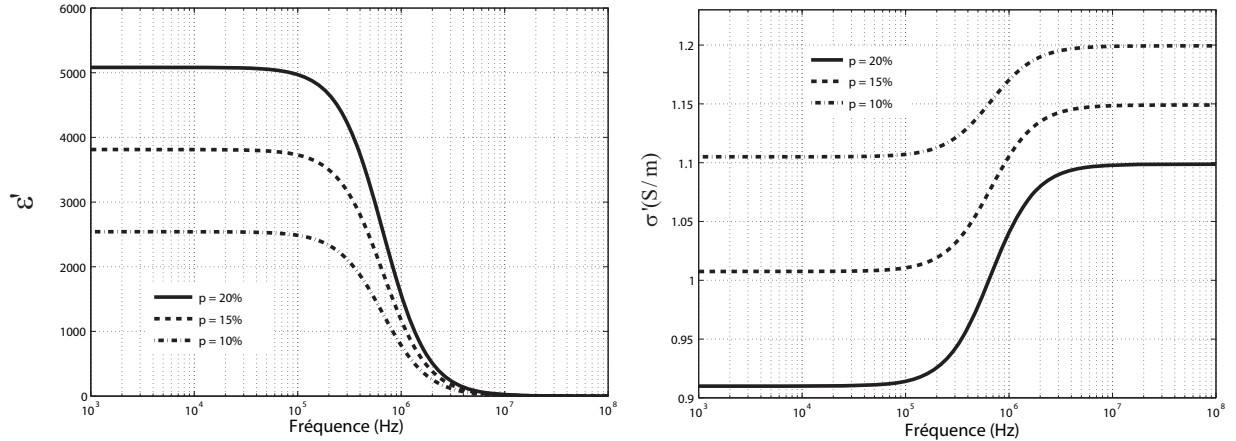


FIGURE C.3 – Exemples de relaxation d’une suspension cellulaire modélisé par l’approximation de Pauly et Schwan (Equ C.13, C.14, C.15. Tracé de la conductivité et permittivité en fonction de la fréquence. $r = 10\mu m$, $C_m = 1\mu F/cm^2$, $\sigma_1 = 0.5 S/m$, $\sigma_2 = 1.3 S/m$, valeurs choisis dans la gamme des valeurs habituellement rencontrées [Sch63]

faire des configurations plus spécifiques, une variété de modèles analytiques dérivés du formalisme de Maxwell-Wagner ont été proposé. Citons entre autres les travaux de Bruggeman [Bru35], Hanaï [Han60] et Schwan [FS89] pour les suspensions de fortes concentrations, de Fricke [Fri53] pour traiter les cas de particules non sphériques, de Fricke encore [Fri55] et Imagiri [IHI79] pour la modélisation de sphères à plusieurs membranes, ou encore Schwan et Morrovitz [SM62] pour la modélisation de très petites cellules.

C.3 Relaxation des contres-ions

Ce processus de relaxation est lié à la diffusion ionique dans les doubles couches adjacentes aux surfaces chargées. La relaxation est liée à un processus de diffusion et non de migration comme c’est le cas pour la relaxation interfaciale de Maxwell-Wagner (voir Annexe C.2). De nombreux auteurs ont reporté l’existence de tels phénomènes dans des milieux comportant des surfaces chargées tels que : des émulsions [Duk71] [HS68], des suspensions de sphères en polystyrène [SM62], des micro-organismes [EC73] et dans de longues macromolécules comme l’ADN [Man77]. La première théorie permettant de décrire ce phénomène fut donné par Schwarz en 1962 [Sch62]. Même si son approche repose sur

plusieurs approximations et suppositions, elle reste la seule largement utilisée par les expérimentalistes pour interpréter leurs résultats. Le modèle considère le cas d'une sphère de rayon a sur laquelle est attachée une couche de contre-ions absorbés de densité surfacique de charges $\delta_0(m^{-2})$. La double couche est supposée très fine par rapport au diamètre de la sphère. Selon Schwartz, la permittivité complexe de la sphère homogène équivalente est alors donnée par :

$$\underline{\varepsilon}_p = \varepsilon_b + \frac{1}{1 + j\omega\tau} \frac{e_0^2 \delta_0 a}{\varepsilon_0 kT} \quad (\text{C.16})$$

Où ε_b est la permittivité du matériau composant la sphère, e_0 la charge du contre-ion, et est τ la constante de temps de relaxation donnée par :

$$\tau = e_0 a^2 / 2\mu kT \quad (\text{C.17})$$

Avec μ la mobilité surfacique des contre-ions(en $m^2/(V \cdot s)$). La permittivité complexe globale d'une suspension de sphères en utilisant ce modèle peut alors être calculée en utilisant la théorie des mélanges de Maxwell-Wagner (voir Annexe C.2), ce qui permet d'obtenir la chute de permittivité obtenue dans une suspension de sphère de fraction volumique p :

$$\Delta\varepsilon = \frac{9p}{(2+p)^2} \frac{e^2 a q_{sn}}{kT} \quad (\text{C.18})$$

D'autres modèles ont été développés pour décrire ce type de relaxation. Des informations plus détaillées pourront être trouvées dans [FS96] [Sch57] [GM00]. Dans les milieux biologiques, les surfaces des membranes cellulaires sont hautement chargées, et donc la relaxation liée à la diffusion des nuages de contre ions présents à la périphérie des cellules est souvent dominante en basses fréquences (dispersion α).

Annexe D

Spécifications techniques des microélectrodes Abtech

INDEPENDENTLY ADDRESSABLE MICROBAND ELECTRODES

MICROBAND DEVICES	Line and Space, Digit Length	Designs	Conductor
IAIME 0505.3 SERIES	5 microns, 3 mm long	10 bands	Au, Pt, ITO
IAME 2004.3 SERIES	20 microns, 3 mm long	4 bands	Au, Pt, ITO
IAME 1504.3 SERIES	15 microns, 3 mm long	4 bands	Au, Pt, ITO
IAME 1004.3 SERIES	10 microns, 3 mm long	4 bands	Au, Pt, ITO
IAME 0504.3 SERIES	5 microns, 3 mm long	4 bands	Au, Pt, ITO

ABTECH -- Chemical and biological sensor devices, instruments, and sensor systems.

■ **Independently Addressable Microband Electrodes (IAIMEs and IAMEs)** are inert, array microelectrodes formed from patterned noble metals sputter-deposited onto an insulating substrate chip. Microfabricated from magnetron sputter-deposited gold, e-gun vapor-deposited platinum or indium tin oxide, they are designed for: i) Electrical cell impedance and cell mobility studies, ii) Characterization of the electrical and optical properties of thin polymeric films and coatings, iii) Electrochemical applications in microelectrochemistry, iv) Electrical / electrochemical impedance spectroscopy, and v) Chemical and biological sensor development. ■ **IAIMEs** are designed with a total of ten (10) independently addressable microbands with five alternating bands and each interdigitated from opposing sides. ■ **Microbands** of IAIME chips are 5 microns wide and 3 mm long with a band spacing of 5 microns wide. IAIME chips are available in gold, platinum and indium tin oxide. ■ **IAMEs** are designed with a total of four (4) independently addressable microband electrodes. ■ **Microbands** and spacings of IAME chips are available in 5, 10, 15, and 20 μm wide and 3 mm long. IAME chips are available in gold, platinum and indium tin oxide. ■ **Investigate** the four-point electrical conductivity and chemoresistive responses of transducer-active, polymeric films in the same electrode configuration, the same test environment, and on the same sample film. ■ **In research and product development**, these devices are widely used for conductimetric, chemoresistive chemical and biological sensors using electrically conducting (electroconductive) polymers, for impedance sensors based on Langmuir-Blodgett or adsorbed polyelectrolyte thin films, for studying the environmental effects on polymer thin films, and in modern micro-electrochemistry. ■ **Develop** these devices into products where the application requires a compact, durable and versatile chemical or biological chemoresistive sensor of low cost.

■ Introduction

Independently Addressable Microband Electrodes (IAMEs) is the registered trade name for a family of devices developed by ABTECH. Also available in an interdigitated array, IAIMEs, these devices are microfabricated (using microelectronics fabrication techniques) from patterns of noble metals deposited on an insulating substrate chip. They are designed for cell motility studies, the

simultaneous interrogation of the electrical, electrochemical, and optical properties of thin polymeric films and coatings, for applications in microelectrochemistry, and for electrical/electrochemical impedance spectroscopy.

■ Applications

Applications of IAMEs in research and product development include:

✓ Cell mobility testing: Study the chemotactic response of cells as they migrate across an interdigitated pattern of independently addressable electrodes.¹

✓ Electro-chromatography: Voltage induced separation of biomolecules as they flow over the electrodes.

✓ Electrical and Electrochemical Impedance Spectroscopy of organic thin films and coatings³.

✓ Capacitance probes and humidity sensors, e.g. based on Langmuir-Blodgett films⁴.

✓ Modern microelectrochemistry: Generator-collector electrochemistry⁵.

✓ Four-point electrical conductimetry: Determine the conductivity of thin films cast onto the four parallel microbands.

■ Coatings

Films or coatings may be applied to the IAME device may be achieved by dip coating, spin casting, spray painting, air-brushing, brush painting, by Langmuir-Blodgett thin film deposition, by electropolymerization, and by molecular self assembly.

■ Application Notes

For further information, request Application Notes:

IAME1 – Independently Addressable Microband Electrodes: Applications and References.

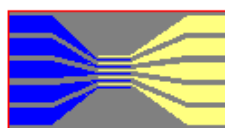
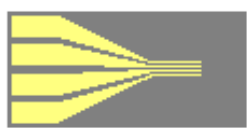
■ Technical Specifications

Substrate:	Schott D263 Borosilicate Glass			
	Dielectric Constant, ϵ_r , at 1 MHz	6.7		
	Dielectric Loss Angle, $\tan \delta$, at 1 MHz	61×10^{-4}		
	Electrical Resistivity (50 Hz) (250 °C)	$1.6 \times 10^8 \Omega \text{ cm}$		
	Coefficient of Linear Thermal Expansion α , 20-300 °C	$7.2 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$		
	Refractive Index at 20°C, n_e ($\lambda = 546.1 \text{ nm}$)	1.5249		
Metallization:	100 Å Ti /W 1,000 Å Au or Pt			
IAIME 0505.3	Digit length, d, (μm):	2,995 μm		
	No. of digit pairs, N	5		
	Digit Width, a, (μm):	05 μm		
	Interdigit Space, a, (μm):	05 μm		
	Spatial Periodicity, λ , (μm)	20 μm		
	Zaretsky ^{6,7} Meander Length, M, (cm)	1.50		
	Center Line or Serpentine Length ⁹ (cm)	2.70		
IAIME XX04.3		2004.3	1504.3	1004.3
	Digit length, d, (μm):	2,980 μm	2,985 μm	2,990 μm
	Digit Width, a, (μm):	20 μm	15 μm	10 μm
	Interdigit Space, a, (μm):	20 μm	15 μm	10 μm
	Spatial Periodicity, λ , (μm)	80 μm	60 μm	40 μm
IME Chip Dimensions	Un-packaged Die (l x w x t)			Packaged Electrode* (l x w x t)
IAIME 0505.3	1.50 x 3.00 x 0.05 cm			13.2 x 1.38 x 0.7 cm
IAIME XX04.3	1.00 x 2.00 x 0.05 cm			13.2 x 1.38 x 0.7 cm
* Electrode Body:	PVC-jacketed printed circuit board			
* Encapsulant:	Epoxy header. Polyimide packaged chip.			
* Leadwires:	Color coded, 30AWG stranded copper, shielded, and PVC jacketed.			

■ **References and Notes**

1. (a) Lawrence, A "Conductimetric Enzyme Assays." *European Journal of Biochemistry* **1981**, *18*, pp. 221-225. (b) Lawrence A; Moores, G. R. "Conductimetry in Enzyme Studies." *Europ. J. of Biochem.* **1972**, *24*, pp. 538 - 546. (c) Cullen, D. C.; Sethi, R. S.; Lowe, C. R. "Multi-Analyte Miniature Conductance Biosensor," *Analytica Chimica Acta* **1990**, *231*, pp. 33 - 40. (d) Mikkelsen, S. R.; Rechnitz, G.A. "Conductometric Transducers for Enzyme-Based Biosensors," *Anal. Chem.* **1989**, *61*(15), pp. 1737 - 1741. (e) Hanss, M.; Rey, A. "Application de la Conductimétrie a l'étude des Réactions Enzymatiques, Systeme Urée-Uréase," *Biochim. Biophys. Acta.* **1971**, *277*, pp. 630 - 638. (f) Norman F. Sheppard, Jr. and Anthony Guiseppi-Elie "Enzyme Sensors Based on Conductimetric Measurement"; **In Protocols in Biosensors Research**; Ashok Mulchandani and Kim R. Rogers, Editors; Humana Press, Totowa, NJ. (**in press**). (g) Anthony Guiseppi-Elie, Gordon G. Wallace, and Tomakazu Matsue "Chemical and Biological Sensors Based on Electrically Conducting Polymers" **In Handbook of Conductive Polymers** 2nd Edition (**1998**), T. Skotheim, R. Elsenbaumer and J. R. Reynolds Eds; Marcel Dekker, New York. (h) Norman F. Sheppard, Jr., David J. Mears, and Anthony Guiseppi-Elie "Model of a Conductimetric Urea Biosensor" *Biosensors and Bioelectronics* (**1996**), Vol. 11(10) 967 - 979.
2. (a) Anthony Guiseppi-Elie, James M. Tour, David L. Allara and Norman F. Sheppard, Jr. "Bioactive Polypyrrole Thin Films with Conductimetric Response to Analyte" **In, Electrical, Optical, and Magnetic Properties of Organic Solid State Materials**, Eds. A. K.-Y. Jen, C. Y.-C. Lee, L. R. alton, M. F. Rubner, G. E. Wnek, L. Y. Chiang, Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 413; Materials Research Society, Pittsburgh, **1996**, p 439- 444. (b) A. Guiseppi-Elie, A. M. Wilson, J. M. Tour, T. W. Brockmann, P. Zhang, D. L. Allara "Specific Immobilization of Electropolymerized Polypyrrole Thin Films onto Interdigitated Microsensor Array Electrodes" *Langmuir* (**1995**), *11*(45), 1768.
3. Naoi, K.; Ueyama, K.; Osaka, T. "Impedance Analysis of Ionic Transport in Polypyrrole-Polyazulene Copolymer and its Charge-Discharge Characteristics" *J. Electrochem. Soc.* **1990**, *137*(2) 494.
4. Kowel, S. T.; Zhou, G.-G.; Srinivasan, M. P.; Stroevé, P.; Higgins, B. G. "On-line Diagnostics for Langmuir-Blodgett Film Growth" *Thin Solid Films* **1985**, *134*, 209.
5. Bard, A. J.; Crayston, J. A.; Kittlesen, G. P., Shea, T. V.; Wrighton, M. S. "Digital Simulation of the measured Electrochemical Response of Reversible Redox Couples at Microelectrode Arrays: Consequences Arising from Closely Spaced Ultramicroelectrodes" *Anal. Chem.* **1986**, *58*(11), 2321.
6. Zaretsky, M. C.; Mouyad, L.; Melcher, J. R. *IEEE Trans. Electr. Insul.* **1988**, *23*, 897.
7. The Zaretsky convention defines the meander length; $M = N \cdot d$
8. Serpentine length is defined as: $S = (2a + d) (2N-1)$

■ **General Ordering Information**



INDEPENDENTLY ADDRESSABLE AND INTERDIGITATED MICROBAND ELECTRODES (IAMES AND IAIMES)

IAIME 0505.3- C where C = Au, Pt or ITO and μm

IAME XX04.3- C where C = Au, Pt or ITO and XX = 5, 10, 15 or 20 μm

IAME SERIES <i>Independently Addressable</i>	GOLD (Au)	PLATINUM (Pt)	INDIUM TIN OXIDE (ITO)
IAME 05 μm lines and spaces	IAME 0504.3-Au	IAME 0504.3-Pt	IAME 0504.3-ITO
IAME 10 μm lines and spaces	IAME 1004.3-Au	IAME 1004.3-Pt	IAME 1004.3-ITO
IAME 15 μm lines and spaces	IAME 1504.3-Au	IAME 1504.3-Pt	IAME 1504.3-ITO
IAME 20 μm lines and spaces	IAME 2004.3-Au	IAME 2004.3-Pt	IAME 2004.3-ITO
IAIME SERIES <i>Independently Addressable Interdigitated</i>	GOLD(Au)	PLATINUM (Pt)	INDIUM TIN OXIDE (ITO)
IAIME 05 μm lines and spaces	IAIME 0505.3-Au	IAIME 0505.3-Pt	IAIME 0505.3-ITO

At the forefront of bioelectronics



Advanced Biosensor Technology

For Further Information
Customer Service and Support
Tel.: +1 804.783 7829
Fax.: +1 804 783 7830

911 East Leigh Street, G24, Richmond, Virginia 23219, U.S.

Annexe E

RLC-mètre HIOKI 3532 - Résumé des spécifications techniques

HIOKI

2001



Improved with Faster Measurement!

3522-50/3532-50 LCR HiTESTER

Components measuring instruments



Improved 3522-50 / 3532-50 further shortens line tact time with its high-speed measuring power

High speed measurement of 5 ms LCR meter



ISO14001
JQA-E-90091



<http://www.hioki.co.jp/>

HIOKI company overview, new products, environmental considerations and other information are available on our website.

With variable frequency measurements, the highly acclaimed 3522/3532 LCR HiTESTER has been improved with the power for maximum high speed measurements of 5 ms (4 times that of current models). This means that line tact times can be further shortened, promising you increased line efficiency.

The 3522-50 offers DC and a range from 1 mHz to 100 kHz, and the 3532-50 covers the range from 42 Hz to 5 MHz. Test conditions can now come closer to a component's operating conditions. The high basic accuracy of $\pm 0.08\%$, combined with ease of use and low price give these impedance meters outstanding cost-performance characteristics.

These will find a wide range of applications, whether for laboratory use for evaluation of operating characteristics, or for production line use, exploiting the full-function interface and comparator functions and rapid response.



Two Models Cover Wide Frequency Range :

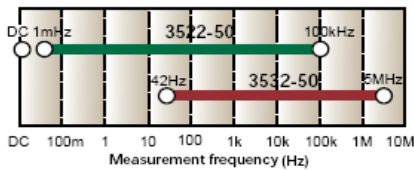


3522-50/3532-50 ICR HIESTER

3522-50/3532-50 Features

■ Higher frequency range

The measurement frequency can be freely set to DC or any value in the 1 mHz to 100 kHz range (3522-50) and any value in the 42 Hz to 5 MHz range (3532-50). In particular this makes it easy to test sample characteristics in the high frequency range.



■ High resolution and high accuracy

The measurement resolution provides a full five digits, and the basic measurement accuracy is $\pm 0.08\%$.

■ Minimum measurement time 5 ms

Four sampling rates can be selected: FAST, NORMAL, SLOW, and SLOW2. The minimum measurement time of 5 ms (displaying |Z|) gives rapid sampling for improved production line efficiency.

(The measurement frequency range varies from one parameter to another.)

■ Fourteen parameters measured

The following parameters can be measured, and selected parameters can be captured by a computer: |Z|, |Y|, θ , Rp (DCR*), Rs (ESR, DCR*), G, X, B, Lp, Ls, Cp, Cs, D (tan δ), and Q. *3522-50 only

■ DC resistance measurement *3522-50 only

DC resistance measurement is another feature of the 3522-50. A single unit, the 3522-50 can provide the crucial parameters of inductance (L) and DC resistance (DCR) for a transformer or coil.

■ Wide setting range for measurement voltage and current

In addition to normal open-loop signal generation, these units provide for voltage/current dependent evaluation, in constant voltage and constant current modes. The signal levels can be set over wide ranges, from 10 mV to 5 Vrms, and from 10 μ A to 100 mA (up to 1 MHz).

■ Simultaneous setting and measurement

Measurement frequency, measurement signal level, and other measurement conditions can be changed while monitoring the measurement results, enabling effective trial measurements and setting of evaluation conditions.

■ Interactive touch panel operation

Operation is extremely simple: touch the item on the screen to be changed, and the possible settings appear in sequence. The neat and simple front panel eliminates all key switches, for a clutter-free design.

■ Memory for thirty sets of measurement conditions

Up to thirty sets of measurement conditions, including comparator values, provide rapid response to constantly changing components on flexible production lines. With multiple measurement conditions in memory, up to five different measurements can be made sequentially. The comparator function lets a single unit provide the logical AND result for this sequence of tests.

■ Four simultaneous measurement items

Any four of the fourteen parameters can be chosen for simultaneous measurement and display.

■ Enlarged display function

Up to four parameters can be displayed enlarged, for easy observation of the measurement values in production line and other situations where the unit is read at a distance.

■ Correlation correction function

The constants a and b can be set in the following correction function expression:

$$\text{Corrected value} = a \times \text{measurement value} + b$$

■ Printer output

With the optional 9442 PRINTER, measurement values, comparator results, and screen printouts can be obtained.

■ DC bias measurement

Using the optional 9268/9269 DC BIAS UNIT, voltage and current bias measurements are simple. The maximum applied bias is ± 40 V DC, but depends on the measurement conditions.

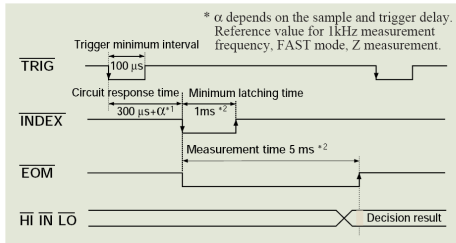
DC, 1 mHz to 100 kHz, and 42 Hz to 5 MHz

External I/O interface

The EXT. I/O connector can input trigger signals, and provides a key lock on/off function, and remote control of the measurement condition loading. Output signals include comparator results and measurement completed signals, for complete line automation.

Timing chart for EXT. I/O sequencing

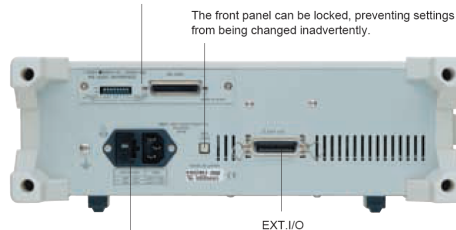
The following chart shows the timing sequence of the trigger (TRIG), analog measurement completion (INDEX), and end-of-measurement (EOM) signals from the EXT. I/O connector.



EXT. I/O signals

- **Outputs**
 - Internal DC power (+5 V output)
 - Comparator result
 - Analog measurement completion
 - End-of-measurement
- **Inputs**
 - External DC power supply (+5 V to +24 V can be supplied by external device)
 - External trigger signal
 - Key lock on/off function (3532-50 only)
 - Memory setting selection

Either a GP-IB or RS-232C interface can be fitted (options).



The AC power supply voltage is selectable: 100 V, 120 V, 220 V or 240 V AC. Rear view of 3532-50

3522-50 / 3532-50 specifications

	3522-50	3532-50
Measurement parameters	$ Z , Y , \theta, R_p$ (DCR), R_s (ESR, DCR), G, X, B, Cp, Cs, Lp, Ls, D (tan δ), Q	$ Z , Y , \theta, R_p, R_s$ (ESR), G, X, B, Cp, Cs, Lp, Ls, D (tan δ), Q
Measurement ranges $ Z , R, X$	10.00 m Ω to 200.00 M Ω (depending on measurement frequency and signal levels)	
θ	-180.00° to +180.00°	
C	0.3200 pF to 1.0000 F	0.3200 pF to 370.00 mF
L	16.000 nH to 750.00 kH	
D	0.00001 to 9.99999	
Q	0.01 to 999.99	
$ Y , G, B$	5.0000 nS to 99.999 S	
Basic accuracy	Z : $\pm 0.08\%$ rdg. θ : $\pm 0.05^\circ$	
Measurement frequency	DC, 1 mHz to 100 kHz	42 Hz to 5 MHz
Measurement signal levels	10 mV to 5 V rms / 10 μ A to 100 mA rms	
Output impedance	50 Ω	
Display screen	LCD with backlight / 99999 (full 5 digits)	
Measurement time (typical values for displaying $ Z $)	FAST : 5 ms, NORMAL : 16 ms, SLOW 1 / 2 : 88 ms / 828 ms	FAST : 5 ms, NORMAL : 21 ms, SLOW 1 / 2 : 72 ms / 140 ms
Settings in memory	Maximum 30 sets	
Comparator functions	HI/IN/LO settings for two measurement parameters; percentage, $\Delta\%$, or absolute value settings	
DC bias	External DC bias ± 40 V max. (option) (3522-50 used alone ± 10 V max. / using 9268 ± 40 V max.)	
External printer	9442 PRINTER (option)	
External interfaces	GP-IB or RS-232C (selectable options), external I/O for sequencer use	
Power source	100, 120, 220 or 240 V ($\pm 10\%$) AC (selectable), 50/60 Hz	
Maximum rated power	40 VA approx.	50 VA approx.

Measurement : All parameter ranges are determined by the $|Z|$ range. ranges 100 m Ω , 1 Ω , 10 Ω , 100 Ω , 1 k Ω , 10 k Ω , 100 k Ω , 1 M Ω , 10 M Ω , 100 M Ω

Measurement frequency :
 [3522-50] : DC, 1 mHz to 100 kHz ($\pm 0.005\%$)
 Up to 10 Hz (1 mHz steps); 10 Hz to 100 Hz (10 mHz); 100 Hz to 1 kHz (100 mHz); 1 kHz to 10 kHz (1 Hz); 10 kHz to 100 kHz (10 Hz)
 [3532-50] : 42 Hz to 5 MHz ($\pm 0.005\%$)
 Up to 1 kHz (0.1 Hz steps); 1 kHz to 10 kHz (1 Hz); 10 kHz to 100 kHz (10 Hz); 100 kHz to 1 MHz (100 Hz); 1 MHz to 5 MHz (1 kHz)

Measurement levels :
 [Voltage and constant voltage]
 10 mV to 5 V rms (DC to 1 MHz)
 50 mV to 1 V rms (1 MHz to 5 MHz)
 Maximum short-circuit current 100 mA rms
 1 mV steps

[Constant current]
 10 μ A to 100 mA rms (DC to 1 MHz)
 50 μ A to 20 mA rms (1 MHz to 5 MHz)
 Maximum voltage 5 V rms
 10 μ A rms steps

Dimensions and mass :
 3522-50 : 313W \times 125H \times 290D mm; 4.5 kg approx. (12.32"W \times 4.92"H \times 11.41"D ; 159 oz. approx.)
 3532-50 : 352W \times 124H \times 323D mm; 6.5 kg approx. (13.86"W \times 4.88"H \times 12.72"D ; 229.68 oz. approx.)

Conforming standards :
 EMC EN61326-1:1997+A1:1998
 EN61000-3-2:1995+A1:1998+A2:1998
 EN61000-3-3:1995
 Safety EN61010-1:1993+A2:1995
 Power supply: Pollution degree 2 Overvoltage Category II (anticipated transient overvoltage 2500 V)
 Test terminals: Pollution degree 2 Overvoltage Category I (anticipated transient overvoltage 330 V)

3522-50/3532-50 LCR HiTESTER

Measurement accuracy and ranges *

Conditions : temperature range 23 °C ±5 °C (73 °F ±9 °F), 80% rh or less (no condensation)

After a 60-minute warm-up period, and open-circuit and short-circuit corrections are made.

Using the 9262 TEST FIXTURE, and measurement signal levels 1 V to 5 V (3522-50), 0.501 V to 1.000 V (3532-50); measurement speed SLOW2.

* Measurement ranges and accuracy depend on the test fixture used, the measurement signal levels, and the measurement speed.

3522-50 Accuracy

Range	Impedance	DC	1m to 99.99Hz	100.0 to 999.9Hz	1.000 to 10.00kHz	10.01 to 100.0kHz
100MΩ	200MΩ	A=1 B=1	A=7 B=5	A=4.5 B=1	A=4.5 B=1	
	10MΩ		A=4 B=3	A=3 B=1.5	A=2.5 B=1.5	
10MΩ	10MΩ	A=0.5 B=0.3	A=2 B=0.5	A=0.7 B=0.4	A=0.7 B=0.4	A=1.5 B=0.5
	1MΩ		A=1 B=0.2	A=0.7 B=0.2	A=0.5 B=0.2	A=2 B=0.3
1MΩ	1MΩ	A=0.2 B=0.05	A=0.7 B=0.03	A=0.25 B=0.03	A=0.2 B=0.03	A=0.7 B=0.03
	100kΩ		A=0.35 B=0.02	A=0.15 B=0.02	A=0.1 B=0.02	A=0.5 B=0.1
100kΩ	100kΩ	A=0.1 B=0.01	A=0.4 B=0.01	A=0.2 B=0.002	A=0.15 B=0.002	A=0.35 B=0.01
	10kΩ		A=0.28 B=0.002	A=0.12 B=0.002	A=0.08 B=0.002	A=0.1 B=0.02
10kΩ	10kΩ	A=0.1 B=0.01	A=0.38 B=0.002	A=0.15 B=0.002	A=0.1 B=0.002	A=0.2 B=0.002
	1kΩ		A=0.25 B=0.001	A=0.1 B=0.001	A=0.05 B=0.001	A=0.08 B=0.002
1kΩ	1kΩ	A=0.1 B=0.01	A=0.36 B=0.001	A=0.12 B=0.001	A=0.08 B=0.001	A=0.15 B=0.001
	100Ω		A=0.25 B=0.001	A=0.1 B=0.001	A=0.05 B=0.001	A=0.08 B=0.002
100Ω	100Ω	A=0.1 B=0.02	A=0.36 B=0.01	A=0.15 B=0.01	A=0.15 B=0.01	A=0.15 B=0.02
	10Ω		A=0.25 B=0.005	A=0.1 B=0.005	A=0.05 B=0.005	A=0.08 B=0.01
10Ω	10Ω	A=0.2 B=0.05	A=0.5 B=0.04	A=0.25 B=0.02	A=0.25 B=0.01	A=0.35 B=0.02
	1Ω		A=0.35 B=0.02	A=0.2 B=0.01	A=0.15 B=0.01	A=0.2 B=0.02
1Ω	1Ω	A=0.3 B=0.3	A=1 B=0.6	A=0.5 B=0.3	A=0.35 B=0.2	A=0.7 B=0.3
	100mΩ		A=0.6 B=0.4	A=0.35 B=0.2	A=0.3 B=0.1	A=0.45 B=0.1
100mΩ	100mΩ	A=1 B=0.5	A=7 B=4	A=3.5 B=1.5	A=2.5 B=1.5	A=3.5 B=1.5
	10mΩ		A=5 B=2	A=2.5 B=1	A=1.5 B=1	A=2 B=1

Upper figure A .. basic accuracy for |Z| (± % rdg.)
 Lower figure A .. basic accuracy for θ (± deg.)
 B is coefficient for sample impedance

When DC resistance measurement,
 A is accuracy for R (± % rdg.)
 B is coefficient for sample resistance

The expression for calculating accuracy is different in the ranges above 1 kΩ and below 100 Ω.
 For details refer to the following expressions.

Range 1 kΩ and above...

$$\text{Accuracy} = A + \frac{B \times |10 \times Z_x - \text{range}|}{\text{Range}}$$

Range 100 Ω and below...

$$\text{Accuracy} = A + \frac{B \times |\text{range} - Z_x| \times 10}{\text{Range}}$$

Z_x is the measured Impedance of the sample (|Z|).

3532-50 Accuracy

Range	Impedance	42 to 99.99 Hz	100.0 Hz to 1.000 kHz	1.001 to 10.00 kHz	10.01 to 100.0 kHz	100.1 k to 1.000 MHz	1.001 to 5 MHz
100 MΩ	200 MΩ	A=4 B=4	A=2 B=2				
	10 MΩ	A=2.5 B=2	A=1 B=1.5				
10 MΩ	10 MΩ	A=0.8 B=0.4	A=0.4 B=0.2		A=1 B=0.5		
	1 MΩ	A=1 B=0.2	A=0.25 B=0.1		A=1 B=0.5		
1 MΩ	1 MΩ	A=0.4 B=0.05	A=0.15 B=0.05		A=0.3 B=0.08	A=3 B=1	
	100 kΩ	A=0.3 B=0.1	A=0.15 B=0.02		A=0.3 B=0.08	A=3 B=0.5	
100 kΩ	100 kΩ	A=0.35 B=0.01	A=0.08 B=0.01	A=0.15 B=0.01	A=0.25 B=0.04	A=0.4 B=0.3	* A=2 B=0.5
	10 kΩ	A=0.25 B=0.01	A=0.05 B=0.01	A=0.08 B=0.01	A=0.15 B=0.02	A=0.3 B=0.3	A=2 B=0.3
10 kΩ	10 kΩ	A=0.35 B=0.01	A=0.08 B=0.01		A=0.2 B=0.02	A=0.3 B=0.03	* A=1.5 B=0.2
	1 kΩ	A=0.25 B=0.005	A=0.05 B=0.005		A=0.08 B=0.02	A=0.15 B=0.02	A=1 B=0.2
100 Ω	100 Ω	A=0.35 B=0.02	A=0.08 B=0.02		A=0.2 B=0.02	A=0.3 B=0.03	* A=1.5 B=0.2
	10 Ω	A=0.25 B=0.01	A=0.05 B=0.01		A=0.08 B=0.02	A=0.15 B=0.02	A=1 B=0.2
10 Ω	10 Ω	A=0.4 B=0.04	A=0.2 B=0.03		A=0.2 B=0.03	A=0.4 B=0.1	* A=2 B=1
	1 Ω	A=0.3 B=0.1	A=0.1 B=0.02		A=0.15 B=0.02	A=0.3 B=0.05	A=2 B=0.5
1 Ω	1 Ω	A=0.7 B=0.4	A=0.4 B=0.3			A=1 B=1	
	100 mΩ	A=1 B=0.2	A=0.25 B=0.2			A=0.7 B=0.5	
100 mΩ	100 mΩ	A=4 B=4	A=3 B=2				*1.001 MHz and above accuracy × $\frac{(f/1\text{MHz}+3)}{4}$
	10 mΩ	A=2.5 B=2	A=2 B=1				

Method of determining accuracy

- The measurement accuracy can be calculated from the Impedance of the sample, the measurement range, the measurement frequency, and the basic accuracy A and coefficient B from the above tables.
- The expression for calculating accuracy is different in the ranges above 1 kΩ and below 100 Ω.
- For C and L, find the basic accuracy A and coefficient B either by direct measurement of the impedance or by approximate calculation as follows.

$$|Z| (\Omega) \cong \omega L (\text{H}) (\theta \cong 90^\circ)$$

$$\cong \frac{1}{\omega C (\text{F})} (\theta \cong -90^\circ)$$

$$\cong R (\Omega) (\theta \cong 0^\circ)$$

Example calculation (The value A and B for the 3522-50)

Sample Impedance Z_x: 500 Ω (measured)

Measurement conditions: frequency 10 kHz, signal level 2 V, range 1 kΩ

From table above, basic Z accuracy A = 0.08, coefficient B = 0.001.

Inserting these in the calculation expression yields:

$$Z \text{ accuracy} = 0.08 + \frac{0.001 \times |10 \times 5 \times 10^3 - 10^3|}{10^3} = 0.084 (\pm \% \text{rdg.})$$

Similarly for θ basic accuracy A = 0.05, coefficient B = 0.001, and thus:

$$\theta \text{ accuracy} = 0.05 + \frac{0.001 \times |10 \times 5 \times 10^3 - 10^3|}{10^3} = 0.054 (\pm \% \text{rdg.})$$

Bibliographie

- [19775] Hydrodynamic focusing method and apparatus, 1975. US Patent 3,871,770.
- [AAG⁺82] A. Aurengo, B. Auvert, F. Grémy, F. Leterrier, and T. PetitClerc. *Biophysique*. François Grémy, flammarion, medecine sciences, 1982.
- [AFR99] HE Ayliffe, AB Frazier, and RD Rabbitt. Electric impedance spectroscopy using microchannels with integrated metal electrodes. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 8(1) :50–57, 1999.
- [AI00] K. Asami and A. Irimajiri. Dielectrospectroscopic monitoring of early embryogenesis in single frog embryos. *Physics in Medicine and Biology*, 45(11) :3285–3298, 2000.
- [ASP⁺04] S. Arndt, J. Seebach, K. Psathaki, H.J. Galla, and J. Wegener. Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6) :583–594, 2004.
- [BHV⁺06] M. Brischwein, S. Herrmann, W. Vonau, F. Berthold, H. Grothe, E.R. Motrescu, and B. Wolf. Electric cell-substrate impedance sensing with screen printed electrode structures. *Lab on a Chip*, 6(6) :819–822, 2006.
- [BIS99] W. Baumgartner, L. Islas, and FJ Sigworth. Two-microelectrode voltage clamp of *Xenopus* oocytes : voltage errors and compensation for local current flow. *Biophysical journal*, 77(4) :1980–1991, 1999.
- [BO08] H. Berney and J.J. O’Riordan. Impedance measurement monitors blood coagulation. Technical report, Analog Dialogue 42-08, 2008.
- [Bor98] David A. Borkholder. *Cell based biosensors using microelectrodes*. PhD thesis, Standord University, 1998.

- [Bru35] D. A. G Bruggeman. Berechnung verschiedener physikalischer konstanten von heterogen substanzen. i. dielektrizitätskonstanten und leitfähigkeiten der mischorper aus isotropen substanzen. *Ann. der Phys*, 24 :636, 1935.
- [Bur81] E.C. Burdette. Electromagnetic and acoustic properties of tissues. *Physical Aspects of Hyperthermia*, 1981.
- [CC38] K.S. Cole and H.J. Curtis. Electric impedance of single marine eggs. *Journal of General Physiology*, 21(5) :591–599, 1938.
- [CC41] K. S Cole and R. H Cole. Dispersion and absorption in dielectrics, i. alternating current characteristics. *J. Chem Phys*, 9 :341, 1941.
- [CC42] K. S Cole and R. H Cole. Dispersion and absorption in dielectrics, ii. direct current characteristics. *J. Chem. Phys*, 10 :98, 1942.
- [CCD⁺05] B.W. Chang, C.H. Chen, S.J. Ding, D.C.H. Chen, and H.C. Chang. Impedimetric monitoring of cell attachment on interdigitated microelectrodes. *Sensors & Actuators : B. Chemical*, 105(2) :159–163, 2005.
- [CGR04] K. Cheung, S. Gawad, and P. Renaud. Microfluidic impedance spectroscopy flow cytometer : particle size calibration. In *Micro Electro Mechanical Systems, 2004. 17th IEEE International Conference on.(MEMS)*, pages 343–346, 2004.
- [CGR05] K. Cheung, S. Gawad, and P. Renaud. Impedance spectroscopy flow cytometry : on-chip label-free cell differentiation. *Cytometry Part A*, 65(2) :124–132, 2005.
- [Cha00] J.F. Chateaux. *Conception et réalisation d'une cellule de caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie de bioimpédance dans la gamme fréquentielle[100 Hz- 1 MHz]. Application aux tissus osseux- Prise en compte de l'anisotropie*. PhD thesis, UHP Nancy 1, 2000.
- [Col68] K. S Cole. *Membranes , Ions and Impulses*, chapter A Chapter of Classical Biophysics, pages 120–122. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 1968.

-
- [Deb29] Peter Debye. *Polar molecules*. The chemical catalog Company, New York,, 1929.
- [Dev06a] Sean Brennan. Analog Devices. Measuring a grounded impedance profile using the ad5933. Application note AN-847, 2006.
- [Dev06b] Sean Brennan. Analog Devices. Measuring a loudspeaker impedance profile using the ad5933. Application note AN-843, 2006.
- [Dev07] Analog Devices. Evaluation board for the 1 msp/s 12-bit impedance converter network analyser. Technical report, 2007.
- [Dev08] Analog Devices. 1msps, 12-bit impedance converter, network analyser ad5933. Technical report, 2008.
- [DTL05] G. Dhatt, G. Touzot, and E. Lefrançois. *Méthodes des éléments finis - Une présentation*. Hermes Science Publications, 2005.
- [Duc90] F. A Duck. *Physical Properties of Tissue*. Academic Press, London, 1990.
- [Duk71] S. S Dukhin. Dielectric properties of disperse systems. *Surface Colloids Science*, 3 :83, 1971.
- [EBB⁺97] R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, K. Stegbauer, and B. Wolf. Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosensors and Bioelectronics*, 12(1) :29–41, 1997.
- [EBB⁺98] R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, and B. Wolf. On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 36(3) :365–370, 1998.
- [EC73] C. W Einolf and E. L Cartensen. Passive electrical properties of microorganisms, v. low frequency dielectric dispersion in bacteria. *Biophys. J*, 13 :8, 1973.
- [FFLP⁺03] M. Frenea, SP Faure, B. Le Pioufle, P. Coquet, and H. Fujita. Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis. *Materials Science & Engineering C*, 23(5) :597–603, 2003.

- [FHA⁺00] C.K. Fuller, J. Hamilton, H. Ackler, P. Krulevitch, B. Boser, A. Eldredge, F. Becker, J. Yang, and P. Gascoyne. Microfabricated multi-frequency particle impedance characterization system. In *Micro Total Analysis Systems 2000 : Proceedings of the [Mu] Tas 2000 Symposium, Held in Enschede, the Netherlands, 14-18 May 2000*, page 265. Kluwer Academic Publishers, 2000.
- [FM26] H. Fricke and S. Morse. The electric capacity of tumors of the breast. *J Cancer Res*, 16 :310–376, 1926.
- [Fos02] Kenneth R. Foster. Herman p. schwan : A scientist and pioneer in biomedical engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4 :1–27, 2002.
- [Frö49] H. Frölich. *Theory of dielectrics*. Oxford University Press, 1949.
- [FRF⁺06] A.B. Fuchs, A. Romani, D. Freida, G. Medoro, M. Abonnenc, L. Altomare, I. Chartier, D. Guergour, C. Villiers, P.N. Marche, et al. Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples. *Lab on a Chip*, 6(1) :121–126, 2006.
- [Fri24] H. Fricke. A mathematical treatment of the electrical conductivity and capacity of disperse systems. i. the electrical conductivity of a suspension of homogeneous spheroids. *Phys. Rev.*, 24 :575, 1924.
- [Fri25] H. Fricke. A mathematical treatment of the electrical conductivity and capacity of disperse systems. ii. the capacity of conducting spheroids surrounded by a non conducting membrane for a current of low frequency. *Phys. Rev*, 26 :678, 1925.
- [Fri53] H. Fricke. The Maxwell-Wagner dispersion in a suspension of ellipsoids. *The Journal of Physical Chemistry*, 57(9) :934–937, 1953.
- [Fri55] H. Fricke. The complex conductivity of a suspension os stratified particles of spherical cylindrical form. *J. Phys. Chem*, 59 :168, 1955.
- [FS89] K. R Foster and H. P Schwan. Dielectric properties of tissues and biological

-
- materials, a critical review. *Critical reviews in biomedical engineering*, pages 25–104, 1989.
- [FS96] K.R. Foster and H.P. Schwan. Dielectric properties of tissues. *Handbook of biological effects of electromagnetic fields*, pages 25–102, 1996.
- [FSSF98] S. Fiedler, S.G. Shirley, T. Schnelle, and G. Fuhr. Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem. *Anal. Chem*, 70(9) :1909–1915, 1998.
- [Gab96] C. Gabriel. Compilation of the Dielectric Properties of Body Tissues at RF and Microwave Frequencies. 1996. Final technical rept. 15 Sep 93-14 Dec 94.
- [GGC96] C. Gabriel, S. Gabriel, and E. Corthout. The dielectric properties of biological tissues : I. Literature survey. *Physics in medicine and biology*, 41(11) :2231–2250, 1996.
- [GK91] I. Giaever and CR Keese. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(17) :7896–7900, 1991.
- [GLG96a] S. Gabriel, RW Lau, and C. Gabriel. The dielectric properties of biological tissues : II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. *Physics in medicine and biology*, 41(11) :2251–2270, 1996.
- [GLG96b] S. Gabriel, RW Lau, and C. Gabriel. The dielectric properties of biological tissues : III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues. *Physics in medicine and biology*, 41(11) :2271–2294, 1996.
- [GLK⁺07] F. Greve, J. Lichtenberg, KU Kirstein, U. Frey, JC Perriard, and A. Hierlemann. A perforated CMOS microchip for immobilization and activity monitoring of electrogenic cells. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(3) :462–471, 2007.
- [GM00] S. Grimnes and OG Martinsen. *Bioimpedance & Bioelectricity basics*. Academic press, 2000.
- [GSR01] S. Gawad, L. Schild, and P. Renaud. Micromachined impedance spectro-

- scopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. *Lab on a Chip*, 1(1) :76–82, 2001.
- [GV02] P.R.C. Gascoyne and J. Vykoukal. Particle separation by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 23(13), 2002.
- [Han60] T. Hanai. Theory of the dielectric dispersion due to interfacial polarization and its application to emulsion. *Kolloid-Z*, 171 :23–31, 1960.
- [HS68] T. Hanai and P. Sherman. Electrical properties of emulsions. *Emulsion Science : Philip Sherman*, page 353, 1968.
- [IHI79] A. Imajiri, T. Hanai, and A. Inouye. A dielectric theory of "multi-stratified shell" model with its application to a lymphoma cell. *J. Theor. Biol*, 78 :251, 1979.
- [JA77] Jonscher and A.K. The 'universal' dielectric reponse. *Nature*, 267 :673–679, 1977.
- [Jas01] Frédéric Jaspard. *Caractérisation diélectrique du sang par spectroscopie de bio-impédance dans la bande [1MHz-1GHz]*. PhD thesis, UHP Nancy 1, 2001.
- [JN02] F. Jaspard and M. Nadi. Dielectric properties of blood : an investigation of temperature dependence. *Physiological measurement*, 23(3) :547–554, 2002.
- [KAB⁺02] P. Krulevitch, H.D. Ackler, F. Becker, B.E. Boser, A.B. Eldredge, C.K. Fuller, P.R.C. Gascoyne, J.K. Hamilton, S.P. Swierkowski, X.B. Wang, et al. Microfabricated AC impedance sensor, August 20 2002. US Patent 6,437,551.
- [KEB99] M. Koch, AGR Evans, and A. Brunnschweiler. Design and fabrication of a micromachined Coulter counter. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 9 :159–161, 1999.
- [LBB97] UD Larsen, G. Blankenstein, and J. Branebjerg. Microchip Coulter particle counter. In *International Conference on Solid State Sensors and Actuators, 1997. TRANSDUCERS'97 Chicago.*, volume 2, 1997.

-
- [LHK⁺01] G.B. Lee, C.I. Hung, B.J. Ke, G.R. Huang, B.H. Hwei, and H.F. Lai. Hydrodynamic focusing for a micromachined flow cytometer. *Transactions-American Society OF Mechanical Engineers, Journal of Fluids Engineering*, 123(3) :672–679, 2001.
- [LNVG⁺00] W. Laureyn, D. Nelis, P. Van Gerwen, K. Baert, L. Hermans, R. Magnee, J.J. Pireaux, and G. Maes. Nanoscaled interdigitated titanium electrodes for impedimetric biosensing. *Sensors & Actuators : B. Chemical*, 68(1-3) :360–370, 2000.
- [Man77] M. Mandel. Dielectric properties of charged linear macromolecules with particular reference to dna. *Ann. N. Y Acad. Sci.*, 303 :74, 1977.
- [Max73] J.C Maxwell. *Treatise on Electricity and Magnetism*. Oxford University Press, London, 1873.
- [MB99] A. Manz and H. Becker. *Microsystem technology in chemistry and life sciences*. Springer Verlag, 1999.
- [MD99] Gerard H. Markx and Christopher L. Davey. The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies : Applications in biotechnology. *Enzyme and microbial technology*, 25 :161–171, 1999.
- [MDK91] GH Markx, CL Davey, and DB Kell. Dielectric permittivity and the brugge-man probe : novel techniques for the online dtermination of biomass concentration in plant cell cultures. *J Biotechnol*, 19 :145–158, 1991.
- [MGS02] OG Martinsen, S. Grimnes, and HP Schwan. Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, pages 2643–52, 2002.
- [MHG99] H. Morgan, M.P. Hughes, and N.G. Green. Separation of submicron bioparticles by dielectrophoresis. *Biophysical Journal*, 77(1) :516–525, 1999.
- [MJ91] ET McAdams, , and J. Jossinet. Electrode-electrolyte interface impedance and polarisation. *Innov. Tech. Biol. Med*, 12, 1991.
- [MJ95] ET McAdams and J. Jossinet. Tissue impedance : a historical overview. *Physiological measurement*, 16(3) :1, 1995.

- [MJ96] E.T McAdams and J. Jossinet. Problems in equivalent circuit modelling of the electrical properties of biological tissues. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40 :147–152, 1996.
- [MJL95] E.T McAdams, J. Jossinet, and A. Lacknermeier. Modelling the 'constant phase angle' behaviour of biological tissues : potential pitfalls. *Innov. Tech. Biol. Med*, 16(6) :662–670, 1995.
- [MLM⁺95] ET McAdams, A. Lacknermeier, JA McLaughlin, D. Macken, and J. Jossinet. The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(1-2) :67–74, 1995.
- [MML⁺03] G. Medoro, N. Manaresi, A. Leonardi, L. Altomare, M. Tartagni, R. Guerrieri, S. Biosystems, and I. Bologna. A lab-on-a-chip for cell detection and manipulation. *IEEE Sensors Journal*, 3(3) :317–325, 2003.
- [MMM91] JR Magné. and RM Magné-Marty. *Biophysique , Physico-chimie / Physique*. Edition Marketing, 1991.
- [MMT⁺02] N. Manaresi, G. Medoro, M. Tartagni, L. Altomare, R. Guerrieri, S. Biosystems, and I. Bologna. Microelectronics meets biology : Challenges and opportunities for functional integration in lab-on-a-chip. In *Solid-State Circuits Conference, 2002. ESSCIRC 2002. Proceedings of the 28th European*, pages 37–42, 2002.
- [MMTG00] G. Medoro, N. Manaresi, M. Tartagni, and R. Guerrieri. CMOS-only sensors and manipulators for microorganisms. In *Electron Devices Meeting, 2000. IEDM Technical Digest. International*, pages 415–418, 2000.
- [MNR08] C. Margo, M. Nadi, and A. Rouane. Caractérisation d'une cellule ovocyte par spectroscopie de bio-impédance dans la bande 50 hz - 5 mhz. *Instrumentation, Mesure, Métrologie*, 8/1-4 :93–112, 2008.
- [MPH06] Damian Miklavcic, Natasa Pavselj, and Francis X Hart. Electric properties of tissues. *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 2006.
- [MPK⁺06] C. Margo, J. Prado, M. Kouider, A. Rouane, and M. Nadi. Bioimpedance spectroscopy for cell characterization in the 50Hz-5MHz frequency range.

-
- Research in Microelectronics and Electronics 2006, Ph. D.*, pages 441–444, 2006.
- [MPKN06] C. Margo, J. Prado, M. Kouider, and M. Nadi. La micro bio-impédancemétrie comme outil diagnostic à l'échelle cellulaire. In *JNRDM, 9èmes Journées Nationales du Réseau Doctoral en Microélectronique*, 2006.
- [MSRY⁺04] A.V. Mamishev, K. Sundara-Rajan, F. Yang, Y. Du, and M. Zahn. Interdigital sensors and transducers. *Proceedings of the IEEE*, 92(5) :808–845, 2004.
- [MW05] M.H. McCoy and E. Wang. Use of electric cell-substrate impedance sensing as a tool for quantifying cytopathic effect in influenza A virus infected MDCK cells in real-time. *Journal of virological methods*, 130(1-2) :157–161, 2005.
- [Nad08] M. Nadi. *Sensors, Lecture Notes in Electrical Engineering*, volume 21, chapter Dielectric Characterization of Biological Tissues : Constraints Related to Ex Vivo Measurements, pages 75–90. Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [OS06] K. Okada and T. Sekino. Impedance Measurement Handbook. *Agilent Technologies*, 2006.
- [Pat03] Tabeling Patrick. *Introduction à la microfluidique (Collection Échelles)*. ISBN 2-7011-3500-1. Belin, 2003.
- [PCF90] J. Ph. Pérez, R. Carles, and R. Fleckinger. *Electromagnétisme, Vide et milieux matériels*. Masson, 1990.
- [Pet79] R Pethig. *Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials*. John Wiley & Sons, 1979.
- [Pet84] Ronald Pethig. Dielectric properties of biological materials : biophysical and medical applications. *IEEE Transactions on Electrical Insulation*, EI-19 No.5 :453–472, 1984.
- [Pet96] R. Pethig. Dielectrophoresis : using inhomogeneous AC electrical fields to separate and manipulate cells. *Critical reviews in biotechnology*, 16(4) :331–348, 1996.

- [PK87] R Pethig and D. B Kell. The passives electrical properties of biological systems : their significance in physiology, biophysics, and biotechnology. *Phys. Med. Biol*, 32 :933, 1987.
- [PM97] R. Pethig and G.H. Markx. Applications of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends in biotechnology*, 15(10) :426–432, 1997.
- [PNMR07] J. Prado, M. Nadi, C. Margo, and A. Rouane. Bioimpedance spectroscopy of human blood at low frequency using coplanar microelectrodes. *IFMBE PROCEEDINGS*, 16(1) :186–189, 2007.
- [Poh78] H.A. Pohl. *Dielectrophoresis : the behavior of neutral matter in nonuniform electric fields*. Cambridge University Press Cambridge, 1978.
- [PS59] H. Pauly and H.P Schwan. Über die impedanz einer suspension von kugelformigen teilchen mit einer schale. *Z. Naturfosh*, 14B :125–131, 1959.
- [RMC96] Bernard Rigaud, Jean-Pierre Morucci, and Nicolas Chauveau. *Bioelectrical Impedance techniques in Medicine, Part1 : Bioimpedance measurements, Second section : Impedance spectrometry*, volume 24/ Issues 4-6. 1996.
- [RMTR02] A. Reininger-Mack, H. Thielecke, and A.A. Robitzki. 3D-biohybrid systems : applications in drug screening. *TRENDS in Biotechnology*, 20(2) :56–61, 2002.
- [RSNI03] A.S. Ross, GJ Saulnier, JC Newell, and D. Isaacson. Current source design for electrical impedance tomography. *Physiological Measurement*, 24(2) :509–516, 2003.
- [RTCFG⁺08] R. Rodriguez-Trujillo, O. Castillo-Fernandez, M. Garrido, M. Arundell, A. Valencia, and G. Gomila. High-speed particle detection in a micro-Coulter counter with two-dimensional adjustable aperture. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(2) :290–296, 2008.
- [RTMSG07] R. Rodriguez-Trujillo, C.A. Mills, J. Samitier, and G. Gomila. Low cost micro-Coulter counter with hydrodynamic focusing. *Microfluidics and Nanofluidics*, 3(2) :171–176, 2007.

-
- [Sal02] MIR Salvador. Conception des microsystèmes sur silicium. *Paris : Hermès Sciences, Lavoisier*, 2002.
- [Sch57] Herman P. Schwan. *Electrical properties of tissue and cell suspensions*, volume 5, pages 147–209. Academic Press Inc, New York,, 1957.
- [Sch62] G. Schwarz. A theory for the low frequency dielectric dispersion of colloidal particles in electrolyte solution. *J. Phys. Chem*, 66 :2636, 1962.
- [Sch63] H.P. Schwan. Determination of biological impedances. *Physical techniques in biological research*, 6(part B) :323–406, 1963.
- [Sch85] HP Schwan. Dielectric properties of cells and tissues. *Interactions between Electromagnetic Fields and Cells*. C. Chiabrera, C. Nicolini, and HP Schwan, editors. Pergamon Press, New York and London, pages 75–97, 1985.
- [Sch94] HP 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, Baltimore, MD, USA*, 1994.
- [Scw63] Herman P. Scwhan. *Determination of biological impedances*, volume 6, chapter 6, pages 323–407. Academic Press, New York and London,, 1963.
- [SFSB08] F. Seoane, J. Ferreira, J.J. Sanchez, and R. Bragós. An analog front-end enables electrical impedance spectroscopy system on-chip for biomedical applications. *Physiological Measurement*, 29(6) :267, 2008.
- [SM62] H. P Schwan and H. J Morowitz. Electrical properties of the membranes of the pleuro-pneumonia-like organism a5969. *Biophys. J*, 2 :295, 1962.
- [SSF⁺00] LL Sohn, OA Saleh, GR Facer, AJ Beavis, RS Allan, and DA Notterman. Capacitance cytometry : Measuring biological cells one by one. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20) :10687–10690, 2000.
- [Stu79] M Stuchly. Interaction of radiofrequency and microwave radiation with living systems. *Radiat. Environ. Biophys.*, 16 :1, 1979.

- [Thi03] H. Thielecke. Capillary chip based characterisation of small tissue samples. *Medical device technology*, 14(9) :18, 2003.
- [TMR01] H. Thielecke, A. Mack, and A. Robitzki. A multicellular spheroid-based sensor for anti-cancer therapeutics. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(4-5) :261–269, 2001.
- [TPS08] E. Tisserand, J. Pautex, and P. Schweitzer. *Analyse et traitement des signaux : méthodes et applications au son et à l'image : cours et exercices corrigés (2eme édition)*. Lavoisier, 2008.
- [TSB⁺99] H. Thielecke, T. Stieglitz, H. Beutel, T. Matthies, HH Ruf, and J.U. Meyer. Fast and precise positioning of single cells on planar electrode substrates. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 18(6) :48–52, 1999.
- [Wag14] K.W Wagner. Explanation of the dielectric fatigue phenomenon on the basis of maxwell’s concept. *Archiv Elektrotechnik*, 2 :371, 1914.
- [WKG00] J. Wegener, C.R. Keese, and I. Giaever. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Experimental Cell Research*, 259(1) :158–166, 2000.
- [WN05] Z. Wu and N.T. Nguyen. Hydrodynamic focusing in microchannels under consideration of diffusive dispersion : theories and experiments. *Sensors & Actuators : B. Chemical*, 107(2) :965–974, 2005.
- [XLSL98] C. Xiao, B. Lachance, G. Sunahara, and J.H.T. Luong. Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing : concentration and time response function approach. *Mol. Toxicol*, 11(2) :183–192, 1998.
- [ZBL⁺04] B. Ziaie, A. Baldi, M. Lei, Y. Gu, and R.A. Siegel. Hard and soft micromachining for BioMEMS : review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 56(2) :145–172, 2004.
- [Zim06] W.B.J. Zimmerman. *Multiphysics Modeling With Finite Element Methods*

(Series on Stability, Vibration and Control of Systems, Serie). World Scientific Publishing Co., Inc. River Edge, NJ, USA, 2006.

Résumé

Ce travail de thèse traite de la caractérisation par spectroscopie d'impédance d'échantillons biologiques de faibles dimensions. Après un état de l'art des moyens de détermination des paramètres caractéristiques de cellules ou agrégats de cellules isolées, nous décrivons une instrumentation destinée à la mesure d'impédance d'une cellule biologique en basses fréquences. Une chaîne de mesure permettant la caractérisation par spectroscopie d'impédance d'un ovocyte de Xénope isolée dans la gamme 50 Hz - 5 MHz est présentée. Celle-ci est basée sur l'utilisation d'un impédancemètre et d'un dispositif de mesure utilisant deux électrodes en or coplanaires. La caractérisation du dispositif de mesure est complétée par une modélisation électrique par la méthode des éléments finis de la zone sensible de mesure. Une deuxième approche est ensuite proposée pour la caractérisation de faibles volumes de fluides biologiques. Celle-ci repose sur l'utilisation d'une matrice d'électrodes composée de 4 microbandes de platine coplanaires et d'un système électronique de conditionnement opérant entre 1 kHz et 100 kHz développé à cet effet. La configuration à 4 électrodes utilisée permet de s'affranchir des problèmes de polarisation aux interfaces métal-milieu. La zone de mesure est également modélisée par voie numérique (méthode des éléments finis) en vue d'établir notamment le facteur de cellule. Après validation de la chaîne de mesure, des résultats de caractérisation expérimentale d'échantillons de 50 μl de sang humain sont présentés et discutés.

Mots-clés: Bioimpédance, microélectrodes, ingénierie biomédicale, méthode V/I tétrapolaire, instrumentation électronique, biocapteur

Abstract

We present a low frequency approach to characterize small biological samples by using bioimpedance spectroscopy. The state of the art of existing approaches and technologies for the determination of electrical parameters of single cell or aggregate of cells is developed in the two first chapters. An electronic instrumentation allowing to characterize an isolated Xenopus ovocyte cell in the frequency range 50 Hz - 5MHz is presented in the third chapter. This consists of an impedancemeter and a biosensor based on two coplanar gold measurement electrodes. The theoretical validation of the chip uses an electrical modeling of the sensing area by finite elements method. A second approach is then proposed in the fourth chapter for the characterization of small biological fluidic samples. It uses a set of 4 coplanar platinum microband electrodes combined with an electronic conditioning circuit designed to operate in the 1 KHz - 100 kHz frequency range. As it is well known, the use of a tetrapolar configuration for the electrodes system prevents the influence of the polarization impedance at the metal-medium interfaces. The sensing area is also numerically modeled by finite elements method allowing to calculate the cell factor. This parameter was compared with its values deduced experimentally. The microspectrometer designed was thus experimentally validated. Both calibrations and results for the characterization of 50 μl human blood samples are presented and discussed.

Keywords: Bioimpedance, microelectrodes, biomedical engineering, tetrapolar, electronic instrumentation, biosensor