



HAL
open science

Spectroscopie d'impédance électrique par biocapteur à micro-électrodes : application à la cytométrie de flux de cellules sanguines

Julien Claudel

► **To cite this version:**

Julien Claudel. Spectroscopie d'impédance électrique par biocapteur à micro-électrodes : application à la cytométrie de flux de cellules sanguines. Autre. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0169 . tel-01750347

HAL Id: tel-01750347

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750347>

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>

THÈSE

Pour l'obtention du titre de :

DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Spécialité: *Systemes électroniques*

Présentée par :

JULIEN CLAUDEL

Spectroscopie d'impédance électrique par bio- capteur à micro-électrodes : application à la cytométrie de flux de cellules sanguines

Soutenue le 9 décembre 2013 à Vandœuvre devant le jury composé de :

Sylvie Renaud	Professeur, Institut Polytechnique de Bordeaux	Rapporteur
Patrick Garda	Professeur, Université Pierre et Marie Curie- Paris 6	Rapporteur
Philippe Benech	Professeur, Institut Polytechnique de Grenoble	Examineur
Djilali Kourtiche	Professeur, Université de Lorraine	Examineur
Omar El Mazria	Professeur, Université de Lorraine	Co-directeur de thèse
Mustapha Nadi	Professeur, Université de Lorraine	Directeur de thèse

*Université de Lorraine –CNRS-
Institut Jean Lamour (UMR 7198) ; Faculté des Sciences et Technologies*

Université de Lorraine – Pôle M4 : matière, matériaux, métallurgie, mécanique

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Sylvie RENAUD, professeur à l'Institut Polytechnique de Bordeaux et à Monsieur Patrick GARDA, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, qui ont bien voulu juger cette thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie également Monsieur Philippe BENECH, Professeur à l'Institut Polytechnique de Grenoble, pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury de soutenance.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Monsieur Djilali KOURTICHE, Professeur à l'Université de Lorraine, qui a suivi avec attention mon travail de thèse, m'a conseillé durant son déroulement et a accepté de l'examiner comme membre du jury.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Omar ELMAZRIA, Professeur à l'Université de Lorraine, qui a co-dirigé ce travail. Je tiens à le remercier pour ces conseils avisés, son appui et sa disponibilité tout au long de ce travail.

Je tiens surtout à manifester ma reconnaissance à Monsieur Mustapha NADI, Professeur à l'Université de Lorraine, qui a dirigé ces travaux de thèse, et qui m'a aiguillé durant leurs réalisations. Ces recommandations et critiques constructives m'ont permis de mener à bien ce projet de recherche.

Je remercie vivement mes collègues du centre de compétence MiNaLor, et en particulier Madame Gwladys LENGAIGNE, ingénieur d'étude, et Monsieur Laurent BOUVOT, ingénieur d'étude, qui ont pu me prodiguer des formations et conseils de qualité, sans lesquels je n'aurais pu accomplir ce travail.

J'exprime toute ma sympathie à mes collègues pour leur aide, leurs conseils et le soutien qu'ils ont pu m'apporter durant mes travaux, et en particulier Monsieur Patrice ROTH, Assistant ingénieur, pour ces conseils techniques et ses réalisations et Monsieur Hamidreza SHIRZADFAR, doctorant, pour son amitié et sa sympathie. J'ai eu la chance de pouvoir travailler avec eux dans une ambiance conviviale et chaleureuse tout au long de ces dernières années.

Il me reste à remercier mes proches, amis et famille, qui m'ont soutenu et ont porté un grand intérêt concernant mes travaux, principalement avec leurs « Alors, tu trouves ? » et « A quoi ça sert ? ». Je leur dédie ce manuscrit avec une attention toute particulière à mes parents sans qui je ne serais sûrement pas arrivé jusqu'ici aujourd'hui.

Sommaire

Sommaire

Sommaire

Remerciements	ii
Sommaire	iv
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xix
Introduction Générale.....	1
CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance	8
1.1 Introduction.	10
1.2 Notion de conductivité électrolytique.....	11
1.2.1 Notion d'électrolyte.....	11
1.2.2 Définition de la conductivité ionique.	11
1.2.3 Cas de l'eau pure.	13
1.2.4 Effets de l'environnement sur la conductivité.....	14
1.3 Notions de propriétés diélectriques.	15
1.3.1 Moment dipolaire moléculaire.	15
1.3.2 Polarisation d'un matériau.	16
1.3.3 Effet mesurable à l'échelle macroscopique.....	19
1.4 Impédance électrique d'un échantillon biologique.....	20
1.4.1 Définition générale et impédance d'un milieu.	20
1.4.2 Effets d'interfaces.	23
1.4.3 Impédance générale d'un échantillon biologique.....	26
1.5 Cas particulier du sang	32
1.5.1 Composition	32
1.5.2 Diagnostics possibles	33
1.6 Conclusion	36
CHAPITRE 2 : La mesure d'impédance d'échantillons biologiques : Etat de l'art	39
2.1 Introduction.	41
2.2 Mesures d'échantillons macroscopiques et modèles associés.	42

Sommaire

2.2.1	Premières mesures d'échantillons biologiques.	42
2.2.2	Approximation de Maxwell et modèles associés.	44
2.2.3	Avancées et applications actuelles.	46
2.3	Mesures d'échantillons par micro-électrodes.	50
2.3.1	Capteurs à électrodes interdigitées.	50
2.3.2	Capteurs à matrices d'électrodes.	52
2.3.3	Mesures de cellules unitaires.	53
2.4	Aspects microfluidiques.	55
2.4.1	Caractéristiques des écoulements microfluidiques.	55
2.4.2	Applications pour la manipulation de cellules et particules.	58
2.5	Mesures unitaires de cellules.	62
2.5.1	Principe de base.	62
2.5.2	Principes de Mesures d'impédance en cytométrie de flux.	64
2.5.3	Mesure et caractérisation par cytométrie de flux.	65
2.6	Les capteurs SAW et leurs applications en microfluidique.	69
2.6.1	Principe et structures.	69
2.6.2	Utilisation comme actionneur.	70
2.6.3	Applications pour le déplacement de cellules.	71
2.7	Conclusion.	74
	CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée.	77
3.1	Introduction.	79
3.2	Choix des structures d'électrodes.	80
3.3	Choix d'un modèle pour une cellules biologique isolée.	81
3.3.1	Généralités sur le choix d'un modèle.	81
3.3.2	Choix du modèle de base.	81
3.3.3	Modifications apportées au modèle.	83

Sommaire

3.4	Simulation par la méthode des éléments finis.	85
3.4.1	Définition.	85
3.4.2	Définition des modèles et paramètres.	85
3.4.3	Définition des variables de simulation.	87
3.4.4	Détermination du facteur de forme.	88
3.4.5	Influence de la taille de la cellule.	89
3.4.6	Influence de la capacité membranaire.	91
3.4.7	Influence du milieu intracellulaire (cytoplasme).	94
3.4.8	Réponse temporelle lors du passage de cellules.	95
3.4.9	Passage simultané de plusieurs cellules.	97
3.4.10	Réponse en fréquence.	101
3.5	Comparaison du modèle électrique et des simulations.	102
3.5.1	Application du modèle sur les géométries d'électrodes.	102
3.5.2	Calcul des impédances fixes.	104
3.5.3	Comparaison des modèles.	104
3.6	Conclusion.	111
	CHAPITRE 4 : Conception et réalisation du biocapteur.	113
4.1	Introduction.	115
4.2	Conception du capteur.	116
4.2.1	Cahier des charges succinct.	116
4.2.2	Structuration des couches.	116
4.2.3	Réalisation des masques.	118
4.3	Fabrication des capteurs.	120
4.3.1	Choix des matériaux.	120
4.3.2	Nettoyage des échantillons.	122
4.3.3	Réalisation des électrodes (couche 1) :	123
4.3.4	Réalisation du canal en résine SU_8 (couche 2).	128

Sommaire

4.3.5	Réalisation et collage du capot en PDMS (couche 3).	131
4.3.6	Réalisation du canal par moulage (méthode alternative couche 2).	135
4.4	Tests d'écoulements.	137
4.4.1	Conditions de tests	137
4.4.2	Tests d'écoulement par aspiration.	137
4.4.3	Tests d'écoulement par surpression.	140
4.4.4	Tests de bouchage/débouchage du canal.	142
4.5	Conclusion.	144
	Chapitre 5 : Mesures par spectroscopie d'impédance sur particules en cytométrie de flux	147
5.1	Introduction.	149
5.2	Réalisation de la chaîne de mesure.	150
5.2.1	Contraintes à respecter.	150
5.2.2	Choix d'un appareil de mesure.	150
5.2.3	Choix des équipements annexes.	153
5.2.4	Interfaçage et mise en place de la chaîne de mesure.	154
5.2.5	Choix du type de mesure d'impédance.	156
5.3	Mesures à vide et calibrations.	157
5.3.1	Généralités.	157
5.3.2	Mesure à vide.	158
5.3.3	Mesures de calibrations avec solutions tampons.	158
5.4	Mesures sur particules en régime dynamique.	161
5.4.1	Choix et préparation des échantillons.	161
5.4.2	Choix et réglages des signaux de mesures.	162
5.4.3	Mesure et traitement des signaux.	163
5.4.4	Mesures de calibration par microbilles.	168
5.4.5	Mesures de cellules et particules.	170

Sommaire

5.4.6 Tests de reproductibilité et vitesse admissible	172
5.5 Conclusion.....	175
Conclusion Générale	177
Bibliographie.....	181
Liste des Publications et Communications	187
ANNEXE 1: Conductivités des solutions salines calibrées	188
ANNEXE 2: Technologies de micro-nano-fabrications	189
ANNEXE 3 : Equations trigonométriques du principe de mesure « Lock-in ».....	198
ANNEXE 4 : Informations complémentaires du HF2IS.....	200
ANNEXE 5 : Caractéristiques techniques du HF2TA.....	205

Liste des figures

Figure 0-1 Schéma synoptique représentant le biocapteur réalisé et de sa chaîne de mesure dédiée.	4
Figure 1-1 Variation de la conductivité en fonction de la température pour 4 solutions étalons du commerce (données fournisseur).	14
Figure 1-2 Représentation schématique des types de polarisations pouvant intervenir lors de l'application d'un champ électrique : a) polarisation électronique, b) polarisation ionique, c) polarisation dipolaire d'orientation, d) polarisation de charge d'espace.	19
Figure 1-3 Schéma d'un échantillon diélectrique entre deux électrodes planes.	22
Figure 1-4 Représentation de la double couche présente à l'interface électrode/liquide lors de la polarisation.	24
Figure 1-5 Modèle électrique de l'impédance de double couche.	25
Figure 1-6 Représentation schématique simplifiée d'une bicouche lipidique.	28
Figure 1-7 Représentation du circuit équivalent de Fricke pour des cellules en suspension, avec R_i la résistance résultante de la conductivité du milieu intérieur, R_e celle du milieu extérieur et C_m la capacité résultant de la capacité surfacique de la membrane.	29
Figure 1-8 Spectres de la permittivité et de la conductivité d'un échantillon biologique avec les zones de dispersion	30
Figure 1-9 Spectres diélectriques caractéristiques du muscle, du sang et d'un liquide organique [21].	31
Figure 1-10 Organigramme synthétique des différents composants du sang.....	33
Figure 2-1 Différents modèles représentant les effets des composants des cellules en suspension, ainsi que les modèles associés. D'après Fricke [23].....	43
Figure 2-2 Schéma et photographie de la cellule de mesure utilisé pour la caractérisation de tissus du sein présentant des tumeurs. D'après Fricke [24].	44
Figure 2-3 Représentation schématique de sphéroïdes en suspension et du milieu homogène équivalent obtenu avec l'approximation de Maxwell.	45
Figure 2-4 Représentation schématique de deux sphères concentriques de propriétés électriques et diélectriques différentes, et de la sphère homogène équivalente obtenue avec l'approximation de Maxwell.	46
Figure 2-5 Placement des électrodes sur le corps humain pour la mesure de la variation du volume intracellulaire et extracellulaire lors de l'hémodialyse. D'après les travaux de Fenech[34].....	48

Liste des figures

Figure 2-6 Modification du modèle électrique cellulaire au cours de la division cellulaire. D'après Asami [38].	48
Figure 2-7 Variation de l'impédance de cellules endothéliales déposées sur de électrodes d'or, au cours de leur apoptose. D'après les travaux de Arndt [39].	49
Figure 2-8 Vue schématique d'un capteur à électrodes interdigitées; avec L la longueur des digits, W leurs largeur, G leur écartement et λ la périodicité.	51
Figure 2-9 Répartition du champ électrique lors d'une mesure avec des électrodes interdigitées, vue de coupe. D'après [49].	51
Figure 2-10 Image au microscope électronique de bactérie esch avec nanoparticules magnétique présente à la surface d'une structure interdigitée. D'après Madhukar Varshney [52].	52
Figure 2-11 matrice de micro-electrodes en platine (10x10). D'après Qingjun Liu [57].	53
Figure 2-12 Schéma et agrandissement par microscopie optique d'électrodes circulaires pour la mesure unitaire de cellules. D'après Lamya Ghenim [58].	54
Figure 2-13 Représentation schématique d'un capteur à micro-trou pour la mesure de cellules unitaire en vue de coupe. D'après Hagen Thielecke [60].	55
Figure 2-14 Schéma représentant un écoulement laminaire dans une structure en H.	56
Figure 2-15 Représentation schématique du phénomène de diffusion pour des particules de différentes tailles, avec un système microfluidique en H.	58
Figure 2-16 focalisation hydrodynamique réalisé à l'aide de deux canaux secondaires. D'après Kwang Bok Kim [63].	59
Figure 2-17 Système microfluidique pour l'extraction du plasma sanguin. a) débit suffisant pour n'extraire que le plasma. B) débit insuffisant laissant passer une partie des globules rouges. D'après [64].	60
Figure 2-18 Schémas de principe d'un capteur microfluidique utilisant la diélectrophorèse pour le tri de particules. Deux rangées d'électrodes de part et d'autre du canal, utilisant des signaux de fréquences différentes permettent le déplacement sélectif des particules. D'après [65].	61
Figure 2-19 Système microfluidique réalisant l'orientation de particules à l'aide d'un actionneur à membrane souple. D'après [67].	62
Figure 2-20 Image en microscopie électronique d'un capteur à microcanal pour la mesure d'impédance en cytométrie de flux. D'après [68].	63
Figure 2-21 Schéma représentant l'acheminement, l'isolation et le centrage de particules dans un microcanal.	64

Liste des figures

Figure 2-22 Schéma de principe de mesure en cytométrie de flux. a) Schéma de mesure différentielle et b) signal associé. D'après S.Gawad [73].	65
Figure 2-23 Chaîne de mesures multifréquence utilisé pour la mesure d'impédance en cytométrie de flux, et adapté au processus présenté dans la figure précédente. D'après S.Gawad [73].	65
Figure 2-24 Répartition des variations de signaux observés par le passage de billes de 5,7 et 9,95 μm .	67
Figure 2-25 Comparaison des variations induites par le passage de différents types de particule à 602 kHz et 10 MHz. D'après [75].	67
Figure 2-26 Caractérisation de globules rouges sains et fantômes par mesure à 1.72MHz et 15MHz.	68
Figure 2-27 Répartition de mesures unitaires de globules rouges bovins infectés a) en fonction de la phase mesurée, b) en fonction de de la partie imaginaire et de la partie réelle ; et de globules rouges bovins non infectés a) en fonction de la phase mesurée, b) en fonction de de la partie imaginaire et de la partie réelle.	68
Figure 2-28 Représentation de la structure à électrodes interdigitées d'un dispositif à ondes élastiques de surface (a), et d'une application possible comme filtre ou ligne à retard (b).	70
Figure 2-29 Vue schématique du déplacement d'une onde acoustique le long d'une surface, et de son interaction avec une goutte d'eau. D'après Aisha [76]	71
Figure 2-30 Schéma de principe du tri de cellule par force acoustique (a), et représentation schématique des forces mise en jeu lors du tri (b). D'après [80]	72
Figure 2-31 Schéma de principe d'un dispositif microfluidique réalisant la focalisation de particules par dispositifs à ondes acoustique de surface. D'après Jinjie Shi [82].	73
Figure 3-1 Modèles électriques d'une cellule en suspension a) modèle représentant les composants équivalant pour chaque élément et b) modèles global associé. D'après [83].	82
Figure 3-2 Représentation du champ électrique dans la zone de mesure pour des électrodes parallèles et coplanaires sans cellule biologique (a) et (d), avec présence d'une cellule (b) et (e), et leurs zones sensibles de mesure respectives (c) et (f).	84
Figure 3-3 Schémas électriques développé représentant des impédances fixes série et parallèle. Et leurs contributions au modèle électrique global.	84
Figure 3-4 Schéma des électrodes coplanaire (a) et parallèle (b).	86
Figure 3-5 Variation de l'impédance en fonction du rayon de la cellule (a) et (b) et en fonction de son volume (c) et (d) pour les différentes géométries d'électrodes.	90

Liste des figures

Figure 3-6 Erreur en pourcent entre le rayon recalculé après linéarisation et le rayon initial a), et centrage sur la zone la plus linéaire b).	91
Figure 3-7 Variation de la capacité en fonction du rayon de la cellule pour plusieurs capacités membranaires.	92
Figure 3-8 Variation de la capacité en fonction du volume de la cellule pour plusieurs capacités membranaires.	93
Figure 3-9 Variation de l'impédance en pourcent en fonction de la conductivité du cytoplasme, pour 4 rayons de cellules différents a) 2 μ m, b) 4 μ m, c) 8 μ m.	95
Figure 3-10 Variation normée de l'impédance, lors du passage d'une cellule isolée.	96
Figure 3-11 Schéma représentant les deux particules rapprochées. Leur position est référencée au point milieu entre leurs centres, et leur écartement correspond à la distance d entre leurs centres.	97
Figure 3-12 Variation normée de l'impédance lors du passage de deux cellules de 7 μ m de diamètre avec différents écartements. Résultats de simulations.	99
Figure 3-13 Module de l'impédance et phase d'une cellule en suspension. Résultats de simulations.	101
Figure 3-14 Représentation de la zone sensible, en rouge, pour les 6 géométries d'électrodes différentes.	103
Figure 3-15 Représentation schématique de la discrétisation à réaliser pour les différentes géométries.	103
Figure 3-16 Variations d'impédances obtenues avec les géométries parallèles et coplanaires après retranchement des impédances fixes, ainsi que celle obtenues avec la simulation de référence et du modèle électrique, en fonction du ratio (diamètre de la cellule/côté de la zone sensible) et du ratio (volume de la cellule/volume de la zone sensible) pour une cellule isolante.	105
Figure 3-17 Variations d'impédances obtenues avec les géométries parallèles et coplanaires après soustraction des impédances fixes, ainsi que celles obtenues avec la simulation de référence et du modèle électrique, en fonction du ratio (diamètre de la cellule/côté de la zone sensible) et du ratio (volume de la cellule/volume de la zone sensible) pour une conductivité du cytoplasme de 0.5S/m.	107
Figure 3-18 Variations d'impédances obtenues avec les géométries parallèles et coplanaires après soustraction des impédances fixes, ainsi que celle obtenues avec la simulation de référence et du modèle électrique, en fonction du ratio (diamètre de la cellule/côté de la zone	

Liste des figures

sensible) et du ratio (volume de la cellule/volume de la zone sensible) pour une conductivité du cytoplasme de 2S/m.	108
Figure 3-19 Variations de capacités obtenues avec les géométries parallèles et coplanaires après soustraction des impédances fixes, ainsi que celle obtenues avec la simulation de référence et du modèle électrique, en fonction du ratio (diamètre de la cellule/côté de la zone sensible) et du ratio (volume de la cellule/volume de la zone sensible) pour une capacité membranaire de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$	110
Figure 4-1 Représentation schématique des deux solutions proposées pour l'implantation d'électrodes parallèles.....	118
Figure 4-2 Design des deux couches du capteur.	120
Figure 4-3 Photographie de la tournette SPIN150 utilisée.....	124
Figure 4-4 Aligneuse de masque et insolateur UV MA750. Photographie prise en salle blanche.	125
Figure 4-5 Vue au microscope optique de la résine structurée après développement :a) vue d'ensemble des structures d'électrodes ; b) Motifs avec défauts de développement ; c) Motifs correctement développés.	125
Figure 4-6 Bâti de gravure ionique IBE 4 wave, utilisé pour nos gravures ioniques.....	126
Figure 4-7 Courbes SIMS obtenue lors de la gravure des couches de tantale et platine, représentant pour chaque matériau le niveau de détection en fonction du temps.	127
Figure 4-8 Photographie de deux échantillons avant et après une gravure ionique.	128
Figure 4-9 Image au microscope optique des électrodes coplanaires avec résidus de résine après un premier passage à l'acétone, b) Image au microscope optique des mêmes électrodes après passage au plasma O_2 et à l'acétone.	128
Figure 4-10 Epaisseur de résine mesurée en fonction en fonction de la vitesse de rotation et approximation par une courbe de type $A/\text{racine}(x)$	129
Figure 4-11 Décollement de la résine lors du développement de la résine SU_8.....	130
Figure 4-12 Sur-insolation de la résine avec présence de résine au fond du canal après développement.	131
Figure 4-13 Photographie de l'échantillon avec la structure en résine SU_8, et agrandissement au microscope de la partie centrale du canal.....	131
Figure 4-14 Représentation schématique des étapes de réalisation du capot en PDMS.....	132
Figure 4-15 Représentation schématique des étapes de collages du PDMS par plasma.....	133

Liste des figures

Figure 4-16 Photographie du capteur obtenu après collage du capot en PDMS. De l'encre bleu a été injectée après placement de capillaire pour augmenter le contraste entre le canal et la couche de résine SU_8	134
Figure 4-17 Vue au microscope optique des structures réalisées avec la résine AZ9260 pour les épaisseurs de 10 μ m (a) et 20 μ m (b).	136
Figure 4-18 Vue au microscope optique de la structure réalisée par moulage du PDMS et de la même structure après collage plasma.	137
Figure 4-19 Etablissement d'un flux laminaire illustré par le passage successif d'encre bleu et d'eau distillée dans le premier rétrécissement du canal	138
Figure 4-20 Représentation schématique des forces s'exerçant sur la structure en PDMS lors de la création d'une dépression dans le canal, et du blocage de particules qui en résulte.	139
Figure 4-21 Vue au microscope optique d'agrégats de cellules (levures de boulanger), formée lors d'un déplacement par dépression. Le contour en rouge délimite la zone où la déformation du capot en PDMS est assez accentuée pour avoir un impact sur le bon déplacement des cellules.	139
Figure 4-22 Représentation schématique des forces s'exerçant sur la structure en PDMS lors de la création d'une surpression dans le canal, et du passage de particules surdimensionnées qui en résulte.	141
Figure 4-23 Vue au microscope optique de la zone d'arrachement entre la résine SU_8 et le substrat.	141
Figure 4-24 Etapes successives de débouchage du canal. Bouchon initial formé de levures de boulanger : (a) bouchage du canal, (b) débouchage avec air sous pression, (c) rétablissement de la circulation du fluide.	143
Figure 4-25 Etapes successives de débouchage du canal avec de l'acétone. Bouchon initial formé de microbilles de 10 μ m.	144
Figure 5-1 Schéma de principe d'un amplificateur à verrouillage de phase.	151
Figure 5-2 Photographie de l'appareil HF2IS, de Zurich Instrument. De gauche à droite, les deux paires d'entrée différentielle (1 et 2), Les deux blocs de sortie avec chacun une entrée additionneuse, la sortie analogique et la sortie de synchronisation (3 et 4), ainsi que des sorties auxiliaires.	152
Figure 5-3 Photographie et schéma de principe de l'amplificateur de courant HF2TA.	153
Figure 5-4 Photographie du microscope optique triloculaire.	154
Figure 5-5 Typon du circuit imprimé réalisé pour l'interface entre le capteur et les appareils de mesures.	155

Liste des figures

Figure 5-6 Banc de mesure utilisé, composé d'un microscope optique avec webcam, d'une carte d'interface supportant le capteur, de l'impédancemètre HF2IS avec son préamplificateur, et de deux PC pour le contrôle, le suivi et l'acquisition des mesures.	156
Figure 5-7 Représentation schématique des impédances parasites intervenant dans nos mesures d'impédances.	157
Figure 5-8 Mesures d'impédances et de phases effectuées en régime statique sur les deux paires d'électrodes coplanaires pour trois solutions calibrées.	160
Figure 5-9 Agrandissement au microscope optique de microbilles calibrées de 6 μ m et 10 μ m de diamètre (400x).	161
Figure 5-10 Impédance mesurée au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz. billes de 6 μ m dans une solution à 0,5S/m.....	164
Figure 5-11 Impédance mesurée au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz. Billes de 6 μ m dans une solution à 0,5S/m. Centrage sur 2 détections de particules.	164
Figure 5-12 Impédance mesurée au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz et signal obtenu après filtrage passe-bas.	165
Figure 5-13 Variation d'impédance au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz.	166
Figure 5-14 Variation d'impédance au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz. Centrage sur 2 détections de particules.	166
Figure 5-15 Variation d'impédance au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz, pour le signal brut et le signal après filtrage.	167
Figure 5-16 Variation d'impédance au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz, pour le signal brut et le signal après filtrage. Agrandissement au niveau d'une seule particule	167
Figure 5-17 Signal de détection de particules obtenu par comparaison par seuil.	168
Figure 5-18 Répartition normée de billes calibrées de 6 μ m en fonction de la variation de résistance mesurée à 100kHz, et de celle recalculée à l'aide des résultats de simulation et du coefficient de variance donné par le constructeur.	169
Figure 5-19 Répartition normée de trois type de particules: sang, levures et bille de 6 μ m en fonction de la variation de résistance induite.	170
Figure 5-20 Répartition normée de deux séries de mesures de billes de 6 μ m en fonction de la variation de résistance induite.	172
Figure 5-21 Variation d'impédance obtenue lors du passage d'une cellule (levure de boulanger) à faible vitesse.	173

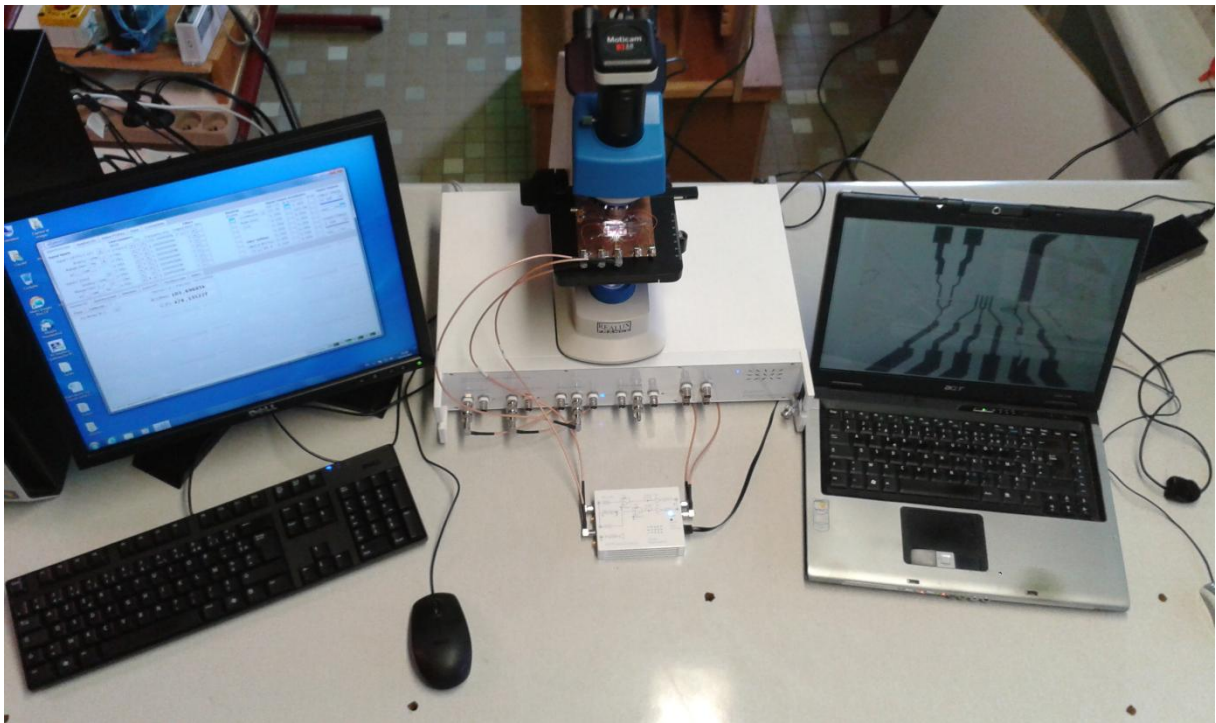
Liste des figures

Figure 5-22 Variation de résistance en fonction du temps pour les deux paires d'électrodes coplanaires, pendant le passage de deux cellules successives.....	174
--	-----

Liste des tableaux

Tableau 1-1 Conductivités molaires ioniques des principaux ions présents dans les milieux biologiques.	12
Tableau 3-1 définition des paramètres géométriques des différentes électrodes à simuler.	86
Tableau 3-2 Valeurs par défaut des paramètres choisis pour les simulations	87
Tableau 3-3 Facteurs de formes obtenus par simulation pour les différentes géométries d'électrodes	89
Tableau 3-4 Coefficients directeurs obtenus après linéarisation des courbes de variation d'impédance.	90
Tableau 3-5 Capacité des différentes électrodes en présence d'une solution ionique de permittivité relative de 78.	92
Tableau 3-6 Vitesses maximales théoriques admissibles en fonction du nombre de période du signal de mesure.	97
Tableau 3-7 Distances limites admissibles pour chaque géométrie d'électrodes.	100
Tableau 3-8 Nombre maximal théorique de cellules mesurables en fonction du nombre de périodes du signal de mesure utilisé (à 100kHz).....	100
Tableau 3-9 Facteurs de formes calculés pour les différentes zones après discrétisation.....	104
Tableau 4-1 Epaisseur de résine SU_8 obtenues en fonction des paramètres de la tournette.	129
Tableau 4-2 Résultats de collage obtenu sur verre et résine SU_8 pour différents paramètres.	134
Tableau 4-3 Epaisseurs mesurées en fonction de la vitesse d'enduction pour la résine AZ9260.	135
Tableau 5-1 Mesures de résistance aux bornes des deux électrodes coplanaires, et calcul de leurs facteurs de forme.	160
Tableau 5-2 Comparaison des variations de résistance induites par le passage successif d'une même cellule.	173

Introduction Générale



Introduction Générale

Objectifs de la thèse :

Cette thèse porte sur la mesure et la caractérisation en dynamique de cellules vivantes unitaires en suspension, par mesures de spectroscopie de bio-impédance. Ce projet se classe dans la thématique actuelle des laboratoires sur puces « Lab on chip », permettant l'intégration des fonctions d'un ou plusieurs dispositifs électroniques de mesure au sein d'une seule micro-puce à faible coût de production. L'utilisation de mesures électriques peut ainsi permettre des mesures directes sur des échantillons nécessitant peu de préparations, avec notamment l'absence d'ajout de marqueurs biochimiques, et ne demandant pas nécessairement la présence d'un praticien hospitalier. Ce travail peut donc aussi s'intégrer dans un autre domaine d'actualité, celui de la télésurveillance médicale, permettant de réaliser à distance par le patient lui-même, la mesure et l'envoi automatique de paramètres d'analyse à visée diagnostique

Les mesures d'impédances sur des tissus biologiques, ont pu montrer depuis plus d'un siècle, la possibilité de les caractériser et les discriminer en fonction de leur type et de leur état physiologique. Elles ont ainsi trouvé des applications thérapeutiques (hyperthermie anticancéreuse, ablation intracardiaque, ...), en diagnostic médical (néphrologie, imagerie,...) ou encore en évaluation des effets des champs électromagnétiques (dosimétrie, CEM des implants médicaux actifs).. Cependant, une mesure globale « macroscopique », ne permet de mesurer que l'effet moyen d'un ensemble organique, rendant par la même certains diagnostics à l'échelle cellulaire impossibles. A titre d'exemple, les globules blancs qui représentent moins de 0,1% des particules composant le sang humain ont un effet qui n'est pas détectable avec de telles mesures. D'où l'intérêt de mesures unitaires sur des cellules à grande vitesse (cytométrie de flux), afin de déterminer avec une grande sensibilité l'état de chaque cellule.

Cette thèse s'intéresse à la conception d'un microcapteur hybride de spectroscopie d'impédance de type « microfluidique », capable de déplacer les cellules, les isoler et les caractériser unitairement à grande vitesse (jusqu'à plusieurs centaines par seconde). Des dispositifs à ondes élastiques de surfaces (SAW), pouvant être utilisés comme actionneurs pour la réalisation de micro-pompes intégrées seront étudiés et intégrés dans les étapes de conception. Une connaissance des propriétés électriques et diélectriques de cellules unitaires est nécessaire afin de pouvoir déterminer le lien entre leur état physiologique et leur réponse en termes d'impédance. Cette étude doit aussi être complétée par des modélisations et

Introduction Générale

simulations analytiques afin de définir la réponse de différents types d'électrodes et leurs sensibilités, et pouvoir valider leur choix et leur dimensionnement. De plus, réaliser un tel dispositif implique le respect de contraintes, notamment en termes de biocompatibilité et faisabilité. Des mesures sur différents types de particules calibrées puis de cellules ont été nécessaires pour valider le fonctionnement de ce dispositif et de ses performances. Pour cela une chaîne de mesures complète, spécifiquement adaptée à notre capteur, a été conçue de manière à pouvoir mesurer à grande vitesse et tout en contrôlant leur passage. Celle-ci, présentée en Figure 0-1, contient d'une part un amplificateur à verrouillage de phase digital commandé par ordinateur avec son préamplificateur et d'autre part une caméra CMOS couplée sur un microscope optique pour le suivi « *in visu* » du passage des cellules biologiques.

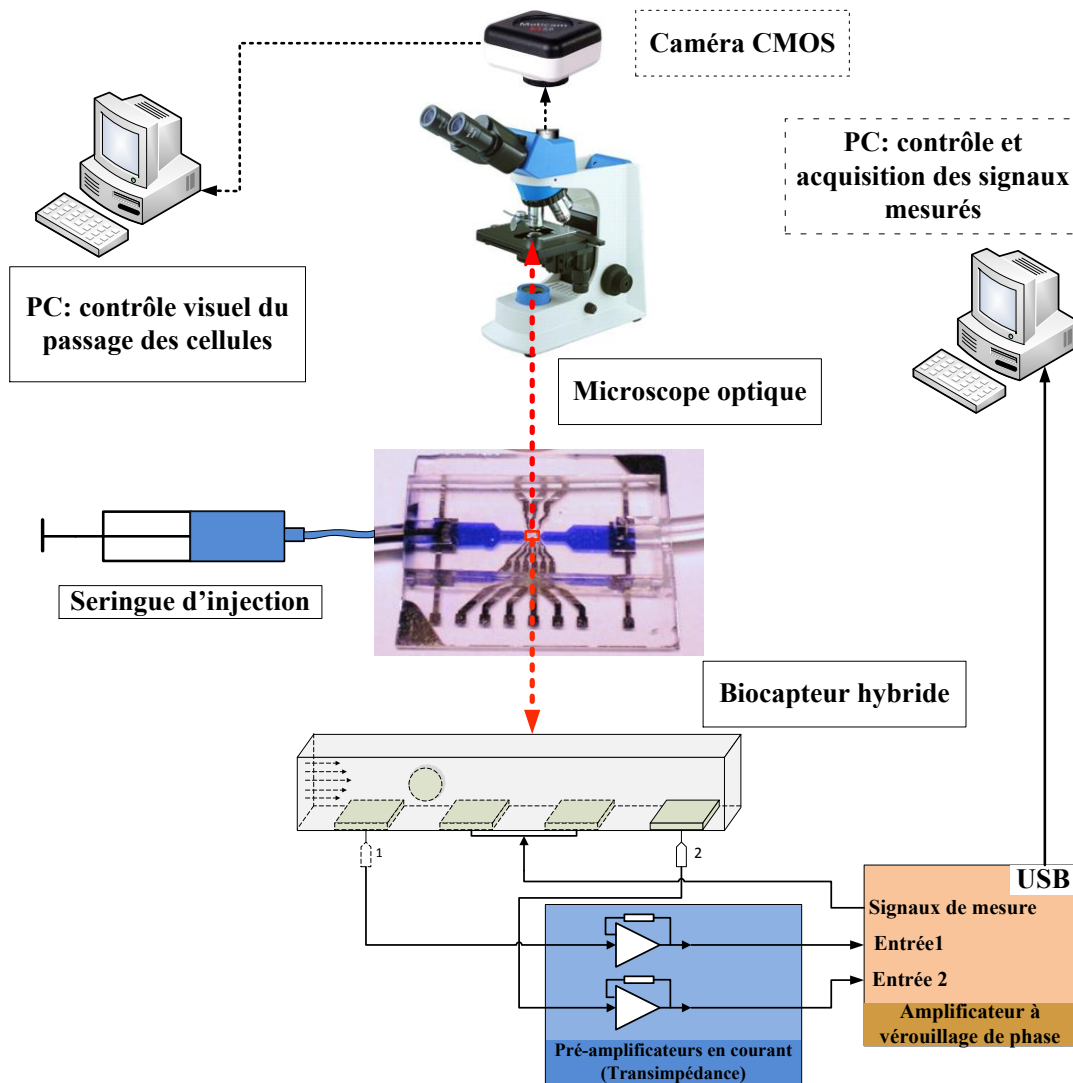


Figure 0-1 Schéma synoptique représentant le biocapteur réalisé et de sa chaîne de mesure dédiée.

Contexte :

Ce projet a été mené au sein de l'équipe 406 « Mesures et architectures électroniques », en collaboration avec l'équipe 405 « Micro-et nanosystèmes », toutes deux parties du département N2EV « Nanomatériaux, Electronique Et vivant » de l'institut Jean Lamour. Cette collaboration a permis de mettre à profit les compétences de l'équipe 406 en termes de caractérisations et mesures de tissus biologiques par spectroscopie d'impédance, avec celle de l'équipe 405 en termes d'élaboration de microsystèmes et de dispositifs microfluidiques.

Plan de la thèse :

Le **premier chapitre** de cette thèse porte sur une étude bibliographique des propriétés impédimétriques des tissus biologiques et de leurs possibles utilisations à des fins de caractérisations et de diagnostics. Y sont présentées en premier lieu les origines des effets électriques et diélectriques existants pour chaque matériau. La composition générale des échantillons biologiques est ensuite décrite en les discrétisant par parties, et en indiquant pour chacune d'entre elles les matériaux les composants et leurs caractéristiques propres. Cela permet de définir les propriétés globales des tissus en fonction de leurs constituants et d'expliquer la nature des phénomènes de relaxations qui leurs sont associés.

Le **second chapitre** est un état de l'art des différentes techniques de mesures d'impédances et de leurs interprétations. Y sont exposées les investigations allant de la mesure d'échantillons macroscopiques à la mesure unitaire de cellules, ainsi que des modèles associés. Les techniques et technologies de microfabrication des électrodes de mesures y sont également présentées. Les propriétés des fluides à l'échelle microscopique, ainsi que la possibilité d'agir sur eux par l'intermédiaire de dispositifs à ondes acoustiques de surface (SAW), sont décrites dans le cadre des objectifs de nos travaux.

Le **chapitre trois** porte sur la modélisation et présente nos résultats obtenus par simulation pour la caractérisation de cellules en suspension pour différentes géométries d'électrodes intégrées dans un micro-canal. Ces résultats ont pu être obtenus par résolution de systèmes tridimensionnels par la méthode des éléments finis, à l'aide du logiciel Comsol Multiphysics®. Ils ont permis d'optimiser et valider les différentes géométries en déterminant leurs sensibilités ainsi que les bandes de fréquences utiles pour les mesures. Ce chapitre expose la principale difficulté des caractérisations de cellules unitaires, imputable aux

Introduction Générale

contraintes et limitations des modèles analytiques actuels. C'est pourquoi une partie importante de ce travail de thèse c'est porté sur l'optimisation de ces modèles, basée notamment sur une discrétisation de la zone de mesure et les équations de Maxwell. Ceux-ci ont pu être comparés aux simulations avec de bonnes concordances et ont mis en avant la possibilité de déterminer les propriétés intrinsèques de cellules isolées, quel que soit la géométrie d'électrodes utilisée.

Le **chapitre quatre** concerne la conception et la réalisation de notre biocapteur microfluidique de spectroscopie d'impédance. Y sont exposés les différentes contraintes qui ont permis de définir le design du capteur et sa réalisation pratique en collaboration avec le centre de compétences MINALOR de l'IJL. On y trouvera notamment les contraintes de faisabilité en fonction des technologies de fabrication mise à disposition et celles concernant la biocompatibilité des matériaux utilisés. Deux techniques de réalisation technologiques y sont exposées ainsi que les difficultés rencontrées et les solutions que nous avons développées. Du point de vue des écoulements une série de tests de validation des dispositifs ont été réalisés en vue de valider leurs aptitudes face aux déplacements fluidiques de microparticules en suspension.

Le **cinquième et dernier chapitre** porte sur la validation expérimentale des biocapteurs que nous avons réalisés. La mise en place d'une chaîne de mesure dédiée à la caractérisation par impédance en cytométrie de flux y est exposée. Le choix d'un amplificateur à verrouillage de phase est justifié en fonction des contraintes de mesures, telles que la gamme de fréquences, les niveaux d'impédances et la rapidité de mesure déterminés au chapitre 3. Les mesures ont été effectuées dans un premier temps sur des solutions et microbilles calibrées pour évaluer si les réponses des capteurs étaient en accord avec les simulations, et si ceux-ci étaient aptes à la mesure de particules en régime dynamique. Enfin, des expérimentations avec des cellules sanguines et des levures ont été menées à bien et ont prouvé la possibilité de discriminer les cellules en fonction de leurs réponses.

Une **conclusion générale** synthétise les travaux et développe succinctement leurs perspectives.

Introduction Générale

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

1.1 Introduction.

Les propriétés électriques des tissus, en particulier celles du sang, sont étudiées depuis des décennies, notamment dans le but de réaliser des outils de diagnostic rapide. Les tissus vivants, tels que le muscle, le sang, les os, possèdent des propriétés électriques et diélectriques caractéristiques. Ces propriétés sont une image de leurs propriétés physiques, biologiques et géométriques, rendant possible un diagnostic par mesures électriques. Ce sont ces propriétés, ainsi que leurs correspondances physiques, que l'on désire mesurer et caractériser, en particulier pour le sang.

Les milieux biologiques sont majoritairement constitués d'eau (60 % pour les tissus biologiques). Cette eau contient une multitude d'ions, qui vont définir ses propriétés électriques et une partie de ces propriétés diélectriques (comportement de type solution électrolytique). Les cellules qui y sont présentes sont elles aussi composées principalement d'un liquide électrolytique contenu dans de très fines membranes isolantes, considérées comme diélectriques, imposant un effet capacitif entre le milieu intracellulaire et extracellulaire. Ces milieux peuvent être définis par leurs conductivités et permittivités complexes, représentant respectivement leurs propriétés électriques et diélectriques. Ces deux propriétés varient en fonction de la fréquence du champ électrique traversant le milieu, sachant que pour un tissu, une baisse de permittivité entraîne une augmentation de la conductivité.

Nous proposons dans ce chapitre, d'étudier les différents effets électriques et diélectriques qui interviennent lors de la caractérisation d'échantillons biologiques. Pour cela nous nous intéresserons dans un premier temps à la définition des propriétés électriques et diélectriques des matériaux de façon générale, en passant de l'échelle atomique jusqu'aux effets mesurable à l'échelle macroscopique.

L'impédance d'un échantillon biologique sera ensuite étudiée en fonction des propriétés des différents éléments qui la compose. Les matériaux composants chaque élément, ainsi que leurs propriétés électriques et diélectriques seront étudiés indépendamment, puis rassemblées jusqu'à obtenir l'impédance globale d'un échantillon.

Enfin, le cas particulier du sang sera étudié plus en détail. Ses différents constituants, ainsi que leurs propriétés et leurs fonctions globales seront définis. Différent types de

caractérisations et diagnostics possible seront présentés, tout en précisant ceux mesurables par spectroscopie d'impédance.

1.2 Notion de conductivité électrolytique.

1.2.1 Notion d'électrolyte.

Divers ions, protéines et substances dissoutes dans un solvant (l'eau pour les tissus vivants) forment un électrolyte, constituant majoritaire dans les tissus du corps humain. Un électrolyte est défini en terme électrique comme une substance ayant une conductivité ionique en courant continu, contrairement aux conducteurs classiques tels que les métaux, qui possèdent une conductivité électronique. Cette conduction est beaucoup plus complexe que la conduction électronique dans un métal, car elle entraîne des réactions chimiques et implique un transport de matière (ions). Dans une solution électrolytique au repos, les ions de signes contraires s'attirent entre eux et attirent les molécules d'eau fortement polaires. Les molécules polaires ont une charge globale nulle mais une répartition non centrée des charges élémentaires qui la composent, elles possèdent donc une face qui est attirée par les charges positives et une autre attirée par les charges de signes contraires. En l'absence d'application d'une tension électrique, ces charges se trouvent immobiles (hormis les diffusions naturelles). Lors de l'application d'une tension électrique, on observe un déplacement de charge, créant ainsi une conduction ionique. Deux principaux phénomènes se produisent alors : la migration, qui consiste en un déplacement de charges (ions) et la diffusion qui concerne le transport d'espèces non chargée. Ce dernier phénomène s'explique, du moins en partie, par l'attraction entre molécules polaires et particules chargées, ainsi qu'avec les collisions puisqu'il y a déplacement de matière. Il joue donc un rôle indirect sur la conductivité puisqu'il consomme et détourne une partie de l'énergie nécessaire aux déplacements des charges.

1.2.2 Définition de la conductivité ionique.

Kohlrausch [1] définit la conductivité comme composée des contributions distinctes des anions (charge -) et des cations (charge +). On peut ainsi définir la densité de courant J en (A/m^2) pour un simple couple anion-cation par l'équation (1) :

$$J = (nz_e v)_+ + (nz_e v)_- = Fc\gamma(\mu_- + \mu_+)E \quad (1)$$

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

Avec v la vitesse de l'ion (en m/s), γ le coefficient d'activité (en général celui du couple d'ion et variant entre 0 et 1), c la concentration ionique (en mol/m³), μ la mobilité de l'ion (en m²/(V.s)), z_e la charge de l'ion (en C), E le champ électrique (en V/m), n le nombres d'ions, et F la constante de Faraday ($F=96485,3365$ C/m).

Cette relation peut aussi être décrite en fonction de la conductivité et du champ électrique. Elle est l'équivalent de la loi d'Ohm pur des fluides conducteurs.

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} \quad (2)$$

Il est aussi possible de définir la contribution totale des différents ions dans la conductivité totale de la solution au repos (sans excitation électrique externe) et de volume V_{sol} , sachant que la contribution globale y sera nulle dans ce cas.

$$V_{sol} \sum (nzeV)_+ + V_{sol} \sum (nzeV)_- = 0 \quad (3)$$

Une autre approche consiste à décrire la contribution totale par une conductivité molaire, exprimée en fonction de la concentration des ions en solution.

$$\lambda = \frac{\sigma}{c} = \gamma F (\mu_+ + \mu_-) \quad (4)$$

Il est aussi possible de définir une conductivité molaire propre à chaque ion. On peut alors définir la conductivité globale comme la contribution de la somme des conductivités molaires ioniques. Le Tableau 1-1 donne les conductivités molaires ioniques pour les ions les plus présents dans les tissus biologiques.

$$\sigma = \sum_{i=0}^n c_i \lambda_i \quad (5)$$

Tableau 1-1 Conductivités molaires ioniques des principaux ions présents dans les milieux biologiques.

Cations	λ_0 (en mS.m ² .mol ⁻¹)	Anions	λ_0 (en mS.m ² .mol ⁻¹)
H ₃ O ⁺	34,98	OH ⁻	19,86
Na ⁺	5,01	Cl ⁻	7,63
K ⁺	7,35	HCO ₃ ⁻	4,45
Ca ²⁺	11,9	CO ₃ ²⁻	13,86

Ces relations, mettant en équation les conductivités théoriques de solutions en fonction de la mobilité μ des ions ne peuvent cependant être utilisées que pour des concentrations limitées [2]. En effet, la mobilité des ions ne peut être considérée comme constante que pour de faibles concentrations, car au-delà, les interactions entre les ions la réduisent. Les ions ont alors tendance à se grouper par paires de charges opposées, avec une mobilité moindre. D'après la théorie d'Osenger [3], la conductivité molaire dépend de la racine carrée de la concentration des ions, et répond ainsi à l'équation (6), avec λ_0 la valeur de conductivité molaire vers laquelle on tend pour des concentrations très faibles et b un facteur dépendant du milieu (ions présents dans l'électrolyte).

$$\lambda = \lambda_0 - b\sqrt{c} \quad (6)$$

1.2.3 Cas de l'eau pure.

L'eau est un matériau composé de molécules fortement polaires qui s'orientent, lors de la présence d'un champ électrique extérieur, dans la même direction que celui-ci. Cette polarité, qui sera expliquée plus en détail dans la partie 3, permet de dissoudre aisément bon nombre de solides ioniques tels que NaCl. Elle est donc en générale, en milieu naturel et dans les organismes, chargée d'un grand nombre d'ions divers lui donnant une plus ou moins grande conductivité. Les molécules d'eau étant électriquement neutres, on pourrait alors penser que l'eau pure présente une conductivité nulle ou extrêmement faible comme c'est le cas des isolants électriques. En réalité, l'eau pure se dissocie naturellement en ions oxoniums H_3O^+ et en ions hydroxydes OH^- selon l'équation :



Cette réaction s'appelle l'autoprotolyse de l'eau [4] et sa constante d'équilibre est très faible (soit 10^{-14} à 25 °C). C'est-à-dire que le produit des concentrations (en mol.m^{-3}) est $[H_3O^+].[OH^-] = 10^{-14}$. L'eau pure est déjà naturellement un électrolyte, même en l'absence d'autres espèces, mais sa conductivité reste très faible : de l'ordre de 5,5 $\mu\text{S/m}$. En comparaison, un conducteur métallique (cuivre, platine, aluminium) a une conductivité de l'ordre de 10^7S/m et un sérum physiologique (ayant une concentration ionique proche de celle des électrolytes présents dans les tissus) possède une conductivité de l'ordre de 1 S/m . De plus, l'eau étant un très bon solvant pour de nombreuses espèces, des gaz présents dans l'atmosphère, tels que le dioxyde de carbone (CO_2) viennent rapidement se dissoudre au

contact de l'eau pure, modifiant ainsi sa conductivité. L'effet de la conductivité propre à l'eau est donc souvent négligé dans les échantillons biologiques.

1.2.4 Effets de l'environnement sur la conductivité.

L'environnement global de mesure est en général non contrôlé ou non contrôlable, du fait de la complexité et/ou du coût d'une telle mise en œuvre.

La conductivité d'un électrolyte varie aussi selon la température du milieu, avec une forte dépendance. En effet, la conductivité d'un électrolyte varie de près de 2% par degré Celsius. Cette variation étant principalement due au changement de viscosité du solvant (eau), lui-même dû à une modification de l'excitation des particules qui le composent. A température plus élevée une viscosité plus faible augmente la mobilité des ions en solution. La courbe de la Figure 1-1 donne la variation de la conductivité en pourcent par rapport à la conductivité à 25°C, de quatre solutions étalons du commerce en fonction de la température dans la plage 15°C à 30°C. Les valeurs utilisées sont les données fournisseurs livrées avec les solutions et sont données en ANNEXE 1.

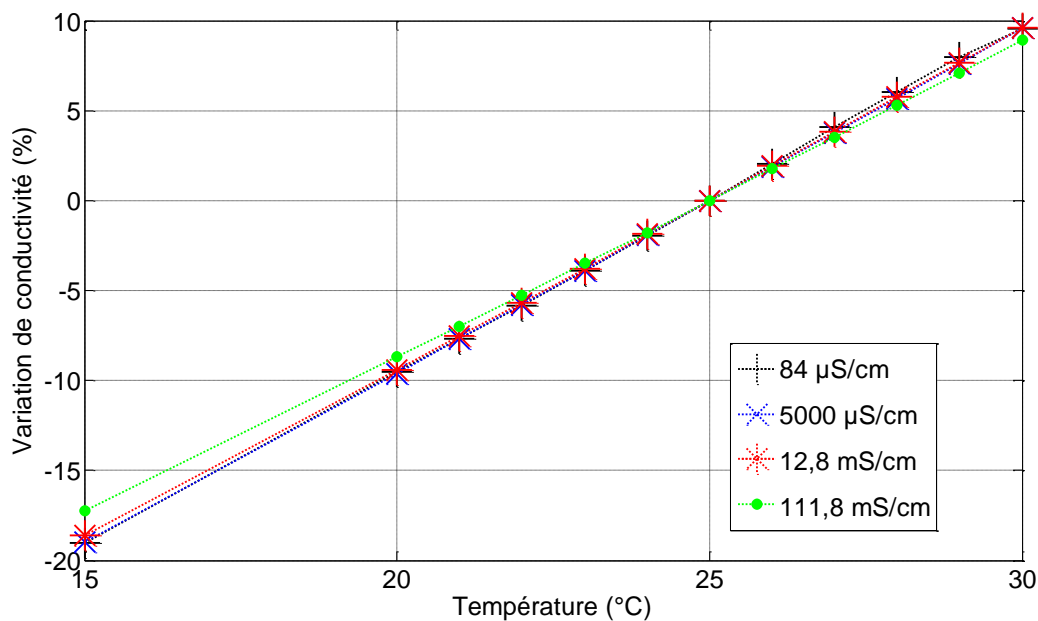


Figure 1-1 Variation de la conductivité en fonction de la température pour 4 solutions étalons du commerce (données fournisseur).

Nous pouvons voir pour les quatre solutions, que la conductivité est proportionnelle à la température dans la gamme 15-30 °C, qui correspond à la gamme classique de mesure d'échantillons biologiques. Les coefficients mesurés après régression linéaire, pour les

solutions de 84 $\mu\text{S/cm}$, 5000 $\mu\text{S/cm}$, 12,8 mS/cm et 111,8 mS/cm donnent respectivement des coefficients de 1.926, 1.905, 1.887 et 1.745 $\%/^{\circ}\text{C}$, soit très proches de l'ordre de grandeur décrit précédemment. Nous pouvons constater que ces coefficients diminuent en fonction de la conductivité, donc de la concentration ionique. Ils varient cependant très peu dans la gamme de conductivité classique des tissus biologiques, à savoir jusqu'à environ 1S/m ; sachant que la dernière solution est une solution proche de la saturation, donc de conductivité bien supérieure à celles des tissus. Cette information est très importante, car elle permettra d'envisager de valider des mesures à des températures différentes. En effet, il est difficile pour un système portable et donc de faibles dimensions de pouvoir toujours effectuer des mesures à températures constantes et prédéfinies. Le fait d'imposer un système de régulation de la température de mesure peut avoir pour effet d'augmenter à la fois la complexité, la flexibilité et le coût du système. Il est donc bien plus aisé d'intégrer un système de mesure interne de température pour ensuite appliquer à la mesure un facteur de correction. Cependant, cette propriété n'est vérifiée que pour des électrolytes simples dans des quantités macroscopiques, et reste donc à vérifier pour des échantillons microscopiques plus complexes.

La pression joue aussi un rôle puisque la viscosité de la solution en dépend aussi [5]. Il sera donc nécessaire de vérifier cet impact lors des mesures, puisque le déplacement d'un liquide dans un capillaire de dimension quasi-microscopique peut induire des pressions non négligeables.

1.3 Notions de propriétés diélectriques.

Les propriétés conductrices des tissus biologiques, ou plus exactement des électrolytes les composants ont été étudiées dans la partie précédente. Cependant ceux-ci présentent, en plus de leurs propriétés électriques (conductivités), des propriétés diélectriques qui peuvent intervenir fortement dans leur caractérisation par spectroscopie d'impédance, surtout dans les gammes de fréquences élevées supérieures au MHz.

1.3.1 Moment dipolaire moléculaire.

Les molécules composants un matériau sont constituées d'atomes de charges négatives et positives, regroupés entre eux par différentes forces dont celles de la loi de coulomb, le tout formant un système électriquement neutre. Malgré cette neutralité globale, certaines molécules peuvent s'orienter, en fonction du champ électrique présent, par rotation ou

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

translation locale (donc sans déplacement global de matière contrairement aux ions en solutions). Nous pouvons alors parler de molécules polaires, par analogie avec la polarité d'un aimant au niveau du champ magnétique. Cette polarité s'explique en fonction de la géométrie de répartition des charges ioniques. Lorsqu'une molécule possède au moins une liaison covalente et que le barycentre des charges positives ne coïncide pas avec le barycentre des charges négatives, la molécule est dite « polaire ». Dans le cas contraire la molécule est apolaire et ne s'orientera donc pas en fonction du champ électrique externe. Toute molécule polaire peut être caractérisée par son moment dipolaire p en (C.m), d'après la relation suivante de l'équation (8), avec q_i les charges élémentaires composant la molécule et r_i les vecteurs rayons.

$$\vec{p} = \sum_i \vec{r}_i q_i \quad (8)$$

Dans le cas d'une molécule polaire composée de deux charges de signes opposés et distantes d'une longueur L , on obtient la relation suivante :

$$\begin{aligned} \vec{p} &= q(\vec{r}_1 - \vec{r}_2) \\ p &= qL \end{aligned} \quad (9)$$

Ce moment dipolaire est aussi appelé moment dipolaire permanent, car il s'agit d'une propriété intrinsèque à la molécule, donc ne dépendant pas de la présence d'un champ électrique extérieur.

1.3.2 Polarisation d'un matériau.

Un matériau est composé d'un grand nombre de molécules, polaires ou non, à l'échelle microscopique. Celui-ci peut être défini au niveau macroscopique par sa polarisation P , qui n'est autre que le moment dipolaire par unité de volume. Il s'agit de l'association de la contribution des moments dipolaires de chaque molécule, divisée par le volume du matériau dans lequel elles sont contenues, et décrite par l'équation suivante :

$$\vec{P} = (\epsilon_r - 1)\epsilon_0 \vec{E} = \chi_r \epsilon_0 \vec{E} \quad (10)$$

L'équation ci-dessus, donne la relation de proportionnalité qui lie la polarisation et le champ électrique. Autrement dit, nous pouvons en déduire qu'en l'absence de champ

électrique, la polarisation est nulle. En effet, les molécules polaires présentent dans un matériau sont orientées de façon aléatoire, en l'absence d'un champ électrique extérieur, produisant ainsi une polarisation globale nulle.

Il existe cependant des matériaux de type ferroélectriques et anti-ferroélectrique qui peuvent présenter une polarisation non nulle, même en l'absence de champ électrique extérieur. Ces matériaux, le plus souvent de synthèse, ne se trouvent cependant pas, ou du moins pas en quantité significative dans les milieux biologiques étudiés. Ils ne seront donc pas étudiés dans ce travail.

Lorsqu'un champ électrique extérieur est appliqué à un matériau, 4 types de polarisations peuvent intervenir, à l'échelle atomique, moléculaire et macroscopique [6].

A l'échelle atomique :

1) Polarisation électronique.

Soumis à un champ électrique, le nuage électronique de l'atome, de charge négative se déplace par rapport au noyau atomique de charge positive. Cette polarisation intervenant au niveau atomique, elle touche donc n'importe quels types d'atomes, et donc par conséquent n'importe quels types de matériaux. C'est pourquoi un matériau, qu'il soit isolant ou non, présente toujours une permittivité supérieure à celle du vide. La Figure 1-2.a illustre cet effet appliqué à un atome quelconque. Ce phénomène de polarisation étant à l'échelle la plus faible, il est le plus rapide avec un ordre de grandeur de 10^{-15} secondes.

A l'échelle moléculaire :

2) Polarisation ionique.

Les ions de charge négative et positive composants les molécules, soumis à l'application d'un champ électrique externe, se déplacent dans des sens opposés. Cela produit un déplacement des barycentres des charges positives et négatives. Les molécules initialement apolaires deviennent ainsi polaires. Les molécules déjà polaires voient quant à elles leur moment dipolaire augmenté. La Figure 1-2.b illustre cet effet, qui bien que moins rapide que le précédent reste tout de même un phénomène très bref, de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-13} secondes.

3) Polarisation dipolaire d'orientation.

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

Contrairement aux deux autres polarisations, on ne la retrouve que pour des molécules polaires. Lorsqu'un champ électrique est appliqué au matériau, les molécules polaires qui étaient jusqu'à présent disposées de façon aléatoire vont s'orienter suivant la direction et le sens du champ électrique externe. Dans les solides, les molécules sont fortement liées et le degré de liberté faible: cette polarisation s'en trouve donc bridée. Au contraire, pour un liquide tel que l'eau, les molécules sont beaucoup plus libres et peuvent suivre l'orientation du champ électrique. Cette polarisation dépend aussi de l'agitation thermique des molécules, dont les contraintes s'opposent en partie à celle de la polarisation. L'effet de la température est donc aussi à prendre en compte au niveau des propriétés diélectriques d'un matériau. Ce phénomène est représenté sur la Figure 1-2.c .

Même si celui-ci ne provoque pas de déplacement global de matière, la rotation d'une molécule prend plus de temps que dans le cas des 2 autres polarisations, et dépend aussi fortement de la taille et du moment dipolaire de la molécule concernée. L'ordre de grandeur classique se situe dans les fréquences micro-ondes, à savoir de 10^{-9} à 10^{-10} secondes pour l'eau. Ces fréquences, contrairement à celles des polarisations précédentes, sont couramment utilisées dans les caractérisations et transmissions, les impédancemètres hautes fréquences travaillant en général dans la bande 1MHz à 2,4 GHz. Lorsqu'un matériau diélectrique se trouve excité par un champ électrique de cette gamme de fréquence, le mouvement de rotation n'est plus synchronisé avec les variations du champ électrique et il se produit un phénomène de résonance. On a ainsi un déphasage entre le champ électrique et le mouvement de rotation, produisant alors des pertes diélectriques et un dégagement d'énergie thermique. Dans ce travail, nous n'atteindrons pas cette fréquence, et cet effet pourra donc être occulté.

A l'échelle moléculaire :

4) Polarisation de charge d'espace.

Cette polarisation est due à un déplacement de charges (déplacement d'ions, donc de matière) dans le volume du matériau lors de l'application d'un champ électrique. La répartition des charges au niveau des interfaces entre le matériau et le milieu extérieur n'est plus équilibrée, et il en ressort ainsi l'apparition d'une polarisation. Celle-ci est typique des milieux électrolytiques, où les porteurs de charges ioniques sont libres de déplacement. Elle n'existe donc pas, ou à très faible échelle, dans les matériaux solides où les particules sont fortement liées. La répartition des charges au centre du matériau reste cependant équilibrée,

donc électriquement neutre. Cette polarisation joue un rôle important lors des mesures sur les milieux biologiques liquides, puisque ceux-ci sont principalement constitués d'électrolytes. Une représentation de cette polarisation est donnée en Figure 1-2.d.

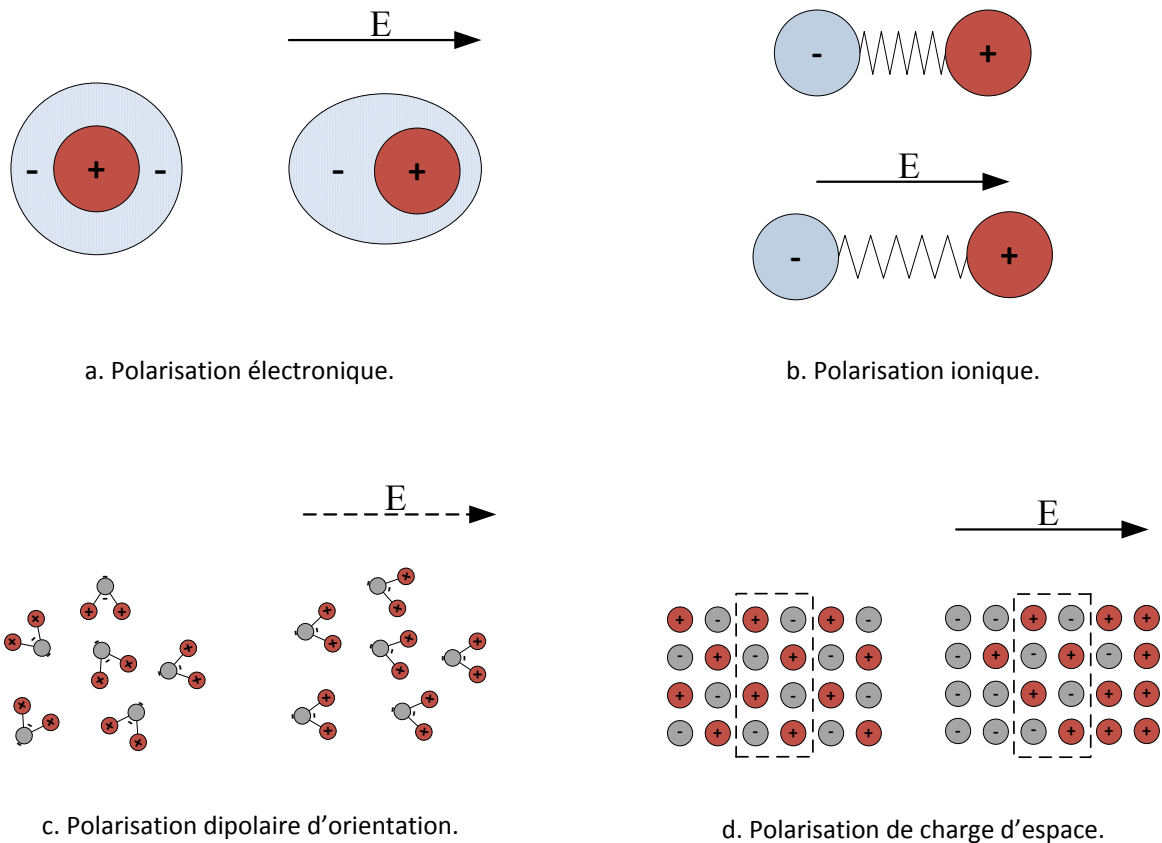


Figure 1-2 Représentation schématique des types de polarisations pouvant intervenir lors de l'application d'un champ électrique : a) polarisation électronique, b) polarisation ionique, c) polarisation dipolaire d'orientation, d) polarisation de charge d'espace.

1.3.3 Effet mesurable à l'échelle macroscopique.

L'association des différents effets de polarisation engendre au niveau macroscopique un effet mesurable par excitation avec une tension (ou un courant) alternatif. Il s'agit de la susceptance B d'un matériau homogène, soumis à un champ électrique de pulsation ω . Celle-ci se définit par la relation suivante :

$$B(\omega) = K \varepsilon_{mat} j \omega \quad (11)$$

K est un facteur dépendant de la géométrie spatiale de l'échantillon, et ϵ_{mat} la permittivité du matériau, qui peut être déduite de la mesure de B . La permittivité du matériau homogène pourra être considérée, comme décrite au début de cette partie, comme constante étant donnée la gamme de fréquences utilisées. Nous pouvons déduire de cette relation, que quelle que soit la permittivité du matériau (toujours supérieur à 1), l'effet de celle-ci sera toujours conséquent à partir d'une certaine fréquence de mesure. Cette grandeur reflète la contribution simultanée des différentes polarisations décrites précédemment, sans pouvoir les différencier.

Un matériau présente toujours à la fois des propriétés électriques et diélectriques, même si pour certains, une des deux propriétés est négligeable devant l'autre dans la gamme de fréquences de mesures choisie. Dans le cas où σ est négligeable devant B , on parle de matériaux isolants ou diélectriques ; dans le cas inverse de matériaux conducteurs. Comme B dépend de la fréquence, on peut définir qu'il existe une gamme de fréquence où le matériau peut être vu comme un conducteur, et une autre comme un isolant. Cette supposition n'est vérifiée que dans certaines conditions, bien que la plupart des matériaux isolants possèdent des permittivités et conductivités relativement constantes dans une large bande de fréquence, d'autres matériaux peuvent présenter de fortes variations de ces paramètres en fonction de la fréquence, tels que les solutions ioniques avec en particulier les effets de polarisation d'orientation.

1.4 Impédance électrique d'un échantillon biologique.

1.4.1 Définition générale et impédance d'un milieu.

L'impédance, au sens large du terme, mesure l'opposition d'un système à une grandeur physique par laquelle il est contraint. Ce terme vient de l'anglais «to impede» qui signifie «faire obstacle à». Elle est en général définie par le rapport entre la grandeur physique qui lui est appliquée et la grandeur physique qui en résulte. On peut notamment citer l'impédance acoustique d'un système, qui permet de caractériser la résistance qu'il oppose au passage d'une onde acoustique. Lorsqu'un fluide ou un milieu déformable est soumis à une pression, il en résulte un déplacement de matière dans l'espace. On définit l'impédance acoustique comme étant le rapport entre la pression exercée sur le système et la vitesse de déplacement de la matière qui en découle, suivant l'équation suivante :

$$Z = \frac{P}{V} \quad (12)$$

Dans notre cas, nous nous intéressons à l'impédance électrique ; c'est-à-dire à la mesure de l'opposition du système au déplacement de charges électriques lorsqu'une différence de potentiel lui est appliquée. Elle se définit par analogie avec les impédances acoustiques et mécaniques comme le rapport entre la tension appliquée au système et le courant électrique qui en résulte, soit :

$$\underline{Z}_e = \frac{\underline{U}}{\underline{I}} \quad (13)$$

\underline{Z}_e , \underline{U} et \underline{I} représentent respectivement l'impédance, la tension et le courant complexe. Il est donc possible de formuler l'impédance sous sa forme complexe :

$$\begin{aligned} \underline{Z}_e &= \frac{U_0}{I_0} e^{j\varphi} = \frac{U_0}{I_0} (\cos \varphi + j \sin \varphi) \\ \underline{Z}_e &= R + jX \end{aligned} \quad (14)$$

U_0 et I_0 sont respectivement les modules de \underline{U} et \underline{I} , et φ représente le déphasage entre \underline{U} et \underline{I} . Le module de $\underline{Z}_e = (\underline{U}/\underline{I})$ est homogène à une résistance et se mesure en Ohms. R et X représentent respectivement la résistance (partie réelle) et la réactance du système (partie imaginaire). La réactance donne une indication importante sur le comportement de système : il est inductif si elle est positive, purement résistif si elle est nulle et capacitif si elle est négative. La mesure d'impédance est un outil efficace pour de nombreuses applications allant de la caractérisation de matériaux [7], lignes de transmission et antennes [8], de systèmes électrochimiques [9] (piles à combustible, batterie, etc...), ou de composants électroniques. Cependant, la mesure d'impédance appliquée à la caractérisation de matériaux fournit une mesure indirecte des propriétés intrinsèques de ces derniers. Outre les erreurs et incertitudes induites par le système de mesure lui-même, l'impédance d'un échantillon dépend de sa géométrie (dimension, forme, orientation), de la géométrie de la surface de contact avec les électrodes de mesure et des éventuelles réactions électrochimiques qui peuvent se produire aux interfaces électrodes/échantillon. C'est pourquoi de telles mesures de caractérisation sont toujours accompagnées de modélisations (électriques, physiques, mathématiques, ...) qui permettent de déterminer les propriétés intrinsèques de l'échantillon.

Le cas le plus simple est celui d'un milieu majoritairement capacitif considéré comme parfaitement homogène, présentant une permittivité ϵ_m et une conductivité σ_m , mesurées entre des électrodes planes de surface S et d'écartement e (voir Figure 1-3).

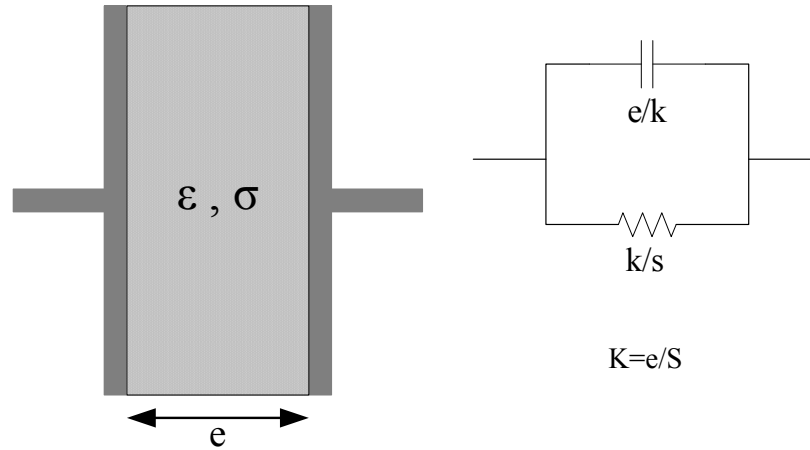


Figure 1-3 Schéma d'un échantillon diélectrique entre deux électrodes planes.

En supposant que le rapport S/e est très grand devant e et en négligeant l'impédance des électrodes, l'impédance globale peut être exprimée par :

$$\underline{Z} = \frac{k}{\sigma} \frac{1}{1 + j \frac{\epsilon}{\sigma} \omega} \quad (15)$$

avec $k = \frac{e}{S}$ le facteur de forme

Cette équation, modélisant un système simple permet de retrouver les paramètres intrinsèques de l'échantillon en fonction de la mesure d'impédance. Les milieux biologiques sont en règle générale majoritairement capacitifs dans le domaine nous intéressant, c'est pourquoi l'admittance, inverse de l'impédance, est souvent utilisée car elle permet une lecture plus simple des données pour ce type de système. En effet, l'équation (16) représentant l'admittance \underline{Y} du même système que précédemment, donne directement les paramètres intrinsèques de celui-ci au facteur de forme près.

$$\underline{Y} = \frac{1}{k} [\sigma + j\omega\epsilon] \quad (16)$$

Les mesures d'impédance sur les milieux biologiques sont donc souvent représentées sous forme de diagramme d'admittance ou même directement en diagramme de conductivité et de permittivité après avoir retranché le facteur de forme du système de mesure. Dans le cas d'un milieu plus complexe et/non homogène σ et ε ne peuvent être considérées comme constants. Il est d'usage de remplacer σ et ε par $\sigma'(\omega)$ et $\varepsilon'(\omega)$ comme fonction de la pulsation (fréquence) d'excitation du système. Il est alors possible de représenter la mesure d'impédance sous forme d'un diagramme spectroscopique de conductivité et d'un autre de permittivité. On peut ainsi associer le système mesuré à un couple résistif/capacitif pour chaque fréquence discrète.

Il est cependant important de ne pas confondre $\sigma'(\omega)$ et $\varepsilon'(\omega)$ avec les permittivités et conductivités complexes $\sigma(\omega)$ et $\varepsilon(\omega)$. Celles-ci sont le plus souvent utilisées pour caractériser respectivement les systèmes très majoritairement résistif et capacitif. Les parties complexes de chacune de ces deux grandeurs sont respectivement définies comme étant les pertes électriques et diélectriques. Elles permettent de mettre en avant les propriétés non purement électriques ou diélectriques des matériaux. Comme pour l'impédance et l'admittance, la conductivité et la permittivité complexe contiennent chacune les mêmes informations, mais présentées différemment.

$$\begin{aligned}\sigma(\omega) &= \sigma'(\omega) + j\sigma''(\omega) \\ \varepsilon(\omega) &= \varepsilon'(\omega) - j\varepsilon''(\omega)\end{aligned}\tag{17}$$

Ces deux grandeurs peuvent être reliées à l'admittance par les relations de l'équation (18).

$$\underline{Y}(\omega) = \frac{\sigma(\omega)}{k} = \frac{j\omega\varepsilon(\omega)}{k}\tag{18}$$

1.4.2 Effets d'interfaces.

Lors de toutes mesures électriques, les signaux de mesures perturbent le système à caractériser, provoquant une perturbation aussi bien de ce système que de l'impédance mesurée. Dans le cas des milieux biologiques, de fortes perturbations complexes sont produites au niveau de l'interface électrodes/milieu biologique lors de la polarisation de celui-ci [10]. Elles peuvent être en partie des réactions de types oxydo-réductions, entre les

électrodes et les ions présents dans les liquides électrolytiques, lors du passage d'un courant électrique. Dans ce cas, ces réactions parasitent à la fois les mesures et polluent l'échantillon en lui apportant de nouvelles espèces ioniques et/ou en en supprimant d'autres. Ces effets peuvent être réduits en utilisant des électrodes inertes chimiquement (or, platine, palladium), qui ne provoqueront pas de réactions d'oxydo-réduction.

Cependant, des effets plus complexes dits de « double couche » ne peuvent être supprimés par l'utilisation de métaux inertes. Ils se produisent eux aussi à l'interface entre l'électrode et le milieu à mesurer (quelques dizaines de nanomètres), et leurs effets sont fortement capacitifs [11]. Les mesures effectuées à basses fréquences en sont donc perturbées [12]. Il faut atteindre une certaine fréquence de mesure F_c (afin que l'impédance de la double couche devienne faible devant celle de l'échantillon), pour pouvoir réellement mesurer l'impédance de l'échantillon. Une représentation de la double couche est donnée en Figure 1-4.

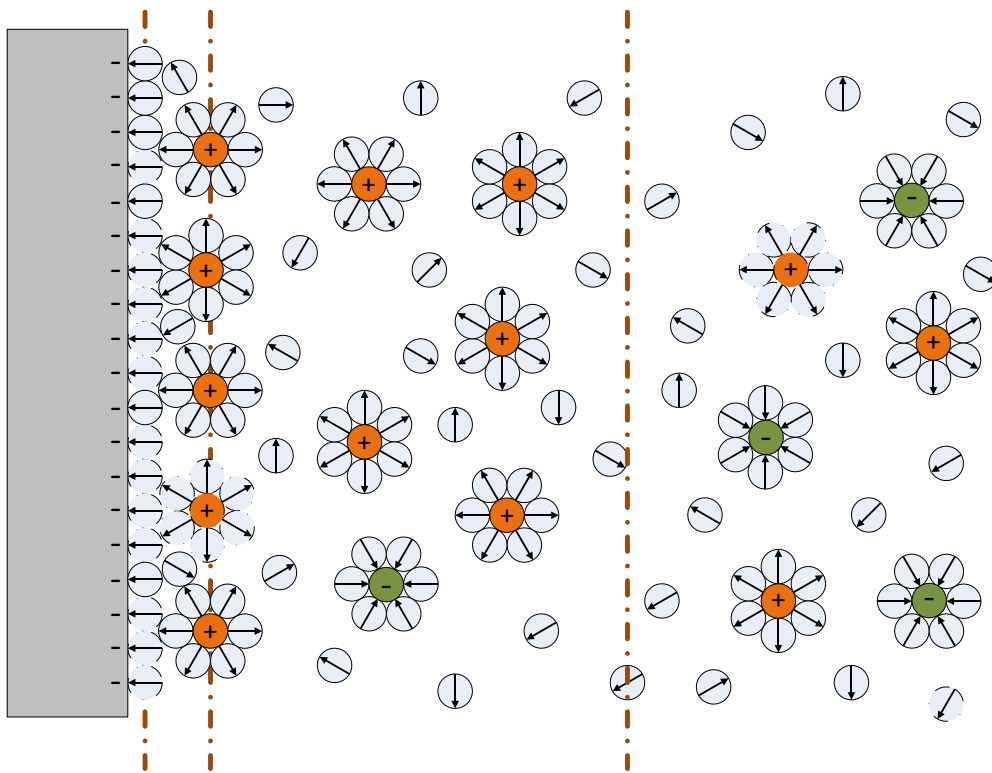


Figure 1-4 Représentation de la double couche présente à l'interface électrode/liquide lors de la polarisation.

Nous pouvons y voir les deux couches qui la composent :

- La première est composée d'une couche de molécules d'eau contenue entre une couche d'ions en solution et l'électrode. C'est cette couche qui donne les effets

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

capacitifs les plus forts car son épaisseur est très faible, similaire à celle d'une molécule d'eau, quasiment purement isolante et de grande permittivité (celle de l'eau soit environ 78). Il s'agit ici d'un effet diélectrique principalement dû à la polarisation dipolaire d'orientation des molécules d'eau. Cette couche est représentée la plupart du temps comme une capacité surfacique de grande valeur.

- La deuxième couche, plus épaisse, est composée d'un mélange de molécules d'eau et d'ions en solution non électriquement neutre. Avec la présence d'un champ électrique, les ions sont respectivement attirés vers l'électrode de charge contraire. Il se produit ainsi un phénomène de polarisation par déplacement de charges. Les effets sur l'impédance sont complexes, car ils allient un effet diélectrique dû aux charges des ions ainsi qu'une conductivité induite par le même déplacement de ces charges dans une zone dense.

Il est possible de diminuer la fréquence F_c en optimisant les dimensions du capteur utilisé [13]. L'impédance de l'échantillon mesurée dépend de la surface des électrodes et de leur écartement, alors que l'effet de double couche ne dépend que de la surface des électrodes : Plus le rapport de la surface des électrodes sur le volume de l'échantillon est grand, plus cette fréquence sera basse.

La double couche est la plupart du temps modélisée en trois composantes comme illustré dans la Figure 1-5.

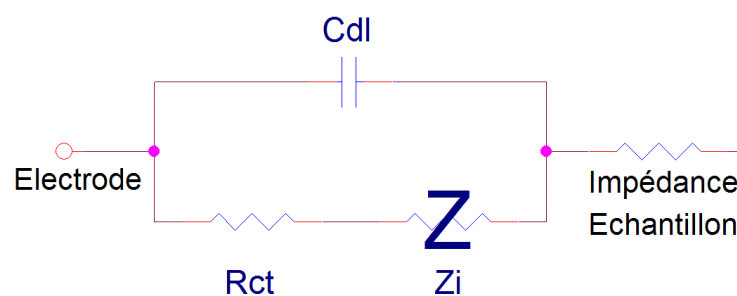


Figure 1-5 Modèle électrique de l'impédance de double couche.

Nous retrouvons la capacité C_{dl} représentative de l'effet fortement capacitif de la première couche, ainsi que la résistance de transfert de charge R_{ct} et l'impédance de Warburg Z_w décrivant les effets complexes se passant dans la deuxième couche [14]. Leurs formules sont données dans les équations (19) et (20).

$$R_{CT} = \frac{RT}{nFi_0} \quad (19)$$

$$Z_w = k(1-j)\omega^{-0,5} \quad (20)$$

Avec **R** représente la constante des gaz, **T** la température en Kelvin, **n** le nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction, **F** la constante de Faraday, **i₀** la densité de courant d'échange, et **k** une constante dépendant principalement de la concentration et de la mobilité des ions présents.

La capacité Cdl représente quant à elle les capacités qui découlent chacune des deux couches, et dépend donc de la permittivité et de l'épaisseur de chacune des couches. La première couche possède la permittivité de l'eau avec une épaisseur estimée à environ 5 Å, alors que la seconde peut avoir une permittivité et une épaisseur variable, en fonction des espèces présentes en solution. L'épaisseur de cette couche peut fortement varier en fonction de la concentration des ions en solutions, soit de quelques Å à plus de 300 Å pour des concentrations très faibles, alors que la diminution de permittivité avec l'augmentation de la concentration reste plus modeste en générale comprise entre 60 et 78 pour l'eau pure.

La mesure de cette impédance, bien que difficile à interpréter, peut donner de multiples informations sur la nature des ions et espèces présentes en solution ainsi que sur la nature des électrodes, comme l'état de surface ou la porosité [15][16]. C'est pourquoi, en plus de la mesure sur tissu biologique, celle-ci est souvent utilisée dans la détermination des propriétés électrochimiques de piles à combustibles, batteries et condensateurs.

Malgré la complexité du modèle et du calcul qui en découle, cette impédance d'interface est souvent modélisée par une simple capacité de valeur fixe. Cette simplification est utilisée lorsque seule la mesure des propriétés intrinsèques du milieu à mesurer nous intéresse. Dans ce cas, cette capacité représente l'entrave à basse fréquence engendrée par les effets d'interfaces.

1.4.3 Impédance générale d'un échantillon biologique.

Les tissus et échantillon biologiques sont constitués en générale d'une grande quantité d'eau dans laquelle sont présents différent type d'ions, avec principalement les ions sodium Na⁺, chlorure Cl⁻, potassium K⁺, et calcium Ca⁺. Ils peuvent se présenter sous formes de

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

structures ordonnées et dense formées par de multiples cellules et particules, comme pour les os ou les muscles, ou sous forme de suspension de particules et cellules dans un liquide comme pour le sang.

Ces unités vivantes autonomes sont formées d'une membrane permettant de les délimiter du milieu extérieur. On définit ainsi l'intérieur de la cellule comme étant le cytoplasme, formé par une solution électrolytique qui peut elle aussi contenir des particules plus petites, formées du même type de membrane, les organites. Dans le cas de la cellule, on parlera de membrane plasmique, et de membrane intracellulaire dans le cas des organites.

Bien qu'elles soient différentes pour chaque type de cellules ou organites, ces membranes présentent de nombreuses caractéristiques communes. Elles sont principalement composées de phospholipides amphiphiles, c'est-à-dire de composés avec une tête hydrophile et une queue hydrophobe. Comme le milieu extérieur et le cytoplasme sont principalement composés d'eau, les têtes hydrophiles vont naturellement s'orienter en direction de l'eau et inversement pour les queues hydrophobes, pour former la structure la plus stable possible. On obtient ainsi une bicouche lipidique d'une épaisseur d'environ 7 nm, dont la représentation schématique est donnée en Figure 1-6. Elle contient aussi divers types de protéines périphériques et transmembranaires aux rôles divers tels que l'échange ciblé d'ions ou molécules avec l'extérieur, le transfert de signaux, etc... .

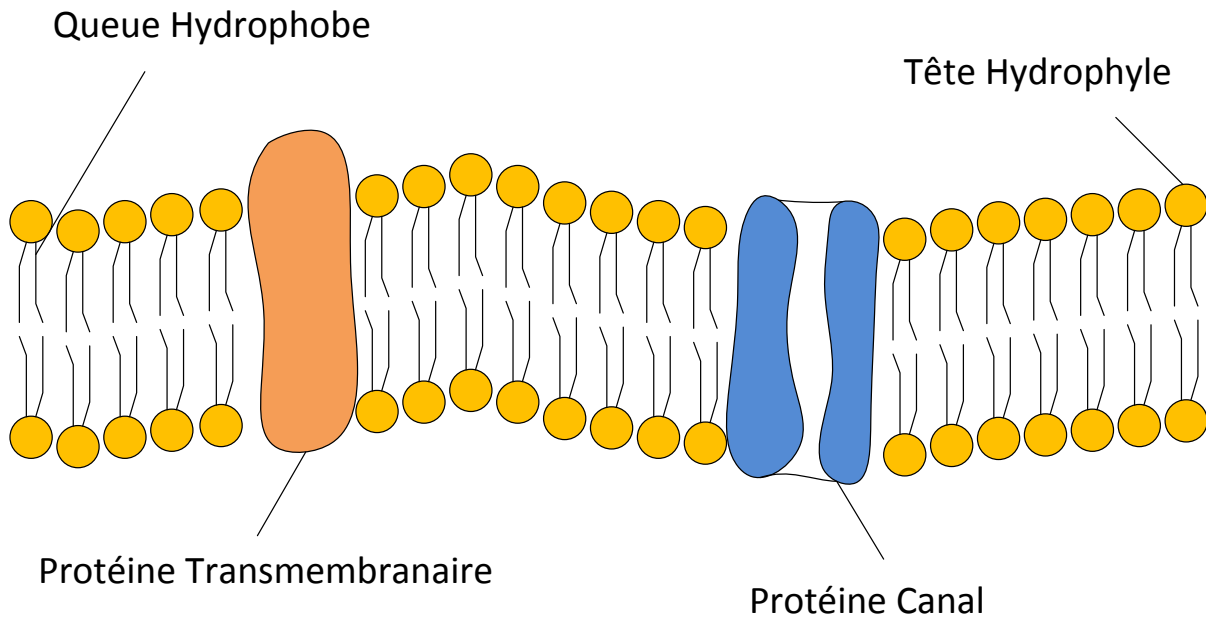


Figure 1-6 Représentation schématique simplifiée d'une bicouche lipidique.

La membrane possède donc principalement des propriétés capacitives de par sa faible épaisseur et les propriétés isolantes des lipides. La littérature fait état de mesure d'une grande capacité surfacique, de l'ordre de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [17][18]. En prenant l'épaisseur de 7 nm pour une permittivité de 5 (permittivité moyenne des lipides), on trouve une capacité surfacique de $0,59\mu\text{F}/\text{cm}^2$. La membrane cellulaire n'étant pas totalement hermétique, du fait de la présence des protéines transmembranaires, elle possède aussi une conductivité électrique. Celle-ci reste très faible et est souvent négligée, car elle représente lors d'une mesure, une conductance très faible par rapport au milieu extérieur. Le milieu extérieur et le cytoplasme possèdent quant à eux des propriétés majoritairement résistives des électrolytes.

Le modèle électrique discret standard de représentation d'une cellule est celui de Fricke [19], qui associe à chaque partie constitutive des cellules et du milieu extérieur un composant électrique passif équivalent. La Figure 1-7 représente ce modèle superposé à une cellule.

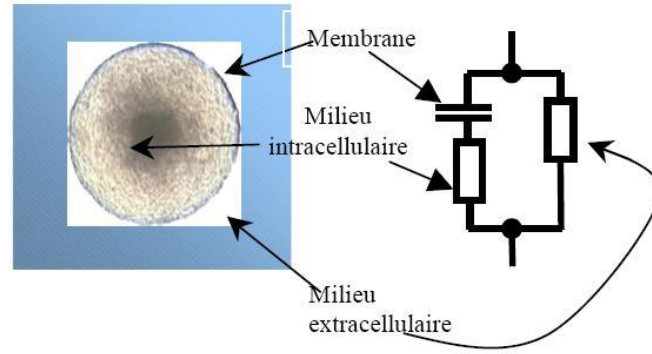


Figure 1-7 Représentation du circuit équivalent de Fricke pour des cellules en suspension, avec R_i la résistance résultante de la conductivité du milieu intérieur, R_e celle du milieu extérieur et C_m la capacité résultant de la capacité surfacique de la membrane.

L'équation suivante décrite par Cole [20] permet d'associer les propriétés électriques des différents éléments de cellules en suspension et des paramètres géométriques de celles-ci.

$$Z_{ech}(j\omega) = r_e \frac{\sigma_i + \frac{1}{j\omega C_m r}}{\varnothing \sigma_e + (1 - \varnothing) \left(\sigma_i + \frac{1}{j\omega C_m r} \right)} \quad (21)$$

Avec r_e représentant la résistivité du milieu extérieur, r_i la résistivité moyenne du cytoplasme des cellules, C_s la capacité surfacique moyenne des membranes cellulaires, \varnothing la densité volumique de cellules et r le rayon moyen des cellules.

Il est ainsi possible de lier à la fois les propriétés électriques et diélectriques de chaque constituant de base (cytoplasme, membrane, plasma, ...) ainsi que les propriétés géométriques des cellules présentes, telles que leurs dimensions, leurs formes, leurs concentrations à une mesure d'impédance globale à différentes fréquences. Les paramètres ainsi obtenus correspondent à une tendance moyenne dans le cas d'une mesure sur une suspension de cellule. Cette équation à toutefois ces limites, car elle suppose que l'échantillon complet est soumis à un champ électrique parfaitement uniforme lors de la mesure.

L'impédance d'un échantillon biologique, le plus souvent affichée sous forme d'un diagramme de conductivité et de permittivité présente des dispersions. Chacune d'elles correspond au passage de la prédominance, sur l'impédance, d'un effet à un autre. Pour la conductivité, l'effet résistif du milieu extracellulaire sera prédominant en très basse fréquence, puis laissera place à l'effet de la conductivité du cytoplasme. Il en sera de même pour la permittivité avec le passage des effets capacitifs de la membrane plasmique jusqu'à celui de la

permittivité propre de l'eau constituant l'échantillon. On obtient ainsi le diagramme général de dispersion, présenté en Figure 1-8.

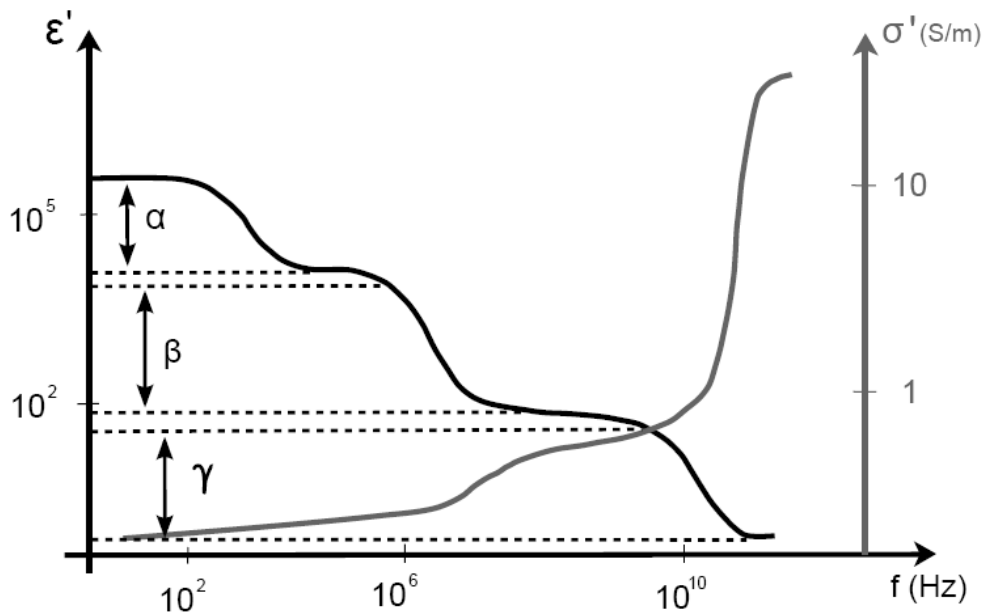


Figure 1-8 Spectres de la permittivité et de la conductivité d'un échantillon biologique avec les zones de dispersion

Dispersion α :

Elle se produit à des fréquences de l'ordre de quelques dizaines de Hertz à quelques kiloHertz. Cette dispersion est due à un phénomène de diffusion ionique qui se produit à la surface des membranes. Elle provoque une forte baisse de la permittivité. Cet effet est surtout présent dans les tissus denses comme le muscle, plus que dans des cellules en suspension, telles que celles du sang. De plus, se produisant à très basse fréquence, elle peut ne pas être visible face aux effets de doubles couches.

Dispersion β :

Elle intervient à des fréquences de l'ordre du mégahertz (entre 500kHz et 20MHz) et correspond à la réaction capacitive de la membrane, qui devient conductrice. On observe une nouvelle chute de la permittivité correspondant désormais à celle de l'eau. Elle est cette fois-ci accompagnée par une augmentation significative de la conductivité. La conductance globale est composée de la conductance du milieu intracellulaire et extracellulaire.

Dispersion γ :

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

La dispersion γ intervient à très haute fréquence, de l'ordre de quelques GHz. A ces fréquences les membranes cellulaires ne jouent plus de rôle d'isolation, et le milieu biologique est perçu comme une simple solution électrolytique. C'est l'orientation dipolaire des molécules d'eau qui est à l'origine de cette dernière dispersion. Etant donnée la fréquence à laquelle elle intervient, il est inutile de l'étudier et de la modéliser pour ce projet.

Afin d'illustrer cette partie, quelques exemples de spectre en permittivités et conductivités sont donnés en Figure 1-9. Il s'agit de résultats obtenus pour un liquide organique, du sang et du muscle, d'après les travaux de Gabriel [21].

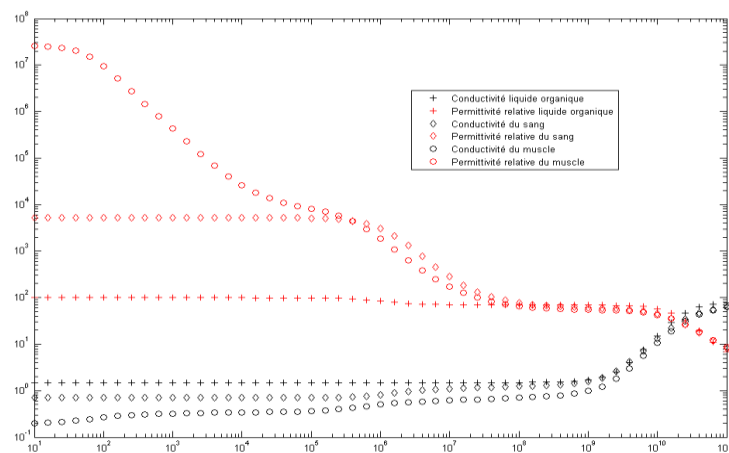


Figure 1-9 Spectres diélectriques caractéristiques du muscle, du sang et d'un liquide organique [21].

Le muscle, tissu dense, présente en très basse fréquence une dispersion α très marquée, qui ne se retrouve pas sur celle du sang et du liquide biologique. La deuxième dispersion, β , est bien marquée à la fois pour le muscle et le sang, avec une forte similarité. Enfin, à plus haute fréquence, pour la dispersion γ , les courbes des trois échantillons sont quasiment confondues, preuve que seuls les effets de polarisation dipolaire de l'eau, présente en très grande quantité dans chacun des échantillons, est majoritaire. De façon générale, les tissus biologiques qui nous intéressent, constitués majoritairement d'eau, possèdent des conductivités de l'ordre du S/m, des capacités membranaires de l'ordre du $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ et des permittivités relatives de 78 environ (celle de l'eau).

Ces données et modèles, très fournis dans la littérature actuelles, le sont beaucoup moins concernant les cellules unitaires, venant principalement du fait que les propriétés des tissus sont surtout connues en termes d'effets globales de toutes les cellules et particules présentées dans l'échantillon complet.

1.5 Cas particulier du sang

1.5.1 Composition

Le sang est un tissu vivant composé de cellules et particules qui baignent dans un liquide, le plasma. Le plasma représente, pour un sujet sain, environ 55% du volume sanguin.

Le plasma :

Il contient environ 90% d'eau dans laquelle sont présents des ions en solution (principalement Na^+ et Cl^-), ainsi que des protéines, des lipides et des glucides. Il sert au transport des cellules sanguines ainsi qu'aux substances vitales comme le glucose, et joue aussi un rôle dans la coagulation. Son comportement global est celui d'une solution électrolytique, défini par une conductance quasi fixe. Les valeurs de conductivités données dans la littérature sont de l'ordre de 1,5 S/m. Il peut être ainsi modélisé par une résistance électrique.

Les cellules et particules :

Les cellules sont principalement composées d'un liquide intracellulaire contenu dans une membrane isolante. Leur modèle classique est celui d'une résistance en série avec une capacité, représentant respectivement le liquide intracellulaire et la membrane. Ce liquide a une conductance du même ordre de grandeur que le plasma et la capacité surfacique est de l'ordre de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Le sang est composé de trois types de cellules et particules :

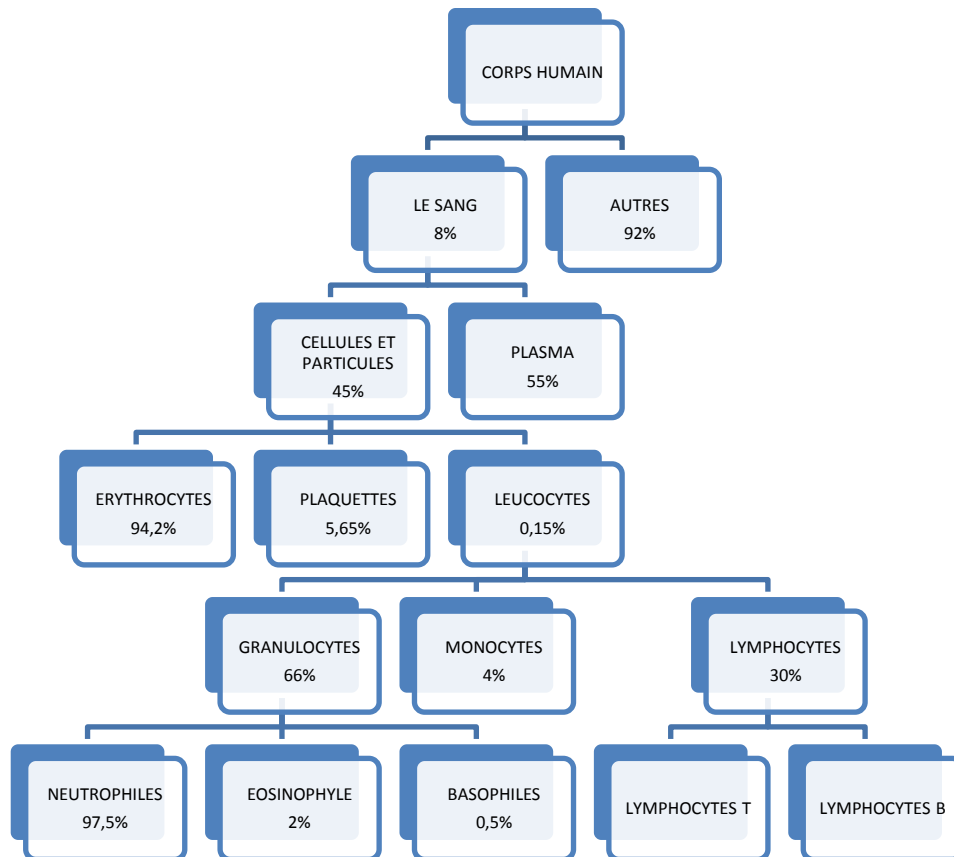
Les globules rouges (érythrocytes): ils représentent 99% des cellules présentes dans le sang, soit environ 4,5 millions par mm^3 . Ils servent à transporter le dioxygène et le dioxyde de carbone. Ils sont dépourvus de noyau et ont une forme biconcave. Dont le diamètre est d'environ 7-8 μm .

Les globules blancs (leucocytes) : Ils sont au nombre de 5 à 10000 par mm^3 . Ils servent à lutter contre les bactéries, virus, parasites et cellules malignes. Ils contiennent tous un noyau de formes différentes, et sont donc les cellules les plus complexes du sang. Ils ont une forme plus sphérique que les globules rouges, et mesurent entre 10 et 15 μm environ. Il en existe plusieurs types, classés en trois grandes familles : granulocytes, monocytes et lymphocytes.

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

Les plaquettes : Ce sont des fragments de cellules produites dans la moelle osseuse, elles jouent un rôle important dans la coagulation du sang. Elles ne sont donc pas comptabilisées en tant que cellules du sang, mais en tant que particules en suspension dans le plasma. Elles ont une taille de l'ordre de 3-4 μm .

Un organigramme, résumant les composés du sang et leurs concentrations est donné en Figure 1-10.



1.5.2 Diagnostics possibles

Les informations présentées ci-après forment une liste non exhaustive de diagnostics susceptibles d'être réalisés par mesures d'impédances.

Conductivité du plasma sanguin :

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

La conductivité du plasma sanguin est fonction de nombreux paramètres, tels que les ions, les protéines et autres molécules qui y sont présents ; ainsi que leurs concentrations. Elle peut donc renseigner sur l'état du patient, notamment sur des carences, comme pour le suivi de dialyse par mesure de conductivité du plasma.

Nombre de cellules et particules :

Le nombre de cellules sanguines peut donner des indications sur l'état de santé du patient. On pense en particulier au nombre de globules blancs qui augmentent de façon significative lors d'une infection, voire même de façon excessive dans le cas de la leucémie. Un nombre trop bas de leucocytes peut être le signe d'une défaillance immunitaire.

Dans le cas des globules rouges, un nombre insuffisant est signe d'anémie, ce qui induit une mauvaise oxygénation des cellules. Les érythrocytes ne doivent pas non plus se trouver en trop grand nombre, comme dans le cas de la polyglobulie.

Les plaquettes jouent un rôle primordial dans la coagulation. Un nombre trop faible de ces fragments de cellule peut entraîner de graves hémorragies, et un nombre trop grand des caillots qui pourraient boucher les veines ou artères.

La détermination de la proportion de chaque type de particules et cellules présentes dans le sang se nomme l'énumération sanguine. Elle constitue le test systématique effectué lors d'une prise de sang, car il permet déjà de détecter dans un grand nombre de cas un problème sanguin, même s'il ne permet pas forcément de le caractériser.

Taille des cellules et particules :

La taille des cellules et particules présentes dans le sang peut nous renseigner sur le bon développement de celles-ci. Là encore, une taille ou une forme anormale peuvent indiquer une pathologie, des cellules infectées, difformes ou immatures, comme pour le cas de leucémie, ou de syndromes génétiques.

Propriétés électriques de la membrane cellulaire et du milieu intracellulaire :

La membrane des cellules possède une forte capacité surfacique. Celle-ci peut diminuer de façon significative dans le cas de cellules infectées ou détériorées. Les propriétés électriques du milieu, tout comme celles du plasma sanguin peuvent varier en fonction de l'état de santé du patient, et nous renseignent donc sur l'état de la cellule. Des études ont

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

notamment prouvé un changement notable de la capacité surfacique des globules parasités par rapport aux globules saines [22].

Les applications décrites ne pourront être mise en œuvre que par la caractérisation de cellules unitaires. Les globules blancs sont en effet les cellules les moins représentés dans le sang, ainsi que les plus diverses. Il est évident que des mesures sur des cellules groupées ne permettront pas une discrimination et un diagnostic précis et qualitatif de ces dernières. Cela justifie donc parfaitement nos désirs de réaliser des caractérisations sur des cellules isolées les unes des autres.

1.6 Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre, que tout matériau est caractérisé par des propriétés électriques et diélectriques, mesurables par spectroscopie d'impédance. Ces propriétés sont issues de phénomènes microscopiques, aussi bien au niveau atomique que moléculaire, dont l'effet global peut être mesuré à l'échelle macroscopique, rendant possible la détection des phénomènes les plus prépondérant.

Les propriétés électriques se définissent par le déplacement libre de charges électriques. Ce déplacement peut s'effectuer de proche en proche par échange d'électrons ou par déplacement de matière (ions) comme dans le cas des solutions électrolytiques. Les propriétés diélectriques se définissent, elles, par la capacité des matériaux à se polariser sous l'effet d'un champ. Cette polarisation peut s'effectuer aussi bien au niveau atomique, comme pour la polarisation électronique, jusqu'à l'échelle moléculaire par la polarisation de charges d'espace. Les phénomènes mesurables associés sont la conductivité et la permittivité électrique. Même si la mesure effectuée est globale, les effets de ses différents mécanismes peuvent être discriminés du fait leurs différentes constantes de temps.

Nous avons vu que les échantillons biologiques sont constitués principalement d'eau. Ce matériau possède à la fois de nombreux effets électriques et diélectriques, qui le différencient de la plupart des autres. Il joue donc un rôle prépondérant dans les mesures d'impédance, de par sa conductivité due à la présence d'ions et de sa grande permittivité induite par la grande polarité de ces molécules. Nous avons vu de plus que des effets complexes se produisent à l'interface entre l'eau et les électrodes de mesure lors de la polarisation de celles-ci.

Tous ces phénomènes, se produisant à des dimensions bien plus faibles que celle d'une cellule, dictent les propriétés de tous les matériaux composants les différentes parties de celle-ci. Nous avons ainsi pu comprendre et caractériser les effets électrique et diélectrique régissant ces différentes parties en fonction de leur composition. Les membranes plasmiques, composées d'une fine double couche de lipide, matériaux possédant une très faible conductivité électrique, se comportent donc comme un diélectrique et apportent une contribution fortement capacitive. Au contraire, le cytoplasme et le milieu extracellulaire, possèdent à la fois des propriétés conductrices apportées par des ions en solution et diélectriques par la grande permittivité de l'eau qui les composent. Les propriétés finales d'un échantillon sont donc fonction des propriétés des composants cités et de leurs rapports

CHAPITRE 1 : Caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie d'impédance

volumiques respectifs. Une mesure d'impédance permet ainsi de déterminer ces propriétés à différentes fréquences ainsi que la concentration cellulaire.

Enfin, nous avons exposé le fait que les tissus distincts présentent des caractéristiques impédométriques différentes, et pouvaient être discriminés par ce type de mesures, mais aussi que les mêmes tissus et cellules peuvent présenter des réponses différentes en fonction de leur état. Nous avons notamment énoncé dans le cas du sang, la possibilité de diagnostiquer certaines pathologies par mesures indirectes des répercussions qu'elles impliquent sur les mesures d'impédance. Ceci est possible dans le cas de cellules de formes ou dimensions anormales, de par la variation du nombre de cellules sanguines en cas d'infections ou encore de la modification des propriétés des membranes plasmiques lorsque des cellules sont parasitées. La mesure d'impédance s'annonce donc comme un moyen efficace d'effectuer des mesures pour le diagnostic d'échantillons cellulaires, sans nécessiter l'utilisation de marqueurs. Cependant, nous avons aussi exposé le fait que seules des caractérisations sur des cellules isolées permettraient d'obtenir assez de précision de mesure pour réaliser une discrimination efficace de chacun des constituants du sang, dans le but par exemple de réaliser un système complet de diagnostic. De telles directives nécessiteront de déterminer les propriétés unitaires des cellules et la réalisation d'un micro-dispositif apte à les isoler et les caractériser.

CHAPITRE 2 : La mesure d'impédance d'échantillons biologiques : Etat de l'art

2.1 Introduction.

Les propriétés électriques des tissus, ainsi que des effets de l'électricité sur le vivant ont fait l'objet d'études depuis plus d'un siècle notamment avec les travaux d'Arsonval ou ceux de Fricke. Cet intérêt est toujours d'actualité avec un regain lié aux évolutions technologiques qui apportent de nouvelles possibilités. C'est le cas par exemple du domaine des laboratoires sur puce. Les mesures, autrefois réalisées avec des signaux de faibles fréquences sur des échantillons de taille macroscopiques, sont désormais réalisés sur des échantillons de taille microscopique (μL ou nL), pouvant descendre jusqu'à la mesure sur cellule unitaire par microélectrodes, désormais possible grâce aux avancées en terme de micro et nano-fabrication.

Nous nous intéresserons dans un premier temps aux mesures macroscopiques réalisées dès le début du siècle dernier. Celles-ci ont permis les premières caractérisations de tissus et cellules au niveau électrique et ouvert la voie vers un nouveau mode de diagnostic possible. C'est aussi à cette époque que les premiers modèles électriques et mathématiques du comportement de ces échantillons vivant ont été établis. L'intérêt de cette revue sur le macroscopique est que, bien que datant de presque un siècle, ces modèles sont toujours d'actualité car ils constituent toujours la base. Avec l'évolution des appareillages de mesures électroniques, et notamment l'augmentation des fréquences de mesures, les échantillons biologiques ont pu être caractérisés de façon plus larges et précises.

La seconde partie sera orientée vers les technologies de micro et nanofabrication « MicroElectroMechanicSystem » MEMS. Inspirées des technologies de fabrication en microélectronique, elles sont utilisées pour réaliser les micro-capteurs et micro-actionneurs actuels, et incontournables pour la réalisation de laboratoires sur puces.

L'intérêt se portera ensuite sur les mesures d'échantillons semi-microscopiques, microscopiques et de cellules unitaires qui contrairement aux mesures macroscopiques, utilisent des technologies de micro fabrication, avec notamment l'emploi de microélectrodes de mesures.

La partie suivante portera sur le domaine de la microfluidique. Les propriétés spécifiques des écoulements microfluidiques, ainsi que les avantages qui en découlent seront exposées. Nous verrons aussi les mesures unitaires de cellules, ainsi que les différentes

actions qui peuvent être accomplies à l'aide de ces dispositifs, notamment lors de leur couplage avec des microactionneurs.

La dernière partie sera consacrée aux technologies des capteurs à ondes élastiques de surfaces (SAW : Surface Acoustic Wave). Utilisées dans un premier temps comme résonateurs ou filtres, ces structures SAW permettent de réaliser une large gamme de capteurs et actionneurs, qui peuvent être astucieusement intégrés à des dispositifs microfluidiques.

2.2 Mesures d'échantillons macroscopiques et modèles associés.

2.2.1 Premières mesures d'échantillons biologiques.

Parmi les premières mesures électriques réalisées sur des tissus biologiques, celles de Fricke [23], dans les années 1920, sont les plus connues et citées en référence. Les mesures qu'il a effectuées dans cette période allaient déjà de 800Hz à 4,5MHz, soit des fréquences permettant la mesure de propriétés de membranes [19]. Ces mesures effectuées sur le sang lui ont notamment permis de développer des modèles électriques liant les différents composants de cellules en suspension dans un liquide. La figure suivante montre les modèles de Fricke représentant les effets de la membrane du cytoplasme et du liquide extracellulaire. Les équations associées, décrivant le comportement spectroscopique de la résistivité et conductivité γ sont aussi présentées. Ceux-ci sont issus de mesures sur des échantillons sanguins. Ces modèles restent aujourd'hui encore les modèles généralement utilisés pour la caractérisation de tissus et échantillons biologiques

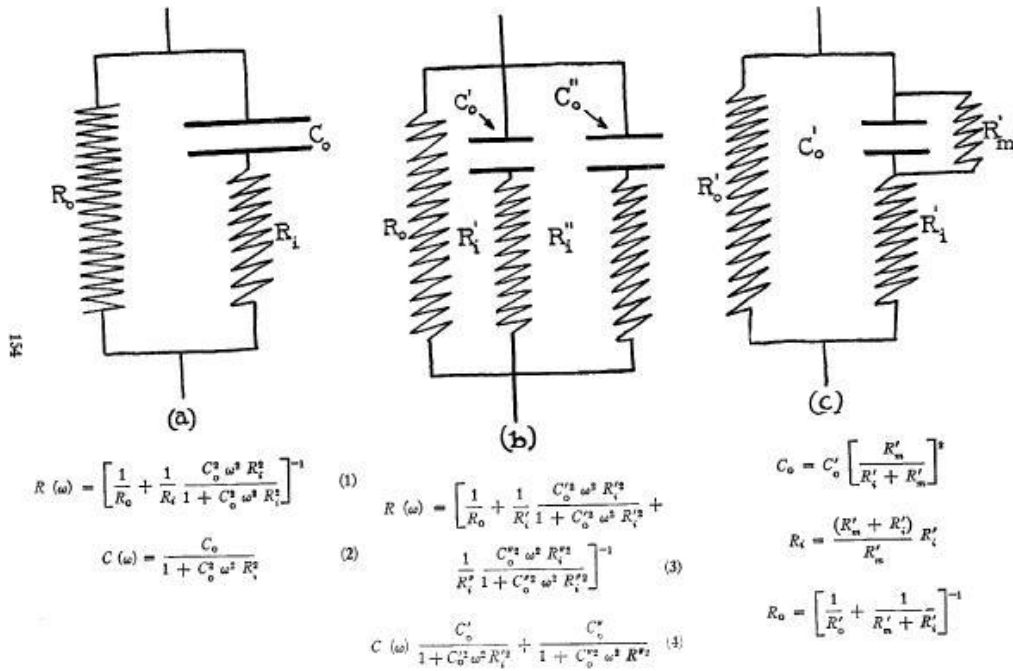


Figure 2-1 Différents modèles représentant les effets des composants des cellules en suspension, ainsi que les modèles associés. D'après Fricke [23].

Un des travaux important de Fricke avait porté sur la mesure sur des tissus mammaires, atteints de tumeurs afin d'établir une corrélation possible entre paramètres électriques et pathologie. Il utilise pour cela une cellule de mesure, présentée en Figure 2-2, qui est composée de deux ampoules en verre reliées entre elles par un diaphragme, ou un échantillon de 1cm³ peut être logé. Sur les côtés de chaque ampoule se trouvent des électrodes, recouvertes de platine afin de limiter les effets d'interface lors de la polarisation des électrodes. Les ampoules sont remplies d'un liquide conducteur pour assurer le contact électrique lors de la mesure. Celle-ci est réalisée par équilibrage manuel d'un pont de Wheatstone. Les mesures effectuées sur les prélèvements de 55 patients [24], ont montré que les tissus atteints de tumeurs malignes présentaient des capacités parallèles plus élevées que ceux atteints de tumeurs bénignes. Il proposa aussi un modèle mathématique [25] sur les milieux dispersifs pour relier les capacités membranaires des cellules composant ces tissus aux mesures de conductivité et de capacité.

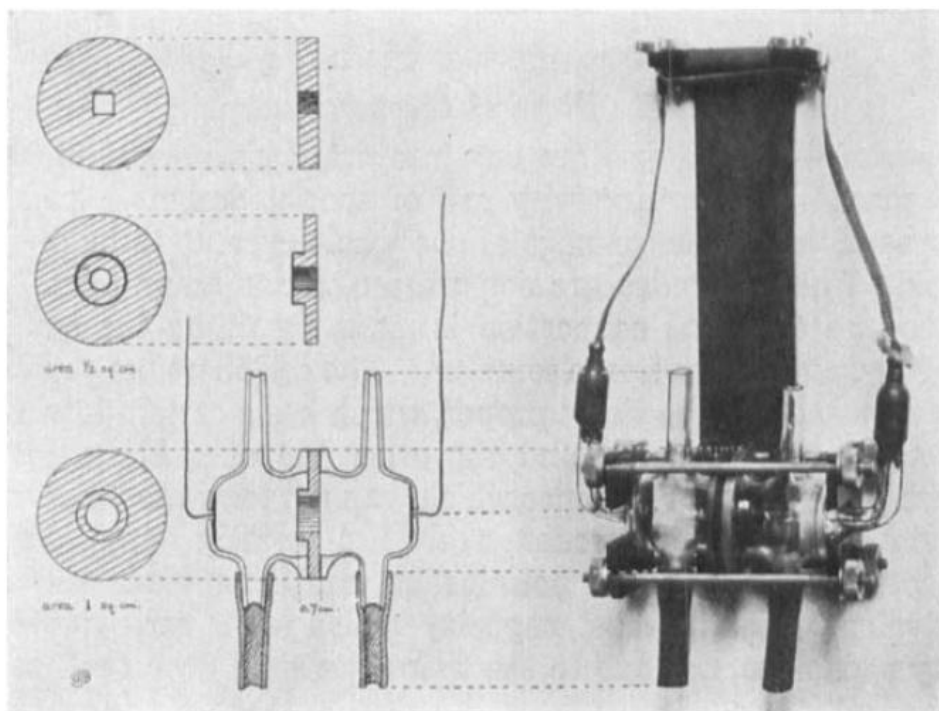


Figure 2-2 Schéma et photographie de la cellule de mesure utilisé pour la caractérisation de tissus du sein présentant des tumeurs. D'après Fricke [24].

2.2.2 Approximation de Maxwell et modèles associés.

Les travaux de Fricke ont permis de montrer que les différents constituants d'un échantillon biologique, et en particulier les membranes cellulaires ont un effet mesurable sur l'impédance globale d'un échantillon et peuvent même nous renseigner sur son état. Afin de caractériser les propriétés de chaque composant de cet échantillon (membrane, cytoplasme et plasma), il est nécessaire d'obtenir un modèle permettant de lier la mesure macroscopique aux éléments microscopiques constituant le milieu.

L'approximation de Maxwell, aussi connue sous le nom d'approximation de Clausius-Mossotti permet à l'origine de calculer l'effet macroscopique du déplacement d'une onde dans un milieu non homogène, en fonction des propriétés et quantité des différents constituant de ce milieu [26]. Elle a été appliquée à l'origine au déplacement d'onde électromagnétique (lumière visible) dans des films métalliques [27], puis principalement repris par Cole [28], qui l'utilisa cette fois pour une onde électrique dans un milieu biologique. L'approximation se base sur l'égalité de deux relations, mettant en équation les conductivités (ou permittivités) de l'échantillon (de façon globale), de l'électrolyte, des particules ainsi que leurs rapports

volumiques dans l'échantillon complet. Celle-ci est décrite ci-dessous et illustrée sur la Figure 2-3 composé de sphéroïdes de conductivité σ_{sph} et permittivité ϵ_{sph} suspendue dans un électrolyte de conductivité $\sigma_{élec}$ et de permittivité $\epsilon_{élec}$ avec une concentration volumique ρ_{vol} .

$$\frac{\frac{\sigma_{éch}/\sigma_{élec} - 1}{\sigma_{éch}/\sigma_{élec} + 2}}{\sigma_{élec}} = \rho_V \frac{\frac{\sigma_{sph}/\sigma_{élec} - 1}{\sigma_{sph}/\sigma_{élec} + 2}}{\sigma_{élec}} \quad (22)$$

$$\frac{\frac{\epsilon_{éch}/\epsilon_{élec} - 1}{\epsilon_{éch}/\epsilon_{élec} + 2}}{\epsilon_{élec}} = \rho_V \frac{\frac{\epsilon_{sph}/\epsilon_{élec} - 1}{\epsilon_{sph}/\epsilon_{élec} + 2}}{\epsilon_{élec}} \quad (23)$$

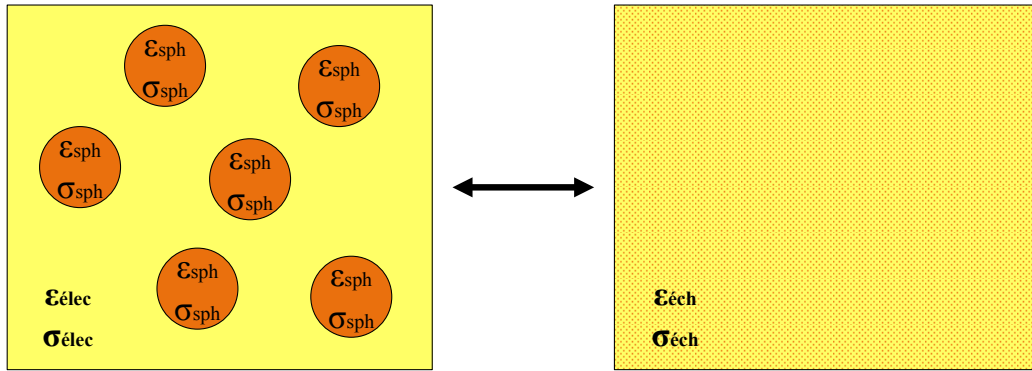


Figure 2-3 Représentation schématique de sphéroïdes en suspension et du milieu homogène équivalent obtenu avec l'approximation de Maxwell.

Une autre approximation est aussi formulée cette fois ci pour des sphères concentriques, pouvant représenter une cellule avec son cytoplasme et sa membrane plasmique. Les deux équations ci-dessous permettent de lier la conductivité σ_{sph} et la permittivité ϵ_{sph} globale de sphères concentriques, en fonction des conductivités σ_{int} et σ_{ext} et permittivités ϵ_{int} et ϵ_{ext} des sphères intérieures et extérieures et de leur rayons respectifs r_{int} et r_{ext} . Elles sont illustrées en Figure 2-4.

$$\sigma_{sph} = \sigma_{mem} \frac{(2\sigma_{mem} + \sigma_{int})r_{ext}^3 - 2(\sigma_{mem} - \sigma_{int})r_{int}^3}{(2\sigma_{mem} + \sigma_{int})r_{ext}^3 + (\sigma_{mem} - \sigma_{int})r_{int}^3} \quad (24)$$

$$\epsilon_{sph} = \epsilon_{mem} \frac{(2\epsilon_{mem} + \epsilon_{int})r_{ext}^3 - 2(\epsilon_{mem} - \epsilon_{int})r_{int}^3}{(2\epsilon_{mem} + \epsilon_{int})r_{ext}^3 + (\epsilon_{mem} - \epsilon_{int})r_{int}^3} \quad (25)$$

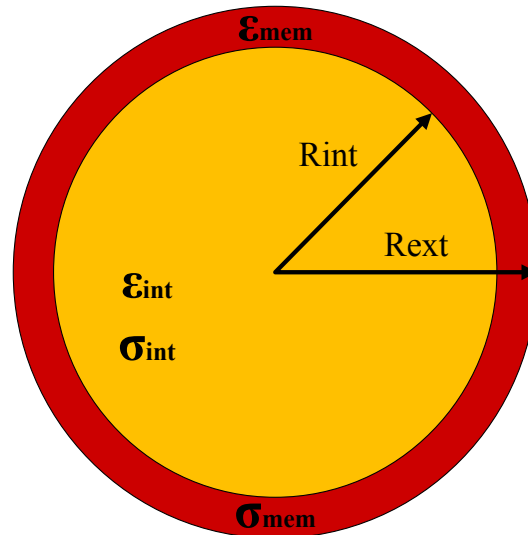


Figure 2-4 Représentation schématique de deux sphères concentriques de propriétés électriques et diélectriques différentes, et de la sphère homogène équivalente obtenue avec l'approximation de Maxwell.

Il est ainsi possible, avec un tel modèle, de calculer des structures non-homogènes constituées d'une multitude de sphères concentriques et/ou sphéroïdes en suspension. Par exemple, dans le cas d'une suspension de cellules contenant des noyaux et/ou organites, il est possible de déterminer l'effet de chacune des parties composant cette structure, en procédant par étape :

- Calcul avec les équations (24) et (25) des propriétés des organites (avec les effets de leur milieu intérieur et de la membrane plasmique).
- Calcul avec les équations (22) et (23) des propriétés du cytoplasme (avec les effets des organites en suspension dans un électrolyte).
- Calcul avec les équations (24) et (25) des propriétés des cellules (avec les effets du cytoplasme et de la membrane cellulaire).
- Calcul final, avec les équations (22) et (23) des propriétés des cellules en suspension dans un électrolyte.

2.2.3 Avancées et applications actuelles.

Les mesures d'impédance d'échantillons biologiques sont utilisées et développées dans de nombreux types d'applications. Cette diversité s'explique notamment par les

CHAPITRE 2 : La mesure d'impédance d'échantillons biologiques : Etat de l'art

avancées en matière de mesures électriques, aussi bien par les précisions des appareillages que les types de signaux utilisables ainsi que les connaissances plus approfondies des propriétés d'une grande diversité de tissus. On pourra en particulier citer les travaux d'Hermann Schwan [29], qui réalisa les premières mesures hautes fréquences d'échantillons biologiques et de nombreuses investigations sur le sang [17]. Les mesures hautes fréquences (de la centaine de MHz jusqu'à plusieurs dizaines de GHz), permettent la caractérisation plus approfondie des tissus biologiques, en particulier sur l'eau qu'ils contiennent.

Les applications les plus évidentes, concernent le diagnostic de pathologies ou de troubles organiques. Dans ce cas, les mesures d'impédance permettent de détecter des pathologies, ou du moins des anomalies présentes dans l'impédance du tissu mesuré. Des mesures hautes fréquences sur du sang, effectuées au sein de notre équipe, ont pu mettre en évidence la dépendance aux taux d'hématocrites, de l'impédance à ces fréquences [30]. L'hématocrite est une des principales mesures effectuées lors d'une prise de sang, et pourrait donc être mesurée quasi instantanément par spectroscopie d'impédance. D'autres mesures hautes fréquences ont aussi pu montrer la possibilité de différencier des cellules pulmonaire saines et malignes [31]. De plus, ces mesures électriques permettent, en fonction des fréquences utilisées, de déterminer des propriétés présentes en profondeur dans les tissus par simple contact des électrodes, permettant ainsi d'effectuer des diagnostics non invasifs [32]. Parmi ceux-ci, il est possible de citer les travaux de Fenech sur le suivi par mesure non-invasive de l'hémodialyse [33]. Cette mesure est effectuée en continue en appliquant diverses électrodes sur le corps du patient, comme illustré en Figure 2-5.

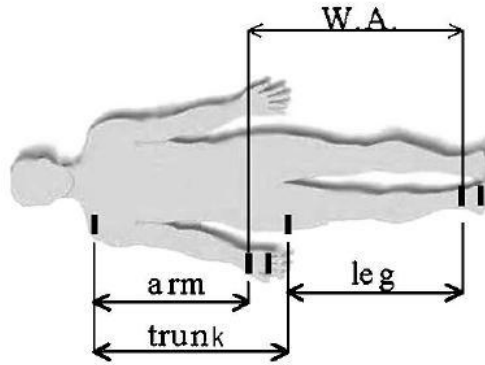


Figure 2-5 Placement des électrodes sur le corps humain pour la mesure de la variation du volume intracellulaire et extracellulaire lors de l'hémodialyse. D'après les travaux de Fenech[34]

Le pourcentage de graisse dans le corps humain peut aussi être mesuré en fonction des propriétés diélectriques [35], l'eau ayant une constante diélectrique supérieure à celle des graisses [36],[37]. Ces mesures sont déjà utilisées dans les balances impédimétriques.

Un autre grand axe concerne le suivi de l'évolution des cellules composant un tissu ou une suspension. Nous avons vu que l'état physique et chimique des cellules composant un tissu, ainsi que leurs nombres influe sur l'impédance globale de celui-ci. Il est par exemple possible de suivre le développement de cellule embryonnaire ou de reproduction cellulaire. Dans ces deux cas, le nombre croissant de cellules, et même de leurs propriétés modifie de façon significative l'impédance de l'échantillon mesuré au cours du temps. Le ratio du volume cellulaire par rapport au liquide extracellulaire se trouve modifié, de même que les effets diélectriques à l'augmentation des surfaces membranaire [38], comme illustré sur la Figure 2-6.

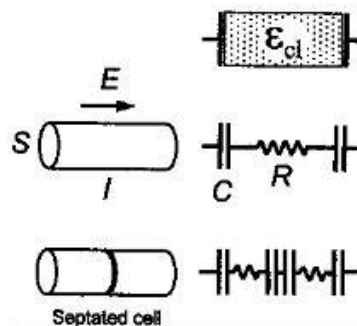


Figure 2-6 Modification du modèle électrique cellulaire au cours de la division cellulaire. D'après Asami [38].

De même des cellules en voie de détérioration, ou mourantes voient leurs impédances changer de manière radicale. Lors de la lyse, qui est la désintégration de la membrane d'une

cellule, un changement très perceptible des propriétés d'un échantillon biologique est aussi provoqué. La destruction de la membrane de la cellule et des organites libère le cytoplasme dans le liquide extracellulaire, provoquant ainsi, à l'opposé de la division cellulaire, une diminution des effets capacitifs jusqu'à obtenir un échantillon proche d'une simple solution ionique. Les travaux de Arndt [39] illustrés en Figure 2-7, montrent bien la disparition progressive du palier en impédance, induit par les effets capacitifs des membranes, au cours de l'apoptose (mort programmée d'une cellule, entraînant la lyse de sa membrane). Il est possible avec ce type de mesures, de déterminer par exemple l'état d'un tissu tel que le sang lors de sa conservation [40], ou même de suivre le développement correct de cellules spécialisées, issue de cellules souches [41].

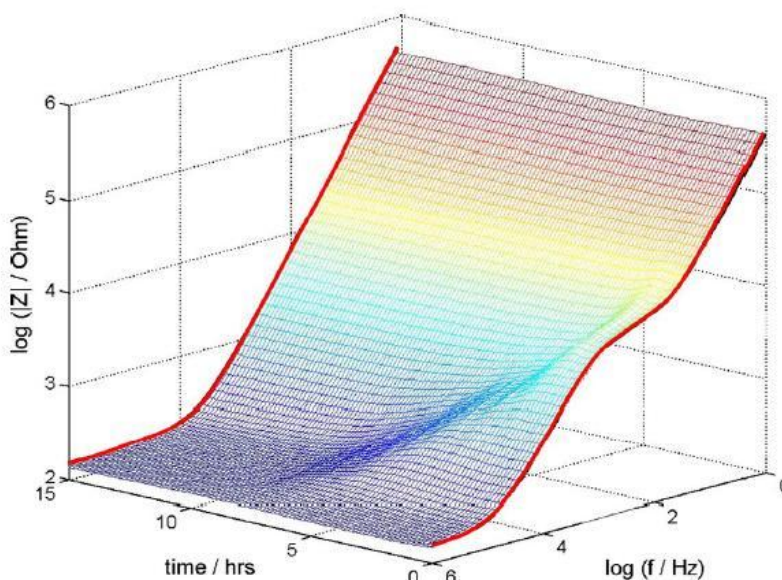


Figure 2-7 Variation de l'impédance de cellules endothéliales déposées sur de électrodes d'or, au cours de leur apoptose. D'après les travaux de Arndt [39].

Les avancées en termes de modélisation et de connaissance des propriétés électriques des tissus permettent la modélisation et la simulation de systèmes complexes, tels que le corps humain, constitué d'environ 80 tissus différents. Les travaux C et S Gabriel sur l'étude des propriétés de nombreux tissus issus de la littérature [42], leurs comparaisons avec leurs propres mesures [43], et l'établissement de leurs modèles paramétriques dans une large gamme de fréquence [21] constituent actuellement une référence exhaustive reconnue. Des études en bioélectromagnétisme ont été développées par le passé au sein même de notre équipe notamment en hyperthermie anticancéreuse, en ablathérapie intracardiaque, en

dosimétrie électromagnétique et CEM des implants médicaux actifs [44] et en spectroscopie d'impédance macroscopique [45] [46].

2.3 Mesures d'échantillons par micro-électrodes.

Avec les technologies de micro-fabrication, décrites en ANNEXE 2, il devient possible de réaliser des capteurs avec des zones de mesures et/ou des électrodes de dimensions comparables à celles de micro-organismes et cellules. Les conditions nécessaires à l'étude et à la caractérisation de cellules unitaires ou en faible nombre, ainsi que l'étude des mécanismes régissant leurs comportements sont donc réunies. Il existe des électrodes dites semi-microscopique, qui possèdent des dimensions utiles à la fois de grandeurs microscopiques et macroscopiques, et purement microscopiques, dont toutes les dimensions sont micrométriques.

2.3.1 Capteurs à électrodes interdigitées.

Les capteurs à électrodes interdigités sont des capteurs qui peuvent être de type semi-microscopiques ou microscopiques suivant les paramètres géométriques utilisés. Leur structure est composée de deux rangées d'électrodes en peigne (les digits) placées tête bêche, comme illustré en Figure 2-8. Ces capteurs ont en général un nombre de digits, de longueur souvent macroscopique (millimétrique ou submillimétrique), mais d'écartement et largeur microscopiques, donnant une surface utile millimétrique.

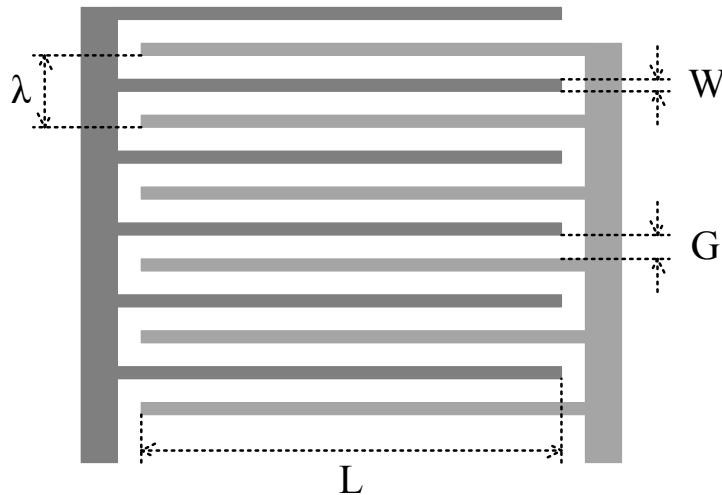


Figure 2-8 Vue schématique d'un capteur à électrodes interdigitées; avec L la longueur des digits, W leurs largeur, G leur écartement et λ la périodicité.

Le principal intérêt de ce type de capteur est que la surface de contact avec l'échantillon est relativement grande, pour un volume de mesure utile restreint. Le champ émis par les électrodes lors de la mesure ne pénètre dans le matériau en contact que d'une profondeur limitée à $\lambda/2$ [49], comme illustré en Figure 2-9, et peut être calculé à l'aide d'équations elliptiques.

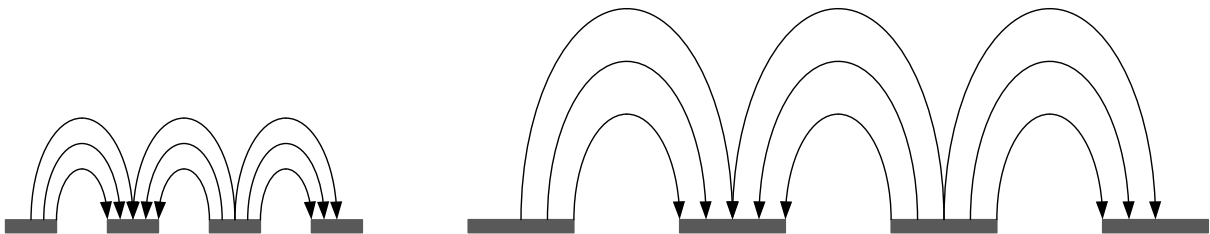


Figure 2-9 Répartition du champ électrique lors d'une mesure avec des électrodes interdigitées, vue de coupe. D'après [49].

Il est ainsi possible de mesurer les propriétés d'un matériau en contact, sur une profondeur bien précise, dépendant des écartements et largeur d'électrodes choisies. Parmi ces mesures, on peut notamment trouver la mesure des propriétés superficielles de tissus fins, tel que la peau [50] ou de substrats cellulaires [51]. Les travaux de Madhukar Varshney [52] ont aussi montré la possibilité de détecter et quantifier des bactéries toxiques comme *Escherichia coli* O157:H7, extraites à l'aide de billes magnétiques. De faibles quantités de cellules et particules peuvent être détectées si celles-ci sont majoritairement présentes dans la zone active de mesure; par exemple par décantation d'un échantillon (Figure 2-10). Ces

particularités permettent de mesurer et surveiller indirectement le comportement de cellules à proximité des électrodes [53], et notamment l'adhésion cellulaire. L'adhésion cellulaire, est une donnée importante. Celle-ci est parfois nécessaire à la survie et à la reproduction de certains organismes, et peut être fortement modifiée par différentes pathologies [54].

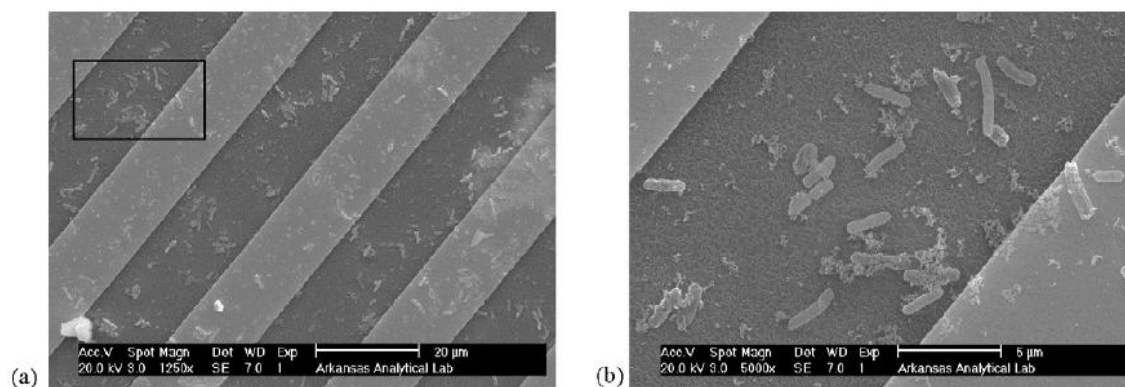


Figure 2-10 Image au microscope électronique de bactérie esch avec nanoparticules magnétique présente à la surface d'une structure interdigitée. D'après Madhukar Varshney [52].

Nous savons que les effets de polarisation dépendent de la surface de contact entre les électrodes et l'échantillon, et que leurs effets sont réduits par l'augmentation de cette surface. Or, ce type de capteur présente une grande surface de contact tout en concevant une zone de mesure microscopique. Il permet donc une mesure microscopique tout en gardant les avantages des contacts macroscopiques. De plus, la fréquence de disparition des effets d'interface peut être optimisée en jouant sur les différents paramètres géométriques du capteur, tout en gardant la même surface [55]. Notre travail de master a porté sur ce sujet et notre équipe a développé un capteur de ce type notamment durant la thèse de Ibrahim [56].

2.3.2 Capteurs à matrices d'électrodes.

Ces types de capteurs, comme les précédents, présentent des zones actives de mesures très superficielles, mais avec des électrodes purement microscopiques. Les électrodes, en grand nombre sont réparties sur une surface totale macroscopique, en général de dimensions millimétriques mais sont utilisables indépendamment. Elles permettent d'effectuer simultanément un grand nombre de mesures dans chacune des zones discrètes couvertes par une électrode. On obtient ainsi un nombre important de mesures sur l'état de chaque partie de l'échantillon. Un exemple, issu de travaux de Qingjun Liu [57] est présenté en Figure 2-11. Il

s'agit d'une matrice de 10 électrodes par 10 électrodes, permettant le suivi de la culture et de l'adhésion de cellules cancéreuses.

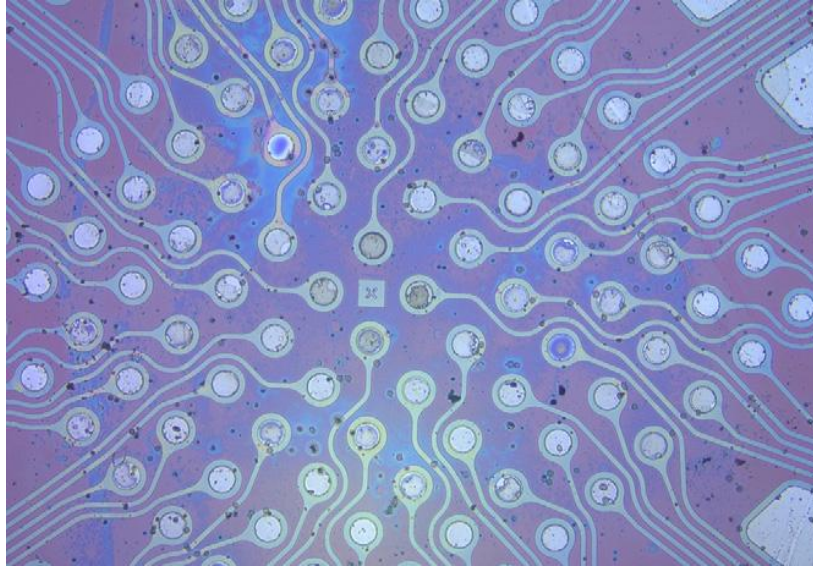


Figure 2-11 matrice de micro-electrodes en platine (10x10). D'après Qingjun Liu [57].

2.3.3 Mesures de cellules unitaires.

Les capteurs cités précédemment, réalisés avec les technologies de microfabrication, ont permis la mesure de faibles quantités de cellules par la réduction du volume de la zone sensible. Ces techniques peuvent encore être poussées plus loin en diminuant encore les dimensions des électrodes. Les technologies actuelles permettent d'obtenir sans difficulté des électrodes de dimensions utiles égales ou inférieures au micron, soit des dimensions inférieures à celle d'une cellule et de la plupart des bactéries, la mesure unitaire est parfaitement possible. Dans le cas de telles mesures, la phase sensible est le placement correct de la cellule dans la zone de mesure. Pour cela il existe deux grands types de techniques de placement : manuel ou automatique par aspiration.

Placement manuel :

Dans ce cas, la structure du capteur à électrodes est en général simple: de simples électrodes formées par un seul dépôt. La phase délicate est le dépôt de la cellule à analyser au centre de la zone de mesure. Ce dépôt est effectué manuellement à l'aide d'une micropipette à pointe micrométrique assistée par des guides de déplacement de précision, et suivit par

microscopie optique. La Figure 2-12 représente le schéma et un agrandissement optique de microélectrodes circulaires développées par Lamya Ghenim [58], pour la mesure en continu de l'adhésion et de la mitose d'une cellule déposée au centre des électrodes.

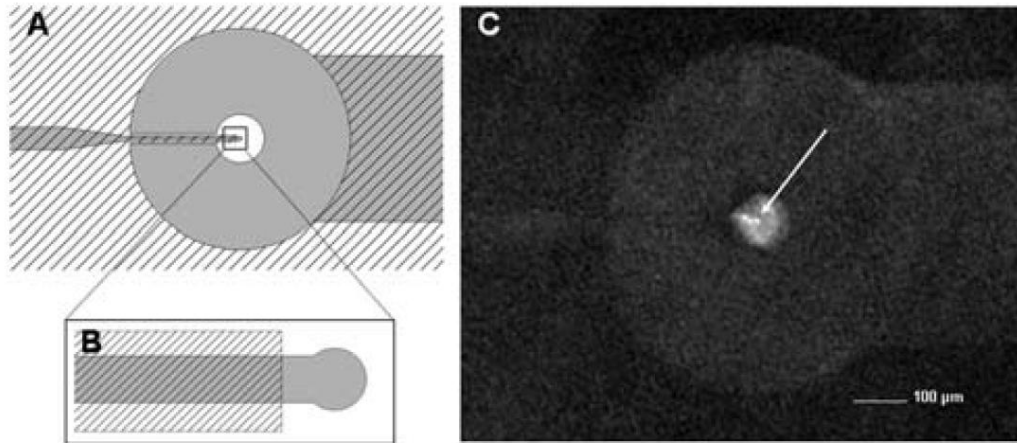


Figure 2-12 Schéma et agrandissement par microscopie optique d'électrodes circulaires pour la mesure unitaire de cellules. D'après Lamya Ghenim [58].

Placement par aspiration :

Cette fois-ci, le type de capteur utilisé est plus complexe. En plus des dites « électrodes de mesures », un système tridimensionnel est mis en place pour le déplacement de la cellule jusqu'aux électrodes. Pour ce faire, le substrat sur lequel doit venir reposer la cellule doit comporter un trou débouchant, de diamètre inférieur à celui de la cellule [59]. En imposant un gradient de pression de part et d'autre le liquide contenant la/les cellule(s) s'écoule par ce trou jusqu'à la capture d'une cellule. Une électrode de référence (qui peut être macroscopique) est placée dans le liquide, l'autre électrode est soit déposée autour du trou, soit placée dans le liquide présent de l'autre côté du trou. Une illustration est donnée en Figure 2-13.

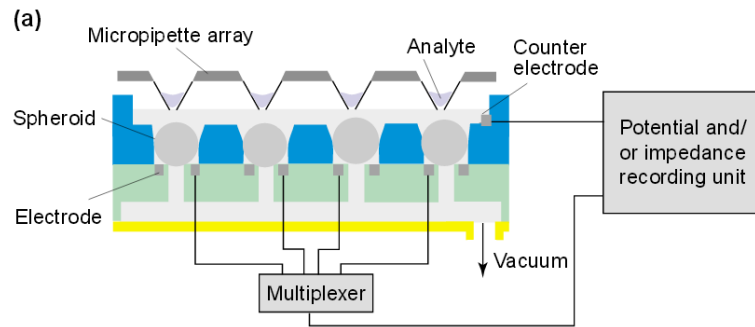


Figure 2-13 Représentation schématique d'un capteur à micro-trou pour la mesure de cellules unitaire en vue de coupe. D'après Hagen Thielecke [60].

Cette technique est une évolution de la technique plus ancienne de « Patch clamp » consistant à effectuer le même type de mesure en capturant une cellule au bout d'une micropipette à pointe micrométrique [61]. Son principal avantage est que la cellule bouche l'intégralité du trou : le champ électrique, même à basse fréquence ne traverse donc que la cellule. Cela permet entre autre de mesurer aisément les propriétés de la membrane, et principalement sa résistivité très faible, dont l'effet est très difficilement mesurable dans le cas d'une cellule en suspension. Cependant la cellule peut subir des contraintes mécaniques assez fortes, pouvant la déformer et fausser certains types de mesures.

2.4 Aspects microfluidiques.

L'utilisation de dispositifs microfluidiques, outre le fait de pouvoir déplacer de faibles quantités de liquide et de particules, permet d'obtenir des effets physiques différents de ceux que l'on obtient habituellement avec des dispositifs de taille macroscopique. Ces effets peuvent être aussi bien bénéfiques que désavantageux, suivant la situation. Dans cette partie, nous allons voir comment tirer parti de ces effets pour la mesure unitaire de cellules, ainsi que la réalisation des mesures elles-mêmes.

2.4.1 Caractéristiques des écoulements microfluidiques.

Écoulements laminaires.

Les écoulements microfluidiques présentent beaucoup de différences avec les écoulements classiques. Ceux-ci sont notamment dus au rapport surface de contact/volume qui augmente considérablement à mesure que les dimensions diminuent, au rapport entre les forces inertielles et de viscosité, et au rapport des effets de capillarité par rapport à la gravité.

Les écoulements fluidiques à l'échelle macroscopique sont très généralement de type turbulent. C'est-à-dire que le fluide en déplacement subit un remous/mélange permanent : le gradient des molécules/particules est globalement orienté dans la direction d'écoulement, mais ce n'est pas le cas d'une molécule/particule isolée. Dans le cas de la microfluidique, l'écoulement est la plupart du temps de type laminaire, c'est-à-dire que toutes les molécules/particules composants le liquide suivent presque parfaitement le gradient de vitesse global du fluide. La principale manifestation de ce phénomène se traduit par le fait que deux liquides différents, mis en contact lors d'un écoulement, ne vont pas se mélanger sur une grande distance. L'expérience la plus démonstrative consiste à faire se rencontrer deux liquides en écoulement microfluidique dans une structure en H, comme celle de la Figure 2-14. Les deux liquides vont entrer en contact dans la zone centrale, sans se mélanger, puis repartent chacun de leur côté.

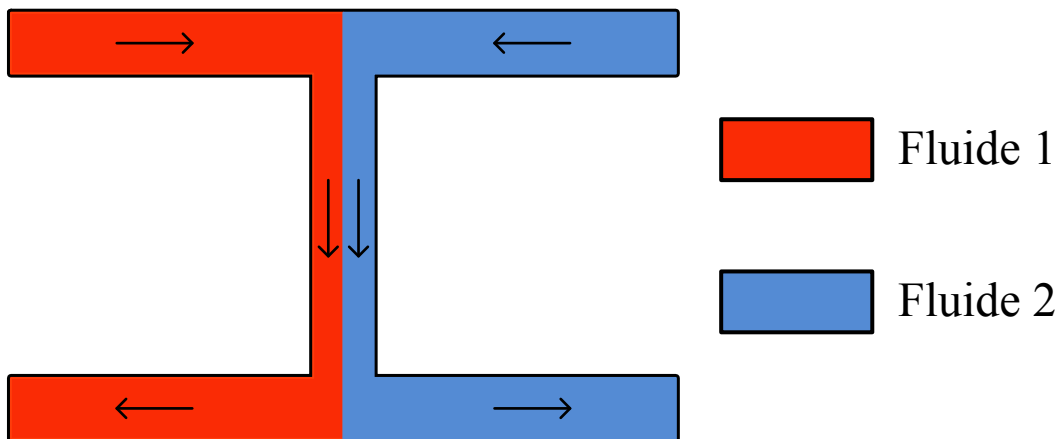


Figure 2-14 Schéma représentant un écoulement laminaire dans une structure en H.

Il est possible de déterminer par le calcul si le comportement d'un fluide sera laminaire ou non en fonction du nombre de Reynolds [62]. Ce nombre sans dimension représente le ratio entre les forces d'inertie et les forces visqueuses. Il est fonction de la vitesse caractéristique du fluide U_0 , de sa viscosité cinématique ν (viscosité dynamique divisée par la densité), et de la dimension caractéristique du conduit L_0 comme décrit dans l'équation (26).

$$Re = \frac{U_0 L_0}{\nu} \quad (26)$$

CHAPITRE 2 : La mesure d'impédance d'échantillons biologiques : Etat de l'art

La dimension caractéristique correspond à la plus petite dimension de la section du conduit, soit le diamètre pour un tube ou la hauteur pour un canal. Il existe deux valeurs clés du nombre de Reynolds :

- Si R_e est inférieur à 2000, l'écoulement est laminaire.
- Si R_e est supérieur à 3000, l'écoulement est turbulent.
- Si R_e est compris entre 2000 et 3000, l'écoulement est transitoire.

Pour un microcanal de $100\mu\text{m}$ de dimension caractéristique, L'écoulement sera laminaire pour de l'eau si la vitesse du fluide est inférieure à 20m/s . Les écoulements dans des microcanaux sont donc presque toujours laminaires, sauf dans certain cas extrêmes. Un moyen visuel permet de valider la laminarité de l'écoulement. Il suffit pour cela de faire déplacer une petite quantité de liquide dans un canal, de façon à ne pas le remplir complètement. Les extrémités du liquide en contact avec l'air présentent alors des formes elliptiques.

La longueur capillaire L_c est un autre nombre caractéristique en microfluidique. Il s'agit de la taille caractéristique d'un fluide à partir de laquelle les forces de gravité sont prédominantes par rapport aux forces de capillarité. Les forces de gravité doivent aussi rester faibles devant celles de capillarité pour que leurs effets sur les fluides et particules qui les composent puissent être négligés. Celle-ci s'exprime pour un liquide donné en fonction de sa tension de surface γ , de sa densité ρ et de la gravité g par la relation suivante :

$$L_c = \sqrt{\frac{\gamma}{\rho g}} \quad (27)$$

Pour l'eau, avec une tension de surface avec l'air de 73 g/s^2 , et une densité de 1g/cm^3 on obtient une longueur capillaire de $2,73 \text{ mm}$ environ. Cette longueur étant bien supérieure aux dimensions de microcanaux, l'effet de la gravité dans le déplacement des fluides pourra être négligé.

Mélanges et diffusion microfluidique :

Il a été dit précédemment que deux fluides laminaires en déplacement ne se mélangent pas. Ceci peut donc poser des problèmes si le but d'un dispositif est de mélanger de faibles

quantités de liquides. En réalité les deux fluides en contact échangent à la fois des particules et des molécules par diffusion. Ce processus, contrairement au mélange par brassage, est très lent et est inversement proportionnel à la taille de la particule mise en jeu. Cette particularité, qui peut être très intéressante pour certaines applications, telles que le tri de particules par taille. En faisant circuler un fluide contenant plusieurs types de particules en contact avec un autre fluide sans particules, celles présentes dans le premier vont se diffuser dans le second. En régulant le temps et/ou la distance de contact entre les deux fluides il est possible de diffuser les particules de petites tailles dans le deuxième liquide, tout en concevant la totalité des particules de plus grande taille dans le premier. Il est possible d'effectuer cette manipulation avec un système en H illustré en Figure 2-15. Les paramètres de diffusion pour chaque type de particules peuvent être déterminés à l'aide du nombre de Péclet, défini par:

$$P_e = \frac{U_0 w}{D} \quad (28)$$

Ce nombre est fonction de la vitesse caractéristique du liquide U_0 , de la largeur du canal w et du coefficient de diffusion D (en m^2/s) de la particule. La particule sera diffusée sur toute la largeur du canal si P_e est inférieur ou égal à 1.

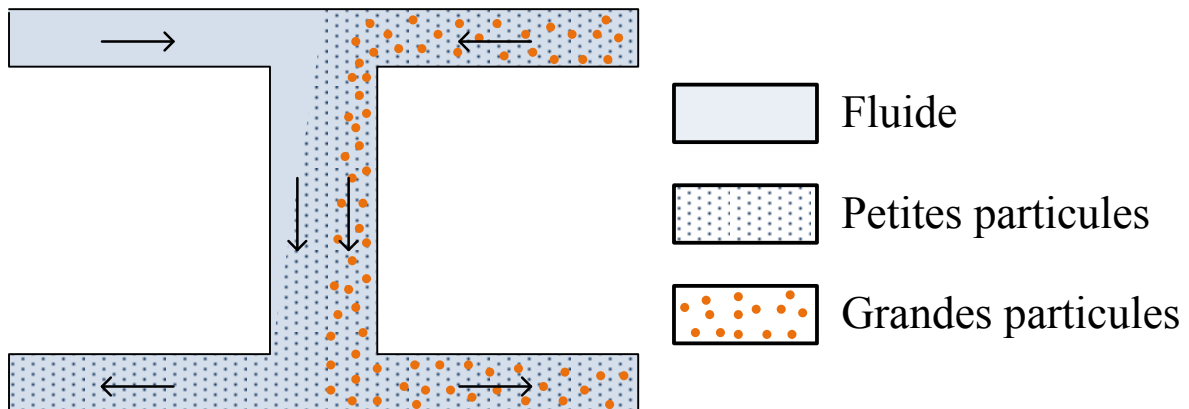


Figure 2-15 Représentation schématique du phénomène de diffusion pour des particules de différentes tailles, avec un système microfluidique en H.

2.4.2 Applications pour la manipulation de cellules et particules.

Les structures microfluidiques, ainsi que les propriétés laminaires des fluides y circulant, ouvrent de nombreux horizons en termes de manipulation et de caractérisation des cellules et particules.

Focalisation et centrage de particules :

Certaines applications, notamment la caractérisation de particules nécessite une focalisation et un centrage des particules dans le canal. Ce procédé permet d'isoler ou de rassembler les particules les unes derrière les autres pour augmenter la discrimination et la sensibilité de mesure lorsque celle-ci passeront dans la zone de mesure. La laminarité des écoulements permet de réaliser cette manœuvre simplement. Il suffit par exemple, comme illustré en Figure 2-16, d'injecter symétriquement de part et d'autre du canal principal, une solution tampon par des canaux secondaires [63].

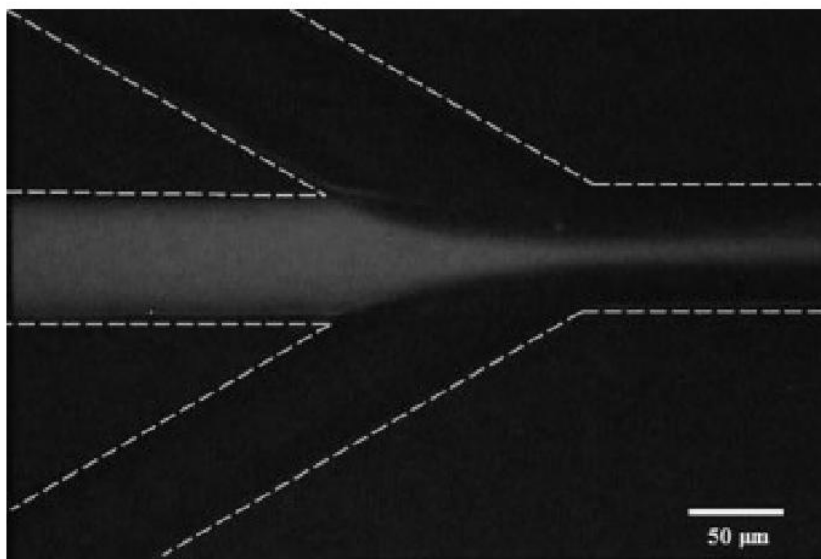


Figure 2-16 focalisation hydrodynamique réalisé à l'aide de deux canaux secondaires. D'après Kwang Bok Kim [63].

Le flux du canal principal se retrouvera focalisé au centre du canal. Le degré de focalisation pourra être contrôlé en modifiant le rapport entre le débit du canal central et des canaux secondaires.

Tri de cellules.

Comme nous l'avons déjà vu dans la partie 2.4.1, les effets de diffusion sont majoritaires et peuvent permettre d'effectuer du tri de particule par taille, en fonction des dimensions du canal et du débit du fluide. Cette technique permet de trier les particules en fonction de leur taille uniquement, et peut nécessiter de répéter le processus plusieurs fois pour isoler complètement une espèce d'une autre. Il est ainsi possible de trier par exemple des cellules sanguines par taille, et même d'en extraire le plasma [64], comme présenté en Figure

2-17. On peut y voir l'extraction d'une partie du plasma sanguin dans deux canaux de part et d'autre du canal principal, lorsque la vitesse de déplacement est suffisante pour que les globules rouges ne puissent se diffuser sur les côtés.

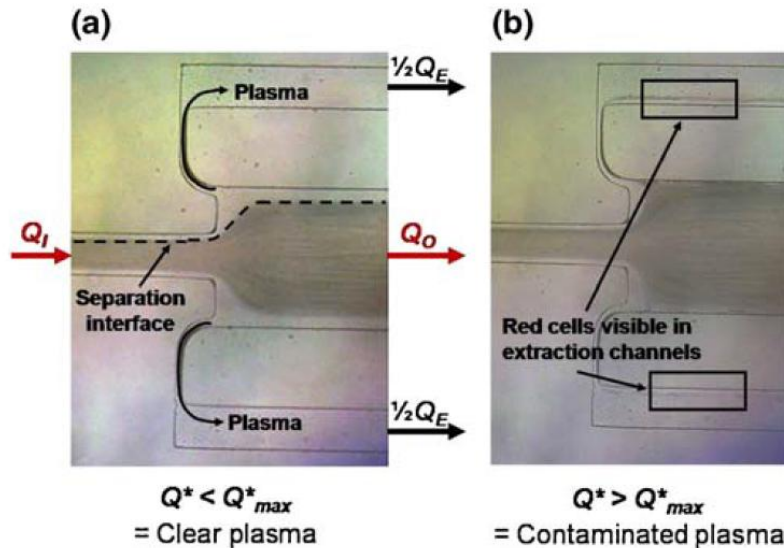


Figure 2-17 Système microfluidique pour l'extraction du plasma sanguin. a) débit suffisant pour n'extraire que le plasma. B) débit insuffisant laissant passer une partie des globules rouges. D'après [64]

Une autre grande technique de séparation consiste à trier les particules en fonction de leurs propriétés diélectriques par application d'un champ électrique. En appliquant un champ électrique fixe et uniforme de part et d'autre du canal, les particules non-neutres telles que les ions en solution sont attirées par l'électrode de charge opposée à la sienne. Cette technique, appelée électrophorèse ne fonctionne qu'avec des espèces chargées et n'est donc pas applicable aux cellules et bactéries qui sont globalement neutres. Il existe dans ce cas une autre technique, la diélectrophorèse, utilisant les propriétés diélectriques des particules. Comme nous l'avons vu au premier chapitre, tout matériau possède des propriétés diélectriques et peut donc être polarisé. En prenant le cas d'une sphère homogène de permittivité différente de celle du milieu extérieur, il se produira une polarisation à l'interface entre celle-ci est le milieu extérieur, d'où l'apparition des forces le long de la surface. Dans le cas d'un champ uniforme, la résultante de ces forces est nulle. On applique donc un champ électrique volontairement non uniforme afin que la force résultante soit non nulle. La force globale résultante sur une particule est donnée par l'équation suivante :

$$F_{DEP} = 2\pi r^3 \varepsilon_{ext} R_e \{K(\omega)\} \nabla |E_{rms}|^2 \quad (29)$$

$$\text{Avec } K(\omega) = \frac{\varepsilon_{ext}(\omega) - \varepsilon_{sph}(\omega)}{\varepsilon_{ext}(\omega) + 2\varepsilon_{sph}(\omega)} \quad (30)$$

Le coefficient K représente le rapport de Clausius-Mossotti, que l'on retrouve dans l'approximation de Maxwell. La direction de la force de diélectrophorèse dépend du signe de $K(\omega)$, or celui-ci dépend des permittivités complexes du milieu extérieur et de la particule, et donc de la fréquence utilisée. En choisissant judicieusement la ou les fréquences de diélectrophorèse, il est possible d'orienter différemment des particules ne présentant pas les mêmes spectres en impédance [65], comme illustré en Figure 2-18. Cette méthode permet de séparer des cellules de dimension identiques, mais présentant des réponses électrique différentes, comme dans le cas de cellules saines et infectées ou mortes [66]. Elle peut être utilisée en série avec un tri par diffusion.

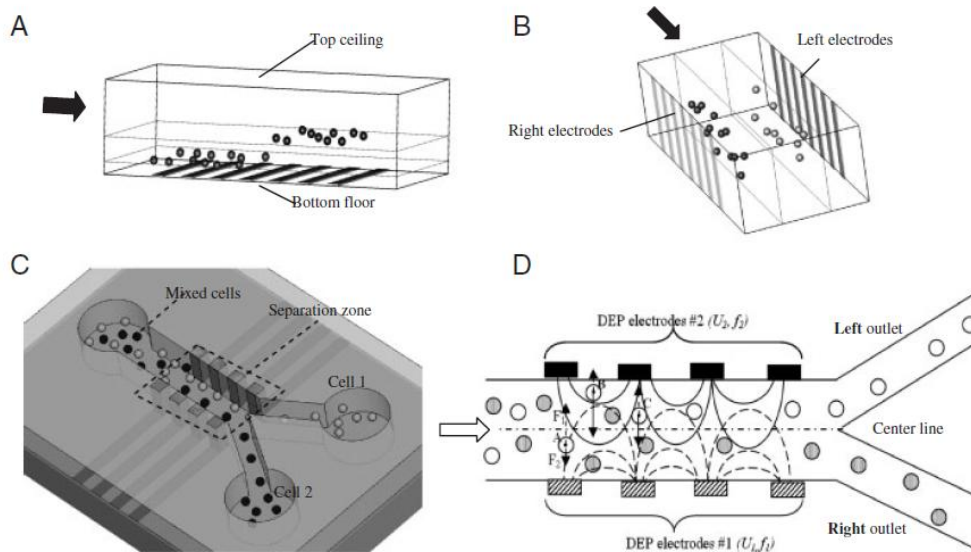


Figure 2-18 Schémas de principe d'un capteur microfluidique utilisant la diélectrophorèse pour le tri de particules. Deux rangées d'électrodes de part et d'autre du canal, utilisant des signaux de fréquences différentes permettent le déplacement sélectif des particules. D'après [65].

Des techniques de tri mécanique peuvent aussi être utilisées, permettant de modifier la trajectoire de particules par des micro-actionneurs. Cette technique nécessite en amont la détection et caractérisation rapide de la particule, dont l'interprétation permettra de définir la commande à appliquer à l'actionneur. On pourra citer les travaux de Gu Han Kwon [67], qui a

réalisé un système d'orientation de cellules à l'aide d'une lamelle en hydrogel, présentée en Figure 2-19.

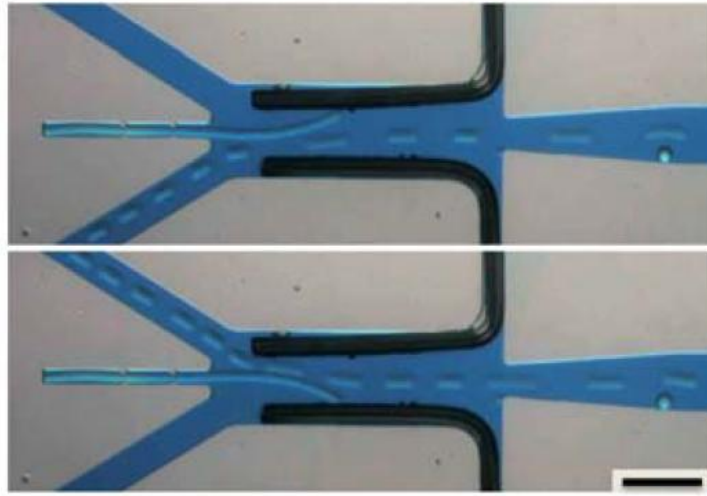


Figure 2-19 Système microfluidique réalisant l'orientation de particules à l'aide d'un actionneur à membrane souple.
D'après [67].

Sous l'effet d'un champ électrique créé par des électrodes de part et d'autre du canal, il est possible de déformer la lamelle vers un côté ou l'autre du canal principal afin d'orienter les particules vers un des deux canaux de sortie.

2.5 Mesures unitaires de cellules.

Nous avons vu dans la partie précédente, que les technologies de micro-fabrication permettaient de réaliser des dispositifs de taille comparable à celle de cellules ou microparticules afin de caractériser celles-ci de manière unitaire ou en faible quantité. Les capteurs déjà exposés permettent la mesure d'un échantillon complet directement déposé par des moyens macroscopiques, ou d'une seule cellule déposée avec des outils de précision ou bloquée dans une cavité par aspiration. Cette dernière technique permet la caractérisation unitaire de cellules, mais en nombre réduit, soit quelques dizaines ou centaines de cellules maximum par l'utilisation de matrice, et le rechargement en nouvelles cellules peut être long. Ce problème peut être pallié par l'utilisation de capteurs d'impédance microfluidiques, qui permettent l'acheminement, le centrage et la mesure unitaire d'un grand nombre de cellules et particules issues d'un échantillon de liquide.

2.5.1 Principe de base.

CHAPITRE 2 : La mesure d'impédance d'échantillons biologiques : Etat de l'art

Ces capteurs fonctionnent avec des suspensions de particules dans un électrolyte. Le liquide électrolytique sert à la fois de vecteur de transport et de conducteur électrique. Les cellules et particules en suspension sont déplacées par gradient de pression entre les extrémités d'un canal microscopique, ayant une section de même ordre de grandeur que les cellules (Figure 2-20).

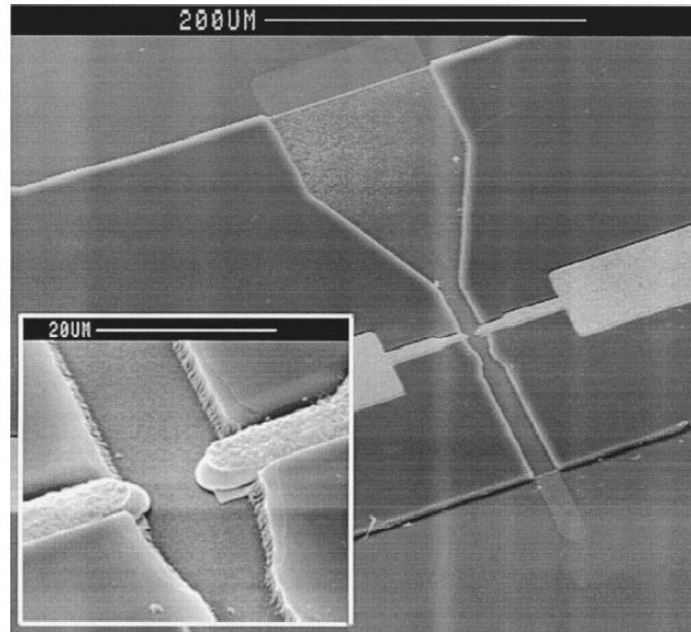


Figure 2-20 Image en microscopie électronique d'un capteur à microcanal pour la mesure d'impédance en cytométrie de flux. D'après [68].

Ces paramètres permettent l'utilisation des propriétés laminaires des fluides, ainsi que l'isolation des cellules dans le canal. En effet, si les dimensions du canal sont assez petites et l'échantillon assez dilué, les cellules et particules se présenteront à la suite les unes des autres dans le canal. Il sera possible de les mesurer de façon unitaire à la chaîne, comme illustré en Figure 2-21.

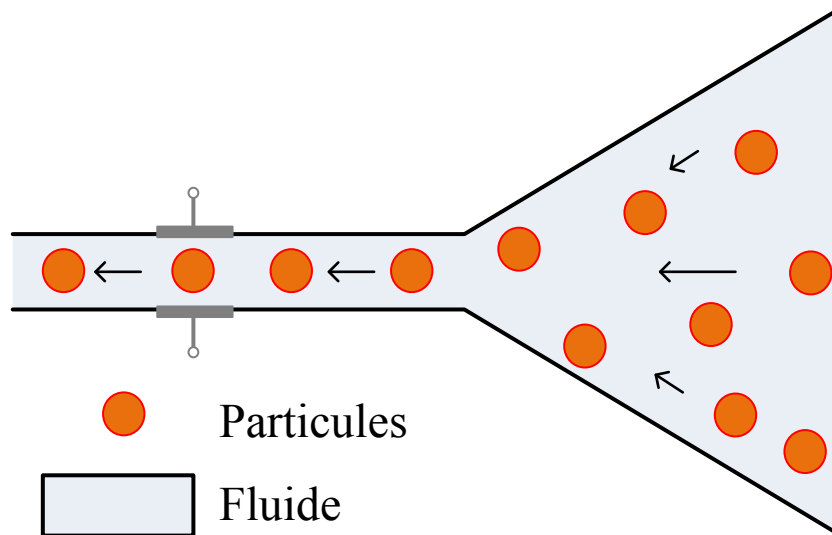


Figure 2-21 Schéma représentant l'acheminement, l'isolation et le centrage de particules dans un microcanal.

2.5.2 Principes de Mesures d'impédance en cytométrie de flux.

Ces types de mesures de particules sont inspirés de la cytométrie en flux par mesure laser, qui permet la détection et la caractérisation de cellules en les faisant défiler à grande vitesse devant un laser. La mesure est cette fois effectuée par des signaux électriques. Ces travaux se sont développés depuis une vingtaine d'années, avec les avancées en terme de microfabrication. On peut notamment citer les travaux de Thielecke [69], Ivorra [70], ou Gawad [71][72].

Cette technique présente toutefois deux principales difficultés, qui viennent du fait que les cellules ne peuvent être mesurées que durant un très court instant lors de leur passage. Il faut pouvoir mesurer chaque cellule lorsque celle-ci est bien présente au centre, pour que les résultats soient comparables, ainsi que mesurer les propriétés de la solution électrolytique. C'est pourquoi il est nécessaire d'effectuer un grand nombre de mesures d'impédance en continu. On peut de cette façon détecter le passage et le centrage d'une cellule, qui correspond à la variation maximum de l'impédance, et mesurer les propriétés de l'électrolyte seul entre le passage de deux cellules. Seule la mesure correspondant au centrage de la cellule est utile et conservée. Il est aussi possible d'effectuer des mesures différentielles à l'aide d'électrodes successives identiques, comme illustré en Figure 2-22.

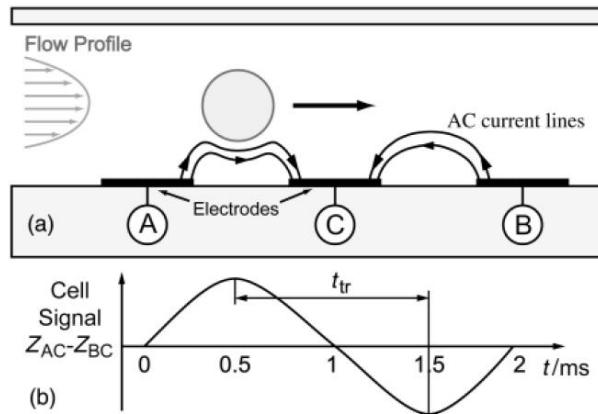


Figure 2-22 Schéma de principe de mesure en cytométrie de flux. a) Schéma de mesure différentielle et b) signal associé. D'après S.Gawad [73].

L'autre difficulté vient du fait que les mesures doivent être effectuées à différentes fréquences pour pouvoir extraire les propriétés de ces différents constituants. Or la plupart des appareils de mesure d'impédance, effectuent les mesures par balayage fréquentiel et mesurent sur un grand nombre de périodes du signal d'analyse, ce qui produit des mesures précises mais très longues (plusieurs centaines de ms à plusieurs dizaines de secondes). Ils sont donc incompatibles avec la mesure en flux. On utilise en général des signaux d'excitation multiplexés, contenant différentes fréquences, puis les signaux à mesurer sont démultiplexés, comme illustré en Figure 2-23. Cela permet d'obtenir les différentes mesures fréquentielles simultanément.

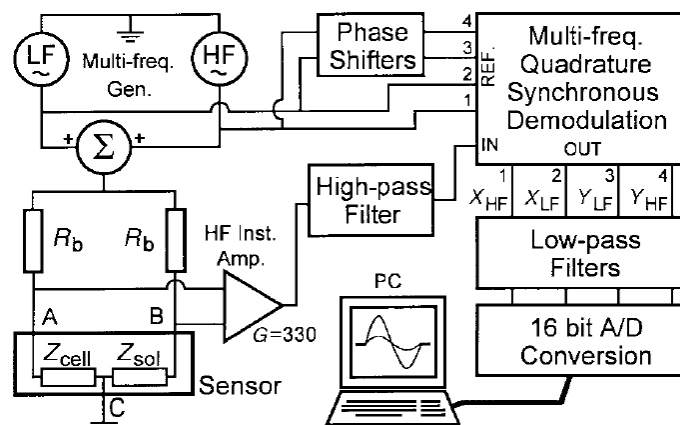


Figure 2-23 Chaîne de mesures multifréquence utilisé pour la mesure d'impédance en cytométrie de flux, et adapté au processus présenté dans la figure précédente. D'après S.Gawad [73].

2.5.3 Mesure et caractérisation par cytométrie de flux.

CHAPITRE 2 : La mesure d'impédance d'échantillons biologiques : Etat de l'art

Les mesures d'impédance effectuées en cytométrie permettent, comme dans les mesures macroscopiques et semi-microscopiques de mesurer les propriétés du cytoplasme, des membranes et du ratio volumique entre les cellules et le milieu mesuré. Comme il s'agit de cellules isolées, ce sont donc les propriétés propres à chaque cellule qui seront caractérisées, ainsi que sa taille. Des mesures simples à une seule fréquence, permettent déjà la détection des cellules et la mesure de leur taille [74], comme présenté Figure 2-24 . Deux populations de billes calibrées ont pu être discriminées en fonction de la variation du signal provoqué par leur passage. Dans ce type de mesure, un signal d'excitation est généré sur deux paires d'électrodes. La tension différentielle entre les deux est ensuite mesurée pour déterminer les variations en volt induites lors du passage des cellules. Avec plusieurs fréquences, il devient possible de déterminer simultanément plusieurs paramètres, tels que la taille des particules et les propriétés de sa membrane. Une mesure avec deux fréquences permet déjà de déterminer la taille et les effets de la membrane et du cytoplasme d'une particule [75], comme illustré en Figure 2-25. Ce type de graphique, permet de comparer les mesures de variation du signal à deux fréquences différentes, soit une avant et une après la dispersion β . On peut remarquer que les particules similaires, comme les billes, suivent la même tendance linéaire. Les globules rouges aussi présentent une répartition linéaire, mais avec un coefficient plus faible, mettant bien en avant l'effet de la membrane plasmique à plus haute fréquence.

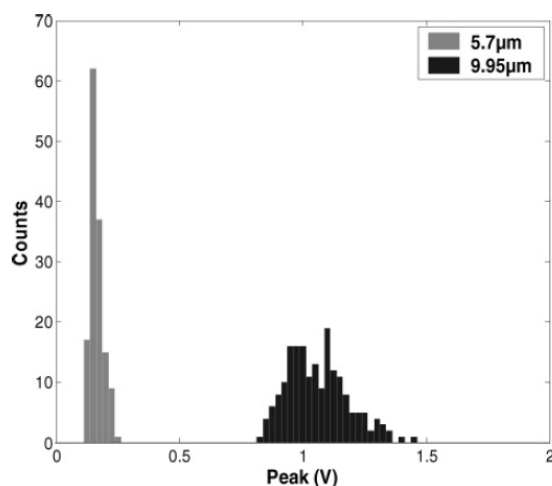


Figure 2-24 Répartition des variations de signaux observés par le passage de billes de 5,7 et 9,95 μm .

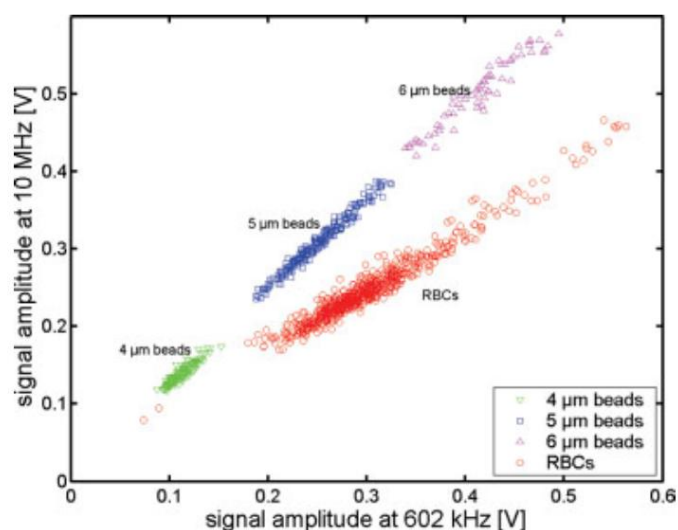


Figure 2-25 Comparaison des variations induites par le passage de différents types de particule à 602 kHz et 10 MHz. D'après [75].

Ces types de mesure ont aussi été menés sur des cellules infectées et anormales dans le but de valider la possibilité de les différencier par mesure d'impédance. Parmi ces tests des globules rouges sains ont été comparés à des globules rouges fantômes [73]. Les globules rouges fantômes sont des globules obtenus après remplacement du cytoplasme d'origine par une solution tampon. Cette manipulation permet de conserver intactes la forme et la propriété de la membrane plasmique, afin de n'étudier que l'effet du cytoplasme. La Figure 2-26 montre les résultats obtenus avec des mesures à deux fréquences comme précédemment. Il est possible d'y voir que la répartition des globules sains et fantômes est approximativement la même à 1.72MHz, fréquence à laquelle la membrane n'est pas conductrice, et qui donne seulement une information sur la dimension des cellules. A 15MHz, la répartition des cellules

CHAPITRE 2 : La mesure d'impédance d'échantillons biologiques : Etat de l'art

fantômes et bien différente, avec une variation plus faible. A cette fréquence le courant traverse la membrane, et les propriétés du cytoplasme interviennent, prouvant dans ce cas qu'il n'est pas le même dans les deux types de cellules. D'autres études, ont mis en évidence la variation des propriétés capacitive de la membrane, donc des mesures effectuées lorsque des cellules sont parasitées. Une partie de ces résultats est donnée en Figure 2-27.

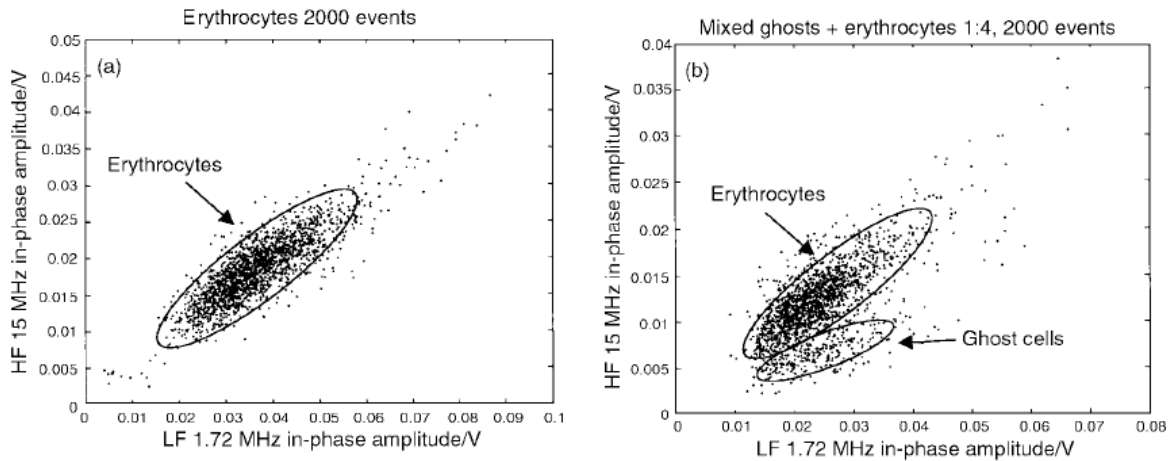


Figure 2-26 Caractérisation de globules rouges sains et fantômes par mesure à 1.72MHz et 15MHz.

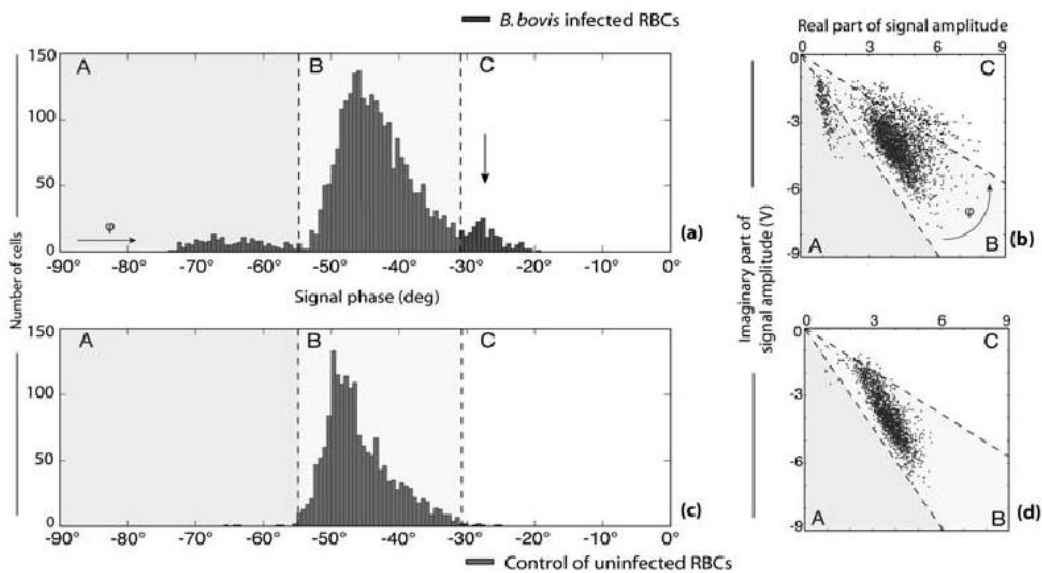


Figure 2-27 Répartition de mesures unitaires de globules rouges bovins infectés a) en fonction de la phase mesurée, b) en fonction de de la partie imaginaire et de la partie réelle ; et de globules rouges bovins non infectés a) en fonction de la phase mesurée, b) en fonction de de la partie imaginaire et de la partie réelle.

2.6 Les capteurs SAW et leurs applications en microfluidique.

2.6.1 Principe et structures.

Les dispositifs à ondes élastiques de surface (SAW : Surface Acoustic Wave), sont des structures à électrodes interdigités (IDT) déposées sur des substrats de type piézoélectriques. C'est à dire composés de matériaux qui se polarisent sous l'action d'une contrainte mécanique, et subissent une contrainte mécanique en cas de polarisation. Leur principal domaine d'utilisation concerne les systèmes de télécommunication où ils sont utilisés comme résonateurs, filtres ou encore lignes à retard. Ils ont été créés à l'origine pour la réalisation de quartz et filtres sélectifs hautes fréquences. Le principe d'un résonateur à SAW est similaire à celui d'un résonateur à quartz aussi appelé résonateur à onde de volume (BAW : Bulk acoustic wave). Les dispositifs SAW permettent par contre d'atteindre des fréquences élevées jusqu'alors interdites aux BAW. En effet les résonateurs à quartz, étaient fabriqués par placement d'une pièce piézoélectrique taillée entre deux armatures métalliques. Un quartz possède une fréquence de résonance proportionnelle à la vitesse de déplacement de l'onde produite dans le matériau par sa polarisation, et inversement proportionnelle à son épaisseur qui fixe la longueur d'onde. Pour un matériau donné, la fréquence maximale était limitée par l'épaisseur minimale qu'il est possible de tailler. Des dispositifs SAW ont été réalisés (Figure 2-28) dans le but de réduire les distances entre électrodes (armatures), en les déposant du même côté du matériau sous forme d'IDT. Cette distance est alors limitée par la résolution des technologies de lithographie. Il est alors possible d'atteindre des longueurs d'ondes sub-microniques et par conséquent atteindre des fréquences dans la gamme du GHz. L'onde créée cette fois-ci est une onde acoustique de surface, appelé aussi onde de Rayleigh, qui comme son nom l'indique se déplace le long de la surface du matériau. La fréquence de résonance pour de tels dispositifs est donnée par l'équation suivante :

$$F_{saw} = \frac{c_{sub}}{\lambda_{saw}} \quad (31)$$

c_{sub} est la vitesse de déplacement d'une onde acoustique et λ_{saw} la période des digits. La fréquence de résonance est donc obtenue lorsque la longueur de l'onde et la période des digits sont les mêmes. Ces deux paramètres, et notamment la vitesse de déplacement de l'onde peuvent être modifiés en fonction de la température, de l'humidité et des contraintes mécaniques subies par le substrat. C'est pourquoi ces dispositifs sont de plus en plus utilisés

comme capteurs (température, pression, humidité, force,). Leur faculté d'être à la fois passifs et interrogeables à distance permet de les utiliser dans des environnements hostiles où des capteurs conventionnels avec électronique embarquée ne pouvaient survivre.

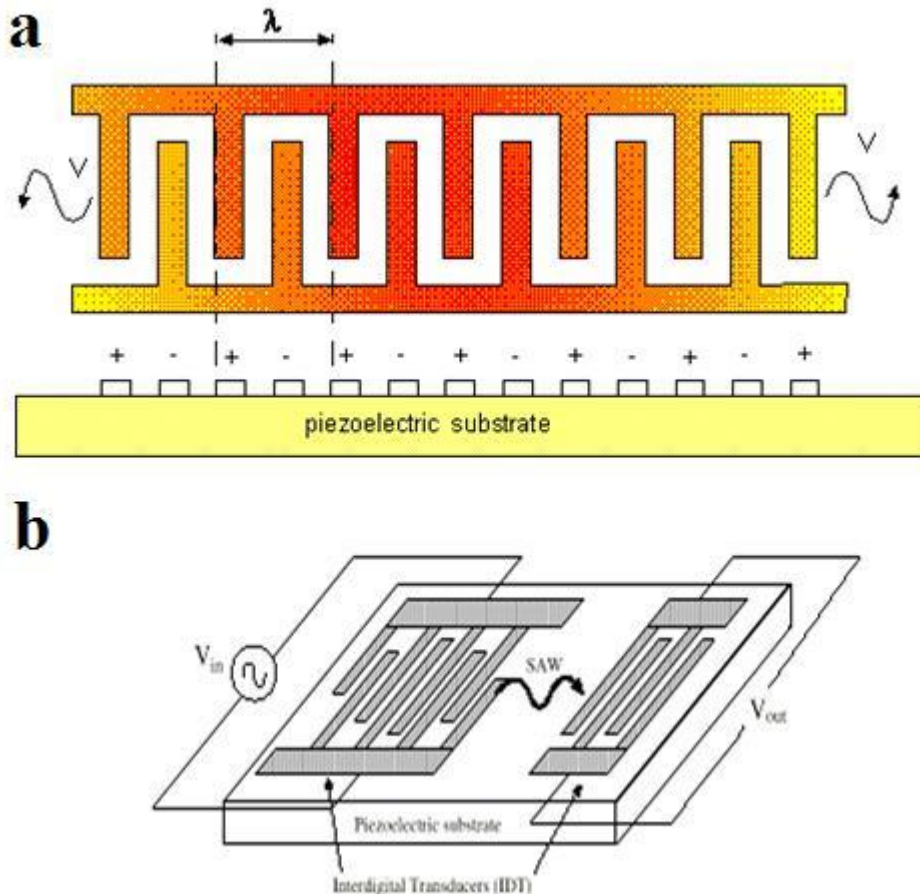


Figure 2-28 Représentation de la structure à électrodes interdigitées d'un dispositif à ondes élastiques de surface (a), et d'une application possible comme filtre ou ligne à retard (b).

2.6.2 Utilisation comme actionneur.

L'onde générée par ces dispositifs est une onde mécanique de surface. Elle va donc interagir avec les matériaux qui pourront s'y trouver, et notamment les liquides. En effet, l'amplitude et la direction d'une onde peut être modifiée avec un transfert d'énergie lorsque celle-ci change de milieu. Un dispositif SAW étant réversible, l'onde réfléchiée causée par la présence d'un matériau sur la surface, peut être captée par ce même dispositif. Nous nous focaliserons toutefois sur les applications microfluidiques permettant de réaliser des actionneurs.

Lorsqu'un liquide tel que l'eau est présent sur la surface de propagation de l'onde, une grande partie de l'énergie de l'onde est transférée, comme illustré en Figure 2-29.

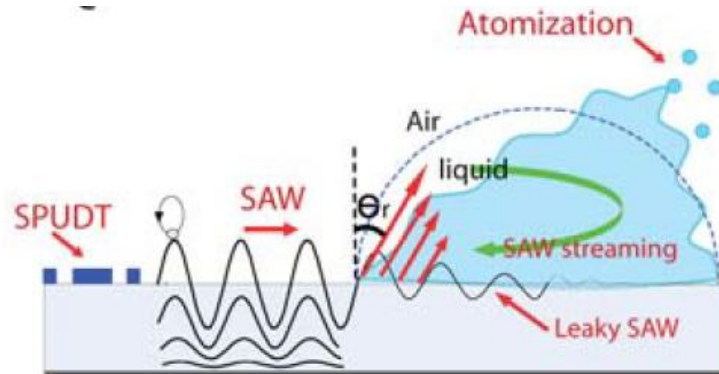


Figure 2-29 Vue schématique du déplacement d'une onde acoustique le long d'une surface, et de son interaction avec une goutte d'eau. D'après Aisha [76]

L'onde est propagée en partie dans la goutte d'eau suivant un angle θ_r . Cet angle peut être calculé en fonction du rapport de la vitesse de l'onde dans le liquide C_l et de l'onde dans le substrat C_{sub} par l'équation suivante :

$$\theta_r = \arcsin\left(\frac{C_l}{C_s}\right) \quad (32)$$

Plusieurs actions mécaniques peuvent se produire lorsque l'énergie est transmise à la goutte d'eau. Il peut y avoir un mouvement de mélange interne [77], une augmentation de la température, un déplacement de la goutte [78] ou même une pulvérisation ou atomisation [76] de celle-ci si l'énergie est suffisante. Pour nos applications microfluidiques, nous porterons notre attention sur le phénomène de déplacement par onde acoustique de surface.

2.6.3 Applications pour le déplacement de cellules.

La première application des dispositifs SAW pour les capteurs en cytométrie de flux porte assurément sur le déplacement des échantillons liquides dans le canal, afin de réaliser un système de pompage intégré, ne nécessitant pas de pompe externe [79].

D'autres applications, de buts similaires à ceux présentés dans les parties précédentes peuvent être réalisées. Les systèmes à électrodes interdigitées pourront notamment réaliser des fonctions de focalisation, de tri et de déplacements ciblés de particules.

Déplacement de cellules :

Lors de la transmission d'une onde acoustique vers un liquide, une partie de l'énergie est consommée au niveau de l'interface liquide/substrat, mais une partie continue à se propager dans le liquide. Celle-ci peut interagir avec les particules présentes dans le liquide et le déplacer dans le sens de propagation de l'onde. Plus la particule aura une grande taille plus les forces s'exerçant sur elles seront grandes et plus son coefficient de diffusion sera faible. Si l'on place des dispositifs SAW de part et d'autre du canal, les particules de plus grandes dimensions se retrouveront concentrées au centre du canal. Jinjie Shi [80], a réalisé le tri de plaquettes et globules rouges avec un système microfluidique présenté en Figure 2-30. En utilisant un seul dispositif SAW avec une puissance suffisante, il est alors possible d'orienter en même temps toutes les particules présentes [81]. Ce système peut être utilisé pour le tri commandé de cellules préalablement mesurées.

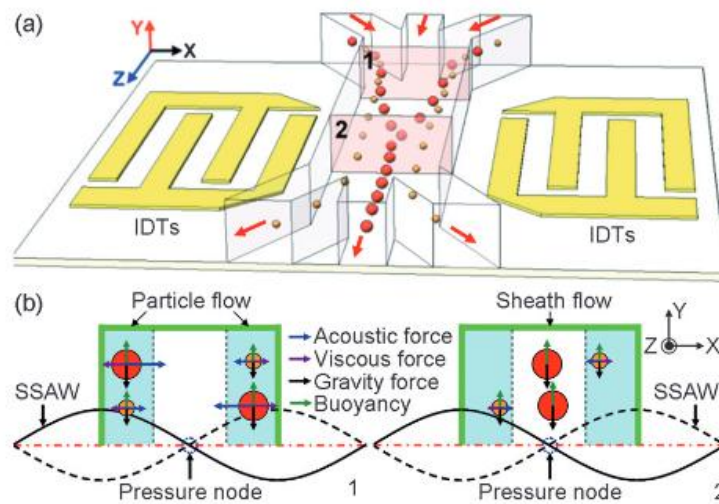


Figure 2-30 Schéma de principe du tri de cellule par force acoustique (a), et représentation schématique des forces mise en jeu lors du tri (b). D'après [80]

Focalisation de cellules :

En prenant toujours la structure précédente, il est possible de focaliser des particules. Dans le système précédent, le temps d'application et l'intensité des forces acoustiques n'étaient suffisantes que pour la focalisation des particules les plus grosses. En augmentant

ces paramètres il est possible de focaliser toutes les particules dans le canal. Jinjie Shi [82], réalisa cette focalisation avec des billes calibrées, illustré en Figure 2-31.

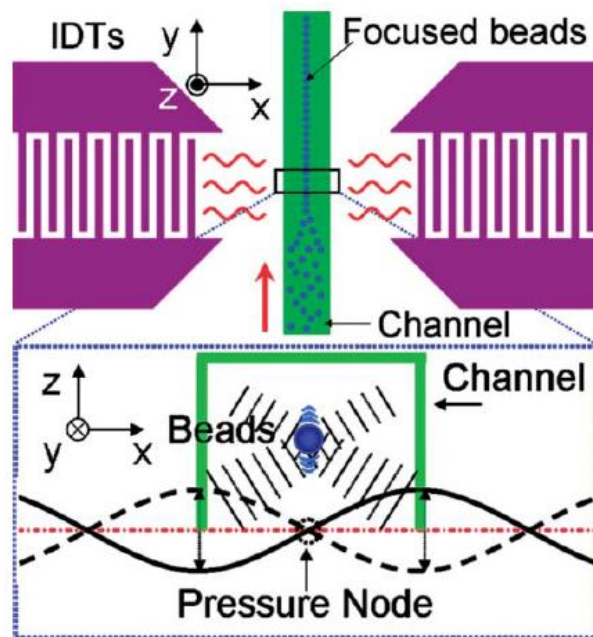


Figure 2-31 Schéma de principe d'un dispositif microfluidique réalisant la focalisation de particules par dispositifs à ondes acoustiques de surface. D'après Jinjie Shi [82].

2.7 Conclusion.

Nous avons conclu le chapitre précédent sur la possibilité d'utiliser efficacement les mesures d'impédance pour le diagnostic et la caractérisation d'échantillons biologiques. Dans la première partie sur les mesures macroscopiques, nous avons vu que de telles mesures fonctionnaient effectivement, puisque de nombreux tissus ont pu être caractérisés et discriminés dès le début du siècle dernier. Très tôt des études sur des tissus sains, infectés et cancéreux ont été réalisés, mettant en évidence des variations non négligeables entre tissus sains et anormaux du même type. Les modèles utilisés, notamment les modèles électriques de Fricke et l'approximation de Maxwell, ont permis de lier ces effets mesurables aux propriétés physico-chimiques des tissus. Ces travaux ont aussi montré la possibilité de superviser l'évolution des tissus et bactéries au cours de leurs reproductions et de leur mort, dans le cadre de cultures cellulaires.

Malgré les résultats obtenus avec ces types de mesures, ceux-ci ne reflétaient que les propriétés d'un échantillon macroscopique complet, c'est-à-dire composé d'un nombre extrêmement important de cellules. C'est pourquoi des systèmes de mesures de dimensions de plus en plus petites ont été réalisés pour essayer de se rapprocher de la mesure de faibles quantités de cellules, voire même d'une seule. La fabrication de tels dispositifs a été rendue possible avec les technologies de micro et nano-fabrication, utilisée à la base pour la miniaturisation de composants électroniques. Des dispositifs comportant des électrodes de tailles microscopiques ont pu être développés afin de mesurer des quantités plus faibles de cellules, tel que les capteurs interdigités, qui permettent de mesurer efficacement une faible couche de cellules, pouvant aller jusqu'à quelques micromètres ; ou même les capteurs à matrice de surface permettant d'effectuer des mesures discrètes d'une faible couche de cellules. Les électrodes ont même été assez miniaturisées pour pouvoir y placer et mesurer une seule cellule, ouvrant ainsi la voie à la mesure unitaire de cellule.

L'utilisation de microélectrodes peut aller jusqu'à la mesure unitaire de cellules, mais un problème de taille reste tout de même : leur positionnement dans la zone de mesure. C'est à ce moment que nous avons étudié les aspects de la microfluidique. Les propriétés des écoulements microfluidiques sont bien différentes de celles observées à l'échelle macroscopique. Ceci est dû aux forces liées à la viscosité, les tensions de surface et les forces de capillarité qui sont prédominantes par rapport aux forces cinétiques et à la gravité. Même si cela peut troubler certain type d'action comme les mélanges volontaires de deux liquides, ces

effets peuvent être avantageusement utilisés pour de nombreuses applications. Pour ne citer que celles-ci, la focalisation de cellules, leur isolation ou même leur tri peuvent être réalisés directement grâce aux propriétés des écoulements microfluidiques, ou indirectement par diélectrophorèse par exemple. L'exploitation de ces propriétés sera donc utile pour nos applications.

Grace à ces technique de micro-fabrications et aux propriétés des fluidiques à l'échelle microscopique, des mesures et caractérisation de cellules unitaire ont pu être effectuée et exploitée grâce à des modèles adapté. De plus nous avons vu la possibilité d'effectuer ce type de mesure à grande cadence pour obtenir des caractérisations sur une population assez large pour être significative. Elles ont notamment pu prouver leur sensibilité, pouvant aller jusqu'à la détection d'une seule cellule anormale sur un échantillon complet. Enfin, nous avons étudié les structures à ondes élastiques de surface, qui présentent de très nombreux types d'applications, dont beaucoup d'entre eux peuvent être astucieusement couplé aux dispositifs microfluidiques pouvant fonctionner comme capteur ou actionneur, ils peuvent notamment être utilisé pour effectuer de applications multiples, comme le déplacement de fluide, la focalisation et le trie sélectifs de cellules. C'est pourquoi ces structures seront par la suite implantées dans nos futurs dispositifs.

**CHAPITRE 3 : Modélisation et
simulation des réponses de biocapteurs
pour la mesure d'impédance de cellule
isolée**

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

3.1 Introduction.

Les mesures d'impédance de milieux biologiques permettent la mesure indirecte des propriétés physique, chimique, morphologique de cellules. Nous avons vu qu'il était déjà possible, par comparaison de mesures sur des échantillons de même nature, de déterminer lesquels étaient susceptibles de présenter des anomalies, ou infections. Cependant pour une meilleure caractérisation de chaque élément constituant ces échantillons, il est nécessaire de définir des modèles qui lient les propriétés électriques mesurées aux caractéristiques biologiques et à la géométrie du système de mesure (électrodes). Le modèle de Fricke et l'approximation de Maxwell déjà évoqués serviront de base à nos modélisations. Il est aussi possible d'étudier ces relations par des outils de simulation physique 3 dimensions. Une des méthodes les plus utilisées est la simulation par éléments finis, qui permet de discrétiser un système complexe en parties simples pour en déterminer les propriétés globales.

Nous allons donc dans un premier temps définir les géométries d'électrodes que nous serons susceptibles de réaliser plus tard. Elles seront surtout choisies en fonction du type de mesures à effectuer et de la possibilité de les réaliser par les technologies de microfabrication.

Nous nous intéresserons ensuite au choix d'un modèle adapté à nos mesures. Il devra être spécifiquement adapté à la mesure unitaire de cellules, et compatible avec les géométries d'électrodes microscopiques définies auparavant. Des simulations par la méthode des éléments finis seront réalisées afin de déterminer l'influence sur l'impédance globale des mesures unitaire de cellules.

Pour cela chaque géométrie d'électrodes adoptée sera testée avec et sans cellule biologique. Les caractéristiques de chaque partie composant une cellule simple, ainsi que sa dimension seront modifiées indépendamment afin d'identifier leur impact individuel. Le déplacement et le centrage des cellules seront aussi étudiés pour définir les vitesses limites de mesures théoriques pour chaque électrode, ainsi que leurs immunités face à un mauvais centrage des cellules.

Les résultats obtenus avec les simulations par la méthode des éléments finis seront finalement comparés au modèle préalablement choisi. Ces comparaisons permettront en particulier de définir les limites d'utilisation du modèle, induit par certaines simplifications et linéarisations formulées pour le mettre en équations.

3.2 Choix des structures d'électrodes.

Le choix des géométries des électrodes constitue une étape cruciale. Celles-ci doivent répondre à plusieurs conditions critiques:

- Intégration des électrodes dans un microcanal.
- Possibilité de réalisation par les techniques classiques de lithographie.
- Possibilité d'effectuer une mesure sur une seule cellule
- Sensibilité suffisante pour la mesure d'une seule cellule.

Tous ces critères sont en fait interdépendants et liés aux dimensions du microcanal lui-même. Celui-ci devant pouvoir recevoir et isoler les cellules, il doit donc être de dimensions similaires à celles-ci, ce qui impose que les dimensions des électrodes soient du même ordre de grandeur. De plus les électrodes doivent être de taille suffisante pour que le champ électrique qu'elles produiront lors des mesures couvre bien la zone entière où la cellule sera présente, sans toutefois avoir un champ d'action trop vaste, qui risquerait de mesurer plusieurs cellules à la fois si celles-ci sont peu éloignées. Les électrodes de type interdigité ne sont donc pas adaptées car elles sont utilisées pour la mesure de zones ayant un fort ratio surface sur volume. Les électrodes concentriques ne sont pas non plus adaptées car l'électrode centrale est déjà de taille supérieure ou égale à celle de la cellule biologique à analyser.

Notre choix se porte donc plutôt sur des géométries simples aussi bien pour la forme du canal que pour les électrodes. Pour le canal, cela permet de le réaliser avec des techniques classiques de lithographie, en une couche, si l'on opte pour une section rectangulaire. Pour les électrodes, ce ne sont pas tant les soucis de fabrication qui amènent à choisir des structures simples, mais plutôt les soucis de modélisation. En effet, l'impédance mesurée dépend à la fois des propriétés de l'échantillon mais aussi de la géométrie des électrodes. Des électrodes de formes géométriques simples permettent de simplifier les équations pour l'obtention des propriétés de chaque constituant de la cellule.

Le choix se portera donc sur des électrodes ayant une surface de contact rectangulaire. Deux géométries simples sont envisageables à partir de ces géométries d'électrodes de base : des électrodes parallèles et coplanaires. Les électrodes parallèles reprennent le principe de la capacité plan. Cependant, comme l'écartement n'est pas négligeable devant la surface des électrodes, le champ ne pourra pas être considéré comme contenu uniquement entre les armatures comme dans la partie 1.4.1. Il sera donc nécessaire d'appliquer des corrections vis-à-vis de la non-linéarité du champ.

3.3 Choix d'un modèle pour une cellule biologique isolée.

3.3.1 Généralités sur le choix d'un modèle.

Le choix d'un modèle adapté permet de lier les paramètres intrinsèques de chaque constituant de la cellule et du milieu extérieur dans lequel celle-ci évolue. Cependant un modèle est basé sur les contributions des phénomènes chimiques, physiques, prépondérants dans le cas à étudier, et ne couvre jamais la totalité des phénomènes et perturbations qui influent sur la mesure pratique. Un modèle se basant toujours sur des hypothèses et des approximations, il conviendra donc d'identifier les effets qui pourront être négligés. Nous avons déjà vu que les modèles standard pour les échantillons biologiques étaient basés sur l'approximation de Maxwell.

3.3.2 Choix du modèle de base.

Pour nos travaux, nous allons nous baser sur le modèle développé par Hywel Morgan[83] pour l'impédance d'une cellule isolée. Ce modèle se base sur l'approximation de Maxwell et le modèle de Fricke. Certaines hypothèses sont formulées pour simplifier et linéariser les équations, avec notamment la linéarisation de l'approximation sur l'impédance globale d'un système composé de deux sphères concentriques. En effet, lorsque la différence de rayon entre les deux sphères est très faible devant le rayon de la sphère externe, comme c'est le cas avec la membrane cellulaire, l'approximation peut être linéarisée de la façon suivante :

$$\sigma_{sph} = \sigma_{mem} \frac{(2\sigma_{mem} + \sigma_{int})r_{ext}^3 - 2(\sigma_{mem} - \sigma_{int})r_{int}^3}{(2\sigma_{mem} + \sigma_{int})r_{ext}^3 + (\sigma_{mem} - \sigma_{int})r_{int}^3} \approx \sigma_{int} + \frac{\sigma_{mem}(r_{ext} - r_{int})}{r_{ext}} \quad (33)$$

$$\varepsilon_{sph} = \varepsilon_{mem} \frac{(2\varepsilon_{mem} + \varepsilon_{int})r_{ext}^3 - 2(\varepsilon_{mem} - \varepsilon_{int})r_{int}^3}{(2\varepsilon_{mem} + \varepsilon_{int})r_{ext}^3 + (\varepsilon_{mem} - \varepsilon_{int})r_{int}^3} \approx \varepsilon_{int} + \frac{\varepsilon_{mem}(r_{ext} - r_{int})}{r_{ext}} \quad (34)$$

Le modèle qui a été développé pour une cellule unique entre des électrodes parallèles est décrit par les équations (35) à (39) et illustré en Figure 3-1.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

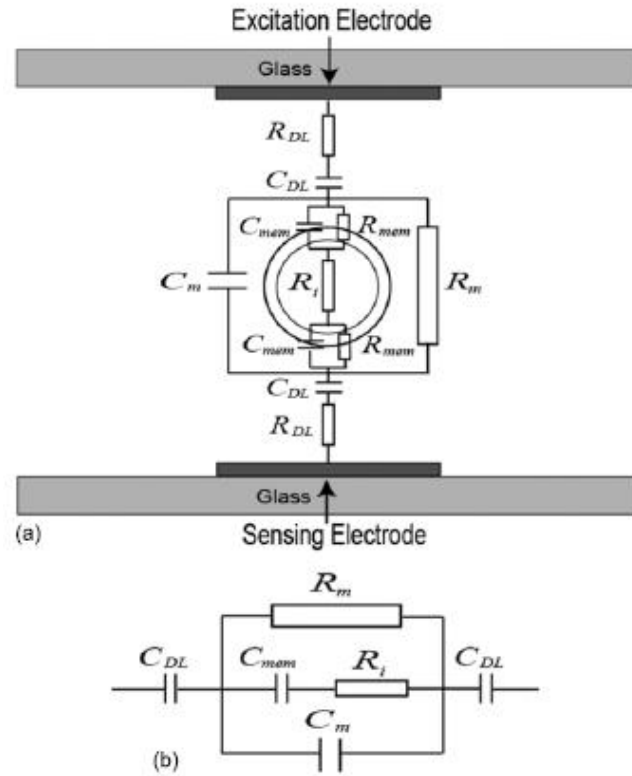


Figure 3-1 Modèles électriques d'une cellule en suspension a) modèle représentant les composants équivalent pour chaque élément et b) modèles global associé. D'après [83].

$$R_m = \frac{1}{\sigma_m (1 - 3\phi/2)lk} \quad (35)$$

$$C_m = \varepsilon_\infty lk \quad (36)$$

$$C_{mem} = \frac{9\phi r_{cell} C_{mem,s}}{4} kl \quad (37)$$

$$R_i = \frac{4 \left(\frac{1}{2\sigma_m} + \frac{1}{\sigma_i} \right)}{9\phi kl} \quad (38)$$

$$\varepsilon_\infty = \varepsilon_m \frac{2\varepsilon_m + \varepsilon_i - 2\phi(\varepsilon_m - \varepsilon_i)}{2\varepsilon_m + \varepsilon_i + \phi(\varepsilon_m - \varepsilon_i)} \quad (39)$$

Avec :

- σ_m et R_m respectivement la conductivité du milieu extérieur et la résistance induite.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

- $C_{mem,s}$ et C_{mem} la capacité surfacique de la membrane et la capacité induite.
- σ_i et R_i la conductivité du cytoplasme et la résistance induite.
- ϵ_m et ϵ_i les permittivités du milieu extérieur et du cytoplasme.
- ϕ le rapport du volume de la cellule sur le volume mesuré.
- L la longueur des électrodes.
- k la constante de cellule qui dépend de la largeur et de l'écartement des électrodes, et peut être calculée à l'aide des équations elliptiques de Jacobi (pour modéliser les effets de bord de chaque côtés des électrodes).

Ce modèle prend en compte le champ électrique non uniforme passant sur les côtés des électrodes. Cependant, il est difficile de définir exactement le rapport volumique ϕ suivant le type d'électrodes utilisées. Il dépend du volume total mesuré par le champ électrique ; d'autant plus que ce champ est supposé uniforme dans les approximations de Maxwell.

3.3.3 Modifications apportées au modèle.

Suite aux problèmes cités précédemment quant à la difficulté d'utilisation de ce modèle pour différentes géométries d'électrodes, due en particulier à la complexité de détermination du rapport du volume de la cellule au volume mesuré, nous avons choisi une autre approche pour le modèle. Nous proposons donc de diviser la zone de mesure active en une zone discrète de géométrie plus simple. Il semble en effet, comme présenté en Figure 3-2, que quel que soit le type d'électrodes utilisées, seule la partie centrale de la zone de mesure présente des modifications de champ notable lors de la présence d'une cellule. Cette zone peut être définie comme le plus grand cube, centrée sur la cellule, que le canal peut contenir. Pour plus de clarté, nous l'appellerons par la suite **zone sensible**.

Il est ainsi possible de modéliser cette zone plus aisément. Elle présente une répartition du champ électrique plus homogène qu'en prenant comme référence le volume complet dans lequel se propage le champ électrique, et son volume est aisé à calculer, puisqu'il s'agit du volume d'un cube. Le modèle final reprendra donc l'équation précédente, en remplaçant le facteur de forme kL par a , la longueur d'une arête du cube. Les zones accolées traversées elles aussi par le champ électrique peuvent être ajoutées dans le modèle final sous forme de composantes d'impédances fixes, en parallèle et en série, comme illustré en Figure 3-3. En retranchant cette impédance, il devient possible de comparer les mesures effectuées avec différentes géométries d'électrodes. Ces zones seront appelées **zones d'impédance fixe**.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

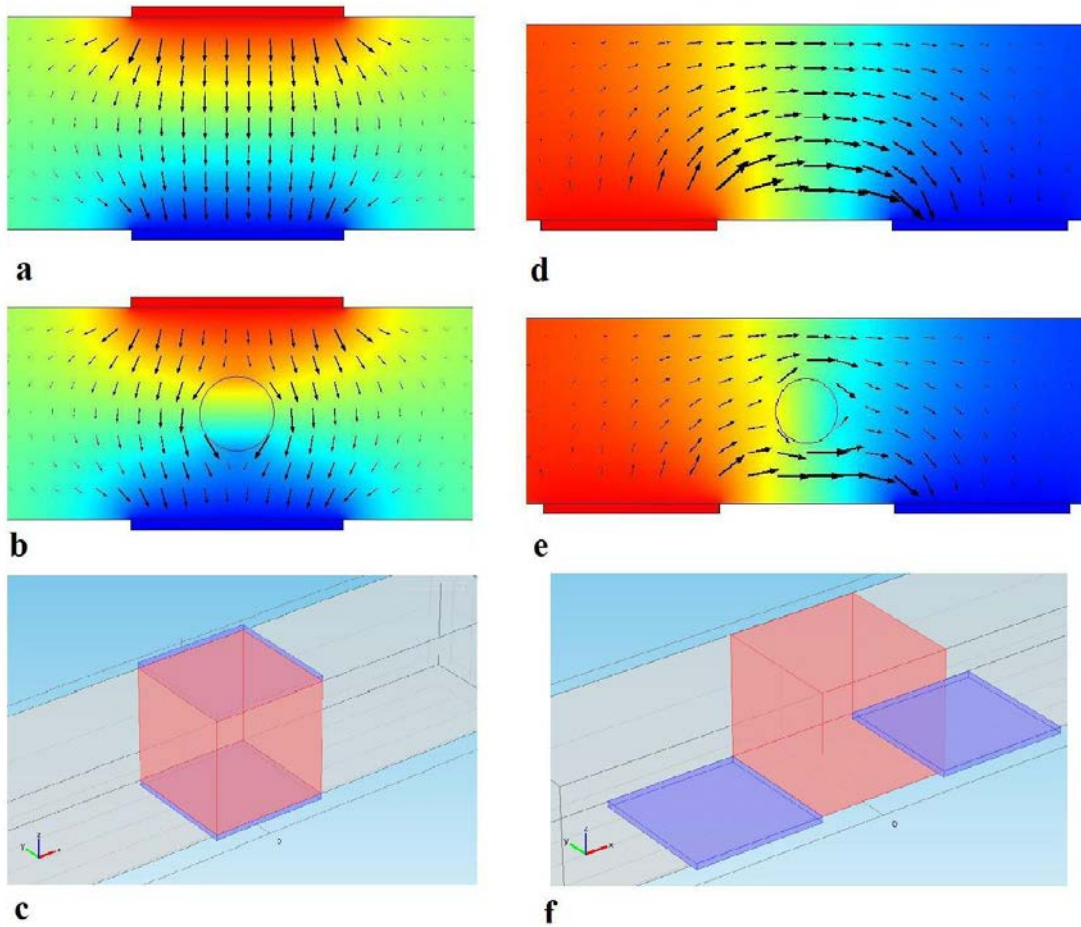
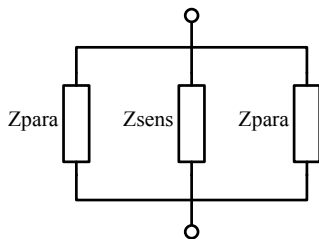
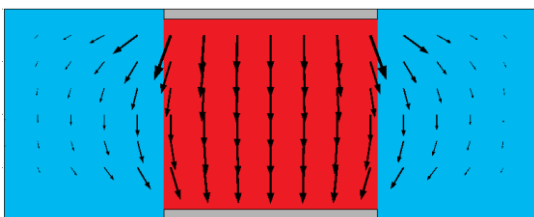


Figure 3-2 Représentation du champ électrique dans la zone de mesure pour des électrodes parallèles et coplanaires sans cellule biologique (a) et (d), avec présence d'une cellule (b) et (e), et leurs zones sensibles de mesure respectives (c) et (f).

Impédances en parallèle



Impédances en série

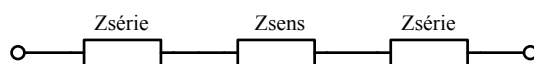
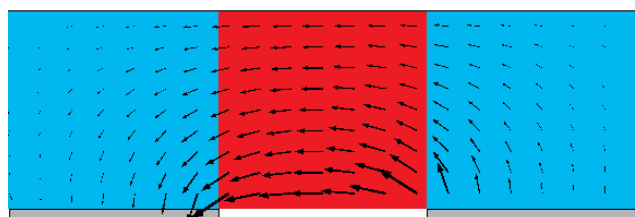


Figure 3-3 Schémas électriques développés représentant des impédances fixes série et parallèle. Et leurs contributions au modèle électrique global.

3.4 Simulation par la méthode des éléments finis.

3.4.1 Définition.

La méthode des éléments finis permet de simuler un système complexe (géométrie complexe, nombre important de composants avec des propriétés différentes, ...) en décomposant celui-ci en éléments de géométrie simple (carrés, cubes, triangles, tétraèdres, ...) Elle permet la résolution numérique des équations aux dérivées partielles, qui régissent le système, ce qui nécessite que le système à résoudre soit continu.

Dans notre cas, notre modèle final se décomposera en structures formées de 5 sous-structures définies avec 4 matériaux différents correspondant à la paire d'électrodes, au milieu extracellulaire, à la membrane plasmique et au cytoplasme. Les simulations ont été effectuées sur le logiciel Comsol Multiphysics, permettant la simulation de nombreux phénomènes physiques et chimiques. Dans notre cas, nous avons utilisé le module « electric current » en fréquentiel « frequency domain ».

3.4.2 Définition des modèles et paramètres.

Les simulations seront réalisées avec des géométries d'électrodes de type parallèles et coplanaires, correspondant aux choix effectués précédemment. Trois électrodes de géométries différentes seront simulées pour chacun des deux types d'électrodes, afin de déterminer leurs réponses. La sensibilité, la stabilité et l'immunité face au mauvais centrage de cellule et à la présence d'agrégat de cellules seront notamment déterminées en vue de définir la géométrie la mieux adaptée à nos mesures.

Les paramètres géométriques retenus pour nos simulations sont illustrés en Figure 3-4 et définis dans le Tableau 3-1. Nous fixerons aussi pour toute la suite de ce mémoire, l'axe x suivant la direction au canal, l'axe y suivant sa largeur, et l'axe z suivant sa verticale.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

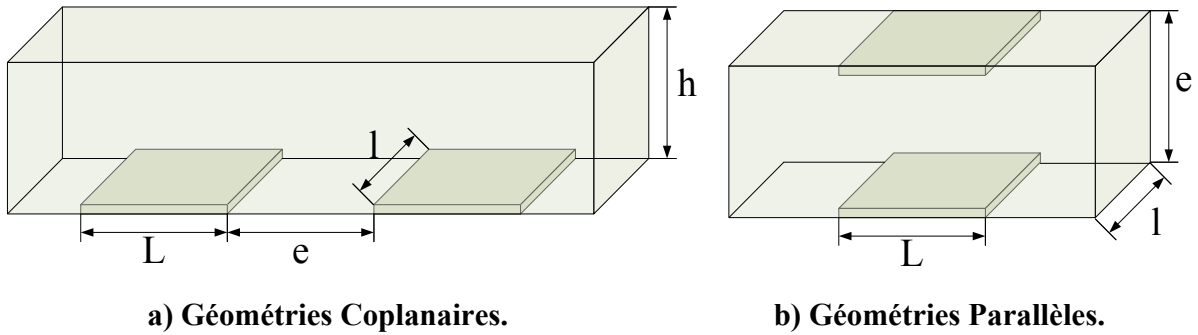


Figure 3-4 Schéma des électrodes coplanaires (a) et parallèles (b)

Tableau 3-1 définition des paramètres géométriques des différentes électrodes à simuler.

Type d'électrodes	Nom	Paramètres (en μm)			
		l	L	e	h
Parallèles	P1	20	20	20	20
	P2	20	40	20	10
	P3	20	20	10	20
Coplanaires	C1	20	20	20	20
	C2	20	20	20	10
	C2	20	20	40	20

Les choix des géométries définies se justifient de la façon suivante. Les dimensions de base du canal de $20\mu\text{m}$ ont été choisies de façon à pouvoir laisser passer un grand nombre de cellules et bactéries différentes, comme les cellules et particules du sang, dont les dimensions varient de 2 à $16\mu\text{m}$ de diamètre environ, sans perturber leur passage. Les géométries P2/C2 et P3/C3 ont été choisies pour palier à d'éventuelles limitations des géométries précédentes. Il se peut que les géométries P1 et C1 ne possèdent pas assez de sensibilité, notamment pour détecter les particules et cellules les plus petites, ainsi qu'une section trop grande pour les isoler. C'est pourquoi dans le cas de P2 et C2, la hauteur du canal a été réduite de moitié. Seule cette dimension est modifiée car elle permet de réaliser cette structure avec le même masque de lithographie. P3 et C3 ont été définies avec des électrodes plus longues pour le cas parallèle et un écartement plus grand dans le cas coplanaire, dans le but d'augmenter la zone utile de détection des particules.

Les cellules seront modélisées en utilisant des sphères concentriques pour représenter le cytoplasme et la membrane plasmique. La membrane cellulaire, d'environ 10 nm

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

d'épaisseur, présente donc des dimensions très faibles par rapport aux dimensions du canal et des électrodes (rapport 1000). Cela pose des problèmes pour le maillage et la simulation, en augmentant considérablement le nombre d'éléments dans le maillage, et la mémoire nécessaire aux simulations. C'est pourquoi l'épaisseur de la membrane a été volontairement augmentée à 250 nm pour les cellules de 2 à 5 μm et à 500 nm pour les cellules de 5 μm et plus. La permittivité choisie a été recalculée de façon à conserver la même capacité surfacique que la membrane d'origine.

3.4.3 Définition des variables de simulation.

Pour plus de simplicité, la conductivité du milieu extracellulaire a été fixée à 1 S/m, permettant ainsi de déterminer directement le facteur de forme du capteur. En plus, cette valeur correspond tout à fait à l'ordre de grandeur des conductivités des liquides biologiques que l'on peut trouver dans le corps humain, tels que le sang et la lymphe. De même, la permittivité relative des liquides extracellulaires et cytoplasmiques sera fixée à 78, correspondant à celle de l'eau pure à 25°C. Nous avons vu que la permittivité de l'eau pouvait diminuer lorsque celle-ci présentait une forte concentration ionique. Les liquides biologiques contiennent en générale une quantité moyenne d'ions, n'influant que peu sur la permittivité initiale de l'eau. Nous pouvons donner comme exemple l'eau de mer, possédant une permittivité relative d'environ 70 pour une conductivité de 5S/m, correspondant à une concentration ionique environ 25 fois supérieure à celle d'une solution à 1S/m (voir équation (6)). La conductivité des électrodes sera fixée à 10^7 S/m, ordre de grandeur pour un bon conducteur métallique. Les autres paramètres seront modifiés durant les simulations afin de déterminer leurs impacts sur l'impédance globale. Les valeurs par défauts, représentant le plus fidèlement une cellule saine, sont données dans le Tableau 3-2. Les valeurs à tester seront choisies autour de ces valeurs de références.

Tableau 3-2 Valeurs par défaut des paramètres choisis pour les simulations

Paramètres	noms	Valeurs de référence
Rayon externe de la cellule	R_{cell}	3.5 μm
Conductivité extracellulaire	σ_m	1 S/m
Permittivité relative extracellulaire	$\epsilon_{m,r}$	78
Conductivité membranaire	σ_{mem}	Choisie pour donner une conductivité surfacique de 10mS/cm ²
Permittivité relative membranaire	$\epsilon_{\text{mem},r}$	Choisie pour donner une capacité surfacique de 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$
Conductivité cytoplasmique	σ_i	1 S/m
Permittivité relative cytoplasmique	$\epsilon_{i,r}$	78

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

Conductivité des électrodes métalliques	$\sigma_{\text{mét}}$	10^7 S/m
Permittivité relative des électrodes métalliques	$\epsilon_{\text{mét,r}}$	1

Les simulations doivent nous permettre de trouver le lien qui existe entre la mesure d'impédance (ou admittance) et les différents paramètres exposés. Nous effectuerons dans un premier temps une simulation sans cellules, pour déterminer le facteur de forme des électrodes. Cette simulation correspond à la mesure d'un liquide de conductivité connu : le quotient entre la conductance mesurée et la conductivité de la solution nous donne le facteur de forme. Nous effectuerons ensuite les simulations suivantes, en variant un des paramètres non fixes, pour en déterminer l'influence globale sur l'impédance :

1. Détermination du facteur de forme.
2. Influence de la taille de la cellule.
3. Influence de la capacité surfacique de la membrane.
4. Influence de la conductivité cytoplasmique.
5. Réponse temporelle lors du passage de cellule.
6. Immunité face à la détection de cellules simultanées.

3.4.4 Détermination du facteur de forme.

Le facteur de forme des électrodes est déterminé sans cellules, il s'agit du facteur qui permet de retrouver la conductivité de la solution présente dans le canal en fonction de la conductance mesurée. Celui-ci est fixe, et dépend uniquement des géométries d'électrodes, il s'agit du rapport de la conductance sur la permittivité et s'exprime donc en mètre. Pour simplifier les simulations, nous avons choisi de simuler le système en utilisant seulement les effets conducteurs, en mode signal continu. Les résultats sont donnés dans le Tableau 3-3.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

Tableau 3-3 Facteurs de formes obtenus par simulation pour les différentes géométries d'électrodes

Type d'électrodes	Nom	Impédance mesurée (en Ohms)	Facteur de forme (en μm)
Parallèles	P1	34 247	29,20
	P2	20 164	49,59
	P3	20 331	49,19
Coplanaires	C1	94 170	10,62
	C2	142 492	7,02
	C3	144 575	6,92

Les électrodes parallèles présentent des facteurs de formes plus élevés que pour les coplanaires. Elles présentent donc un avantage, car pour une conductivité ou une permittivité donnée, l'impédance à mesurée sera plus faible. Il est en effet difficile de mesurer des impédances élevées à des fréquences élevées, à cause des capacités d'entrée des appareils de mesures.

3.4.5 Influence de la taille de la cellule.

A basse fréquence, les cellules peuvent être considérées comme isolantes (très faible conductivité de la membrane). La taille de la cellule sera modifiée pour mesurer la variation de conductance qui en résulte. Cette variation permettra de lier la réponse basse fréquence aux dimensions des cellules. Là encore, il est possible de simplifier le problème de simulation en mode courant continu. Comme les cellules peuvent être considérées comme isolantes, il suffit de simuler celles-ci comme une seule sphère de conductivité très basse. Pour plus de clarté, les résultats sont exposés sous forme de variation d'impédance (en pourcent), par rapport à la simulation sans cellule, en Figure 3-5. Nous pouvons y voir que les géométries P2 et C2 présentent la meilleure sensibilité de détection de particule, avec des variations de 2,5 à 4 fois supérieures pour des cellules de 3 à 4,5 μm de rayon. Cependant, proportionnellement à la taille du canal, ce sont les géométries P1 et C1 qui présentent les meilleures sensibilités. Il est possible de voir que les variations restent très faibles pour des cellules de faibles dimensions : il faut attendre des cellules de 2 μm pour les deux géométries précédentes et de 3 μm pour les autres géométries pour avoir une variation supérieure à 1% de l'impédance.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

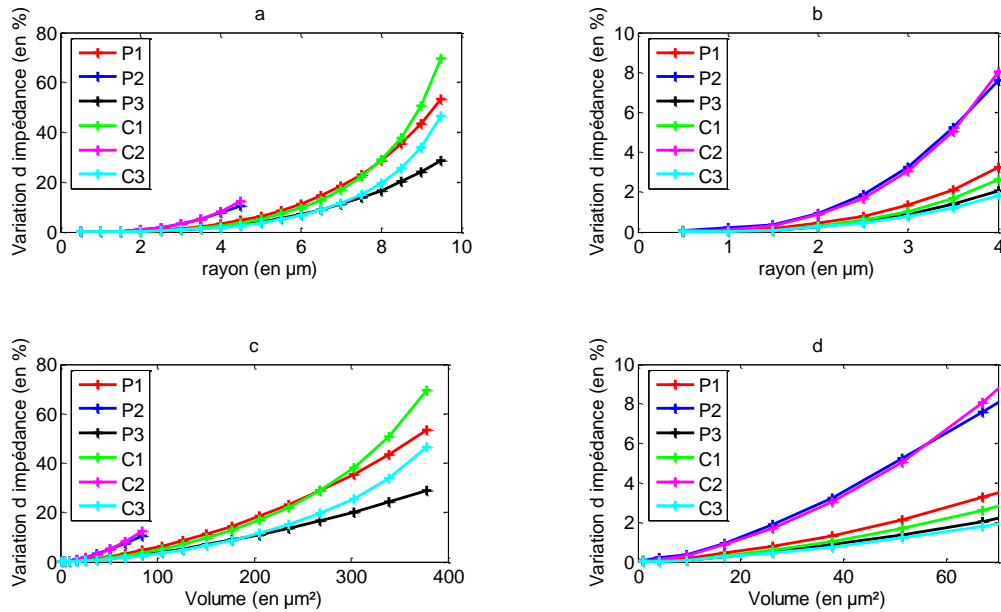


Figure 3-5 Variation de l'impédance en fonction du rayon de la cellule (a) et (b) et en fonction de son volume (c) et (d) pour les différentes géométries d'électrodes.

En regardant les variations en fonction du volume des cellules, nous pouvons observer que les courbes sont relativement linéaires, mis à part pour les géométries C1 et C3 lorsque les cellules dépassent 8μm de diamètre. Il est ainsi possible de proposer un rapport linéaire entre le volume de la cellule et la variation d'impédance qui en résulte. Pour cela, Les coefficients directeurs des différentes courbes sont extraits dans la partie la plus linéaire, et disponible dans le Tableau 3-4. Il est ainsi possible de retrouver le rayon en fonction du coefficient directeur par la formule suivante :

$$\Delta Z_{\%} = A_{isol} \frac{4}{3} \pi r_{cell}^3 \quad (40)$$

Tableau 3-4 Coefficients directeurs obtenus après linéarisation des courbes de variation d'impédance.

Géométrie	P1	P2	P3	C1	C2	C3
Coefficient	11,5E ⁻³	29,3E ⁻³	7,6 ⁻³	9,5E ⁻³	28,9E ⁻³	6,5E ⁻³

Le rayon a donc été recalculé en en fonction de l'équation (40) et de la variation d'impédance, puis comparé au rayon d'origine ayant servi à la simulation. Les erreurs en

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

pourcent entre les rayons trouvés et les rayons d'origines sont données en Figure 3-6 pour les 6 géométries.

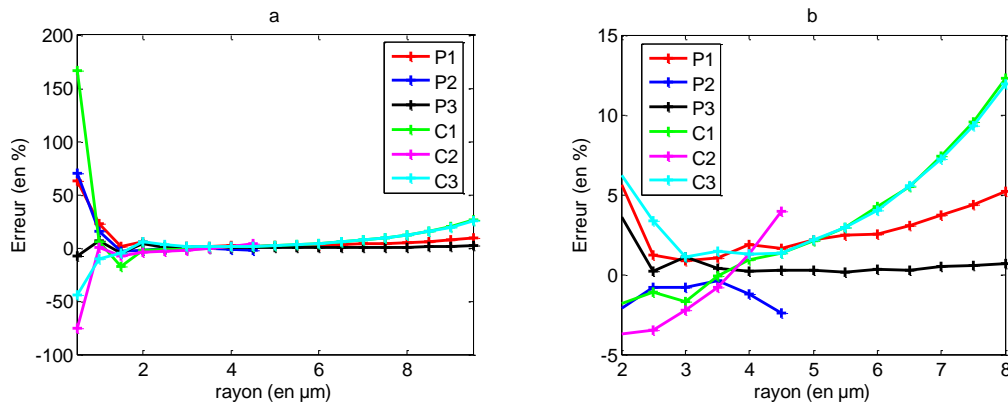


Figure 3-6 Erreur en pourcent entre le rayon recalculé après linéarisation et le rayon initial a), et centrage sur la zone la plus linéaire b).

Globalement les erreurs sont inférieures ou égales à 5% à condition que la cellule ne soit pas trop petite ($> 2 \mu\text{m}$), excepté pour les géométries C1 et C3 où l'erreur devient importante pour les cellules de grandes tailles ($> 6 \mu\text{m}$). La géométrie P3 est celle qui donne les mesures les plus linéaires, avec une erreur inférieure à 1% lorsque le rayon des cellules est compris entre 2,5 et 8,5 μm . Nous remarquons aussi que les erreurs des autres géométries sont aussi plus faibles, de l'ordre de 1 ou 2% lorsque la cellule est de dimension moyenne (entre 30% et 60% de la hauteur du canal). Cette linéarisation semble donc correcte pour des cellules ayant ces dimensions. Par comparaison, des microbilles de calibration, ayant une uniformité bien supérieure à celle des cellules, présentent en général un coefficient de variance de 10% pour leur rayon. Ce genre de billes servant à calibrer les capteurs cytométriques, une linéarisation avec une erreur de 5%, soit deux fois inférieure, peut être tolérée.

3.4.6 Influence de la capacité membranaire.

Toujours à basse fréquence, le passage d'une cellule, constituée d'une membrane de grande capacité surfacique modifie la partie imaginaire (capacitance) mesurée entre les électrodes. La capacitance totale obtenue, d'après le modèle choisi, est constituée de la somme de la capacité sans cellule, et de la capacité induite par la membrane. Cette approximation peut se justifier par le fait que le cytoplasme et le milieu extracellulaire ont des permittivités presque égales (78 voisine de l'eau), et que le volume de la membrane est négligeable. Les capacités aux bornes des différentes électrodes sont données dans le Tableau 3-5, elles peuvent être retrouvées à l'aide des facteurs de forme précédemment déterminés.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

Comme pour les résultats précédents, seule la variation de la capacité induite par la capacité membranaire est exposée en Figure 3-7 et Figure 3-8. Elle n'est cependant pas cette fois ci exprimée en pourcent mais en Farads, car elle est directement image de la capacité surfacique en Farad/m² de la membrane.

Tableau 3-5 Capacité des différentes électrodes en présence d'une solution ionique de permittivité relative de 78.

Géométrie	P1	P2	P3	C1	C2	C3
Capacité (en fF)	20,156	34,23	33,95	7,33	4,84	4,77

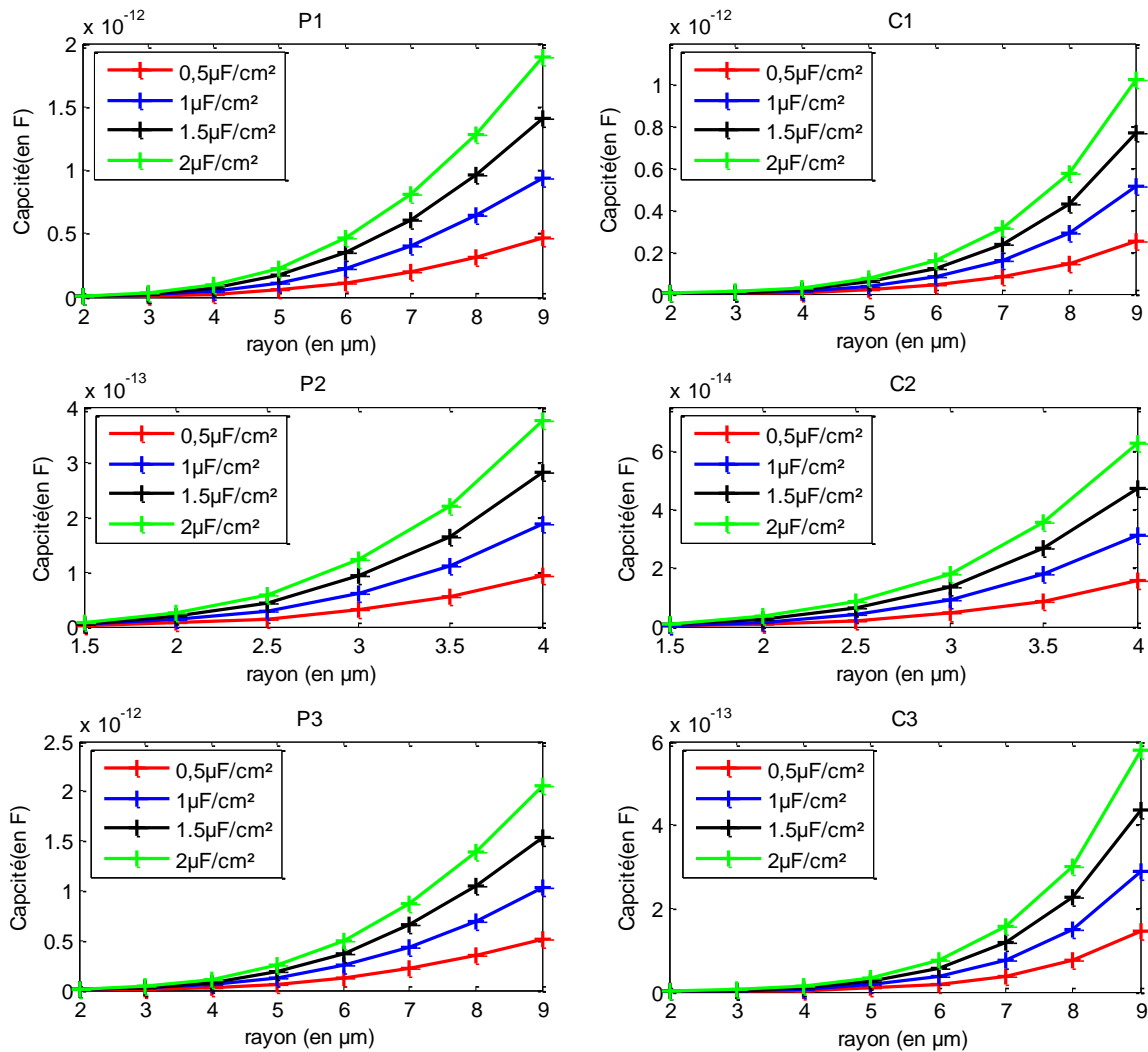


Figure 3-7 Variation de la capacité en fonction du rayon de la cellule pour plusieurs capacités membranaires.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

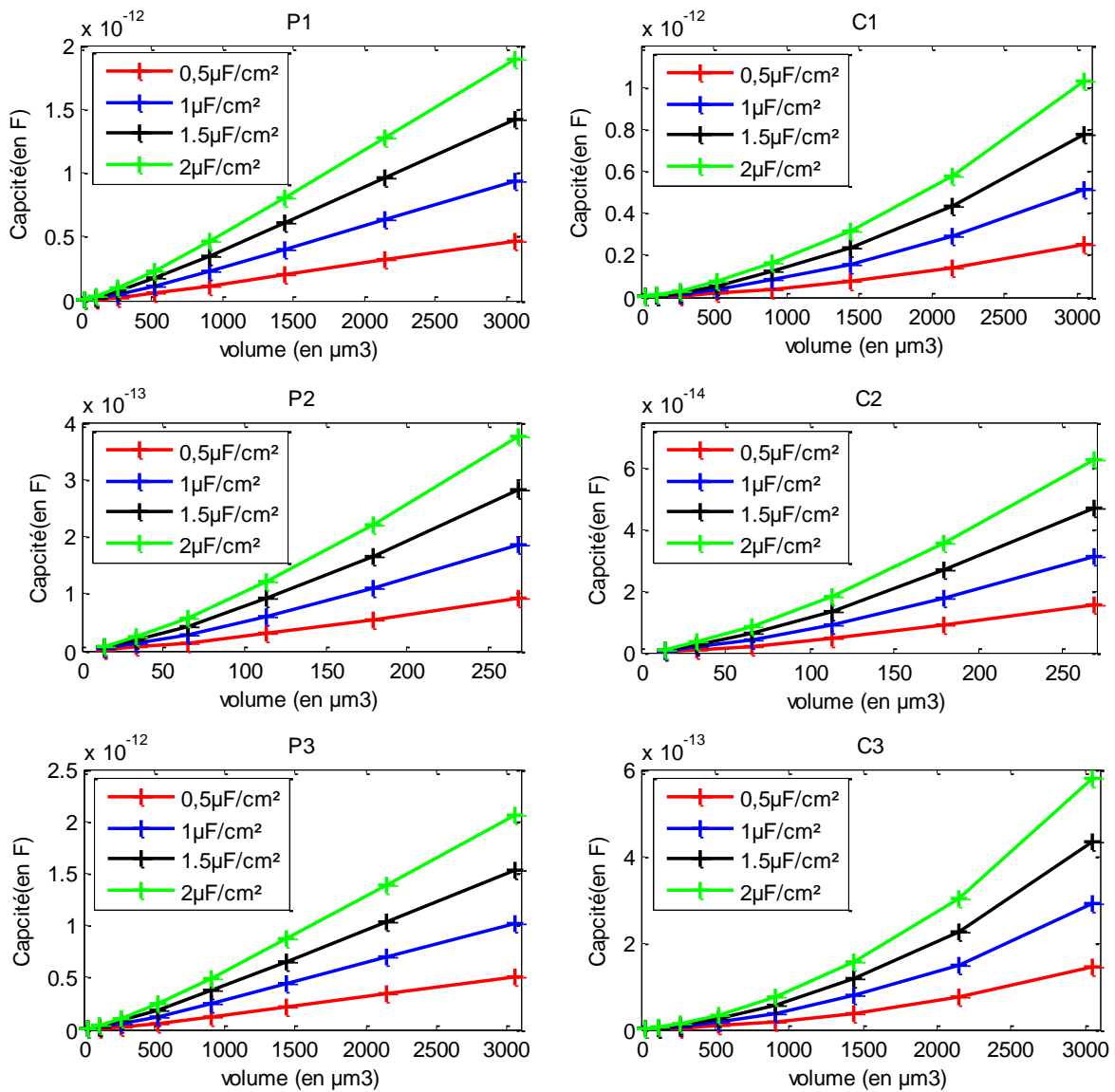


Figure 3-8 Variation de la capacité en fonction du volume de la cellule pour plusieurs capacités membranaires.

Nous pouvons observer que les géométries parallèles présentent des variations beaucoup plus importantes que pour les géométries coplanaires équivalentes. Elles présentent aussi une bien meilleure linéarité en fonction du volume de la cellule. Cela peut s'expliquer par la nature de la contribution de la capacité membranaire. Elle intervient de façon différente pour les deux géométries, en parallèle pour la géométrie de type parallèle et en série pour la géométrie de type coplanaire, comme illustrée précédemment en Figure 3-3. Comme pour la partie précédente, nous pouvons observer que les variations induites par la présence d'un cellule restent très faible quand leur diamètre est inférieur à 30% de la hauteur du canal.

3.4.7 Influence du milieu intracellulaire (cytoplasme).

A plus haute fréquence, la membrane peut être considérée comme conductrice (grande capacité surfacique de la membrane). La partie réelle de l'impédance mesurée à cette fréquence dépend de la conductivité du milieu extracellulaire et du cytoplasme. Nous allons donc nous intéresser à la variation d'impédance induite par la conductivité du cytoplasme lors de la mesure d'une cellule. Il est aussi possible dans ce cas de simplifier les simulations en prenant le cas d'un système en courant continu, prenant seulement en compte les conductivités des milieux extracellulaires et du cytoplasme, l'épaisseur de la membrane étant négligeable. Nous allons pour chaque géométrie, faire varier la conductivité du cytoplasme pour plusieurs tailles de cellules, de 1/10 de fois à 10 fois la conductivité du milieu extracellulaire. Nous présenterons encore une fois les résultats sous forme de variation d'impédance, par rapport à la mesure sans cellule, pour plus de clarté. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 3-9. La courbe c ne présente pas les géométries C2 et P2, dont les dimensions ne permettent pas la mesure d'une cellule de $8\mu\text{m}$ de rayon (hauteur du canal de $10\mu\text{m}$).

Nous pouvons observer que quelle que soit la taille de la cellule, les variations induites par la conductivité du cytoplasme restent faibles. Il faut à la fois que la taille de la cellule soit proche de la taille maximale du canal et que le rapport entre la conductivité du cytoplasme et du milieu extracellulaire soit élevé pour obtenir une variation significative. Encore une fois, les géométries P2 et C2 présentent les sensibilités les plus élevées pour les cellules de faible dimension. Les géométries P1 et C1 présentent toujours les meilleures sensibilités proportionnellement à la taille du canal, et P3/C3 les plus faibles. Cette fois-ci aucune proportionnalité directe entre les dimensions de la cellule (rayon, surface, volume) et la variation d'impédance n'est pas visible sur les courbes. On peut cependant observer que pour des valeurs centrées autour de la conductivité du milieu extracellulaire, les courbes de variations présentent une partie plus linéaire.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

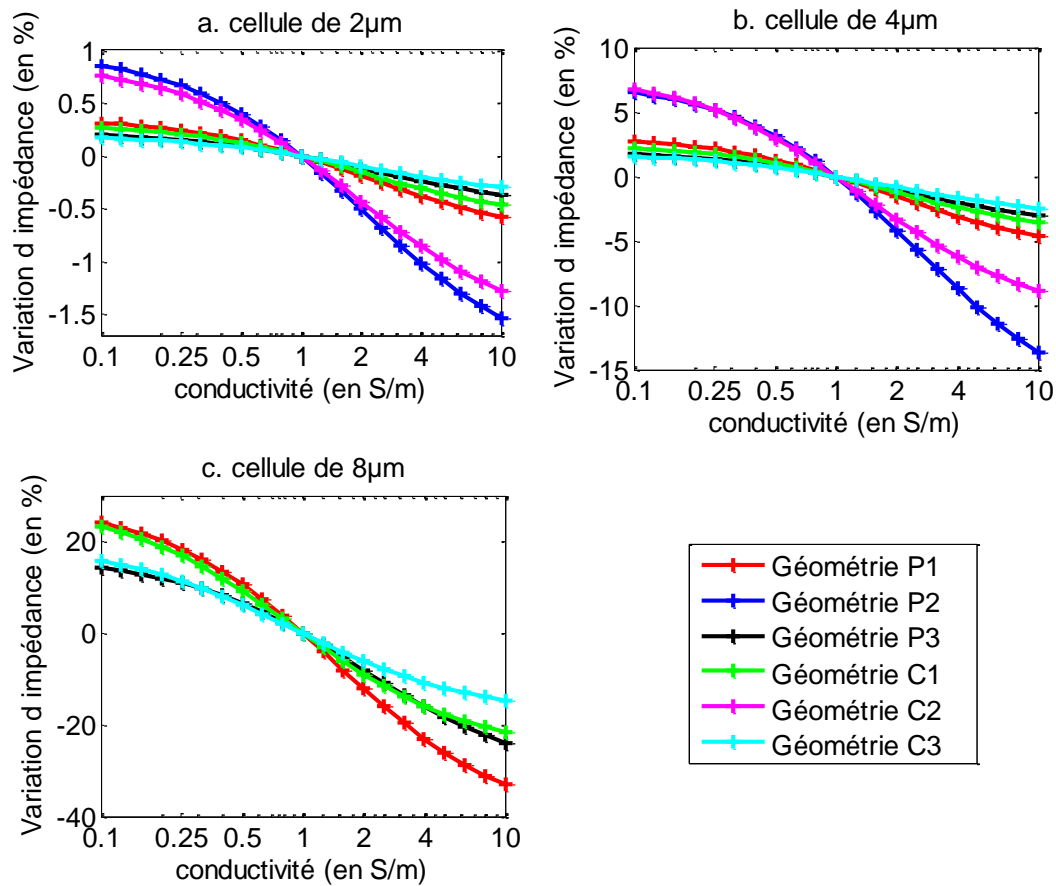


Figure 3-9 Variation de l'impédance en pourcent en fonction de la conductivité du cytoplasme, pour 4 rayons de cellules différents a) 2µm, b) 4µm, c) 8µm.

Les courbes obtenues ne permettent pas de définir une relation mathématique simple entre les variations obtenues et les paramètres modifiés. Cependant, ces résultats peuvent être utilisés et interprétés par la suite en temps qu'abaques, ou sous forme de tables de valeurs.

3.4.8 Réponse temporelle lors du passage de cellules.

Les simulations précédentes nous ont permis de déterminer la réponse d'une cellule présente au centre de la zone de mesure, en fonction de ses propriétés intrinsèques. Cependant, lors d'une mesure pratique, la cellule sera en continuel mouvement dans le canal, nous obligeant à effectuer un grand nombre de mesures pour ne garder que celles correspondant au moment où la cellule est dans la zone utile de mesure. Pour cela nous allons devoir définir les limites de cette zone en fonction de la tolérance acceptée. Des simulations ont ainsi été effectuées en faisant déplacer une cellule isolée de 7 µm de diamètre dans la zone de mesure. Les résultats obtenus sont donnés en Figure 3-10. Toujours pour des soucis de

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

clarté, les variations d'impédance ont été normées sur la valeur maximum, c'est-à-dire de façon à ce qu'elle soit unitaire.

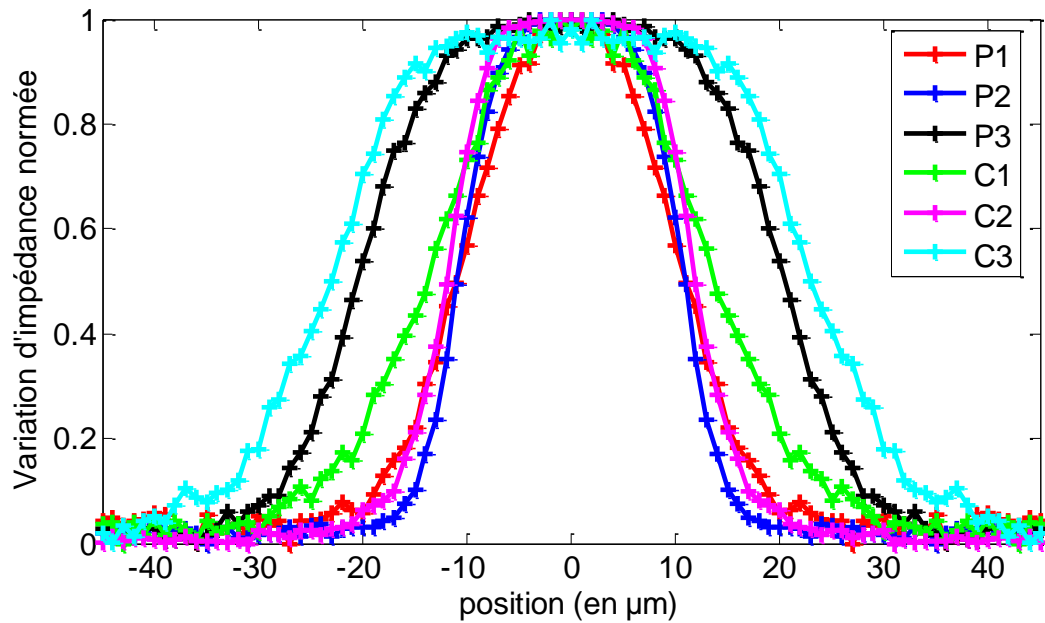


Figure 3-10 Variation normalisée de l'impédance, lors du passage d'une cellule isolée.

Nous pouvons voir que les géométries P3 et C3 présentent une zone de mesure utile plus grande que celle des autres géométries, avec la présence d'un palier bien marqué, signe que la zone de mesure est stable sur une grande distance. Ensuite c'est le cas de la géométrie C2, qui présente aussi un palier marqué mais de dimension plus réduite. Les autres géométries ne présentent qu'un palier très faiblement marqué, donc une zone de mesure stable très réduite par rapport aux autres. Pour une même vitesse de déplacement de la cellule, ils nécessitent donc une cadence de mesure plus élevée.

Une mesure d'impédance s'effectue sur une ou plusieurs périodes du signal d'excitation selon la précision désirée. Sachant que la fréquence minimale de la plage nous intéressant est de 100kHz, et connaissant la zone de mesure stable à 5% (choisie entre 95 et 100% de la variation maximale), il est possible de déterminer la vitesse maximale théorique admissible pour les particules en fonction du nombre de périodes du signal désiré. Ces résultats sont donnés dans le Tableau 3-6.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

Tableau 3-6 Vitesses maximales théoriques admissibles en fonction du nombre de période du signal de mesure.

Nombre de périodes	Vitesse maximales en cm/sec					
	P1	P2	P3	C1	C2	C3
1	70,00	110,00	210,00	110,00	140,00	240,00
2	35,00	55,00	105,00	55,00	70,00	120,00
4	17,50	27,50	52,50	27,50	35,00	60,00
8	8,75	13,75	26,25	13,75	17,50	30,00
16	4,38	6,88	13,13	6,88	8,75	15,00
32	2,19	3,44	6,56	3,44	4,38	7,50
64	1,09	1,72	3,28	1,72	2,19	3,75

3.4.9 Passage simultané de plusieurs cellules.

Une zone de mesure stable de grande longueur permet une mesure plus aisée d'une cellule lors de son passage, en particulier en tolérant une vitesse plus élevée pour une cadence de mesure donnée. Cependant il ne faut pas oublier que les cellules se présenteront les unes à la suite des autres. Même avec un échantillon fortement dilué, il se peut que des cellules se présentent de façon très rapprochée, voire même en formant un agrégat. C'est pourquoi le passage de deux cellules simultanées, doit être étudié afin de déterminer l'impact sur la variation temporelle de l'impédance. Pour cela nous avons simulé le déplacement suivant l'axe x de deux cellules isolantes de $7\mu\text{m}$, à différentes distances l'une de l'autre comme représenté dans le schéma de la Figure 3-11. La référence de positionnement suivant cet axe est prise au point situé à égale distance des deux cellules, et la distance **d** représente leur écartement, défini entre leurs centres. La distance de $7\mu\text{m}$ correspond ainsi à deux cellules accolées. Les résultats sont donnés en Figure 3-12.

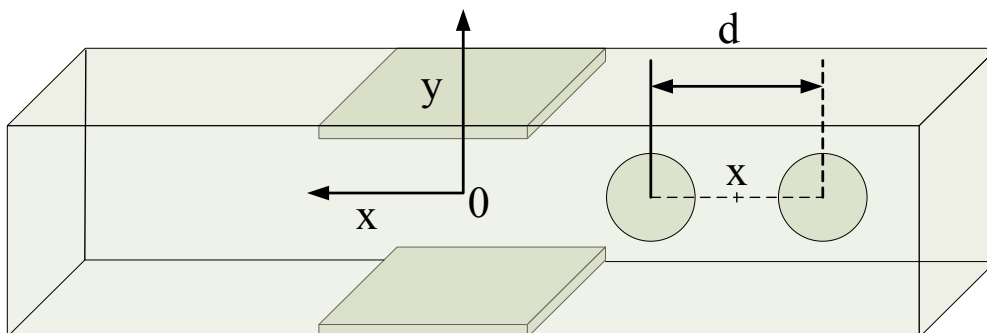


Figure 3-11 Schéma représentant les deux particules rapprochées. Leur position est référencée au point milieu entre leurs centres, et leur écartement correspond à la distance d entre leurs centres.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

Pour chaque géométrie, 4 distances décroissantes ont été choisies de façon à illustrer les 4 cas de figures qui peuvent être rencontrés, ainsi que la réponse d'une cellule totalement isolée pour comparaison. Les quatre cas de figures peuvent être définis avec trois distances clés D1, D2 et D3 :

- Si $d > D1$: Présence de deux dômes représentant distinctement les effets de chacune des deux cellules. La contribution de la première cellule est bien finie lorsque la suivante est au centre de la zone de mesure. Cependant celle de la première cellule n'a pas encore disparue que la suivante arrive déjà dans la zone de mesure sensible.
- Si $D1 > d > D2$ Présence d'un seul dôme de plus grande largeur. Il s'agit du même cas de figure que précédemment mais en condition critique. Les effets distincts des deux cellules sont mesurables de part et d'autre du dôme; mais les effets de la cellule quittant la zone de mesure, et celle y entrant se compensent durant leur déplacement. A moins de pouvoir déplacer les cellules à une vitesse fixe connue, la détection de présence de deux cellules ne peut s'effectuer qu'avec une mesure de la vitesse de celles-ci; par exemple avec l'utilisation de deux paires d'électrodes en série (mesure différentielle).
- Si $D2 > d > D3$ Présence d'un dôme surmonté d'un deuxième plus ou moins visible. La détection du fait que deux cellules sont passées peut s'effectuer par la détection des paliers présents de chaque côté du dôme central, comme pour les géométries P2 et P3. Pour les géométries P1 et C1 ces paliers ne sont pas assez marqués pour pouvoir effectuer une détection correcte sans mesure de la vitesse des particules, comme précédemment. Dans ce cas de figure, où les cellules sont déjà fortement rapprochées, la variation induite lorsqu'elles se trouvent de part et d'autre du centre de la zone de mesure est plus importante que celle induite par une cellule seule présente au centre.
- Si $d < D3$ La présence d'un seul dôme, comme dans le cas d'une cellule simple. Celui-ci possède environ la même largeur que pour une cellule simple, mais une amplitude qui correspond environ au double. Dans ce cas de figure, il n'est pas possible d'utiliser la forme du signal pour déterminer la présence de deux cellules.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

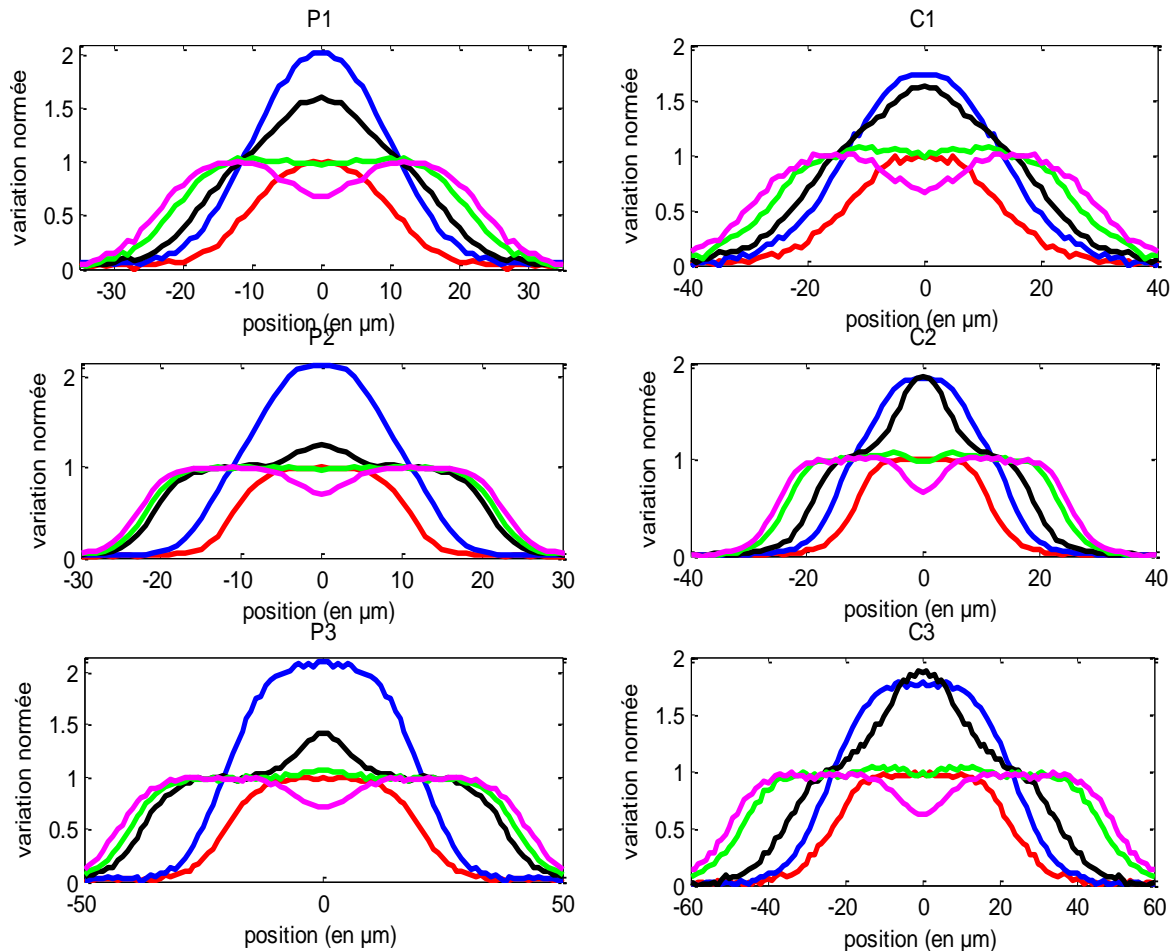


Figure 3-12 Variation normée de l'impédance lors du passage de deux cellules de 7 μm de diamètre avec différents écartements. Résultats de simulations.

On fixe la distance D_{lim} , correspondant au cas où la variation d'impédance entre le passage de deux cellules simultanées est de -33%, comme distance limite admissible entre deux cellules pour les mesurer efficacement. Les différentes valeurs de D_{lim} sont données dans le Tableau 3-7. La valeur de 33% est choisie arbitrairement comme marge d'erreur admissible, pour l'interprétation des résultats. Elle correspond à une variation globale de 1% de l'impédance pour une cellule de taille moyenne, engendrant environ 3% de variation d'impédance lors de son passage. Cette valeur pourra être choisie, dans le cas de mesures pratiques, en fonction des performances des appareils de mesures et de la rapidité d'échantillonnage. Les géométries P2, P1 et C2 donnent les meilleurs résultats quant à la distance minimale admissible pour une mesure correcte des deux cellules, D_{lim} , avec 24 et 26 et 27 μm. C'est ensuite le cas des géométries C1 avec 33 μm. Les géométries P3 et C3 présentent les moins bons résultats, avec des distances minimales jusqu'à deux fois plus grandes que celle de P1.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

Tableau 3-7 Distances limites admissibles pour chaque géométrie d'électrodes.

Géométrie	P1	P2	P3	C1	C2	C3
D_{lim} (en μm)	26	24	45	33	27	54

Pour des distances moins élevée, il faudra seulement détecter le passage de deux cellules simultanées, soit par l'allure de la courbe, soit par le rapport entre la durée du palier et la vitesse de passage des cellules, ou par une variation d'impédance plus élevée que celles attendues.

En prenant en compte les distances D_{lim} et les vitesses limites déterminées précédemment, il est possible de définir le nombre maximal de cellules théorique qu'il est possible de mesurer par seconde. Ces valeurs sont données dans le Tableau 3-8.

Tableau 3-8 Nombre maximal théorique de cellules mesurables en fonction du nombre de périodes du signal de mesure utilisé (à 100kHz).

Nombre de périodes	Flux maximal théorique en cellules/seconde					
	P1	P2	P3	C1	C2	C3
1	26923	45833	46667	33333	51852	44444
2	13462	22917	23333	16667	25926	22222
4	6731	11458	11667	8333	12963	11111
8	3365	5729	5833	4167	6481	5556
16	1683	2865	2917	2083	3241	2778
32	841	1432	1458	1042	1620	1389
64	421	716	729	521	810	694

Ces résultats représentent les valeurs maximales théoriques, qui seront en réalité bien inférieures lors de mesures. Elles permettent cependant de donner un ordre d'idée des futurs paramètres qui seront utilisés lors des mesures.

3.4.10 Réponse en fréquence.

Les simulations précédentes nous ont permis de déterminer les réponses des géométries choisies pour chacun des paramètres des parties constituant les cellules, notamment lors de leur passage dans la zone de mesure. Il reste encore à déterminer la réponse en fréquence d'une cellule unitaire mesurée dans un canal. Cette réponse permettra de déterminer la gamme de fréquences nécessaire pour effectuer les futures mesures. Un modèle de cellule, représentant les caractéristiques générales des cellules que nous mesurerons, sera simulé en réponse fréquentielle. Notre choix s'est porté sur une cellule de $7\mu\text{m}$ de diamètre, avec une capacité membranaire de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ et une conductivité cytoplasmique de $0,5\text{S}/\text{m}$ évoluant dans un électrolyte de $1\text{S}/\text{m}$. Celle-ci a été simulée dans une structure cubique entre deux électrodes parallèles. Les résultats de ces simulations sont exposés en Figure 3-13

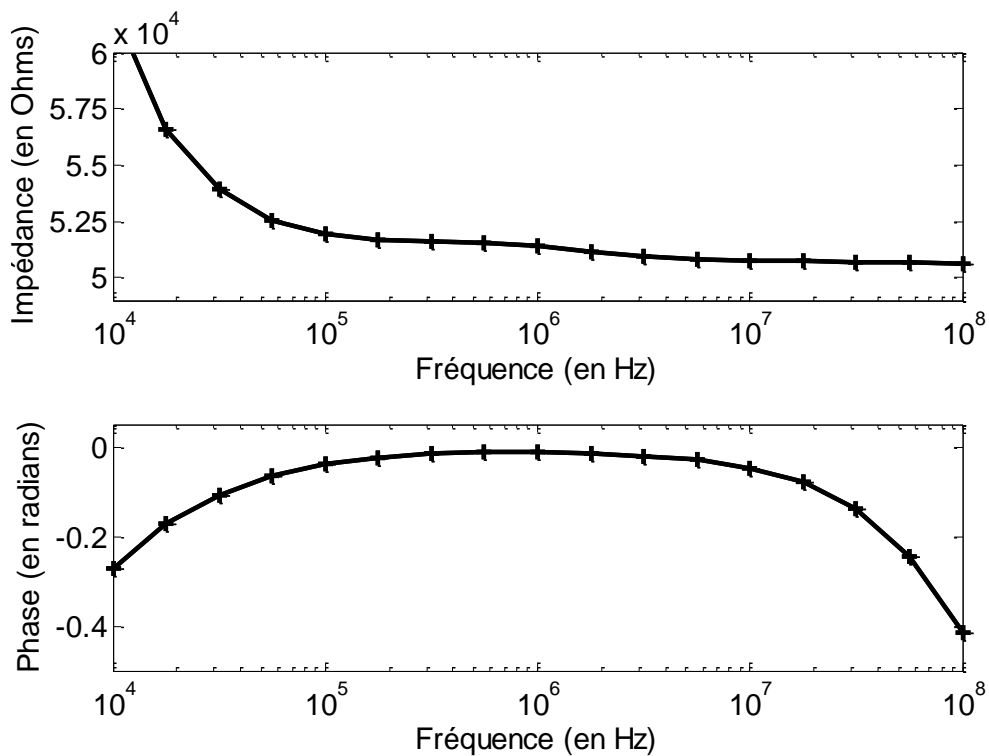


Figure 3-13 Module de l'impédance et phase d'une cellule en suspension. Résultats de simulations.

Nous pouvons déterminer la zone utile de mesure entre 100kHz et 10Mhz. En dessous de 100kHz, les effets d'interface sont prédominants. La dispersion Beta se produit aux alentours du MHz, et les effets du milieu extracellulaire seul (mesure de la dimension des cellules) et de la membrane, ainsi que celle du cytoplasme peuvent respectivement être

déterminées de chaque côté de cette fréquence centrale, soit à 100kHz et 10MHz environ. Au-delà de cette zone, l'effet de la permittivité de l'eau devient prédominant.

3.5 Comparaison du modèle électrique et des simulations.

Nous allons dans cette partie, comparer et valider le modèle théorique établi et les simulations effectuées par la méthode des éléments finis. Pour ce faire, nous allons dans un premier temps valider notre hypothèse sur la discrétisation de la zone de mesure en zones sensibles et constantes. Puis comparer les résultats obtenus après discrétisation à ceux du modèle électrique.

3.5.1 Application du modèle sur les géométries d'électrodes

Nous avons fait l'hypothèse, dans la partie 3.3.3 que pour chaque géométrie d'électrodes, la zone de mesure peut se définir comme l'assemblage d'une zone sensible et de zones à impédances fixes en série et/ou en parallèle. Nous allons donc pour chacune des géométries précédentes définir les modèles discrétisés équivalents tel qu'illustré en Figure 3-14.

Pour toutes les géométries parallèles, les contributions des zones d'impédance fixes peuvent être représentées comme une seule impédance fixe en parallèle avec celle de la zone sensible. Pour les géométries C1 et C3 ces contributions peuvent être représentées comme une impédance en série entre les électrodes et la zone sensible. Pour la géométrie C2, les zones d'impédance fixe représenterons à la fois une impédance en série avec celle la zone sensible, ainsi qu'une autre en parallèle, comme illustré en Figure 3-15

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

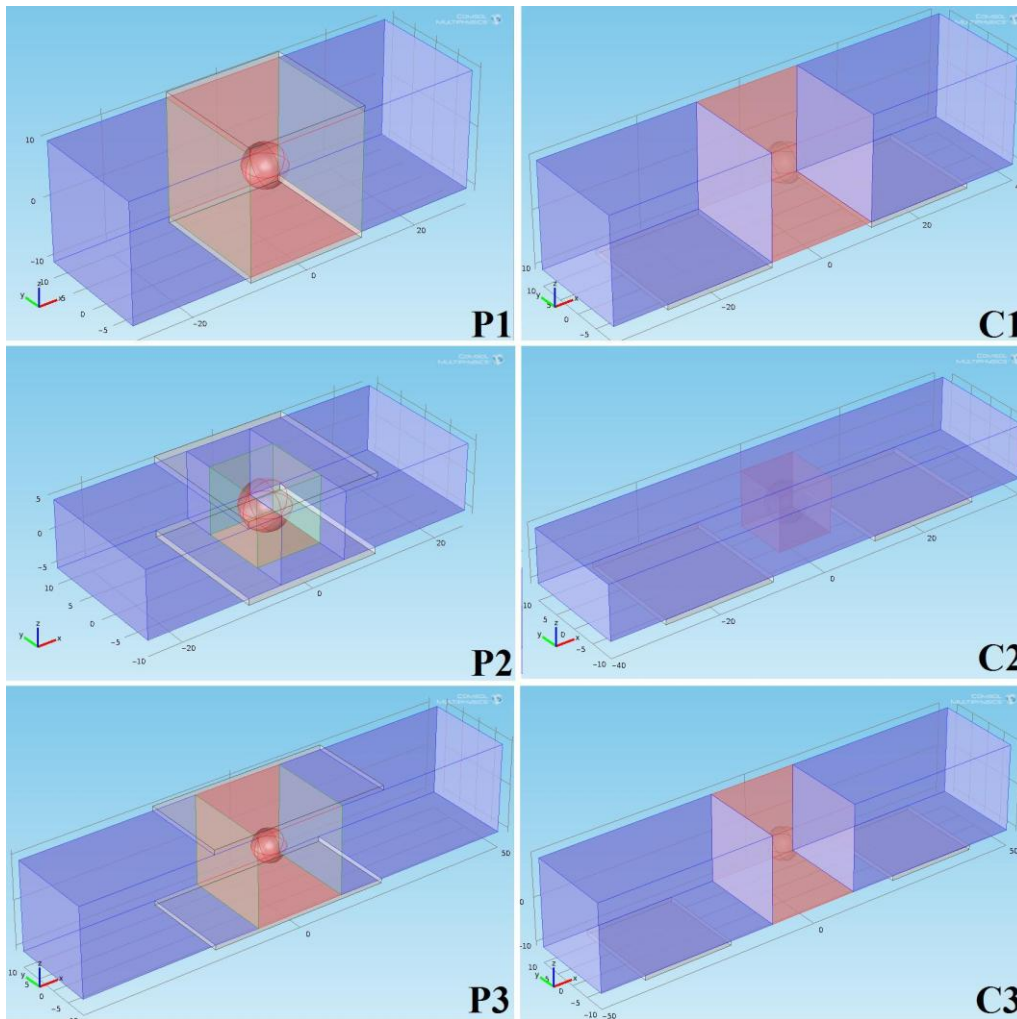


Figure 3-14 Représentation de la zone sensible, en rouge, pour les 6 géométries d'électrodes différentes.

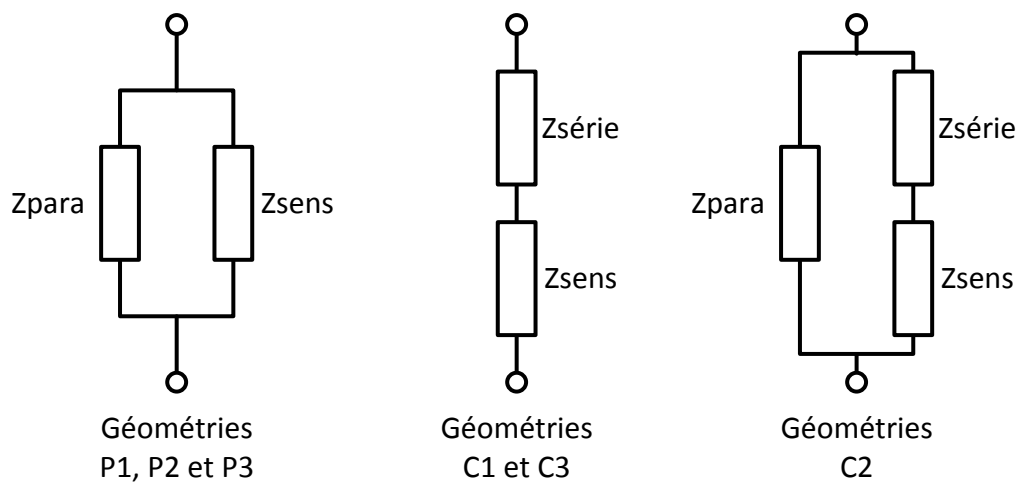


Figure 3-15 Représentation schématique de la discrétisation à réaliser pour les différentes géométries.

3.5.2 Calcul des impédances fixes.

Les impédances fixes correspondent à des zones de dimensions fixes, leurs impédances ne dépendent donc que de la géométrie des électrodes, du canal, ainsi que de la conductivité et permittivité du milieu extracellulaire, mais pas de celle de la cellule présente au centre de la zone de mesures. Elles peuvent ainsi être simplement définies par leur type (parallèle ou série) et leur facteur de forme pour chaque géométrie. Connaissant le facteur de forme de la partie sensible, ainsi que ceux des géométries d'électrodes complètes, il est possible d'en déduire directement ceux des zones fixes. Ces résultats sont donnés dans le Tableau 3-9.

Tableau 3-9 Facteurs de formes calculés pour les différentes zones après discrétisation.

Type de facteurs de forme	Facteurs de forme en μm					
	P1	P2	P3	C1	C2	C3
Géométrie complète	29,2	49,59	49,19	10,62	7,02	6,92
Zone sensible	20	10	20	20	10	20
Impédance série				22,64	5,41	10,58
Impédance parallèle	9,2	39,59	29,19		3,51	

3.5.3 Comparaison des modèles.

Afin de vérifier notre hypothèse, nous allons retrancher les différentes impédances en série et en parallèle des résultats de simulation précédente. Nous devrions ainsi obtenir les mêmes variations pour les géométries P1, P3, C1 et C3 et pour les géométries P2 et C2. De plus, même si les zones centrales de mesure n'ont pas toutes les mêmes facteurs de forme, elles sont de géométries semblables. Cela implique qu'elles doivent présenter les mêmes variations pour le même ratio Volumique ou ratio diamètre de la cellule/largeur du canal.

Ces résultats obtenus après retranchement seront comparés d'une part à la simulation d'une cellule entre deux électrodes parallèles dans un espace cubique, représentant la zone sensible et pris comme référence, et d'autre part aux variations obtenues avec les équations du modèle électrique pour les mêmes paramètres. Comme pour les simulations précédentes, ces comparaisons seront effectuées avec l'étude des paramètres propres à la cellule, à savoir la taille, les propriétés de la membrane et du cytoplasme.

Variation de la taille de la cellule.

Pour observer l'influence de la taille de la cellule, nous nous plaçons dans le cas où la cellule est isolante. Nous obtenons les résultats présentés en Figure 3-16.

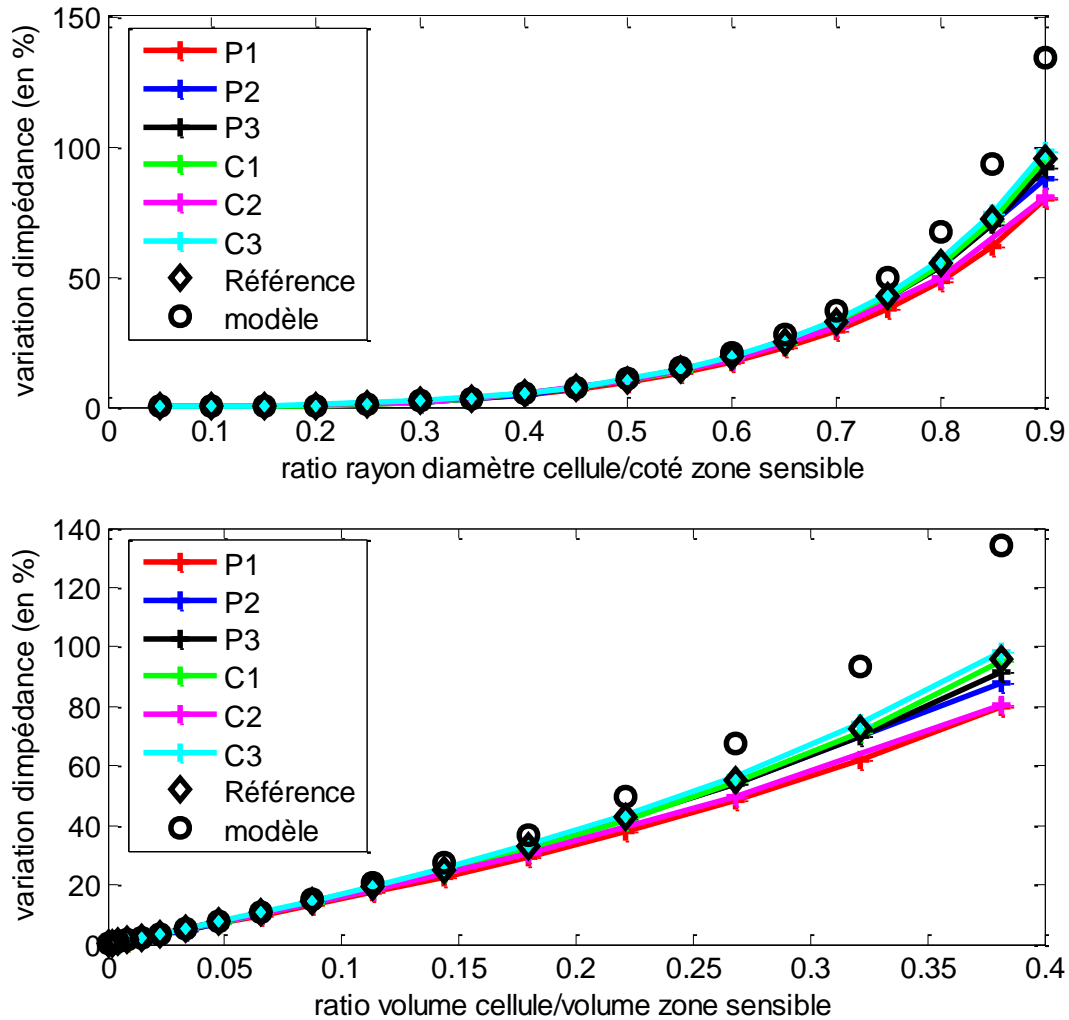


Figure 3-16 Variations d'impédances obtenues avec les géométries parallèles et coplanaires après retranchement des impédances fixes, ainsi que celle obtenues avec la simulation de référence et du modèle électrique, en fonction du ratio (diamètre de la cellule/côté de la zone sensible) et du ratio (volume de la cellule/volume de la zone sensible) pour une cellule isolante.

Nous pouvons voir dans un premier temps que les résultats obtenus sont cohérents avec l'hypothèse que nous avons faites, puisque les variations obtenues pour les 6 géométries sont presque confondues entre elles et avec les variations de la simulation de référence. Le modèle électrique est aussi en accord avec nos simulations, car il présente aussi des valeurs similaires si le rapport volumique n'est pas trop élevé. Au-dessus d'un rapport volumique de 0,2, correspondant environ à une cellule de 14 μm dans un canal de 20 μm de hauteur, celui-ci

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

commence à devenir conséquent. Cette limitation est due au fait que le modèle de Maxwell, dont est issu le modèle utilisé, est valide lorsque le champ est relativement uniforme. Ce n'est plus le cas, lorsque celui-ci contourne une cellule de grande dimension. Pour cette dimension de cellule, la variation calculée par le modèle électrique est supérieure de 12% par rapport aux simulations de référence. Cette erreur peut paraître assez importante, mais elle est déjà calculée sur une variation initiale d'impédance. En effet pour ce rapport volumique, les variations d'impédance suivant les géométries sont de l'ordre de 5 à 15%, ce qui implique une erreur sur la mesure d'impédance de 0,6 à 1,8%. Ces erreurs peuvent même se retrouver du même ordre de grandeur que la précision d'un appareil de mesure.

Effet de la conductivité du cytoplasme.

Pour comparer les modèles, nous nous sommes replacés dans le cas d'une cellule conductrice, correspondant au modèle équivalent d'une cellule lorsque l'impédance de la membrane devient négligeable par rapport aux autres impédances. Les comparaisons ont été effectuées avec deux conductivités de cytoplasme différentes, soit la moitié et le double de celle du milieu extracellulaire. Les résultats, sont présentés en Figure 3-17 et Figure 3-18.

Comme pour les simulations précédentes, nous pouvons observer que les résultats obtenus sont parfaitement en accord. Les différentes courbes sont presque confondues. Cette fois-ci, l'erreur obtenue entre le modèle électrique et le modèle de référence pour un rapport volumique de 0,2 est de 3,8% pour une conductivité de 0,5S/m et de 3,9% pour une conductivité de 2S/m. Cela implique une erreur sur l'impédance globale de 0,2% à 0,6% suivant la géométrie.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

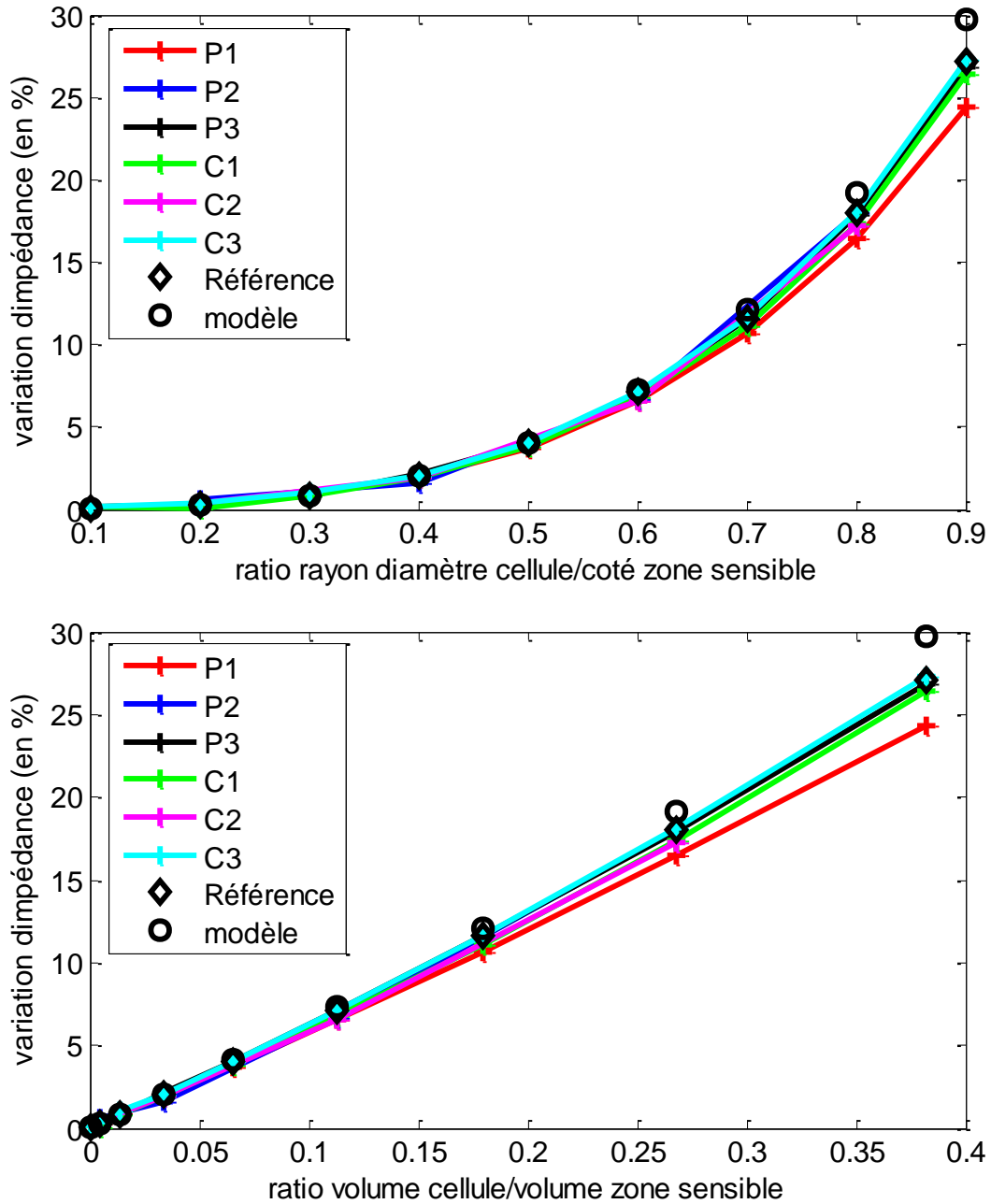


Figure 3-17 Variations d'impédances obtenues avec les géométries parallèles et coplanaires après soustraction des impédances fixes, ainsi que celles obtenues avec la simulation de référence et du modèle électrique, en fonction du ratio (diamètre de la cellule/côté de la zone sensible) et du ratio (volume de la cellule/volume de la zone sensible) pour une conductivité du cytoplasme de 0.5S/m.

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

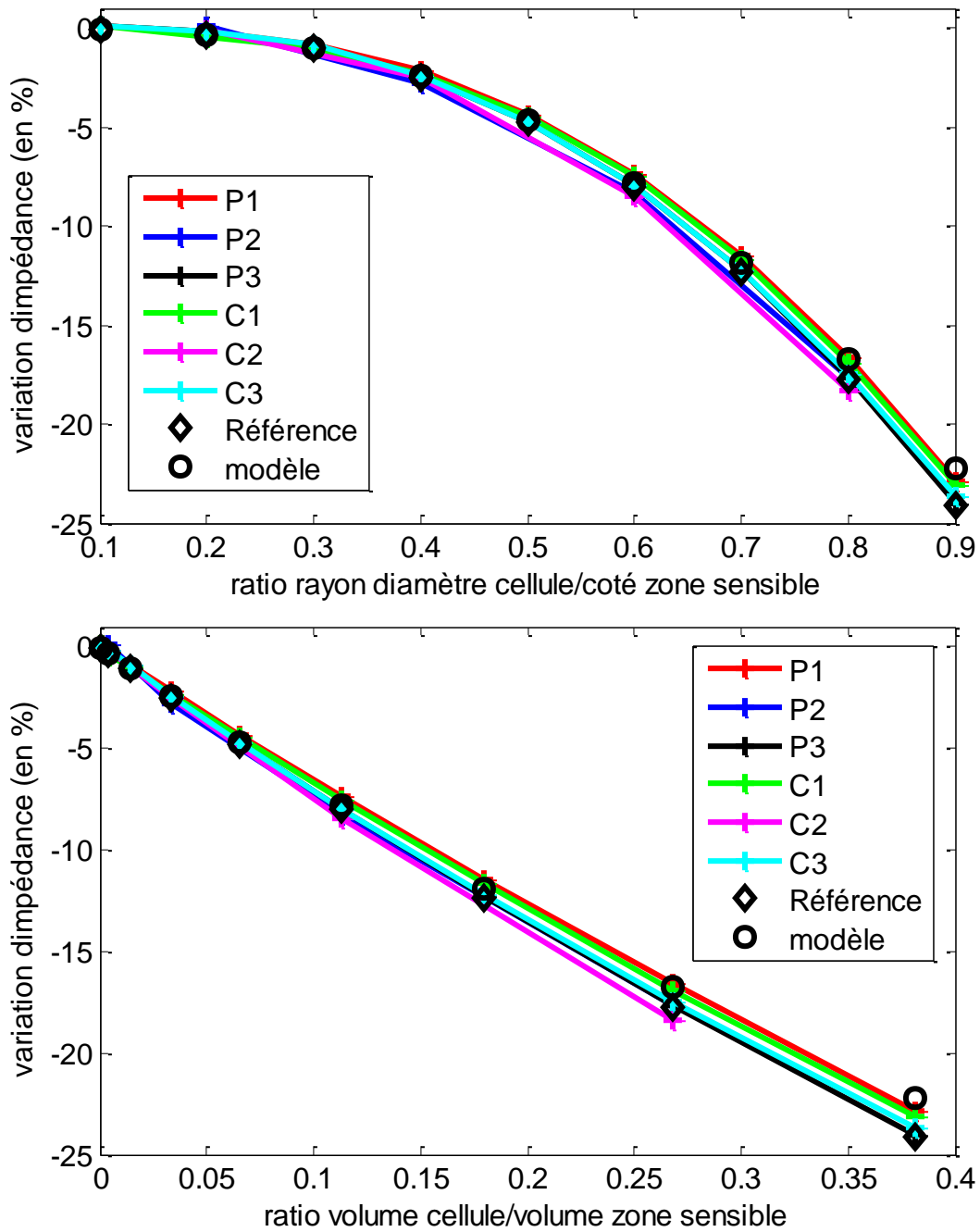


Figure 3-18 Variations d'impédances obtenues avec les géométries parallèles et coplanaires après soustraction des impédances fixes, ainsi que celle obtenues avec la simulation de référence et du modèle électrique, en fonction du ratio (diamètre de la cellule/côté de la zone sensible) et du ratio (volume de la cellule/volume de la zone sensible) pour une conductivité du cytoplasme de 2S/m.

Effet de la capacité membranaire.

Pour comparer les modèles, nous nous sommes replacés dans le cas d'une cellule avec une capacité surfacique membranaire de $1\mu\text{S}/\text{cm}^2$. Cette fois, afin de pouvoir comparer plus aisément les résultats, les courbes sont représentées en termes de variation de capacité par rapport à la mesure sans cellules. La capacité membranaire, d'après le modèle électrique, est proportionnelle au rapport volumique de la cellule, mais aussi à son rayon.

Afin de pouvoir comparer toutes les géométries en même temps, il sera nécessaire de multiplier par deux les variations calculées pour les géométries P2 et C2. Présentant des facteurs de forme deux fois plus faibles pour leurs zones sensibles, les cellules qui y seront présentes, auront un rayon deux fois plus faible pour le même rapport volumique. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 3-19. Comme pour les cas précédents nous obtenons des résultats en accord avec les théories formulées. De même que pour la cellule isolante, nous obtenons des erreurs très faibles entre le modèle électrique et les simulations lorsque le rapport volumique de la cellule n'est pas trop grand. Pour un rapport volumique de 0,2, représentant une cellule de $14\mu\text{m}$ dans un canal de $20\mu\text{m}$ de section, nous obtenons une erreur d'environ 22% pour la variation de capacité entre le modèle électrique et les résultats de simulation. Il ne faut pas oublier qu'une erreur de 22% sur la variation mesurée, représente une erreur moindre sur la mesure d'impédance elle-même, et que le modèle électrique prend en compte une épaisseur de membrane négligeable face à la dimension de la cellule. Cela est vrai en réalité avec un rapport de dimension d'un ordre de grandeur de 1000, mais pas en simulation où l'épaisseur de la membrane a été augmentée d'un rapport 25 à 50 pour rendre le système simulable. Il est donc difficile de connaître la part d'erreur émanant des simulations et de celle émanant du modèle électrique.

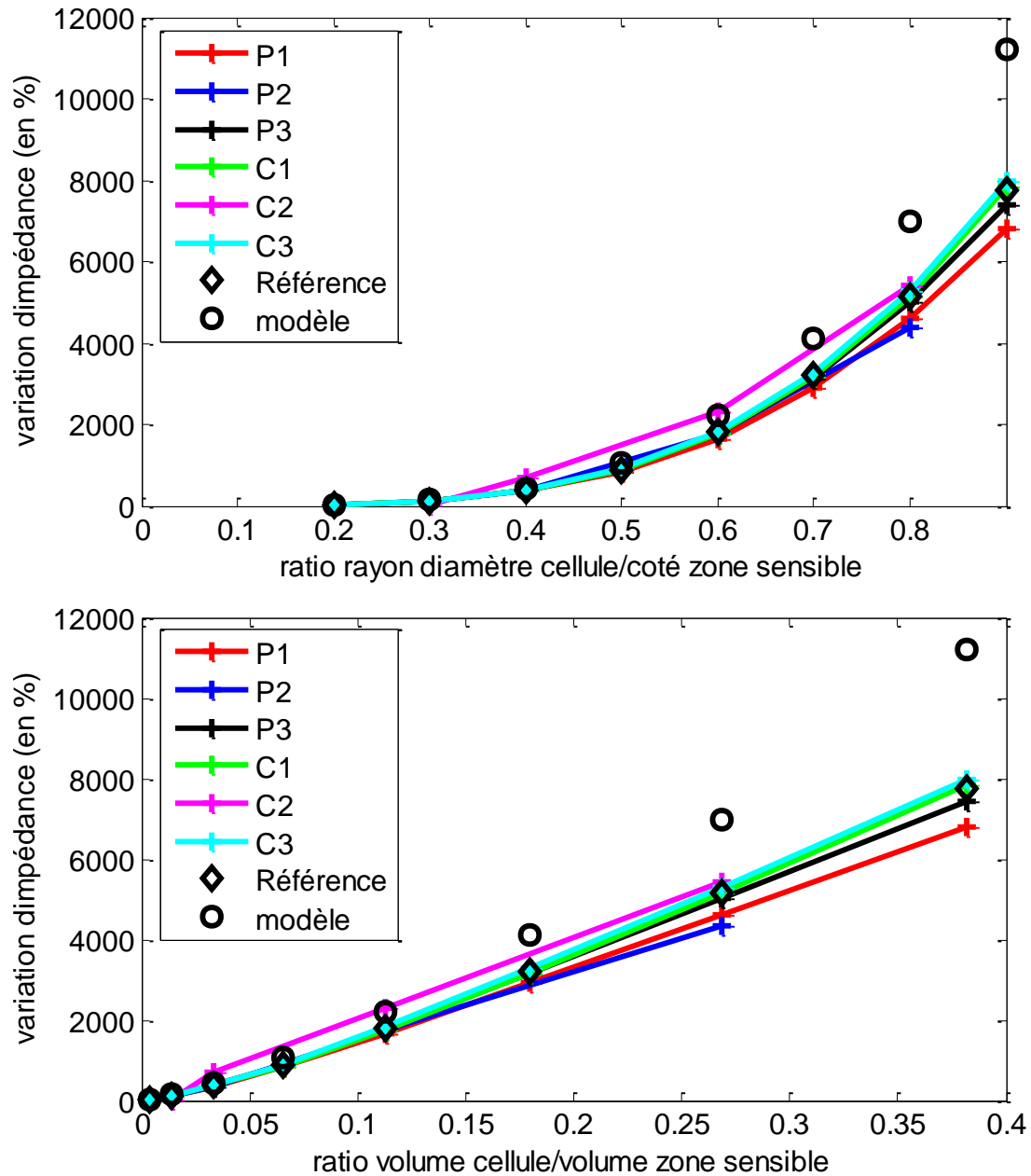


Figure 3-19 Variations de capacités obtenues avec les géométries parallèles et coplanaires après soustraction des impédances fixes, ainsi que celle obtenues avec la simulation de référence et du modèle électrique, en fonction du ratio (diamètre de la cellule/côté de la zone sensible) et du ratio (volume de la cellule/volume de la zone sensible) pour une capacité membranaire de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$.

3.6 Conclusion.

Nous avons réalisé dans cette partie l'étude par modélisations et simulations des mesures d'impédances de cellules unitaires par des microélectrodes implantées dans un canal. Cette étude nous a permis de pouvoir nous situer par rapport au type de structures et à la gamme de mesures qu'il faudra effectuer. Pour cela, plusieurs structures d'électrodes ont été proposées. Le choix de leurs géométries a été guidé d'une part par la nécessité d'utiliser des dimensions du même ordre de grandeur que les cellules à mesurer, et d'autre part sur leurs réalisabilités techniques et leur intégrabilité dans un microcanal. Ce choix a aussi été orienté vers des géométries élémentaires afin de pouvoir appliquer les modèles les plus simples possibles.

La seconde partie s'est donc naturellement portée sur le choix d'un modèle. Celui qui a été choisi découle des modèles de Maxwell mais optimisé pour la mesure de cellules unitaires. Celui-ci avait déjà servi plusieurs fois de référence pour des géométries d'électrodes parallèles. Une étape a donc été nécessaire afin de proposer une adoption de ce modèle pour une plus large gamme de géométries d'électrodes, en passant par la discrétisation des différentes zones soumises à un champ électrique lors de mesures.

Des simulations par la méthode des éléments finis ont été réalisées pour déterminer la réponse de chaque type d'électrodes à la mesure de cellules unitaires. Les différents paramètres d'une cellule biologique que nous désirons mesurer par impédancemétrie ont été modifiés indépendamment pour déterminer la sensibilité de chaque géométrie utilisée, ainsi que leur immunité face à la détection de cellules rapprochées ou agrégat de cellules. Nous avons ainsi pu déterminer que les mesures utiles, peuvent être décrites sous forme de variations d'impédances. Celles-ci étant déjà faibles, soit de l'ordre de quelques pourcent, pour les meilleurs géométries, les électrodes C3 et P3, qui présentaient des réponses bien moins intéressantes que ces dernière ont été écartées. La réponse en fréquence de l'impédance d'une cellule isolée a aussi été réalisée. Nous avons ainsi pu déterminer la gamme de mesures utiles en termes d'impédances et de fréquences.

Enfin, les résultats obtenus en simulation ont pu être comparés au modèle électrique modifié. Il s'est avéré qu'en appliquant aux résultats de simulation la discrétisation proposée pour les modèles électriques, nous avons pu pour chaque géométrie, retrouver l'impédance équivalente d'une cellule présente dans un bloc élémentaire. Ce résultat signifie donc, la possibilité d'effectuer des comparaisons directes entre des mesures effectuées avec différentes géométries, donc différentes réponses de base. Le modèle électrique a quant à lui montré de

CHAPITRE 3 : Modélisation et simulation des réponses de biocapteurs pour la mesure d'impédance de cellule isolée

bonnes concordances avec les résultats de simulation à la condition près que le diamètre de la cellule ne représente pas plus de 70% de la hauteur du canal; condition qu'il faudra de toute façon respecter pour éviter tout risque d'obturation du canal. Les mesures sur les cellules dont le diamètre est inférieur à 30% de la hauteur du canal ne présentent que de très faibles variations. Elles sont donc difficilement exploitables. Il sera donc, dans un cas général, préférable que les dimensions des cellules soit comprises entre 30 et 70% de la plus petite dimension du canal.

CHAPITRE 4 : Conception et réalisation du biocapteur

CHAPITRE 4 : Conception et réalisation du biocapteur

4.1 Introduction.

Nous avons déterminé, dans le chapitre précédent, les géométries d'électrodes les mieux adaptées à nos mesures. La prochaine étape, exposée dans ce chapitre, concerne leur réalisation. Pour cela nous définissons dans un premier temps la conception du capteur. Celui-ci devra être défini par structuration de différentes couches, afin d'être compatible avec les techniques de fabrication classiques. Ce design devra comporter tous les éléments nécessaires au bon fonctionnement du capteur final. Cette conception sera ensuite utilisée pour la fabrication des masques de lithographie en chrome.

Nous nous intéresserons ensuite à la fabrication du capteur, avec en premier lieu le choix des matériaux qui devront être utilisés parmi ceux à notre disposition. Ils devront notamment respecter un certain nombre de contraintes telles que la biocompatibilité et une bonne résistance aux agressions des échantillons biologiques et des produits nécessaires pour le nettoyage. Deux techniques de fabrication possibles seront exposées. L'une consistant à réaliser un canal par structuration de résine et l'autre par moulages. Dans les deux cas, les techniques et principes utilisés pour cette réalisation seront détaillées.

Une fois les capteurs réalisés, des tests d'écoulements seront effectués pour vérifier leur étanchéité, et vérifier aussi que l'écoulement dans le canal est bien laminaire. Ils permettront aussi de déterminer si les capteurs pourront résister à des pressions plus élevées que celles utilisées pour le simple déplacement d'un liquide, comme dans le cas d'un bouchage du canal par des agrégats.

4.2 Conception du capteur.

4.2.1 Cahier des charges succinct.

Le capteur à réaliser doit permettre de transporter un liquide biologique, tel que le sang, dans une zone de mesure composée de microélectrodes. Le capteur devra comporter un canal microscopique de 20 μ m de largeur, afin de pouvoir y isoler et mesurer les cellules une à une. De plus ce canal devra être suffisamment long pour y intégrer les différents types d'électrodes à tester. Un canal d'une telle dimension ne permet pas le placement d'un échantillon, il faudra donc prévoir un évasement de ce canal en canaux de plus grande dimension, millimétrique, où l'échantillon pourra être injecté ou déposé.

Des systèmes SAW, composés d'électrodes interdigitées seront implantées à chaque extrémité des canaux, afin de réaliser le déplacement du liquide par ondes acoustiques de surfaces. La présence de ces systèmes impose aussi que les extrémités des canaux doivent être de dimensions millimétriques pour transférer une énergie suffisante vers le liquide.

Dans un premier temps, afin de valider le fonctionnement des dispositifs réalisés et vérifier que les mesures sont en accord avec la théorie, le capteur sera réalisé sur un substrat simple, moins coûteux que les substrats de type piézoélectriques. Il se peut aussi que le système de déplacement SAW ne fonctionne pas comme prévu. Dans ces deux cas, il sera nécessaire de prévoir en plus, un moyen de déplacer du liquide par injection ou aspiration. Nous pourrions également envisager de combiner les deux systèmes de déplacement. Le système SAW servira pour des déplacements précis et contrôlables par le signal (fréquence et puissance) alimentant le dispositif SAW.

Il faudra aussi pouvoir suivre l'évolution des cellules lors de leur déplacement dans le canal afin de pouvoir valider que les mesures effectuées correspondent bien à leurs passages dans la zone de mesure. Ce suivi permettra aussi de valider si le canal est correctement nettoyé entre chaque mesure, ainsi que de prévenir les risques d'occlusion du canal. Pour ce faire, le capteur devra être transparent afin de pouvoir effectuer ce suivi par une caméra combinée avec un microscope optique.

4.2.2 Structuration des couches.

Dans la réalisation d'un microsystème, le design est une étape importante, car il doit permettre de définir toutes les couches nécessaires à la réalisation du système final en 3

dimensions. Il doit de plus être compatible avec les techniques de micro-fabrications disponibles.

Les électrodes coplanaires sont les plus faciles à structurer, car elles ne nécessitent qu'un seul niveau de masquage et une seule couche à structurer sur le substrat, soit une structure de base de type surface. Il en va de même pour les dispositifs SAW qui sont composés d'électrodes interdigitées, donc aussi de type coplanaire. Il faut aussi prévoir la connectique entre ces structures microscopiques et les connectiques macroscopiques. Pour cela les pistes des électrodes devront être ramenées sur les bords du substrat, au niveau de contacts millimétriques.

Les électrodes parallèles sont plus complexes à intégrer dans un dispositif, car elles possèdent des structures plus complexes à réaliser. Elles peuvent être réalisées soit de part et d'autre du canal, soit par collage de deux substrats de part et d'autre du canal, comme présenté en Figure 4-1. Dans les deux cas de figures, ces structures sont difficiles à réaliser. Placer des substrats de chaque côté du canal nécessite un collage délicat avec une phase d'alignement qui nécessite des appareils de centrage de précision qui ne sont pas à notre disposition. De plus l'accès de l'échantillon vers le canal nécessite un retrait de matière de part et d'autre du substrat. L'autre solution permet de conserver un seul substrat. Elle est cependant délicate au niveau de la réalisation d'un second dépôt, de par le ratio hauteur sur largeur élevé, et le risque de non-adhérence sur les parois. C'est pourquoi dans le cadre de ce travail de thèse, seules les électrodes de type coplanaire seront envisagées pour nos mesures. Cependant, les structures de bases permettant la réalisation des électrodes parallèles seront prévues en vue de leur réalisation.

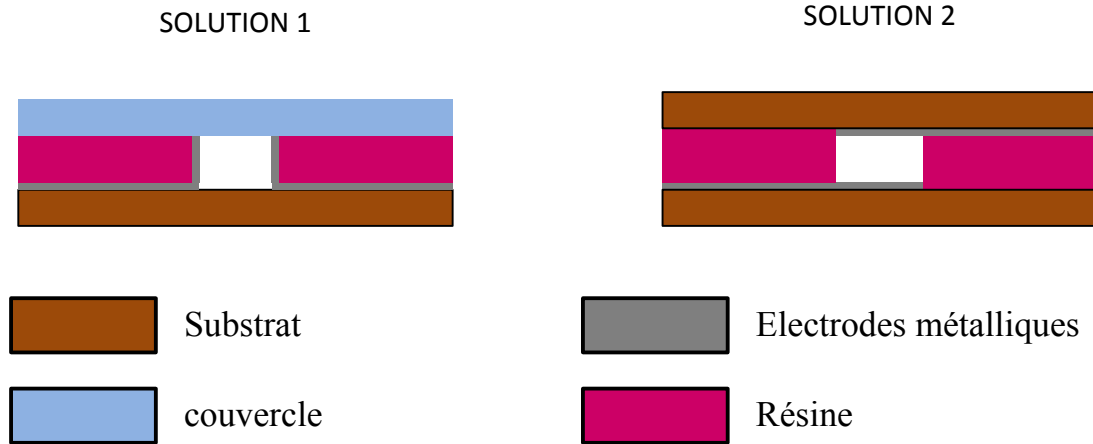


Figure 4-1 Représentation schématique des deux solutions proposées pour l'implantation d'électrodes parallèles.

L'empreinte du canal sera quant à elle réalisée sur une couche propre, placée au-dessus de celle des électrodes coplanaires. Elle sera formée des rétrécissements successifs décrits précédemment, avec un canal de mesure central de $20\mu\text{m}$ de largeur. Des distances suffisantes seront laissées entre chaque groupe d'électrodes pour éviter les interférences entre elles, ainsi qu'entre le dernier rétrécissement et les électrodes pour permettre un meilleur centrage des cellules.

Finalement, le canal devra être fermé par un couvercle. Celui-ci devra être scellé par collage ou maintien par force afin d'éviter tout flux en dehors du canal. Il devra aussi comprendre des orifices où le liquide à tester pourra être déposé ou injecté. Dans ce dernier cas, ceux-ci devront être de taille compatible avec les capillaires disponibles sur le marché et être de profondeur suffisante pour le maintenir correctement. Le canal pourrait aussi être réalisé par moulage, puis collé directement sur le substrat. Cependant, tout comme le placement des électrodes parallèles, cette technique nécessite l'utilisation d'un appareil de centrage de précision.

4.2.3 Réalisation des masques

Une fois toutes les contraintes et paramètres définis, Il est possible de réaliser le design complet du capteur par des outils de CAO. Le format « gds » est utilisé comme standard pour la réalisation de masques.

Comme défini précédemment, toutes les électrodes seront réalisées par paires. Les électrodes les plus importantes étant celles de type coplanaires, elles seront placées au centre du canal. Les électrodes seront réalisées avec des longueurs plus grandes ($100\mu\text{m}$) que celles

normalement nécessaires pour faciliter leur centrage dans le canal. Après placement du canal, seule la surface voulue pourra être en contact avec le liquide présent dans le canal. Les empreintes, pour d'éventuelles futures électrodes parallèles, seront placées de part et d'autre du canal, en dépassant de $1\ \mu\text{m}$ de chaque côté. La distance d' $1\ \mu\text{m}$ correspondant à l'ordre de grandeur de la résolution d'une lithographie UV. Deux paires d'électrodes interdigitées, seront aussi placées. Celles-ci comporteront un nombre réduit de digits, du fait des dimensions du canal. Elles seront composées de trois paires d'électrodes de $2\ \mu\text{m}$ de large et d'écartement, couvrant une surface de $20 \times 20\ \mu\text{m}^2$. Elles ne seront pas en mesure de détecter les cellules, mais pourront être utilisées pour mesurer les propriétés du liquide et détecter une éventuelle sédimentation au fond du canal. Chacune de ces structure sera placée à $200\ \mu\text{m}$ l'une de l'autre pour éviter qu'elles interfèrent.

Concernant le canal, la largeur de celui-ci à ses extrémités est fixée à $5\ \text{mm}$, ce qui permettra un centrage aisé avec des capillaires millimétriques. Les systèmes SAW seront donc choisis de même dimensions, afin que les ondes couvrent toute la largeur du canal. Ils seront formés de deux fois 100 paires d'électrodes avec une période de $24\ \mu\text{m}$, pour obtenir une longueur d'onde de même ordre de grandeur que la hauteur du canal. Les électrodes font $6\ \mu\text{m}$ de largeur pour $6\ \mu\text{m}$ d'écartements. Des dimensions d'électrodes plus faibles peuvent poser des problèmes, pour la réalisation de telles structures. La salle de lithographie dans laquelle seront réalisés les dispositifs est de classe 1000. C'est-à-dire que les poussières supérieures à $6\ \mu\text{m}$ sont filtrées, mais d'après la norme, contient en moyenne 293 particules de $5\ \mu\text{m}$ par m^3 . Si le risque de dépôt d'une particule est faible sur un motif isolé, il le devient moins sur une structure présentant une surface plus étendue, tel qu'un dispositif SAW. De plus, la partie de la salle blanche où sont réalisés les dépôts et le nettoyage des échantillons est de classe 10000 et contient 10 fois plus de particules en suspension.

Une dernière chose est à prendre en compte lors de la conception du masque, et la réalisation de motifs de centrage : le placement entre chaque couche doit être réalisé avec une précision micrométrique, notamment pour les motifs de bases des électrodes parallèles. Pour cela, des croix de centrage sont dessinées sur des zones non utilisées de l'échantillon. Celles-ci doivent être placées à des distances suffisantes pour permettre un bon centrage, et sont généralement placées aux quatre coins de la zone utile du masque.

En respectant toutes les indications et paramètres décrits précédemment, nous obtenons le design présenté en Figure 4-2.

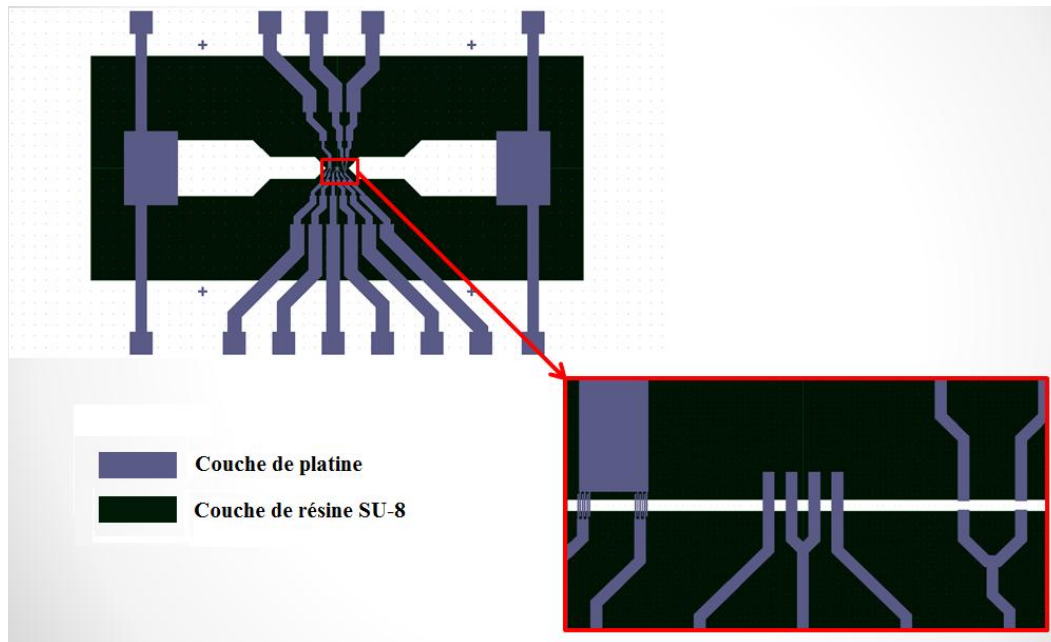


Figure 4-2 Design des deux couches du capteur.

Suivant le type de résine utilisée pour les lithographies, il reste encore à définir si les masques doivent être imprimés en motifs positifs ou négatifs. Pour la première couche, nous privilégierons la structuration par gravure, dont le choix sera argumenté dans la partie sur les sélections des matériaux et des techniques de micro-fabrications. La résine utilisée sera donc une résine positive, ce qui implique par là même l'utilisation d'un masque à motifs positifs. Pour le canal, nous pouvons envisager dès maintenant de réaliser à la fois les masques positifs et négatifs, suivant la réalisation du canal directement par dépôt de la résine ou par moulage préalable.

4.3 Fabrication des capteurs

La totalité des étapes qui seront présentées ont été réalisées dans les locaux de l'institut Jean Lamour, dont la majorité d'entre eux en salle de micro-conception (salle blanche) avec le soutien du centre de compétence MINALOR.

4.3.1 Choix des matériaux

Lors de la fabrication d'un microsystème, les matériaux doivent être choisis de façon judicieuse, pour que le système final soit réalisable. Dans le cas de notre capteur, destiné aux applications biomédicales, celui-ci doit de plus montrer la plus grande biocompatibilité

possible. En effet, les matériaux ne devront pas interagir avec les échantillons, afin de ne pas modifier les propriétés de ceux-ci et/ou les altérer. Ils devront présenter une bonne résistance face aux attaques chimiques. La plupart des échantillons biologiques n'ont pas un pH neutre, comme le cas du sang avec un pH compris entre 7,35 et 7,45, et peuvent provoquer des réactions acido-basiques avec les électrodes par exemple. Les nombreux ions en solution qu'ils contiennent peuvent aussi engendrer des réactions d'oxydoréduction, surtout en cas de polarisation des électrodes, avec des matériaux tels que le cuivre. De plus s'agissant de dépôt par couches minces, ces attaques peuvent rapidement les faire complètement disparaître. Nous allons pour cela déterminer les matériaux les plus adaptés pour nos différentes couches.

Substrat.

Le choix du substrat est le premier à effectuer, car il s'agit de la base du capteur. C'est sur ce matériau que toutes les couches structurées seront déposées. Le substrat peut être fonctionnalisé ou non, c'est-à-dire ne jouer qu'un rôle de support d'attache ou posséder par exemple des propriétés physicochimiques essentielles au fonctionnement du capteur. C'est le cas par exemple pour l'implémentation de structures SAW sur un substrat piézoélectrique. Dans un premier temps, nous allons nous orienter vers un substrat peu coûteux et non fonctionnalisé. Notre choix c'est donc tourné vers un échantillon en verre, qui permettra le suivi *de visu* des cellules, puisque transparent. Concernant le substrat piézoélectrique, nous avons choisi le niobate de lithium (LiNbO_3), transparent lui aussi, et qui est déjà utilisé avec succès par les équipes de notre institut pour le déplacement de microgouttes par électrodes SAW.

Electrodes.

Comme dit précédemment les électrodes doivent être le plus inerte possible chimiquement afin de ne pas réagir avec l'environnement de mesure. Les matériaux les plus souvent utilisés pour ces applications sont le platine, l'or, le palladium et le tantale. Seul le palladium n'est pas à notre disposition pour réaliser les électrodes. Notre choix s'est porté sur le platine, qui en plus d'être disponible présente les meilleurs caractéristiques pour les mesures de type électrochimiques [10].

Canal et couvercle.

Nous avons proposé deux méthodes possibles pour la réalisation du canal, soit par structuration directe d'une résine sur le substrat, soit par moulage et collage. Nous allons donc chercher les matériaux les plus à même de remplir ces fonctions.

Concernant, la résine, notre choix s'est porté sur l'utilisation de la résine SU_8, présentant toutes les caractéristiques requises. Cette résine fait partie des matériaux les plus biocompatibles utilisés dans les MEMS, et plus particulièrement en microfluidique. De plus, cette résine est disponible en de nombreuses viscosités, permettant de faire des dépôts dans une large gamme d'épaisseurs (quelques dixièmes à quelques centaines de μm). Il s'agit d'une résine négative, transparente, qui une fois réticulée devient très résistante à une large gamme de solvants. Celle-ci pourra résister à des nettoyages avec des solvants tels que des alcools.

Concernant la réalisation d'un couvercle ou d'un moulage, notre choix s'est porté sur le même matériau, le Polydiméthylsiloxane (PDMS), puisque le couvercle peut lui aussi être réalisé facilement par moulage. Il s'agit d'un polymère siliconé obtenu après polymérisation et réticulation d'une résine et d'un durcisseur. De par ses propriétés élastiques, il est facile à démouler. Il est aussi biocompatible mais peut être contaminé par certains composés hydrophobiques, notamment après vieillissement. Cependant, les relargages pouvant survenir après contamination restent limités, surtout dans le cas d'un flux continu dans le canal lors des mesures.

4.3.2 Nettoyage des échantillons

Avant de réaliser tous dépôts de matière sur le substrat, il est nécessaire de parfaitement nettoyer celui-ci, afin qu'il soit exempt de poussières, de graisse, ou de tout autre composant indésirable. La qualité d'accroche des différentes couches en dépend directement. Un protocole de nettoyage est systématiquement suivi de façon à assurer la parfaite propreté du substrat. Il se décompose en quatre phases :

1. Nettoyage pendant 10 minutes avec une solution de soude (NaOH) dans un bain à ultrasons.
2. Nettoyage pendant 10 minutes avec une solution détergente alcaline RBS dans un bain à ultrasons.
3. Nettoyage pendant 10 minutes avec de l'acétone dans un bain à ultrasons.

4. Nettoyage et rinçage pendant 10 minutes avec de l'isopropanol.
5. Séchage de l'échantillon au pistolet à azote.

Les échantillons sont aussi frottés avec une lingette au milieu des étapes 2 et 3 et rincés à l'eau déionisée entre les étapes 1 à 3. La soude permet de supprimer les dépôts inorganiques, et le RBS et l'acétone les dépôts organiques (telles que les graisses). Le passage dans l'acétone permet de supprimer ces dépôts efficacement mais laisse des traces après séchage. C'est pourquoi les échantillons sont ensuite placés directement dans un bécher d'isopropanol, qui ne laisse pas de trace après séchage.

4.3.3 Réalisation des électrodes (couche 1) :

Dépôt de platine par pulvérisation cathodique.

Il s'agit de la première étape de la réalisation, correspondant à la première couche du capteur. Elle permet de structurer directement les électrodes coplanaires et interdigitées sur le substrat. Les opérations sont presque les mêmes dans le cas d'un substrat piézoélectrique ou en verre. La première étape consiste à déposer une couche uniforme de platine sur toute la surface de l'échantillon. Pour cela nous disposons d'un bâti de pulvérisation cathodique, avec quatre cibles à disposition : aluminium, tantale, platine et silicium. Ce type de dépôt à l'avantage être rapide, hormis le temps de charge et de décharge de l'échantillon. 64 secondes de pulvérisation suffisent pour déposer environ 150nm de platine. Le platine étant un métal relativement inerte, il a présenté des problèmes d'accroche à de multiples reprises. Ce problème a été résolu par ajout au préalable d'une fine couche d'accroche en tantale, aussi par pulvérisation pendant 10 secondes. La couche d'accroche de tantale ne présente aucun problème de compatibilité puisque il est biocompatible et en plus il présente une infime surface en contact avec l'extérieur (seules les surfaces latérales de 5 nm d'épaisseur ne sont pas protégées par la couche de platine).

Dépôt de résine et lithographie.

A la fin de l'étape précédente, le matériau est déposé sur toute la surface du substrat. La résine photosensible choisie est une résine de type Shipley 1813. Il s'agit d'une résine assez peu visqueuse, généralement utilisée pour des épaisseurs de l'ordre du μm . Il s'agit d'une résine positive standard, souvent utilisée en salle blanche, notamment pour effectuer

CHAPITRE 4 : Conception et réalisation du biocapteur

des gravures ioniques. Elle est donc adaptée pour notre structuration du platine, qui nécessitera une gravure ionique. La résine est directement déposée sur l'échantillon à l'aide d'une pipette, puis étalée en une couche homogène par centrifugation dans une tournette, Figure 4-3. Ce dépôt étant couramment utilisé, l'utilisation des paramètres définis par défaut était déjà optimale.



Figure 4-3 Photographie de la tournette SPIN150 utilisée.

Le solvant de la résine est ensuite évaporé en plaçant l'échantillon pendant 60 secondes sur une plaque chauffante pour les échantillons en verre. Le niobate de lithium, utilisé pour nos échantillons piézoélectriques, est aussi pyroélectrique, une modification rapide de la température, ou un gradient de température trop important risque de briser l'échantillon. C'est pourquoi ces échantillons sont placés dans une boîte pour évaporer le solvant à température ambiante pendant plusieurs heures. Une fois la résine durcie, l'échantillon est placé dans un isolateur UV, présenté en Figure 4-4, qui effectue la mise en contact de la résine et du masque en chrome, puis l'insolation UV pendant 3.5s. Une fois insolé, l'échantillon est ensuite développé dans un bécher de MF319 (développeur pour résine S_1813), ce qui permet d'obtenir une couche de résine structurée. Cette résine étant colorée (violet), l'intégrité des motifs peut être vérifiée facilement au microscope optique avant gravure (Figure 4-5). De plus, comme il s'agit d'une résine positive, elle peut être aisément enlevée en cas de mauvais développement des motifs.

CHAPITRE 4 : Conception et réalisation du biocapteur



Figure 4-4 Aligneuse de masque et insolateur UV MA750. Photographie prise en salle blanche.

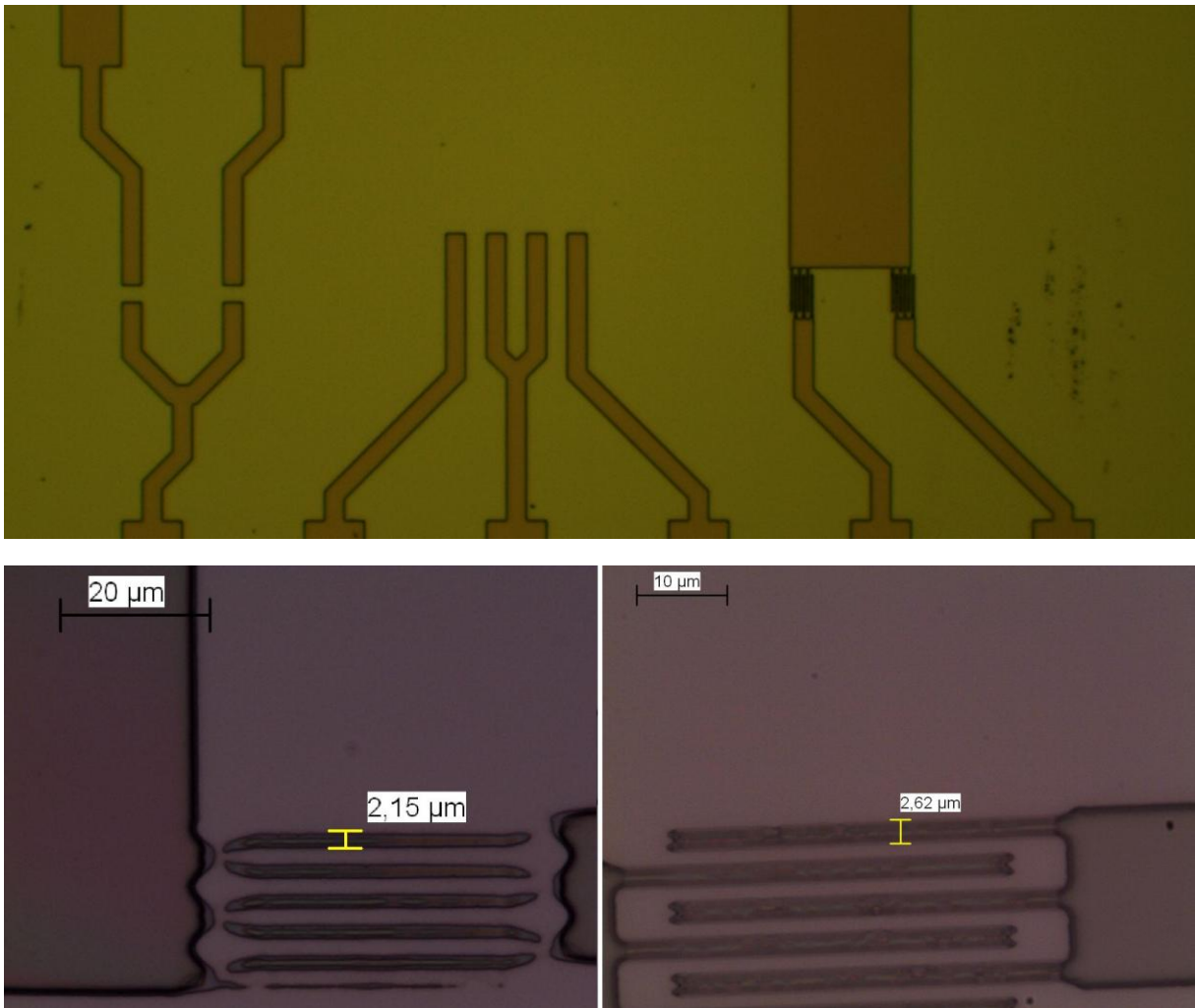


Figure 4-5 Vue au microscope optique de la résine structurée après développement : a) vue d'ensemble des structures d'électrodes ; b) Motifs avec défauts de développement ; c) Motifs correctement développés.

Gravure ionique.

La gravure ionique est une gravure sèche (physique), qui permet de graver tous types de matériaux. Cette gravure est donc adaptée pour le platine, qui ne réagit qu'avec un nombre très limité de produits chimiques. Le bâti de gravure utilisé est le IBE4Wave, présenté en Figure 4-6, qui permet de réaliser des gravures automatiques suivant des recettes prédéfinies. Pour notre échantillon nous avons utilisé l'Argon comme gaz de process pour le plasma, avec une tension de faisceau de 200V pour un courant de 50mA. Une puissance de faisceau donnée, correspond à une vitesse de gravure propre pour chaque matériau.



Figure 4-6 Bâti de gravure ionique IBE 4 wave, utilisé pour nos gravures ioniques.

Comme la gravure ionique n'est pas sélective, il faut déterminer à quel moment arrêter la gravure. Pour cela il est possible par exemple de déterminer après plusieurs expérimentations le temps nécessaire en fonction de l'épaisseur. Cela n'a pas été nécessaire puisque ce bâti comporte un spectroscope de masse à ionisation secondaire (SIMS : secondary ions mass spectroscopy), qui permet d'analyser en continu les matériaux gravés. Lorsque les atomes de la surface de l'échantillon sont pulvérisés, une partie d'entre eux est ionisée. Ces ions sont ensuite accélérés vers le SIMS, qui analyse leur quantité et leurs masses. Chaque ions ayant une masse propre, il est possible de connaître de quels matériaux pulvérisés ils proviennent. Lors de nos gravures nous avons analysé trois matériaux différents, correspondant aux trois différentes couches de l'échantillon : le platine, le tantale et le silicium. Le silicium correspond au substrat en verre, composé en majorité d'oxyde de silicium (SiO_2). L'évolution des quantités d'ions secondaires détectés est donnée en Figure 4-7.

Nous pouvons observer le début de la gravure, correspondant à l'augmentation du niveau de détection du platine. Une fois la couche de tantale atteinte, le niveau de détection de celui-ci augmente à son tour, et de même pour le silicium une fois le substrat atteint. Il faut attendre que le niveau de détection du tantale soit retombé au plus bas et celui du silicium stabilisé pour arrêter la gravure. Le substrat subit donc aussi une gravure, mais de temps bien inférieur à celui des couches métalliques, donc sur une épaisseur que nous pourrions négliger.

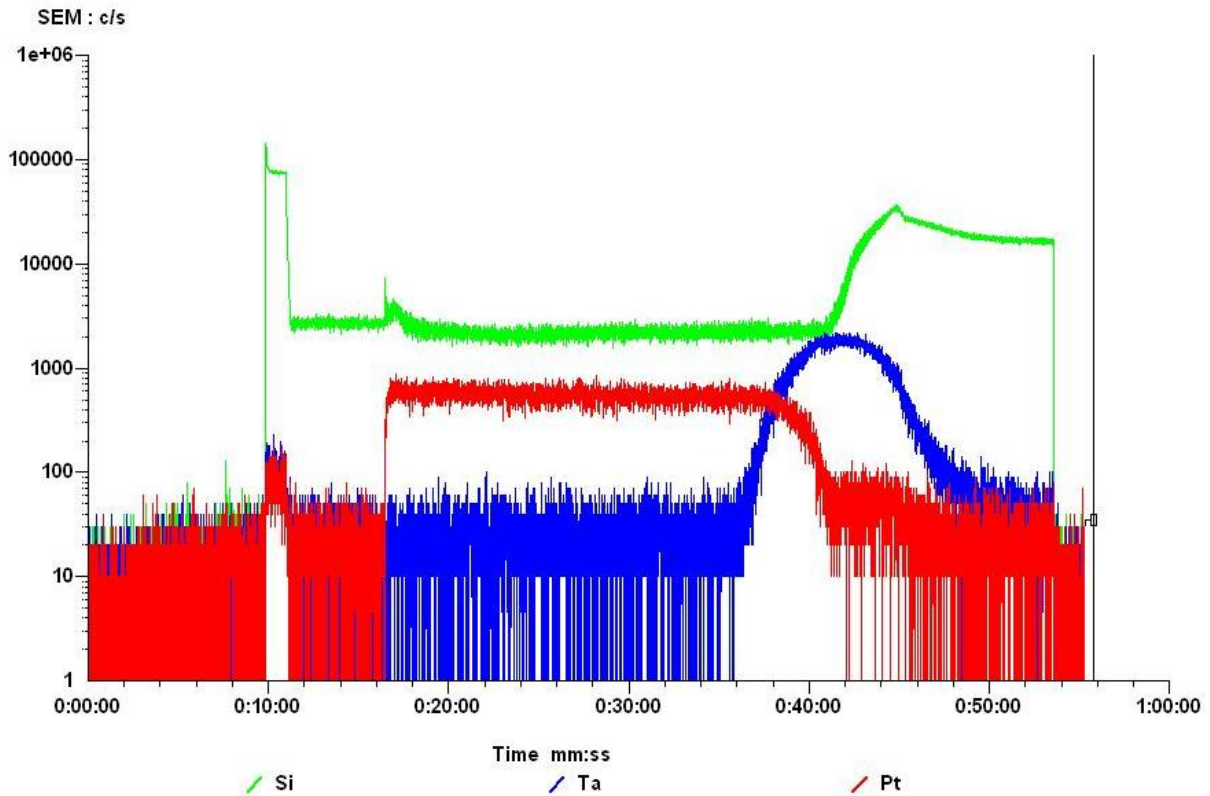


Figure 4-7 Courbes SIMS obtenue lors de la gravure des couches de tantale et platine, représentant pour chaque matériau le niveau de détection en fonction du temps.

Une fois gravé, nous obtenons nos motifs d'électrodes en platine, surmontés du reste de résine structurée, comme illustré en Figure 4-8. Celle-ci peut être enlevée en plaçant l'échantillon quelques minutes dans un béccher d'acétone aux ultrasons, puis rincé à l'isopropanol. Le bombardement ionique de la résine a cependant tendance à modifier les propriétés de surface de celle-ci, la rendant plus résistante aux solvants, voir Figure 4-9. Dans ce cas il peut être nécessaire de placer l'échantillon dans une chambre de plasma oxygène. Celui-ci modifie aussi les propriétés de surface, rendant la résine cette fois plus soluble.

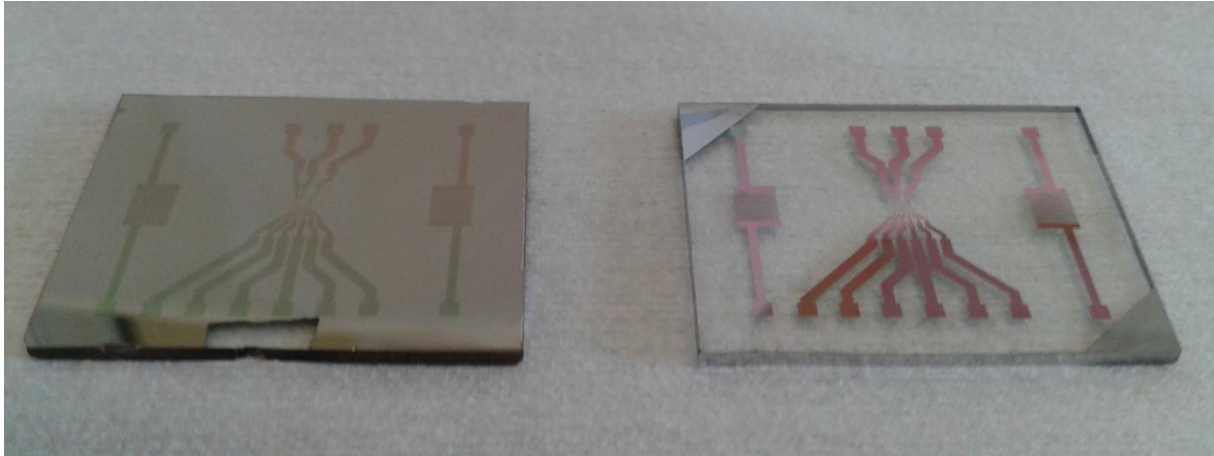


Figure 4-8 Photographie de deux échantillons avant et après une gravure ionique.

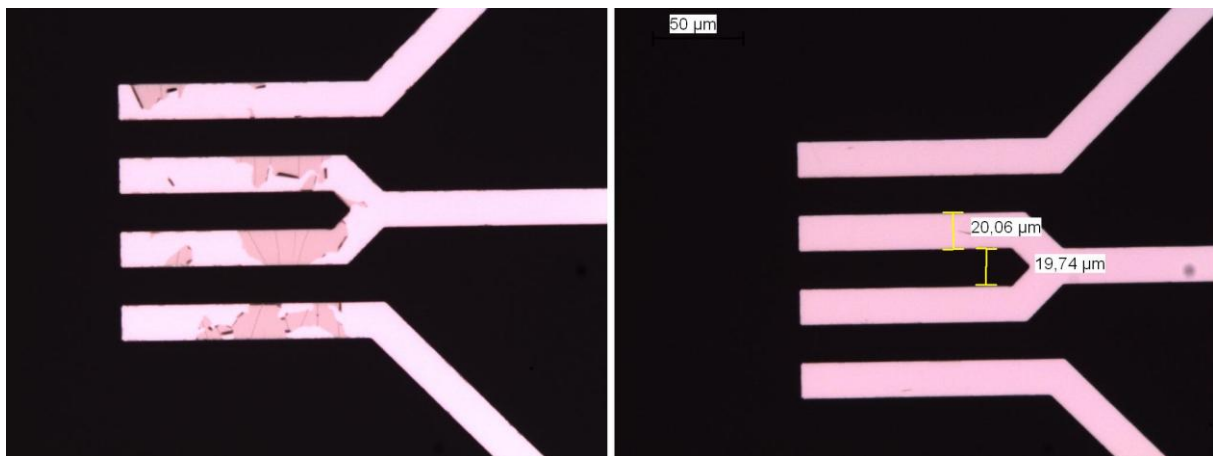


Figure 4-9 Image au microscope optique des électrodes coplanaires avec résidus de résine après un premier passage à l'acétone, b) Image au microscope optique des mêmes électrodes après passage au plasma O_2 et à l'acétone.

4.3.4 Réalisation du canal en résine SU_8 (couche 2).

La réalisation du canal se fait à l'aide des étapes de lithographie UV, comme pour la couche précédente. On utilise cette fois la résine SU_8. S'agissant d'une résine négative, elle devient cette fois-ci très résistante aux solvants après insolation. Ce qui implique qu'après développement, elle devient presque impossible à supprimer. C'est pourquoi cette étape est critique. Si les motifs voulus ne sont pas obtenus dès le premier développement, l'échantillon complet deviendra inutilisable, et les étapes précédentes seront perdues. C'est pourquoi tous les tests de validation ont été effectués sur échantillon de verre. Cette résine, notamment par son épaisseur, nécessite des temps de recuit, d'insolation et de développement plus longs, soit 30 min de recuit et 10 secondes d'insolation. De plus la réaction de polymérisation qui se produit après exposition au rayonnement UV a une faible cinétique à température ambiante, il faut effectuer un recuit de 30 min après l'insolation pour l'activer.

CHAPITRE 4 : Conception et réalisation du biocapteur

La première étape a été de déterminer les bons paramètres d'enrésinement pour obtenir l'épaisseur voulue. L'épaisseur obtenue dépend de la constante de la tournette utilisée pour cette résine et de la racine carrée de la vitesse de rotation. Les mesures effectuées à l'aide d'un profilomètre à aiguille, pour les tests effectués sont exposés dans le Tableau 4-1 et la Figure 4-10. Pour réaliser notre canal de 20 μm d'épaisseur la vitesse de rotation a pu être fixée à 2000 tr/min.

Tableau 4-1 Epaisseur de résine SU_8 obtenues en fonction des paramètres de la tournette.

Vitesse (en tr.min ⁻¹)	Temps (en sec)	Epaisseur mesurée (en μm)
1000	300	32
3000	300	16,3
7000	300	10,5
10000	300	7,7

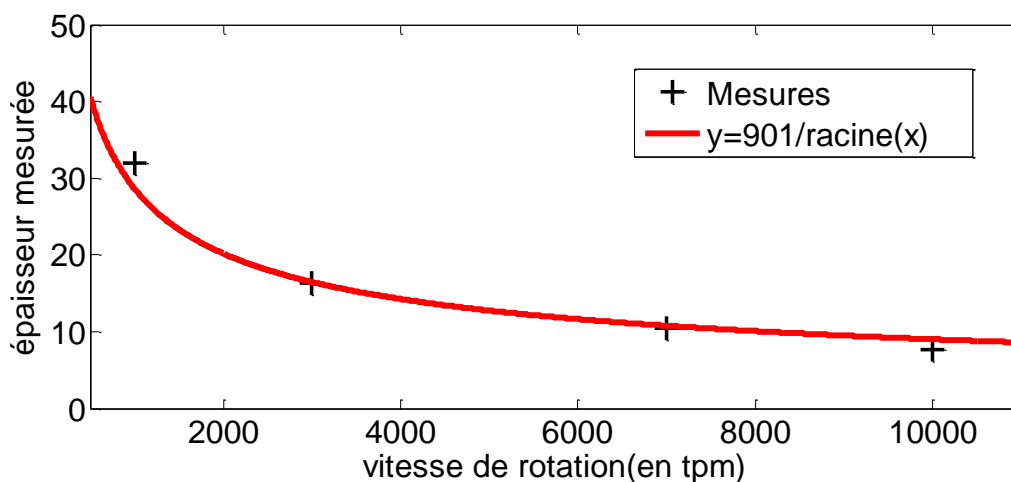


Figure 4-10 Epaisseur de résine mesurée en fonction de la vitesse de rotation et approximation par une courbe de type $A/\text{racine}(x)$.

Plusieurs problèmes ont été rencontrés au cours de la réalisation du canal en résine SU_8. Cette résine a en effet montré des problèmes d'adhérence sur le substrat, ce qui a provoqué dans certains cas le décollement d'une partie de la structure lors du développement, comme illustré en Figure 4-11. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'un promoteur d'adhérence, le PRIMER 80/20. Celui-ci s'applique sur l'échantillon, comme une résine avec recuit, et permet de modifier les propriétés de la surface pour améliorer l'adhérence. Malgré tout, les échantillons en résine SU_8 ont présenté des problèmes de décollement lors de leur utilisation pratiques (voir partie 4.4.3).

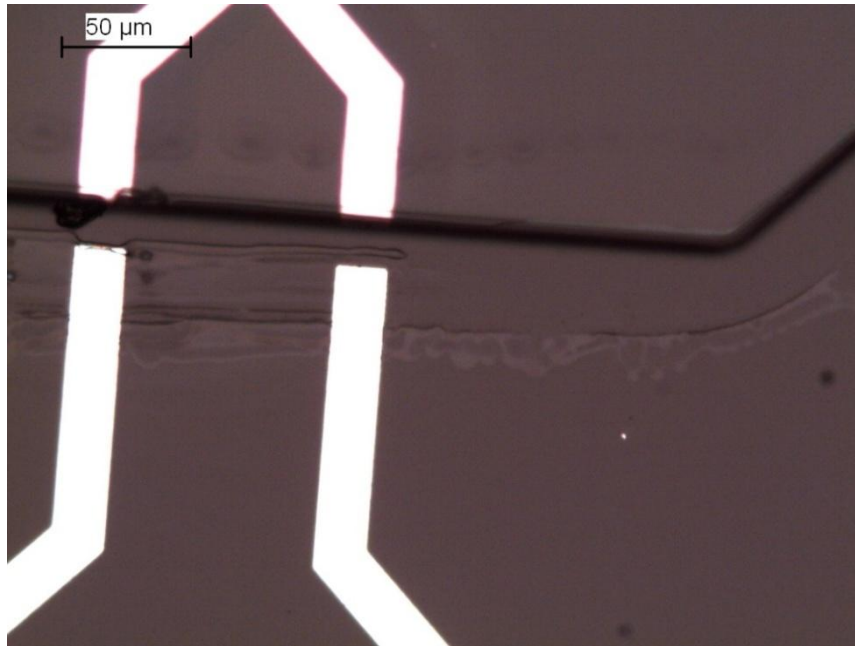


Figure 4-11 Décollement de la résine lors du développement de la résine SU_8.

L'autre problème principal concerne une mauvaise insolation de la résine, survenue dans certains essais. Elle est due principalement à un mauvais plaquage du masque contre la résine. Ce mauvais plaquage peut être dû à la présence de particules qui se sont déposées entre la résine et le masque, des restes de résines d'une précédente lithographie, ou d'un défaut d'homogénéité de la résine. Il en résulte une insolation anormale de la résine, comme illustré en Figure 4-12, où la résine au fond du canal a été insolée. Ce problème vient du fait que le rayonnement de la source UV n'est jamais parfaitement perpendiculaire à l'échantillon. La résine SU_8 étant très visqueuse, elle forme des surépaisseurs au bord de l'échantillon lors de l'étalement, qui peuvent poser des gros problèmes de plaquages des masques. Afin de pallier à ce problème, l'échantillon est placé sur une surface plane pendant plusieurs heures après l'étalement, afin d'homogénéiser au maximum la couche de résine. Dans un but de prévention, les masques sont systématiquement nettoyés avant chaque lithographie. L'application de cette nouvelle procédure a permis de réaliser les échantillons suivants avec de bons paramètres et une bonne reproductibilité. La structure SU_8 obtenue est donnée en Figure 4-13.

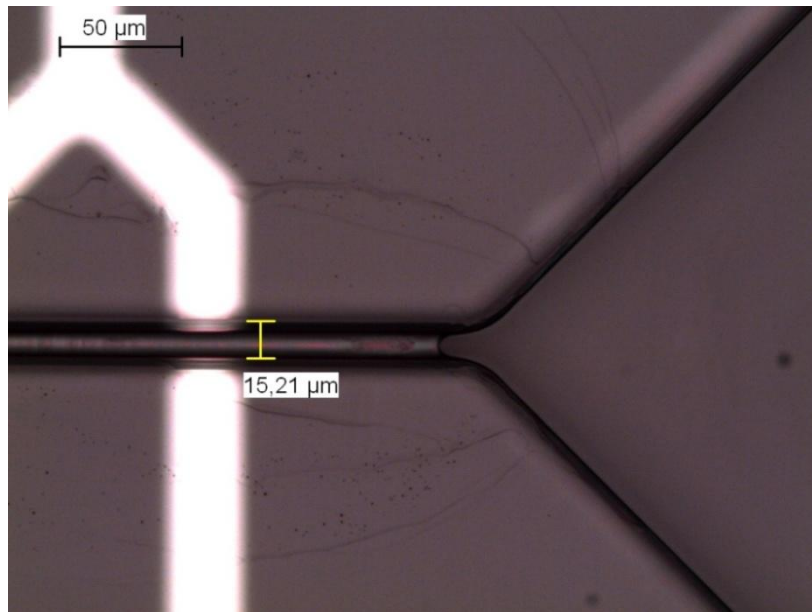


Figure 4-12 Sur-insolation de la résine avec présence de résine au fond du canal après développement.

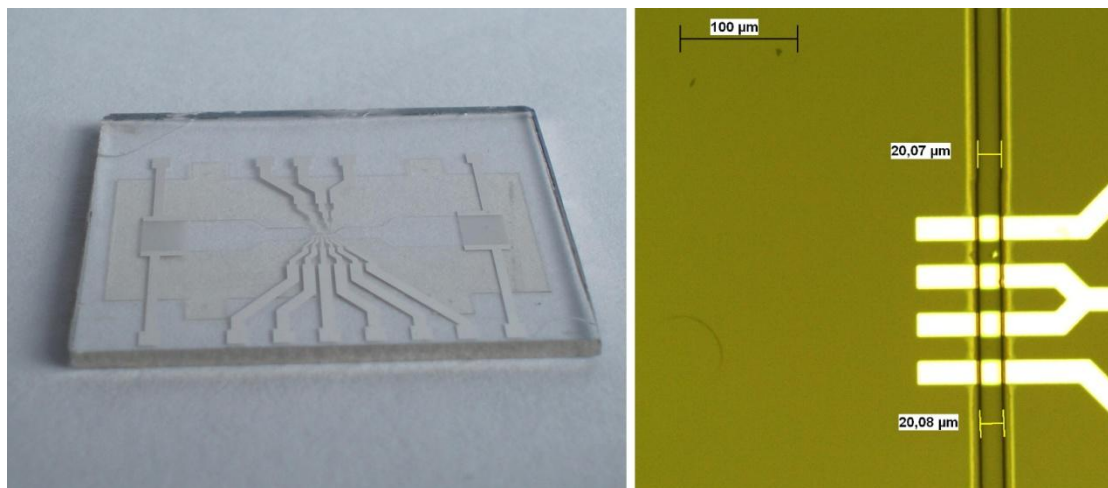


Figure 4-13 Photographie de l'échantillon avec la structure en résine SU_8, et agrandissement au microscope de la partie centrale du canal.

4.3.5 Réalisation et collage du capot en PDMS (couche 3).

Le PDMS est simple à manipuler. Il se présente sous la forme d'un liquide très visqueux que l'on doit mélanger à un agent réticulant, lui aussi liquide. La proportion classique, en masse, est de 10 unités de PDMS liquide pour 1 unité d'agent réticulant. Il est possible de modifier ce rapport pour obtenir une structure finale plus au moins élastique. Une fois les deux liquides mélangés, la réaction de réticulation commence, celle-ci est relativement lente à température ambiante et dépend fortement de la température. Il faut

plusieurs heures pour obtenir une augmentation visible de la viscosité et près de 24 heures pour obtenir le durcissement complet de la résine. Il est possible d'obtenir un durcissement complet en environ 1 heure à 75°C ou de le conserver sous forme liquide plusieurs jours à 4°C. Comme ce polymère siliconé est très visqueux, il emprisonne facilement des bulles d'air lors du mélange et risque de ne pas correctement couvrir les motifs les plus petits. Pour cela, il est en générale placé sous vide après avoir été déposé dans le moule, ce qui élimine les bulles d'air et favorise son étalage, et permet ainsi d'obtenir une résolution de près de 6nm.

Réalisation du capot.

Notre capot en PDMS doit venir fermer le canal, et ne contient donc pas de motifs microstructurés. Il doit cependant faire un lien entre le canal et l'extérieur pour le dépôt d'échantillon et/ou l'implantation d'un capillaire. Un moule a donc été réalisé par usinage d'une pièce massive en aluminium. Une lame de verre a été placée au fond du moule pour obtenir un très bon état de surface, et des trous ont été percés de chaque côté du moule pour pouvoir y placer les capillaires. Le PDMS est placé dans le moule puis placé sous vide pour supprimer les bulles d'air piégées. Une fois le polymère réticulé, les capillaires sont enlevés et le PDMS démoulé, laissant une ouverture aux diamètres exacts des capillaires de chaque côté. Des orifices sont ensuite découpés au scalpel pour effectuer la liaison avec la face qui se trouvera juste au-dessus du canal. Ces étapes sont décrites en Figure 4-14.

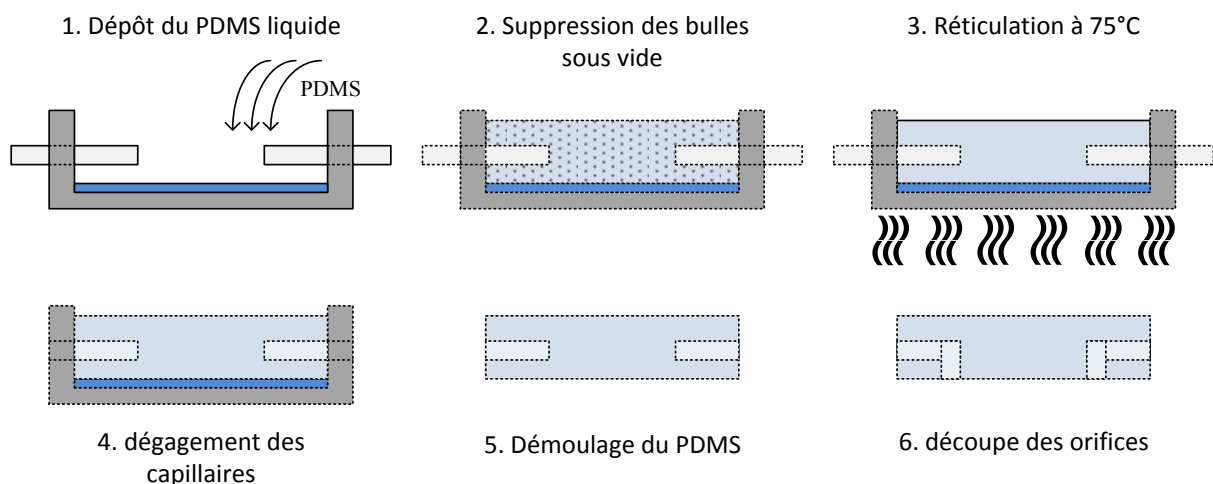


Figure 4-14 Représentation schématique des étapes de réalisation du capot en PDMS.

Collage du capot.

L'assemblage du capot en PDMS et de l'échantillon est réalisé par collage plasma oxygène. Certains matériaux, comme le PDMS subissent une modification chimique de leurs propriétés de surface lorsque celle-ci se trouve en contact avec un plasma. Dans le cas du PDMS, cette modification rend possible un collage irréversible avec certains matériaux tels que le verre après mise en contact. Si de nombreux articles décrivent des méthodes de collage de PDMS sur verre, très peu de données sur le collage du PDMS sur la résine SU_8 sont disponibles. La plupart décrivent la possibilité de réaliser un tel collage, ou montrent des dispositifs réalisés par un tel collage, mais sans détails sur le procédé utilisé. C'est pourquoi différents tests ont été effectués pour trouver les bons paramètres de collage. Les tests ont dans un premier temps été effectués sur des lames de verre, pour déterminer les paramètres d'exposition nécessaires à la modification de la surface du PDMS, puis sur la résine SU_8. Les résultats sont disposés dans le Tableau 4-2. L'exposition du verre au plasma décape sa surface mais ne modifie pas ses propriétés, puisqu'il s'agit déjà d'un oxyde (SiO₂). Pour la résine SU_8, le plasma semble modifier définitivement sa surface, la rendant incollable avec le PDMS. Des tests effectués en n'exposant que le PDMS, n'ont pas permis d'effectuer de collage avec les échantillons exposés au plasma oxygène plusieurs jours auparavant. Le schéma de principe du collage du couvercle par plasma est présenté en Figure 4-15. Ce collage ne nécessite pas de centrage délicat, puisqu'il vient jusqu'à fermer le canal par un bloc de surface plane, le seul centrage à effectuer est entre l'extrémité des canaux faisant 5mm de large et les orifices de 2mm préalablement découpés. Il peut donc s'effectuer à l'œil nu sans nécessité de machine de centrage. Le capteur final obtenu est présenté en Figure 4-16.

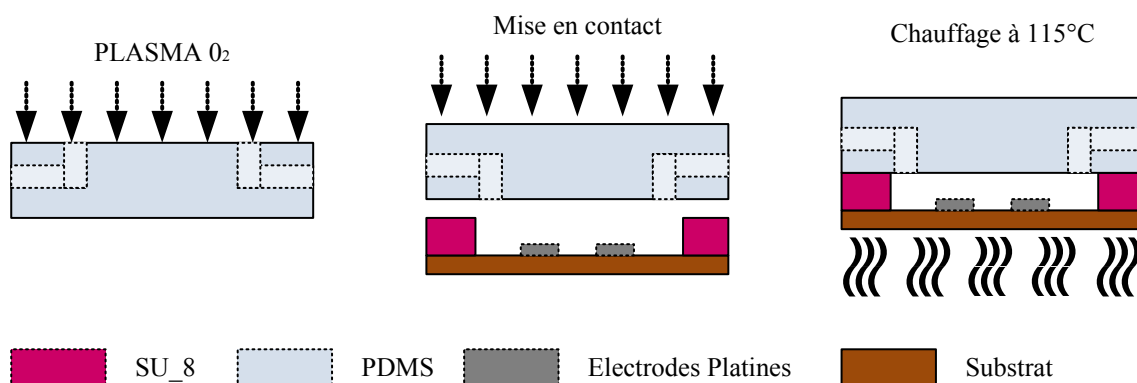


Figure 4-15 Représentation schématique des étapes de collages du PDMS par plasma.

CHAPITRE 4 : Conception et réalisation du biocapteur

Tableau 4-2 Résultats de collage obtenu sur verre et résine SU_8 pour différents paramètres.

Type d'échantillon	Exposition de l'échantillon au plasma	Chauffage de l'échantillon	Puissance plasma utilisée (en W)	Temps d'exposition (sec)	Résultats de collage
Verre	Oui	Aucun	50	30	Aucun collage
			100	30	Aucun collage
			100	60	Aucun collage
			100	300	Aucun collage
			100	600	Aucun collage
		95°C pendant 30 min	100	30	Collage partiel
			100	60	Collage complet
			100	300	Aucun collage
		SU_8	Oui	Aucun	100
95°C pendant 30 min	100			60	Aucun collage
non	Aucun		100	60	Aucun collage
	95°C pendant 30 min		100	60	Collage complet

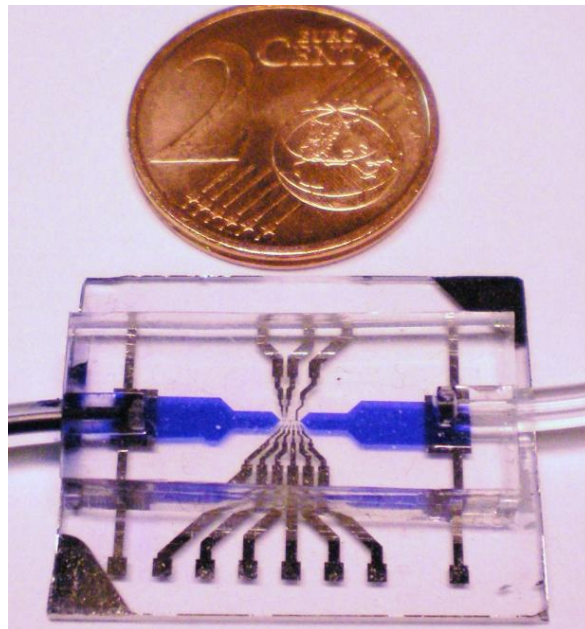


Figure 4-16 Photographie du capteur obtenu après collage du capot en PDMS. De l'encre bleu a été injectée après placement de capillaire pour augmenter le contraste entre le canal et la couche de résine SU_8

4.3.6 Réalisation du canal par moulage (méthode alternative couche 2).

Cette alternative consiste à intégrer directement la structure du canal lors du moulage du PDMS, permettant de remplacer les couches 2 et 3 définies précédemment par une seule. Pour ce faire, le bloc de PDMS doit être directement structuré lors du moulage, en remplaçant la lamelle de verre initiale par une autre comportant le négatif de la structure du canal. La première étape consiste donc à réaliser cette structure par lithographie. Les premiers essais ont été effectués avec la résine SU_8 et en utilisant cette fois-ci le masque positif. Les essais n'ont pas été concluants. Du fait de l'adhérence limitée de cette résine, le motif correspondant à la partie du canal de 20 μ m de largeur s'est décroché lors du démoulage, pour les deux essais consécutifs.

Une autre résine à notre disposition a été utilisée en remplacement: l'AZ9260. Il s'agit d'une résine positive épaisse, permettant de réaliser des motifs de quelques μ m à 24 μ m. Ces caractéristiques, hormis l'adhérence sur le verre, sont moins bonnes que celle de la SU_8 pour nos applications. Elle a en effet une résistance moindre aux solvants. Cela peut donc poser des problèmes de nettoyage entre chaque moulage. Les épaisseurs jusqu'à 10 μ m peuvent être obtenues en une seule couche, alors que les épaisseurs supérieures doivent être réalisées en deux étapes de dépôts. Le second dépôt se fait sur une première couche de 10 μ m déjà recuite. Nous avons donc, dans un premier temps cherché la bonne vitesse d'enrésinement pour obtenir 10 μ m, puis pour obtenir celle de 20 μ m à partir de la précédente. Les épaisseurs mesurées sont résumées dans le Tableau 4-3. Les vitesses de la tournette pour l'étalement des couches retenues sont de 1500 tr/min pour la première et 2500 tr/min pour la seconde.

Tableau 4-3 Epaisseurs mesurées en fonction de la vitesse d'enduction pour la résine AZ9260.

Vitesse (en tr/min)	Epaisseur (en μ m)	Vitesse (en tr/min) Avec première couche à 1500 tr/min	Epaisseur totale (en μ m)
1500	9,59	1500	26,58
2000	7,99	2000	25,28
2400	7,69	2500	19,58
3000	7,50		

Les structures réalisées, de 10 μ m et 20 μ m, présentent des pertes en résolution plus importantes que pour la résine SU_8. Pour cette dernière nous obtenions bien les 20 μ m de largeur de canal, à la résolution maximale de la lithographie optique près. Pour la résine AZ9260 nous obtenons une largeur pour le canal d'environ 19 μ m avec quelques résidus pour

CHAPITRE 4 : Conception et réalisation du biocapteur

l'épaisseur de $10\mu\text{m}$ ($9,59\ \mu\text{m}$ mesurée) et $15\mu\text{m}$ pour l'épaisseur de $20\mu\text{m}$ ($19,58\ \mu\text{m}$ mesurée) comme présentées en Figure 4-17. Les insulations avaient été faites avec les paramètres par défaut donnés par le constructeur, avec un substrat de référence en silicium. Par manque de temps, les optimisations des paramètres d'insolation n'ont pas pu être réalisées, et seul le dispositif de $10\mu\text{m}$ d'épaisseur a été utilisé pour réaliser le nouveau moule.

Le nouveau moule réalisé a pu l'être avec succès. En effet, 5 blocs en PDMS ont pu y être réalisés, sans altérations notables de la structure en résine. La cinquième structure moulée en PDMS est présentée en Figure 4-18. Cette technique permet de réaliser rapidement un nombre important de dispositifs ayant les mêmes caractéristiques, puisque réalisés dans la même matrice. Une fois le moule créé, le temps de fabrication d'un capteur est nettement diminué puisque l'étape critique de réalisation du canal en résine est supprimée. Cette technique a cependant un inconvénient : elle ne pourra pas servir à la réalisation d'électrodes parallèles, et nécessite un placement précis entre la structure moulée et l'échantillon comportant les électrodes. Comme les dimensions des électrodes coplanaires avaient été volontairement agrandies, le placement a tout de même pu être réalisé à la main après passage du PDMS au plasma, avec un contrôle visuel par microscope.

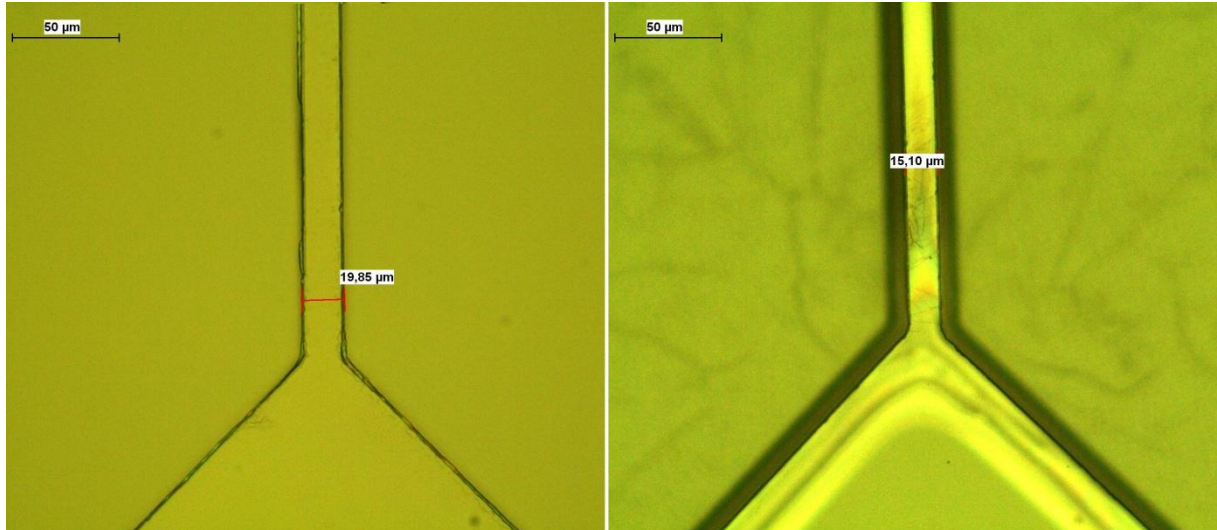


Figure 4-17 Vue au microscope optique des structures réalisées avec la résine AZ9260 pour les épaisseurs de $10\mu\text{m}$ (a) et $20\mu\text{m}$ (b).

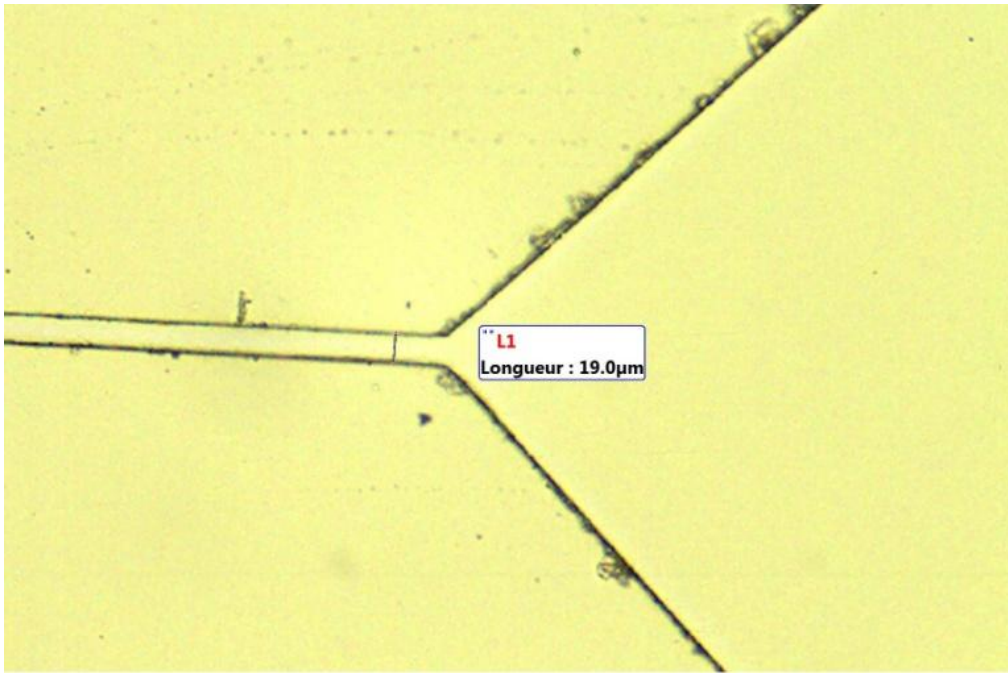


Figure 4-18 Vue au microscope optique de la structure réalisée par moulage du PDMS et de la même structure après collage plasma.

4.4 Tests d'écoulements.

4.4.1 Conditions de tests

Une fois les dispositifs fabriqués, des tests d'écoulement ont été réalisés afin de vérifier si les dispositifs sont bien aptes à réaliser le déplacement de liquide et cellules dans le canal. Les écoulements voulus étant très faibles de l'ordre de quelques dizaines de nano-litres par minute, les dispositifs de type pousse-seringue et micro-pompes du marché possèdent déjà des débits trop élevés pour nos applications. Les déplacements ont donc été effectués par génération d'une différence de pression de chaque côté du canal. Le maintien d'un débit constant n'étant pas nécessaire, puisque les mesures seront effectuées à grand échantillonnage lors du passage de cellules, l'application d'une suppression ou d'une dépression à l'aide d'une simple seringue reliée aux capillaires d'entrée/sortie sera suffisante.

4.4.2 Tests d'écoulement par aspiration.

Ce test est le plus facile à mettre en place, puisqu'il ne nécessite pas de coller le capillaire. Celui-ci est simplement inséré dans l'ouverture présente sur le côté du capteur, et est maintenu grâce à l'élasticité du PDMS. En créant une dépression à l'intérieur de cette

partie du canal, la structure vient se comprimer autour du capillaire. Les premiers tests ont été effectués avec des liquides simples pour vérifier l'établissement de l'écoulement laminaire. Afin d'observer au mieux cet écoulement, nous avons successivement introduit de l'encre bleu puis de l'eau distillée comme présenté en Figure 4-19. Nous pouvons observer la forme en parabole du liquide se déplaçant, typique des écoulements microfluidiques. Lorsque le liquide arrive en contact avec la partie la plus étroite du canal, une dépression plus importante est nécessaire pour faire franchir le fluide de l'autre côté. Ceci est dû aux tensions entre le liquide les parois du canal et l'air, qui sont prédominantes à ces dimensions. Cependant, une fois le liquide présent des deux côtés du canal, une très faible dépression suffit pour déplacer le liquide.

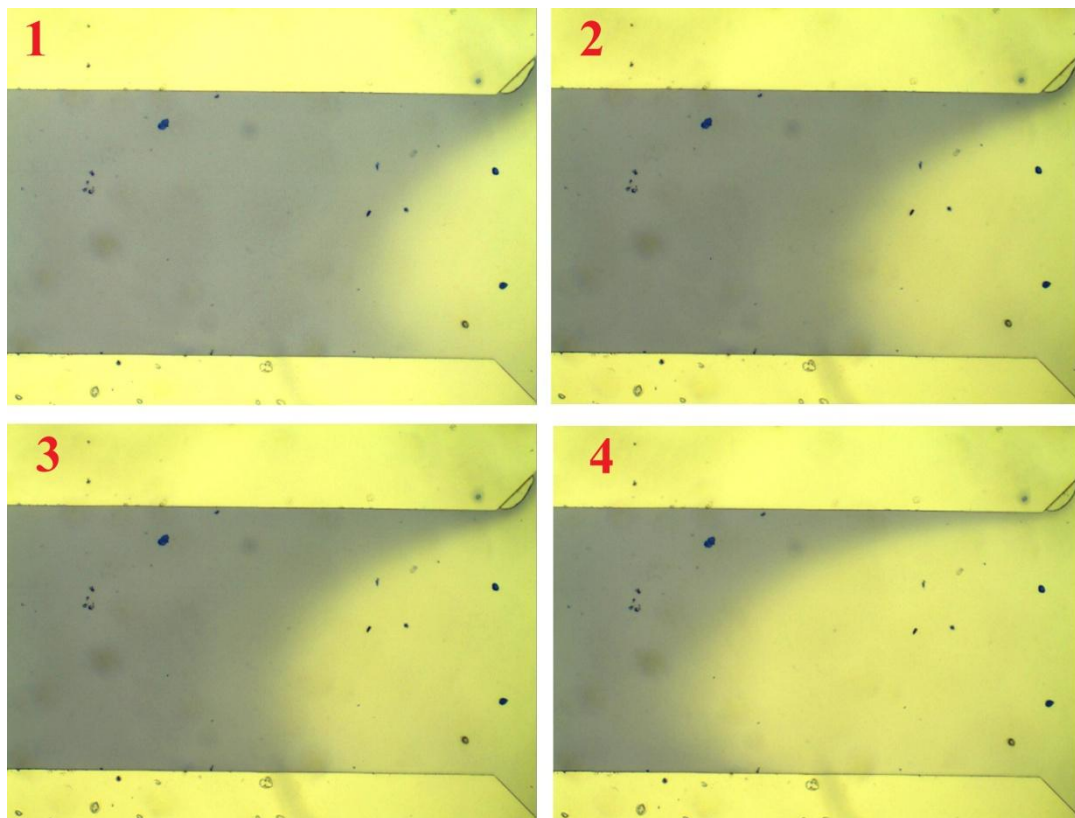


Figure 4-19 Etablissement d'un flux laminaire illustré par le passage successif d'encre bleu et d'eau distillée dans le premier rétrécissement du canal

Cette technique permet aussi un bon maintien entre le substrat et la partie structurée formant le canal, puisque les forces résultantes des différences de pression permet le placage du substrat et des couches supérieures, comme illustré en Figure 4-20. Cette même figure montre aussi un problème majeur qui peut survenir à cause de cette même dépression. Le PDMS étant souple, les forces résultantes ont tendance à le plaquer vers le bas et à réduire la

hauteur du canal. Un grand nombre de cellules, peuvent s'y retrouver piégées, notamment les plus grandes, comme dans le cas présenté en Figure 4-21.

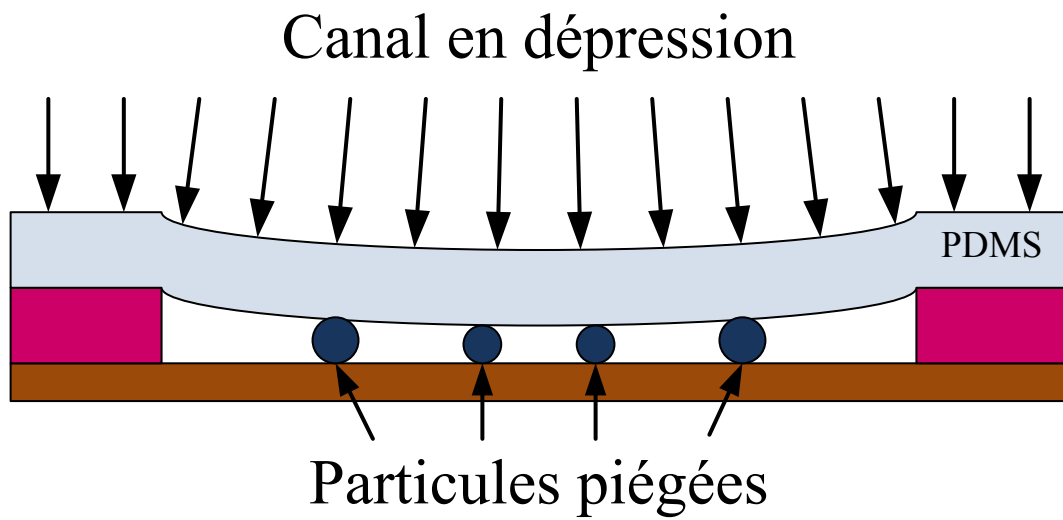


Figure 4-20 Représentation schématique des forces s'exerçant sur la structure en PDMS lors de la création d'une dépression dans le canal, et du blocage de particules qui en résulte.

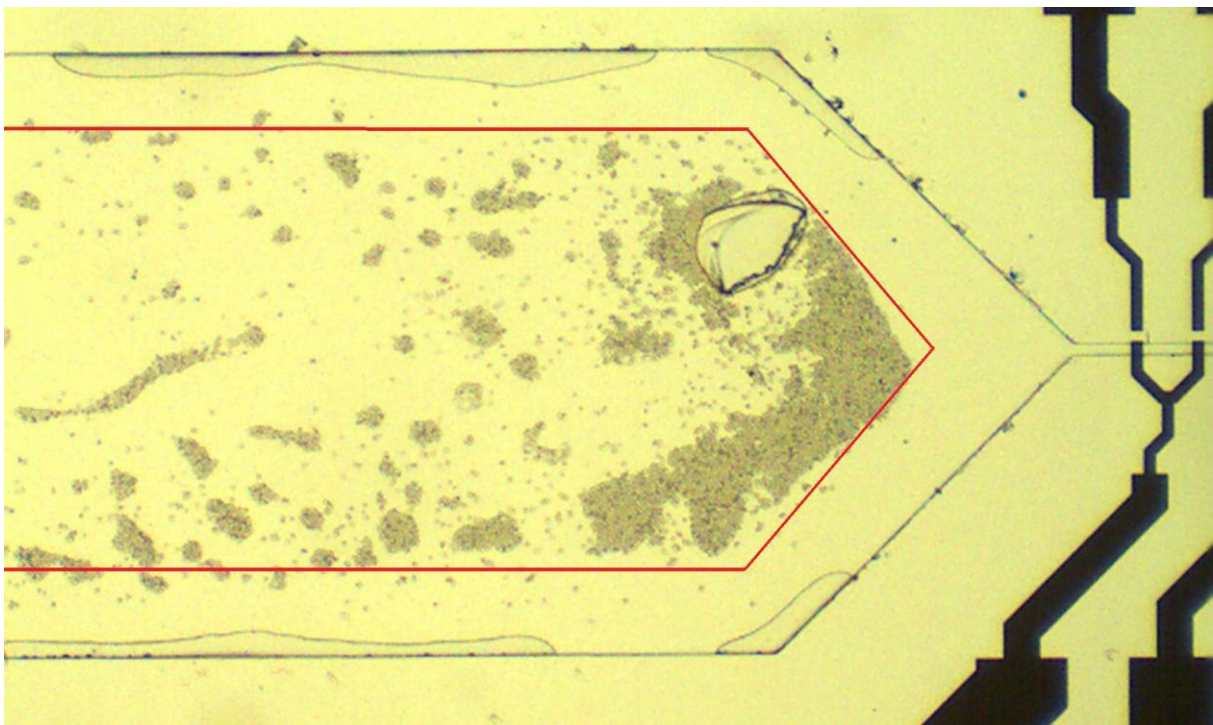


Figure 4-21 Vue au microscope optique d'agrégats de cellules (levures de boulanger), formée lors d'un déplacement par dépression. Le contour en rouge délimite la zone où la déformation du capot en PDMS est assez accentuée pour avoir un impact sur le bon déplacement des cellules.

Nous pouvons observer cet effet, qui bloque les cellules présentes au centre du canal, là où la déformation est la plus forte, les zones situées au bord du canal, et là où le canal est plus étroit ne subissent pas cet effet. Cela peut provoquer deux problèmes majeurs. Le premier est que les cellules les plus grandes auront plus de probabilité de rester coincées dans cette partie du canal, et les mesures effectuées ne seront pas représentatives de la population cellulaire de l'échantillon. Le deuxième est encore plus critique, puisque de nombreux agrégats risquent de se former et de se détacher spontanément. Dans le meilleur des cas, cela induira une multitude de mauvaises mesures, et dans le pire des cas un bouchage du canal, comme ce fut le cas pour plusieurs capteurs. Cette méthode n'est donc pas très appropriée au risque des problèmes qu'elle engendre.

4.4.3 Tests d'écoulement par surpression.

Ce test est un peu plus difficile à mettre en œuvre que le précédent, car il nécessite de coller le capillaire avec une colle époxy afin de réaliser l'étanchéité entre celui-ci et le bloc de PDMS. Cette fois-ci, les forces mise en œuvre ont tendance à repousser le bloc de PDMS vers l'extérieur, comme illustré en Figure 4-22. Le problème que l'on peut rencontrer et l'inverse du précédent : des particules de tailles supérieures à la hauteur normale du canal, qui auraient dû rester bloquer au niveau du réservoir d'entrée risquent de se déplacer dans le canal. Cela ne pose de problèmes que dans le cas de particules très légèrement plus grandes que la hauteur du canal, ce qui risque de boucher celui-ci dans sa partie la plus étroite. Les autres particules seront stoppées à la limite de la zone prédéfinie sur la Figure 4-21. Nous pouvons y voir un morceau de PDMS, résultant de la découpe des orifices, qui s'est avancé dans le canal malgré sa taille, mais qui est resté bloqué à la frontière de cette zone lors d'un déplacement. De plus, l'utilisation d'une surpression limite beaucoup plus les effets d'adhésion cellulaire dans le canal que la technique par dépression.

Dans le cas des dispositifs réalisés en résine SU_8, ce type de déplacement a provoqué plus au moins rapidement le décollement de la résine du substrat en verre. Après un de ces décollements, la partie décollée du substrat a volontairement été arrachée pour déterminer l'origine de ce décollement. Une vue au microscope de cette zone est donnée en Figure 4-23. Il est possible d'y voir qu'il s'agit bien du décollement entre le substrat et la résine ; celle-ci était restée fortement liée au bloc de PDMS. Ce type de déplacement est finalement plus avantageux que le précédent, mais non compatible avec les premiers types de capteurs réalisés.

Canal en surpression

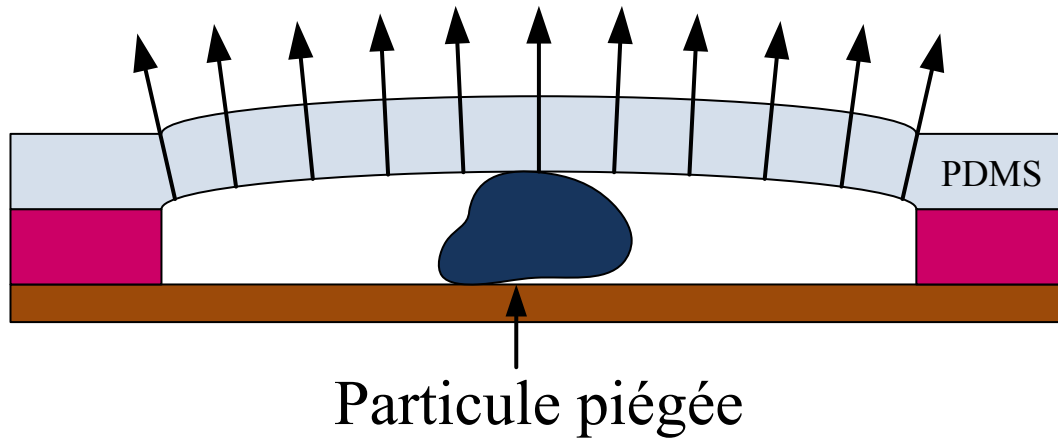


Figure 4-22 Représentation schématique des forces s'exerçant sur la structure en PDMS lors de la création d'une surpression dans le canal, et du passage de particules surdimensionnées qui en résulte.

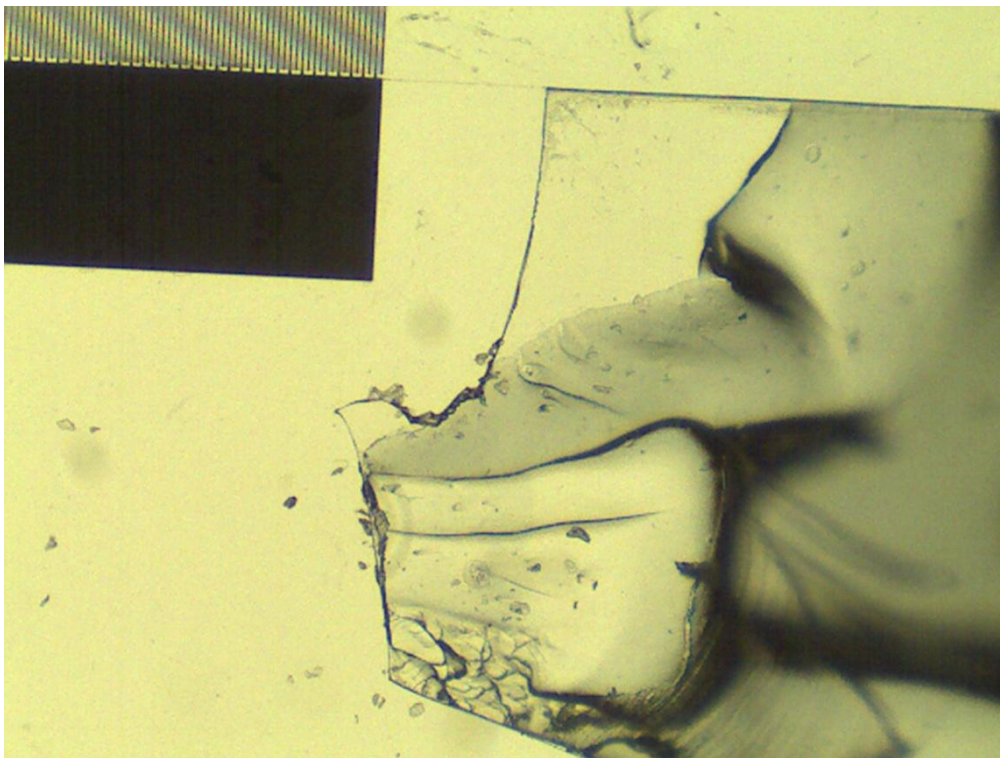


Figure 4-23 Vue au microscope optique de la zone d'arrachement entre la résine SU_8 et le substrat.

4.4.4 Tests de bouchage/débouchage du canal.

La possibilité de nettoyage du capteur est une fonctionnalité importante. En effet, même en utilisant une surpression pour le déplacement des cellules, un certain nombre d'entre elles restent collées aux parois du canal. Dans le cas d'une nouvelle campagne de mesures, ces cellules risquent de se décrocher et de fausser les mesures. Il faut pour cela réussir à les éliminer. Deux techniques complémentaires le permettent, la première consiste à injecter une bulle d'air. Elle aura pour effet de chasser l'eau présente autour des cellules, les décrochant du même coup grâce à la tension de surface entre l'air et l'eau. La deuxième technique consiste à utiliser un solvant ou un détergeant pour détruire la membrane des cellules. Dans les deux cas, il se produit un regroupement massif de cellules et débris cellulaires qu'il faut évacuer.

Pour vérifier que ces débris peuvent être évacués, même dans les cas les plus difficiles, le canal a été volontairement bouché de deux façons différentes. Seuls les capteurs réalisés sans SU_8 ont été testés, les autres présentant une trop faible adhérence de la résine au substrat. La première méthode a consisté à faire déplacer lentement dans le canal un échantillon très concentré en cellules, afin de provoquer un bouchon par agrégation, comme illustré en Figure 2-15. Une fois bouché, une bulle d'air a été introduite et la pression augmentée pour réaliser le débouchage. Nous pouvons voir que même initialement bouché sur la moitié de sa longueur, et avec un amas très important de cellules à l'entrée, le canal a pu être débouché.

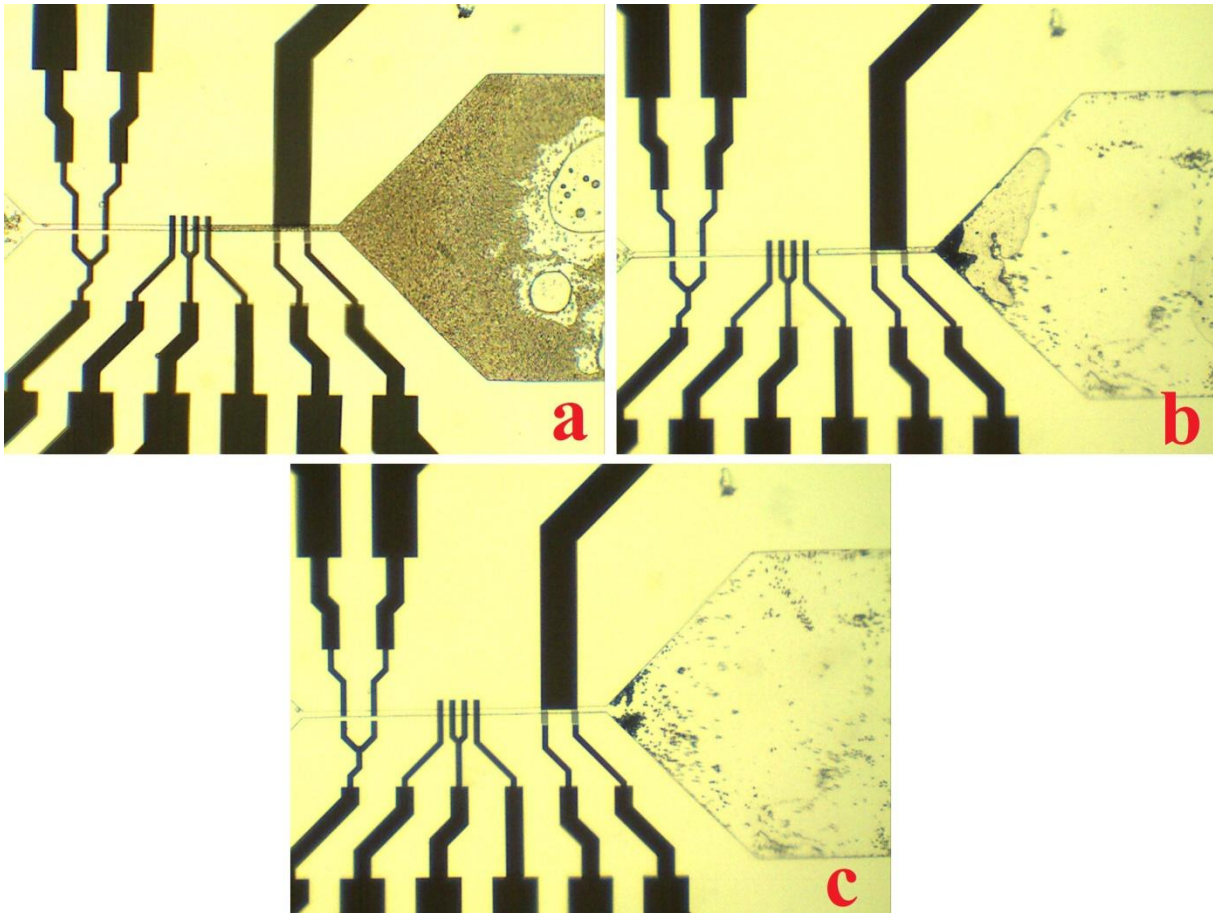


Figure 4-24 Etapes successives de débouchage du canal. Bouchon initial formé de levures de boulanger : (a) bouchage du canal, (b) débouchage avec air sous pression, (c) rétablissement de la circulation du fluide.

Le deuxième test consiste à faire déplacer des billes calibrées de polystyrène, de $10\mu\text{m}$ de diamètre, en direction du canal. Le canal réalisé en PDMS possède une hauteur nominale de $9,59\mu\text{m}$, soit très légèrement moins que les billes. Lors du déplacement par surpression, celles-ci peuvent se déplacer jusqu'à l'entrée du canal central et y rester bloquées, comme dans le cas de la Figure 4-25. Le débouchage est réalisé par circulation d'acétone dans le canal, qui permet de dissoudre les particules de polystyrène et libérer le canal. Cette manipulation met en évidence la possibilité de dissoudre les bouchons provoqués par des particules pouvant se dissoudre ou se désagréger dans l'acétone, soit un grand nombre de particules organiques dont les cellules et bactéries (les lipides composant la membrane sont fortement solubles dans l'acétone).

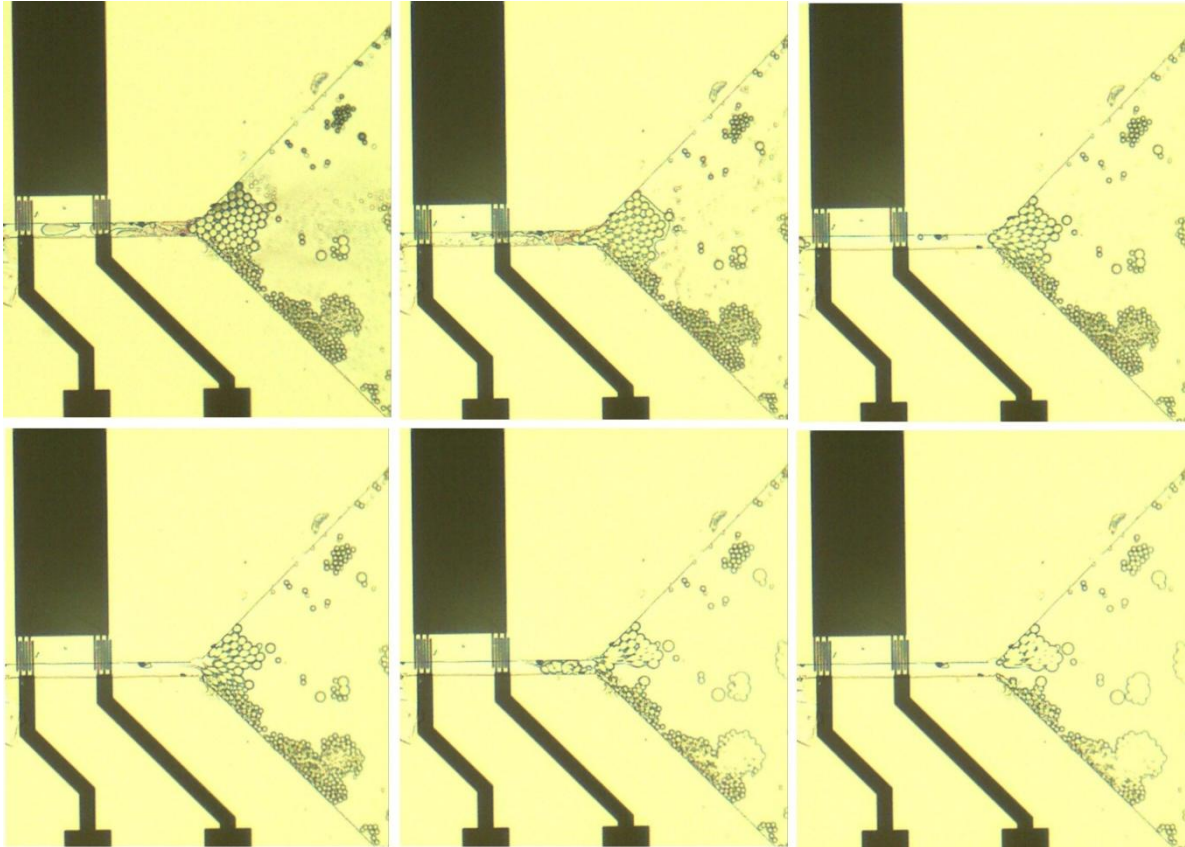


Figure 4-25 Etapes successives de débouchage du canal avec de l'acétone. Bouchon initial formé de microbilles de 10µm.

4.5 Conclusion.

Nous avons, dans ce chapitre réalisé les capteurs qui serviront pour nos mesures de cellules en cytométrie de flux. Dans un premier temps, le design du capteur a été défini à l'aide de deux couches structurées, représentant respectivement les électrodes et le canal. Même si la fabrication d'un capteur à électrodes parallèles n'était pas envisagée pour le moment, les motifs nécessaires à leur réalisation ont été tout de même implantés en plus des électrodes coplanaires et des structures SAW, en vue d'une réalisation future. Le choix des matériaux s'est fait en fonction de ceux à notre disposition, à savoir le platine, la résine SU_8 et le PDMS, qui tous les trois sont biocompatibles et conviennent pour des applications microfluidiques.

Nous sommes ensuite passés à la réalisation proprement dite des capteurs. Certaines étapes, comme pour le dépôt et la gravure des électrodes pour le platine, n'ont pas posé de soucis particuliers. Il s'agissait en effet de structurations réalisées régulièrement au sein de la salle blanche de notre institut, et pour lesquels les procédés optimums étaient déjà établis. Le

CHAPITRE 4 : Conception et réalisation du biocapteur

canal fut ensuite réalisé de deux façons différentes, par structuration d'une couche de résine SU_8 directement sur l'échantillon et collage d'un couvercle en PDMS, ainsi que par collage direct de structures en PDMS réalisées par moulage sur une structure en résine AZ9260. Dans les deux cas, la résine sélectionnée n'a jamais été utilisée et les bons paramètres ont dû être déterminés par plusieurs séries de tests. Il fut de même pour le collage du PDMS sur verre et SU_8, donc les paramètres de collage ont aussi dus être établis.

Finalement, nous avons procédé à différents tests d'écoulement qui ont permis de montrer que nous avons bien à faire à des écoulements laminaires, et la possibilité de faire déplacer le liquide dans le microcanal sans avoir recourt à des pression élevées. Deux méthodes de déplacement par différence de pression ont été testées, la méthode par surpression s'est montrée bien plus efficace que celle par aspiration. Cette dernière présente plus de désavantages, notamment par le blocage d'un grand nombre de cellules dans les parties larges du canal et le risque accru de formation d'agrégats de cellules et de risque de bouchage du canal. Les structures en résine SU_8 ont donné des résultats mitigés, avec des décollements intempestifs de la résine dès que le capteur était utilisé en déplacement par surpression. Or c'est avec ce type de déplacement que des obturations du canal à cause d'agrégats de cellules ont été supprimées. Du fait de ces problèmes les capteurs à base de résines SU_8 n'ont pas été utilisés pour les mesures décrites au chapitre suivant.

CHAPITRE 4 : Conception et réalisation du biocapteur

Chapitre 5 : Mesures par spectroscopie d'impédance sur particules en cytométrie de flux

5.1 Introduction.

C'est dans cette dernière partie que les mesures sur cellules isolées en régime dynamique seront réalisées. Il faudra donc dans un premier temps, trouver les appareils nécessaires au suivi et à la mesure de particules à grande vitesse. Nous commencerons donc par établir les contraintes spécifiques que ces appareils devront respecter, en nous fiant aux résultats obtenus en simulations. Un banc de mesure pourra ensuite être mis en place avec les appareils sélectionnés, et toutes les interfaces nécessaires pour y relier le capteur et exporter les mesures effectuées.

Comme lors de la fabrication de tout nouveau capteur, celui-ci devra être testé dans des situations contrôlées afin de vérifier que ses réponses correspondent à nos attentes. Pour cela des tests à vide seront opérés de manière à déterminer les impédances parasites induites par la chaîne de mesure. D'autres mesures de calibration seront effectuées pour vérifier que les réponses des capteurs sont cohérentes avec celles déterminées en modélisation et simulation. Etant donné les problèmes liés à l'adhérence de la résine SU_8, seuls les capteurs ayant un canal de 10 μ m de hauteur pourront être utilisés pour les mesures effectuées dans cette partie.

Une fois ces étapes validées, les mesures de cellules en régime dynamique pourront être réalisées. Il sera toutefois nécessaire de définir avec quels types de cellules et particules nous pourrons travailler, en fonction principalement des dimensions du canal ainsi que les types de signaux à utiliser. Ces mesures seront comparées entre elles afin d'établir la possibilité de caractériser et discriminer les différentes particules. Nous effectuerons aussi des mesures concernant la reproductibilité et la cadence maximale des mesures afin de déterminer les performances de notre capteur.

5.2 Réalisation de la chaîne de mesure.

5.2.1 Contraintes à respecter.

Les mesures d'impédance de cellule en dynamique nécessitent une instrumentation bien adaptée. Les contraintes liées à ce type de mesures sont très spécifiques, et l'appareil de mesure choisi devra au minimum:

- Avoir une gamme de fréquence de mesure comprise entre 100kHz et 10MHz.
- Pouvoir mesurer simultanément deux signaux de fréquences différentes, pour la mesure en instantanée des différents paramètres de chaque cellule.
- Pouvoir mesurer des impédances dans la gamme de 10k Ω à 1M Ω .
- Pouvoir mesurer des impédances à grande cadence, moins d'une ms par mesure, afin de pouvoir mesurer plusieurs dizaines à centaines de cellules par secondes.
- Disposer d'au moins deux entrées de mesures et/ de la possibilité de mesurer en différentiel, pour la mesure par paires d'électrodes identiques.
- Pouvoir numériser les mesures pour leurs exploitations sur ordinateur.
- Pouvoir générer des signaux d'excitation dans la gamme 10mV à 1V.
- Avoir une résolution suffisante pour mesurer les faibles variations induites par le passage de particules.

5.2.2 Choix d'un appareil de mesure.

L'appareil retenu devra satisfaire à toutes les exigences énoncées précédemment, puisque chacune d'entre elles est rédhibitoire. Les impédancemètres de table, ne pourront donc pas être utilisés même s'ils sont capables de mesurer des larges gammes d'impédance avec une grande précision, leurs temps de mesures sont trop lents, et ils ne permettent pas la mesure simultanée de plusieurs fréquences, mais effectuent un balayage fréquentiel. Par exemple, l'impédance 4148 de HP permet des mesures d'impédance avec une précision de 0.01%, mais exige un temps par mesure de 120 ms à 1 MHz.

Notre choix s'est donc orienté vers un appareil de type amplificateur à verrouillage de phase « lock-in Amplifier », qui convient mieux à ce type d'application. Le principe de base de cet appareil est donné en Figure 5-1, et les équations trigonométriques correspondantes en ANNEXE 3. Deux signaux déphasés de $\pi/2$ sont générés en interne. Le premier est envoyé vers le système à caractériser, et le signal réponse du système est ensuite mesuré et envoyé vers un démodulateur. Celui-ci est composé de deux multiplieurs et deux filtres passe-bas. Le signal mesuré est multiplié de part et d'autre par les deux signaux internes déphasés, puis filtrés. La sortie de chacun des deux filtres nous donne respectivement une valeur continue proportionnelle à la partie réelle et la partie imaginaire de ce signal. Ce mode de mesure permet, de ne garder que les fréquences présentes dans une bande très étroite centrée sur la fréquence de mesure. En générant un signal de mesure composé de plusieurs signaux de fréquences différentes, il est possible de récupérer indépendamment la réponse pour chaque fréquence en utilisant plusieurs démodulateurs centrés sur chacune d'entre elles.

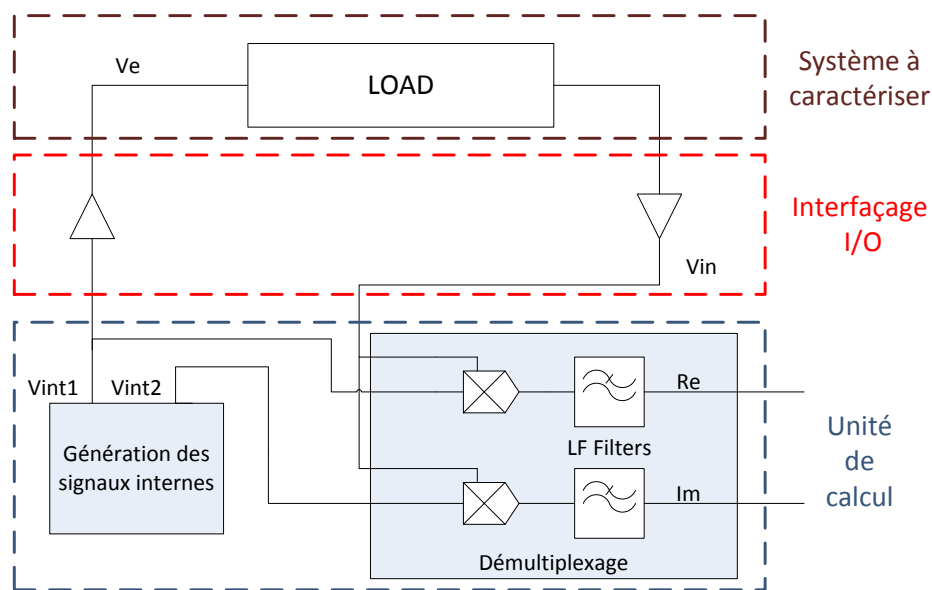


Figure 5-1 Schéma de principe d'un amplificateur à verrouillage de phase.



Figure 5-2 Photographie de l'appareil HF2IS, de Zurich Instrument. De gauche à droite, les deux paires d'entrée différentielle (1 et 2), Les deux blocs de sortie avec chacun une entrée additionneuse, la sortie analogique et la sortie de synchronisation (3 et 4), ainsi que des sorties auxiliaires.

Notre choix s'est porté sur l'amplificateur HF2IS, présenté en Figure 5-2, fabriqué par Zurich Instrument. Il s'agit d'un appareil de mesure d'impédance basé sur le principe de verrouillage de phase, optimisé pour les mesures d'impédance en statique et en dynamique. Il s'agit de plus d'un appareil numérique : toutes les fonctions dont la génération des signaux et le filtrage sont réalisés par fonctions logiques, la partie analogique se limite au convertisseur et buffer d'entrée/sortie. La commande de l'appareil s'effectue depuis un logiciel sur ordinateur par le biais du port USB2, qui permet le réglage de bons nombres de paramètres dont les fréquences de signaux, leurs amplitudes, et les propriétés des filtres, ainsi que le rapatriement des données. Les caractéristiques principales de cet appareil, sont les suivantes :

- Gamme de mesure de signaux analogique de 0,1 μ Hz à 50MHz.
- Possibilité de générer et mesurer jusqu'à 8 signaux de fréquences différentes simultanément.
- Gamme de mesure d'impédance de 100m Ω à 10G Ω .
- Mesure et transfert jusqu'à 460 000 impédances/sec. Soit jusqu'à 8 fréquences à 57 000 impédances/sec pour chacune.
- 2 sorties 50 Ω et deux entrées différentielles 50 Ω /1M Ω pouvant chacune être utilisée indépendamment en mesure simple ou différentielle.
- Génération de signaux de sortie avec une résolution de 16bits, pour des plages de ± 10 mV, ± 100 mV, ± 1 V ou ± 10 V.

- Mesure de signaux d'entrée avec 14 bits de résolution.

Les performances de cet appareil sont bien compatibles avec les contraintes énoncées précédemment, nous permettant d'en valider le choix. Le schéma de principe de cet appareil ainsi que ses caractéristiques supplémentaires sont donnée en ANNEXE 4.

5.2.3 Choix des équipements annexes.

La gamme de mesure d'impédance décrite précédemment pour cet appareil tient compte de l'utilisation d'un préamplificateur supplémentaire. En effet, les impédances hautes, surtout aux alentours du MHz, ne peuvent être mesurées directement par l'appareil à cause de ses impédances d'entrée faibles. Le constructeur propose donc un amplificateur de courant de type transimpédance, interfacé directement avec le HF2IS, afin d'obtenir en sa sortie une tension image du courant avec un grand rapport d'amplification U/I. Celui-ci est réglable de 100 à 100M, directement depuis le logiciel. Cet amplificateur est présenté en Figure 5-3.

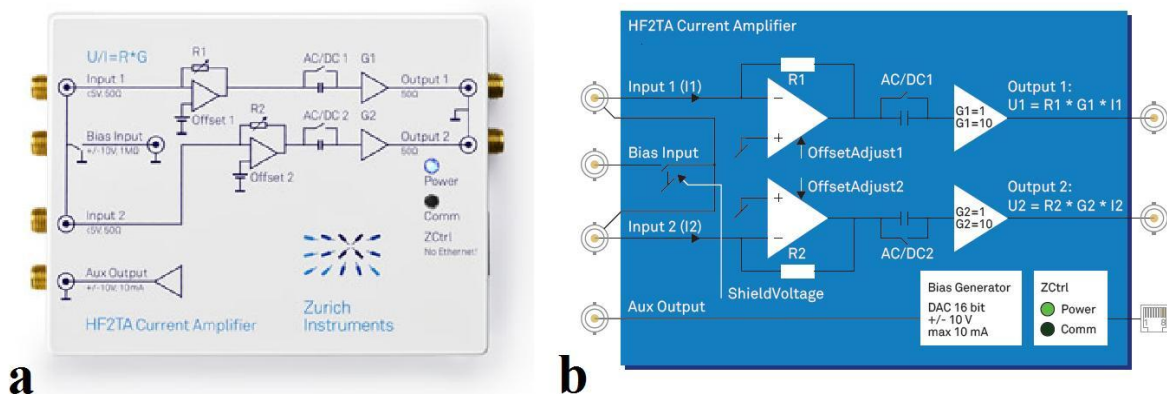


Figure 5-3 Photographie et schéma de principe de l'amplificateur de courant HF2TA.

Il possède deux entrées dont le gain peut être modifié indépendamment, permettant de l'utiliser pour la mesure en parallèle d'impédance sur une paire d'électrodes. Les caractéristiques détaillées de ce pré-amplificateur sont données en ANNEXE 5.

Les mesures seront contrôlées par microscope, pour valider le fait que les mesures effectuées correspondent bien au passage réel des cellules et particules. Nous avons donc opté pour un microscope trinoculaire Realux LABO2 (Figure 5-4), composé de quatre objectifs plan, pour des agrandissements de 40x 100x 400x et 1000x. Une caméra CMOS de 3Mpixel a aussi été fixée sur le troisième oculaire, afin de pouvoir suivre directement l'évolution des cellules dans le canal sur un écran, et capturer des vidéos et images.



Figure 5-4 Photographie du microscope optique triloculaire.

5.2.4 Interfaçage et mise en place de la chaîne de mesure.

Nous disposons à présent de l'appareillage nécessaire pour nos mesures. La prochaine étape consiste à réaliser l'interfaçage entre tous ces appareils pour réaliser notre banc de mesure final. Afin d'effectuer la connexion entre le capteur réalisé et les appareils de mesure, une carte de type circuit imprimé a été réalisée (Figure 5-5). Celle-ci est munie d'un emplacement pour connecteur standard de type SMA. L'emplacement présent au centre de la carte a été fraisé afin d'y placer le capteur, tout en laissant une ouverture assez grande pour permettre de visualiser toute les zones utiles du capteur. Les connexions entre les pads des électrodes en platine et les pistes en cuivre ont été simplement faites par soudure d'un fil à l'étain. Enfin, deux trous ont été placés en haut de la carte, afin de fixer celle-ci à la platine du microscope.

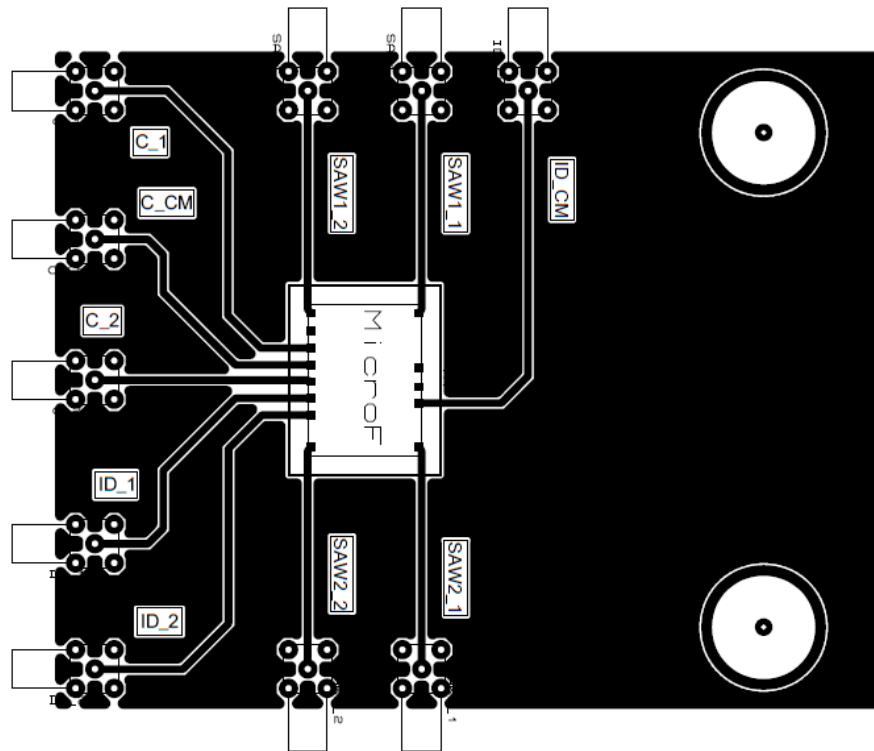


Figure 5-5 Typon du circuit imprimé réalisé pour l'interface entre le capteur et les appareils de mesures.

Le banc de mesure final est présenté dans la Figure 5-6. Il est composé du microscope optique sur lequel est fixée la carte d'interface contenant le capteur. Celle-ci est connectée à l'impédancemètre et à l'amplificateur de courant par le biais de cordons SMA de faibles longueurs (50cm), afin de réduire au maximum la longueur de la boucle de mesure. L'appareil de mesure est connecté via un cordon USB à un premier PC pour le commander et rapatrier les données. La caméra, placée sur le microscope est reliée à un autre ordinateur, pour le suivi en continu du déplacement du liquide et des cellules pendant les mesures. Cette séparation sur deux ordinateurs a été choisie d'une part pour visualiser simultanément le logiciel de commande du lock-in et le canal du capteur ; et d'autre part pour alléger le flux de données sur chaque ordinateur. En effet, les données vidéos haute définition de la caméra et celles issues de l'échantillonnage provoquaient des saturations qui se traduisaient par des coupures dans l'acquisition des résultats de mesures.

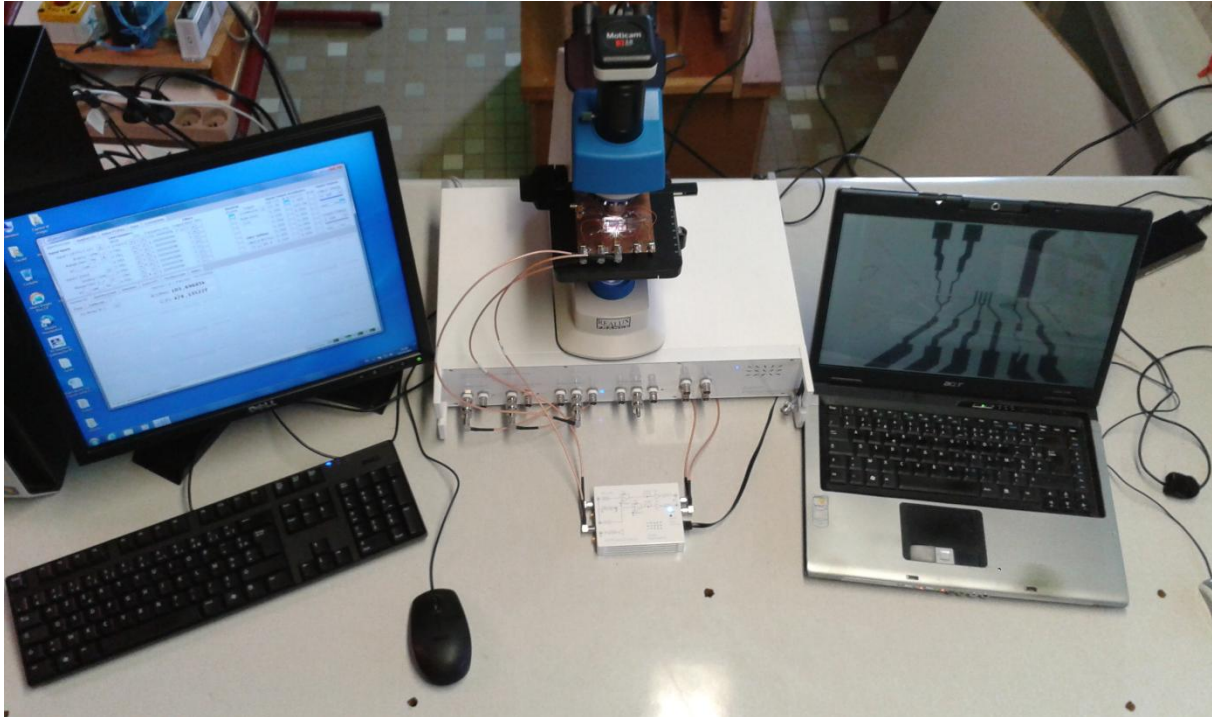


Figure 5-6 Banc de mesure utilisé, composé d'un microscope optique avec webcam, d'une carte d'interface supportant le capteur, de l'impédancemètre HF2IS avec son préamplificateur, et de deux PC pour le contrôle, le suivi et l'acquisition des mesures.

5.2.5 Choix du type de mesure d'impédance.

Cet appareil peut effectuer des mesures d'impédances en 4 points ou en 2 points. Dans le cas d'une mesure 4 points, le courant traversant l'échantillon, ainsi que la tension à ces bornes sont mesurés. Ce type de mesure est le plus précis, et permet de supprimer une grande partie des effets induits par la chaîne de mesure elle-même, tels que l'impédance des câbles et de la sortie de l'appareil. De plus la mesure en quatre points permet de réduire les effets de polarisation éventuels liés aux interfaces électrodes milieu. Il est plutôt utilisé pour des impédances faibles et moyennes, jusqu'à quelques kHz. En effet, l'impédance de l'entrée mesurant la tension doit être relativement élevée par rapport à celle du système à mesurer, pour ne pas court-circuiter celle-ci. Or, dans notre cas, nous devons mesurer des impédances de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines d'Ohms jusqu'à des fréquences de l'ordre de 10MHz. A ces fréquences, l'entrée 1M Ω /20pF de l'appareil a un module d'impédance d'environ 8k Ω , soit près de 40 fois inférieure à celle que nous désirons mesurer.

Dans le cas d'une mesure en 2 points, il faut pouvoir considérer que la tension aux bornes du système à mesurer et la même que celle générée par l'appareil, ou du moins fixe et que sa valeur peut être connue. Dans notre cas, l'appareil possède une impédance de sortie de

50 Ω , tout comme l'entrée de l'amplificateur de courant. Les impédances des cordons de mesures sont optimisées pour les hautes fréquences, et présentent une impédance encore plus faible. La chute de tension aux bornes d'une impédance de l'ordre de 100k Ω ne sera que d'environ 0,1% et pourra être négligée.

5.3 Mesures à vide et calibrations.

5.3.1 Généralités.

Lors de l'étude d'un capteur de mesure d'impédance d'échantillons biologiques, il est nécessaire d'effectuer plusieurs tests préliminaires. La réalisation d'un test à vide et de tests en charge avec des solutions calibrées permet de déterminer la réponse du capteur, soit son facteur de forme, ainsi que les impédances parasites présentes en série et en parallèle. La détermination du facteur de forme permet de lier la mesure effectuée par le capteur aux propriétés électriques et diélectriques du milieu. La connaissance des impédances parasites, permettra de les déduire des mesures, évitant ainsi de les fausser. Etant donnée la géométrie des électrodes, les impédances parasites peuvent être modélisées par le circuit de la Figure 5-7.

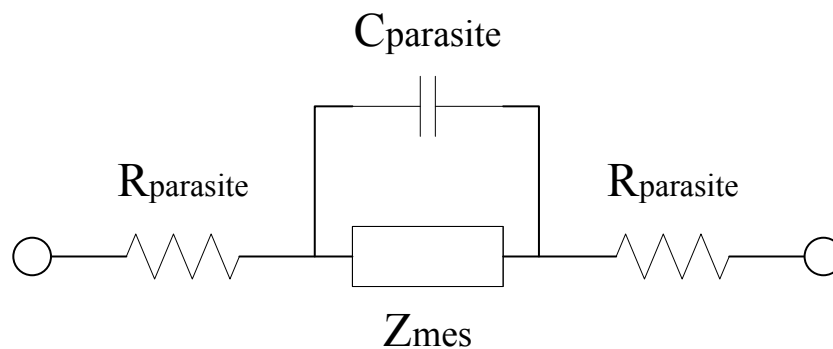


Figure 5-7 Représentation schématique des impédances parasites intervenant dans nos mesures d'impédances.

La capacité parasite montée en parallèle représente le couplage entre les électrodes coplanaires. Si le couplage au niveau du canal est une mesure utile, puisqu'il s'agit de la mesure de permittivité du milieu, tous les autres couplages intervenant dans le verre, le PDMS et l'époxy de la carte d'interface sont des couplages parasites venant s'ajouter en parallèle. Les résistances séries sont induites par les câbles et les pistes en cuivre et les électrodes de platine. L'essentiel étant présent dans les électrodes en platine, qui possèdent des sections bien inférieures à celles des autres parties. Leur valeur peut être facilement estimée, puisque

l'on connaît leurs dimensions et leurs épaisseurs. On trouve ainsi une résistance de l'ordre de quelques dizaines d'Ohms; donc négligeable face aux impédances mesurées. Ces paramètres devront être déterminés pour chacune des deux paires d'électrodes C1 et C2.

5.3.2 Mesure à vide.

Lors de la mesure à vide nous nous trouvons dans le cas où l'impédance de notre capteur est purement capacitive, égale à C_{vide} , pouvant être déterminée par le facteur de forme du capteur et une permittivité de 1 (air). Les capacités mesurées, correspondant à C_{vide} en parallèle avec $C_{parasite,p}$, sont respectivement de 575 fF et 515 fF pour les électrodes C1 et C2, avec une variation dans la plage 100kHz à 1MHz de plus au moins 1%. Nous pouvons déjà remarquer que ces capacités sont très grandes devant les capacités déterminées en simulation pour une solution de permittivité 78 présente entre les électrodes, soit 4,84 fF. Cette valeur est inférieure à 1% des valeurs mesurées. Cela signifie donc que les capacités parasites sont largement supérieures aux capacités que l'on doit mesurer, ce qui risque de rendre négligeable la variation totale de la capacité induite par la membrane cellulaire.

5.3.3 Mesures de calibrations avec solutions tampons.

Cette étape consiste à mesurer la conductance induite par la conductivité de différentes solutions tampon injectées dans le canal. Pour ces tests, nous avons utilisé de l'eau distillée, et trois solutions calibrées à 8,4mS/m, 0,5S/m et 1,288 S/m. Afin d'éviter au maximum les risques de contamination entre chacune des mesures, nous avons effectué un nettoyage systématique du canal en y faisant circuler de l'eau distillée pendant environ une minute. Nous faisons ensuite circuler la solution à mesurer pendant une minute minimum afin de rincer les derniers résidus laissés des liquides précédemment injectés. Pendant ces injections, l'impédance était contrôlée jusqu'à sa stabilisation. Les résultats de mesures d'impédances (module et phase) sont données en Figure 5-8. Nous pouvons observer dans la partie en basses fréquences les effets d'interface, dont l'effet est fortement capacitif. Il se traduit par une phase proche de $-\pi/2$ et une pente de -20dB/décade. Nous pouvons aussi observer que ces effets d'interfaces sont similaires pour les solutions à 0,5S/m et 1,288S/m. Une autre observation peut être faite dès à présent, concernant les mesures au-delà du MHz. Nous pouvons en effet observer que les effets capacitifs, dus aux capacités parasites, commencent à devenir prépondérante au-dessus de cette fréquence. Des capacités parasites de 500fF, présentent une impédance d'environ 320 k Ω à 1MHz et 32k Ω à 10MHz. Or c'est à ces

fréquences que peuvent être mesurées les propriétés du cytoplasme, et celles-ci n'induisent que de faibles variations d'impédances comparées aux autres paramètres. Les capacités parasites risquent là encore de compromettre la bonne mesure de ce paramètre.

A partir de ces mesures, il est possible de déterminer le facteur de forme du capteur. Contrairement à la mesure de capacité comme dans le cas à vide, la mesure de la résistance nous renseigne directement sur le facteur de forme du capteur. En effet, si les effets capacitifs induits par le verre et le PDMS sont loin d'être négligeables, ce n'est pas le cas de leurs résistances puisqu'il s'agit de très bons isolants. La résistance mesurée ne dépend donc que de la conductivité de la solution et du facteur de forme du capteur. La résistance à prendre en compte pour nos calculs correspond à la partie réelle de l'impédance lorsque la phase est maximale (prédominance de l'effet résistif). Les résistances mesurées, ainsi que les facteurs de forme calculés pour chaque paire d'électrodes sont exposés dans le Tableau 5-1.

Les facteurs de forme calculés, hormis pour le cas d'une solution de 8,4mS/m, sont très proches des valeurs déterminées lors des simulations : soit 6,41 μ m et 6,51 μ m pour la paire d'électrodes C1, et 6,74 μ m et 6,66 μ m pour la paires d'électrodes C2 contre 7,02 en simulation pour un canal de section 20x10 μ m. Ils sont cependant légèrement plus faibles de 4 à 9%, différence pouvant venir du fait que les dimensions réelles sont légèrement plus petites (résolution optique de la lithographie). En effet, en utilisant le facteur de forme de 6,44 obtenu en simulant cette fois-ci un canal de section 19 μ m par 9,5 μ m, représentant les dimensions mesurées à l'aide d'un microscope et d'un profilomètre, les erreurs ne sont plus que de 0,47% à 4,66%. La paire d'électrodes C1 est celle qui présente les meilleures concordances avec les simulations, avec seulement 0,47% et 1,1 % d'erreur pour la mesure de solutions calibrés de 0,5S/m et 1,288S/m. Les erreurs plus importantes obtenues avec la solution à 8,4mS/m peuvent venir d'une contamination. Les solutions de conductivités très faibles peuvent être très facilement contaminées par des résidus ioniques présents dans le canal, qui modifient de façon très significative leurs conductivités d'origine. Cette hypothèse est plus que plausible étant donné que les deux paires d'électrodes ont mesurées approximativement la même impédance. Ces mesures peuvent donc être utilisées pour déterminer efficacement la qualité de fabrication d'un capteur dans le cas où une vérification par microscope ou profilomètre n'est pas possible, difficile à mettre en œuvre, ou trop coûteuse. Ceci peut être par exemple le cas lors d'une fabrication en grande série.

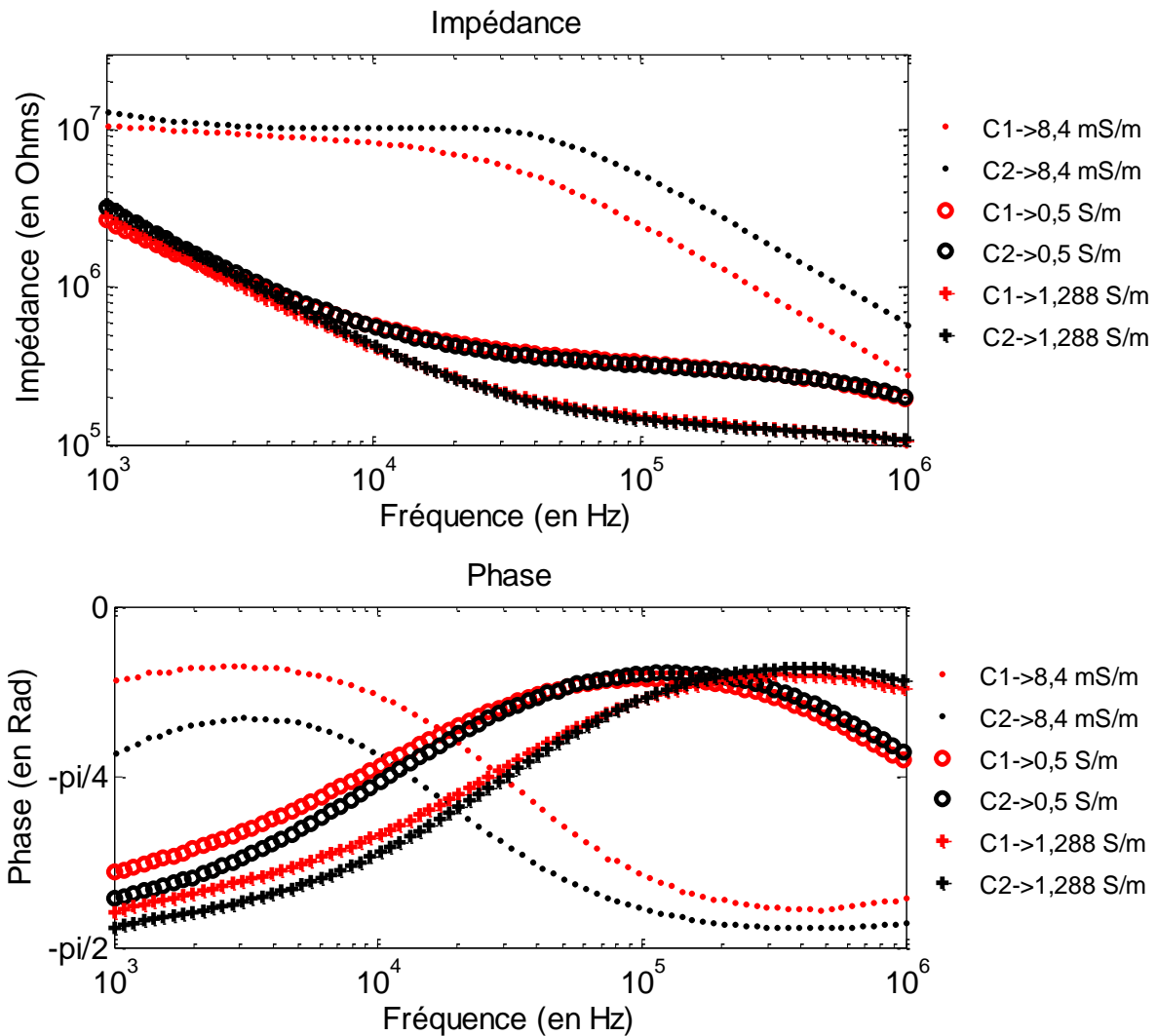


Figure 5-8 Mesures d'impédances et de phases effectuées en régime statique sur les deux paires d'électrodes coplanaires pour trois solutions calibrées.

Tableau 5-1 Mesures de résistance aux bornes des deux électrodes coplanaires, et calcul de leurs facteurs de forme.

Conductivité	Electrodes	Résistance mesurée (en Ohms)	Facteur de forme calculé	Facteur de forme simulé (en μm) Canal de $20 \times 10 \mu\text{m}$	Facteur de forme simulé (en μm) Canal de $19 \times 9,5 \mu\text{m}$	Erreur (en %) Section de $20 \times 10 \mu\text{m}$	Erreur (en %) Section de $19 \times 9,5 \mu\text{m}$
8,4 mS/m	C1	9068135	13,13	7,02	6,44	87	104
	C2	9103764	13,07	7,02	6,44	86,2	103
0,5 S/m	C1	311864	6,41	7,02	6,44	8,7	0,47
	C2	296390	6,74	7,02	6,44	4	4,66
1,288 S/m	C1	119303	6,51	7,02	6,44	7,3	1,1
	C2	116486	6,66	7,02	6,44	5,1	3,4

5.4 Mesures sur particules en régime dynamique.

5.4.1 Choix et préparation des échantillons.

Différents types de cellules et particules ont été sélectionnés pour être détectés et mesurés en cytométrie de flux. Comme les simulations ont porté sur des modèles de cellules sphériques, nous avons dans un premier temps cherché des particules de référence parfaitement sphériques. Notre choix s'est arrêté sur des microbilles de polystyrène noire, les « polybead® Black Dyed Microspheres » distribuée par **Polysciences, Inc.** Leur couleur noire permet un suivi aisé au cours de leur transit dans le canal, et leur nature isolante permet de les utiliser pour valider la variation d'impédance induite par le passage d'une particule isolante. Elles sont disponibles en solution aqueuse à 2,5%. Comme le canal avait été choisi initialement avec des dimensions de 20 μm par 20 μm , deux tailles de billes, de 6 et 10 μm de diamètres ont été commandées, et sont présentées en Figure 5-9.

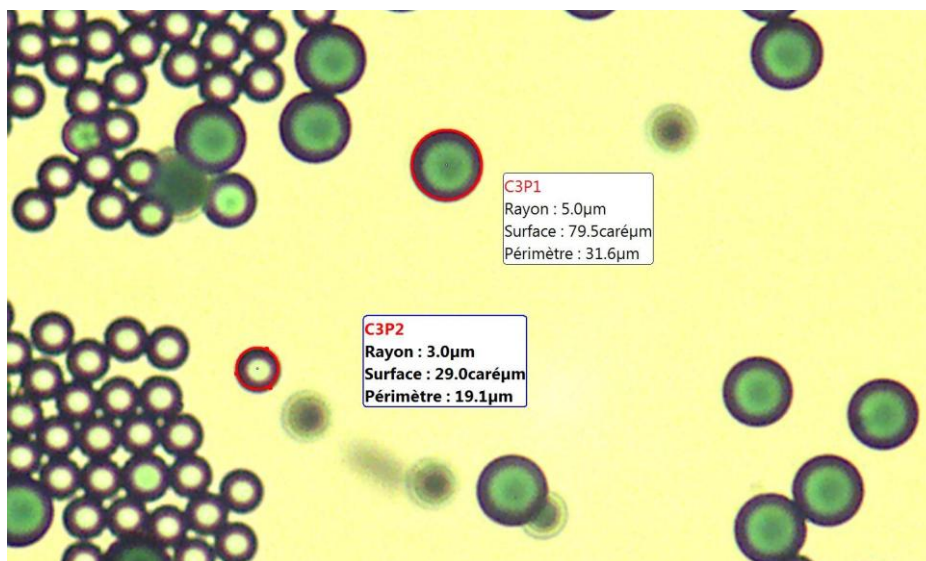


Figure 5-9 Agrandissement au microscope optique de microbilles calibrées de 6 μm et 10 μm de diamètre (400x).

Concernant les cellules à utiliser, le choix s'est porté en premier sur des levures de boulanger : « *Saccharomyces cerevisiae* ». Ces bactéries sont facilement disponibles, non pathogènes et relativement résistantes. C'est pourquoi elles sont souvent utilisées comme bactérie de référence dans les domaines biomédicaux. Elles présentent aussi des dimensions intéressantes, puisqu'elles sont ovoïdes et mesurent quelques microns. Les deuxièmes cellules

choisies sont les cellules sanguines, qui devront être mesurées très rapidement après prélèvement, car le cycle de coagulation débute seulement quelques minutes après.

Chacun de ces échantillons sera largement dilué dans une solution saline calibrée afin d'éviter les risques d'agrégation, pouvant induire des erreurs de mesures ainsi que le bouchage du canal. Celle-ci a été choisie à 0,5 S/m pour pouvoir être le plus compatible possible avec tous les échantillons. Il faut en effet une concentration ionique assez proche de celle du cytoplasme pour le sang, car les globules rouges ont tendance à équilibrer la salinité du cytoplasme avec celle de l'extérieur. Cela a pour effet de modifier la géométrie des globules lorsque l'écart est trop grand, ou même de détruire les cellules. Les levures de boulanger résistent à une plus large gamme de salinité, mais celle-ci ne doit pas être trop grande non plus pour leur survie. C'est pourquoi la solution à 0,5S/m a été préférée à celle de 1,288 S/m. Comme effectué précédemment avec les mesures de calibration par solutions tampons, le canal sera systématiquement nettoyé avant l'injection de chaque échantillon pour éviter les risques de contamination.

5.4.2 Choix et réglages des signaux de mesures.

Pour nos mesures, nous avons choisi d'utiliser trois signaux de fréquences différentes, afin de mesurer les différentes propriétés des cellules. Les fréquences ont été choisies en fonction des simulations et des mesures précédentes. Celles-ci montrent une prédominance résistive aux alentours de 100kHz, soit à une fréquence où l'impédance de la membrane de la cellule n'est pas encore négligeable. Cette fréquence est donc la plus propice pour la mesure des variations induites par les dimensions des cellules. Deux autres fréquences, ont été sélectionnées : 1MHz et 5MHz. Il s'agit respectivement, d'après les simulations et les données trouvées dans la littérature, des grandeurs de fréquences où se produit la dispersion β , et où l'effet résistif du cytoplasme peut être mesuré.

Les amplitudes des signaux ont été fixées à 100mV, compromis pour ne pas détériorer les cellules lors de leur passage, et avoir le maximum de résolution possible pour les mesures de courant. Le gain de l'amplificateur a été réglé à 100k, soit 10k pour le gain en transimpédance et 10 pour le gain supplémentaire, pour obtenir une tension image du courant d'amplitude assez élevée et donc augmenter la résolution de mesure. Le gain choisi correspond au gain maximal que l'on peut utiliser dans notre gamme de fréquence choisie, au-delà la bande passante du pré-amplificateur devient trop faible.

La vitesse d'échantillonnage a été choisie pour chaque fréquence à 28k impédances/sec, afin de pouvoir détecter des passages rapides de cellules. Un échantillonnage plus rapide est inutile puisque la fréquence du signal la plus basse utilisée est de 100kHz et qu'il faut plusieurs périodes pour obtenir une mesure stable d'impédance.

Il reste enfin le réglage des filtres numériques. Ceux-ci ont été réglés après plusieurs tests de mesure avec une bande passante de 10kHz, qui correspondait au meilleur compromis entre vitesse et qualité des mesures. Au-dessus de cette valeur, le bruit n'était pas assez filtré et les variations ne pouvaient être mesurées assez précisément. Au-dessous de cette valeur, les mesures n'étaient pas assez rapides et bon nombre de cellules n'étaient pas mesurées avec suffisamment d'échantillons pour être sûr que la valeur maximale de la variation d'impédance avait été atteinte. En effet, le capteur nécessite un débit minimum afin que les cellules se déplacent correctement dans les parties les plus larges du canal. Autrement un grand nombre d'entre elles restent collées contre les parois. Ce débit minimum entraîne un déplacement rapide du fluide dans la partie du canal où sont effectuées les mesures.

5.4.3 Mesure et traitement des signaux.

Les mesures effectuées par le HF2IS nous donnent directement l'impédance en fonction du temps. Avec l'échantillonnage de 28k impédances par secondes, des mesures sur quelques dizaines de secondes nous donnent près d'un million de valeur. De plus comme illustré dans les Figure 5-10 et Figure 5-11, les variations d'impédances induites par les passages de particules sont très brèves, seulement quelques ms. Le traitement de ces données requiert l'utilisation d'un programme pour être automatisé.

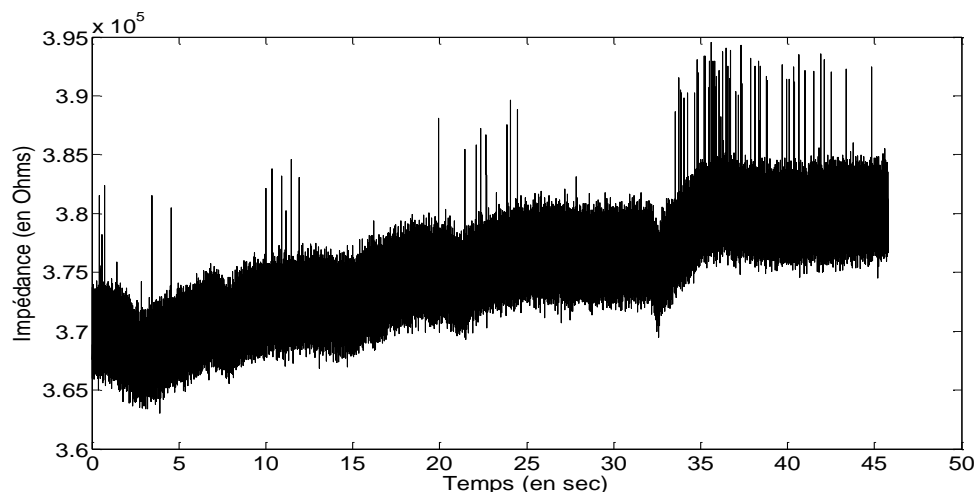


Figure 5-10 Impédance mesurée au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz. Billes de $6\mu\text{m}$ dans une solution à 0,5S/m

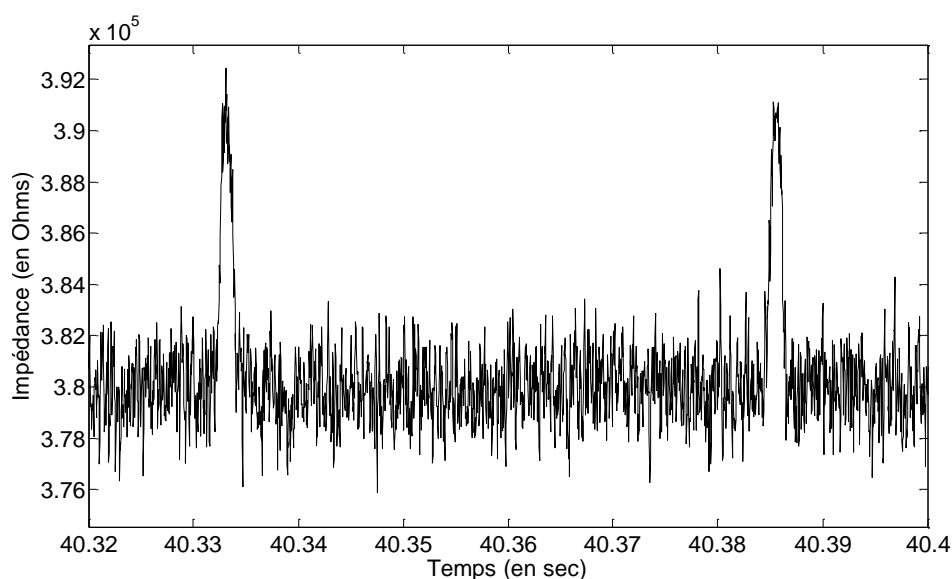


Figure 5-11 Impédance mesurée au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz. Billes de $6\mu\text{m}$ dans une solution à 0,5S/m. Centrage sur 2 détections de particules.

Nous pouvons observer sur ces deux figures que les variations induites par le passage de cellules sont nettement visibles. Cependant un bruit non négligeable est présent ainsi qu'une dérive en impédance au cours du temps. Cette variation au cours du temps n'est pas très importante, de l'ordre de 3%, et peut être due à la présence de résidus, à une légère modification de température et/ou pression. Les variations un peu plus brusques, comme celles présentes aux alentours de 33 secondes sont induites par un changement de pression. En effet, à ces moments donnés, les particules commençaient à adhérer aux parois du canal dans

la zone située avant le dernier rétrécissement, et un surplus de pression a été constaté, d'où la détection d'un grand nombre de particules qui s'en est suivi. Ces dérives dans le temps doivent être tout de même prises en compte, puisqu'elles sont du même ordre de grandeur que les variations de l'impédance. Comme nous nous intéressons à la variation d'impédance, cette dérive peut être supprimée de façon simple. Pour cela on applique un filtre passe bas de fréquence de coupure assez basse pour supprimer les variations induites par le passage de cellules mais assez haute pour conserver les variations induites par la dérive dans le temps. Nous obtenons le signal affiché en rouge dans la Figure 5-12.

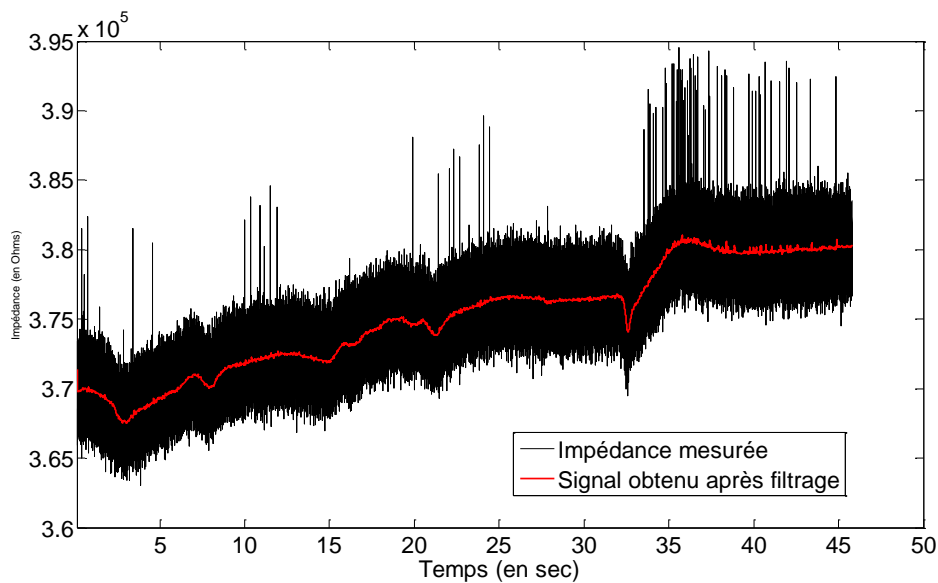


Figure 5-12 Impédance mesurée au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz et signal obtenu après filtrage passe-bas.

Le signal obtenu après filtrage passe bas, que nous nommerons Z_{pb} , suit bien la dérive temporelle de l'impédance sans suivre les variations induites par le passage de particules. Le signal représentant la variation d'impédance en pourcents, induite par le passage des particules peut être obtenu en calculant la variation en pourcent entre le signal de départ et le signal obtenu après filtrage. Le signal obtenu est présenté en Figure 5-13 et Figure 5-14. Nous obtenons cette fois ci des signaux plus facilement exploitables puisque la variation d'impédance peut être directement mesurée. Cependant le bruit subsistant risque d'induire des erreurs de détections. Il ne s'agit pas à proprement dit d'un bruit comme ceux qui peuvent être directement échantillonnés lors de la mesure directe d'un signal, mais il peut être traité de la même façon. Il est dû aux incertitudes de mesures ainsi qu'au bruit réel hautes fréquence qui n'est pas totalement supprimé lors du filtrage numérique effectué par le Lock-in. S'agissant d'un bruit de haute fréquence, celui-ci peut être réduit sans influencer sur les variations

d'impédance, de cinétique plus lente. Les résultats après filtrage passe bas sont donnés en Figure 5-15 et Figure 5-16.

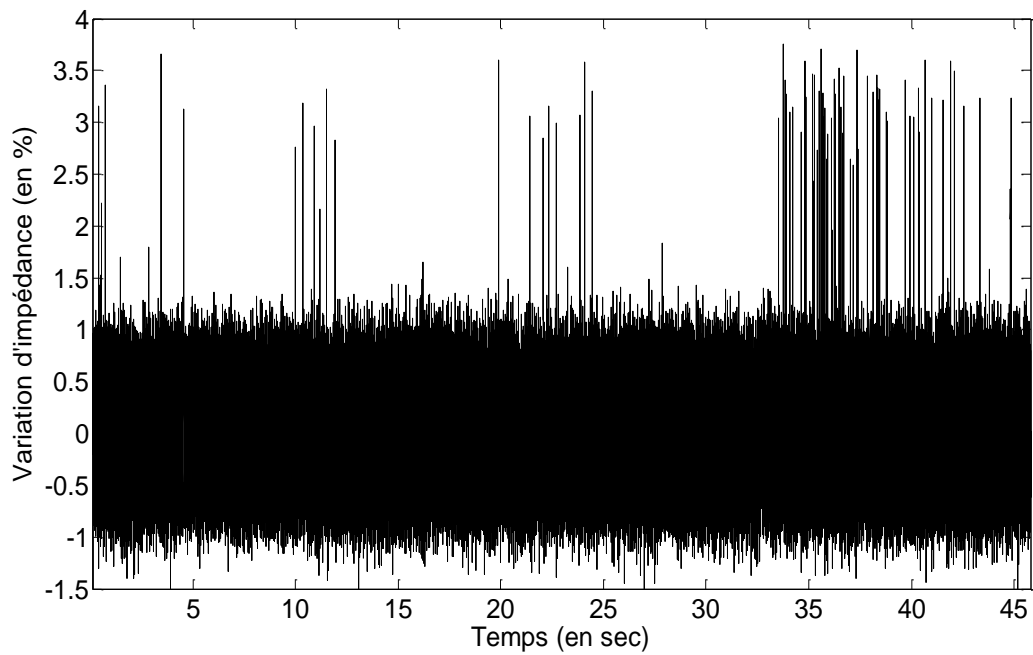


Figure 5-13 Variation d'impédance au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz.

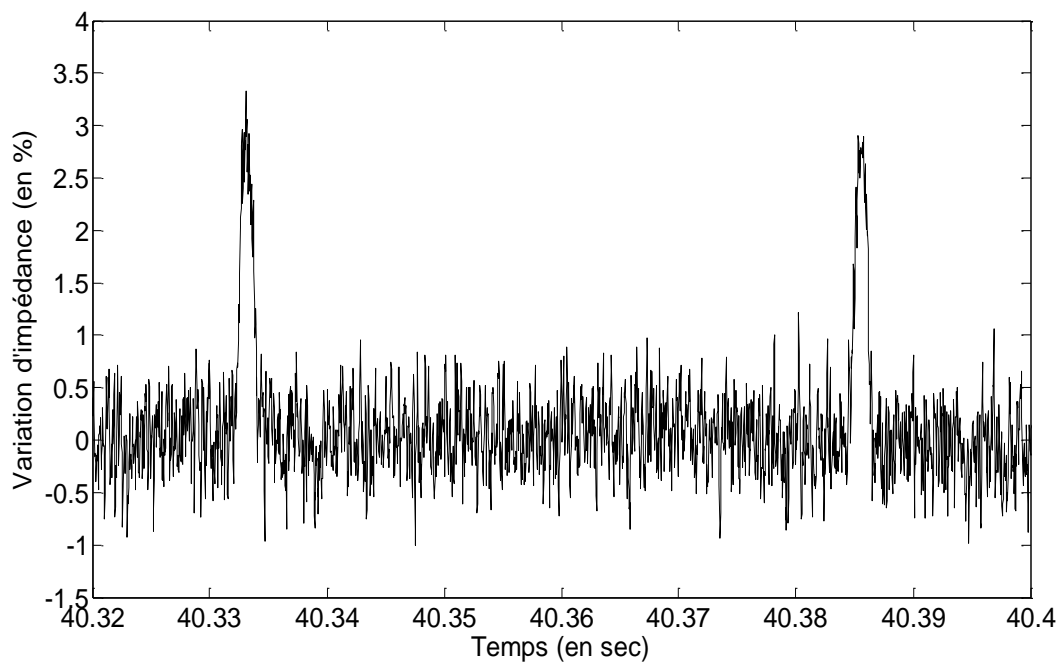


Figure 5-14 Variation d'impédance au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz. Centrage sur 2 détections de particules.

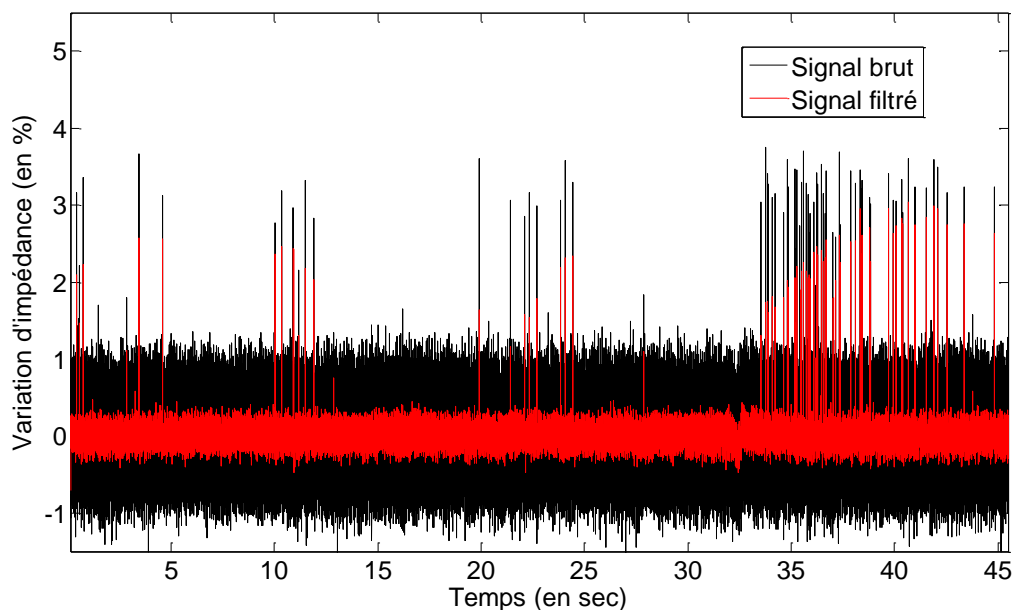


Figure 5-15 Variation d'impédance au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz, pour le signal brut et le signal après filtrage.

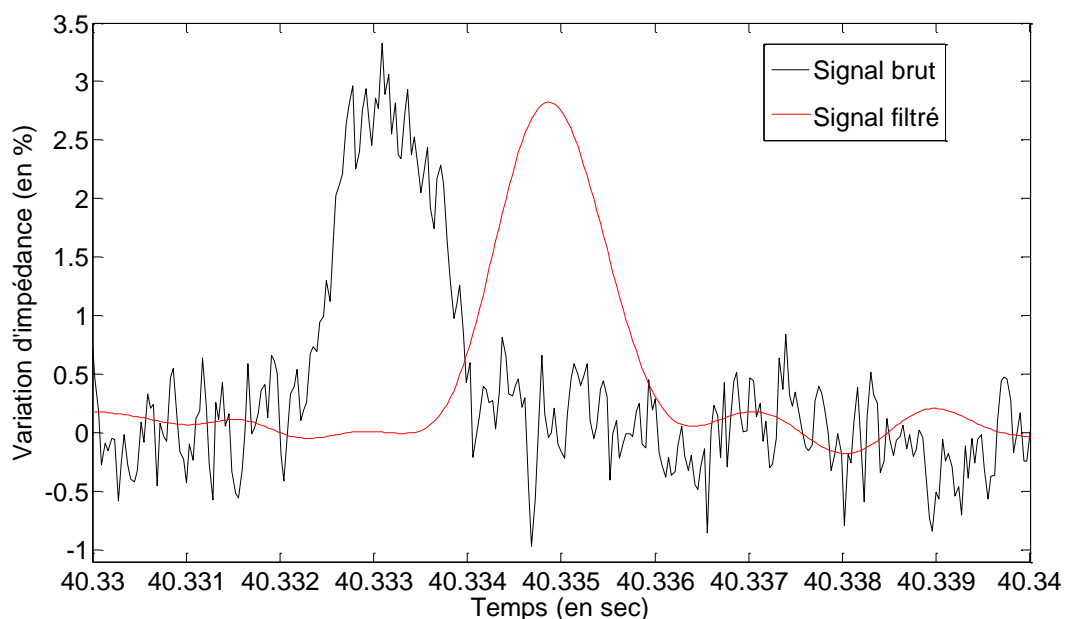


Figure 5-16 Variation d'impédance au cours du temps lors du passage de particules à 100kHz, pour le signal brut et le signal après filtrage. Agrandissement au niveau d'une seule particule

Nous pouvons observer que le bruit a été fortement diminué. Il est passé de 1% de l'impédance mesurée à environ 0.25 %, permettant ainsi d'éviter des risques de fausses détections, à cause de certains pics pouvant être confondus avec des variations induites par des passages de particules. L'agrandissement de la deuxième figure nous montre aussi que la

variation induite par cette particule peut être directement défini comme étant le maximum de variation du signal filtré, ce qui n'était pas le cas pour le signal bruité.

La dernière étape consiste à détecter automatiquement les variations d'impédances du signal filtré, qui correspondent aux passages de particules et d'en mesurer le maximum, correspondant à la mesure utile. Pour cela il faut appliquer un seuil de détection en % pour détecter les zones où la variation d'impédance est considérée comme suffisante pour être due à une présence de cellule. On obtient ainsi le signal présenté en Figure 5-17. Il suffit ensuite, lorsque ce signal est au niveau haut, de détecter et sauvegarder la valeur maximale du signal filtré.

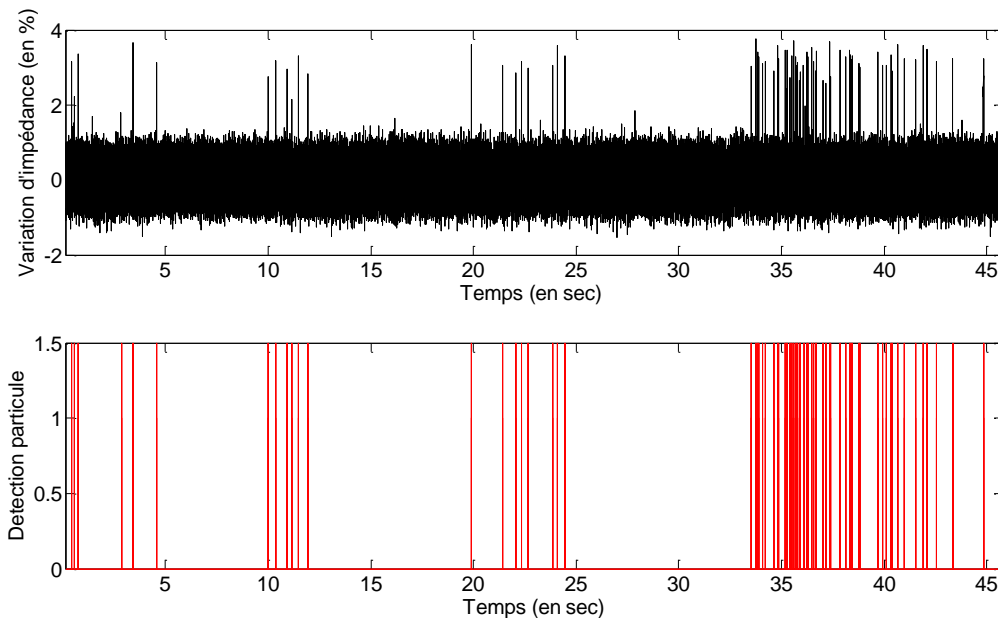


Figure 5-17 Signal de détection de particules obtenu par comparaison par seuil.

Ces traitements de signaux ont été effectués, pour plus de clarté sur le module de l'impédance. Il faudra bien évidemment sélectionné en amont seulement la partie du signal voulu (résistance, capacité, ..) en fonction du type de paramètres à mesurer, avant d'effectuer ces étapes.

5.4.4 Mesures de calibration par microbilles.

A 100kHz, la résistance mesurée ne dépend que de la conductivité de la solution calibrée, du facteur de forme du capteur et du volume de la cellule. La mesure de la variation de résistance donnera donc, comme déterminé dans le chapitre 3 de modélisation et simulation, une mesure indirecte des dimensions des cellules. La résistance peut être obtenue

par simple extraction de la partie réelle de l'impédance. Afin de pouvoir valider les mesures effectuées avec notre capteur, nous avons dans un premier temps effectué les tests sur des billes calibrées de 6 μ m, afin d'obtenir leur courbe de répartition en fonction des variations de résistance mesurées (Le capteur utilisé comportant la géométrie C2, les billes de 10 μ m de diamètre n'ont pas été utilisées). Celle-ci a ensuite été comparée avec celle calculée en fonction de nos simulations et des références données par le constructeur, à savoir un coefficient de variance maximum de 10%. Pour cela nous avons combiné les résultats de simulation pour un canal de 19 μ m par 9,5 μ m avec la répartition normée à 10%. Les répartitions obtenues sont présentées dans la Figure 5-18.

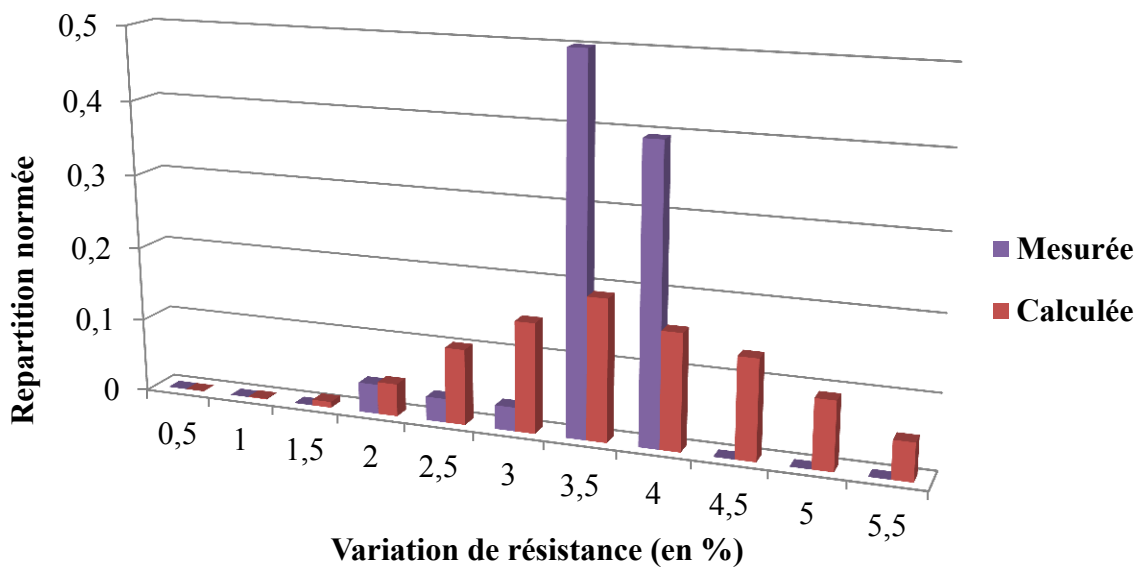


Figure 5-18 Répartition normée de billes calibrées de 6 μ m en fonction de la variation de résistance mesurée à 100kHz, et de celle recalculée à l'aide des résultats de simulation et du coefficient de variance donné par le constructeur.

Nous pouvons observer que les deux courbes de répartition présentent une moyenne très proche, soit de 3,52% de variation théorique contre 3,48% mesurée. La courbe calculée présente cependant un étalement plus important. Cela peut s'expliquer par le fait que le coefficient de variance de 10% donné par le constructeur correspond à la tolérance maximale garantie. Le coefficient réel sera donc égal ou inférieur, ayant pour incidence de diminuer cet étalement. Ces résultats permettent de confirmer la justesse et la précision de mesure de notre capteur.

5.4.5 Mesures de cellules et particules.

Dans cette section, les caractéristiques de différentes particules et cellules définies précédemment seront mesurées afin de déterminer si les résultats obtenus sont en accord avec la théorie, ainsi que de vérifier la possibilité de discriminer ces particules.

Mesures à 100kHz (application à la mesure des dimensions de cellule) :

Ces mesures de variations ont été effectuées à 100kHz, permettant la mesure indirecte de la taille des cellules et particules. Pour chaque type de particule, les mesures ont été effectuées sur plus d'une centaine d'unités afin d'obtenir des mesures représentatives de la population mesurée. Les résultats de ces mesures sont exposés en Figure 5-19, sous forme d'un diagramme de répartition normée.

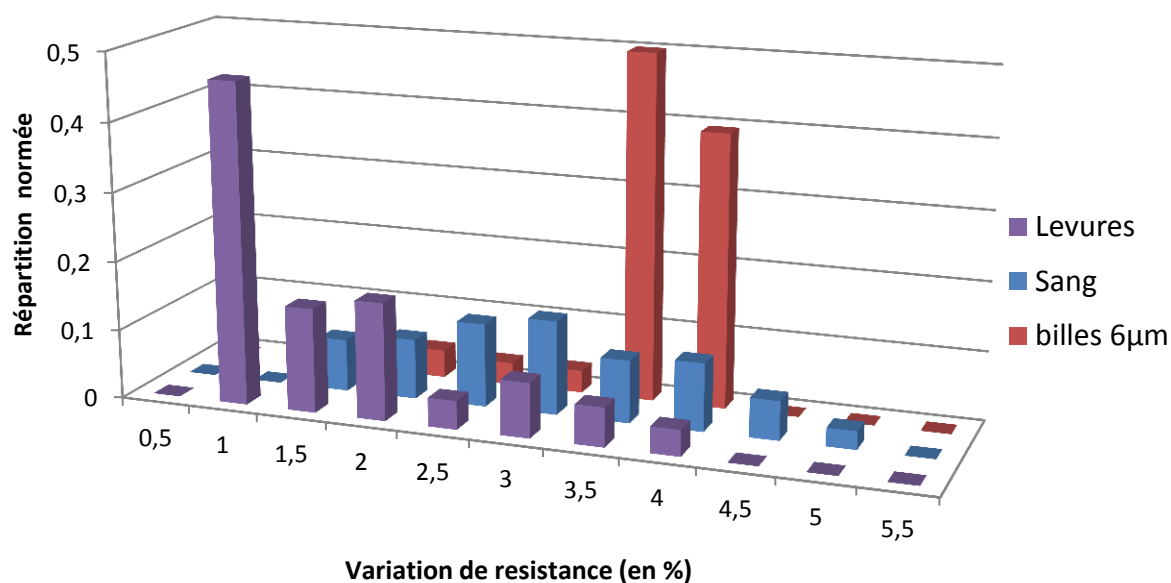


Figure 5-19 Répartition normée de trois type de particules: sang, levures et bille de 6µm en fonction de la variation de résistance induite.

Ce diagramme permet de présenter la population de chaque type de cellule en fonction de la variation de résistance induite. Les levures de boulanger, légèrement plus petites en général que les cellules sanguines, présentent bien une répartition avec des valeurs plus faibles que ces dernières. Il en est de même entre les billes de 6µm qui ont des dimensions plus grandes (en volume) que celles des cellules sanguines. Nous pouvons aussi remarquer que les billes ont une répartition beaucoup plus étroite que les cellules. Cela s'explique

facilement par le fait qu'elles soient calibrées, contrairement aux cellules, qui peuvent présenter des répartitions plus larges, sans pour autant être anormales. Ces mesures sont cohérentes avec les données trouvées dans la littérature. En effet, si l'on revient aux résultats déjà présentés en Figure 2-25, nous avons vu que des billes calibrées de 4, 5 et 6 μm pouvaient être aisément différenciées avec une mesure à 600kHz (mesurant les mêmes paramètres que nos mesures à 100kHz), car elles présentaient des répartitions assez étroites. En revanche, les globules rouges présentaient une répartition plus étendue, dans la même gamme que celle des billes de 5 et 6 μm réunis, soit allant environ de 4,5 à 6,5 μm . Cela donnerait dans notre cas une répartition ciblée dans la zone de 1,5 à 4,5 % de variation, ce qui est bien le cas de notre courbe.

Ces résultats attestent de la possibilité de déterminer les dimensions des particules lors de leur passage, et donc de les discriminer. Cela est possible aussi à condition que les répartitions ne soient pas trop proches comme pour les levures et les billes. Les cellules sanguines ayant une répartition relativement large, il serait difficile de les discriminer des autres. Nous pouvons aussi conclure que malgré les mesures de différentes cellules, il n'y a pas eu de cas d'agrégation de cellules décelables. Il n'y a donc soit pas eu d'agrégations de cellules durant les mesures soit celles-ci étaient de petites tailles.

Mesures des autres paramètres cellulaires.

Les autres mesures concernent la capacité membranaire et le cytoplasme. La première doit pouvoir s'effectuer à la même fréquence que la mesure de résistance, et la seconde dans les environs de 5MHz, où la capacité de membrane pourra être considérée comme négligeable. Pour mesurer la capacité il suffit de garder la partie imaginaire de l'admittance et de la diviser par la pulsation ω , et les propriétés du cytoplasme comme précédemment avec une mesure de résistance. L'extraction de ces paramètres à partir des mesures effectuées n'a pas fourni de valeur mesurable. Ces deux problèmes viennent de la même source : les capacités parasites. Celles-ci étant grandes devant la capacité à vide et celle de la membrane, les variations provoquées par la présence de la cellule n'ont pas eu de répercussions mesurables. Concernant la variation de résistance induite par le cytoplasme, celle-ci se mesure à 5MHz. Or à cette fréquence les effets des capacités parasites sont déjà prédominants par rapport à la résistance, ce qui ne permet pas d'en mesurer les variations induites par le passage de cellules.

5.4.6 Tests de reproductibilité et vitesse admissible.

Séries de mesures.

Afin de vérifier que nos mesures sont reproductibles, nous avons dans un premier temps effectué à deux jours d'intervalle deux séries de mesures sur des billes calibrées de $6\mu\text{m}$, afin de comparer les résultats. Ces mesures se sont portées sur des billes, car ce sont les particules à notre disposition présentant les dimensions les plus uniformes et stables. Les résultats sont présentés dans la Figure 5-20. Les répartitions entre les deux séries sont très proches, prouvant que les mesures, et les variations moyennes pour chacune des deux séries sont respectivement de 3,48 et 3,28%, soit moins de 6% de différence entre les deux. Il est donc possible d'en déduire que les mesures sont reproductibles.

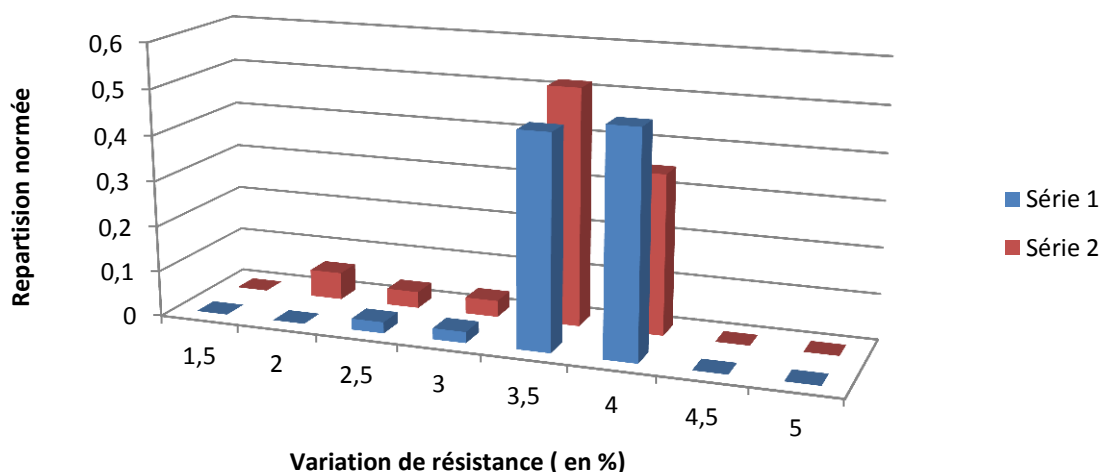


Figure 5-20 Répartition normée de deux séries de mesures de billes de $6\mu\text{m}$ en fonction de la variation de résistance induite.

Mesures successives sur une même cellule.

Un autre test de reproductibilité a pu être effectué en faisant passer plusieurs fois de suite la même particule entre les électrodes de mesures à très faibles vitesses. Pour ce test une levure de boulanger a été utilisée. Les résultats des mesures effectuées pour 7 passages successifs sont donnés dans le Tableau 5-2. Les mesures effectuées successivement sont très

proches les unes des autres, avec moins de 4% d'écart entre les différents passages, étant donnée la faible variation de départ, il n'est même pas possible de déterminer s'il s'agit d'erreur de mesures ou de réelles variations. Ce système permet donc des mesures avec une grande reproductibilité. La courbe de variation présentée pour une de ces particules, en Figure 5-21, permet de bien mettre en évidence la présence d'un palier stable dont l'allure correspond à celle des courbes obtenues par simulation.

Tableau 5-2 Comparaison des variations de résistance induites par le passage successif d'une même cellule.

Numéro de passage	Variation de résistance (en %)	variation par rapport à la première mesure (en %)
1	1,677	
2	1,678	0,06
3	1,742	3,87
4	1,712	2,08
5	1,714	2,20
6	1,716	2,33
7	1,746	4,11

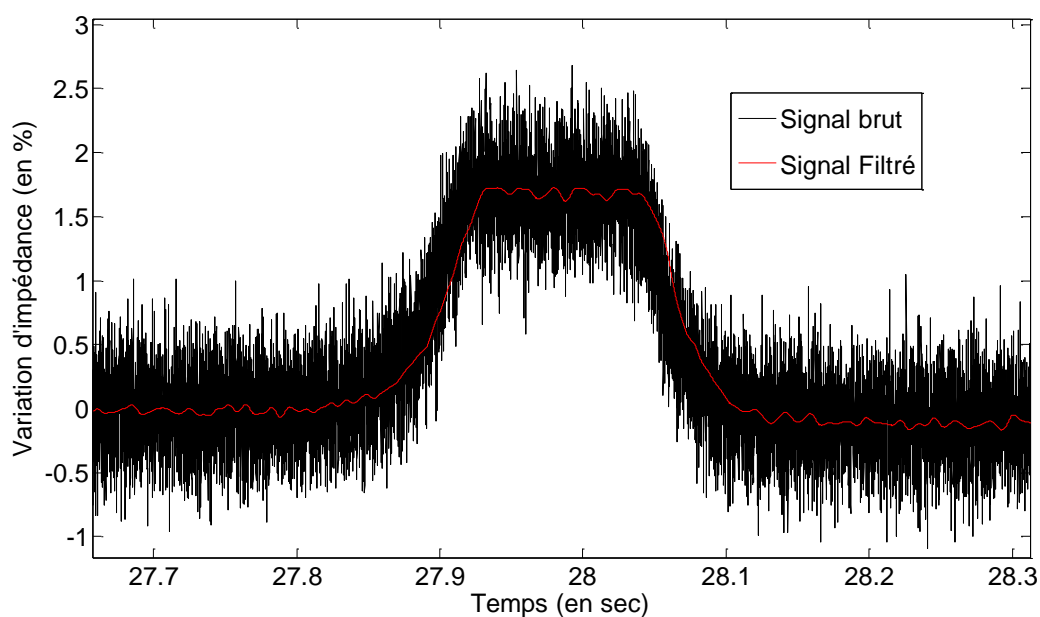


Figure 5-21 Variation d'impédance obtenue lors du passage d'une cellule (levure de boulanger) à faible vitesse.

Mesure par paires d'électrodes.

Ces mesures sont effectuées simultanément sur les deux paires d'électrodes, permettant ainsi de mesurer à deux reprises chaque particule passant dans le canal. Ces mesures ont été effectuées avec des levures, pour optimiser les chances d'obtenir le passage de deux cellules simultanées de taille différentes. La variation de résistance pour le passage de deux cellules simultanées est donnée en Figure 5-22.

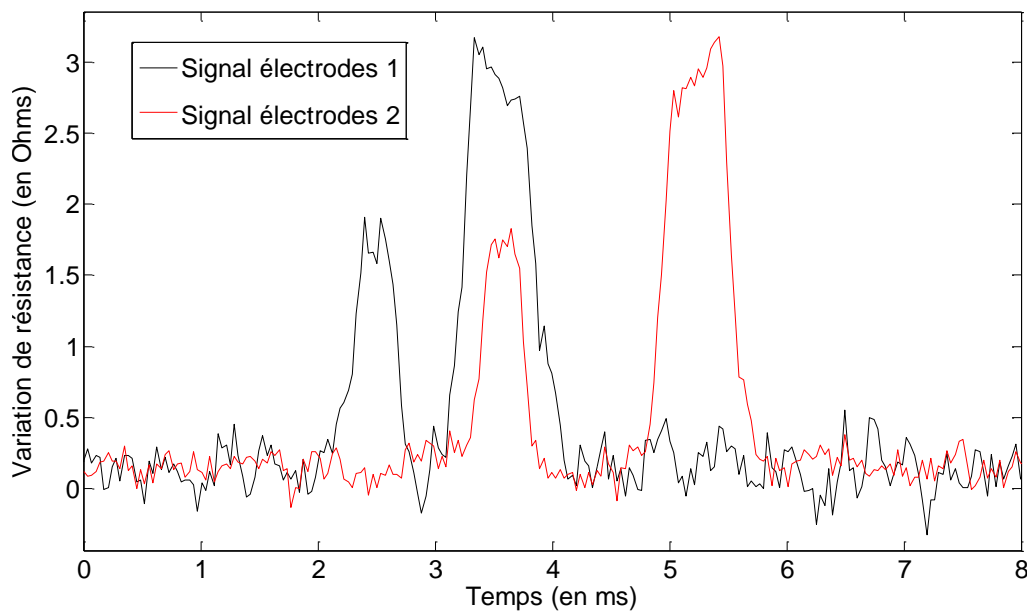


Figure 5-22 Variation de résistance en fonction du temps pour les deux paires d'électrodes coplanaires, pendant le passage de deux cellules successives.

Nous pouvons observer que les variations mesurées par chacune des électrodes sont similaires. De plus, comme la distance entre les électrodes est connue (80 μm), il est possible de mesurer la vitesse de ces particules par l'écart de temps entre les détections au niveau des deux paires d'électrodes, soit 1ms environ pour la plus petite particule. On obtient donc une vitesse de 80 mm/sec. La partie la plus étroite du canal faisant 1mm de longueur, la cellule la traverse entièrement en moins de 20 ms. Nous pouvons définir que cette vitesse est proche de la vitesse limite, puisque seulement quelques mesures stables sont présentes au niveau du palier. Nous pouvons aussi observer que la seconde particule, de plus grande taille, se déplace moins rapidement avec une vitesse d'environ 50 mm/s. Cette différence peut s'expliquer par le fait que plus une particule en suspension est grande, plus sa mobilité est faible. De plus, le faible gradient de vitesse du liquide aux abords des parois du canal freine la progression de la cellule. Celles de grandes dimensions sont donc les plus exposées.

5.5 Conclusion.

Nous avons pu réaliser dans cette partie expérimentale, des mesures d'impédances sur différentes cellules et particules, à savoir des billes calibrées de 6 μ m de diamètres, des levures de boulanger et des cellules sanguines. Ces mesures ont pu être correctement acquises grâce à un banc de mesure adéquat que nous avons validé. Les choix des appareils le composant, et en particulier l'impédancemètre HF2IS, ont permis de répondre correctement aux aptitudes de mesures attendues eut égard aux contraintes du cahier des charges déduites à partir des résultats de simulation.

Les mesures à vide nous ont permis de déterminer les impédances parasites s'ajoutant à celles que nous désirons mesurer. Celles effectuées avec des solutions calibrées, nous ont permis quant à elles de déterminer le facteur de forme des électrodes, qui s'est bien avéré en accord avec nos résultats obtenus en modélisation et simulation, avec moins de 1,1% de différences pour la première paire d'électrodes. Pour revenir aux impédances parasites, nous avons déterminé que l'impédance en série, correspondant à celles des câbles, électrodes et entrée/sortie des appareils de mesure pouvait être négligée comparée aux grandeurs à mesurer. Ce n'est cependant pas le cas de la capacité parasite de ce premier prototype ne nous a pas permis pour l'instant de mesurer tous les paramètres désirés.

Nos mesures sur les variations de résistances lors du passage des particules, ont quant à elles donnés de bons résultats, puisque les mesures des différentes particules ont permis de les répartir et de les différencier par tailles. Les résultats obtenus ont pu être comparés avec succès à notre modèle théorique et nos simulations, notamment pour les billes calibrées dont la répartition centrée sur la même valeur que celle trouvée pendant les simulations, soit 3,5%. Les mesures de cellules sanguines ont quant à elles été comparées avec d'autres résultats disponibles dans la littérature, avec une parfaite cohérence. De plus les différentes mesures de répétabilité nous ont donné des résultats très prometteurs, comme dans le cas de mesures simultanées de la même particule, nous donnant à chaque fois des mesures presque identiques avec un taux de variation très faible (inférieur à 5%) par rapport au type de mesures effectuées.

Nos résultats permettent d'envisager de mesurer sans difficultés les autres paramètres, encore inaccessibles avec ce capteur, en réalisant un nouveau prototype où les couplages capacitifs parasites seront fortement réduits. Ceux-ci pourront être réduits de façon significative par application d'un écart plus important entre les contacts et pistes menant aux

électrodes microscopiques de la zone de mesure, en réduisant les longueurs des électrodes coplanaires à leur extrémité et en déplaçant les contacts de ces électrodes de chaque côté du substrat. L'utilisation de géométries de type parallèles pourra être aussi envisagée: la géométrie P2 pourrait permettre, d'après nos simulations, d'effectuer des mesures de capacité membranaire avec une sensibilité 7 fois supérieure et de multiplier par 7 la fréquence maximale de mesure utile. Les dispositifs SAW, actuellement en test de validation pourront promouvoir un meilleur contrôle de la vitesse des particules, et voir même sa régulation.

Conclusion Générale

La caractérisation de tissus biologiques par spectroscopie d'impédances permet d'obtenir un grand nombre d'informations indirectes sur leur état physiologique. Chaque matériau possède à la fois des propriétés électriques et diélectriques spécifiques. A l'échelle microorganique, chaque cellule vivante est constituée de différents éléments qu'il est possible de différencier et caractériser par mesures électriques. Les nombreuses investigations conduites depuis plus d'un siècle dans ce domaine ont permis de caractériser un grand nombre de tissus, aussi bien sains que pathologiques, montrant la possibilité d'utiliser ces techniques dans les applications médicales diagnostiques ou thérapeutiques. De nombreux modèles, telles que ceux de Fricke ou découlant des approximations de Maxwell ont pu être développés pour faire le lien entre les mesures électriques et les propriétés physicochimiques des échantillons. Des modèles électriques relativement représentatifs sont ainsi disponibles.

Cependant, la plupart de ces travaux portaient sur des expérimentations à l'échelle macroscopique, ne donnant qu'une mesure des effets globaux des cellules formant l'échantillon. Depuis une vingtaine d'années, les développements technologiques (microsystèmes, bioMEMS, biopuces etc...) ont stimulé le développement de mesures à l'échelle cellulaire voire infra cellulaire (ADN). Des mesures sur des quantités de cellules de plus en plus faibles, notamment par capteurs à électrodes interdigités, jusqu'à la mesure de cellule unitaire par cytométrie de flux ont été effectuées notamment par notre équipe. Tout cela a été rendu possible par l'utilisation des nouvelles technologies de micro-nanofabrications utilisées à la base pour la miniaturisation des composants électroniques. De plus, le travail à ces dimensions permet de bénéficier des effets laminaires des fluides, qui peuvent être utilisés pour le déplacement et le centrage précis des cellules. Il est aussi envisageable de se servir de micro-actionneurs dans le but de contrôler le déplacement des particules, aussi bien de façon globale que ciblée. C'est pourquoi nous avons envisagé la réalisation d'un capteur hybride dédié à la spectroscopie d'impédance de cellules en cytométrie de flux, pouvant intégrer des dispositifs de type SAW.

La première étape de ce projet s'est portée sur la modélisation et la simulation de la réponse unitaire d'une cellule. Un modèle basé sur une linéarisation de l'approximation de Maxwell Garnett et le partitionnement de la zone de mesure a pu être développé. Celui-ci divise la zone de mesure initiale en une zone sensible contenant la cellule à mesurer, et des zones d'impédances fixes, qui peuvent être retranchées de la mesure globale. Il permet ainsi

Conclusion Générale

de contourner des contraintes actuelles pour la détermination de modèles analytiques adaptable à différentes géométries d'électrodes pour la mesure unitaire de cellules. Des simulations par la méthode des éléments finis, ont été menées avec différentes géométries d'électrodes parallèles et coplanaires. Elles ont permis de déterminer les géométries les plus à même de réaliser des mesures de cellule unitaires, en terme de : sensibilité, de capacité à distinguer des cellules proches les unes des autres, et des vitesses maximales théoriques admissibles. Nous les avons aussi utilisées pour déterminer la gamme d'impédance (de quelques dizaines à quelques centaines de $k\Omega$) et la bande de fréquence (de 100 kHz à 10 MHz) utiles, ainsi que l'apport unitaire de chaque constituant d'une cellule, en fonction de leurs paramètres intrinsèques et dimensions. Leurs comparaisons avec le modèle analytique développé, ont montré de bonnes similitudes pour des cellules dont la taille est comprise entre 25 et 75% de celles du canal, permettant de valider les hypothèses auparavant formulées.

La suite de ce projet nous a amené à la réalisation proprement dite du capteur microfluidique. Dans un premier temps, le design de celui-ci a été établi en se basant sur les géométries coplanaires et parallèles retenues sur la base de simulations, ainsi que sur la faisabilité du dispositif par les méthodes classiques de micro-fabrication par couches. Même si, seules les électrodes coplanaires ont été utilisées, les motifs nécessaires à la réalisation de structures parallèle et d'actionneurs à ondes acoustiques de surface furent intégrés en anticipation d'une réalisation. L'étude des matériaux pouvant servir à la réalisation des électrodes, du canal et couvercle de scellage a abouti au choix du platine, du PDMS et de la résine SU_8 comme étant parmi les plus biocompatibles pour nos applications. Deux versions de capteurs, utilisant des couches et méthodes de fabrications différentes, ont été élaborées. La première, utilisant une couche de résine SU_8 pour structurer le canal, a montré d'importants problèmes d'adhésion, provoquant un décrochement quasi-systématique du canal lors des tests. Ce problème a pu être résolu avec la deuxième génération de capteur, conçu par collage chimique irréversible d'un bloc de PDMS structuré par moulage. Cette technique a permis de plus une nette réduction du temps de fabrication tout en améliorant la reproductibilité.

La dernière partie a consisté à valider expérimentalement les résultats obtenus en simulation, ainsi que la possibilité de détecter et discriminer différents types de cellules et particules lors de leur passage dans le micro-canal. Etant donné le type de mesure à réaliser, il a fallu concevoir un banc de mesure dédié, centré sur un amplificateur à verrouillage de phase (HF2IS de Zurich Instrument©), autorisant des mesures d'impédances à grande vitesse et

Conclusion Générale

jusqu'à huit fréquences multiplexées. L'utilisation d'un microscope optique a permis le suivi des cellules lors de leurs déplacements, et de valider que les variations d'impédance mesurées correspondaient bien au passage effectif des cellules. Des tests de validations, réalisés à vide et avec des solutions calibrées ont permis de déterminer les impédances parasites du système capteur et conditionneur, ainsi que de les facteurs de forme des deux paires d'électrodes coplanaires. Celles-ci correspondent bien à celles trouvées en simulation avec moins de 6 et 9% de différences, pouvant être directement imputables aux résolutions de la lithographie optique utilisée lors de l'élaboration des capteurs. Enfin, des cellules sanguines, des bactéries (levures de boulanger) et des micro-billes calibrées ont été caractérisées. Les mesures des dimensions de ces particules, correspondant à la variation de la résistance mesurée à 100kHz, ont montré de bonnes correspondances avec les valeurs déterminées en simulation et la possibilité de les discriminer. D'autres tests ont aussi prouvé la possibilité de procéder à des mesures avec une bonne répétabilité. Les essais effectués sur la capacité à 100kHz et la résistivité au-dessus de 1 MHz, utilisées pour déterminer respectivement les propriétés de la membrane et du cytoplasme, ont mis en évidence les difficultés d'accomplissement de ces mesures à cause des impédances parasites, même faibles (capacités parasites de l'ordre de 0,5 fF).

Malgré ce problème lié aux capacités parasites, tous les tests et mesures effectués ont donné des résultats tout à fait satisfaisants, permettant d'envisager de bonnes perspectives quant à la suite du travail initié. Comme énoncé dans le dernier chapitre, la conception des pistes menant des contacts macroscopiques aux électrodes microscopiques pourra être revue afin de diminuer fortement les couplages capacitifs entre celles-ci, et rendre possible les mesures de tous les paramètres désirés. Les dispositifs à ondes acoustiques de surface, pourraient aussi à terme remplacer les seringues utilisées lors de ce projet de thèse, pour effectuer un déplacement contrôlé du fluide et des particules à travers le micro-canal. Des capteurs sur substrat piézoélectriques en niobate de lithium (LiNbO_3), ont d'ailleurs déjà été produits mais sont encore en phase de validation. Des séries de mesures, sur d'autres types de cellules et particules, saines ou non, pourrons aussi être envisagées pour élargir les données sur les propriétés de cellules unitaires. Celles-ci sont à l'heure actuelle, contrairement aux mesures macroscopiques, très peu renseignées dans la littérature.

Conclusion Générale

Bibliographie

- [1] J. Picalek et J. Kolafa, « Molecular dynamics study of conductivity of ionic liquids: The Kohlrausch law », *J. Mol. Liq.*, vol. 134, n° 1, p. 29-33, 2007.
- [2] S. Koneshan, J. C. Rasaiah, R. M. Lynden-Bell, et S. H. Lee, « Solvent structure, dynamics, and ion mobility in aqueous solutions at 25 C », *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, n° 21, p. 4193-4204, 1998.
- [3] L. Onsager, « Theories of Concentrated Electrolytes. », *Chem. Rev.*, vol. 13, n° 1, p. 73-89, 1933.
- [4] N. F. Hall, « Systems of acids and bases », *J. Chem. Educ.*, vol. 17, n° 3, p. 124, 1940.
- [5] M. French, T. R. Mattsson, et R. Redmer, « Diffusion and electrical conductivity in water at ultrahigh pressures », *Phys. Rev. B*, vol. 82, n° 17, p. 174108, 2010.
- [6] U. Kaatze et K. Giese, « Dielectric relaxation spectroscopy of liquids: frequency domain and time domain experimental methods », *J. Phys. [E]*, vol. 13, n° 2, p. 133, 1980.
- [7] A. Hamed, E. Tisserand, P. Schweitzer, et Y. Berviller, « Original embedded impedance analyzer for piezoelectric sensors », *Sensors Actuators Phys.*, vol. 182, p. 82-88, 2012.
- [8] K. S. Rao, P. V. Nikitin, et S. F. Lam, « Impedance matching concepts in RFID transponder design », in *Automatic Identification Advanced Technologies, 2005. Fourth IEEE Workshop on*, 2005, p. 39-42.
- [9] E.-H. Aglzim, A. Rouane, et R. El-Moznine, « An electronic measurement instrumentation of the impedance of a loaded fuel cell or battery », *Sensors*, vol. 7, n° 10, p. 2363-2377, 2007.
- [10] E. T. McAdams, A. Lackermeier, J. A. McLaughlin, D. Macken, et J. Jossinet, « The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 10, n° 1, p. 67-74, 1995.
- [11] S. Mayer, L. A. Geddes, J. D. Bourland, et L. Ogborn, « Faradic resistance of the electrode/electrolyte interface », *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 30, n° 5, p. 538-542, 1992.
- [12] T. C. Halsey, « Frequency dependence of the double-layer impedance at a rough surface », *Phys. Rev.*, vol. 35, n° 8, p. 3512, 1987.
- [13] M. Ibrahim, J. Claudel, D. Kourtiche, M. Nadi, F. Montaigne, et G. Lengaigne, « Optimization of planar interdigitated electrode array for bioimpedance spectroscopy restriction of the number of electrodes », in *Sensing Technology (ICST), 2011 Fifth International Conference on*, 2011, p. 612-616.
- [14] N. A. Sekushin, « Equivalent circuit of Warburg impedance », *Russ. J. Electrochem.*, vol. 45, n° 7, p. 828-832, 2009.
- [15] K. Xu, S. Zhang, et R. Jow, « Electrochemical impedance study of graphite/electrolyte interface formed in LiBOB/PC electrolyte », *J. Power Sources*, vol. 143, n° 1, p. 197-202, 2005.
- [16] T. Pajkossy, « Impedance spectroscopy at interfaces of metals and aqueous solutions—Surface roughness, CPE and related issues », *Solid State Ionics*, vol. 176, n° 25, p. 1997-2003, 2005.
- [17] H. P. Schwan, « Electrical properties of blood and its constituents: Alternating current spectroscopy », *Blut*, vol. 46, n° 4, p. 185-197, 1983.
- [18] Y. Katsumoto, Y. Hayashi, I. Oshige, S. Omori, N. Kishii, A. Yasuda, et K. Asami, « Dielectric cytometry with three-dimensional cellular modeling », *Biophys. J.*, vol. 95, n° 6, p. 3043-3047, 2008.

Bibliographie

- [19] H. Fricke, « The electric capacity of suspensions with special reference to blood », *J. Gen. Physiol.*, vol. 9, n° 2, p. 137-152, 1925.
- [20] K. S. Cole, « The Advance of Electrical Models for Cells and Axons: “Arma virumque cano” », *Biophys. J.*, vol. 2, n° 2 Pt 2, p. 101, 1962.
- [21] S. Gabriel, R. W. Lau, et C. Gabriel, « The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues », *Phys. Med. Biol.*, vol. 41, n° 11, p. 2271, 1996.
- [22] A. Valero, T. Braschler, et P. Renaud, « A unified approach to dielectric single cell analysis: Impedance and dielectrophoretic force spectroscopy », *Lab. Chip*, vol. 10, n° 17, p. 2216-2225, 2010.
- [23] H. Fricke et S. Morse, « The electric resistance and capacity of blood for frequencies between 800 and 4½ million cycles », *J. Gen. Physiol.*, vol. 9, n° 2, p. 153, 1925.
- [24] H. Fricke et S. Morse, « The electric capacity of tumors of the breast », *J. Cancer Res.*, vol. 10, n° 3, p. 340-376, 1926.
- [25] H. Fricke, « A mathematical treatment of the electric conductivity and capacity of disperse systems I. The electric conductivity of a suspension of homogeneous spheroids », *Phys. Rev.*, vol. 24, n° 5, p. 575, 1924.
- [26] O. Levy et D. Stroud, « Maxwell Garnett theory for mixtures of anisotropic inclusions: Application to conducting polymers », *Phys. Rev. B*, vol. 56, n° 13, p. 8035, 1997.
- [27] J.M. Garnett, « Colours in Metal Glasses and in Metallic Films. », *Proc. R. Soc. Lond.*, vol. 73, n° 488-496, p. 443-445, 1904.
- [28] K. S. Cole, « Electric impedance of suspensions of spheres », *J. Gen. Physiol.*, vol. 12, n° 1, p. 29-36, 1928.
- [29] B. Rajewsky et H. Schwan, « Die Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit des Blutes bei ultrahohen Frequenzen », *Naturwissenschaften*, vol. 35, n° 10, p. 315-316, 1948.
- [30] F. Jaspard, M. Nadi, et A. Rouane, « Dielectric properties of blood: an investigation of haematocrit dependence », *Physiol. Meas.*, vol. 24, n° 1, p. 137, 2003.
- [31] S. Egot-Lemaire, J. Pijanka, J. Sulé-Suso, et S. Semenov, « Dielectric spectroscopy of normal and malignant human lung cells at ultra-high frequencies », *Phys. Med. Biol.*, vol. 54, n° 8, p. 2341, 2009.
- [32] B. Rigaud, J.-P. Morucci, et N. Chauveau, « Bioelectrical impedance techniques in medicine. Part I: Bioimpedance measurement. Second section: impedance spectrometry. », *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 24, n° 4-6, p. 257-351, 1995.
- [33] M. Fenech, M. Maasrani, et M. Y. Jaffrin, « Fluid volumes determination by impedance spectroscopy and hematocrit monitoring: application to pediatric hemodialysis », *Artif. Organs*, vol. 25, n° 2, p. 89-98, 2001.
- [34] M. Fenech et M. Y. Jaffrin, « Extracellular and intracellular volume variations during postural change measured by segmental and wrist-ankle bioimpedance spectroscopy », *Biomed. Eng. IEEE Trans.*, vol. 51, n° 1, p. 166-175, 2004.
- [35] D. P. Kotler, S. Burastero, J. Wang, et R. N. Pierson, « Prediction of body cell mass, fat-free mass, and total body water with bioelectrical impedance analysis: effects of race, sex, and disease. », *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 64, n° 3, p. 489S-497S, 1996.
- [36] M. Pop, A. Molckovsky, L. Chin, M. C. Kolios, M. A. Jewett, et M. D. Sherar, « Changes in dielectric properties at 460 kHz of kidney and fat during heating: importance for radio-frequency thermal therapy », *Phys. Med. Biol.*, vol. 48, n° 15, p. 2509, 2003.
- [37] M. Uematsu et E. U. Franck, *Static dielectric constant of water and steam*. American Chemical Society and the American Institute of Physics for the National Bureau of Standards, 1980.

Bibliographie

- [38] K. Asami, E. Gheorghiu, et T. Yonezawa, « Real-time monitoring of yeast cell division by dielectric spectroscopy », *Biophys. J.*, vol. 76, n° 6, p. 3345-3348, 1999.
- [39] S. Arndt, J. Seebach, K. Psathaki, H.-J. Galla, et J. Wegener, « Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, n° 6, p. 583-594, 2004.
- [40] Y. Hayashi, I. Oshige, Y. Katsumoto, S. Omori, A. Yasuda, et K. Asami, « Temporal variation of dielectric properties of preserved blood », *Phys. Med. Biol.*, vol. 53, n° 1, p. 295, 2008.
- [41] P. O. Bagnaninchi et N. Drummond, « Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 16, p. 6462-6467, 2011.
- [42] C. Gabriel, S. Gabriel, et E. Corthout, « The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey », *Phys. Med. Biol.*, vol. 41, n° 11, p. 2231, 1996.
- [43] S. Gabriel, R. W. Lau, et C. Gabriel, « The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz », *Phys. Med. Biol.*, vol. 41, n° 11, p. 2251, 1996.
- [44] J. Katrib, P. Schmitt, I. Magne, D. Kourtiche, M. Souques, et M. Nadi, « Implantable cardioverter-defibrillators exposed to low frequency magnetic fields », in *General Assembly and Scientific Symposium, 2011 XXXth URSI*, 2011, p. 1-4.
- [45] F. Jaspard et M. Nadi, « Dielectric properties of blood: an investigation of temperature dependence », *Physiol. Meas.*, vol. 23, n° 3, p. 547, 2002.
- [46] M. Nadi, C. Gagny, et P. R. Djilali Kourtiche, « Electric properties of mammalian tissues: ex vivo results from 1 Mhz to 1 GHz ».
- [47] M. Nadi, « Dielectric Characterization of Biological Tissues: Constraints Related to Ex Vivo Measurements », in *Sensors*, Springer, 2008, p. 75-90.
- [48] A. B. Pippard, « The surface impedance of superconductors and normal metals at high frequencies. II. The anomalous skin effect in normal metals », *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.*, vol. 191, n° 1026, p. 385-399, 1947.
- [49] A. V. Mamishev, K. Sundara-Rajan, F. Yang, Y. Du, et M. Zahn, « Interdigital sensors and transducers », *Proc. IEEE*, vol. 92, n° 5, p. 808-845, 2004.
- [50] R. Ivanic, I. Novotny, V. Rehacek, V. Tvarozek, et M. Weis, « Thin film non-symmetric microelectrode array for impedance monitoring of human skin », *Thin Solid Films*, vol. 433, n° 1, p. 332-336, 2003.
- [51] M. Brischwein, S. Herrmann, W. Vonau, F. Berthold, H. Grothe, E. R. Motrescu, et B. Wolf, « Electric cell-substrate impedance sensing with screen printed electrode structures », *Lab. Chip*, vol. 6, n° 6, p. 819-822, 2006.
- [52] M. Varshney et Y. Li, « Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle-antibody conjugates for detection of *Escherichia coli* O157: H7 in food samples », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, n° 11, p. 2408-2414, 2007.
- [53] R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, K. Stegbauer, et B. Wolf, « Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 12, n° 1, p. 29-41, 1997.
- [54] R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, et B. Wolf, « On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures », *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 36, n° 3, p. 365-370, 1998.
- [55] M. Ibrahim, J. Claudel, D. Kourtiche, et M. Nadi, « Geometric parameters optimization of planar interdigitated electrodes for bioimpedance spectroscopy », *J. Electr. Bioimpedance*, vol. 4, n° 1, p. 13-22, 2013.

Bibliographie

- [56] M. Ibrahim, J. Claudel, D. Kourtiche, B. Assouar, et M. Nadi, « Physical and Electrical Modeling of Interdigitated Electrode Arrays for Bioimpedance Spectroscopy », in *New Developments and Applications in Sensing Technology*, Springer, 2011, p. 169-189.
- [57] Q. Liu, J. Yu, L. Xiao, J. C. O. Tang, Y. Zhang, P. Wang, et M. Yang, « Impedance studies of bio-behavior and chemosensitivity of cancer cells by micro-electrode arrays », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, n° 5, p. 1305-1310, 2009.
- [58] L. Ghenim, H. Kaji, Y. Hoshino, T. Ishibashi, V. Haguet, X. Gidrol, et M. Nishizawa, « Monitoring impedance changes associated with motility and mitosis of a single cell », *Lab. Chip*, vol. 10, n° 19, p. 2546-2550, 2010.
- [59] S. Cho et H. Thielecke, « Micro hole-based cell chip with impedance spectroscopy », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, n° 8, p. 1764-1768, 2007.
- [60] A. Reininger-Mack, H. Thielecke, et A. A. Robitzki, « 3D-biohybrid systems: applications in drug screening », *TRENDS Biotechnol.*, vol. 20, n° 2, p. 56-61, 2002.
- [61] N. Fertig, R. H. Blick, et J. C. Behrends, « Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip », *Biophys. J.*, vol. 82, n° 6, p. 3056-3062, 2002.
- [62] O. Reynolds, « An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. », *Proc. R. Soc. Lond.*, vol. 35, n° 224-226, p. 84-99, 1883.
- [63] K. B. Kim, H. Chun, H. C. Kim, et T. D. Chung, « Red blood cell quantification microfluidic chip using polyelectrolytic gel electrodes », *Electrophoresis*, vol. 30, n° 9, p. 1464-1469, 2009.
- [64] E. Sollier, M. Cubizolles, Y. Fouillet, et J.-L. Achard, « Fast and continuous plasma extraction from whole human blood based on expanding cell-free layer devices », *Biomed. Microdevices*, vol. 12, n° 3, p. 485-497, 2010.
- [65] L. Wang, J. Lu, S. A. Marchenko, E. S. Monuki, L. A. Flanagan, et A. P. Lee, « Dual frequency dielectrophoresis with interdigitated sidewall electrodes for microfluidic flow-through separation of beads and cells », *Electrophoresis*, vol. 30, n° 5, p. 782-791, 2009.
- [66] G. Mernier, N. Piacentini, T. Braschler, N. Demierre, et P. Renaud, « Continuous-flow electrical lysis device with integrated control by dielectrophoretic cell sorting », *Lab. Chip*, vol. 10, n° 16, p. 2077-2082, 2010.
- [67] G. H. Kwon, Y. Y. Choi, J. Y. Park, D. H. Woo, K. B. Lee, J. H. Kim, et S.-H. Lee, « Electrically-driven hydrogel actuators in microfluidic channels: fabrication, characterization, and biological application », *Lab. Chip*, vol. 10, n° 12, p. 1604-1610, 2010.
- [68] H. E. Ayliffe, A. B. Frazier, et R. D. Rabbitt, « Electric impedance spectroscopy using microchannels with integrated metal electrodes », *Microelectromechanical Syst. J.*, vol. 8, n° 1, p. 50-57, 1999.
- [69] H. Thielecke, T. Stieglitz, H. Beutel, T. Matthies, H. H. Ruf, et J.-U. Meyer, « Fast and precise positioning of single cells on planar electrode substrates », *Eng. Med. Biol. Mag. IEEE*, vol. 18, n° 6, p. 48-52, 1999.
- [70] A. Ivorra, R. Gomez, N. Noguera, R. Villa, A. Sola, L. Palacios, G. Hotter, et J. Aguilo, « Minimally invasive silicon probe for electrical impedance measurements in small animals », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, n° 4, p. 391-399, 2003.
- [71] S. Gawad, M. Henschkel, Y. Leung-Ki, R. Iuzzolino, L. Schild, P. Lerch, et P. Renaud, « Fabrication of a microfluidic cell analyzer in a microchannel using impedance spectroscopy », in *Microtechnologies in Medicine and Biology, 1st Annual International Conference On. 2000*, 2000, p. 297-301.

Bibliographie

- [72] S. Gawad, S. Metz, L. Schild, et P. Renaud, « Impedance spectroscopy cell analysis in microchannels », in *Micro Total Analysis Systems 2001*, 2001, p. 253-255.
- [73] S. Gawad, L. Schild, et P. Renaud, « Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing », *Lab. Chip*, vol. 1, n° 1, p. 76-82, 2001.
- [74] H. Chun, T. D. Chung, et H. C. Kim, « Cytometry and velocimetry on a microfluidic chip using polyelectrolytic salt bridges », *Anal. Chem.*, vol. 77, n° 8, p. 2490-2495, 2005.
- [75] K. Cheung, S. Gawad, et P. Renaud, « Impedance spectroscopy flow cytometry: On-chip label-free cell differentiation », *Cytometry A*, vol. 65, n° 2, p. 124-132, 2005.
- [76] A. Qi, L. Yeo, J. Friend, et J. Ho, « The extraction of liquid, protein molecules and yeast cells from paper through surface acoustic wave atomization », *Lab. Chip*, vol. 10, n° 4, p. 470-476, 2010.
- [77] R. Shilton, M. K. Tan, L. Y. Yeo, et J. R. Friend, « Particle concentration and mixing in microdrops driven by focused surface acoustic waves », *J. Appl. Phys.*, vol. 104, n° 1, p. 014910-014910-9, 2008.
- [78] D. Beyssen, L. Le Brizoual, O. Elmazria, et P. Alnot, « Microfluidic device based on surface acoustic wave », *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 118, n° 1, p. 380-385, 2006.
- [79] D. Fukuoka et Y. Utsumi, « Fabrication of the cyclical fluid channel using the surface acoustic wave actuator and continuous fluid pumping in the cyclical fluid channel », *Microsyst. Technol.*, vol. 14, n° 9-11, p. 1395-1398, 2008.
- [80] J. Shi, H. Huang, Z. Stratton, Y. Huang, et T. J. Huang, « Continuous particle separation in a microfluidic channel via standing surface acoustic waves (SSAW) », *Lab Chip*, vol. 9, n° 23, p. 3354-3359, 2009.
- [81] T. Franke, A. R. Abate, D. A. Weitz, et A. Wixforth, « Surface acoustic wave (SAW) directed droplet flow in microfluidics for PDMS devices », *Lab. Chip*, vol. 9, n° 18, p. 2625-2627, 2009.
- [82] J. Shi, X. Mao, D. Ahmed, A. Colletti, et T. J. Huang, « Focusing microparticles in a microfluidic channel with standing surface acoustic waves (SSAW) », *Lab Chip*, vol. 8, n° 2, p. 221-223, 2008.
- [83] H. Morgan, T. Sun, D. Holmes, S. Gawad, et N. G. Green, « Single cell dielectric spectroscopy », *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 40, n° 1, p. 61, 2007.

Bibliographie

Liste des Publications et Communications

Articles de revues

- [1] M. Ibrahim, J. Claudel, D. Kourtiche, et M. Nadi, « Geometric parameters optimization of planar interdigitated electrodes for bioimpedance spectroscopy », *J. Electr. Bioimpedance*, vol. 4, n° 1, p. 13-22, 2013.
- [2] M. Ibrahim, J. Claudel, D. Kourtiche, B. Assouar, et M. Nadi, « Physical and Electrical Modeling of Interdigitated Electrode Arrays for Bioimpedance Spectroscopy », in *New Developments and Applications in Sensing Technology*, vol. 83, S. Mukhopadhyay, A. Lay-Ekuakille, et A. Fuchs, Éd. Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 169-189.

Articles de conférences

- [3] J. Claudel, M. Ibrahim, H. Shirzadfar, M. Nadi, O. Elmazria, et D. Kourtiche, « Hybrid microfluidic biosensor for single cell flow impedance spectroscopy: theoretical approach and first validations », in *XIII Mediterranean Conference on medical and biological engineering and computing (MEDICON)*, 2013.
- [4] H. Shirzadfar, J. Claudel, M. Nadi, D. Kourtiche et S. Yamada, « Analysis Sensitivity by Novel Needle-Type GMR Sensor Used in Biomedical Investigation », in *XIII Mediterranean Conference on medical and biological engineering and computing (MEDICON)*, 2013.
- [5] M. Ibrahim, J. Claudel, D. Kourtiche, M. Nadi, et F. Montaigne, « Optimization of an Interdigitated Electrodes Array Used in Bioimpedance Spectroscopy », in *5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering*, vol. 37, Á. Jobbágy, Éd. Springer Berlin Heidelberg, 2012, p. 1279-1282.
- [6] M. Ibrahim, J. Claudel, D. Kourtiche, M. Nadi, F. Montaigne, et G. Lengaigne, « Optimization of planar interdigitated electrode array for bioimpedance spectroscopy restriction of the number of electrodes », in *Fifth International Conference on Sensing Technology (ICST)*, 2011, p. 612-616.

Communications sans actes

- [7] J. Claudel, M. Ibrahim, M. Nadi, O. Elmazria, et D. Kourtiche, « Biocapteur hybride pour la spectroscopie d'impédance cellulaire », 8^{ème} journées Maghreb-Europe, Matériaux et Applications aux Dispositifs et Capteurs, MADICA, Sousse, Tunisie, 2012.
- [8] J. Claudel, M. Nadi, O. Elmazria, et D. Kourtiche, « Blood cell diagnosis using an hybrid sensor combining Electrical bio-impedance spectroscopy and fluidic microsystem », journées GDR Micro-Nano-Fluidique Lyon, 2011.

Communications pédagogiques

- [9] J. Claudel, M. Nadi, O. Elmazria, « Bio-impedance single cell measurement using microfluidic hybrid device », Docscilor 2013.
- [10] J. Claudel, M. Nadi, O. Elmazria, et D. Kourtiche, « Blood cell diagnosis using an hybrid sensor combining Electrical bio-impedance spectroscopy and fluidic microsystem », Docscilor 2011, Villers-lès-Nancy, France, 2011.

ANNEXE 2: Technologies de micro-nano-fabrications

1. Problématique.

Les mesures macroscopiques, permettent d'effectuer une multitude de mesures et caractérisations d'échantillons biologiques. Les applications sont nombreuses, en particulier dans le domaine du diagnostic. Cependant, leur champ d'action est limité par les dimensions même des dispositifs utilisés. Il est ainsi impossible de déterminer les propriétés d'un petit groupe de cellules, ou même d'une seule dans la mesure d'un échantillon en contenant des millions. Si l'on prend comme exemple le sang, l'effet des globules blancs, représentant environ 0,15% des cellules en nombre, soit environ 1% en rapport volumique, est négligeable devant celui du plasma et des globules rouges. De même, un échantillon ne peut être détecté comme infecté ou anormal, que si un pourcentage suffisant des cellules le composant est déjà atteint. Or, certaines pathologies peuvent déjà être symptomatiques à des stades très peu avancés en termes de nombre de cellules infectées, ou pourraient être détectées de façon très précoce si un pourcentage faible de cellules infectées pouvait être décelé. C'est pourquoi de nombreuses études actuelles se focalisent sur la caractérisation unitaire ou de petit agrégat de cellules, soit la mesure d'échantillon microscopique ou semi-microscopique. Cependant pour effectuer des mesures à de tels niveaux, les capteurs utilisés doivent eux aussi être de dimensions similaires. Les scientifiques se sont donc inspirés des technologies de micro fabrication créées à l'origine pour la miniaturisation de composants électroniques, pour la réalisation de micro-dispositifs et micro-actionneurs pour manipuler et mesurer des microéchantillons.

2. Principe de base.

Le principe de base de l'élaboration de microsystèmes consiste à construire une structure à trois dimensions par empilements successifs de couches de matière. Pour cela on démarre en général d'une surface de base sur laquelle différents matériaux vont être déposés, retirés ou modifiés afin d'obtenir une structure finale fonctionnelle. Celle-ci peut être d'une grande complexité et formée de plusieurs dizaines de matériaux et couches différentes. Un exemple de base, celui de la réalisation d'un transistor CMOS est illustré en Figure A1-1. Ces différentes étapes sont la plupart du temps réalisées dans des salles blanches. L'air y est filtré pour éviter les le dépôt de poussières parasites sur les échantillons, et climatisé pour conserver des températures et humidités de travail constantes, nécessaires à une bonne reproductibilité.

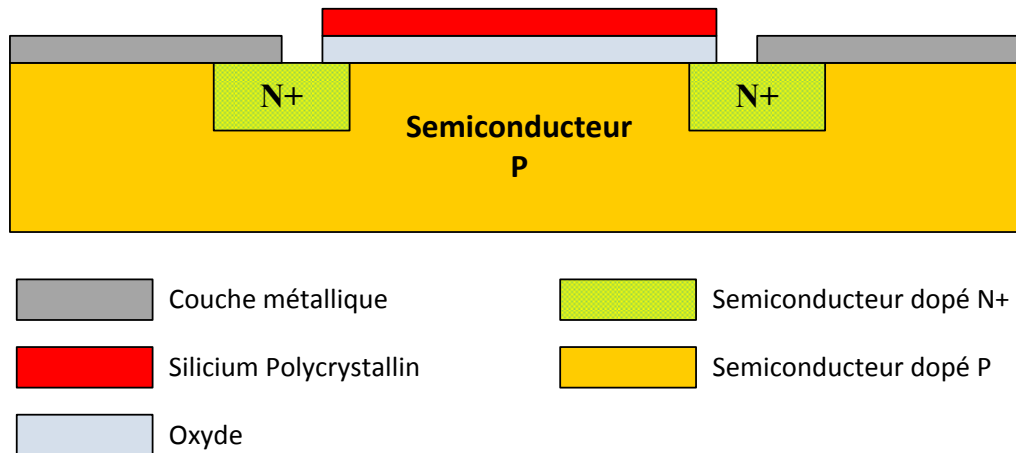


Figure A1-1 Vue en coupe d'un transistor MOS, réalisé par couches successives de différents matériaux. On retrouve en outre des couche de silicium modifiés (dopé N et P), des couches isolante en oxyde de silicium et des couches d'aluminium et polysilicium conductrices.

3. Méthodes de dépôts.

Afin de réaliser ces structures, il est nécessaire de pouvoir déposer des couches de divers matériaux de façon la plus homogène possible et d'épaisseurs contrôlées. Il existe différentes techniques de dépôt possibles, avec en particulier les dépôts par évaporation, par pulvérisation cathodique, par dépôt chimique en phase vapeur ou enrésinement.

Dépôt par évaporation sous vide :

Cette technique consiste à déposer les matériaux voulus par condensation de vapeur sur la surface de l'échantillon. Pour ce faire, le matériau à déposer, ainsi que l'échantillon sont placés dans une enceinte sous vide poussé ou ultravide, afin d'éviter que des particules en suspension ne viennent se déposer à la surface à la place du matériau désiré. Celui-ci est chauffé jusqu'à évaporation, et les vapeurs viennent ensuite se déposer sur la surface de l'échantillon, plus froides. Les matériaux peuvent être chauffés de différentes manières :

- Par effet Joule en chauffant un creuset par une résistance électrique, ou en chauffant un filament fabriqué avec ce matériau.
- Par application d'un faisceau d'électron.
- Par induction avec un creuset ferromagnétique ou par chauffage direct des matériaux si celui-ci l'est aussi.

- Par arc électrique.

L'épaisseur obtenue est fonction du temps d'évaporation et peut ainsi être contrôlée. Différents types de matériaux peuvent ainsi être déposés, à condition de pouvoir les évaporer. Les métaux sont les principaux matériaux utilisés. Des gaz de procès peuvent aussi être injectés pour créer d'autres espèces, telles que l'oxygène pour la formation d'oxydes, ou l'évaporation de plusieurs matériaux en même temps pour la réalisation d'alliages et de matériaux composites.

Dépôt par pulvérisation cathodique :

Cette technique de dépôt est elle aussi réalisée dans un réacteur sous un vide poussé, pour les mêmes raisons que précédemment. Un gaz inerte, tel que l'argon est injecté pour créer un plasma froid après application d'une différence de potentiel entre la cible, formée du matériau à déposer, et les parois du réacteur. Les espèces positives, (ions argon Ag^+ dans le cas d'utilisation du gaz argon) sont ensuite accélérées vers la cible sous tension par création d'un champ électrique, et entrent en collision avec elle. Elles provoquent la pulvérisation des atomes présents en surface sous forme de particules neutres, qui viendront se condenser sur le substrat. Là encore, l'épaisseur du dépôt peut être contrôlée par le temps de pulvérisation. C'est une technique assez rapide, peu sujette à la pollution par d'autres espèces, qui donne des films avec exactement la même composition que la cible utilisée. Des gaz de procès peuvent aussi être ajoutés, comme par exemple de l'oxygène, pour créer de l'oxyde de silicium à partir d'une cible silicium.

Dépôt chimique en phase vapeur :

Cette technique de dépôt n'utilise pas, contrairement aux deux autres, des matériaux massifs, mais des précurseurs gazeux. L'échantillon, toujours présent dans un réacteur, est chauffé à haute température, puis plusieurs précurseurs gazeux sont injectés dans l'enceinte. Ceux-ci régissent et/ou se décomposent à la surface de l'échantillon, créant ainsi le dépôt désiré. Cette technique permet l'élaboration de couches d'une très grande pureté, et le dépôt de matériaux sous différentes formes: amorphes, polycristallines, monocristallines, épitaxiées, etc..., mais ne permet d'utiliser que des substrats ayant une bonne résistance aux températures élevées.

Techniques de dépôt hybrides :

Il existe aussi des techniques de dépôt hybride, reprenant plusieurs des techniques précédentes ou présentant quelques modifications, afin d'optimiser certains dépôts. On trouvera notamment :

- L'évaporation assistée par plasma, qui améliore l'adhérence du substrat.
- La pulvérisation par faisceau d'ions, qui utilise un canon à ions, permettant de contrôler indépendamment l'énergie et le flux d'ions, contrairement à la technique par création de plasma.
- L'évaporation assistée par faisceau d'ions, qui présente les avantages décrits précédemment.

Dépôt de résine :

Certaines couches peuvent aussi être réalisées en résines. Il s'agit en général de polymères dissous dans un solvant. Cette résine liquide est déposée sur l'échantillon puis étalée par centrifugation, à l'aide d'une tournette. La résine est ensuite évaporée à température ambiante, ou en chauffant l'échantillon, jusqu'à évaporation du solvant. L'épaisseur de résine dépend de sa viscosité, d'une constante propre à la tournette utilisée et de la vitesse de rotation utilisée. Pour une résine et une tournette donnée, l'épaisseur obtenue est inversement proportionnelle au carré de la vitesse de rotation. Il est possible de déposer des couches de résines avec des épaisseurs précises très variées (quelques centaines de nm à quelques centaines de μm), en jouant sur sa viscosité (proportion de solvant) et la vitesse de rotation. Ces résines peuvent servir de couche utile, mais sont le plus souvent utilisées comme couche provisoire pour la structuration d'autre couche (cf partie 0).

4. Techniques de structuration.

Les dépôts cités précédemment permettent d'obtenir des couches précises de différents matériaux, de façon la plus homogène possible sur toute la surface possible. Il reste cependant à structurer cette couche afin de lui donner sa forme utile finale. Pour ce faire, il existe 4 grandes techniques permettant de réaliser cela :

- Par suppression des zones non utiles (gravure).

- Par ajout de matière uniquement sur des zones ciblées de l'échantillon (lift off).
- Par action mécanique (matriçage).
- Par moulage.

Chacune de ces techniques nécessite une étape préalable : la lithographie. Celle-ci va permettre de réaliser une couche provisoire de résine structurée, qui laissera libre ou non certaines zones de l'échantillon accessible pour être gravées, réaliser un moule, etc...

La lithographie:

Il existe deux sortes de résines, les résines de lithographie optique (photosensible), qui réagissent avec la lumière (en général les ultraviolets) et les résines de lithographie électroniques, sensible au bombardement d'électrons. Elles sont composées de trois phases, un polymère, un élément actif (aux photons ou aux électrons), et un solvant. Lorsque la résine est exposée à la source d'énergie adéquate, l'élément actif provoque soit la formation d'une chaîne de polymères de plus grande dimension dans le cas d'une résine négative, soit d'une de plus faible dimensions dans le cas d'une résine positive. Les grandes chaînes de polymère étant plus résistantes au solvant, il suffit ensuite de passer l'échantillon dans un solvant pour supprimer les surfaces de résines non désirées. Dans le cas d'une lithographie optique, un masque avec des motifs de structure en chrome vient masquer les zones à ne pas exposer. Pour une lithographie électronique, l'exposition est effectuée par balayage d'un faisceau d'ions sur la surface de la résine. Les étapes classiques d'une lithographie sont illustrées en Figure A1-2.

Dans certain cas, un recuit après exposition est nécessaire pour activer la réaction enclenchée par l'exposition, qui peut être très lente à température ambiante. Un dernier recuit, plus fort, peut aussi être nécessaire pour stabiliser la résine après le développement.

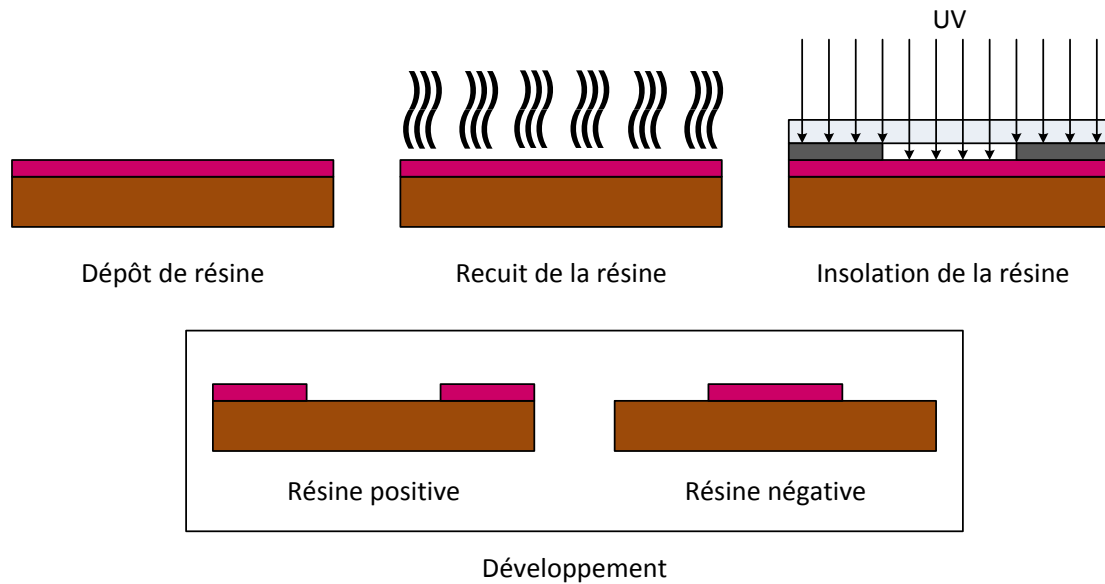


Figure A1-2 Principales étapes d'une lithographie optique.

La lithographie électronique, réalisée à l'aide de microscope électronique à balayage, est très lente et coûteuse mais possède une très grande résolution (de l'ordre de quelques nm). Elle est donc principalement réservée à la recherche, à la fabrication de prototypes ou des masques de lithographie optique. Cette dernière possède une résolution moindre, mais est beaucoup plus rapide et moins coûteuse (après fabrication des masques). Elle est donc utilisée pour la fabrication en série.

Structuration par gravure :

Ce type de structuration consiste à déposer dans un premier temps la couche de matériaux, puis d'effectuer une étape de lithographie avec une résine. La résine se trouve présente dans les zones où le matériau doit être conservé. On vient ensuite graver le matériau au niveau des zones vides de résine, puis supprimer la résine, comme illustré en Figure A1-3. Il existe deux grands types de gravures : la gravure humide et la gravure sèche :

- La gravure humide s'effectue par réaction avec des solutions chimiques : réaction de type acide-base, oxydo-réduction ou dissolution dans un solvant. Cette gravure est en générale isotrope (gravure dans toutes les directions) comme illustré en Figure A1-4, et facile à mettre en œuvre. Elle peut toutefois être anisotrope, dans les cas de gravure de matériaux cristallins, ou la vitesse de gravure n'est pas la même dans toutes les directions. Le choix de la résine et de la solution de gravure seront généralement

choisis de façon à ce que la gravure soit sélective. C'est-à-dire qu'elle ne réagisse que peu ou pas avec la résine de lithographie et la couche inférieure.

- La gravure sèche s'effectue par pulvérisation de la surface de l'échantillon. Il s'agit d'une gravure physique anisotrope (Figure A1-4) et non sélective. L'épaisseur de résine de lithographie devra donc être déposée en quantité suffisante pour subsister jusqu'à la gravure complète des matériaux, et la fin de la gravure devra pouvoir être détectée ou calculée de façon à ne pas graver la couche inférieure. Cette gravure est plus coûteuse, plus difficile à mettre en œuvre et nécessite des équipements souvent onéreux. Ses principaux intérêts sont l'anisotropie et la possibilité de graver toute sorte de matériaux ou presque.

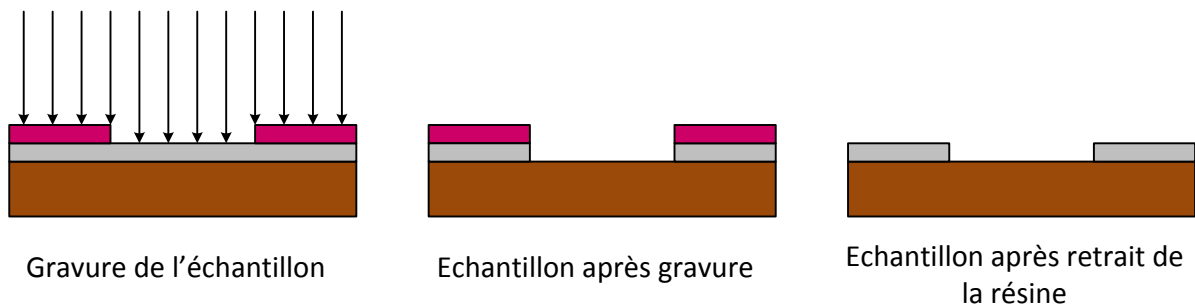


Figure A1-3 Gravure d'un échantillon.

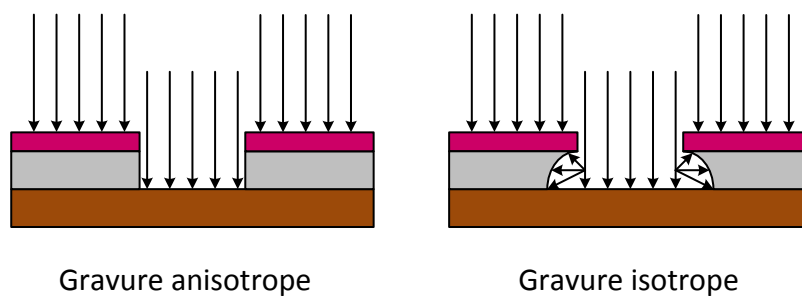


Figure A1-4 Représentations schématiques d'une gravure isotrope et d'une gravure anisotrope.

Structuration par ajout de matière.

Cette fois-ci, le motif en résine est réalisé en premier. Le matériau est ensuite déposé par évaporation ou pulvérisation cathodique, par exemple. Le matériau vient se déposer d'une part sur l'échantillon, dans les zones non protégées, et d'autre part sur la résine, comme illustré en Figure A1-5.

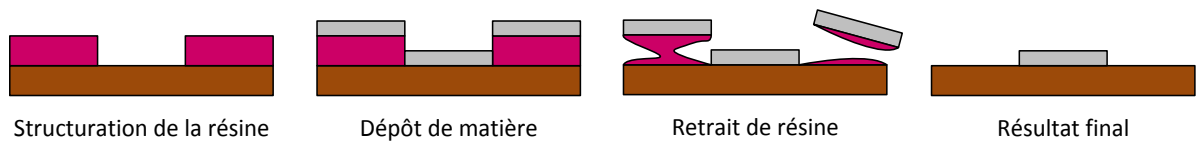


Figure A1-5 Etapes de structuration par dépôt ciblé de matière.

La résine est supprimée à l'aide d'un solvant, conservant seulement la structure désirée. Cette méthode permet d'être sûr de ne pas graver la couche inférieure, et utilise de simples solvants. Cependant des dépôts risquent de se former sur les parois verticales de la résine, rendant impossible son retrait. Les zones de grandes surfaces de résine peuvent être difficiles à supprimer, sans compter les risques de re-déposition des débris de matériaux générés.

Structuration par matriçage.

Cette technique s'utilise principalement sur des matériaux déformables tels que les polymères. La structure est réalisée par plaquage avec pression, et éventuellement chauffage, d'une matrice comportant le négatif du motif à réaliser directement sur l'échantillon. L'échantillon est ensuite détaché de la matrice pour obtenir le motif final, illustré en Figure A1-6. La matrice est réalisée en matériaux résistants, par gravure sur métal ou verre par exemple.

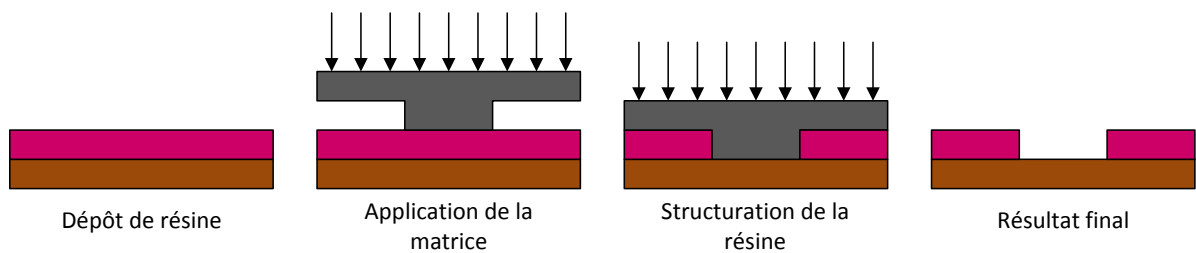


Figure A1-6 Etapes de structuration par matriçage.

Structuration par moulage.

Il s'agit d'une technique proche de celle du matriçage. Sauf que cette fois le matériau doit être déposé en phase liquide dans le moule, puis solidifié avant démoulage. Les matériaux de type résine siliconée, obtenue par mélange d'une résine et d'un durcisseur, sont souvent utilisés. Les moules utilisés peuvent être réalisés en matériaux dur comme

précédemment, ou simplement par structuration d'une résine de lithographie, comme dans le cas présenté en Figure A1-7.

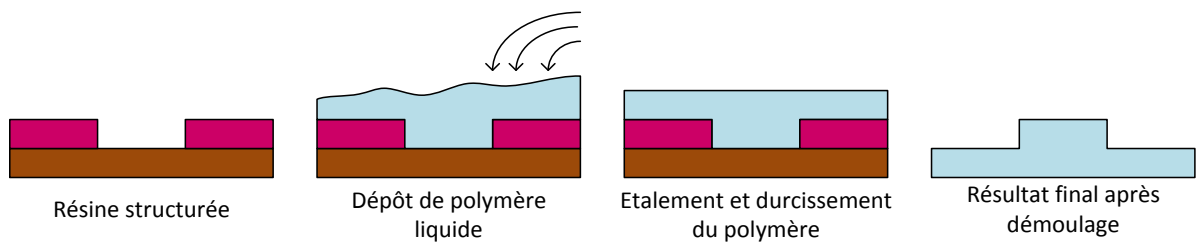


Figure A1-7 Etapes de structuration par moulage.

ANNEXE 3 : Equations trigonométriques du principe de mesure « Lock-in »

Equations des deux signaux internes :

$$V_{int_1} = A \sin(\omega t)$$

$$V_{int_2} = A \sin\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right)$$

Equations du signal mesuré :

$$V_{in} = AG \sin(\omega t + \phi) + b(t)$$

Avec **G** le gain du système (et des éventuels amplificateurs en entrées et sorties), ϕ le déphasage par rapport au signal interne V_{int_1} , et $b(t)$ les bruits et perturbations.

Calcul réalisé en multipliant V_{int_1} et V_{in} :

$$A \sin(\omega t) \cdot [AG \sin(\omega t + \phi) + b(t)]$$

$$\frac{A^2 G}{2} [\cos(\omega t - \omega t + \phi) - \cos(2\omega t + \phi)] + A \sin(\omega t) \cdot b(t)$$

$$\frac{A^2 G}{2} \cos(\phi) - \frac{A^2 G}{2} \cos(2\omega t + \phi) + A \sin(\omega t) \cdot b(t)$$

On obtient un signal avec une composante continue $\frac{A^2 G}{2} \cos(\phi)$.

L'amplitude de la partie réelle du signal est déterminée après filtrage passe bas et division par $A/2$: $\text{Re}(V_{in}) = AG \cos(\phi)$.

Calcul réalisé en multipliant V_{int_1} et V_{in} :

ANNEXE 3 : Equations trigonométriques du principe de mesure « Lock-in »

$$\begin{aligned}
 & A \sin\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right) \cdot [AB \sin(\omega t + \phi) + b(t)] \\
 & \frac{A^2 B}{2} \left[\cos(\omega t - \omega t + \phi + \frac{\pi}{2}) - \cos(2\omega t + \phi + \frac{\pi}{2}) \right] + A \sin\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right) \cdot b(t) \\
 & \frac{A^2 B}{2} \cos\left(\phi + \frac{\pi}{2}\right) - \frac{A^2 B}{2} \cos(2\omega t + \phi + \frac{\pi}{2}) + A \sin\left(\omega t + \frac{\pi}{2}\right) \cdot b(t) \\
 & - \frac{A^2 B}{2} \sin(\phi) + \frac{A^2 B}{2} \sin(2\omega t + \phi) + A \cos(\omega t) \cdot b(t)
 \end{aligned}$$

On obtient un signal avec une composante continue - $\frac{A^2 G}{2} \sin(\phi)$.

L'amplitude de la partie imaginaire du signal est déterminée après filtrage passe bas et division par $-A/2$: $\text{Im}(\mathbf{V}_{in}) = AG \cos(\phi)$.

On obtient directement par cette méthode les modules des parties réelles et imaginaires correspondant à la composante du signal de mesure de même fréquence que celle des signaux internes. Les composantes des perturbations ayant une fréquence différente de celle du signal d'excitation sont ainsi supprimées.

ANNEXE 4 : Informations complémentaires du HF2IS

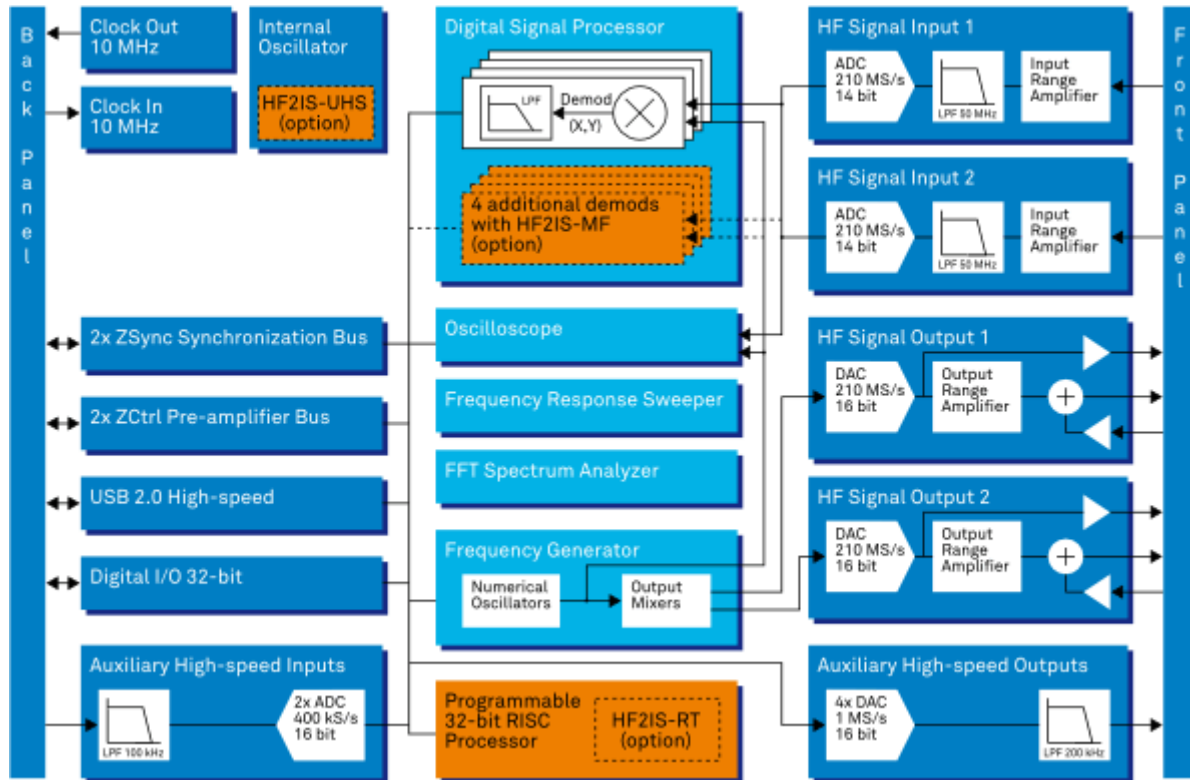


Schéma de principe du fonctionnement interne de l'appareil HF2IS

Caractéristiques techniques données par le constructeur :

HF Analog Input

analog bandwidth	1 μ Hz - 50 MHz
input impedance	50 Ω or 1 M Ω 20 pF
input noise voltage	5 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$ above 10 kHz
impedance range	100 m Ω - 10 G Ω
input range	± 3.3 V
input AC range	± 1.5 V (with DC coupling)
A/D conversion	14 bit, 210 MS/s

HF Analog Output

analog bandwidth	DC - 50 MHz
operating ranges	± 10 mV, ± 100 mV, ± 1 V, ± 10 V
signal adder	± 10 V, DC - 50 MHz bandwidth
output range	100 mA (max, 50 Ω output)
D/A conversion	16 bit, 210 MS/s

Demodulator & Reference

number of demodulators	4 dual-phase (8 with HF2IS-MF option)
output sample rate	on USB: up to 460 kS/s on Auxiliary outputs: 1 MS/s
filter time constant	1 μ s - 500 s
filter bandwidth	80 μ Hz - 220 kHz
filter slope	6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 dB/Oct
X, Y, R, Theta	64-bit full range
reference frequency	0.7 μ Hz
resolution	
reference phase angle	1.0 μ°
resolution	

Auxiliary Signals

high-speed outputs	4 channels, ± 10 V, amplitude, phase, frequency, X/Y, or user defined
D/A converter	16 bit, 1 MS/s
D/A analog bandwidth	200 kHz
high-speed inputs	2 channels, ± 10 V
A/D converter	16 bit, 400 kS/s
A/D analog bandwidth	100 kHz

Other Interfaces

host connection	USB 2.0 high-speed, 480 Mbit/s
pre-amplifier control bus	ZCtrl proprietary bus to control external pre-amplifiers
synchronization bus	ZSync proprietary bus to locally interconnect ZI instruments
digital I/O	32 bit, general purpose

General

dimensions	45 x 35 x 10 cm (19" rack)
weight	6.2 kg
power supply	110-120 V, 220-240 V, 50/60 Hz
operating temperature	+5 $^\circ$ C to +40 $^\circ$ C
internal oscillator output	sine, ± 1 V, 10 MHz
internal oscillator stability	30 ppm, check for HF2IS-UHS Ultra-high Stability option
PC operating systems	32-bit and 64-bit version of Windows XP, Vista, Windows 7, Linux

ANNEXE 5 : Caractéristiques techniques du HF2TA.

Frequency Response

frequency range (3 dB cut-off)	DC - 50 MHz (depends on R1,R2 settings)
frequency range with AC coupling	10 Hz - 50 MHz (depends on R1,R2 settings)
small signal bandwidth (0.1 V _{pp})	50 MHz
large signal bandwidth (1 V _{pp})	40 MHz

Input

input current range	1 nA - 10 mA (depends on R1,R2,G1,G2 settings)
input noise current	50 fA - 150 pA (depends on R1,R2,G1,G2 settings)
input noise voltage (10 kHz)	5 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$
input offset adjustment range	± 10 mV
input current leakage (typical)	2 pA
input impedance (DC, Z // 15 pF)	50 Ω - 70 k Ω
input bias voltage range	± 10 V

Gain

transimpedance gain (R1,R2)	100 V/A - 100 MV/A
gain accuracy	$\pm 1\%$
output voltage gain (G1,G2)	G=1 or G=10

Auxiliary Output

typical use	bias for external sensor (ex: photodetectors)
voltage range	± 10 V
maximum current drive	10 mA

Spectroscopie d'impédance électrique par bio-biocapteur à micro-électrodes: Application à la cytométrie de flux de cellules sanguines

Ce travail de thèse porte sur la réalisation et la validation d'un capteur pour la mesure d'impédance en cytométrie de flux associée à un dispositif microfluidique pour des cellules sanguines dans la gamme de fréquences (100 kHz-10 MHz).

Un premier chapitre introduit les propriétés électriques et diélectriques des tissus vivants. Les effets de chaque élément des cellules sur l'impédance globale mesurée sont décrits, ainsi que les modèles associés.

Un état de l'art, sur les mesures de l'échelle macroscopique à la mesure unitaire de cellules, est exposé dans le second chapitre. Les mesures en cytométrie de flux et l'utilisation possible des actionneurs à ondes acoustiques de surface (SAW) y sont aussi étudiées.

Le troisième chapitre concerne la modélisation analytique et la simulation par la méthode des éléments finis de cellules unitaires par des microélectrodes de différentes géométries. Les résultats de cette section ont permis de déterminer les meilleures géométries, leurs sensibilités, et leurs réponses.

La fabrication du capteur est étudiée dans le quatrième chapitre. Les contraintes liées à la faisabilité par les techniques de micro-fabrication et la biocompatibilité des matériaux y sont développées. Des premiers tests de validation sur les écoulements y sont effectués.

Le cinquième et dernier chapitre est centré sur la mesure de cellules et particules. Dans un premier temps, des tests de calibration ont été réalisés pour déterminer le facteur de forme des électrodes et les impédances parasites. Les mesures sur des cellules et particules ont permis de valider les résultats obtenus en simulation, ainsi que la discrimination des particules testées en fonction de leurs dimensions.

L'intérêt de ce type de biocapteur est discuté en conclusion.

Mots clefs : Spectroscopie d'impédance, bio-capteurs, cellules unitaires, microfluidique.

Electric impedance spectroscopy by bio-sensor using micro-electrodes: Application to blood cells flow cytometry.

This thesis focuses on the implementation and validation of a microfluidic bioimpedance sensor for cytometric measures in the frequency range (100kHz - 10MHz) of biological cells (blood cells) combined with a microfluidic device.

The first chapter introduces the electrical and dielectric properties of living tissues and summarizes the state of the art. The effects of each element of the cells on the overall measured impedance are described, as well as the associated models.

A state of the art, on the bioimpedance macroscopic measurements unit cell is outlined in the second chapter. Measurements by flow cytometry and the possible use of surface acoustic wave (SAW) devices as actuators are also studied.

The third chapter deals with analytical modeling and simulation by the finite element method of unit cells by microelectrodes of different geometries. 3D simulations were done showing the best configuration for the electrodes design. The results of this section were used to determine the best geometry, their sensibilities, and their answers.

The sensor design is described in the fourth chapter. Technological constraints related to its micro-fabrication techniques feasibility and biocompatibility of materials are developed. Flows validation tests were done and are described.

The fifth and final chapter focuses on the measurement of cells and particles. In a first step, calibration tests were carried out to determine the form factor of the electrodes and the parasitic impedances. Measurements on cells and particles were used to validate the results obtained in simulation, as well as discrimination based particles tested their dimensions.

The advantage of this type of biosensor is discussed in conclusion.

Keywords: Impedance spectroscopy, bio-sensors, single cells, microfluidic.