



HAL
open science

Conception et réalisation d'un biocapteur à matrice d'électrodes pour la caractérisation de milieux biologiques par spectroscopie d'impédance

Arthur Luiz Alves de Araujo

► To cite this version:

Arthur Luiz Alves de Araujo. Conception et réalisation d'un biocapteur à matrice d'électrodes pour la caractérisation de milieux biologiques par spectroscopie d'impédance. Electronique. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0005 . tel-02555956

HAL Id: tel-02555956

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02555956v1>

Submitted on 27 Apr 2020

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>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

*Ecole Doctorale IAEM (Informatique, automatique,
électronique-électrotechnique et mathématiques)*

*Département de formation doctorale Electronique-
Electrotechnique*

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : *Systèmes électroniques*

par **Arthur Luiz ALVES DE ARAUJO**

Conception et réalisation d'un biocapteur à matrice d'électrodes pour la caractérisation de milieux biologiques par spectroscopie d'impédance

Thèse soutenue publiquement le 17 décembre 2019 à Nancy devant le jury composé de :

Vincent Senez	Directeur de recherche CNRS, IEMN Lille	Rapporteur
Rosaria Ferrigno	Professeure, Université de Lyon	Rapporteur
Sylvie Renaud	Professeure, INP Bordeaux	Examinatrice
Djilali Kourtiche	Professeur, Université de Lorraine	Examineur
Mustapha Nadi	Professeur, Université de Lorraine	Directeur de thèse
Julien Claudel	Maitre de Conférences, Université de Lorraine	Co-directeur de thèse

Je dédie ce manuscrit

à mon père Luiz Porfirio et ma mère Aurenny de Araujo

à ma sœur Ana Luiza

à ma femme Cybelle Belem

Remerciements

Je remercie Madame Rosaria FERRIGNO, professeure à l'Université de Lyon et Monsieur Vincent SENEZ, directeur de recherche CNRS à l'IEMN Lille, pour l'honneur qu'ils me font en ayant accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Madame Sylvie RENAUD, professeure à l'INP Bordeaux, d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury de soutenance.

J'exprime ma plus vive reconnaissance à Monsieur Julien CLAUDEL, Maître de Conférences à l'Université de Lorraine qui a co-dirigé ce travail. Je tiens à le remercier pour ses explications toujours bien pédagogiques, pour les discussions techniques et scientifiques et pour sa disponibilité, que ce soit professionnel ou personnel, 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 ce travail de thèse et m'a accueilli au sein de l'équipe Architectures et Systèmes Electroniques. Je tiens à le remercier pour sa confiance, ses recommandations et critiques constructives et son support à la mise en place des expériences présentées dans ce manuscrit, que ce soit de façon administrative ou matérielle.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Djilali KOURTICHE, Professeur à l'Université de Lorraine, qui a accepté d'examiner ce travail comme membre du jury. Je tiens à le remercier pour son suivi avec attention de mon travail de thèse et pour les discussions techniques et scientifiques.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire : les techniciens, chercheurs et administratifs qui m'ont aidé et accompagné durant ce travail. Je remercie particulièrement Monsieur Patrice ROTH pour les discussions techniques et pour ses blagues motivationnelles et Madame Christine DAUDENS pour sa compétence et agilité dans la partie administrative.

Je remercie vivement mes collègues du centre de compétence MiNaLor, et en particulier Madame Gwladys LENGAGNE, ingénieur d'étude, et Monsieur Laurent BADIE, ingénieur d'étude, d'avoir très précieusement contribué à la réussite de ce travail par ses formations et conseils de qualité.

Je tiens ensuite à remercier tous les doctorants de l'équipe dont j'ai pu avoir de bonnes discussions : Benjamin VIDALES, Edwin CALDERON, Duc VU, Cihan GERCEK, Saima

SIOUANE, Ayoub BOURJILAT, Mohamed ZIDANE, Zahra DOUMANDJI, Rabiaa LACHTAR.

Je tiens à remercier les amis Franck, avec qui j'ai partagé de bons moments de détente, et Pep avec qui j'ai eu l'opportunité de faire une colocation et partager de manière quotidienne les doutes et les joies de nos thèses, les repas et les moments de détente.

Je remercie énormément à ma famille en France Thais et Tulio pour ses conseils, encouragements et moments de détente. Je remercie aussi Vanuza d'avoir proposé plusieurs discussions et débats constructifs.

Je non seulement dédie, mais remercie également mes parents, ma sœur et ma belle femme d'avoir su m'apporter réconfort et soutien dans les moments difficiles tout au long de ma vie et de mes études sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui. Je remercie spécialement ma femme avec qui j'ai discuté et j'ai partagé les doutes et les joies de nos thèses et que même en habitant dans une ville différente et en préparant une thèse aussi elle a su me comprendre et me supporter avec patience et amour.

Table des matières

Conception et réalisation d'un biocapteur à matrice d'électrodes pour la caractérisation de milieux biologiques par spectroscopie d'impédance	I
Table des matières.....	I
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux.....	X
Notation mathématique.....	XI
Introduction générale	1
Chapitre 1 : Caractérisation de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance – fondements et l'état de l'art	5
1.1. Introduction.....	6
1.2. Propriétés électriques et diélectriques des milieux biologiques	7
1.2.1. Moment dipolaire.....	7
1.2.2. Formation d'une solution électrolytique.....	7
1.2.3. Conductivité ionique	8
1.2.4. Polarisation d'un matériau et relaxation diélectrique	9
1.2.5. Notion de double couche	11
1.2.6. Caractérisation électromagnétique des tissus biologiques.....	12
1.2.7. Le modèle de Debye	13
1.2.8. Le modèle de Cole-Cole	14
1.2.9. Le modèle de Fricke.....	15
1.3. Spectroscopie d'Impédance d'échantillon biologique	15
1.3.1. Définition de spectroscopie d'impédance.....	15
1.3.2. Méthodes de mesure	17

1.3.3. Maîtrise des paramètres d'influence sur la mesure	20
1.4. Rappels de microfluidique	21
1.5. Biocapteurs avec microélectrodes.....	24
1.5.1. Biocapteur à microélectrodes parallèles	27
1.5.2. Biocapteurs à microélectrodes interdigitées	28
1.5.3. Biocapteurs à microélectrodes coplanaires	29
1.5.4. Biocapteurs à matrice de microélectrodes	31
1.5.5. Optimisations des capteurs à microélectrodes	33
1.6. Conclusion	34
Chapitre 2 : Modélisation analytique et numérique d'un biocapteur à électrodes coplanaires	36
2.1. Introduction.....	37
2.2. Choix de la structure des électrodes.....	39
2.3. Modélisation électrique d'une cellule entre deux électrodes sans pistes de connexion.....	39
2.4. Choix de la géométrie des électrodes.....	41
2.4.1. Variation d'impédance normalisée	43
2.4.2. Bande passante.....	44
2.5. Structure du capteur	45
2.6. Modèle électrique du capteur à électrodes coplanaires.....	46
2.6.1. Variation d'impédance normalisée	50
2.6.2. Fréquences de coupure.....	51
2.7. Simulations du capteur.....	58
2.7.1. Détermination du facteur de forme	58
2.7.2. Analyse de la variation d'impédance normalisée	60

2.7.3. Analyse des fréquences de coupure	63
2.8. Optimisation du capteur	66
2.8.1. Isolation des pistes de connexion avec une couche d'isolant	66
2.8.2. Matrice d'électrodes avec puits	71
2.9. Conclusion	72
Chapitre 3 : Conception et réalisation du capteur.....	74
3.1. Introduction.....	75
3.2. Conception du capteur	76
3.2.1. Structure et dimensions des électrodes	76
3.2.2. Géométrie des pistes de connexion.....	77
3.2.3. Couche d'isolant sur les pistes de connexion	78
3.2.1. Structure de puits	78
3.2.2. Structure globale des microcanaux	79
3.3. Choix des matériaux	80
3.3.1. Substrat	80
3.3.2. Électrodes.....	80
3.3.3. Isolant.....	81
3.3.4. Canal microfluidique	81
3.3.5. Choix d'interface microcanal-macrofluidique.....	81
3.4. Réalisation en salle blanche : procédé technologique.....	82
3.4.1. Dessin et réalisation des masques	82
3.4.2. Fabrication de la partie sensible.....	85
3.4.3. Fabrication du canal microfluidique	90
3.4.4. Assemblage du canal microfluidique à la partie sensible du capteur	91

3.5. Réalisation d'un banc de mesure	92
3.5.1. Enregistrement des données.....	95
3.6. Conclusion	97
Chapitre 4 : Etude expérimentale : mesures et validation du capteur	99
4.1. Introduction.....	100
4.2. Validation du banc de mesures : utilisation d'une matrice de switchs	101
4.3. Mesures avec des capteurs sans canal microfluidique	102
4.3.1. Mesure à vide et avec solutions étalons	103
4.4. Caractérisation des capteurs avec canal microfluidique	106
4.4.1. Mesure à vide	107
4.4.2. Mesures avec solutions calibrées	110
4.5. Mesures en régime statique.....	113
4.5.1. Mesures avec microbilles calibrées	113
4.6. Mesures en régime dynamique	118
4.7. Conclusion	121
Conclusion générale et perspectives	123
Bibliographie	126
Liste des publications et communications.....	132
Annexe 1 : Calcul des pôles et zéros	133
Annexe 2 : Capacité d'électrodes coplanaires avec milieu non homogène	135
Annexe 3 : Valeurs de fréquence de coupure F_{low} et F_{high} expérimental.....	137
Conception et réalisation d'un biocapteur à matrice d'électrodes pour la caractérisation de milieux biologiques par spectroscopie d'impédance	138

Liste des figures

Figure 1-1. Schéma des étapes de la formation d'une solution électrolytique : (a) l'ionisation (b) la dissociation et (c) la solvatation [28].	8
Figure 1-2. Conductivité en fonction de la concentration d'une solution électrolytique.	9
Figure 1-3. Schéma (a) du nuage d'électrons (b) de polarisation électronique et (c) du dipôle formé.	10
Figure 1-4. Schéma (a) du déplacement et (b) de la rotation des molécules diatomiques sous influence d'un champ électrique.	11
Figure 1-5. Schéma de la polarisation de charge d'espace.	11
Figure 1-6. Schéma de la double couche à l'interface électrode-liquide.	12
Figure 1-7. Schéma de la membrane cellulaire[30].	13
Figure 1-8. Circuit électrique équivalent à l'équation de Debye.	14
Figure 1-9. Modèle électrique proposé par Cole-Cole.	14
Figure 1-10. Modèle électrique proposé par Fricke pour une cellule	15
Figure 1-11. Modèle électrique proposé par Gersing pour plusieurs cellules	15
Figure 1-12. Caractéristique tension-courant pour un système non linéaire.	16
Figure 1-13. Schéma d'un spectre d'impédance des milieux biologiques.	17
Figure 1-14. Techniques de mesure d'impédance en fonction de la fréquence[35].	18
Figure 1-15. Schéma du circuit de mesure d'impédance par pont.	18
Figure 1-16. Schéma du circuit de mesure d'impédance par résonance. [35]	19
Figure 1-17. Schéma du circuit de mesure d'impédance par la technique Volt-Ampèremétrie. [35]	19
Figure 1-18. Schéma du circuit de mesure d'impédance par pont auto accordé (a) générale et (b) avec un amplificateur opérationnel[35].	20
Figure 1-19. Schéma de la distribution du champ électrique (a) dans deux milieux différents et (b) pour une solution uniforme.	21
Figure 1-20. Schéma d'une structure en H avec un écoulement laminaire.	22
Figure 1-20. Schéma d'une structure en H avec le phénomène de diffusion pour des particules de différentes tailles.	23
Figure 1-22. Focalisation hydrodynamique réalisée à l'aide de deux canaux secondaires [40].	23
Figure 1-23. Classification des capteurs biomédicaux.	25
Figure 1-24. Schéma des composants qui constituent un biocapteur [46].	26
Figure 1-25. Schéma des procédures utilisées dans [60].	28

Figure 1-26. Schéma d'une paire d'électrodes interdigitées [72].	28
Figure 1-27. Image des bactéries <i>E. coli</i> entre les électrodes interdigitées [21].	29
Figure 1-28. Schéma d'une paire d'électrodes coplanaires	29
Figure 1-29. Distribution du champ électrique en 2D (a) d'une paire d'électrodes coplanaires et (b) des électrodes interdigitées.	30
Figure 1-30. Distribution des valeurs de mesures en fonction du courant et de la phase pour trois échantillons différents[64].	30
Figure 1-31. Schéma du système microfluidique 3D utilisé par [73].	31
Figure 1-32. Schéma de la matrice d'électrodes avec les électrodes de référence[79].	32
Figure 1-33. Image microscopique de la matrice d'électrodes 10x10 [80]	32
Figure 2-1. Schéma électrique équivalent (a) pour une paire d'électrodes parallèles avec une cellule au milieu et (b) son modèle électrique [20].	40
Figure 2-2. Schéma des composants électriques (a) pour une paire d'électrodes coplanaires avec une cellule centrée et (b) son modèle électrique.	41
Figure 2-3. Modèle d'une cellule biologique pour les simulations par FEM.	41
Figure 2-4. Bloc de simulation et dimensions des électrodes pour les géométries (a) carrées (b) rectangulaire et (c) circulaire.	43
Figure 2-5. Graphique de la variation d'impédance normalisée en fonction du rayon de la cellule pour les géométries d'électrodes carrées, rectangulaires et circulaires.	44
Figure 2-6. Schéma de la structure du capteur à concevoir.	45
Figure 2-7. Modèle électrique d'une paire d'électrodes coplanaires avec la paroi du canal....	46
Figure 2-8. Modèle électrique planaire d'une paire d'électrodes coplanaires avec les composants parasites.	47
Figure 2-9. Représentation du spectre d'impédance d'un milieu biologique avec les composants électriques dominants dans chaque bande de fréquence.	48
Figure 2-10. Graphiques de la variation d'impédance normalisée analytique en fonction de la longueur des pistes de connexion et du coefficient de remplissage(a) pour le palier P1 et (b) pour le palier P2.	51
Figure 2-11. Modèle électrique global (a) et modèle électrique équivalent (b) pour la fréquence de coupure basse- F_{low} .	52
Figure 2-12. Graphique de la fréquence de coupure basse analytique en fonction du coefficient de remplissage pour trois longueurs de pistes de connexion.	54
Figure 2-13. Modèle électrique global (a) et modèle équivalent (b) pour la fréquence de coupure de la cellule- F_c .	54
Figure 2-14. Graphique de la fréquence de coupure de la cellule en fonction du coefficient de remplissage pour trois valeurs de rayon de la cellule.	56

Figure 2-15. Modèle électrique global (a) et modèle équivalent (b) pour la fréquence de coupure haute- F_{high}	56
Figure 2-16. Graphique de la fréquence de coupure haute analytique en fonction du coefficient de remplissage et de la longueur des pistes de connexion.....	57
Figure 2-17. Bloc de simulation utilisé pour les simulations du capteur avec une cellule centrée entre les électrodes	58
Figure 2-18. Bloc de simulation utilisé pour obtenir les facteurs de formes (a) des électrodes et (b) des pistes de connexion.	59
Figure 2-19. Graphiques de la variation d'impédance normalisée par simulation en fonction du rapport rayon de la cellule/largeur de l'électrode pour trois dimensions des électrodes (20 x 20 μm^2 , 10 x 10 μm^2 , 5 x 5 μm^2) avec les dimensions de piste de connexion constantes (2 x 10 μm^2) (a) pour le palier P1 et (b) pour le palier P2.	61
Figure 2-20. Graphique de la variation d'impédance normalisée par simulation en fonction de la largeur des pistes de connexion pour trois longueurs de piste de connexion (5 μm , 10 μm et 20 μm) (a) pour le palier P1 et (b) pour le palier P2.....	62
Figure 2-21. Variation d'impédance normalisée en fonction du placement de la cellule pour les mesures (a) au palier P1 et (b) au palier P2.....	63
Figure 2-22. Graphiques de (a) la fréquence de coupure basse et (b) de la fréquence de coupure haute en fonction du coefficient de remplissage pour trois dimensions des électrodes. Dans (b) « Cste » représente les courbes quand les pistes de connexion sont constantes et « prop » représente les courbes quand les pistes augmentent proportionnellement aux électrodes.	65
Figure 2-23. Graphiques de (a) la fréquence de coupure basse et (b) de la fréquence de coupure haute en fonction de la largeur de pistes de connexion pour trois longueurs de pistes de connexion.	66
Figure 2-24. Modèle électrique d'une paire d'électrodes coplanaires avec une couche d'isolant sur les pistes de connexion et la paroi du canal.	67
Figure 2-25. Bloc de simulation d'une paire d'électrodes coplanaires avec une couche d'isolant sur les pistes de connexion.....	68
Figure 2-26. Graphique de la variation d'impédance normalisée pour trois dimensions de pistes de connexion avec « BS2 » et sans « BS1 » couche d'isolant sur les pistes de connexion pour les calculs analytiques « A » et de simulations « S » (a) au palier P1 et (b) au palier P2.	69
Figure 2-27. Graphiques analytiques « A » et de simulation « S »(a) de la fréquence de coupure basse et (b) de la fréquence de coupure haute pour trois dimensions de pistes de connexion pour les capteurs avec « BS2 » et sans« BS1 » couche d'isolant sur les pistes de connexion.....	70
Figure 2-28. Schéma du capteur avec le puits.	71
Figure 3-1. Schéma de la structure et dimensions des électrodes(a) pour la matrice à 2x2 électrodes et (b) pour la matrice à 3x3 électrodes.....	76

Figure 3-2. Schéma de pistes de connexion (a) pour les matrices à 4 électrodes et (b) pour la matrice à 9 électrodes.....	77
Figure 3-3. Schéma de la couche d'isolant sur les pistes de connexion.	78
Figure 3-4. (a) Schéma de la couche de SU8 pour former le puits.	79
Figure 3-5. Schéma (a) d'un bon placement et (b) d'un mauvais placement du microcanal sur les microélectrodes.....	79
Figure 3-6. Schéma de la structure du canal avec les trois orifices d'entrée/sortie.....	80
Figure 3-7. Schéma de l'interface microfluidique-macrofluidique.	82
Figure 3-8. Image du design des masques (a) pour la fabrication des électrodes (b) pour la fabrication de la couche d'isolant (c) pour la fabrication du puits et (d) pour la fabrication des canaux microfluidiques.	84
Figure 3-9. Étapes de fabrication de la partie sensible du capteur.....	85
Figure 3-10. Image microscopique du masque en résine pour la gravure du tantale/platine...87	
Figure 3-11. Image microscopique après la gravure du tantale/platine.	88
Figure 3-12. Image microscopique de la couche sacrificielle sur les électrodes.	88
Figure 3-13. Image microscopique de la couche d'isolant autour des électrodes.	89
Figure 3-14. Image du capteur avec un agrandissement sur les électrodes où les bords du puits sont mis en évidence.	90
Figure 3-15. Étapes de fabrication du canal microfluidique.....	91
Figure 3-16. Étapes d'assemblage de la partie sensible et du canal microfluidique.....	91
Figure 3-17. (a) Image du capteur avec le canal microfluidique et (b) image microscopique des électrodes dans le canal microfluidique.....	92
Figure 3-18. Schéma du banc de mesure.	92
Figure 3-19. Plage de mesure de l'impédancemètre [89].	93
Figure 3-20. Images des cartes PCB (a) pour connecter les câbles (b) pour souder le capteur et (c) la connectique complète au microscope.	95
Figure 3-21. Face avant du programme Labview utilisé pour commander l'acquisition de données.	96
Figure 4-1. Graphiques de l'impédance et de la phase avec et sans la matrice de switches et avec et sans compensation des effets parasites des câbles et de la carte électronique.....	102
Figure 4-2. Images microscopiques des électrodes (a) du capteur C1 (simple) (b) du capteur C2 (avec la couche d'isolant) et (c) du capteur C3 (avec la couche d'isolant et le puits).	103
Figure 4-3. Les étapes de dépôt d'une goutte de solution étalon sur les microélectrodes. (a) Approximation du microtube, (b) dépôt de la goutte et (c) image de la goutte déposée sur les microélectrodes.	104

Figure 4-4. Disposition de la goutte avec un volume fixe de (a) (b) 0,2 μ l et (c) (d) 1 μ L sur les électrodes (a) (c) du capteur C1 et (b) (d) du capteur C2.	105
Figure 4-5. Spectre d'impédance du capteur C1 (courbes vertes et noires) et du capteur C2 (courbes magenta et bleue) avec des volumes différents sur les électrodes	106
Figure 4-6. (a) Schéma et nomenclature des électrodes. (b) Schéma des combinaisons entre les électrodes.	107
Figure 4-7. Graphiques du (a) module et phase de l'impédance et (b) de la capacité pour toutes les configurations des électrodes.	108
Figure 4-8. Module et phase mesurés pour le capteur CA20 avec l'eau du robinet.	112
Figure 4-9. Schéma des bandes de fréquences utiles pour toutes les structures des capteurs.	113
Figure 4-10. Image microscopique des électrodes (a) sans microbille et (b) avec une microbille entre les électrodes.	114
Figure 4-11. Module et phase de l'impédance des mesures Z_{ref} et Z_{cell} pour les configurations AB, CD, AC et BD.	116
Figure 4-12. Distribution de la variation d'impédance du capteur CA20 et du capteur CA10	116
Figure 4-13. Distribution de la variation d'impédance pour les configurations AB et CD du capteur CA10	117
Figure 4-14. Distribution de la variation d'impédance pour les capteurs CA10 et CA10ISO	118
Figure 4-15. Images microscopiques des échantillons (a) C1, (b) C2 et (c) C3 de levures de boulanger dans le microcanal d'un capteur CA20	119
Figure 4-16. Graphiques du module et phase de l'impédance pour les mesures effectuées avec les configurations AC (courbes avec les symboles plus, astérisque et ronde pour les concentrations C1, C2 et C3 respectivement) et Ho (courbes avec les symboles carré, triangle vers le haut et triangle vers le bas pour les concentrations C1, C2 et C3 respectivement) pour trois concentrations différentes de levures de boulanger.	120

Liste des tableaux

Tableau 2-1. Paramètres des matériaux dans les simulations	42
Tableau 2-2. Fréquences de coupure basse et haute pour les géométries analysées.....	44
Tableau 2-3. Définitions des composants du modèle électrique.....	46
Tableau 2-4. Description des paramètres intrinsèques utilisés dans les équations	49
Tableau 2-5. Facteur de forme pour différentes dimensions des électrodes et des pistes de connexion	60
Tableau 3-1. Labels et structures des électrodes à fabriquer	77
Tableau 3-2. Caractéristiques des matrices de switches	94
Tableau 4-1. Caractéristiques des premiers capteurs utilisés.....	103
Tableau 4-2. Caractéristique des capteurs avec canal microfluidique	107
Tableau 4-3. Valeurs de capacités des capteurs ($f = 100$ kHz).....	110
Tableau 4-4. Valeurs de la conductivité mesurée ($\mu\text{S}/\text{cm}$) des solutions à 23 °C	110
Tableau 4-5. Valeurs du facteur de forme expérimental.....	111
Tableau 4-6. Tableau des capteurs utilisés avec les longueurs des pistes de connexion exposées à la solution.....	115

Notation mathématique

Constantes

Symbole	Nom	Valeur	unité
v_0	Vitesse de la lumière au vide	3×10^8	m/s
ϵ_0	Permittivité du vide	$8,8541 \times 10^{-12}$	F/m
π	Pi	3,141592	

Variables

Symbole	Nom	unité
ϵ_r	Permittivité relative du matériau	F/m
Λ_m	Conductivité molaire d'un électrolyte	S.m ² .mol ⁻¹
λ_i	Conductivité molaire ionique	S.m ² .mol ⁻¹
μ	Viscosité dynamique du fluide	kg/(m.s)
$\vec{\mu}$	Moment dipolaire	C.m
ρ	Résistivité électrique	Ω .m
ρ_f	Masse volumique du fluide	kg/m ³
σ	Conductivité électrique	S
Φ	Coefficient de remplissage de la cellule	-
C_{dc}	Capacité de double couche	F
C_H	Capacité de Helmholtz	F
C_{GC}	Capacité de Gouy-Chapman	F
C_m	Concentration molaire	mol.m ⁻³
C_{surf}	Capacité électrique surfacique	F/m ²
D	Coefficient de diffusion d'une particule	m ² /s
d	Dimension caractéristique	m
\vec{d}	Distance entre les charges	m
\vec{E}	Champ électrique	N/C
F	Fréquence de coupure	Hz
G	Conductance du matériau	S
I	Courante électrique	A
K	Facteur de forme	m

l	Distance entre électrodes	m
L	Longueur	m
\vec{P}	Polarisation	C/m ²
Pe	Nombre de Péclet	-
q	Charge du dipôle	C
R	Résistance électrique	Ω
Re	Nombre de Reynolds	-
S	Surface	m ²
t	Temps de relaxation	s
v	Vitesse caractéristique du fluide	m/s
V	Tension électrique	V
W	Largeur	m
x	Susceptibilité électrique	-
Z	Impédance complexe	Ω

Introduction générale

Contexte

Les caractéristiques des cellules, tissus et milieux biologiques, telles que leur concentration, leur taille et leur physiologie, sont des indicateurs importants pour identifier et traiter au mieux les maladies ou détecter des agents pathogènes [1]. La connaissance des propriétés électromagnétiques des cellules peut fournir des signaux précoces de pathologies ou de dysfonctionnements dans le corps humain pour des applications médicales par exemple via un diagnostic sanguin [2]. Autre application possible, l'analyse de milieux biologiques par caractérisation électromagnétique pour vérifier la présence ou non de bactéries pathogènes [3].

Ces propriétés sont généralement mesurées en laboratoire en utilisant des appareillages coûteux et des procédures longues. La réduction de ces contraintes compte parmi les intérêts des biocapteurs et des laboratoires sur puce. Nous pouvons citer en particulier des travaux récents axés sur la détection rapide de très faibles concentrations de bactéries *E. coli* [4]. Les nouvelles technologies développées pour caractériser les cellules plus rapidement, à moindre coût et de manière plus précise incluent l'électrorotation [5], l'impédance en cytométrie [6]–[8], la spectroscopie de bio-impédance électrique (BIS) [9]–[11] et les immunocapteurs électrochimiques [12]. Ces technologies constituent donc des outils précieux pour l'identification des cancers [13] [14], des bactéries [15] ou des parasites (comme la malaria) [16], des toxines [17], la nature des tissus sains ou cancéreux [18] ou des modifications de propriétés de l'ADN [19].

La technique de spectroscopie d'impédance appliquée à des particules biologiques unitaires en suspension dans un milieu physiologique [20], avec l'utilisation de nanobilles magnétiques et d'électrodes interdigitées sérigraphiées [21], ou de réseaux de micropuits entre des électrodes conductrices transparentes dans un canal microfluidique [22] permet de détecter et de caractériser des cellules et des bactéries. Combinée à des dispositifs microfluidiques, elle peut constituer un outil puissant pour le tri, l'analyse, le comptage et la discrimination de cellules [6] [23] [24].

La limite de détection est le plus petit nombre de cellules biologiques pouvant être mesurées par un biocapteur. Une façon de l'améliorer est de réduire la taille des électrodes, permettant de limiter le volume de la zone d'investigation. Cependant, le taux de détection se

trouve alors également diminué, c'est-à-dire que le nombre de cellules mesurées est également limité. Comme présenté dans le travail de Furst et al [15], l'utilisation d'une matrice d'électrodes augmente le taux de détection; toutefois, les pistes de connexion des électrodes (principalement pour les électrodes situées au centre de la matrice) créent une fuite de courant vers l'électrolyte ou le substrat qui réduit la variation d'impédance normalisée. Les méthodes les plus utilisées pour réduire la fuite de courant électrique consistent à faire croître une couche de SiO_2 sur le substrat (cette méthode est utilisée lorsque le substrat est en silicium) et à utiliser une couche de passivation avec des composés polymères, alternant Si_3N_4 et SiO_2 ou une couche individuelle de Si_3N_4 [25] [26].

Objectifs de la thèse :

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Mesures et architectures électroniques » de l'Institut Jean Lamour (Unité Mixte de Recherche 7198-Université de Lorraine – CNRS) sur la période octobre 2016-octobre 2019 et a bénéficié d'un contrat doctoral de l'Université de Lorraine.

Le projet de thèse a comme objectif la conception et le développement d'un biocapteur à matrice d'électrodes coplanaires pour la caractérisation/détection de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance à l'échelle unitaire. La structure en forme de matrice d'électrodes permet d'augmenter le débit de détection lorsque le nombre d'électrodes augmente. Cependant, le premier défi est d'analyser et de limiter les effets des pistes de connexions qui peuvent réduire la variation d'impédance normalisée et ainsi augmenter la difficulté de détection de cellules entre les électrodes. Pour analyser les effets des pistes de connexion, proposer des améliorations et observer la faisabilité, nous avons utilisé une matrice d'électrodes simple 2x2. Avec cette structure nous analysons de façon analytique, par simulation et par mesures expérimentales l'influence des pistes de connexion sur la bande de fréquence et sur la variation d'impédance. Pour réduire les effets de pistes de connexion, nous proposons de réduire leurs dimensions ainsi que l'utilisation d'une couche d'isolant sur les pistes de connexion.

Un autre défi est la mise en place d'un banc de mesure qui permet l'adressage entre les électrodes, l'injection d'échantillon, le déplacement de cellules unitaires et son suivi visuel au moment de la mesure pour enregistrer le positionnement de la cellule. Nous y avons répondu par la conception et la réalisation d'un ensemble expérimental intégrant ces différentes fonctionnalités.

Plan de la thèse :

Chapitre 1 :Caractérisation de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance – fondements et état de l'art

Le premier chapitre de cette thèse porte dans un premier temps sur les rappels des propriétés électriques et diélectriques de milieux biologiques et des phénomènes physiques et chimiques relatifs à la cellule de mesure.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous abordons les principes de la Spectroscopie d'Impédance ainsi que les principales méthodes pour la mettre en oeuvre.

Nous abordons ensuite des aspects de la microfluidique et dans la dernière partie nous présentons une revue et une classification de capteurs biomédicaux avec en particulier ceux qui sont en lien avec notre objectif.

Chapitre 2 :Modélisation analytique et numérique d'un biocapteur à électrodes coplanaires

Dans ce chapitre, nous justifions le choix de la structure du capteur retenue par des simulations effectuées sur différentes géométries d'électrodes. Une fois les géométries des électrodes choisies, nous avons développé un modèle électrique pour avoir une idée du comportement fréquentiel et de la variation d'impédance en fonction des paramètres géométriques des électrodes et des pistes de connexion.

Pour prendre en compte des effets non modélisables analytiquement, comme la dispersion du champ électrique au bord des électrodes, nous avons effectué des simulations par la méthode des éléments finis.

Chapitre 3 :Conception et réalisation du capteur

Dans ce chapitre nous abordons la conception du capteur dont nous détaillons la structure et les dimensions des électrodes développées. Nous justifions les choix des matériaux pour la fabrication du capteur et nous abordons les principales techniques de fabrication du capteur en salle blanche. Le banc de mesure expérimental est présenté et détaillé.

Chapitre 4 :Étude expérimentale : mesures et validation du capteur

Dans ce chapitre nous abordons les aspects expérimentaux.

Dans un premier temps, nous caractérisons le banc de mesure constitué d'une matrice de switches, puis nous étudions la réponse des capteurs sans canal microfluidique. Nous avons

constaté que les mesures sans canal microfluidique sont dépendantes du volume et du placement des gouttes sur les électrodes nécessitant ainsi d' utiliser un canal microfluidique. Quatre structures de capteurs avec canal microfluidique ont été utilisées et comparées en régime statique pour montrer l'influence des pistes de connexion sur la variation d'impédance normalisée du capteur et sur les fréquences de coupure .

Dans la dernière partie de ce chapitre, nous présentons la technique permettant de mesurer la variation de concentration de cellules en régime dynamique.

Chapitre 1 :
Caractérisation de cellules biologiques par
spectroscopie d'impédance – fondements et
état de l'art

1.1. Introduction

Ce chapitre est structuré en quatre parties complémentaires :

La première partie rappelle des propriétés électriques et diélectriques de milieux biologiques et des phénomènes physiques et chimiques relatifs à la cellule de mesure. Elle porte sur sept points : la définition du moment dipolaire, l'explication de la formation d'une solution électrolytique, la définition de la conductivité ionique, les mécanismes de polarisation et relaxation d'un matériau, les processus d'interface entre l'électrode et la solution électrolytique et enfin la modélisation électrique des tissus et des cellules biologiques.

Dans la deuxième partie de ce premier chapitre, sont rappelés les principes de la Spectroscopie d'Impédance (**BIS: Bio Impedance Spectroscopy**) ainsi que les principales méthodes pour la mettre en oeuvre. Parmi les techniques de mesure/caractérisation de milieux biologiques nous avons retenu la **BIS** qui peut être réalisée par diverses méthodes comme la mesure par pont autoaccordé ou la mesure par résonance qui est détaillée dans cette dernière partie. Les paramètres d'influence sont notamment discutés.

La troisième partie porte sur les aspects de microfluidique qui concernent nos objectifs. L'un des paramètres qui peuvent influencer les mesures est la variation du volume de la solution électrolytique. Pour le maîtriser, nous utilisons un canal microfluidique dans lequel le volume sur les électrodes est maintenu constant. Le canal microfluidique sert aussi à positionner les échantillons biologiques sur les électrodes.

Ce chapitre se conclut par la quatrième partie qui présente une revue et une classification de capteurs biomédicaux. Sont particulièrement décrits ceux qui sont en lien avec notre objectif, c'est-à-dire les biocapteurs à microélectrodes utilisés pour caractériser des cellules biologiques.

1.2. Propriétés électriques et diélectriques des milieux biologiques

Lorsque des microélectrodes sont utilisées pour la caractérisation de milieux biologiques (milieu aqueux), un équilibre électrochimique est établi. Cet équilibre électrochimique peut être modélisé par des composants électriques passifs tels que la résistance et le condensateur.

Pour bien comprendre les modèles des composants électriques passifs (résistances et condensateur) proposés par Debye, Cole-Cole, Fricke, entre autres, il est intéressant à faire des rappels des propriétés électriques et diélectriques de milieux biologiques et des phénomènes physiques et chimiques relatifs à la cellule de mesure. Une résistance peut être utilisée pour modéliser la conductivité électrique et ionique et un condensateur pour modéliser le cumul de charges en surface. Dans cette partie, nous faisons un rappel de l'origine de la conductivité ionique dans une solution électrolytique et de la façon dont les charges sont distribuées à la surface des matériaux. Pour cela, nous parlons sur le moment dipolaire, la formation d'une solution électrolytique et les mécanismes de polarisation d'un matériau.

1.2.1. Moment dipolaire

Quand un matériau est chargé, il peut être classé comme polaire ou apolaire en fonction de la distribution volumique de ses charges. Lorsque le barycentre des charges positives est différent du barycentre de charges négatives d'une molécule, ce dernier présente un moment dipolaire. Le moment dipolaire est noté comme un vecteur $\vec{\mu}$ en fonction de la charge du dipôle (q) et de la norme, direction et sens de la charge négative vers la charge positive (\vec{d}) comme présenté dans l'équation (1.1). Le vecteur $\vec{\mu}$ est dirigé de la charge négative vers la charge positive et est donné en Coulomb-mètre (Cm) ou Debye (D).

$$\vec{\mu} = q\vec{d} \quad (1.1)$$

Le matériau polaire présente toujours un moment non nul contrairement au matériau apolaire qui n'en présente pas à l'état de repos, mais peut devenir polaire lorsqu'il est soumis à un champ électrique externe. Les processus de polarisation d'un matériau sont détaillés dans la section 1.2.4.

1.2.2. Formation d'une solution électrolytique

Les électrolytes sont des composés chimiques qui une fois dissous dans un solvant (l'eau pour les milieux biologiques) sont capables de transporter des charges électriques. Ce

transport de charges procède d'un mouvement ionique, à la différence des métaux pour lesquels le transport de charges est réalisé par les électrons.

Les trois phases dans la formation d'une solution électrolytique : l'ionisation, la dissociation et la solvation sont schématisées dans la Figure 1-1. Dans la phase d'ionisation, le moment dipolaire du solvant interagit avec celui du soluté de sorte qu'il y a une polarisation de la liaison dans le soluté et les paires d'ions sont alors formées. Dans la deuxième phase, la dissociation, il y a une séparation des charges par le solvant. Dans l'eau, cette séparation est forte, car elle a une constante diélectrique élevée. Dans des solvants avec faibles valeurs de constante diélectrique, la dissociation peut ne pas être totale de sorte que la conductivité ionique est limitée. Dans la troisième phase, la solvation ou hydratation, les molécules polaires du solvant entourent les ions formés avec leur pôle positif vers l'anion et leur pôle négatif vers le cation [27].

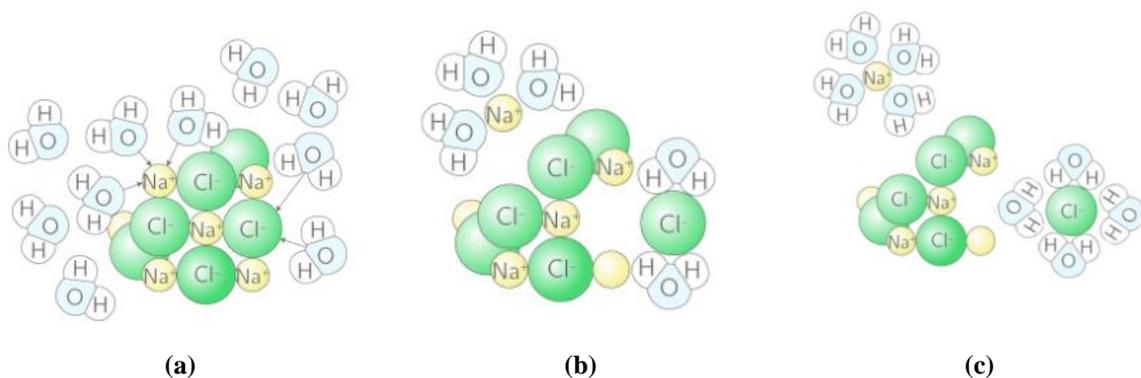


Figure 1-1.Schéma des étapes de la formation d'une solution électrolytique : (a) l'ionisation (b) la dissociation et (c) la solvation [28].

1.2.3. Conductivité ionique

La résistance au passage de courant électrique entre deux électrodes de plaques parallèles est donnée par $R=\rho/l/S$. R est la résistance, l la distance entre les plaques, S la surface d'une plaque et ρ la résistivité qui dépend des propriétés intrinsèques au matériau. La conductance G représente l'aptitude au passage de courant d'un matériau et c'est l'inverse de la résistance. La conductivité est l'inverse de la résistivité, $\sigma = 1/\rho$, et correspond à la quantité de courant qui passe par le conducteur pour une tension de 1 V.

Pour une solution électrolytique, la conductivité est dépendante de sa concentration ionique C . Plus grande est la concentration, plus grande est la conductivité jusqu'à que les ions de même charge soient très proches et se repoussent en occasionnant une saturation, comme montré sur le graphe de la Figure 1-2.

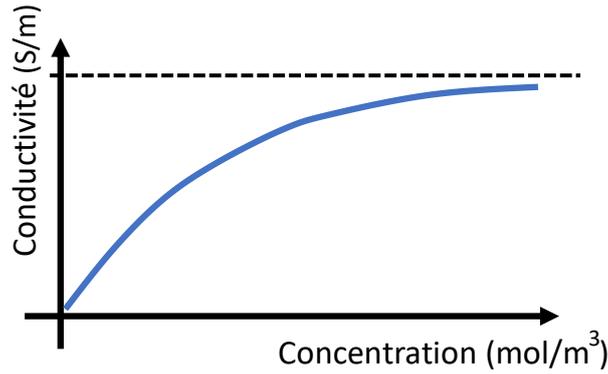


Figure 1-2. Conductivité en fonction de la concentration d'une solution électrolytique.

Une autre manière d'analyser la conductivité d'une solution électrolytique consiste à utiliser la conductivité molaire d'un électrolyte Λ_m , équation (1.2), qui dépend de la capacité des ions à se déplacer vers les électrodes et rend plus facile le comparatif entre les solutions. Dans l'équation (1.2) ci-dessous, σ est la conductivité de la solution électrolytique et C_m la concentration d'ions. D'une autre manière : la conductivité molaire peut être vue comme la somme de la conductivité molaire ionique (λ_i).

$$\Lambda_m = \frac{\sigma}{C_m} = \sum_i \lambda_i \quad (1.2)$$

Dans une solution électrolytique de faible concentration, le courant est directement proportionnel au nombre d'ions qui s'approche des électrodes par unité du temps. Le nombre d'ions qui arrivent aux électrodes est $N = C \cdot S \cdot v \cdot \Delta t$, où S est la surface d'électrode, C la concentration des ions, v la vitesse de déplacement des ions et Δt le temps. Le courant d'ions est alors $Nq/\Delta t$ où q est la charge de l'ion. La conductance qui est le courant par la tension appliquée est alors calculée par l'équation (1.3).

$$G = \frac{CSvq}{\Delta V} \quad (1.3)$$

1.2.4. Polarisation d'un matériau et relaxation diélectrique

La polarisation (\vec{P}) d'un matériau est définie comme le moment dipolaire par unité de volume ou autrement dit, la densité superficielle de charges sur la surface d'un diélectrique lorsqu'un champ électrique externe (\vec{E}) est appliqué. Pour un matériau homogène, isotrope et linéaire, le vecteur polarisation est donné par l'équation (1.4) où χ_r est la susceptibilité électrique qui dépend du matériau et ϵ_0 est la permittivité diélectrique du vide.

$$\vec{P} = \chi_r \epsilon_0 \vec{E} \quad (1.4)$$

Pour un matériau polaire, les moments dipolaires sont différents de zéro, mais sans champ électrique ils sont orientés de manière aléatoire et le vecteur polarisation est nul.

Il y a quatre types de polarisation : la polarisation électronique, la polarisation ionique, la polarisation dipolaire d'orientation et la polarisation de charge d'espace. La polarisation électronique se passe au niveau atomique, les polarisations ionique et dipolaire d'orientation se passent au niveau moléculaire et la polarisation de charge d'espace se passe au niveau macroscopique.

Imaginons un modèle simple d'un atome isolé dans lequel le barycentre des charges du nuage d'électrons coïncide avec le barycentre des charges du noyau et que le nombre de charges de celui-ci soit $+Z$ et celui du nuage d'électrons soit $-Z$, Figure 1-3(a). Lorsqu'un champ électrique externe est appliqué sur l'atome, le nuage d'électrons se déplace par rapport au noyau. Avec ce déplacement s'est créé un moment dipolaire induit, Figure 1-3(b) et (c). Ce processus de polarisation s'appelle polarisation électrique et il est le plus rapide avec un ordre de grandeur de 10^{-15} secondes.

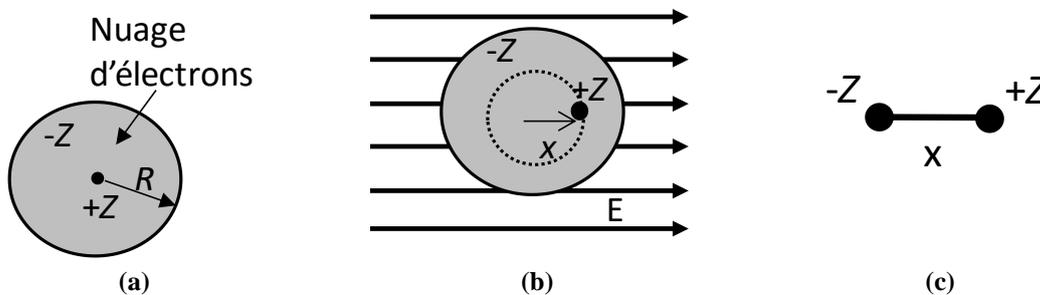


Figure 1-3. Schéma (a) du nuage d'électrons (b) de polarisation électronique et (c) du dipôle formé.

Maintenant, imaginons une molécule diatomique A et B comme dans la Figure 1-4(a). Lorsque le champ électrique est appliqué, il peut y avoir un déplacement des ions de manière que la distance entre les barycentres des charges est modifiée ce qui par conséquent modifie aussi le moment dipolaire. Ce processus de polarisation est la polarisation ionique et est de l'ordre de 10^{-13} à 10^{-12} secondes.

De la même manière que les ions peuvent se déplacer lorsqu'un champ électrique est appliqué, il peut y avoir aussi une rotation de la molécule autour d'elle-même de manière à s'aligner avec le champ électrique comme dans la Figure 1-4(b). Ce processus de polarisation

est la polarisation dipolaire d'orientation. L'ordre de grandeur classique se situe dans les fréquences micro-ondes, à savoir de 10^{-9} à 10^{-10} secondes pour l'eau.

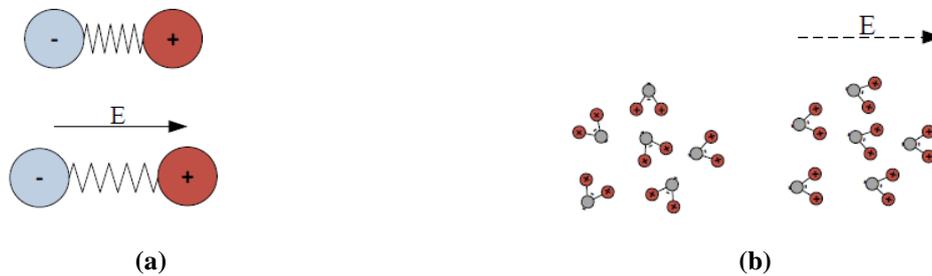


Figure 1-4. Schéma (a) du déplacement et (b) de la rotation des molécules diatomiques sous influence d'un champ électrique.

Lorsque le champ électrique est appliqué dans le volume d'un matériau, il peut y avoir un déplacement des charges comme schématisé dans la Figure 1-5. Ce processus, appelé polarisation de charge d'espace, est typique des milieux électrolytiques où les porteurs de charges ioniques sont libres de se déplacer.

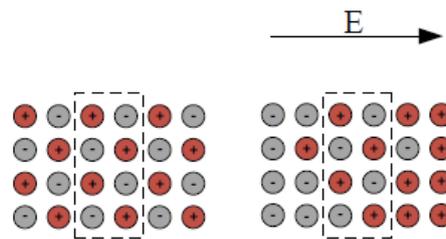


Figure 1-5. Schéma de la polarisation de charge d'espace.

1.2.5. Notion de double couche

Généralement l'interface métal solution est polarisée, cela veut dire qu'il existe un excès de charges positif d'un côté de l'interface et un excès de charges négatives de l'autre côté de manière que s'est créé une double couche électrochimique[27]. Plusieurs modèles ont été proposés depuis 1879 (modèle de Helmholtz) jusqu'à 1924 (modèle de Stern) afin de représenter la structure de la double couche.

Le modèle de Helmholtz est le plus simple. L'excès de charges du côté de l'électrolyte est réparti de manière uniforme en vis-à-vis de celui du métal à une distance L_H de l'interface. Ce modèle représente l'interface comme un condensateur plan avec une capacité surfacique $C_H = \epsilon / L_H$. Ce modèle étant très simple ne prend en compte ni la concentration de l'électrolyte ni la tension interfaciale.

En 1913, un modèle qui considère que l'excès de charge du côté de l'électrolyte se répartit dans l'espace a été proposé par Gouy et Chapman. Dans ce modèle, l'épaisseur où les charges se répartissent est donnée par la longueur de Debye et prévoit une double couche diffuse différemment du modèle de Helmholtz qui prévoit une double couche compacte.

La réunion des modèles de Helmholtz et de Gouy-Chapman (équation (1.5)) a été proposée en 1924 par Stern. Le modèle de Stern dit qu'il y a une couche compacte à l'interface ainsi qu'une couche diffuse après la couche compacte (Figure 1-6), jusqu'où le potentiel est uniforme, de manière que la capacité de double couche résulte de deux capacités en série : la capacité due à la couche compacte proposée par Helmholtz(C_H) et la capacité due à la couche diffuse proposée par Gouy-Chapman(C_{GC}) :

$$\frac{1}{C_{ac}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{GC}}. \quad (1.5)$$

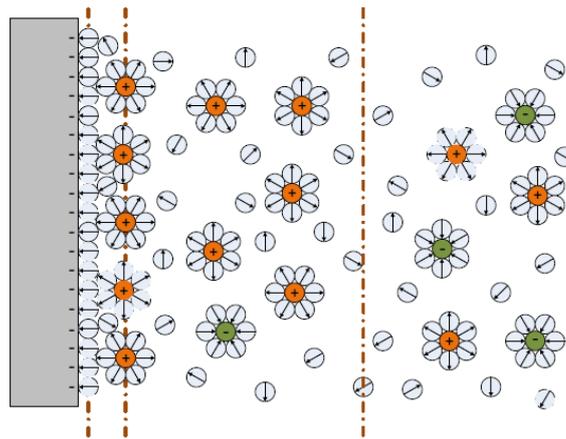


Figure 1-6. Schéma de la double couche à l'interface électrode-liquide.

1.2.6. Caractérisation électromagnétique des tissus biologiques

Lorsqu'un tissu biologique est stimulé avec une tension électrique alternative, la réponse n'est pas instantanée, mais exponentielle du premier ordre dans le temps à cause de l'inertie des molécules et des forces de frottement. La polarisation et le déplacement de charges ne sont pas instantanés. En basses fréquences les charges ont le temps de s'orienter en suivant le champ électrique et la polarisation est maximale, mais lorsque la fréquence augmente, les charges ne vont pas suivre les lignes du champ électrique et la polarisation diminue.

Une cellule biologique est formée par une membrane et à l'intérieur contient un liquide intracellulaire. Ce liquide intracellulaire est une solution électrolytique et normalement les

milieux naturels des cellules biologiques sont aussi des solutions électrolytiques. Les membranes contrôlent les échanges d'ions et de molécules entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et sont formées par une double couche lipidique dans laquelle s'insèrent des macromolécules protéiques. La Figure 1-7 montre le schéma d'une membrane cellulaire. L'épaisseur d'une membrane cellulaire est d'environ 7,5 nm et est constituée essentiellement de lipides. Elle se comporte comme un diélectrique quasi parfait dans lequel la capacité est proche de 0,8 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ si elle est assimilée à un condensateur de plaques parallèles[29].

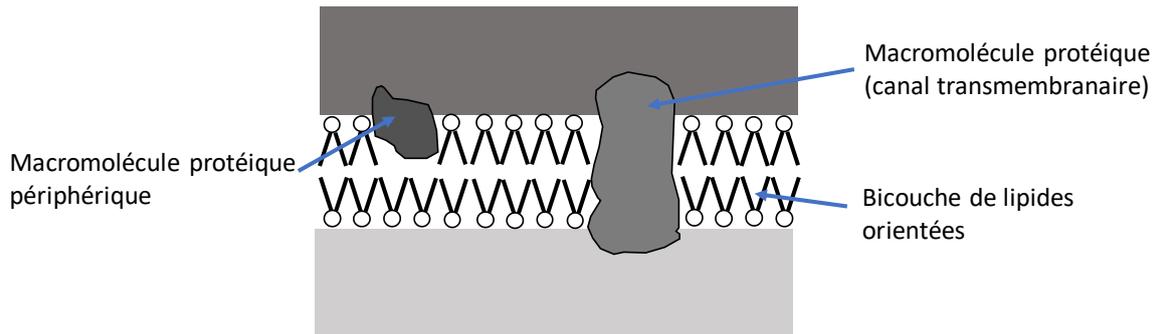


Figure 1-7. Schéma de la membrane cellulaire[30].

Historiquement, plusieurs modèles ont été proposés pour représenter les propriétés électriques de tissus et cellules biologiques tels que le modèle de Debye[31], le modèle de Cole-Cole[32] et le modèle de Fricke[29]. D'autres modèles raffinant ceux précités ont été développés en fonction des domaines fréquentiels et/ou de la nature du signal. On notera en particulier les travaux de Schwann [33] comme référence phare.

1.2.7. Le modèle de Debye

La théorie de Debye suppose un processus purement visqueux sans force de rappel élastique. L'équation de Debye est donnée par la variation de la permittivité du matériau entre sa valeur maximale à une fréquence nulle (ϵ_s) et sa valeur minimale à une fréquence idéalement infinie (ϵ_∞) comme montré dans l'équation (1.6) où τ_0 est la constante de temps de relaxation.

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + j\omega\tau_0} \quad (1.6)$$

Si l'on sépare la partie réelle et la partie imaginaire de l'équation (1.6) nous obtenons les équations (1.7) et (1.8), respectivement.

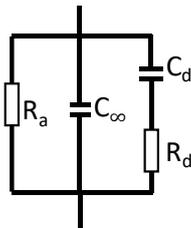
$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + (\omega\tau_0)^2} \quad (1.7)$$

$$\epsilon^*(\omega) = (\epsilon_s - \epsilon_\infty) + \frac{\omega\tau_0}{1 + (\omega\tau_0)^2} \quad (1.8)$$

Les effets de la conductivité statique ne sont pas pris en compte par la formulation de Debye. L'équation de Debye est modifiée comme suit pour les prendre en compte :

$$\epsilon^*(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + j\omega\tau_0} - j \frac{\sigma_s}{\omega\epsilon_0} \quad (1.9)$$

Le modèle électrique de la Figure 1-8 représente cette équation.



$$R_a = \frac{K_{cell}}{\sigma_s}$$

$$C_\infty = \frac{\epsilon_0 \epsilon_\infty}{K_{cell}}$$

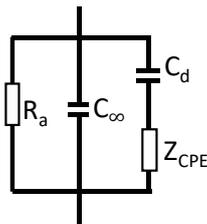
$$R_d = \frac{K_{cell} \tau_0}{\epsilon_0 (\epsilon_s - \epsilon_\infty)}$$

$$C_d = \frac{\epsilon_0 (\epsilon_s - \epsilon_\infty)}{K_{cell}}$$

Figure 1-8. Circuit électrique équivalent à l'équation de Debye.

1.2.8. Le modèle de Cole-Cole

Dans la pratique, l'équation de Debye ne correspond pas complètement au profil de permittivité observé dans les tissus biologiques. Cole-Cole ont proposé un modèle empirique basé sur la distribution statistique des constantes de temps de relaxation, δ . Cette distribution vient du fait que les différents types de dipôles ont chacun leur propre temps de relaxation. Pour prendre en compte cet effet dans la modélisation électrique, ils ont proposé un composant électronique physiquement irréalisable avec une phase constante, Z_{CPE} . Le modèle de Cole-Cole est représenté par le circuit de la Figure 1-9.



$$R_a = \frac{K_{cell}}{\sigma_s}$$

$$C_\infty = \frac{\epsilon_0 \epsilon_\infty}{K_{cell}}$$

$$Z_{CPE} = \frac{K_{cell} \tau_0 (j\omega\tau_0)^{-\delta}}{\epsilon_0 (\epsilon_s - \epsilon_\infty)}$$

$$C_d = \frac{\epsilon_0 (\epsilon_s - \epsilon_\infty)}{K_{cell}}$$

Figure 1-9. Modèle électrique proposé par Cole-Cole.

1.2.9. Le modèle de Fricke

En prenant en compte les propriétés électriques de la membrane et des milieux interne et externe de la cellule, Fricke [29] propose un modèle électrique où la membrane cellulaire est représentée par une capacité C_{mem} , le milieu intracellulaire est représenté par une résistance en série avec la capacité cellulaire et le milieu externe est représenté par une résistance en parallèle, comme montré dans la Figure 1-10.

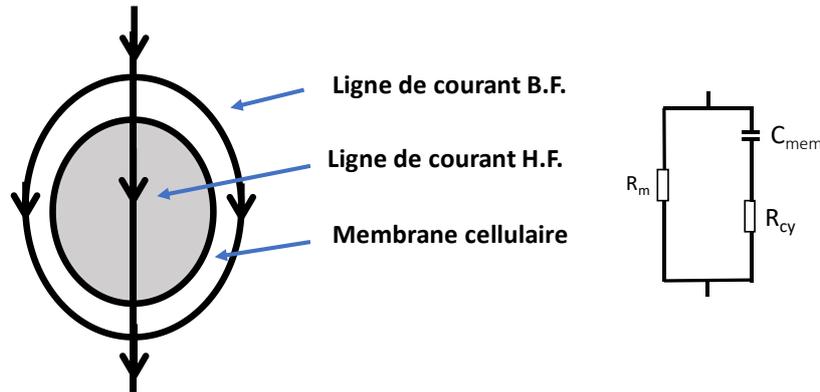


Figure 1-10. Modèle électrique proposé par Fricke pour une cellule

Dans les cas où il y a une agglomération de cellules [34] propose un modèle qui prend en compte les cellules environnantes comme représenté dans la Figure 1-11.

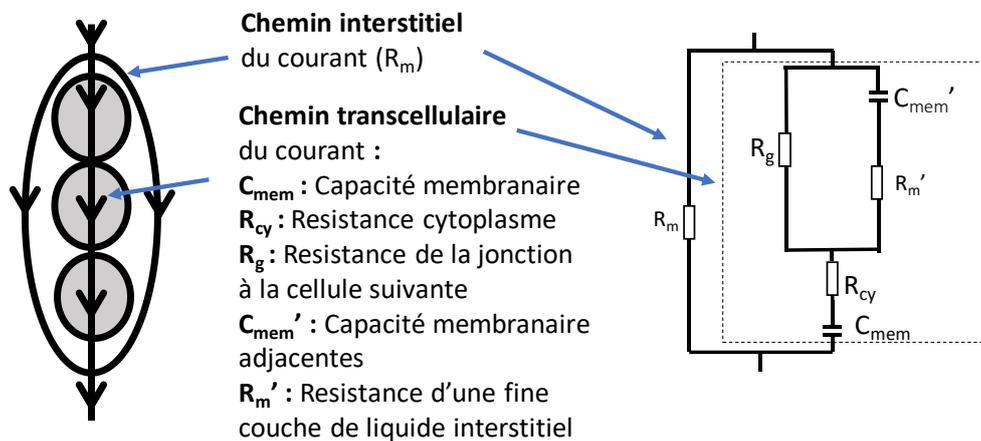


Figure 1-11. Modèle électrique proposé par Gersing pour plusieurs cellules

1.3. Spectroscopie d'Impédance d'échantillon biologique

1.3.1. Définition de spectroscopie d'impédance

Dans la technique de spectroscopie d'impédance, les propriétés diélectriques des échantillons biologiques sont déterminées par leurs réponses à des excitations par des signaux

électriques de fréquence variable. Le signal d'excitation est normalement une tension ou un courant électrique sinusoïdal appliqué entre les électrodes et l'impédance mesurée constitue la réponse du système. L'impédance complexe $Z(j\omega)$ peut être définie par l'équation (1.10) avec Z_{re} sa partie réelle et Z_{im} sa partie imaginaire.

$$Z(j\omega) = \frac{V(j\omega)}{I(j\omega)} = Z_{re} + jZ_{im} \quad (1.10)$$

Afin de considérer que la mesure est effectuée sur un système linéaire invariant dans le temps, il suffit d'appliquer une perturbation de très faible amplitude autour d'un point de fonctionnement supposé quasi stationnaire (système à l'équilibre) pendant la mesure Figure 1-12. Dans ces conditions, il est ainsi possible d'obtenir une réponse électrique fiable correspondant à l'état du système au moment de la perturbation.

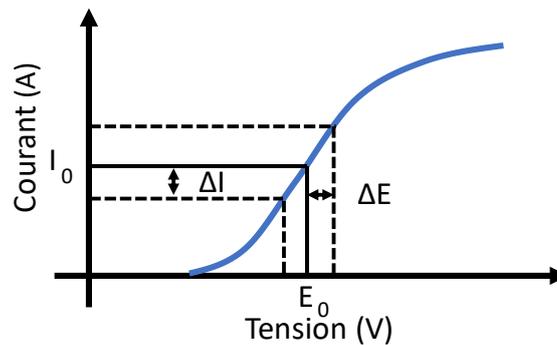


Figure 1-12. Caractéristique tension-courant pour un système non linéaire.

La Figure 1-13 montre l'allure du spectre d'impédance d'un milieu biologique. Normalement, le spectre d'impédance d'un milieu biologique a quatre zones correspondant chacune à un effet prépondérant. Les zones rouges correspondent aux effets indésirables. Dans les zones bleue et verte, ce sont les effets du milieu et de la cellule qui dominent. La transition entre les effets de la capacitance de double couche (la première zone rouge) et les effets du milieu plus la forme de la cellule (zone bleue) a lieu dans la fréquence de coupure basse F_{low} . Les effets du milieu plus du cytoplasme de la cellule se posent dans la zone verte, après la fréquence de coupure F_c . Dans la deuxième zone rouge, les effets indésirables des capacités du milieu et parasites sont prépondérants et interviennent à partir de la fréquence de coupure F_{high} .

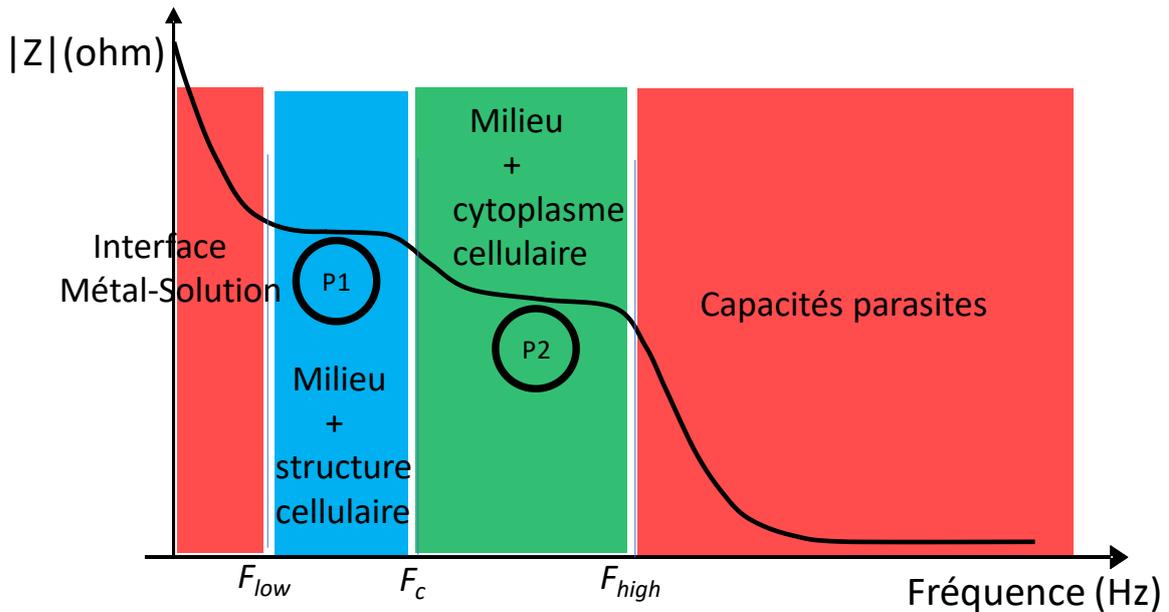


Figure 1-13. Schéma d'un spectre d'impédance des milieux biologiques.

La partie du spectre d'impédance entre F_{low} et F_c (le premier palier - P1) nous permet de détecter des cellules entre les électrodes et la partie du spectre d'impédance entre F_c et F_{high} (le second palier – P2) nous permet de les caractériser à partir des paramètres électriques et diélectriques du cytoplasme et de la membrane cellulaire. Il est donc nécessaire, au moment de la conception du capteur de veiller à diminuer les capacités parasites de sorte que la fréquence F_{high} soit la plus grande possible.

1.3.2. Méthodes de mesure

Plusieurs techniques de mesure d'impédance sont disponibles. Leur choix dépend de la bande de fréquence à mesurer, la plage de mesure d'impédance, la précision et la facilité d'utilisation de l'appareil. Les techniques les plus utilisées sont la mesure par pont, la mesure par résonance, la technique Volt-Ampèremétrique, la mesure pont auto accordé, la technique RF I-V et la technique d'analyseur de réseau. Les deux dernières techniques sont utilisées pour de hautes fréquences (au-dessus de quelques centaines de MHz) étant donné que dans ces fréquences la mesure de la tension et du courant est très délicate, car la mesure d'impédance est faite à partir des coefficients de réflexion de l'onde électrique. Avec les quatre premières techniques citées ci-dessus, il est possible de mesurer l'impédance du continu jusqu'à 300 MHz [35]. La Figure 1-14 montre un schéma des méthodes de mesures et ses limitations au niveau de fréquence.

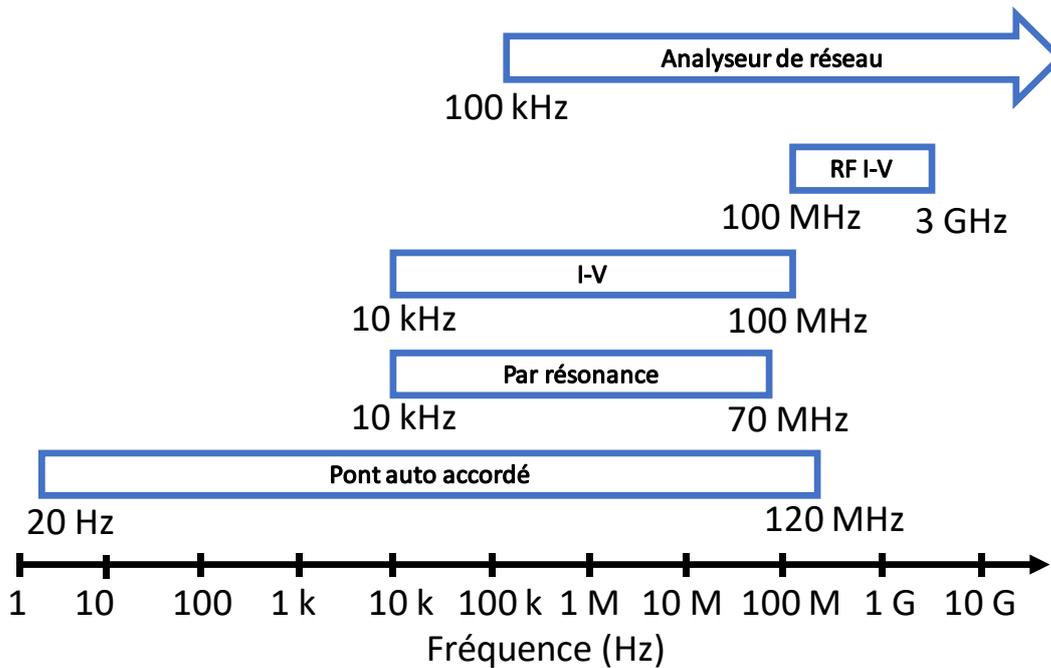


Figure 1-14. Techniques de mesure d'impédance en fonction de la fréquence[35].

- **La mesure par pont**

La mesure par pont, proposée par Wheatstone (et ses variantes Sauty, Nernst, Wien, Maxwell), est réalisée avec quatre composants dont trois sont connus et un est le composant à mesurer. Le schéma électrique du pont est donné dans la Figure 1-15. Lorsque le courant dans la branche du détecteur D est nul le pont est en équilibre. Quand le pont est à l'équilibre, l'équation (1.11) est valide. Ainsi il suffit de varier l'impédance Z_1 jusqu'à obtenir l'équilibre pour calculer l'impédance inconnue.

$$Z_{sol} = \frac{Z_1 Z_3}{Z_2} \quad (1.11)$$

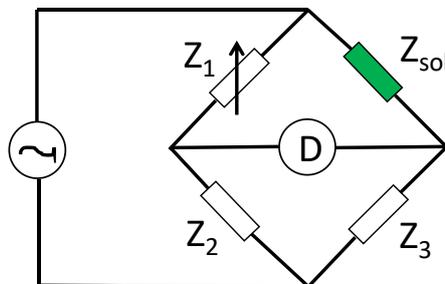


Figure 1-15. Schéma du circuit de mesure d'impédance par pont.

- **La mesure par résonance**

La mesure par résonance est basée sur le principe d'un circuit RLC résonant tel que celui de la Figure 1-16. Normalement l'impédance inconnue est constituée d'une résistance et d'une bobine et ses valeurs sont déterminées à partir du facteur de qualité obtenu à la résonance en ajustant la capacité. Cette technique est peu utilisée pour la bioimpédance, car lors de la résonance, le courant induit peut être élevé et ainsi endommager le milieu biologique. De plus, elle ne fonctionne pas en basses fréquences à cause de la résistance de pertes de la bobine qui n'est plus négligeable, elle ne fonctionne aussi qu'autour d'une fréquence de résonance et que pour un modèle simple RL, RC.

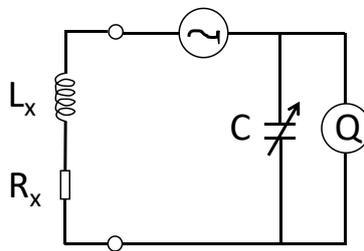


Figure 1-16. Schéma du circuit de mesure d'impédance par résonance. [35]

- **La technique Volt-Ampèremétrie**

L'impédance inconnue peut être calculée directement à partir de la loi d'Ohm avec les mesures du courant et de la tension sur le composant inconnu. Le courant est obtenu à l'aide d'une résistance de précision de valeur connue avec la mesure de la tension entre ces bornes comme schématisé dans la Figure 1-17. Une fois le courant et la tension connus, l'impédance peut être calculée par l'équation (1.12).

$$Z \frac{V_V}{I(j\omega)} = Z_{re} + jZ_{im} \quad (1.12)$$

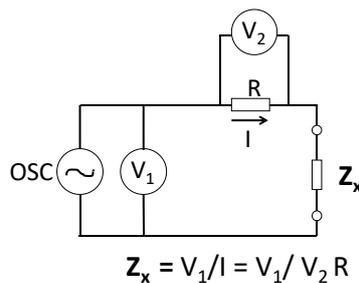


Figure 1-17. Schéma du circuit de mesure d'impédance par la technique Volt-Ampèremétrie. [35]

- **La mesure par pont auto accordé**

Son principe de fonctionnement est basé sur le fait de mesurer la tension appliquée au dispositif sous test (Device Under Test : DUT) et le courant qui le traverse. Une source d'excitation sinusoïdale (OSC dans la Figure 1-18) pour exciter le DUT, un voltmètre (V_x) et un convertisseur I-V sont utilisés comme montré dans la Figure 1-18 pour faire la mesure par pont auto accordé. Comme l'impédance d'entrée de l'amplificateur est idéalement infinie, le courant qui passe par le DUT n'est pas dévié et passe alors par R_r d'où $I_r = I_x$. La borne d'entrée négative de l'amplificateur est à la masse virtuelle et ainsi la tension mesurée par V_r est $I_r \times R_r$ ou $I_x \times R_r$. Comme $Z_{DUT} = V_x / I_x$ et $I_x = I_r = V_r / R_r$ nous avons $Z_{DUT} = R_r \times V_x / V_r$ et nous obtenons ainsi l'impédance à partir de mesures des tensions V_x et V_r .

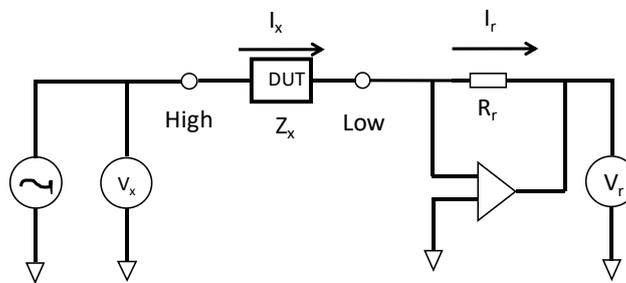


Figure 1-18. Schéma du circuit de mesure d'impédance par pont auto accordé (a) générale et (b) avec un amplificateur opérationnel[35].

1.3.3. Maîtrise des paramètres d'influence sur la mesure

Les mesures d'impédance sont influencées par des paramètres tels que la température, l'hygrométrie, l'acidité, l'hétérogénéité, l'anisotropie et le volume.

La conductivité d'un électrolyte a une forte dépendance avec la température, environ 2% par degré Celsius. À des températures plus élevées, la viscosité de la solution diminue et ainsi la mobilité des ions augmente. À cause de cette dépendance des mesures d'impédance avec la température, l'environnement de mesure doit avoir une température contrôlée ce qui est le cas de nos mesures.

L'acidité, l'hétérogénéité et l'anisotropie sont des paramètres qui peuvent aussi influencer les résultats des mesures d'impédance. Cependant, dans ce travail de recherche ils sont négligés, car nous utilisons de solutions électrolytiques étalonnées de pH neutre, isotrope et homogène avec des conductivités connues.

Comme le champ électrique est dépendant des propriétés électriques du milieu, les mesures d'impédance sont dépendantes du volume de l'échantillon et de la géométrie des électrodes. Par exemple quand le volume de la solution électrolytique est petit (Figure 1-19), le champ électrique circule par la solution et par l'air qui cause un changement de la valeur d'impédance mesurée. Quand le volume est relativement grand, la majorité du champ électrique reste confiné dans un milieu uniforme.



Figure 1-19. Schéma de la distribution du champ électrique (a) dans deux milieux différents et (b) pour une solution uniforme.

1.4. Rappels de microfluidique

Notre dispositif est hybride en ce sens qu'il allie à un principe électrique un dispositif de mobilité des cellules sous test de type fluidique. La microfluidique est la science et technologie de contrôle et manipulation de fluides dans l'échelle du microlitre avec des dimensions aux micromètres. 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. Cette technique a été très utilisée depuis l'avènement des *Lab-on-chip* [36], [37].

Le comportement d'un fluide peut être prévisible et modélisé à partir de la nature de son écoulement (laminaire, transitoire ou turbulent). Le type d'écoulement est défini à partir du nombre de Reynolds, donné par l'équation (1.13),

$$R_e = \frac{\rho_f v d}{\mu} \quad (1.13)$$

où ρ_f est la masse volumique du fluide, μ est la viscosité dynamique du fluide, d est la dimension caractéristique et v la vitesse caractéristique du fluide.

Si la valeur de $R_e \ll 1$, l'écoulement suit le régime de Stokes ; si $1 < R_e < 2000$, l'écoulement est de type régime laminaire ; si $2000 < R_e < 3000$, l'écoulement suit le régime transitoire et ; si $R_e > 3000$, l'écoulement suit le régime turbulent.

Dans les systèmes microfluidiques, les dimensions des canaux sont de dimensions micrométriques et si le fluide à déplacer est de l'eau ($\rho \approx 1000 \text{ kg/m}^3, \mu = 1 \text{ mPa}$), le nombre de Reynolds vaut alors de l'ordre de 10^{-4} . Il est ainsi considéré donc comme un écoulement de Stokes.

Dans le régime d'écoulement de Stokes les effets d'inertie sont négligeables par rapport aux effets visqueux. Cela signifie qu'il y a un équilibre entre forces visqueuses et forces de pression [38], [39]. Dans la pratique cela veut dire que l'écoulement est laminaire et que deux liquides différents ne se mélangent pas sur une longue distance comme schématisé dans la Figure 1-20. Dans une structure en H, les deux liquides vont entrer en contact dans la zone centrale, sans se mélanger, puis repartent chacun de leur côté.

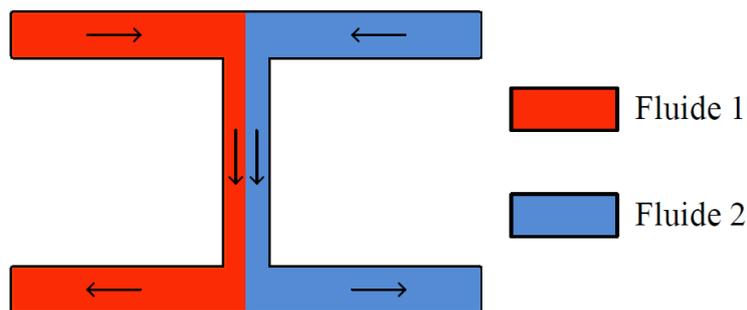


Figure 1-20. Schéma d'une structure en H avec un écoulement laminaire.

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 petite taille 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.

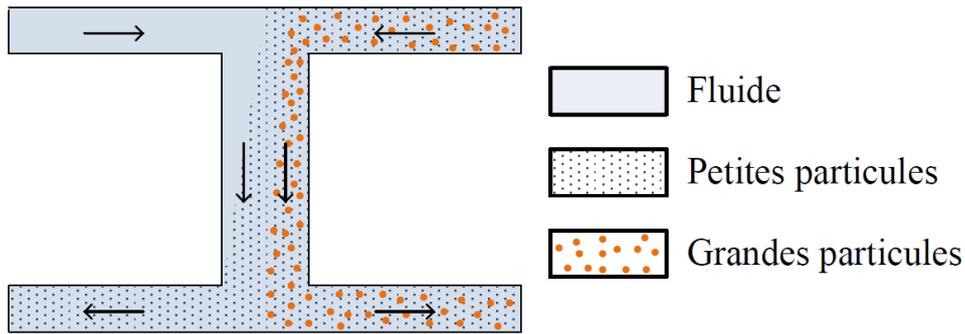


Figure 1-21. Schéma d'une structure en H avec le phénomène de diffusion pour des particules de différentes tailles.

Les paramètres de diffusion pour chaque type de particules peuvent être déterminés à l'aide du nombre de Péclet, défini par:

$$P_e = \frac{U_0 W}{D} \quad (1.14)$$

Dont U_0 représente la vitesse caractéristique du liquide, W est la largeur du canal et D est le coefficient de diffusion de la particule.

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 celles-ci passeront dans la zone de mesure. La laminarité des écoulements permet de réaliser cette manoeuvre simplement. Il suffit par exemple, comme illustré en Figure 1-22, d'injecter symétriquement de part et d'autre du canal principal, une solution tampon par des canaux secondaires[40].

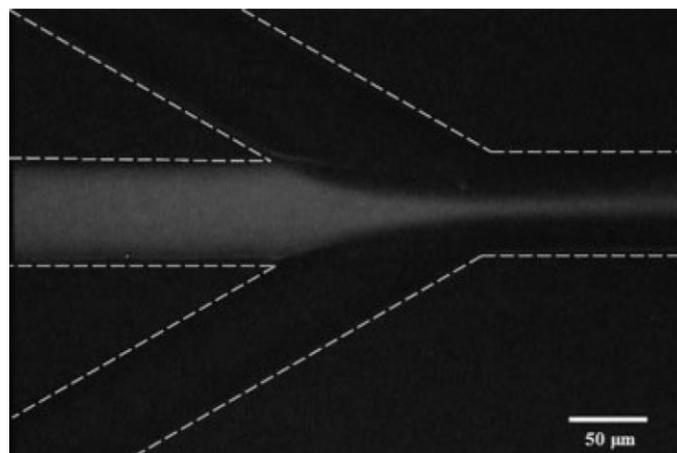


Figure 1-22. Focalisation hydrodynamique réalisée à l'aide de deux canaux secondaires [40].

1.5. Biocapteurs avec microélectrodes

Le capteur est un dispositif qui convertit un signal non électrique en un signal électrique interprétable. Lorsqu'un capteur est développé pour caractériser un milieu biologique, comme : la pression sanguine ; le flux sanguin ; la température du corps ; l'activité électrique au niveau du cœur(par l'ECG) ; l'activité électrique du cerveau (par l'EEG) entre autres, nous parlons de capteur biomédical.

On fait une différenciation entre les capteurs biomédicaux et les capteurs biologiques (plus connus comme biocapteurs). Le capteur biomédical est un dispositif électronique utilisé pour caractériser un milieu biologique. Cette caractérisation peut être faite par un principe physique, par un principe chimique ou par intermédiaire d'un milieu biologique. Quand la caractérisation est faite avec un milieu biologique comme intermédiaire pour l'interprétation du signal, le capteur biomédical est appelé biocapteur. Nous pouvons dire ainsi que le biocapteur est un type de capteur biomédical.

Les capteurs biomédicaux peuvent être classifiés par rapport à leur principe de fonctionnement comme capteur biomédical physique, capteur biomédical chimique et capteur biologique (ou biocapteur) [25]. Dans la Figure 1-23 nous pouvons voir de manière schématique la classification des capteurs biomédicaux avec l'axe principal de ce travail de recherche mis en évidence.

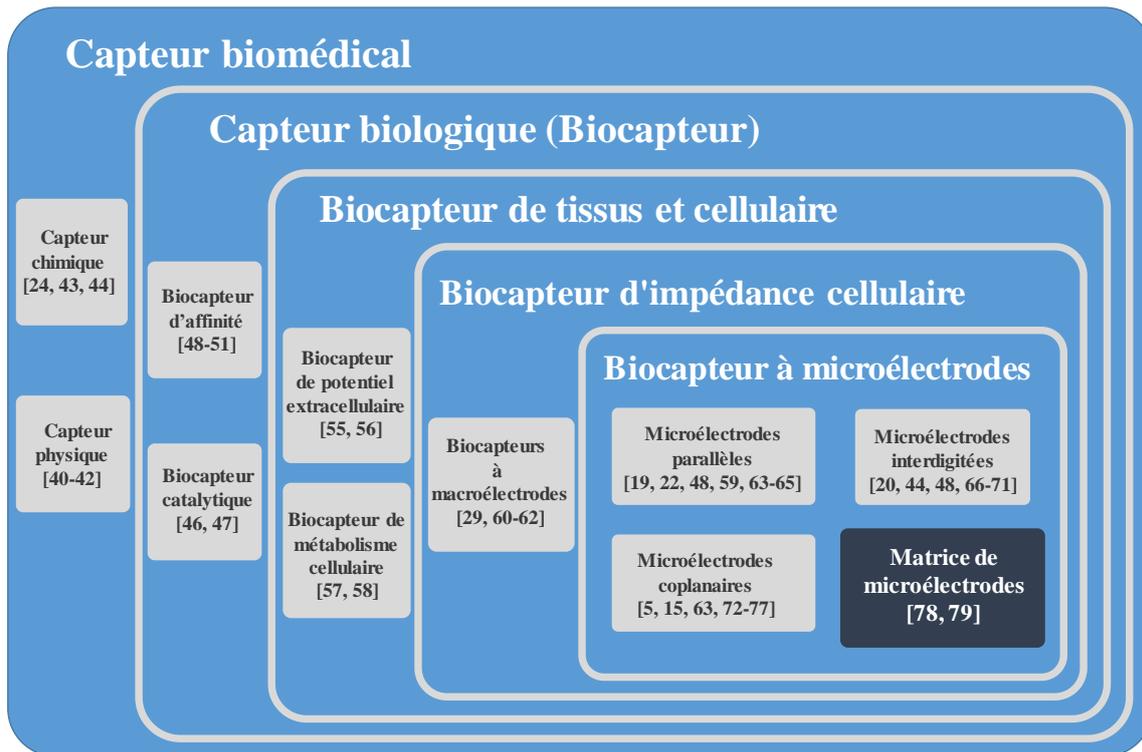


Figure 1-23. Classification des capteurs biomédicaux.

Un capteur biomédical physique utilise un principe physique (électrique, thermique, optique ou magnétique) pour convertir une caractéristique biologique en signal électrique. La mesure de la pression sanguine peut par exemple être faite de manière non invasive avec un capteur capacitif [41]–[43].

Un capteur biomédical chimique transforme une information chimique, comme la concentration d'un échantillon, en un signal électrique exploitable. Ce type de capteur utilise des couches ioniques pour transformer une grandeur non électrique comme le composant, le contenu, la densité, etc. en une grandeur électrique [25]. Une des applications les plus connues pour ce type de capteur c'est la détection et le suivi de gaz toxiques[44] [45].

Un capteur biologique ou biocapteur convertit une caractéristique d'un matériau biologique en une grandeur électrique. De manière générale le biocapteur est composé par un élément biologique (enzyme, anticorps ou cellule) en contact direct avec un élément physicochimique comme une électrode ou une fibre optique comme schématisé dans la Figure 1-24.

Notre travail portant sur un biocapteur, nous le détaillons dans la partie suivante.

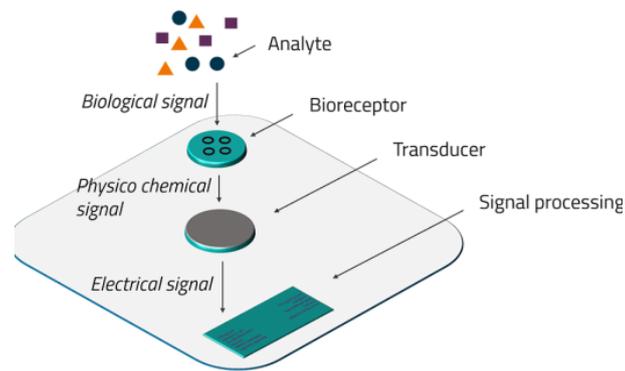


Figure 1-24. Schéma des composants qui constituent un biocapteur [46]

On distingue trois types de biocapteurs : les biocapteurs catalytiques, les biocapteurs d'affinité et les biocapteurs cellulaire et tissulaire.

Les biocapteurs catalytiques sont réalisés avec des enzymes (l'enzyme fonctionne comme un agent de liaison macromoléculaire) ou microorganismes (à la place d'utiliser les enzymes extraites des microorganismes il est utilisé les microorganismes eux-mêmes) [47] [48].

Le biocapteur d'affinité est basé sur la liaison irréversible du composant biologique visé, comme les anticorps et l'ADN. La clé de ce type de capteurs est le dessin et la préparation de l'interface entre le composant biologique et le matériel sensible [49]–[51]. La principale différence entre ces deux biocapteurs est que le biocapteur d'affinité fixe des biomolécules directement sur l'électrode, de manière sélective, amenant certains ions à interagir au niveau de la double couche, tandis que le biocapteur catalytique utilise des molécules catalytiques qui initient ou améliorent de manière sélective certaines réactions au niveau de la double couche [52].

Le biocapteur de cellules et tissu est basé sur les mesures du métabolisme, de l'électrophysiologie ou de l'impédance cellulaires. Il peut être utilisé pour détecter des paramètres tels que le stress, la toxicité et les dérivés organiques. Il peut aussi être utilisé pour surveiller l'effet thérapeutique des médicaments ainsi que pour la détection de microorganismes [53]–[55]. Trois catégories de capteur de cellule et tissus sont distinguées: le biocapteur de potentiel extracellulaire [56] [57], le biocapteur de métabolisme cellulaire [58] [59] et le biocapteur d'impédance cellulaire [60].

Le biocapteur d'impédance cellulaire est basé sur la réponse du système à une excitation électrique via une mesure d'impédance qui permet un test non invasif de l'adhésion, de

l'étalement, de la détection et de la mobilité de cellules. Les biocapteurs d'impédance cellulaire peuvent être classés en fonction de l'échelle des électrodes comme biocapteur à macroélectrodes et biocapteurs à microélectrodes. Le cas des macroélectrodes ne concerne pas nos objectifs, mais nous pouvons citer pour mémoire des travaux de notre équipe telles que la détection de cancer du sein [61], la caractérisation électrique de tissu[30] [62] et la mesure de volume d'eau dans le corps[63].

Les biocapteurs à microélectrodes peuvent aussi être classés en fonction de la géométrie des microélectrodes: structure coplanaire, parallèle ou interdigitée. Ils sont décrits ci-dessous.

1.5.1. Biocapteur à microélectrodes parallèles

Le biocapteur à électrodes parallèles est celui qui présente la distribution du champ électrique le plus uniforme. Cependant, pour le suivi des échantillons biologiques, les électrodes doivent être transparentes ce qui nécessite l'utilisation d'un matériau conducteur transparent. Ils présentent aussi plus de difficulté de réalisation du fait que les électrodes ne sont pas sur le même plan. Malgré ces difficultés de fabrication, plusieurs biocapteurs à électrodes parallèles ont été développés pour la détection de bactéries [64], la caractérisation de cellules biologiques [20] [23] [65], la discrimination cellulaire [66] et le piégeage cellulaire[49] [60] [67].

Ameri et coll [60] ont développé un biocapteur avec électrodes parallèles pour attirer des cellules vers la surface de l'électrode pour les caractériser par spectroscopie d'impédance. Ce dispositif permet également d'éliminer les cellules pour faciliter le processus de nettoyage. Les auteurs ont utilisé un système microfluidique avec des cavités et électrodes parallèles pour déplacer l'échantillon avec les cellules, la diélectrophorèse permettant d'attirer les cellules sur les électrodes. Les cellules restées hors des cavités ont été retirées du canal par un écoulement de solution saline. Les cellules qui sont dans la cavité sont ensuite caractérisées par spectroscopie d'impédance. Enfin, pour faciliter le nettoyage, les cellules sont détruites par application d'un champ électrique intense. Dans la Figure 1-25, une illustration de cette procédure est donnée[60].

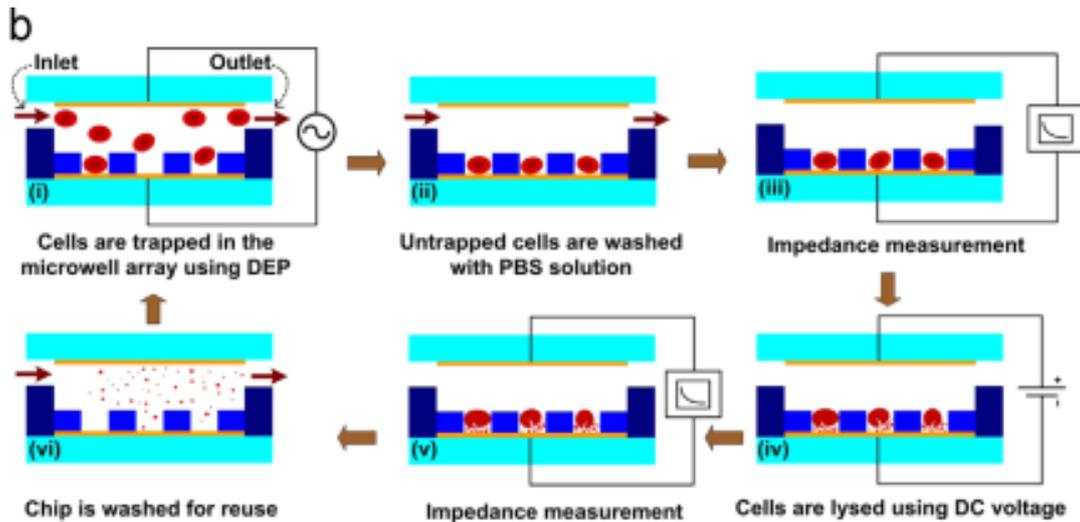


Figure 1-25. Schéma des procédures utilisées dans [60].

1.5.2. Biocapteurs à microélectrodes interdigitées

La structure des électrodes interdigitées est composée par des électrodes en forme de peigne (comme montré dans la Figure 1-26). Comme les électrodes interdigitées sont déposées sur un seul plan, les procédures de fabrication peuvent être plus simples comparées aux électrodes parallèles avec possibilité d'utiliser des conducteurs classiques pour l'application biologique telle que l'or ou le platine. Plusieurs biocapteurs de ce type ont été proposés pour la détection de bactéries [45] [49] [67]–[70] ou pour l'adhésion cellulaire [71].

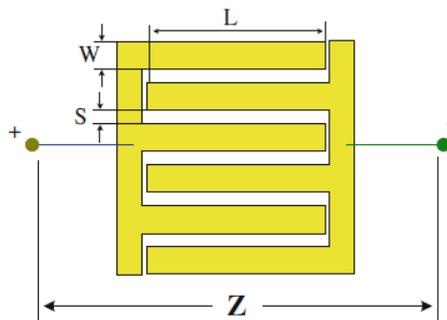


Figure 1-26. Schéma d'une paire d'électrodes interdigitées [72].

Varshney et coll. ont développé un biocapteur à électrodes interdigitées pour la détection rapide et spécifique de la bactérie *E. coli* pathogène dans la viande hachée [21]. Ils ont utilisé des nanoparticules magnétiques conjuguées avec des anticorps et un aimant permanent d'attirer l'ensemble nanoparticules plus bactéries vers les électrodes comme cela est montré dans la Figure 1-27. Avec ce système, une concentration de 7.4×10^4 CFU/ml de

bactéries *E. coli* en culture pure et une concentration de 7.4×10^4 CFU/ml de bactéries *E. coli* dans la viande hachée ont été détectées avec une durée de mesure de 35 minutes.

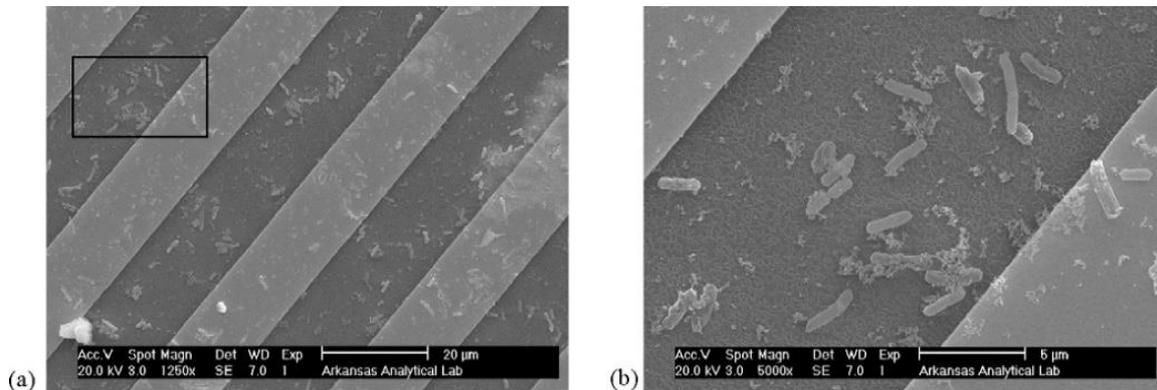


Figure 1-27. Image des bactéries *E. coli* entre les électrodes interdigitées [21].

1.5.3. Biocapteurs à microélectrodes coplanaires

Les biocapteurs à microélectrodes coplanaires (Figure 1-28) comme les biocapteurs à microélectrodes interdigitées, ont des électrodes sur un seul plan et peuvent être fabriqués avec les procédures classiques de déposition de métal.

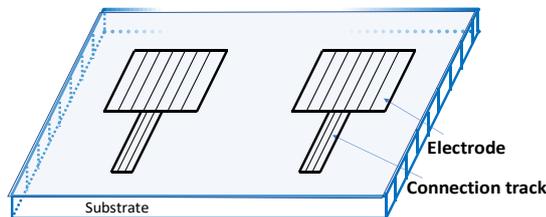


Figure 1-28. Schéma d'une paire d'électrodes coplanaires

La principale différence entre les capteurs à électrodes interdigitées et ceux à électrodes coplanaires vient d'une distribution du champ électrique plus surfacique pour les interdigitées (le champ électrique plus proche des électrodes) alors qu'elle est volumique pour les coplanaires, comme affiché dans la Figure 1-29(a) pour les électrodes coplanaires et la Figure 1-29(b) pour les électrodes interdigitées.

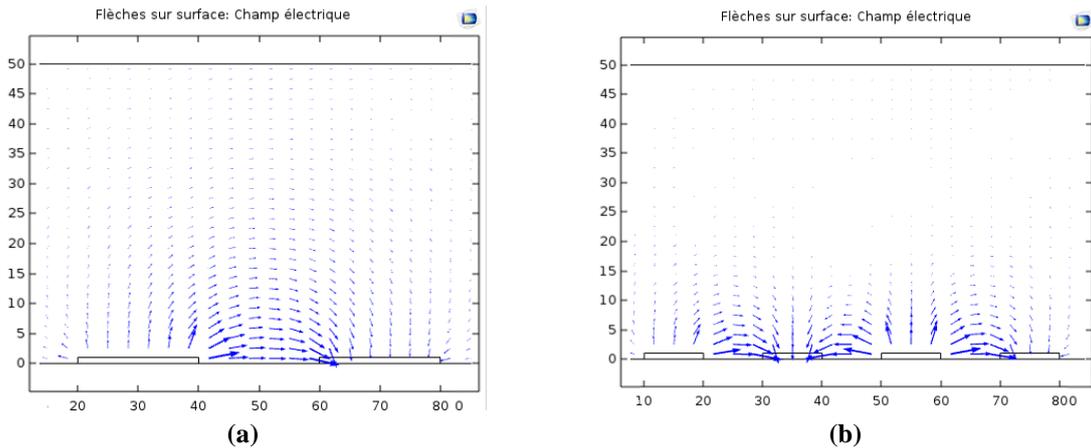


Figure 1-29. Distribution du champ électrique en 2D (a) d'une paire d'électrodes coplanaires et (b) des électrodes interdigitées.

Avec des microélectrodes coplanaires, il y a des biocapteurs pour la détection de bactéries[64], le comptage de cellules[73] ou la détection de pathologies [16].

Clausen et coll.[64] ont développé un biocapteur avec des électrodes coplanaires pour la détection et la différenciation de bactéries *E. coli*. Ils ont pu distinguer des bactéries *E. coli* de microbilles de dimensions similaires (1 et 2 μm) en utilisant la phase de l'impédance dans une fréquence de 7 MHz et 8 MHz, comme montré dans la Figure 1-30. Ils ont aussi réussi à discriminer les bactéries gram-positives de bactéries gram-négatives avec une limite de détection de 522 bactéries/mL. Cette discrimination repose sur les caractéristiques membranaires et de paroi de la bactérie et peut être utilisée pour décider le traitement antibiotique. Historiquement, c'est un procès chimique appelé coloration de Gram (d'où le nom) qui a été utilisé pour discriminer ces types des bactéries.

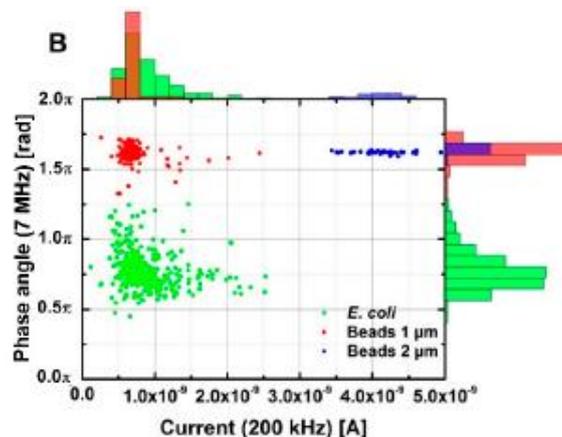


Figure 1-30. Distribution des valeurs de mesures en fonction du courant et de la phase pour trois échantillons différents[64].

Romen et coll[73] ont aussi développé un biocapteur avec des électrodes coplanaires, mais pour le comptage de cellules. Ils ont utilisé un système microfluidique 3D pour placer les cellules au centre des électrodes, comme schématisé dans la Figure 1-31. Avec ce système microfluidique, les cellules peuvent être centrées entre les électrodes aussi bien horizontalement que verticalement. Ils ont montré qu'en utilisant le centrage horizontal et vertical de façon identique ils augmentent en un facteur de 1,6 le pouvoir de détection comparé à l'utilisation du centrage en une seule direction.

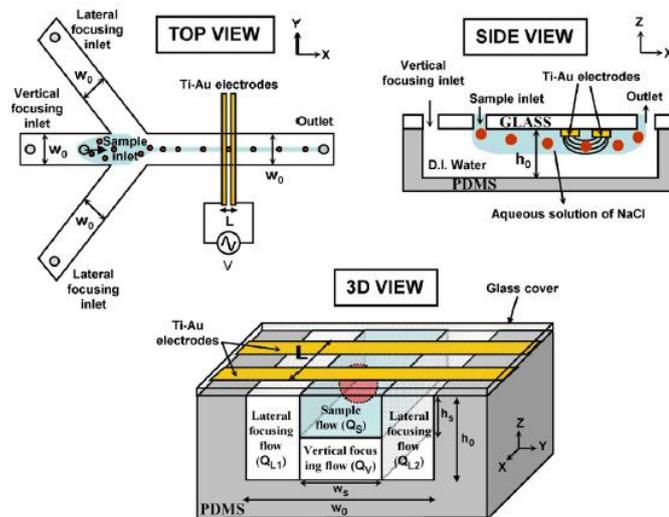


Figure 1-31. Schéma du système microfluidique 3D utilisé par [73]

Notre équipe a développé par le passé des capteurs avec électrodes coplanaires et à électrodes interdigitées. Les capteurs avec électrodes coplanaires ont été développés pour la cytométrie de flux de cellules sanguines avec des résultats de discrimination sur des mesures avec des levures, du sang et des billes de 6 μm calibrés [6] [74] [75]. Les capteurs avec électrodes interdigitées ont été optimisés pour améliorer la bande de fréquence [76] [77] et développés pour la détection de séquences d'ADN par spectroscopie d'impédance et l'analyse sanguine [78].

1.5.4. Biocapteurs à matrice de microélectrodes

Les biocapteurs à matrice de microélectrodes peuvent être utilisés pour faire des mesures microscopiques (à l'échelle de cellules unitaires) ou macroscopiques (à l'échelle de tissus ou concentration de cellules). Les électrodes étant adressables indépendamment permettent d'effectuer un grand nombre de mesures dans chacune des zones discrètes couvertes par une électrode.

1.5.5. Optimisation des capteurs à microélectrodes

Les fréquences de coupure des capteurs étant dépendantes des géométries et des matériaux des électrodes, l'optimisation géométrique peut induire une augmentation de la plage de mesure et une diminution des erreurs. Pejic et al [81] rappellent que l'optimisation du dimensionnement des électrodes d'un capteur est l'une des étapes les plus cruciales dans la réalisation d'un dispositif de mesure d'impédance.

Tuan et Mouhamad [76] [77] ont fait des améliorations au niveau des géométries des électrodes interdigitées, dont ils ont montré que le rapport optimal de la distance entre les électrodes sur la largeur des électrodes est de 0,66.

La fréquence de coupure basse dépend fortement de la capacité de l'interface métal-électrolyte. Plus petite est la surface des électrodes, plus petite est la capacité et ainsi plus grande est la fréquence F_{low} de sorte que la bande de fréquence de mesure utile diminue. Une manière d'augmenter la surface d'interface métal-électrolyte (pour améliorer la bande de fréquence) et garder le volume du champ électrique (pour avoir une bonne sensibilité) est avec l'utilisation d'électrodes microporeuses telles que le platine noir[79].

Pour optimiser le biocapteur en fonction de la fréquence de coupure haute et ainsi augmenter la bande de fréquence, Price et al [26] ont joué sur la structure des électrodes. Ils ont diminué la largeur des pistes de connexion et ils ont ajouté une couche épaisse d'isolant sur les pistes de connexion de sorte qu'ils ont augmenté la fréquence de coupure haute jusqu'à 10 MHz. Ils ont utilisé des électrodes rondes avec le diamètre de centaines de micromètres. L'optimisation des microélectrodes pour la mesure de cellules unitaires avec une dizaine de micromètres est manquante dans la littérature, ainsi nous avons analysé et proposé des améliorations pour la bande de fréquence et principalement pour la variation d'impédance normalisée.

1.6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les concepts de base permettant de comprendre les propriétés électriques et diélectriques de cellules de mesures électrochimiques non faradiques par Spectroscopie d'Impédance. Dans ce contexte, nous avons défini le moment dipolaire, rappelé la formation d'une solution électrolytique, défini la conductivité ionique, montré les mécanismes de polarisation d'un matériau, défini les processus faradique et non faradique et nous avons proposé des modèles à circuits discrets des tissus et cellules biologiques.

Parmi les bases rappelées dans ce chapitre, nous avons évoqué les méthodes de mesures d'impédance par Spectroscopie d'Impédance et les généralités sur la microfluidique.

Dans la dernière partie, nous avons proposé une classification des capteurs médicaux. Cette classification nous a permis via une vision globale des types de capteurs existants pour les applications au vivant de nous focaliser sur les biocapteurs à microélectrodes pour la détection de cellules biologiques. Les principales difficultés dans la détection de cellules biologiques (principalement microorganismes) sont liées à la limite de détection et à la durée de mesure.

Dans la continuité des travaux de notre équipe au sein de l'Institut Jean Lamour et sur une base comparative avec les travaux d'autres auteurs, nos études se sont concentrées sur un système simple et économique pour viser la limite de détection à l'échelle unitaire de façon relativement rapide

Chapitre 2 :
Modélisation analytique et numérique d'un
biocapteur à électrodes coplanaires

2.1. Introduction

En caractérisation électromagnétique de milieux biologiques, les fréquences de coupure de même que la variation d'impédance normalisée sont des paramètres déterminants pour la conception et le développement de biocapteurs sur puce. La connaissance de la bande passante, donc des fréquences de coupure, permet de proposer un modèle électrique maîtrisé en vue d'analyser et d'extraire des paramètres intrinsèques aux échantillons biologiques. La variation d'impédance normalisée nous indique la sensibilité du capteur relative à une très petite quantité de cellules voire à une cellule isolée.

Dans ce chapitre, nous justifions le choix de la structure du capteur retenue par celui de la géométrie des électrodes qui a été fait à partir de simulations. Une fois les géométries des électrodes choisies, nous avons développé un modèle électrique pour avoir une idée du comportement fréquentiel et de la variation d'impédance en fonction des paramètres géométriques des électrodes et des pistes de connexion. Cette approche s'inscrit dans l'expérience de notre équipe de recherche[74], [75] . À partir du modèle électrique, nous avons développé les équations analytiques et tracé les courbes des fréquences de coupure et de la variation d'impédance normalisée.

Pour prendre en compte des effets non modélisables analytiquement, comme la dispersion du champ électrique due aux effets de bord des électrodes, nous avons effectué des simulations par la méthode des éléments finis (*Finite Element Method-FEM*) en utilisant le logiciel COMSOL (COMSOL Multiphysics®). Dans cette partie, nous avons analysé les effets sur les fréquences de coupure et sur la variation d'impédance des dimensions des électrodes, des dimensions des pistes de connexion, de la taille des cellules et de leurs positionnements.

Entre autres résultats, nous avons observé que les pistes de connexion peuvent réduire la variation d'impédance normalisée. Pour minimiser les effets des pistes de connexion, nous avons proposé l'utilisation d'une couche d'isolant sur celles-ci. Nous avons adapté les modèles électriques existants à cette nouvelle structure et nous avons fait des simulations pour vérifier les effets de l'addition de la couche d'isolant.

Afin de pouvoir positionner les cellules de sorte à pouvoir les caractériser par spectroscopie d'impédance nous avons proposé l'utilisation d'une cavité de piégeage (puits).

La première partie de ce chapitre précise et justifie le choix de la structure d'électrodes ; dans la deuxième partie, la modélisation électrique d'une cellule biologique entre deux

électrodes, sans prise en compte des pistes de connexion, est développée ; la troisième partie décrit les simulations permettant de choisir la géométrie des électrodes ; la quatrième partie présente la conception du capteur ; la cinquième partie traite du modèle électrique et de ses équations analytiques ; la sixième partie reprend les simulations en prenant en compte les effets parasites ; enfin, la septième et dernière partie présente l'optimisation du capteur.

2.2. Choix de la structure des électrodes

En prenant comme base les travaux déjà développés au sein de notre équipe et les références bibliographiques, nous avons opté pour la réalisation d'une matrice d'électrodes coplanaires adressables pour la détection de cellules biologiques. Cette structure est innovante et permet d'avoir une limite de détection basse, c'est-à-dire de pouvoir détecter une faible quantité de cellules. Nous avons aussi réfléchi à l'utilisation possible d'électrodes parallèles, cependant la fabrication de cette structure demande des étapes supplémentaires de microalignement de deux substrats/capteurs qui complexifie la fabrication. Les électrodes parallèles nécessitent aussi l'utilisation d'électrodes transparentes, pouvant être réalisées avec des matériaux tels que l'oxyde d'indium-étain, si l'on désire un suivi au microscope des cellules présentes dans la zone de mesure. Ces techniques et matériaux ne sont pour le moment pas disponibles au sein du centre de compétences MiNaLor (Micro et Nanotechnologies en Lorraine) de notre laboratoire. Le centre de compétences (CC) MiNaLor rassemble des équipements et des compétences nécessaires à la mise en œuvre de procédés de micro et nanofabrication.

2.3. Modélisation électrique d'une cellule entre deux électrodes sans pistes de connexion

Le modèle électrique de la Figure 2-1 est utilisé pour une cellule en suspension entre deux électrodes parallèles identiques [20]. Différemment du modèle classique proposé par Fricke, dans ce modèle les effets capacitifs d'interface et du milieu sont pris en compte.

Les effets d'interface entre l'électrode et la solution électrolytique étant de type capacitif (effet de double couche), ils sont représentés par un condensateur C_{dl} , la résistance et la capacitance de la solution étant respectivement notées R_m et C_m . Comme il a été vu au premier chapitre, le cytoplasme étant formé par une solution ionique, il est représenté par une résistance R_{cy} et la membrane cellulaire formée de lipides par une capacitance C_{mem} .

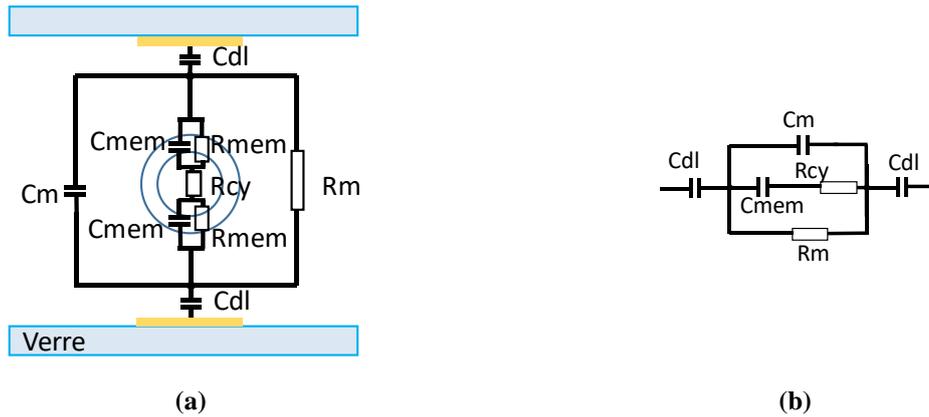


Figure 2-1. Schéma électrique équivalent (a) pour une paire d'électrodes parallèles avec une cellule au milieu et (b) son modèle électrique [20].

Pour une cellule entre deux électrodes coplanaires, nous pouvons utiliser le modèle de la Figure 2-2 qui est similaire au modèle pour les électrodes parallèles. Cependant, leurs valeurs d'impédances sont différentes à cause du facteur de forme. Le facteur de forme pour les électrodes parallèles est défini simplement comme le rapport de la surface des électrodes sur la distance entre les électrodes, tandis que celui pour les électrodes coplanaires peut être déterminé par l'équation (2.1):

$$K = \frac{L \ln \left[\frac{2}{4 \sqrt{1 - \frac{s^2}{(s+2w)^2} - 1}} \left(\sqrt[4]{1 - \frac{s^2}{(s+2w)^2} + 1} \right) \right]}{377\pi v_0 \epsilon_0}, \quad (2.1)$$

où :

- L est la longueur
- w est la largeur
- s est la distance entre les électrodes
- v_0 est la vitesse de la lumière au vide
- et ϵ_0 la permittivité de l'air.

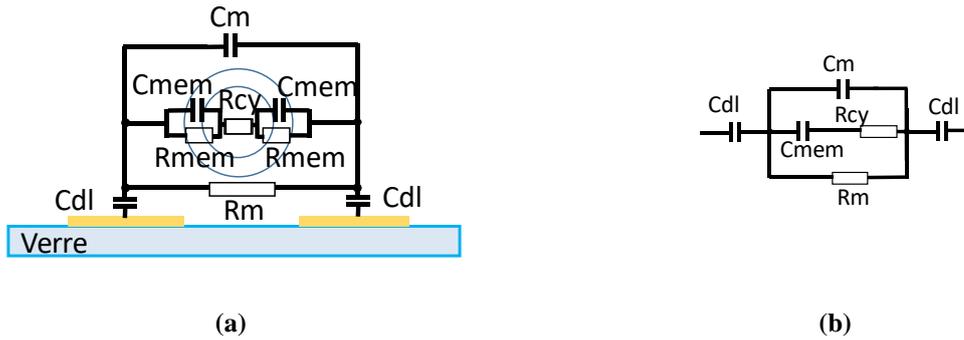


Figure 2-2. Schéma des composants électriques (a) pour une paire d'électrodes coplanaires avec une cellule centrée et (b) son modèle électrique.

2.4. Choix de la géométrie des électrodes

Une fois que la structure des électrodes a été choisie, il a fallu choisir leur géométrie. Pour cela, nous avons réalisé des simulations par FEM avec le logiciel COMSOL. Les paramètres de simulations utilisés sont donnés dans le Tableau 2-1. Les cellules biologiques sont, de manière simplifiée, composées d'un cytoplasme et d'une membrane. Le cytoplasme peut être considéré comme un matériau conducteur et la membrane comme un matériau isolant. Pour représenter une cellule avec COMSOL nous avons utilisé deux sphères concentriques, comme illustrées dans la Figure 2-3, avec une différence de rayon de $0,75 \mu\text{m}$. La partie centrale représente le cytoplasme et la partie externe représente la membrane. L'épaisseur de la membrane d'une cellule biologique est d'environ 10 nm , cependant réaliser des simulations avec un tel écart de dimensions (ordre micrométrique pour le rayon cellulaire et ordre nanométrique pour l'épaisseur de la membrane) nécessite de disposer d'une grande puissance de calcul. Pour pouvoir effectuer les simulations avec des ordinateurs classiques, l'épaisseur de la membrane a été augmentée à $0,75 \mu\text{m}$ et sa permittivité a été adaptée pour maintenir une capacité surfacique de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [75].

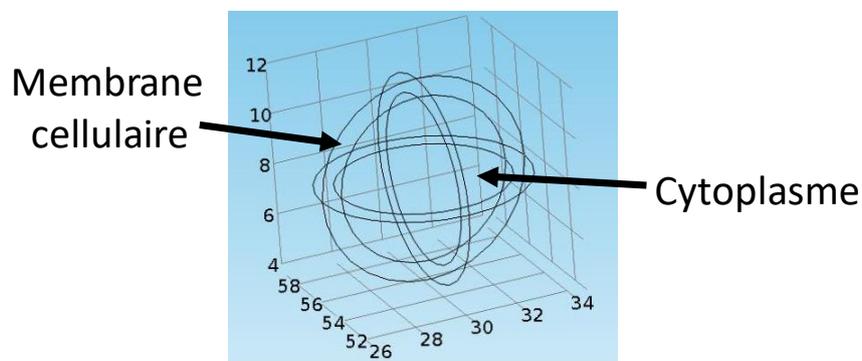


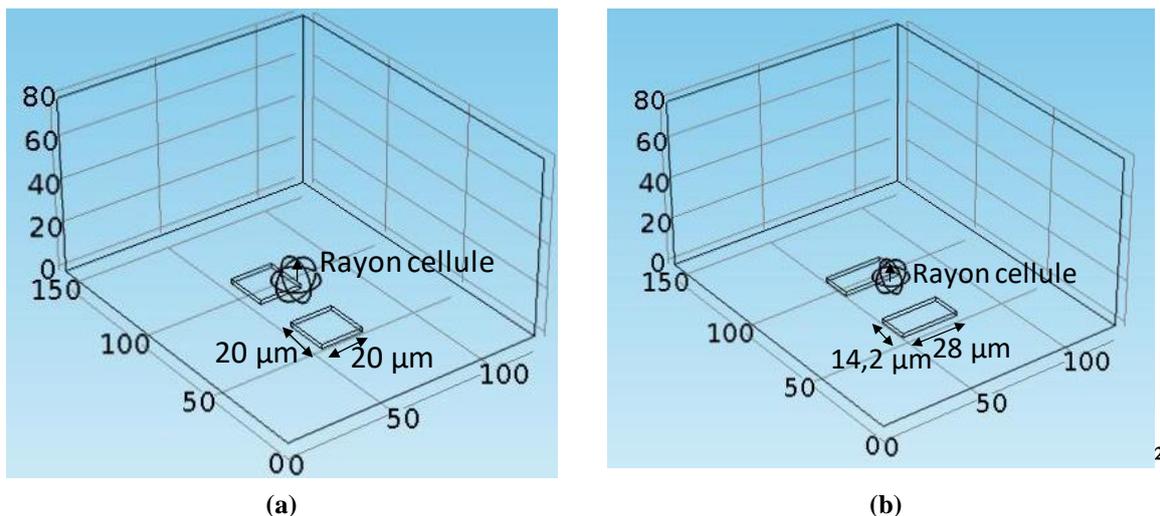
Figure 2-3. Modèle d'une cellule biologique pour les simulations par FEM.

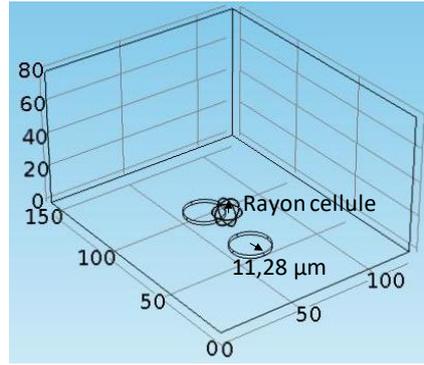
Tableau 2-1. Paramètres des matériaux dans les simulations

Matériau	Conductivité (S/m)	Permittivité relatif	Référence
Substrat	1×10^{-13}	4	COMSOL
Électrodes	$8,9 \times 10^6$	1	COMSOL
Cytoplasme	1	78	[75]
Membrane	1×10^{-13}	847	[75]
Milieu	1	78	[75]

Pour choisir la géométrie des électrodes coplanaires, nous avons analysé la variation d'impédance normalisée et les fréquences de coupure basse et haute. Les simulations ont été effectuées avec trois géométries différentes : carrée, circulaire et rectangulaire. Le choix de ces géométries a été dicté par la possibilité d'une distribution volumique du champ électrique que la géométrie interdigitée ne permet pas, sa distribution du champ électrique étant plus surfacique.

La surface des électrodes est un paramètre qui modifie la variation d'impédance normalisée de même que les fréquences de coupure. Pour n'avoir que l'effet de la géométrie des électrodes, nous avons maintenu la valeur de surface des électrodes constante à $400 \mu\text{m}^2$. Nous n'avons pas pris en compte les pistes de connexions et nous avons maintenu une distance entre les centres des électrodes de $40 \mu\text{m}$. La Figure 2-4 montre les géométries et dimensions d'électrodes utilisées pour ces simulations.





(c)

Figure 2-4. Bloc de simulation et dimensions des électrodes pour les géométries (a) carrées (b) rectangulaire et (c) circulaire.

2.4.1. Variation d'impédance normalisée

Pour notre travail, la variation d'impédance normalisée représente la signature lorsqu'une cellule biologique est détectée, donc positionnée entre les électrodes. Plus grande est la variation d'impédance normalisée plus facile est la détection d'une cellule. L'obtention de ce paramètre est réalisée avec deux valeurs d'impédance dans une fréquence spécifique entre F_{low} et F_{high} : l'impédance de référence (Z_{ref}) est l'impédance à vide (sans cellule entre les électrodes), et l'impédance en charge (Z_{cell}) est l'impédance avec une cellule entre les électrodes. La variation d'impédance normalisée est calculée comme décrit dans l'équation (2.2) :

$$\Delta|Z|_n = (Z_{cell} - Z_{ref})/Z_{ref} \quad (2.2)$$

Pour obtenir la géométrie pour laquelle la variation d'impédance est la plus grande, nous avons calculé la variation d'impédance normalisée en fonction du rayon de la cellule. Nous avons fait varier le rayon de la cellule entre 2 μm et 10 μm et nous observons que plus grande est la cellule, plus grande est la variation d'impédance normalisée comme présenté sur la Figure 2-5. Cela est logique, car plus grande est la cellule plus le champ électrique est perturbé et donc l'impédance augmentée. Nous observons que la géométrie circulaire a une variation d'impédance normalisée plus grande que la géométrie carrée d'environ 5%, pour une cellule de 8 μm , et que ces deux dernières ont de meilleurs résultats que la géométrie rectangulaire. Cette différence est due au fait que le champ électrique pour la géométrie rectangulaire est plus dispersé contrairement aux configurations carrée et circulaire pour

lesquelles il est plus concentré. Nous pouvons donc en conclure que les géométries carrée et circulaire sont à privilégier face aux électrodes rectangulaires.

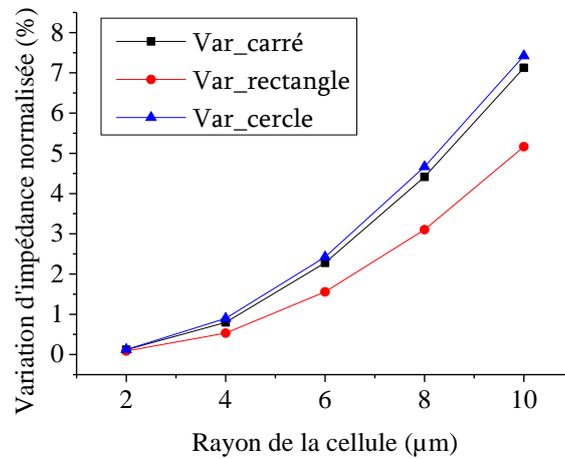


Figure 2-5. Graphique de la variation d'impédance normalisée en fonction du rayon de la cellule pour les géométries d'électrodes carrées, rectangulaires et circulaires.

2.4.2. Bande passante

Pour analyser la fréquence de coupure basse, les effets de double couche ont été prises en compte dans les simulations. L'épaisseur de la double couche est à l'échelle nanométrique et les dimensions des électrodes sont micrométriques et cet écart d'échelles nécessite de nouveau une puissance de calcul importante. Pour contourner ce problème, comme pour le modèle de simulation de la membrane cellulaire, une adaptation des dimensions de la double couche et de sa valeur de permittivité électrique a été faite. L'épaisseur de la double couche et sa permittivité relative ont été fixées respectivement de $1,5 \mu\text{m}$ et $1,7 \times 10^3$. Avec ces valeurs la capacité surfacique de la double couche de simulation est de $0,01 \text{ F/m}^2$, comme estimé dans [72]. Ces simulations nous ont permis d'obtenir les fréquences de coupure basses et les fréquences de coupure hautes pour les trois géométries analysées. Elles sont résumées dans le Tableau 2-2. Nous pouvons ainsi remarquer que la différence de fréquences entre les trois géométries est faible. Cela est dû au fait que la variation du facteur de forme est elle-même faible. Pour des surfaces d'électrodes identiques, le type de géométrie ne semble pas être un critère prépondérant concernant les fréquences de coupure.

Tableau 2-2. Fréquences de coupure basse et haute pour les géométries analysées

	Carré	Rectangle	Cercle
F_{low} (Hz)	26 KHz	22 KHz	18 KHz
F_{high}	228 MHz	222 MHz	217 MHz

2.5. Structure du capteur

Après les simulations comparatives entre les différentes géométries, nous avons choisi de poursuivre le développement du capteur avec la géométrie carrée en laissant la géométrie ronde pour une étude future. Pour augmenter le débit de cellules détectables/caractérisables, nous utilisons une matrice d'électrodes. Nous avons limité le nombre d'électrodes à quatre au début pour valider la structure et analyser les effets parasites. Cette étude permettra d'étendre par la suite le nombre d'électrodes. Pour faire déplacer et centrer les cellules biologiques sur les électrodes, éviter l'évaporation de la solution liquide et maintenir le volume constant sur les électrodes, nous utilisons un canal microfluidique.

Pour établir le modèle, nous définissons le coefficient de remplissage du capteur comme étant le rapport entre le volume de la cellule biologique et le volume d'investigation. Celui-ci peut être défini comme le volume de référence concentrant plus de 95% de l'énergie du champ électrique appliqué.

Pour un suivi au microscope des cellules présentes dans la zone de mesure nous avons opté pour l'utilisation d'un substrat transparent en verre. Le schéma du capteur est donné sur la Figure 2-6.

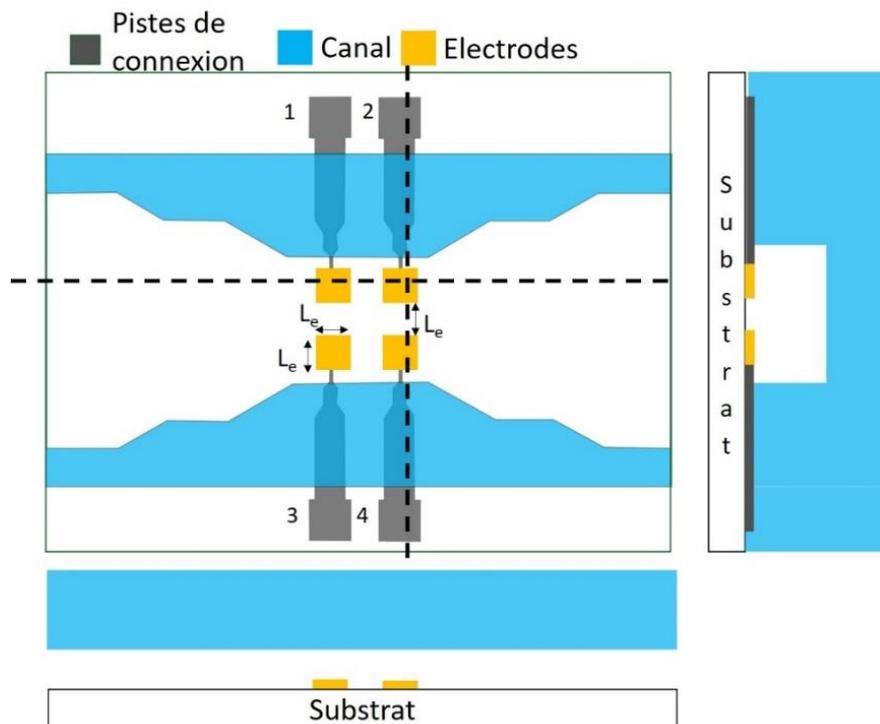


Figure 2-6. Schéma de la structure du capteur à concevoir.

2.6. Modèle électrique du capteur à électrodes coplanaires

À partir du modèle de la Figure 2-2, nous avons conçu un nouveau modèle adapté à la structure du capteur. Celui-ci est présenté dans la Figure 2-7. Dans ce nouveau modèle, nous avons pris en compte les effets du substrat ainsi que les effets parasites entre les pistes de connexions dues au substrat, à la solution présente entre les pistes et aux parois du canal. Les descriptions des résistances et capacités du modèle sont présentées dans le Tableau 2-3:

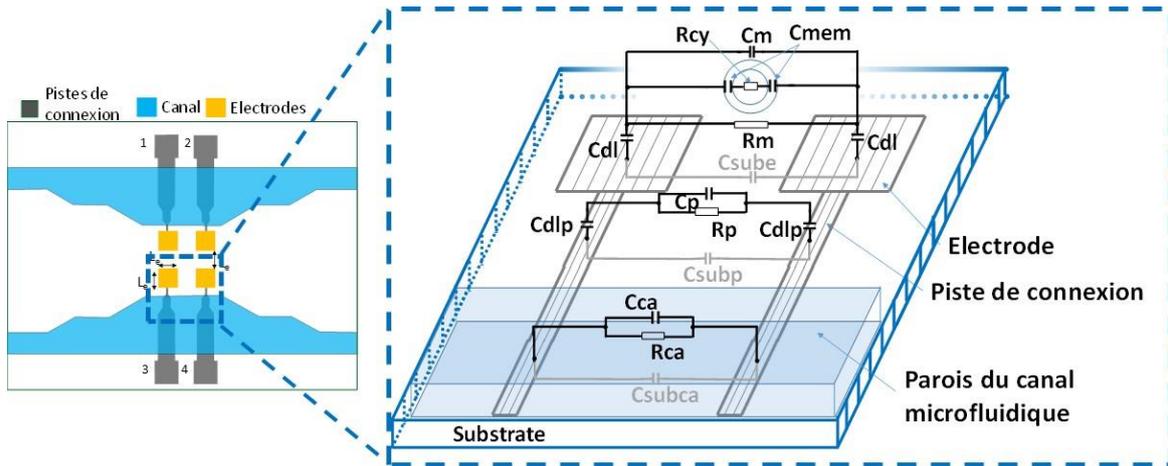


Figure 2-7. Modèle électrique d'une paire d'électrodes coplanaires avec la paroi du canal.

Tableau 2-3. Définitions des composants du modèle électrique

Component	Description
C_{dl}	Capacité de double couche des électrodes
C_m	Capacité du milieu
R_m	Résistance du milieu
R_{cy}	Résistance du cytoplasme
C_{mem}	Capacité de la membrane cellulaire
C_{sube}	Capacité du substrat sous l'électrode
C_{subp}	Capacité du substrat sous les pistes
R_p	Résistance de pistes de connexion
C_{dlp}	Capacité de double couche des pistes de connexion
C_p	Capacité des pistes de connexion
C_{subca}	Capacité du substrat sous les canaux
C_{ca}	Capacité des pistes sous le canal
R_{ca}	Résistance des pistes sous le canal

Pour les pistes de connexions internes au canal, l'effet capacitif de double couche (C_{dlp}) est présent, car les solutions électrolytiques sont en contact avec le métal des pistes. Pour les pistes de connexions internes au canal, il y a aussi les effets résistif et capacitif du milieu qui dépendent du facteur de forme des pistes K_p , de la conductivité et de la permittivité de la solution électrolytique. Dans cette partie du capteur, il y a aussi l'effet capacitif du substrat (C_{subp}). Comme la solution électrolytique a une permittivité et une conductivité beaucoup plus grandes que celles du substrat, les effets de celui-ci ne vont apparaître qu'au-delà de F_{high} .

Pour les pistes de connexions externes au canal (placées en dessous de la structure qui le forme), il existe des effets capacitifs et résistifs dépendant de son facteur de forme K_{plar} , de la conductivité et la permittivité du matériau du canal et du substrat. L'effet résistif de cette partie (R_{ca}) peut être négligeable, car la conductivité du matériau qui forme le canal est normalement très faible. Cependant les effets capacitifs ne peuvent pas être négligés, car le champ électrique passant par le substrat et au-dessus des pistes crée des capacités parasites (C_{subca} et C_{ca}) qui influencent la valeur de F_{high} .

La Figure 2-8 donne le modèle électrique d'une paire d'électrodes coplanaires avec les composants parasites.

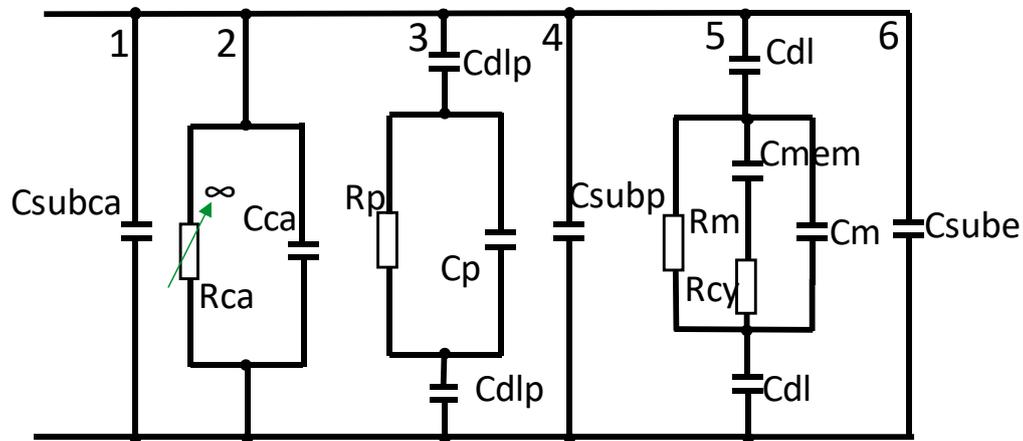


Figure 2-8. Modèle électrique planaire d'une paire d'électrodes coplanaires avec les composants parasites.

La Figure 2-9 représente le spectre d'impédance d'un milieu biologique (comme celui montré à la Figure 1-13 en montrant cette fois-ci la prépondérance des effets sous forme de modèles électriques équivalents dans chaque bande de fréquence.

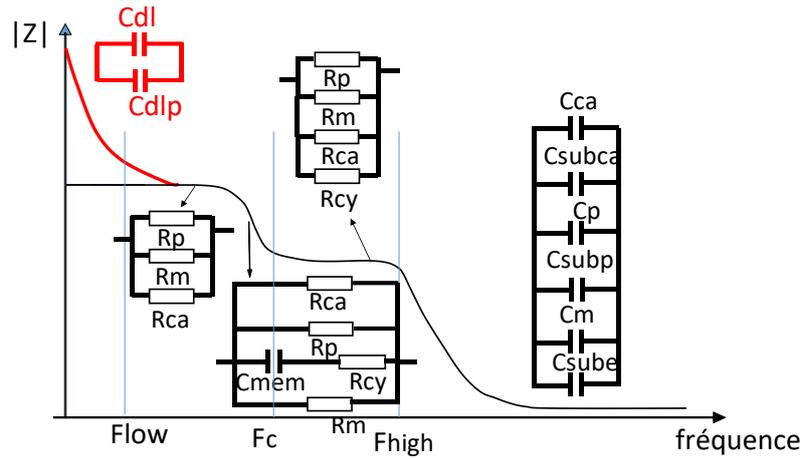


Figure 2-9. Représentation du spectre d'impédance d'un milieu biologique avec les composants électriques dominants dans chaque bande de fréquence.

Pour les fréquences inférieures à F_{low} , les effets des capacités de double couche des électrodes (C_{dl}) et des pistes de connexion interne au canal (C_{dlp}) sont prépondérants. Dans la bande de fréquence entre F_{low} et F_{cell} (palier P1) se forme le premier palier mettant en évidence les effets des résistances du milieu (R_m), du canal (R_{ca}) et des pistes (R_p). Lorsque l'impédance de la membrane cellulaire diminue l'effet de la résistance du cytoplasme apparait en parallèle avec les autres résistances de telle manière qu'un deuxième palier se forme entre F_{cell} et F_{high} (palier P2). Aux fréquences supérieures à F_{high} tous les effets des capacités parasites des pistes de connexions (dues au substrat et au canal) s'ajoutent à la capacité du milieu.

Les composants électriques équivalents du milieu et de la cellule biologique peuvent être calculés à partir de paramètres intrinsèques comme décrit dans les équations (2.3) – (2.6) [20].

$$R_m = \frac{1}{\sigma_m \left(1 - \frac{3\phi}{2}\right) K} \quad (2.3)$$

$$C_m = \varepsilon_m \left(1 - \frac{3\phi}{2}\right) K \quad (2.4)$$

$$R_{cy} = \frac{4 \left(\frac{1}{2\sigma_m} + \frac{1}{\sigma_{cyt}} \right)}{9\phi K} \quad (2.5)$$

$$C_{mem} = \frac{9\phi r C_{mem,S}}{4} K \quad (2.6)$$

Les autres composants électriques représentent les effets des différentes parties du capteur :

- ceux des pistes de connexion C_p, R_p ;
- la capacité de l'interface métal-milieu C_{dl} et C_{dlp} ;
- les capacités du substrat C_{sub} et C_{subp} ;
- les effets de la paroi du canal microfluidique C_{ca} et R_{ca}

Tous ces composants sont décrits en fonction de paramètres intrinsèques du capteur dans les équations (2.7)-(2.15)

$$C_{dl} = C_0 A_{ele} \cdot \quad (2.7)$$

$$C_{sube} = \varepsilon_m K \quad (2.8)$$

$$C_{subp} = \varepsilon_{sub} K_p \quad (2.9)$$

$$R_p = \frac{1}{\sigma_m K_p} \quad (2.10)$$

$$C_{dlp} = C_0 A_p \quad (2.11)$$

$$C_p = \varepsilon_m K_p \quad (2.12)$$

$$C_{subca} = \varepsilon_{sub} K_{pca} \quad (2.13)$$

$$C_{ca} = \varepsilon_{ca} K_{pca} \cdot \quad (2.14)$$

$$R_{ca} = \frac{1}{\sigma_{ca} K_{pca}} \quad (2.15)$$

Les paramètres intrinsèques utilisés dans les équations (2.2)-(2.15), sont résumés dans le Tableau 2-4.

Tableau 2-4. Description des paramètres intrinsèques utilisés dans les équations	
Composant	Description
Φ	Coefficient de remplissage
K	Facteur de forme de l'électrode
K_p	Facteur de forme des pistes de connexion
K_{pca}	Facteur de forme des pistes sous le canal
σ_m	Conductivité du milieu
σ_{cyt}	Conductivité du cytoplasme
σ_{ca}	Conductivité du canal

ϵ_m	Permittivité du milieu
ϵ_{sub}	Permittivité du substrat
ϵ_{ca}	Permittivité du canal
r	Rayon de la cellule
$C_{mem,s}$	Capacité surfacique de la membrane
C_0	Capacité surfacique de la double couche
A_{ele}	Surface de l'électrode
A_p	Surface de la piste de connexion

2.6.1. Variation d'impédance normalisée

Comme déjà expliqué dans la partie 2.4.1. la variation d'impédance normalisée est calculée par $\Delta|Z|_n = (Z_{cell} - Z_{ref})/Z_{ref}$ à une fréquence (F_n) entre F_{low} et F_{high} , où les effets résistifs sont prépondérants. A une fréquence au palier P1 (entre F_{low} et F_{cell}), l'impédance Z_{cell} est égale aux résistances du milieu et des pistes de connexion en parallèle $Z_{cell} = \frac{R_m R_p}{R_p + R_m}$. L'impédance Z_{ref} est égale aux résistances du milieu à vide ($R_{m0} = 1/(\sigma_m K)$) et des pistes de connexion en parallèle, $Z_{ref} = \frac{R_{m0} R_p}{R_p + R_{m0}}$. En remplaçant Z_{cell} et Z_{ref} dans $\Delta|Z|_n$ nous obtenons la variation d'impédance normalisée comme l'équation (2.16) :

$$\Delta|Z|_n = \frac{(R_{m0} + R_p)R_m}{(R_m + R_p)R_{m0}} - 1 \quad (2.16)$$

L'impédance Z_{ref} est la même au palier P1 et au palier P2, cependant l'impédance Z_{cell} au palier P2 et au palier P1 sont différentes. Z_{cell} au palier P2 est égale aux résistances en parallèle du milieu, du cytoplasme et des pistes, $Z_{cell} = \frac{R_m R_{cy} R_p}{R_{cy} R_p + R_m R_p + R_m R_{cy}}$. En remplaçant Z_{cell} et Z_{ref} dans $\Delta|Z|_n$ nous obtenons la variation d'impédance normalisée comme l'équation (2.17) :

$$\Delta|Z|_n = \frac{R_{m0} R_m R_{cy} R_p + R_m R_{cy} R_p^2}{R_{m0} R_{cy} R_p^2 + R_{m0} R_m R_p^2 + R_{m0} R_m R_{cy} R_p} - 1 \quad (2.17)$$

En remplaçant les valeurs de résistances dans les équations (2.16) et (2.17), nous avons tracé les courbes de la Figure 2-10 représentant la variation d'impédance normalisée en fonction du coefficient de remplissage pour trois longueurs de pistes de connexion avec des électrodes $10 \times 10 \mu m^2$. Nous observons l'augmentation de la variation d'impédance normalisée quand le coefficient de remplissage augmente. Il est plus facile de détecter une cellule lorsque

le volume de celle-ci se rapproche du volume d'investigation. Cependant plus longues sont les pistes de connexion plus petit est le module de la variation d'impédance normalisée. Cela est dû aux fuites de courant par les pistes de connexion qui augmentent lorsque ses dimensions augmentent.

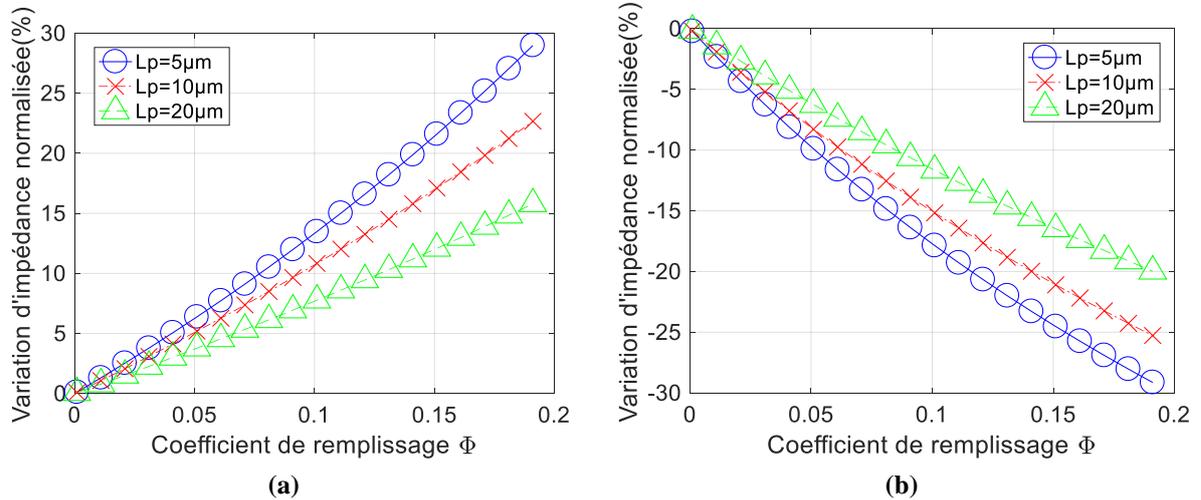


Figure 2-10. Graphiques de la variation d'impédance normalisée analytique en fonction de la longueur des pistes de connexion et du coefficient de remplissage(a) pour le palier P1 et (b) pour le palier P2.

2.6.2. Fréquences de coupure

À des fréquences inférieures à F_{low} nous n'avons que l'effet de double couche et aux fréquences au-delà de F_{high} nous n'avons que les effets de capacités parasites et de capacité de l'échantillon. Ainsi les informations de l'échantillon biologique sont entre F_{low} et F_{high} . Pour étudier le comportement de ces fréquences en fonction des composants du modèle électrique nous avons trouvé les fréquences de coupures à partir des pôles et zéros du modèle électrique.

- **Fréquence de coupure basse**

Comme les capacités parasites C_{sube} , C_{subp} , C_{ca} et C_{subca} sont petites comparées aux capacités de double couche, leurs impédances aux fréquences inférieures à F_{low} sont très grandes de sorte que nous pouvons considérer les branches 1, 2, 4 et 6 du circuit de la Figure 2-11(a) comme ouvertes. Ne subsistent ainsi que les capacités C_{dl} et C_{dlp} et les résistances R_p et R_m qui déterminent F_{low} (Figure 2-11(b)). Lorsque les impédances des capacités de double couche C_{dl} et C_{dlp} diminuent, subsistent les résistances R_p et R_m en parallèle.

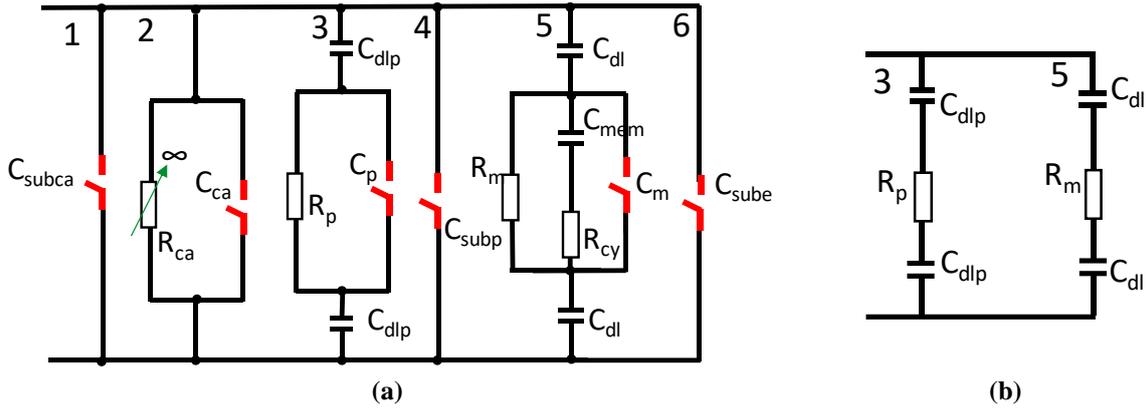


Figure 2-11. Modèle électrique global (a) et modèle électrique équivalent (b) pour la fréquence de coupure basse- F_{low} .

À partir du modèle équivalent pour la fréquence de coupure basse (modèle de la Figure 2-11(b)), il peut y avoir deux comportements différents de l'impédance :

- un premier quand l'impédance des pistes ($C_{dlp}-R_p$) est supérieure à l'impédance des électrodes($C_{dl}-R_m$) ou *vice-versa*. Une des deux branches se trouve alors ouverte ;
- le deuxième cas correspond aux deux impédances équivalentes, le courant se divisant alors dans les deux branches.

Dans le premier comportement, pour le cas $Z_{C_{dlp}-R_p} \gg Z_{C_{dl}-R_m}$, l'impédance est du premier ordre comme montré dans l'équation (2.18).

$$Z(S) = \frac{SC_{dl}R_m + 1}{SC_{dl}} \quad (2.18)$$

Il existe un **pôle** à zéro et un **zéro** à $S = 1/(C_{dl}R_m)$. Le **pôle** se produit à une fréquence plus petite que le **zéro** et ainsi l'impédance chute de 20 dB/décade jusqu'à la fréquence correspondant au **zéro**. À cette fréquence apparait le premier palier et c'est donc cette fréquence que nous considérons comme la fréquence de coupure basse (équation(2.19)).

$$F_{low} = \frac{1}{2\pi C_{dl}R_m} \quad (2.19)$$

Le deuxième comportement se passe quand les valeurs d'impédance des deux branches sont équivalentes. Dans ce cas, l'impédance est celle équivalente à la mise en parallèle entre

l'impédance des pistes et l'impédance des électrodes comme illustré dans l'équation (2.20). Cette impédance de deuxième ordre produit un pôle à zéro et un autre pôle à ω_n (voir équation(2.21)) et deux **zéros** qui dépendent des valeurs des composants.

$$Z(S) = \frac{S^2 C_{dl} R_m C_{dlp} R_p + S(C_{dl} R_m + C_{dlp} R_p) + 1}{S^2 (C_{dlp} C_{dl} R_m + C_{dlp} C_{dl} R_p) + S(C_{dl} + C_{dlp})} \quad (2.20)$$

$$\omega_n = \frac{C_{dl} C_{dlp} (R_p + R_m)}{C_{dl} + C_{dlp}} \quad (2.21)$$

Pour les **zéros**, nous avons la pulsation naturelle ω_n (équation (2.22)) et le facteur d'amortissement (équation (2.23)) qui dépendent des valeurs numériques des résistances du milieu et des capacités de la double couche des électrodes et des pistes de connexion. Plus de détails sur le calcul de **pôles** et **zéros** dans l'annexe 1:

$$\omega_n = \sqrt{\frac{1}{C_{dl} R_m C_{dlp} R_p}} \rightarrow F_{low} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{1}{C_{dl} R_m C_{dlp} R_p}} \quad (2.22)$$

$$\delta = 0,5(C_{dl} R_m + C_{dlp} R_p) \sqrt{\frac{1}{C_{dl} R_m C_{dlp} R_p}} \quad (2.23)$$

Pour analyser les effets des paramètres intrinsèques du capteur, tels que le coefficient de remplissage de l'échantillon biologique et la longueur des pistes de connexions sur F_{low} , nous avons tracé la courbe de la fréquence de coupure basse (équation 2.20) en fonction du coefficient de remplissage pour trois longueurs de pistes de connexion (10 μm , 20 μm et 40 μm), avec la largeur de 2 μm et avec les électrodes de 10 x 10 μm^2 . À partir de la courbe de la Figure 2-12 nous pouvons dire que plus grand est le coefficient de remplissage plus petite est la fréquence de coupure. Cela est dû au fait qu'avec un coefficient de remplissage plus grand l'impédance augmente et ainsi la fréquence de coupure diminue. Analytiquement la fréquence de coupure F_{low} ne dépend pas de la longueur de pistes de connexions. Comme la longueur est directement proportionnelle pour K_{dlp} ($K_{dlp} = \frac{W_p \times L_p}{e_{dl}}$) et pour K_p ($K_p = L_p \times K_p'$) et ces deux dernières sont inversement proportionnel entre eux pour $C_{dlp} \times R_p$, la longueur L_p est simplifiée.

W_p est la largeur des pistes de connexion, e_{dl} est l'épaisseur de la double couche et K_p' est le deuxième terme de l'équation (2.1).

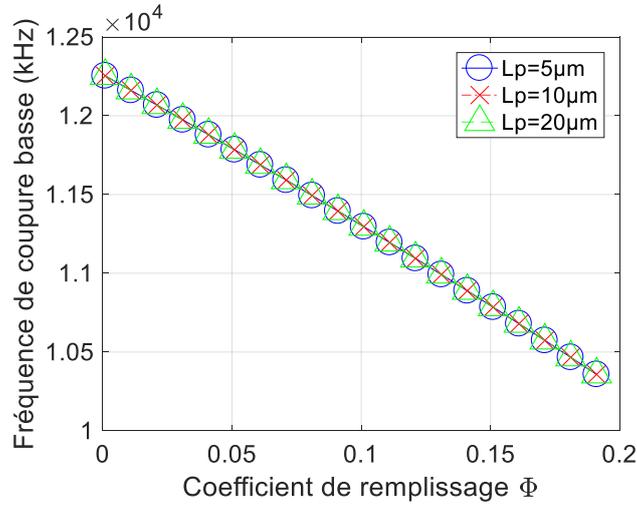


Figure 2-12. Graphique de la fréquence de coupure basse analytique en fonction du coefficient de remplissage pour trois longueurs de pistes de connexion.

- **Fréquence de coupure de la cellule**

Pour la fréquence de coupure de la cellule, nous avons le modèle de la Figure 2-13. Les branches 1, 2, 4 et 6 sont ouvertes de sorte que le courant circule dans les branches 3 et 5 différemment du modèle pour la fréquence de coupure basse. Les effets de la cellule C_{mem} et R_{cy} s'ajoutent. Dans cette bande de fréquence, les capacités de double couche sont court-circuitées ce qui donne le modèle simplifié de la Figure 2-13(b).

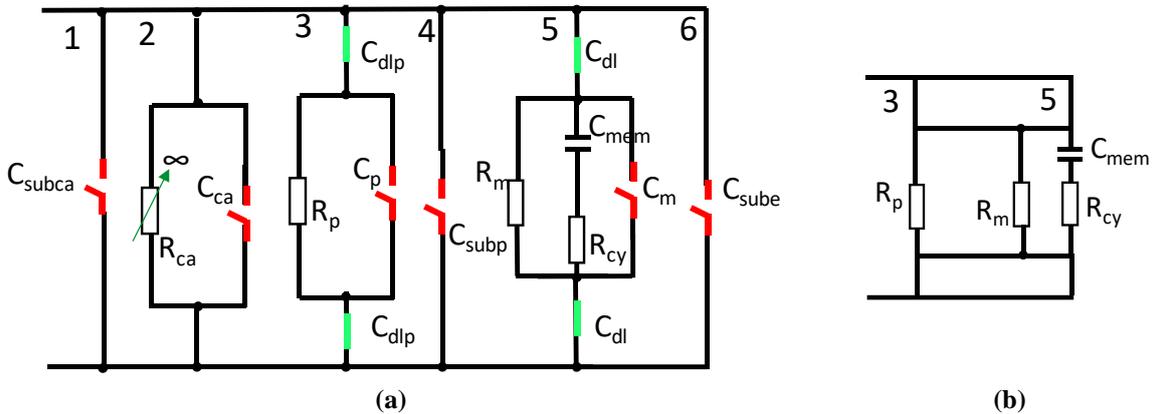


Figure 2-13. Modèle électrique global (a) et modèle équivalent (b) pour la fréquence de coupure de la cellule- F_c .

À partir de ce modèle électrique réduit (Figure 2-13(b)) nous obtenons l'impédance dans le domaine de fréquence comme l'équation (2.24) :

$$Z(S) = \frac{SC_{mem}R_{cy}(R_m + R_p) + R_m + R_p}{SC_{mem}(R_m + R_p + R_mR_pR_{cy}) + R_mR_p} \quad (2.24)$$

À partir de l'impédance nous obtenons un **pôle** à $S = R_mR_p/(C_{mem}(R_m + R_p + R_mR_pR_{cy}))$ et un **zéro** à $S = 1/(C_{mem}R_{cy})$. Le **pôle** se produit à une fréquence plus petite que le **zéro** et ainsi l'impédance chute de 20 dB/décade jusqu'au **zéro**. À cette fréquence il apparait un deuxième palier et c'est donc cette fréquence que nous considérons comme la fréquence de coupure de la cellule (équation (2.25)).

$$F_{cell} = 1/(2\pi C_{mem}R_{cy}) \quad (2.25)$$

Comme nous pouvons le voir à partir de l'équation (2.25) et du graphique de la Figure 2-14, F_{cell} ne dépend que des paramètres de la cellule. Par exemple, la fréquence de coupure d'une bactérie de 2 μm de largeur est d'environ 450 kHz et pour un globule blanc ayant un rayon de 10 μm la fréquence de coupure est d'environ 95 kHz. Ces valeurs de fréquence ont été obtenues avec $\sigma_m = 0,03 \text{ S/m}$, $\sigma_{cy} = 1 \text{ S/m}$ et $C_{mem,s} = 1 \mu\text{F/cm}^2$.

Plus grand est le rayon de la cellule plus petite est la fréquence de coupure de la cellule. Ce comportement est cohérent si nous considérons que la capacité membranaire augmente avec le volume de la cellule et donc F_{cell} diminue conformément à l'équation (2.26). Cela est vrai avec les conductivités du milieu et du cytoplasme constantes.

$$F_{cell} = 1/\left(2\pi r C_{mem,s} \left(\frac{1}{\sigma_m} + \frac{1}{\sigma_{cy}}\right)\right) \quad (2.26)$$

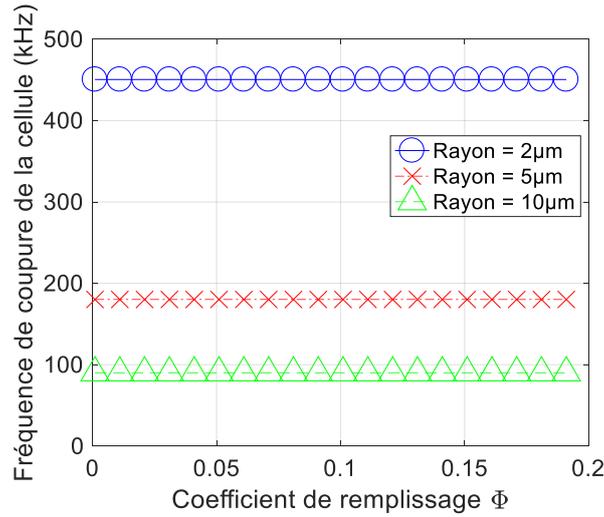


Figure 2-14. Graphique de la fréquence de coupure de la cellule en fonction du coefficient de remplissage pour trois valeurs de rayon de la cellule.

- **Fréquence de coupure haute**

Aux fréquences élevées, nous pouvons considérer le circuit de la Figure 2-15 dont toutes les branches influencent la fréquence de coupure haute. Au-dessus de cette fréquence, les impédances des capacités parasites diminuent jusqu'au court-circuit.

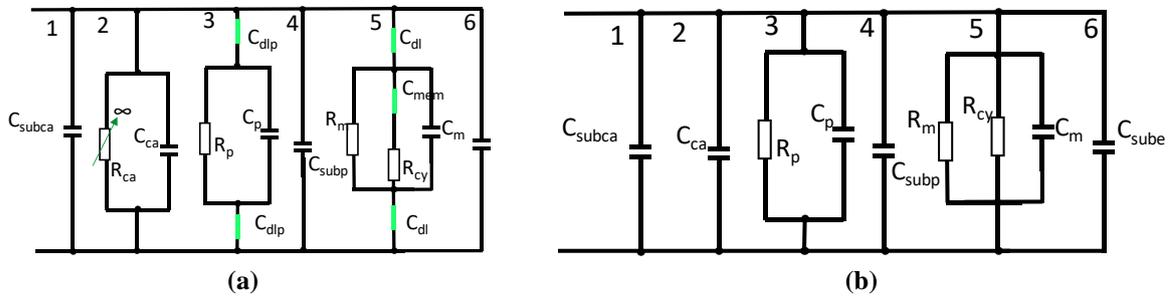


Figure 2-15. Modèle électrique global (a) et modèle équivalent (b) pour la fréquence de coupure haute- F_{high} .

En utilisant la même technique que celle utilisée dans les deux cas précédents, nous trouvons l'impédance dans le domaine de fréquence pour le modèle électrique réduit selon l'équation (2.27).

$$Z(S) = \frac{\frac{R_m R_{cy} R_p}{R_{cy} R_p + R_m R_p + R_m R_{cy}}}{1 + S \frac{R_m R_{cy} R_p}{R_{cy} R_p + R_m R_p + R_m R_{cy}} (C_{sub} + C_m + C_{subp} + C_p + C_{ca} + C_{subca})} \quad (2.27)$$

À partir de l'équation de l'impédance, nous calculons les **pôles** et **zéros**. Dans ce cas, il n'existe pas de **zéro** et il existe un seul **pôle** en $S = \frac{1}{C_{par}R_{par}}$ dans lequel $R_{par} = \frac{R_m R_{cy} R_p}{R_{cy} R_p + R_m R_p + R_m R_{cy}}$ et $C_{par} = C_{sube} + C_m + C_{subp} + C_p + C_{ca} + C_{subca}$. Ainsi, la fréquence de coupure haute est :

$$F_{high} = \frac{1}{2\pi C_{par} R_{par}} \quad (2.28)$$

Avec cette équation, nous voyons que plus grandes sont les capacités parasites, plus basse est la fréquence de coupure haute . Malheureusement celle-ci peut facilement devenir inférieure à la fréquence de coupure de la cellule de sorte que les effets du cytoplasme ne sont plus caractérisables. Dans la Figure 2-16, nous avons tracé le graphique de la fréquence de coupure haute analytique en fonction du coefficient de remplissage pour trois longueurs de pistes de connexion (5 μm , 10 μm et 20 μm) avec les électrodes de 10 x 10 μm^2 . Avec cette courbe, nous observons que F_{high} augmente quand le coefficient de remplissage augmente et diminue quand la longueur de pistes de connexion augmente. Quand la longueur des pistes de connexion augmente, le facteur de forme augmente ainsi que les capacités C_p et C_{subp} , de sorte que C_{par} augmente davantage que R_{par} ne diminue. Les effets de C_{par} sont ainsi prépondérants sur ceux de R_{par} . Avec l'augmentation de C_{par} la fréquence F_{high} diminue.

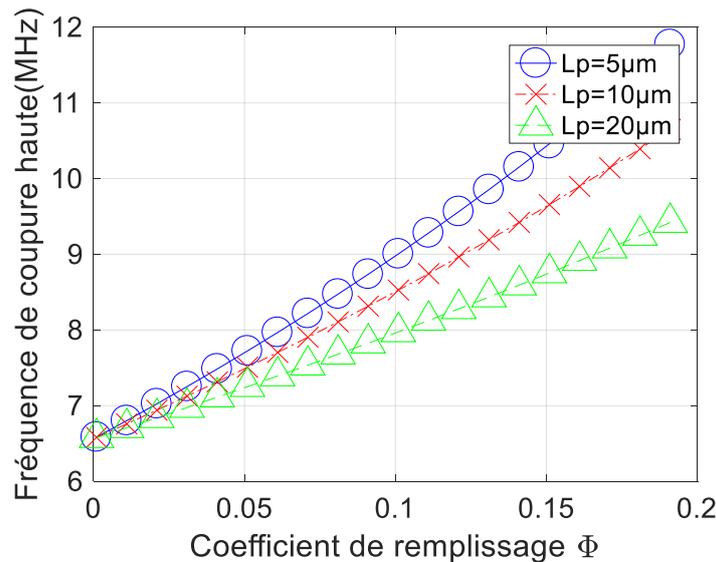
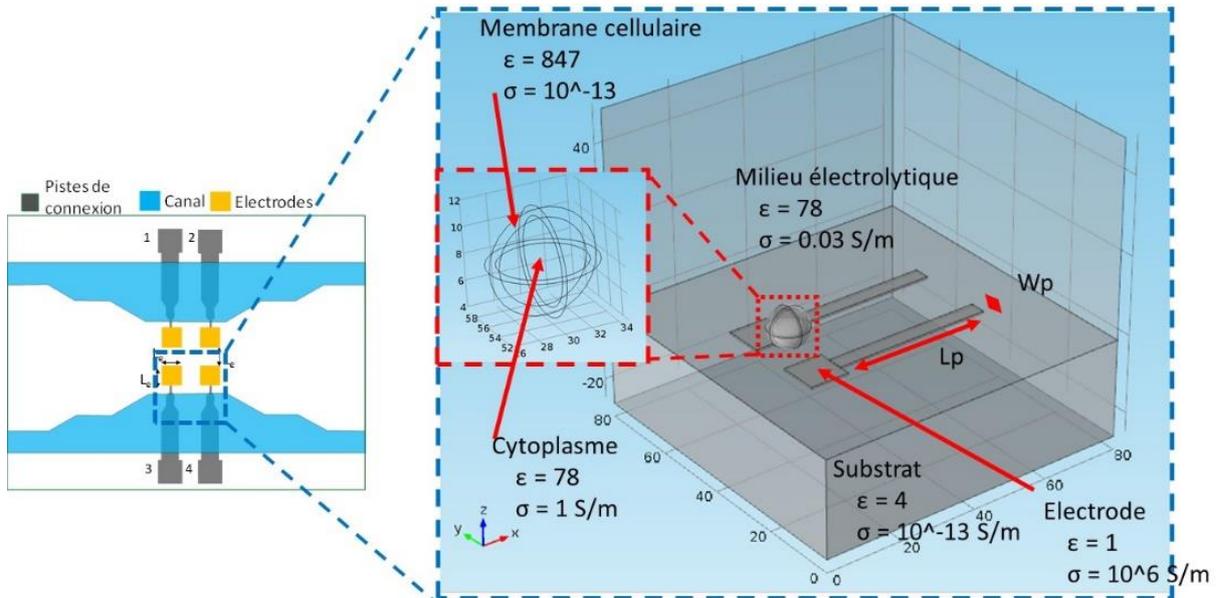


Figure 2-16. Graphique de la fréquence de coupure haute analytique en fonction du coefficient de remplissage et de la longueur des pistes de connexion

2.7. Simulations du capteur

Le bloc de simulation utilisé avec COMSOL en prenant en compte les effets du substrat et des pistes de connexions est affiché dans la Figure 2-17. Le rayon de la cellule est de $4\ \mu\text{m}$, les dimensions des électrodes et des pistes de connexion sont de $10 \times 10\ \mu\text{m}^2$ et $2 \times 10\ \mu\text{m}^2$, respectivement, et les noms des paramètres utilisés pour toutes les simulations sont aussi donnés dans la Figure 2-17.



2.7.1. Détermination du facteur de forme

Le facteur de forme d'une électrode (K) est un paramètre qui dépend de la distance entre les électrodes, de la longueur et de la largeur des électrodes et de leur géométrie. Il est donc indépendant de la nature de l'échantillon et peut être considéré comme constant pour un capteur donné. Ce paramètre est déterminant pour les fréquences de coupure et pour la variation d'impédance normalisée. Nous l'utilisons, avec d'autres paramètres, pour tracer les courbes des fréquences de coupure (détaillées dans les parties suivantes). Pour obtenir la valeur du facteur de forme, nous avons utilisé des blocs de simulations simplifiés, présentés en Figure 2-18. En sachant que la résistance peut être calculée par $R = 1/\sigma K$, nous avons simulé une conductivité de $1\ \text{S/m}$ pour calculer $K = 1/\sigma R$ à partir de la valeur obtenue de R .

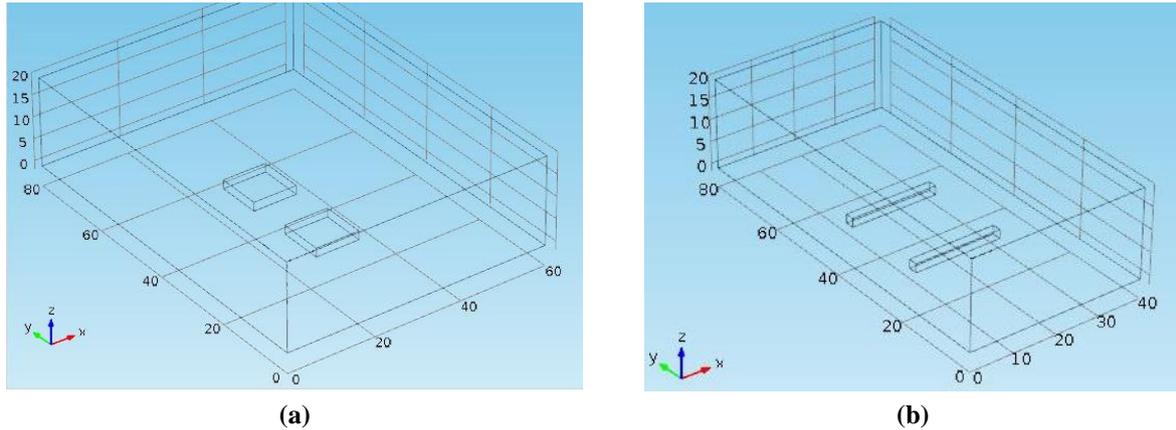


Figure 2-18. Bloc de simulation utilisé pour obtenir les facteurs de formes (a) des électrodes et (b) des pistes de connexion.

Nous avons calculé les valeurs du facteur de forme pour les électrodes seules (K) et pour les pistes de connexions (K_p) comme données au Tableau 2-5. La distance entre les centres des électrodes et entre les centres de pistes de connexion pour la structure avec les électrodes $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ est de $10 \mu\text{m}$ (Distance 1), pour la structure avec les électrodes $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ elle est de $20 \mu\text{m}$ (Distance 2) et pour la structure avec électrodes $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ est de $40 \mu\text{m}$ (Distance 3). Le facteur de forme K_p a été calculé pour trois longueurs de pistes de connexion ($5 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$ et $20 \mu\text{m}$) correspondant à la moitié, la valeur puis au double de la longueur de l'électrode de référence ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) et pour six valeurs de largeurs de pistes de connexion correspondant à 5%, 10%, 20%, 30%, 40% et 50% de la largeur de l'électrode de référence. Comme prévu, plus grand les dimensions des électrodes ou des pistes plus grand est le facteur de forme. Nous observons aussi que la variation du facteur de forme est plus grande en fonction de la longueur qu'en fonction de la largeur. Dans le Tableau 2-5, nous avons mis en gras les valeurs des facteurs de forme utilisés dans les simulations.

Tableau 2-5. Facteur de forme pour différentes dimensions des électrodes et des pistes de connexion

Facteurs de forme (μm)									
Dimensions	Distance 1			Distance 2			Distance 3		
Électrodes (K)									
20 x 20 μm^2	-			-			19,2		
10 x 10 μm^2	-			11,8			-		
5 x 5 μm^2	6,7			-			-		
Pistes de connexion (K_p)									
W_p	Lp 5	Lp 10	Lp 20	Lp 5	Lp 10	Lp 20	Lp 5	Lp 10	Lp 20
0,5 μm	2,7	4,7	8,5	2,6	4,4	7,5	2,5	4,0	6,3
1 μm	3,5	5,8	10,2	3,3	5,3	8,7	3,0	4,6	7,1
2 μm	4,6	7,4	12,7	4,2	6,4	10,4	3,8	5,5	8,2
3 μm	5,6	8,8	14,8	4,9	7,5	11,8	4,4	6,2	9,0
4 μm	6,4	10,1	16,9	5,6	8,4	13,0	4,9	6,8	9,7
5 μm	7,4	11,5	19,1	6,3	9,2	14,1	5,4	7,4	10,3

2.7.2. Analyse de la variation d'impédance normalisée

- **Influence de la taille de cellule**

Dans cette partie nous avons analysé l'influence de la taille de la cellule sur la variation d'impédance normalisée quand les dimensions des électrodes sont réduites. Nous avons tracé les courbes de la variation d'impédance normalisée en fonction du rapport rayon de la cellule/largeur de l'électrode pour trois dimensions d'électrodes (20 x 20 μm^2 , 10 x 10 μm^2 , 5 x 5 μm^2) avec des dimensions de piste de connexion constantes (2 x 10 μm^2) (Figure 2-19). Nous avons tracé les courbes pour $\Delta|Z|_n$ au palier P1 (Figure 2-19(a)) et au palier P2 (Figure 2-19(b)). Nous observons que plus grand est le rayon de la cellule par rapport à la largeur des électrodes plus grande est la variation d'impédance normalisée. Il est ainsi plus facile de détecter une cellule entre les électrodes.

À partir des graphiques de la Figure 2-19 nous voyons aussi que le module de la variation d'impédance diminue quand les dimensions des électrodes diminuent à pistes de connexions identiques. Cela est dû au fait que la surface des électrodes diminue et devient

proche de la surface des pistes de connexion. Dans la section suivante, nous analysons l'influence des pistes de connexion sur $\Delta|Z|_n$.

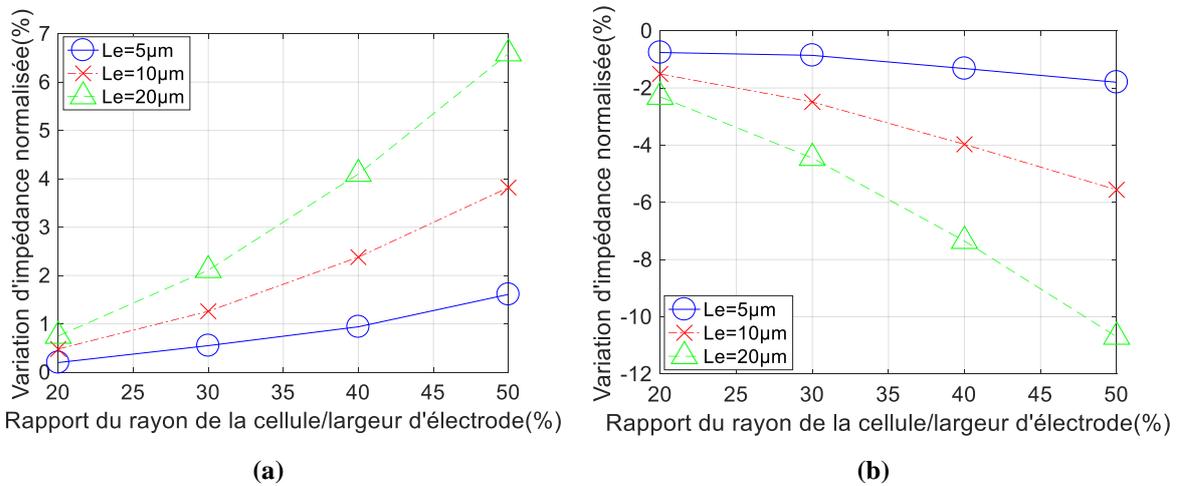


Figure 2-19. Graphiques de la variation d'impédance normalisée par simulation en fonction du rapport rayon de la cellule/largeur de l'électrode pour trois dimensions des électrodes ($20 \times 20 \mu m^2$, $10 \times 10 \mu m^2$, $5 \times 5 \mu m^2$) avec les dimensions de piste de connexion constantes ($2 \times 10 \mu m^2$) (a) pour le palier P1 et (b) pour le palier P2.

- **Influence des pistes de connexions**

Les graphiques de la Figure 2-20 montrent la variation d'impédance normalisée en fonction de la largeur des pistes de connexion pour trois longueurs de piste de connexion (cercle bleu : $5 \mu m$; astérisque rouge : $10 \mu m$; triangle vert : $20 \mu m$). Ces valeurs sont équivalentes à la moitié, à l'égal et au double de la longueur des électrodes. La Figure 2-20(a) est le $\Delta|Z|_n$ pour le palier P1 et la Figure 2-20(b) pour le palier P2. Plus grandes sont les dimensions des pistes de connexion plus petit est $\Delta|Z|_n$, car les fuites du courant par les pistes de connexion augmentent. Il faut donc réduire ces dimensions de pistes de connexion dans les limites de fabrication. Cependant la réduction des dimensions des pistes de connexion a une limite imposée par les techniques de fabrication.

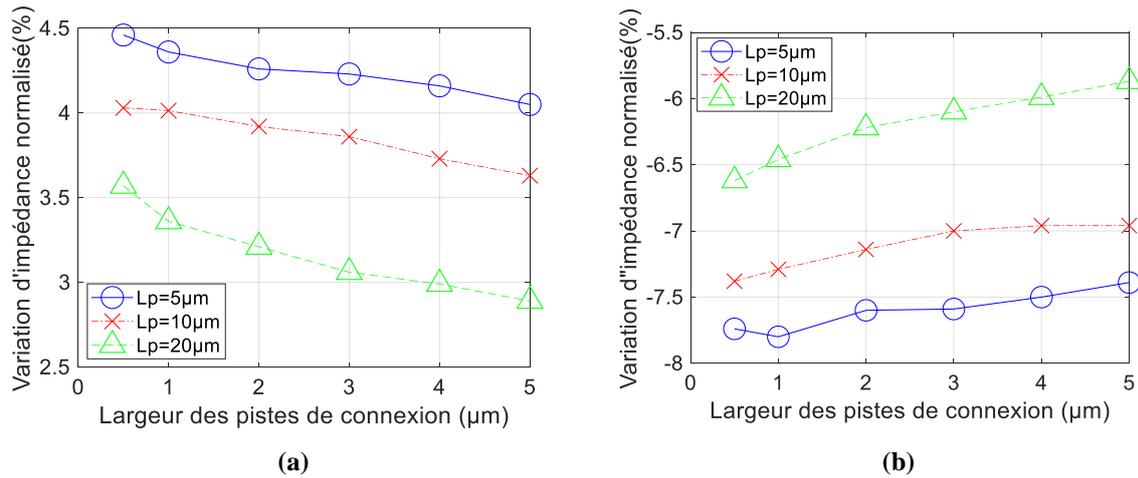


Figure 2-20. Graphique de la variation d'impédance normalisée par simulation en fonction de la largeur des pistes de connexion pour trois longueurs de piste de connexion (5 µm, 10 µm et 20 µm) (a) pour le palier P1 et (b) pour le palier P2.

- **Influence du positionnement de la cellule**

Dans cette partie nous étudions l'impact du placement de la cellule sur la variation d'impédance. Le placement de la cellule peut être vu selon les trois axes X, Y et Z. Afin de vérifier cet impact, des simulations ont été effectuées avec différents placements de la cellule: avec un pas correspondant à la largeur de l'électrode pour les axes X et Y, et avec un pas de 1µm pour l'axe Z. Les résultats sont donnés en Figure 2-21. Plus la cellule s'éloigne des pistes de connexions suivant l'axe Z, plus la variation d'impédance est petite. Cela est dû au fait que la distribution du champ électrique est moins importante dans la partie éloignée des électrodes et ainsi la variation du champ causé par les cellules est plus petite. La même chose a lieu lorsque la cellule s'éloigne des électrodes, la variation d'impédance diminue, car le champ électrique est moins concentré dans ces parties. Lorsque la cellule est sur les électrodes ou entre les électrodes, $\Delta|Z|_n$ est plus grand, car cette zone est à plus grande densité de lignes de champ électrique.

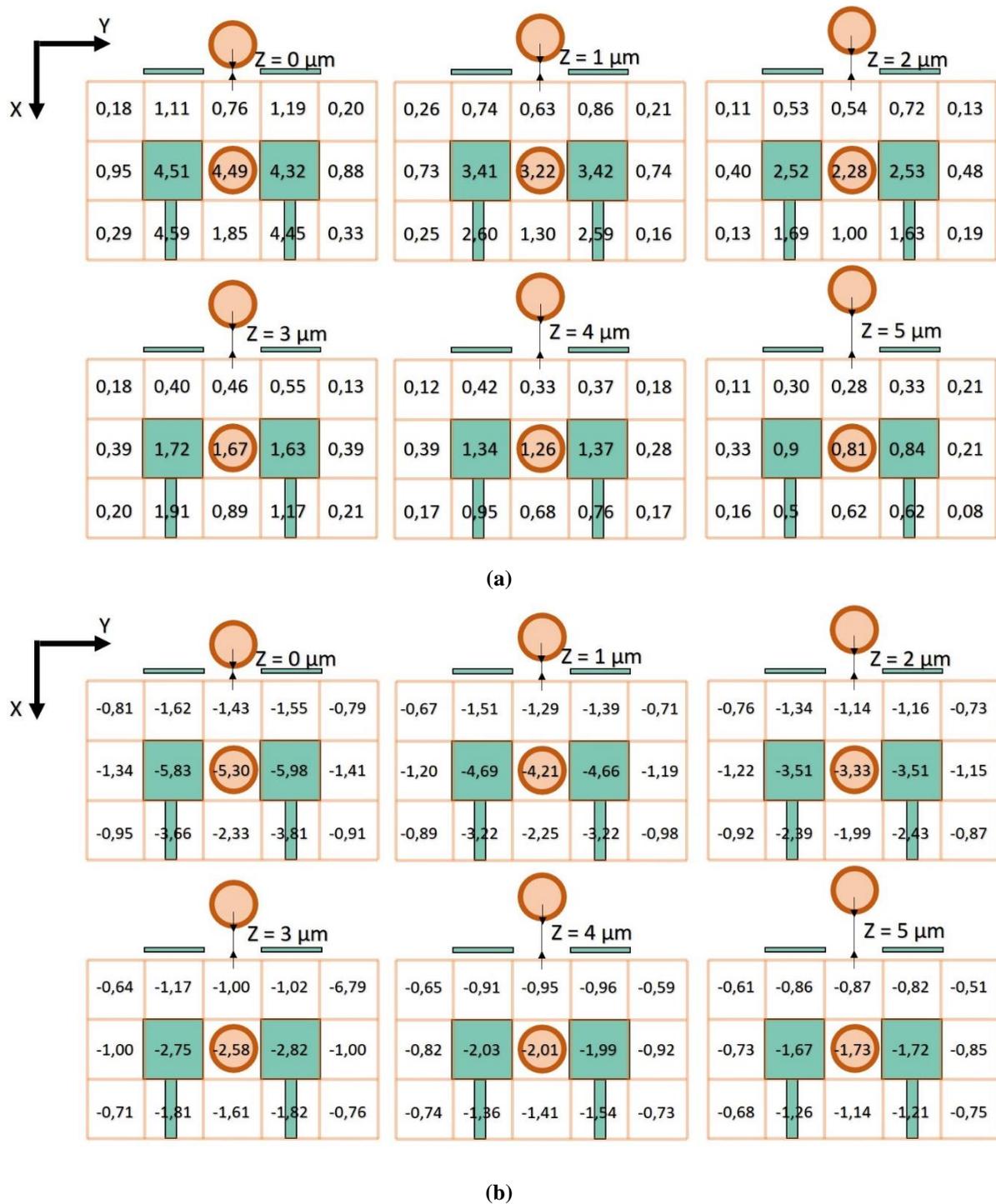


Figure 2-21. Variation d'impédance normalisée en fonction du placement de la cellule pour les mesures (a) au palier P1et (b) au palier P2..

2.7.3. Analyse des fréquences de coupure

Pour analyser les fréquences de coupure par simulation, nous avons utilisé les facteurs de forme trouvés précédemment avec COMSOL et nous avons utilisé les équations (2.22) et (2.28) avec Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA) pour tracer les courbes.

- **Influence des dimensions des électrodes**

Comme nous pouvons le voir dans la Figure 2-22, lorsque le coefficient de remplissage Φ augmente, la fréquence F_{low} diminue et la fréquence F_{high} augmente. La diminution de F_{low} est due au fait que l'augmentation de Φ augmente R_m (car dans l'équation (2.3), $3\Phi/2 < 1$). Comme Φ n'a pas d'influence sur C_{dl} , C_{dlp} et R_p seul l'effet de R_m intervient sur F_{low} en fonction de Φ . F_{low} est donc inversement proportionnel à R_m . Pour la fréquence F_{high} , Φ influence de manière inverse la capacité du milieu C_m et la résistance R_{cy} de manière que son augmentation cause à la fois la diminution de C_m et R_{cy} , augmentant ainsi F_{high} .

Pour la fréquence de coupure haute en fonction de la largeur des électrodes il y a deux effets opposés qui dépendent des pistes de connexion. Les facteurs de forme des électrodes augmentent avec l'augmentation de la largeur des électrodes, mais en même temps le facteur de forme des pistes de connexion diminue, car la distance entre les pistes augmente. Cette diminution des facteurs de forme des pistes implique une diminution des effets capacitifs comparés aux effets résistifs. Ainsi, les résistances R_m et R_{cy} diminuent de manière plus importante que les capacités de C_{par} de sorte que F_{high} augmente, comme le confirme le tracé de la Figure 2-22(b) (cercle bleu, croix rouge, triangle vert).

Dans le cas où les pistes de connexions augmentent proportionnellement à l'augmentation des dimensions des électrodes, les facteurs de forme des électrodes et des pistes de connexion augmentent de manière que la variation de la capacité C_{par} est inversement proportionnelle à la variation de la résistance R_{par} . La variation de F_{high} est ainsi négligeable, lorsqu'il y a une augmentation proportionnelle des dimensions des électrodes et des pistes de connexion, comme le montre la Figure 2-22(b) (astérisque cyan, plus magenta, triangle vers le bas noir).

Donc pour avoir une bande de fréquence plus large et ainsi obtenir un palier plus large, nous devons utiliser un coefficient de remplissage et des électrodes plus grandes. Pour obtenir un rapport Φ plus grand, il faut utiliser les dimensions des électrodes de l'ordre de grandeur des cellules à mesurer.

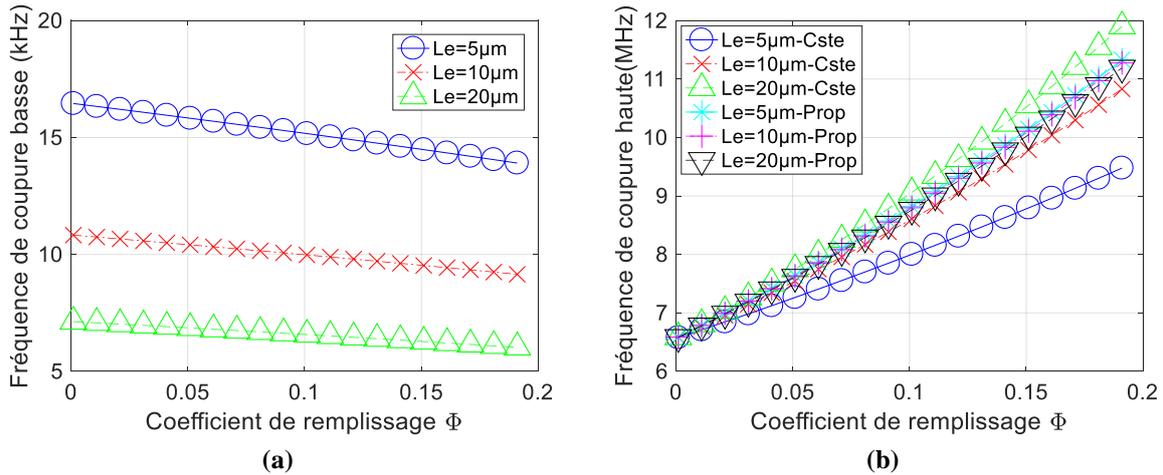


Figure 2-22. Graphiques de (a) la fréquence de coupure basse et (b) de la fréquence de coupure haute en fonction du coefficient de remplissage pour trois dimensions des électrodes. Dans (b) « Cste » représente les courbes quand les pistes de connexion sont constantes et « prop » représente les courbes quand les pistes augmentent proportionnellement aux électrodes.

- **Influence des pistes de connexions**

Contrairement aux résultats analytiques pour F_{low} , les résultats de simulation FEM (Figure 2-23(a)) montrent une diminution de F_{low} quand la longueur des pistes de connexion augmente. Cela est dû au fait que les simulations FEM prennent en compte les effets de dispersion du champ électrique.

Le comportement de F_{high} en fonction de la largeur et de la longueur des pistes de connexion est le même que pour F_{low} , c'est-à-dire que plus grande est la largeur ou la longueur des pistes de connexion plus petite est la fréquence de coupure (Figure 2-23(b)). Cela est dû au fait que la variation des dimensions des pistes de connexion provoque une plus grande variation sur les capacités C_{par} qui les composent que sur les résistances R_{par} qui les composent. L'augmentation des pistes de connexion augmentant l'effet capacitif, la fréquence F_{high} diminue.

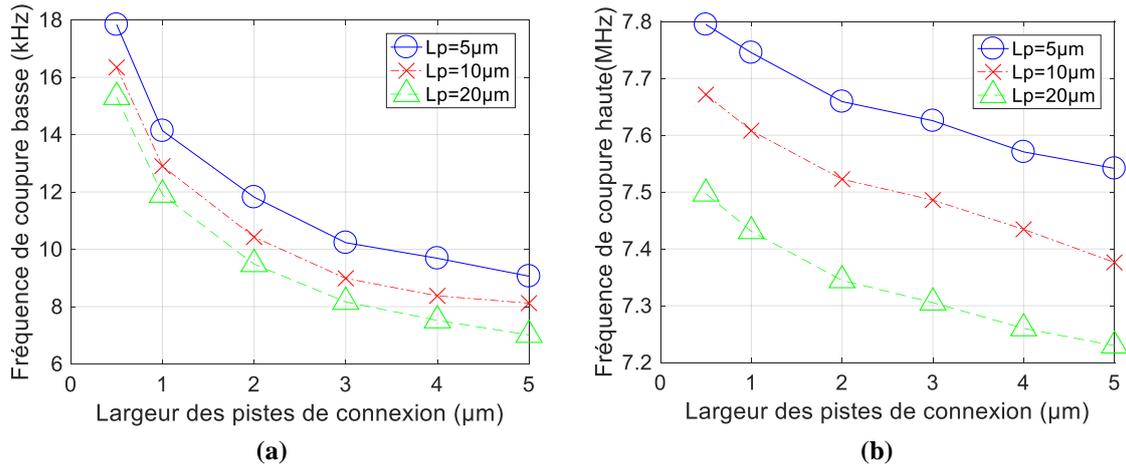


Figure 2-23. Graphiques de (a) la fréquence de coupure basse et (b) de la fréquence de coupure haute en fonction de la largeur de pistes de connexion pour trois longueurs de pistes de connexion.

2.8. Optimisation du capteur

À partir des simulations, nous pouvons en déduire que les pistes de connexion ont une influence sur la variation d'impédance normalisée. Pour diminuer ces effets de pistes de connexions, nous avons ajouté une couche d'isolant sur les pistes de connexion [82].

2.8.1. Isolation des pistes de connexion avec une couche d'isolant

- **Modèle analytique avec une couche d'isolant sur les pistes de connexion**

Une fois que la couche d'isolant sur les pistes est ajoutée, l'effet résistif et l'effet de double couche des pistes de connexion deviennent négligeables, car la couche d'isolant empêche le transfert de charges entre les pistes et le cumul d'ions sur les pistes de connexion. Nous obtenons alors le modèle électrique donné en Figure 2-24 dont $C_{iso} = \varepsilon_0 \varepsilon_{eff} \frac{K(k'_0)}{K(k_0)}$, $K(k)$ est l'intégrale elliptique complète de première espèce et ε_{eff} est la constante diélectrique effective équivalente pour deux couches différentes[83]. Plus sur le calcul de la capacité C_{iso} dans l'annexe 2.

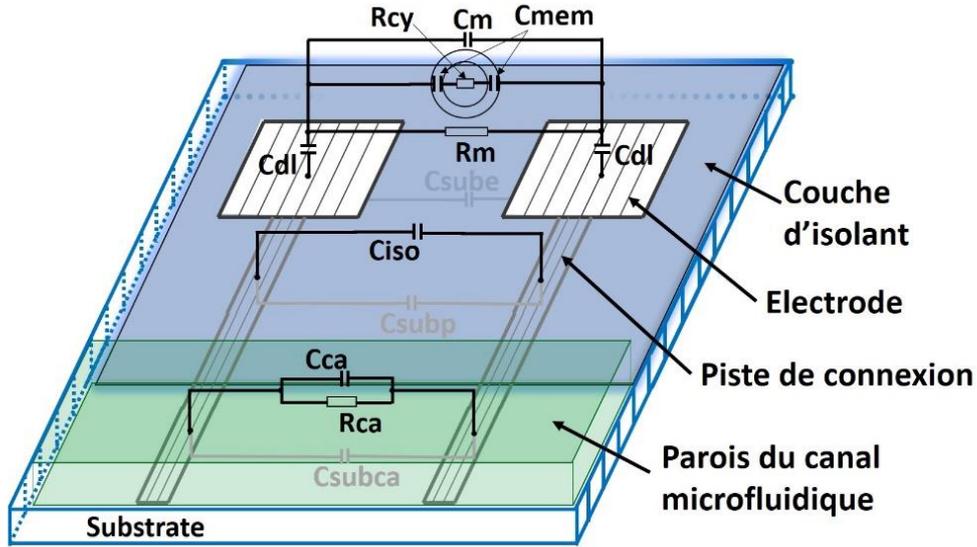


Figure 2-24. Modèle électrique d'une paire d'électrodes coplanaires avec une couche d'isolant sur les pistes de connexion et la paroi du canal.

Lorsque la couche d'isolant est ajoutée sur les pistes de connexion, les équations de la variation d'impédance normalisée sont modifiées et suivent alors l'équation (2.29) pour le palier P1 et l'équation (2.30) pour le palier P2. Grâce à l'ajout de la couche d'isolant, $\Delta|Z|_n$ ne dépend plus que des résistances R_m et R_{m0} pour le premier palier, et ne dépend plus que de R_m , R_{m0} et R_{cy} pour le deuxième palier. Dans les deux cas, cela permet de garder une variation d'impédance optimale contrairement aux dispositifs sans couche d'isolant. Ceux-ci peuvent avoir une variation d'impédance plus de 3 fois moins importante dans les cas les plus défavorables.

$$\Delta|Z|_n = \frac{R_m}{R_{m0}} - 1 \quad (2.29)$$

$$\Delta|Z|_n = \frac{R_m R_{cy}}{(R_m + R_{cy}) R_{m0}} - 1 \quad (2.30)$$

En utilisant la même technique que précédemment pour trouver les **pôles** et **zéros**, nous avons déterminé les fréquences de coupure analytiques quand une couche d'isolant est utilisée sur les pistes de connexion. Elles sont données par l'équation (2.31) pour la fréquence de coupure basse et l'équation (2.32) pour la fréquence de coupure haute. $R_{par} = \frac{R_m R_{cy}}{R_{cy} + R_m}$ et $C_{par} = C_{sube} + C_m + C_{subp} + C_{iso} + C_{ca} + C_{subca}$.

$$F_{low} = \frac{1}{2\pi C_{dl} R_m} \quad (2.31)$$

$$F_{high} = \frac{1}{2\pi R_{par} C_{par}} \quad (2.32)$$

- **Simulations avec une couche d'isolant sur les pistes de connexion**

L'épaisseur de la couche d'isolant est de l'ordre nanométrique et les dimensions des électrodes sont de l'ordre micrométrique. Cet écart d'échelles nécessite une grande puissance de calcul et des simulations longues pour des dimensions réelles. Pour réduire cette complexité de simulation, nous avons adapté la permittivité de la couche d'isolant. En supposant l'épaisseur réelle de la couche d'isolant de 150 nm, nous avons utilisé une épaisseur de simulation de 500 nm, avec donc un rapport de 3,33. Pour obtenir la même capacité surfacique, nous avons multiplié le rapport d'épaisseur par la permittivité de la couche d'isolant (environ 4,2 pour le SiO₂) et nous avons obtenu la valeur de la nouvelle permittivité de la couche d'isolant égale à 14. Le bloc de simulation et les valeurs des paramètres électriques utilisés sont donnés en Figure 2-25.

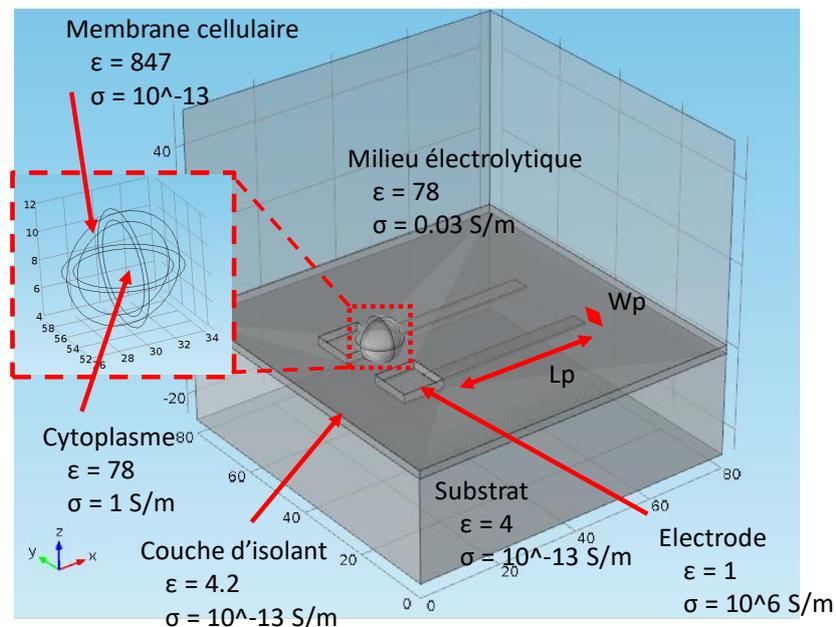


Figure 2-25. Bloc de simulation d'une paire d'électrodes coplanaires avec une couche d'isolant sur les pistes de connexion.

À partir de l'équation (2.29) et les simulations de la variation d'impédance normalisée, nous observons dans la Figure 2-26 que l'addition de la couche d'isolant rend $\Delta|Z|_n$ indépendant des dimensions des pistes de connexion. Au palier P1(Figure 2-26(a)) le $\Delta|Z|_n$ est le plus grand pour la structure avec la couche d'isolant indépendamment des dimensions des pistes de connexions. Au palier P2(Figure 2-26(a)), pour les pistes plus larges de 2 μm et plus longues que 10 μm , la fréquence de coupure haute diminue de telle manière que la bande de fréquence entre F_c et F_{high} n'est pas suffisante pour former le deuxième palier. Nous n'avons

donc pas les résultats de simulation de la variation d'impédance normalisée pour ces dimensions. Le plus important pour extrait de ces résultats est le fait que la couche d'isolant permet d'avoir des valeurs $\Delta|Z|_n$ indépendantes des dimensions de pistes de connexion.

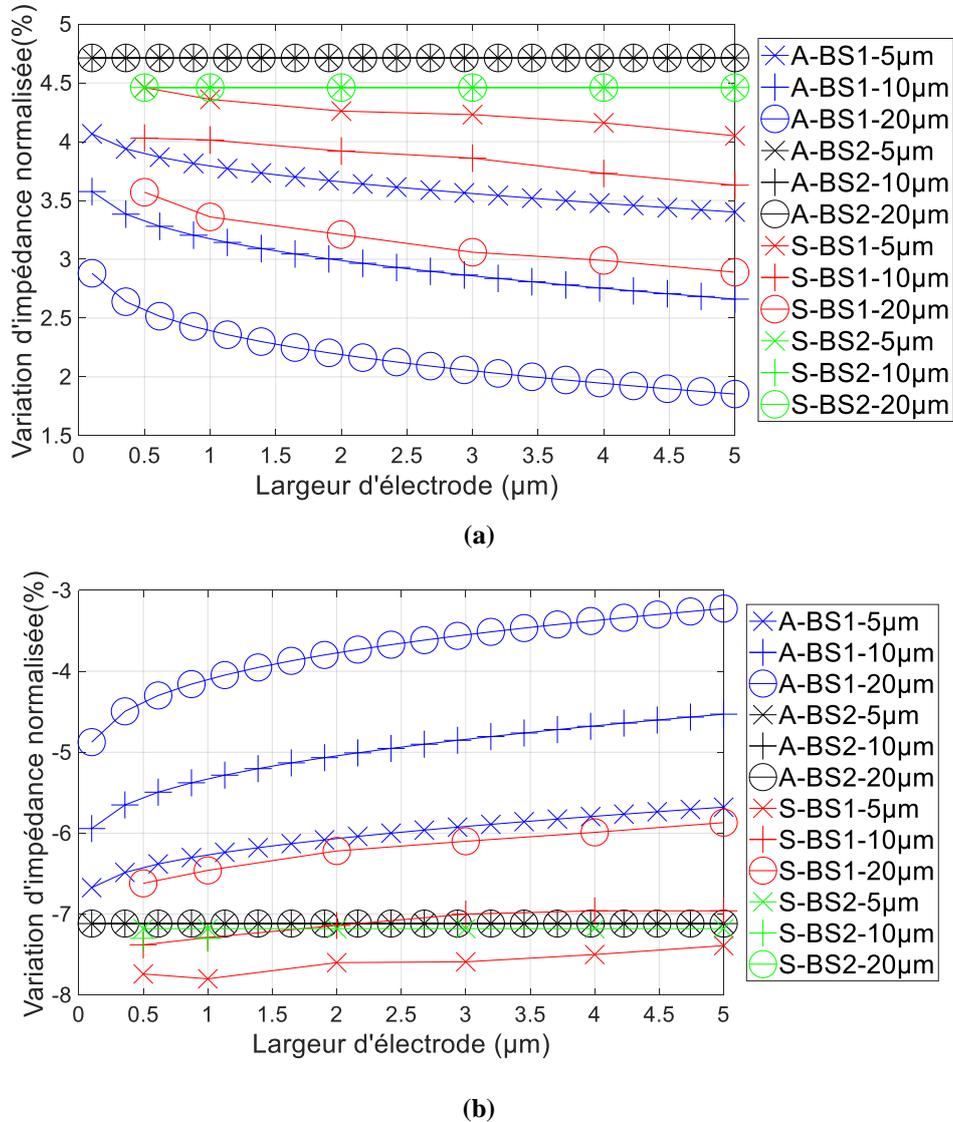
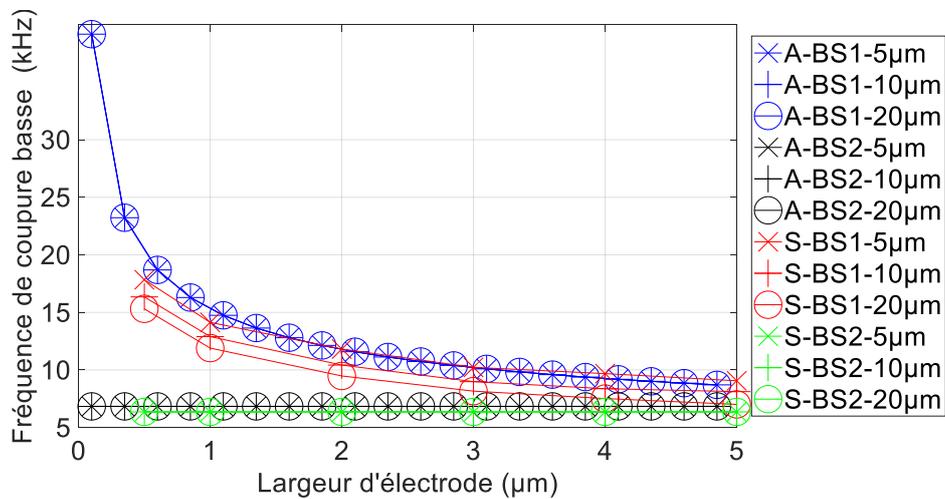


Figure 2-26. Graphique de la variation d'impédance normalisée pour trois dimensions de pistes de connexion avec « BS2 » et sans « BS1 » couche d'isolant sur les pistes de connexion pour les calculs analytiques «A » et de simulations « S » (a) au palier P1 et (b) au palier P2.

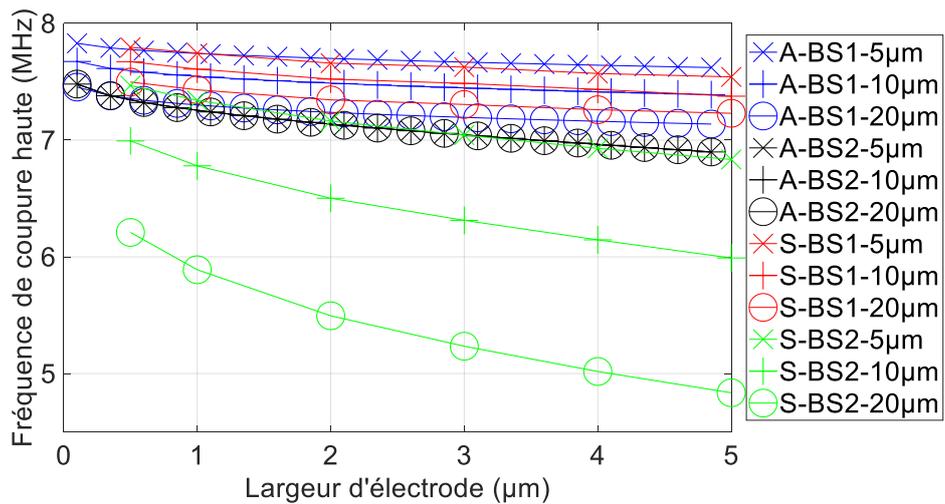
À partir des équations (2.31) et (2.32) et des simulations nous avons tracé les courbes des fréquences de coupure en fonction de la largeur et de la longueur des pistes de connexion. Comme déjà observé dans les parties précédentes, plus grandes sont les dimensions des pistes de connexions plus petites sont les fréquences de coupure. L'insertion de la couche d'isolant réduit encore plus la fréquence de coupure basse (Figure 2-27(a)) (réduction d'environ 40% pour la piste de 2 μm de largeur et 10 μm de longueur) et moins la fréquence de coupure haute (Figure 2-27(b)) (réduction d'environ 13% pour la piste de 2 μm de largeur et 10 μm de

longueur). Pour la fréquence F_{low} , cela est dû au fait que le terme $C_{dlp}R_p$ disparaît et comme ce terme est beaucoup plus petit que 1, c'est lui qui fait augmenter F_{low} et donc sans ce terme F_{low} diminue.

Lorsque la couche d'isolant est ajoutée, la capacité des pistes C_p se transforme en capacité d'isolant C_{iso} . Cette dernière est plus petite que C_p car la permittivité de la couche d'isolante ($\epsilon_{r,iso} = 4.2$) est inférieure à la permittivité du milieu ($\epsilon_{r,m} = 78$), ainsi la capacité équivalente parallèle C_{par} diminue. Cependant, l'addition de la couche d'isolant fait disparaître le terme R_p de sorte que la résistance équivalente R_{par} augmente plus que la C_{par} ne diminue. Dans ce cas R_{par} devient prépondérant comparé à C_{par} et F_{high} diminue.



(a)



(b)

Figure 2-27. Graphiques analytiques « A » et de simulation « S »(a) de la fréquence de coupure basse et (b) de la fréquence de coupure haute pour trois dimensions de pistes de connexion pour les capteurs avec « BS2 » et sans « BS1 » couche d'isolant sur les pistes de connexion.

2.8.2. Matrice d'électrodes avec puits

Le puits peut être utilisé pour maintenir un volume constant sur les électrodes et éviter que la solution électrolytique s'étale sur les pistes de connexion, ainsi comme, en utilisant un canal microfluidique aussi, le puits peut être utilisé pour piéger les cellules. Pour avoir les cellules statiques sur les électrodes et faire une caractérisation d'impédance dans une large bande de fréquence, nous avons prévu l'utilisation d'un puits. Pour attirer une cellule dans un puits, nous pouvons utiliser la diélectrophorèse [60], [84], [85] ou des microbilles magnétiques avec des aimants [4], [21], [67], [86].

Comme l'épaisseur de la couche formatrice du puits est grande suffisante pour confiner la plupart du champ électrique des pistes de connexion (Figure 2-28), la modélisation du puits peut être la même que celle pour le canal microfluidique. L'utilisation d'un puits ne change pas la modélisation électrique, il changera seulement les propriétés électriques du matériau et les dimensions des pistes de connexion exposées à la solution électrolytique. Ainsi nous pouvons simplement remplacer R_{ca} et C_{ca} du modèle électrique déjà développé par R_{pu} et C_{pu} .

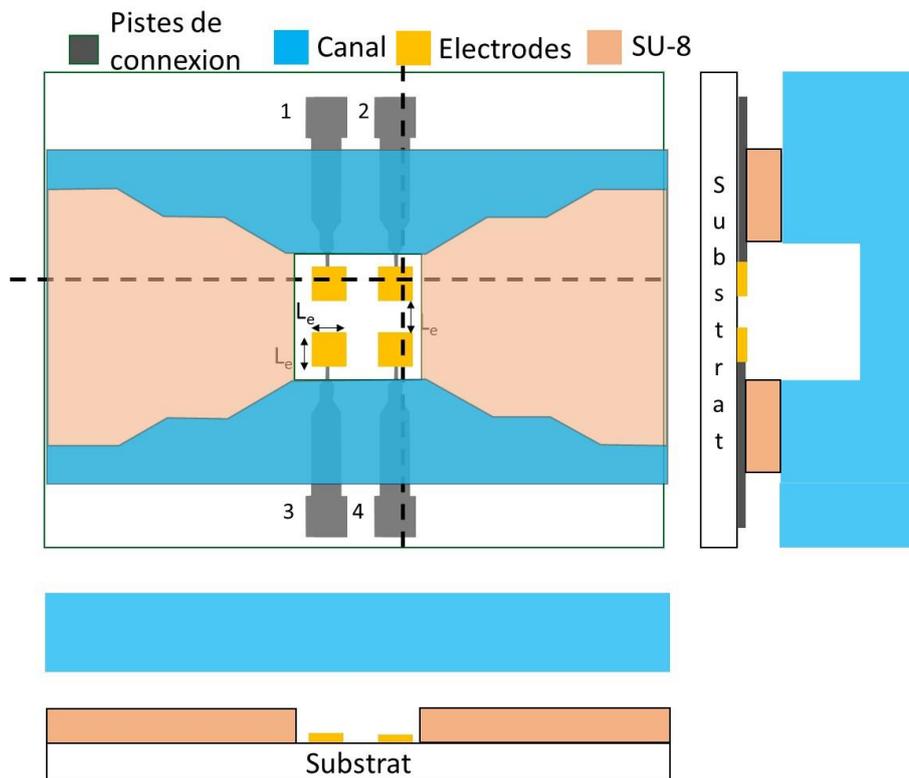


Figure 2-28. Schéma du capteur avec le puits.

2.9. Conclusion

Dans ce chapitre, une première partie porte sur le choix de la structure coplanaire et sa justification. Dans les deuxième et troisième parties, à partir de simulations, le choix d'une géométrie carrée des électrodes est également justifié et analysé par un modèle électrique sans prendre en compte les effets de pistes de connexion et substrat. Une fois la structure et la géométrie des électrodes choisies, nous avons conçu, dans la quatrième partie, le design du capteur avec la structure du canal microfluidique.

Comme originalité de ce travail de thèse, un modèle électrique qui prend en compte tous les paramètres parasites a été développé dans la cinquième partie. Ce modèle prend en compte les effets interfacial entre l'électrode et la solution électrolytique, la capacité parasite du substrat, les caractéristiques du matériau du canal microfluidique et l'effet capacitif et résistif des pistes de connexion.

À partir du modèle électrique développé, nous avons calculé les fréquences de coupure et la variation d'impédance normalisée analytique pour observer leurs comportements en fonction des paramètres intrinsèques à la cellule et au capteur. Les équations des fréquences de coupure ont été déterminées à partir des pôles et zéros de l'équation d'impédance.

Dans la sixième partie de ce chapitre, pour prendre en compte des effets non modélisables analytiquement tels que la dispersion du champ électrique au bord des électrodes, nous avons réalisé des simulations en utilisant le logiciel COMSOL. Nous avons observé que pour avoir une bande de fréquence plus large et ainsi obtenir un palier plus large nous devons utiliser un coefficient de remplissage Φ et des électrodes plus grandes. Pour obtenir un Φ plus grand, il convient de dimensionner des électrodes à l'échelle des cellules à mesurer. Avec la réduction des électrodes à l'échelle de petites cellules (quelques unités de micromètre) les effets parasites des pistes de connexion causent une réduction de la variation d'impédance normalisée.

Dans la septième et dernière partie, nous avons proposé des améliorations du capteur comme l'addition d'une couche d'isolant sur les pistes de connexion et l'addition d'une cavité aux alentours des électrodes. Pour minimiser les effets des pistes de connexion sur la variation d'impédance normalisée, nous avons proposé l'utilisation d'une couche d'isolant sur les pistes de connexion. Pour cette nouvelle structure, nous avons adapté le modèle électrique et nous avons effectué une analyse analytique et numérique des fréquences de coupure et de la variation

d'impédance. Nous avons ainsi observé que l'addition de la couche d'isolant réduit les fréquences de coupure cependant qu'elle augmente la variation d'impédance normalisée.

Chapitre 3 :

Conception et réalisation du capteur

3.1. Introduction

Ce chapitre traite de la conception du capteur sur la base des résultats des simulations du chapitre précédent. Sont justifiés les choix des matériaux pour la fabrication du capteur et sont abordées les principales techniques de fabrication du capteur en salle blanche. Enfin, le banc de mesure est détaillé.

Dans la première partie de ce chapitre, est abordée la conception du capteur dont la structure et les dimensions des électrodes développées sont détaillées de même que les schémas des géométries des pistes de connexion, de la couche d'isolant et de la structure du puits. À la fin de cette partie, est également décrite la structure du microcanal.

Dans la deuxième partie, le choix des matériaux utilisés comme le verre est justifié comme substrat notamment pour sa compatibilité avec les procédures en salle blanche, son bas coût et sa transparence. L'utilisation du platine pour les électrodes, le SiO₂ pour la couche d'isolant et le PDMS pour le canal microfluidique sont également précisés de même que le choix de l'interface microcanal-capillaire.

La troisième partie aborde la réalisation des capteurs en salle blanche avec un résumé des techniques et procédures utilisées.

La quatrième et dernière partie décrit le banc de mesure et le rôle des appareils de mesure utilisés, ainsi que le programme d'acquisition des données.

3.2. Conception du capteur

Pour détecter/caractériser une faible quantité de cellules voire des cellules unitaires il faut que la variation d'impédance normalisée soit mesurable et, évidemment, plus sa valeur sera grande plus facile sera la détection/caractérisation. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, une manière d'augmenter ce paramètre est d'en augmenter le rapport volumique Φ . Pour l'augmenter, il faut dimensionner les électrodes au même ordre de grandeur que la cellule. Quand les dimensions des électrodes sont réduites, le débit de détection/caractérisation est aussi réduit. Pour analyser le comportement de la réponse spectrale d'impédance pour des dimensions réduites, nous avons développé des capteurs avec trois dimensions d'électrodes.

Pour augmenter la quantité de mesures, nous avons développé un capteur en forme de matrice d'électrodes. Cette structure matricielle entraîne forcément des interconnexions entre les électrodes. Comme vu au chapitre précédent, les pistes de connexions peuvent diminuer la variation d'impédance normalisée. Une façon de réduire cela consiste à ajouter une couche d'isolant sur les pistes de connexion. Pour analyser cette hypothèse déjà validée analytiquement et par simulation, nous avons fabriqué des capteurs avec et sans couche d'isolant sur les pistes de connexion.

3.2.1. Structure et dimensions des électrodes

Pour analyser la faisabilité de détection de cellules biologiques à des concentrations très faibles voire pour une cellule isolée et la faisabilité d'utiliser une matrice d'électrodes pour augmenter le nombre de mesures, nous avons développé des matrices carrées de 2x2 électrodes carrées pour les trois dimensions suivantes : $20 \times 20 \mu\text{m}^2$, $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ et $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ainsi qu'une matrice 3x3 de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. L'espacement entre les électrodes est égal à la longueur des électrodes. La Figure 3-1 donne le schéma de ces électrodes et le Tableau 3-1 résume les capteurs développés. Ceux-ci ont été labellisés pour alléger le texte.

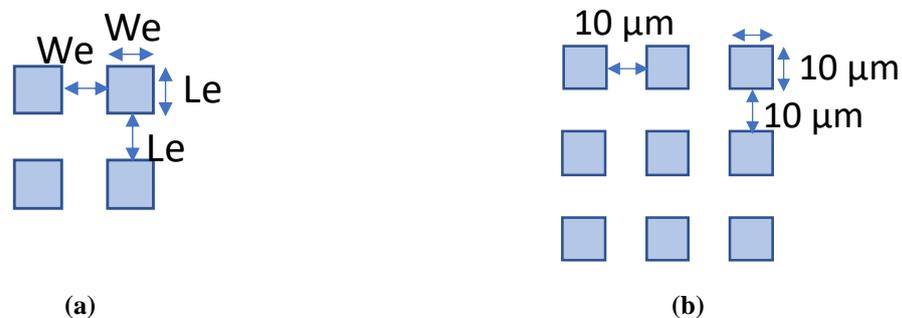


Figure 3-1. Schéma de la structure et dimensions des électrodes (a) pour la matrice à 2x2 électrodes et (b) pour la matrice à 3x3 électrodes.

Tableau 3-1. Labels et structures des électrodes à fabriquer

Capteur	Dimensions	Nombre d'électrodes
CA5	5 x 5 μm^2	4, 2x2
CA10	10 x 10 μm^2	4, 2x2
CA20	20 x 20 μm^2	4, 2x2
CB10	10 x 10 μm^2	9, 3x3

3.2.2. Géométrie des pistes de connexion

Comme vu auparavant à partir du modèle analytique et du modèle numérique les pistes de connexions influencent les fréquences de coupure et la variation d'impédance normalisée. Pour diminuer ces effets, la capacité des pistes de connexions doit être la plus petite possible et la résistance la plus grande possible. Pour obtenir une faible capacité et une grande résistance, les pistes de connexions doivent être éloignées au maximum et doivent être les plus étroites possible, cependant lorsque la largeur des pistes de connexions est diminuée et la longueur augmentée le risque de rupture des pistes pendant la fabrication augmente. Pour avoir un bon compromis entre le risque de rupture des pistes et une faible dimension nous avons choisi une largeur de pistes de connexion de 2 μm lorsqu'elles sont proches des électrodes et de 100 μm au bout des pistes. L'augmentation de la largeur des pistes de connexions a été faite avec une ouverture de 45°. La longueur des pistes de connexion est de 9,5 mm (Figure 3-2).

À la fin des pistes de connexion et au bord du substrat ont été placés des plots de 2 x 10 mm^2 pour faciliter la connectique (Figure 3-2).

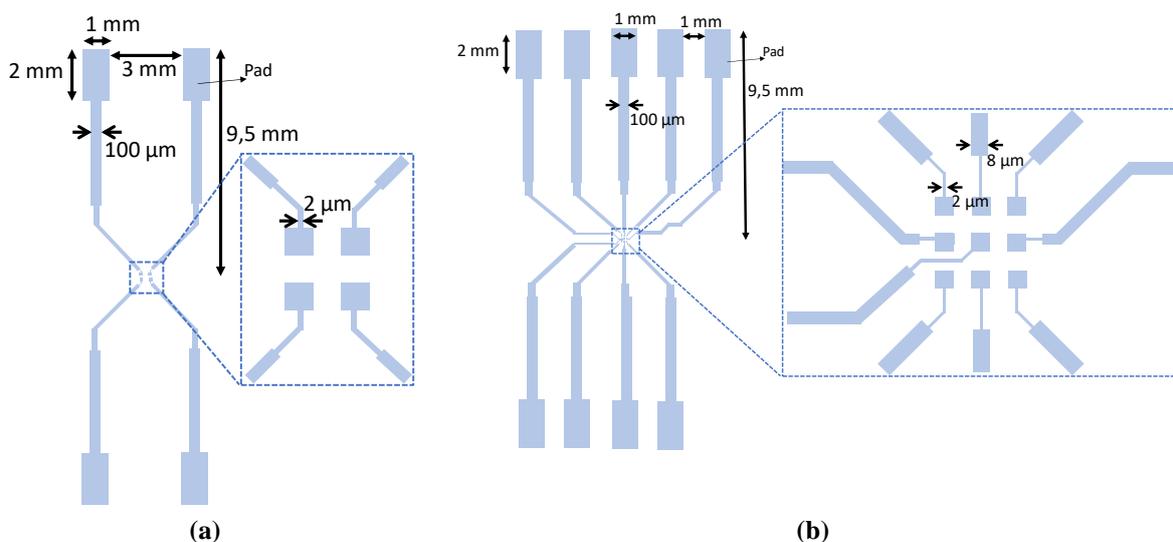


Figure 3-2. Schéma de pistes de connexion (a) pour les matrices à 4 électrodes et (b) pour la matrice à 9 électrodes.

3.2.3. Couche d'isolant sur les pistes de connexion

La couche d'isolant est placée sur les pistes de connexion pour, comme expliqué au chapitre précédent, diminuer les effets des pistes de connexion sur la variation d'impédance normalisée. Nous avons conçu la couche d'isolant qu'elle soit déposée sur tout le substrat à l'exception des électrodes et des plots, comme schématisé dans la Figure 3-3. Grâce à l'alignement des masques avec le substrat nous arrivons à placer l'isolant autour des électrodes avec une erreur maximale de 1 μm .

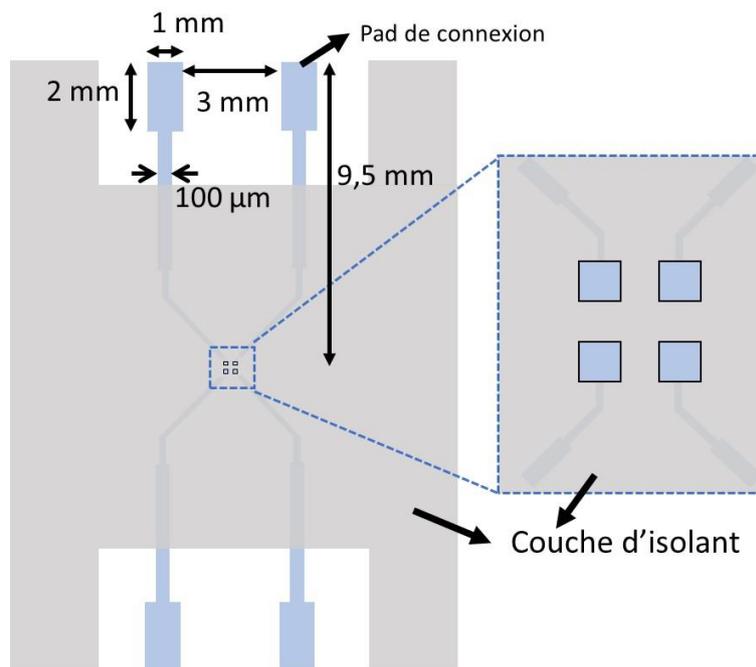


Figure 3-3. Schéma de la couche d'isolant sur les pistes de connexion.

3.2.1. Structure de puits

Le puits est formé avec une résine épaisse développée autour de la matrice d'électrodes comme schématisé dans la Figure 3-4. Comme pour la couche d'isolant, nous avons utilisé une machine d'alignement de masques avec le substrat pour réaliser un centrage précis du puits. Les dimensions des puits correspondent aux dimensions des matrices d'électrodes plus une marge de la largeur d'une électrode de sorte que la largeur du puits pour le capteur CA5 est de 20 μm (15 μm de la largeur de la matrice plus 5 μm de marge), pour le capteur CA10 de 40 μm (30 μm de la largeur de la matrice plus 10 μm de marge), pour le capteur CA20 de 80 μm (60 μm de la largeur de la matrice plus 20 μm de marge) et pour le capteur CB10 de 60 μm (50 μm de la largeur de la matrice plus 10 μm de marge). Avec l'addition de la marge, nous avons plus de liberté pour le positionnement du puits.

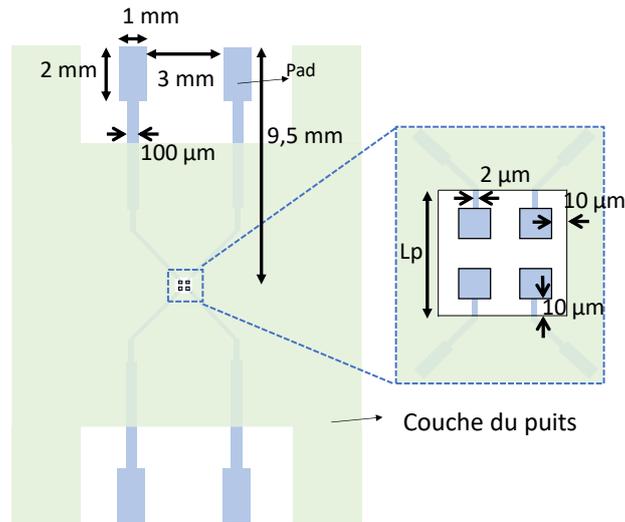


Figure 3-4. (a) Schéma de la couche de SU8 pour former le puits.

3.2.2. Structure globale des microcanaux

Pour éviter la dépendance des résultats au volume, nous avons utilisé un canal microfluidique qui permet d'avoir un volume constant sur les électrodes. Un autre bénéfice de l'utilisation d'un canal microfluidique est le centrage des cellules sur les électrodes. Pour que les cellules passent toujours sur les électrodes, le canal doit être à la même échelle que la matrice des électrodes. Ainsi nous avons défini la largeur du canal microfluidique comme la largeur du puits plus $20\ \mu\text{m}$. L'addition de ces $20\ \mu\text{m}$ sert à assurer le bon placement du microcanal sur les électrodes. N'ayant pas à disposition un système de micropositionnement pour le canal, le placement est effectué à la main sous microscope. La largeur du canal pour le capteur CA5 est $40\ \mu\text{m}$, pour le capteur CA10 est $60\ \mu\text{m}$, pour le capteur CA20 est $100\ \mu\text{m}$ et pour le capteur CB10 $80\ \mu\text{m}$. La Figure 3-5(a) un emplacement correct des électrodes (les électrodes bien au centre du microcanal) et la Figure 3-5(b) celle d'un mauvais positionnement du microcanal et du puits sur les microélectrodes.

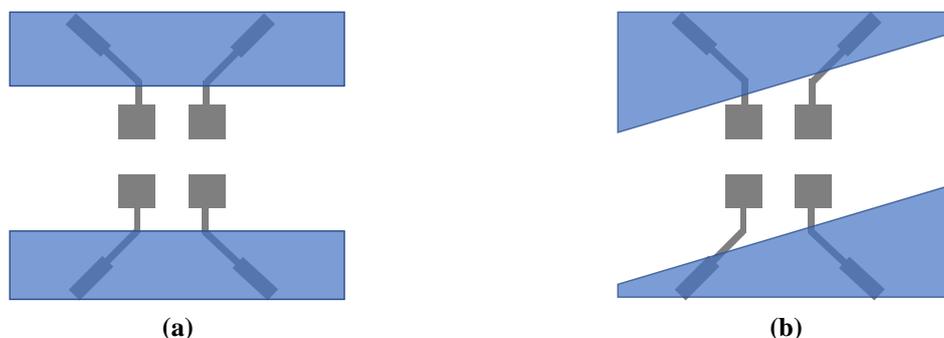


Figure 3-5. Schéma (a) d'un bon placement et (b) d'un mauvais placement du microcanal sur les microélectrodes.

Pour pouvoir injecter le liquide dans le dispositif par des capillaires, il a fallu réaliser une interface microcanal-capillaire. Pour ce faire, nous avons agrandi la largeur du canal microfluidique lorsqu'il s'éloigne du centre jusqu'à atteindre une largeur millimétrique. Pour ne pas avoir une augmentation de largeur trop abrupte avec des angles droits et éviter que les cellules s'accumulent aux bords, nous avons augmenté la largeur du canal avec des inclinaisons d'environ 45° . À l'extrémité du canal, des trous de 2 mm de diamètre ont été découpés avec un emporte-pièce pour y connecter les capillaires. Nous avons prévu trois entrées et trois sorties (Figure 3-6) de sorte à contrôler le flux laminaire et ainsi centrer les cellules en utilisant les propriétés laminaires de la microfluidique.

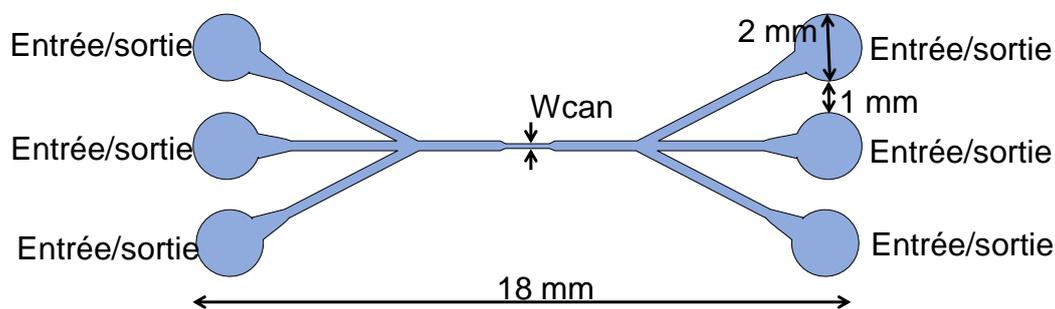


Figure 3-6. Schéma de la structure du canal avec les trois orifices d'entrée/sortie.

3.3. Choix des matériaux

Les matériaux choisis doivent être biocompatibles, compatibles avec les process et disponibles en salle blanche pour la fabrication du capteur.

3.3.1. Substrat

Le matériau le plus utilisé comme substrat dans la technologie de microfabrication est le silicium à cause de ces propriétés semi-conductrices. Cependant il n'est pas transparent ce qui nous empêche de suivre les manipulations des échantillons biologiques au microscope. Parmi les matériaux transparents pouvant être utilisés comme substrat en salle blanche, nous trouvons le verre et quelques polymères. Nous avons choisi le verre qui est transparent, biocompatible, peu coûteux et compatible avec les techniques de fabrication en salle blanche [52].

3.3.2. Électrodes

Les électrodes doivent avoir une grande conductivité électrique, être compatibles avec les procédés de fabrication et être inertes chimiquement pour ne pas réagir avec le milieu de mesure. Les matériaux qui respectent ces critères et sont disponibles au centre de compétences

MiNaLor sont le platine et l'or. Le platine étant plus stable et présentant de meilleures caractéristiques pour les mesures de type électrochimique nous l'avons choisi pour la fabrication des électrodes [52].

3.3.3. Isolant

La couche d'isolant peut être réalisée avec des polymères, par couches alternées de Si_3N_4 et SiO_2 ou par couches isolées de Si_3N_4 ou SiO_2 . L'utilisation d'un polymère est plus simple, car il est déposé sur le substrat et ensuite développé en lithographie. Les polymères peuvent être biocompatibles et ont une faible valeur de constante diélectrique (inférieure à 2,7), cependant il est difficile d'obtenir des épaisseurs en dessous de l'échelle micrométrique, ils peuvent être dégradés par produits chimiques et peuvent avoir des fissures en cas de nettoyage par ultrasons [25].

Les couches alternées $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4/\text{SiO}_2$ combinent l'imperméabilité ionique de Si_3N_4 avec la propriété isolante électrique de SiO_2 , cependant des étapes de fabrication sont ajoutées. Pour réduire la complexité de la procédure de fabrication, nous utilisons uniquement la couche de SiO_2 pour isoler les pistes de connexion[25].

3.3.4. Canal microfluidique

Un des matériaux les plus utilisés pour la formation de canal microfluidique est le PolyDiMéthylSiloxane (PDMS). Il s'agit d'un polymère siliconé obtenu après polymérisation et réticulation d'une résine et d'un durcisseur. Étant transparent, compatible avec les procédés de microfabrication et biocompatible, le PDMS répond bien à nos besoins pour la fabrication de microcanaux. Pour la fabrication du microcanal, le PDMS en phase liquide est mélangé à un agent réticulant (à proportion de 10:1) et versé dans un moule microstructuré en résine SU-8. Après la réticulation (approximativement 24h à température ambiante) nous obtenons une réplique du moule en PDMS réticulé (durci).

3.3.5. Choix d'interface microcanal-macrofluidique

Le capillaire est connecté directement au capteur et pour faire circuler les solutions dans le capteur nous utilisons des seringues et aiguilles (connectées au capillaire) pour réaliser l'interface microfluidique-macrofluidique. Parmi le grand choix des matériaux des capillaires, nous avons choisi le Tygon (Medical tubing, Tygon® ND 100-80) dû à sa biocompatibilité, à sa flexibilité et à son élasticité qui nous permet de le relier directement au PDMS. Le diamètre externe de ce capillaire est de 1,26 mm et le diamètre interne de 0,76 mm. L'aiguille utilisée,

de dimension 21G permet de connecter les seringues (1 mL TERUMO) aux capillaires. Dans la Figure 3-8 est affiché un schéma de ces connexions fluidiques.

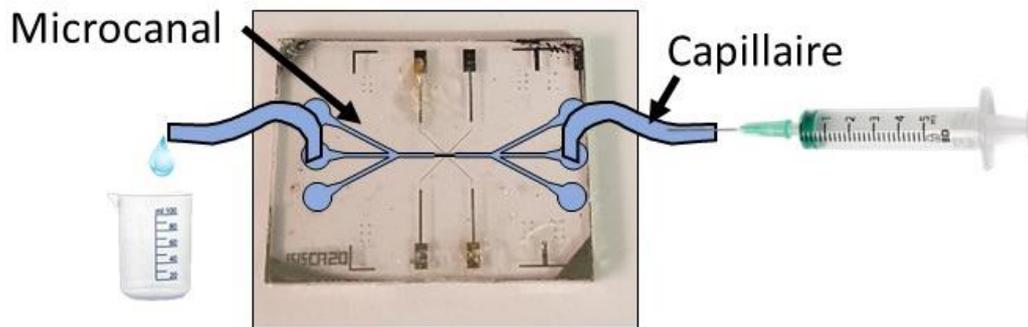


Figure 3-7. Schéma de l'interface microfluidique-macrofluidique.

3.4. Réalisation en salle blanche : procédé technologique

Les procédures de fabrication d'un composant en salle blanche sont faites couche par couche jusqu'à obtenir une structure complète. Dans notre cas, nous utilisons jusqu'à trois couches : une couche de métal pour la partie conductrice, une couche d'isolant sur les pistes de connexion et une couche de résine épaisse pour créer un puits. Ces trois couches sont utilisées pour la partie sensible du capteur. Pour la partie microfluidique, une seule couche de résine épaisse est utilisée pour créer un moule. Chaque couche a un motif spécifique qui est structuré à l'aide d'un masque en lithographie.

Le capteur final est obtenu en collant le canal microfluidique sur le substrat en verre, où se trouve la partie sensible du capteur (les électrodes). Ces deux parties sont fabriquées indépendamment l'une de l'autre et collées ensemble par un traitement de surface de la partie microfluidique par fonctionnalisation par plasma. Les détails des procédures de fabrication sont exposés dans une partie suivante.

Toutes les étapes de fabrication ici présentées ont été réalisées à l'institut Jean Lamour, dont la plus grande partie en salle de microfabrication (salle blanche) avec l'aide et le soutien du centre de compétence MiNaLor.

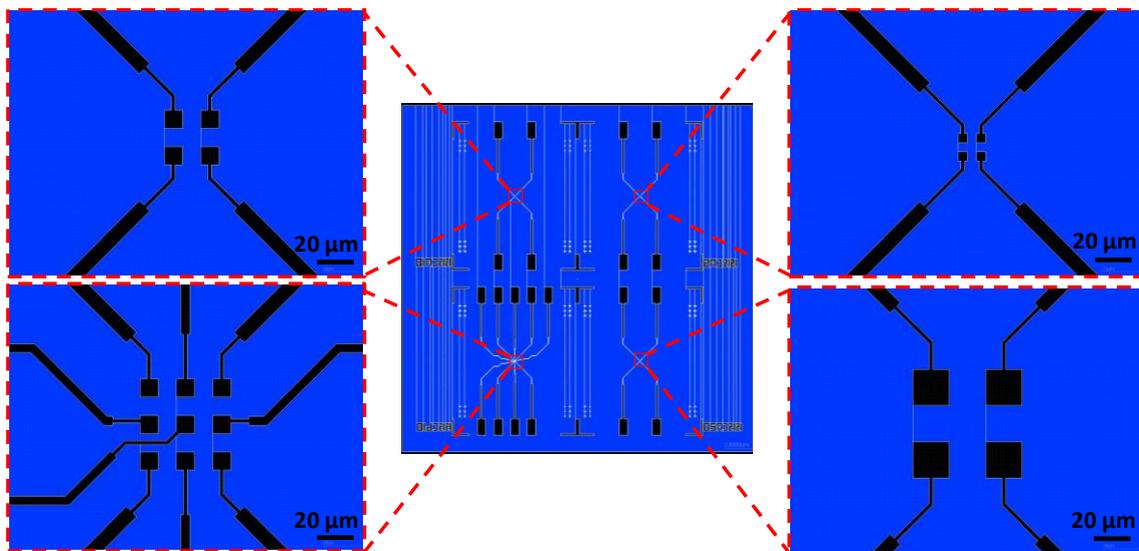
3.4.1. Dessin et réalisation des masques

Lors de l'étape de lithographie, un masque avec les motifs souhaités pour chaque couche est utilisé. Dans les Figure 3-8(a-d) sont montrés les designs des masques pour la couche des électrodes Figure 3-8(a), pour la couche d'isolant Figure 3-8(b), pour la couche du

puits Figure 3-8(c) et le masque pour faire le moule du canal microfluidique Figure 3-8(d). Dans chaque masque il y a 4 motifs différents (un pour chaque structure) :

- 1 motif pour la matrice des électrodes 2x2 et chaque électrode avec les dimensions $5 \times 5 \mu\text{m}^2$;
- 1 motif pour la matrice des électrodes 2x2 et chaque électrode avec les dimensions $10 \times 10 \mu\text{m}^2$;
- 1 motif pour la matrice des électrodes 2x2 et chaque électrode avec les dimensions $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ et ;
- 1 motif pour la matrice des électrodes 3x3 et chaque électrode avec les dimensions $10 \times 10 \mu\text{m}^2$.

Les designs des masques ont été validés par les ingénieurs du CC MiNaLor et envoyés à la centrale de technologie de Femto-ST pour la fabrication des masques en Soda-lime cinq pouces.



(a)

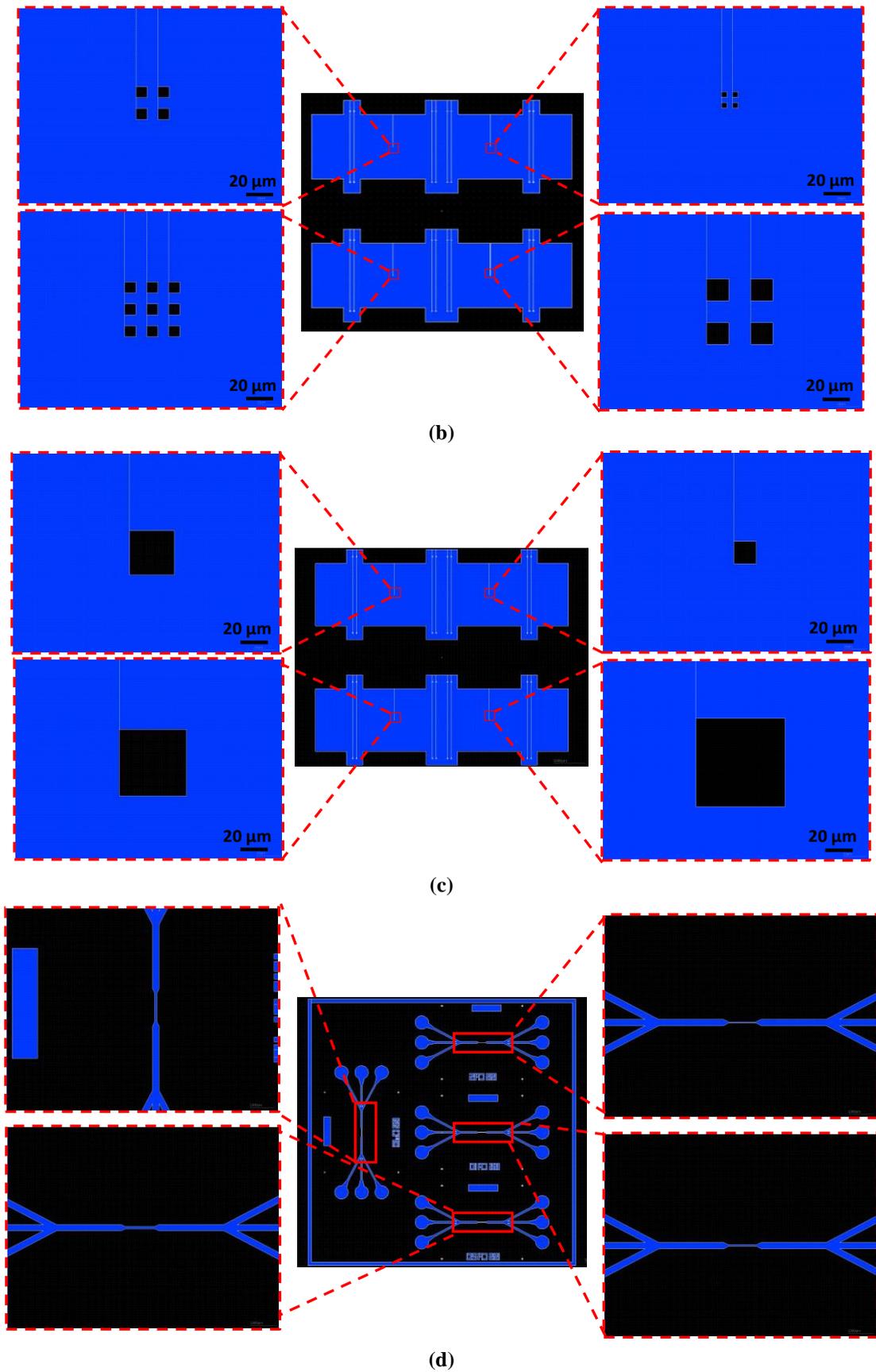


Figure 3-8. Image du design des masques (a) pour la fabrication des électrodes (b) pour la fabrication de la couche d'isolant (c) pour la fabrication du puits et (d) pour la fabrication des canaux microfluidiques.

3.4.2. Fabrication de la partie sensible

La partie sensible du capteur est réalisée avec une couche métallique « tantale-platine », une couche d'isolant SiO_2 sur les pistes de connexion et une troisième couche en résine SU-8 pour former un puits. La fabrication de la partie sensible passe par les sept étapes schématisées dans la Figure 3-9 et listées ci-dessous:

- Nettoyage du substrat ;
- Dépôt de tantale et platine ;
- Masquage en résine pour la gravure du tantale-platine ;
- Gravure du tantale-platine ;
- Masquage en résine pour faire le lift off de SiO_2 ;
- Dépôt et lift off de SiO_2 ;
- Photolithographie de la résine SU-8 .

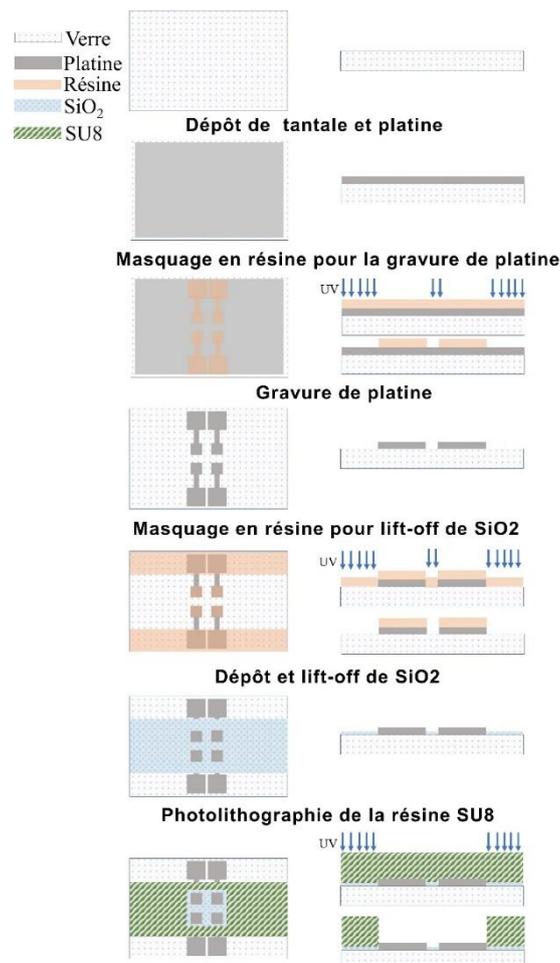


Figure 3-9. Étapes de fabrication de la partie sensible du capteur

- **Nettoyage des échantillons**

Pour enlever toute saleté comme des poussières ou des graisses et avoir un bon accrochage des matériaux, nous avons nettoyé les substrats en verre. D'abord avec une solution de soude (NaOH) et avec une solution détergente alcaline à base de perborate de sodium (PBS 5%) pour enlever les traces de graisse. Nous les avons ensuite nettoyés à l'acétone et à l'isopropanol pour enlever les matériaux inorganiques. Les nettoyages au NaOH, au PBS et à l'acétone sont faits dans un bain à ultrasons pendant 10 min par étape. Après le nettoyage à l'acétone, l'échantillon est rincé avec l'isopropanol et séché au pistolet à azote.

- **Dépôt de Tantale et Platine**

Dans cette étape réalisée par pulvérisation cathodique (AC450, Alliance Concept), le substrat est complètement couvert par une couche de tantale qui sert de couche d'accrochage puis de platine. Le platine étant relativement inerte, il présente des problèmes d'accrochage au verre. Cela explique l'utilisation d'une fine couche d'accrochage de tantale. L'épaisseur de la couche de tantale est d'environ 10 nm et la couche de platine est d'environ 150 nm [52].

- **Masquage en résine pour la gravure du tantale-platine**

À cette étape le substrat est complètement couvert par le platine, nous devons donc créer une couche de masquage en résine qui protégera les zones de platine à conserver lors de la gravure pour obtenir le motif désiré. Pour réaliser cette étape, la résine photosensible positive MICROPOSIT S1813 est étalée uniformément sur le substrat à l'aide d'une tournette. Après l'étalement une plaque chauffante permet d'enlever le solvant de la résine liquide. Le substrat est ensuite placé dans un aligneur de masque ultraviolet (UV) (MJB4, SUSS MicroTec®). Un masque comportant les motifs des électrodes est plaqué sur l'échantillon qui est ensuite soumis à un rayonnement UV. Une fois insolée, la résine est développée dans un béccher de MF319 (développeur pour la résine S-1813) de sorte que le masque de résine est créé (Figure 3-10).

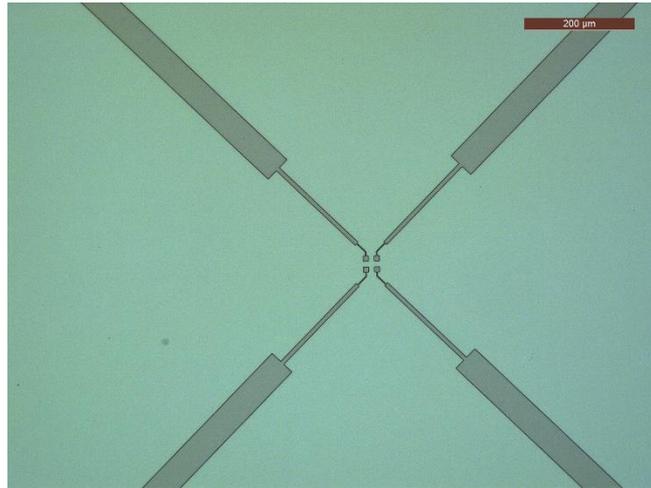


Figure 3-10. Image microscopique du masque en résine pour la gravure du tantale/platine.

- **Gravure du tantale-platine**

Une fois le masque en résine créé sur l'échantillon, nous passons à l'étape de gravure pour enlever les parties métalliques que le masque ne protège pas. Cette procédure est généralement faite par une gravure sèche ou par une gravure humide. La gravure humide est faite par voie d'attaque chimique en milieu humide (avec des acides ou bases) et la gravure sèche utilise un faisceau d'ions dirigés vers la cible à traiter. Le choix du type de gravure dépend de plusieurs paramètres tels que le cout, la sélectivité du matériau de gravure, l'anisotropie, le taux de gravure et la compatibilité de la procédure [52].

Le platine est un des métaux le plus difficiles à graver à cause de son inertie chimique. Ainsi pour éviter l'utilisation des produits chimiques très forts, nous avons utilisé la gravure sèche ionique qui est disponible au centre de compétences MiNaLor et est compatible avec nos procédures.

Comme la gravure ionique n'est pas sélective, il est nécessaire d'établir un temps de gravure pour éviter, une fois les métaux gravés, de graver le substrat aussi. Pour cela, le bâti de gravure comporte un spectroscope de masse des ions secondaires (SIMS : secondary ion mass spectroscopy), qui permet d'analyser en continu les matériaux en cours de gravure. À la fin de la gravure du métal, il reste encore le masque de résine sur le substrat. Pour enlever ce masque, nous laissons l'échantillon dans un bécher avec acétone pendant 20 minutes.

Après cette étape nous obtenons le capteur avec le motif de la couche de métal et nous pouvons coller le canal microfluidique pour obtenir les capteurs sans la couche d'isolant. Pour

les capteurs avec les couches d'isolant sur les pistes, deux étapes de fabrication sont encore nécessaires avant de coller le canal microfluidique.

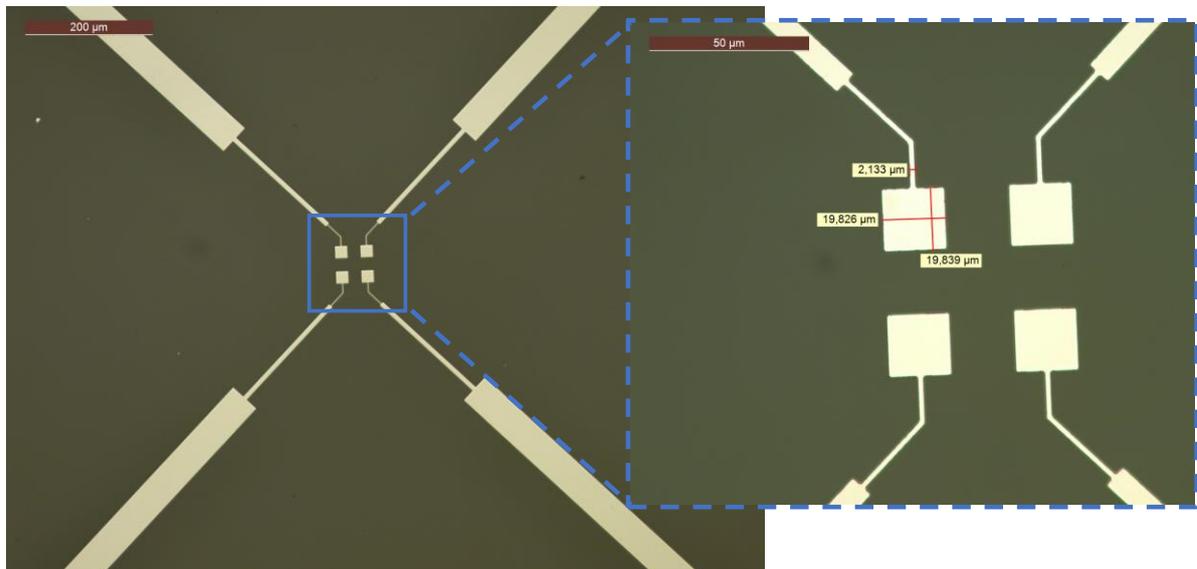


Figure 3-11. Image microscopique après la gravure du tantale/platine.

- **Masquage en résine pour faire le lift off de SiO_2**

Avant de faire le dépôt de SiO_2 nous devons réaliser une couche sacrificielle en résine LOR3A. À l'inverse de l'étape du masquage pour le dépôt de tantale/platine, dont nous avons enlevé l'excès de métal par gravure, dans cette étape nous enlevons l'excès de SiO_2 présent sur couche sacrificielle en enlevant celle-ci par dissolution. Dans la Figure 3-12 nous pouvons observer la couche sacrificielle seulement sur les électrodes.

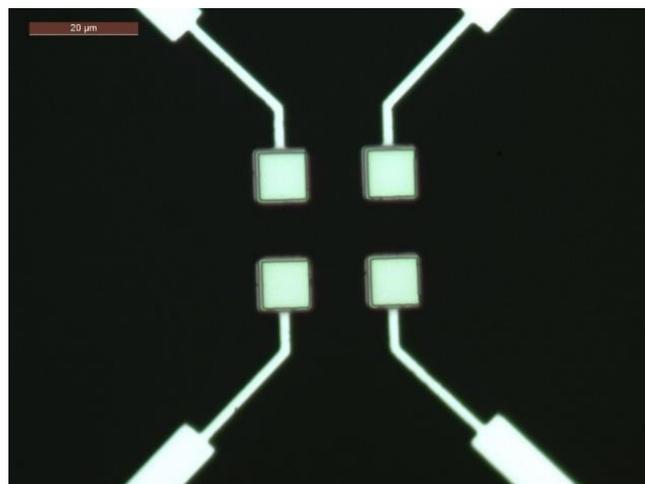


Figure 3-12. Image microscopique de la couche sacrificielle sur les électrodes.

- **Dépôt et lift off de SiO₂**

Une fois la couche sacrificielle réalisée, nous passons à l'étape de dépôt du SiO₂. Le dépôt de SiO₂ a été réalisé par pulvérisation cathodique (dans la même machine que le dépôt de platine) durant 1600 secondes pour créer une couche de 150 nm. Pour enlever l'excès de SiO₂ et former le motif souhaité après le dépôt de SiO₂, l'échantillon est placé dans un bécher rempli avec le solvant MICROPOSIT™ REMOVER 1165 à 80°C pendant 30 minutes sans ultrason et puis 5 minutes avec ultrason. Après les 35 minutes, la partie du motif non souhaité de la couche sacrificielle est dissoute de l'échantillon et tout le SiO₂ qui couvrait cette partie est aussi retiré de sorte que la couche de SiO₂ reste seulement sur les pistes de connexion (Figure 3-13).

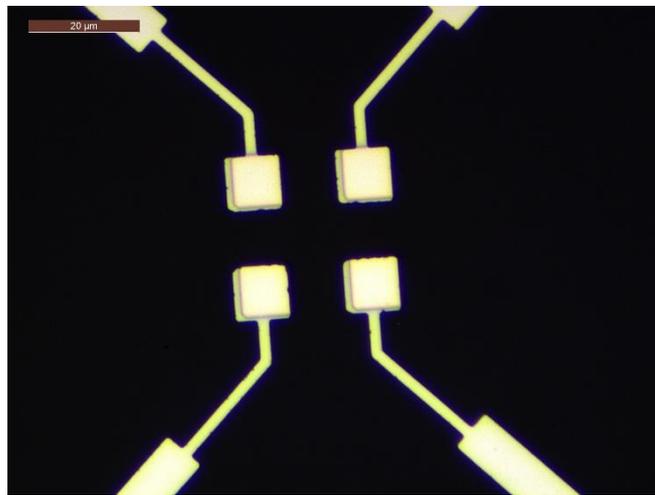


Figure 3-13. Image microscopique de la couche d'isolant autour des électrodes.

- **Photolithographie de la résine SU-8**

La photolithographie de la résine SU-8 est utilisée pour la fabrication du moule du canal microfluidique et pour la formation du puits. La résine SU-8 est une résine négative qui devient très résistante aux solvants après insolation UV. L'étape de la création du puits devient donc critique, car si les motifs ne sont pas correctement obtenus au premier développement toutes les étapes précédentes sont perdues, car la résine devient presque impossible à enlever. Des tests pour trouver les bons paramètres d'enrésinement et d'insolation ont été faits en premier lieu avec des échantillons de verre simple.

La Figure 3-14 montre l'image du capteur avec un agrandissement sur les électrodes où nous pouvons observer les traits du puits autour des électrodes.

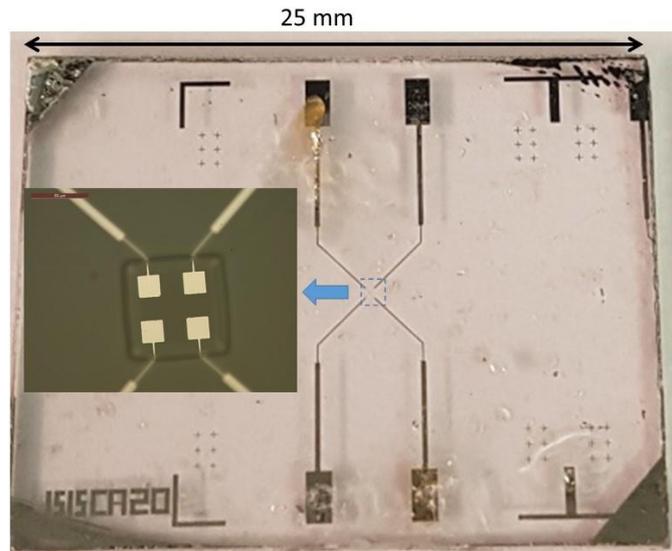


Figure 3-14. Image du capteur avec un agrandissement sur les électrodes où les bords des puits sont mis en évidence.

3.4.3. Fabrication du canal microfluidique

Le canal microfluidique est réalisé avec du PDMS structuré par moulage à partir d'un moule en résine SU-8. Ce moule est réalisé par dépôt de la résine épaisse SU-8 sur un substrat silicium puis structuré pour obtenir le négatif du canal.

La fabrication du canal microfluidique passe par quatre étapes dont les trois premières consistent en la fabrication du moule et la dernière au moulage (schématisé dans la Figure 3-15). La première étape est la préparation du substrat (coupure et nettoyage). Nous découpons un wafer (4 pouces de diamètre) de silicium aux dimensions des canaux ($2 \times 2,5 \text{ cm}^2$) pour diminuer les coûts. Normalement les wafers de silicium sont déjà nettoyés, mais lors de l'étape de coupure des saletés et débris sont présents et une étape de nettoyage est alors nécessaire. Après la préparation du substrat, nous passons à l'étape d'étalement de la résine en utilisant les paramètres d'accélération de la tournette et de température de la plaque chauffante déjà validés pour les puits. L'échantillon ensuite passe par les étapes d'insolation et de développement de la résine pour obtenir le motif en négatif du microcanal sur le substrat. Une fois la structure du canal formée nous passons à l'étape de moulage consistant au dépôt d'une quantité de PDMS (encore liquide) permettant d'avoir une épaisseur d'environ 4 mm. Le PDMS encore liquide déposé sur le moule est dégazé sous cloche à vide de manière à épouser parfaitement la structure du moule. Après 24 h à température ambiante le PDMS durcit et est prêt à être démoulé.

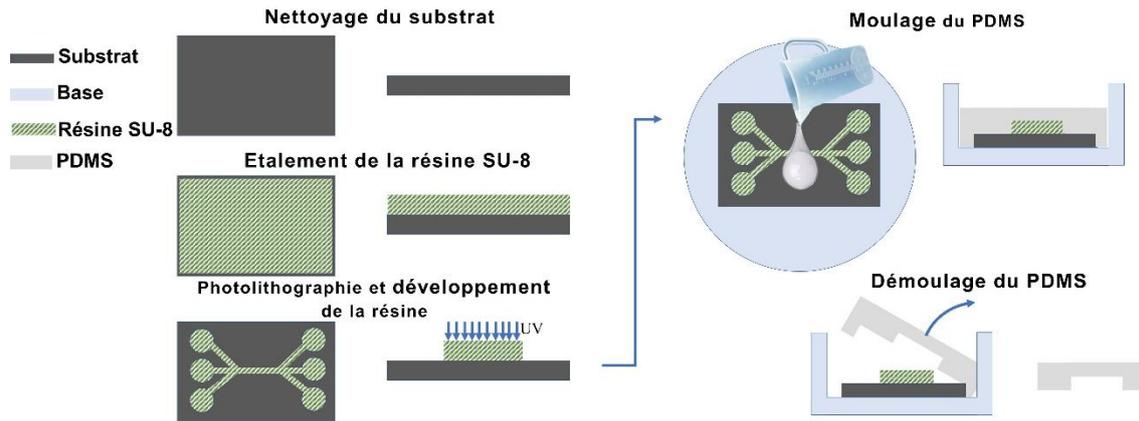


Figure 3-15. Étapes de fabrication du canal microfluidique

3.4.4. Assemblage du canal microfluidique à la partie sensible du capteur

Une fois la partie sensible sur verre et le PDMS avec le microcanal obtenus, ces deux parties sont fixées ensemble après un traitement de surface du PDMS par plasma oxygène [87]. Avant le traitement par plasma les surfaces des échantillons sont soigneusement nettoyées avec de l'isopropanol. La formule empirique du PDMS est $(C_2H_6OSi)_n$ dont n est le nombre de répétitions du monomère. Le traitement de surface par plasma du PDMS produit des terminaisons silanol ($SiOH$) à la surface de sorte que des liaisons covalentes $Si-O-Si$ sont formées avec la surface du substrat en verre [88]. Après le traitement de la surface du PDMS et du substrat, nous opérons le centrage du canal sur les électrodes à l'aide d'un microscope. Une fois le PDMS bien placé sur le substrat, l'ensemble est chauffé à 90° pendant 15 min pour finir le collage. Le schéma de l'assemblage du canal microfluidique à la partie sensible du capteur est affiché dans la Figure 3-16.

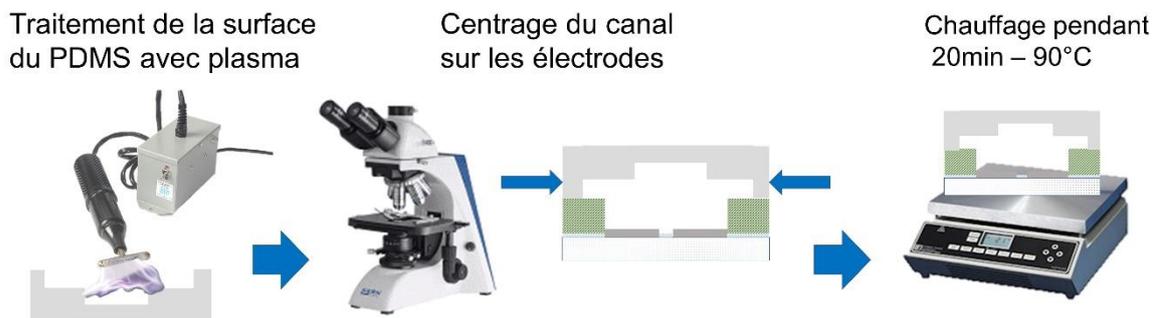


Figure 3-16. Étapes d'assemblage de la partie sensible et du canal microfluidique.

La Figure 3-17(a) montre le capteur avec le canal microfluidique après l'étape de collage et la Figure 3-17 (b) montre le placement des électrodes dans le canal microfluidique.

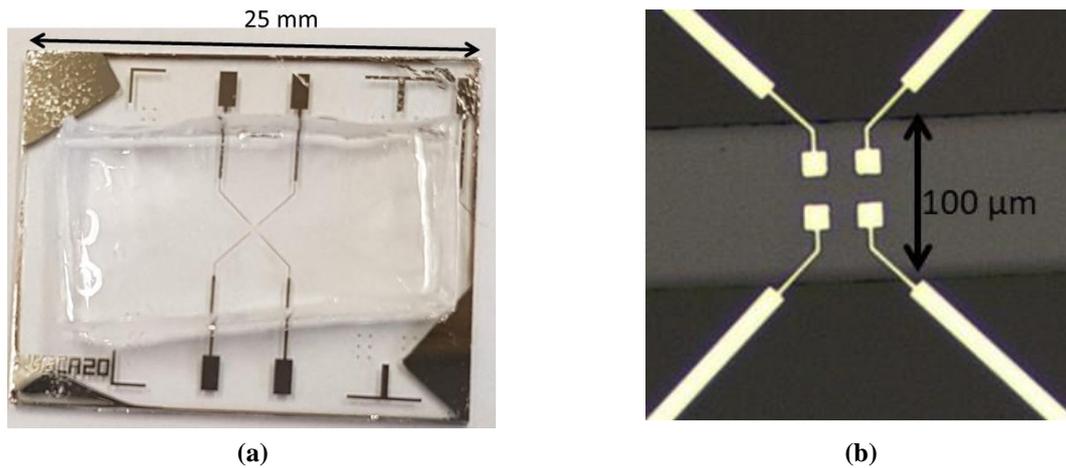


Figure 3-17. (a) Image du capteur avec le canal microfluidique et (b) image microscopique des électrodes dans le canal microfluidique.

3.5. Réalisation d'un banc de mesure

Le banc d'expérimentation utilisé pour faire les mesures de spectroscopie d'impédance est présenté en Figure 3-18. Les équipements utilisés sont : (1) impédancemètre de précision (2) matrice de switchs, (3) cartes PCB (*Printed Circuit Board*) d'interface capteur-connectique, (4) microscope avec caméra CMOS, (5) micropositionneur et (6) ordinateur.

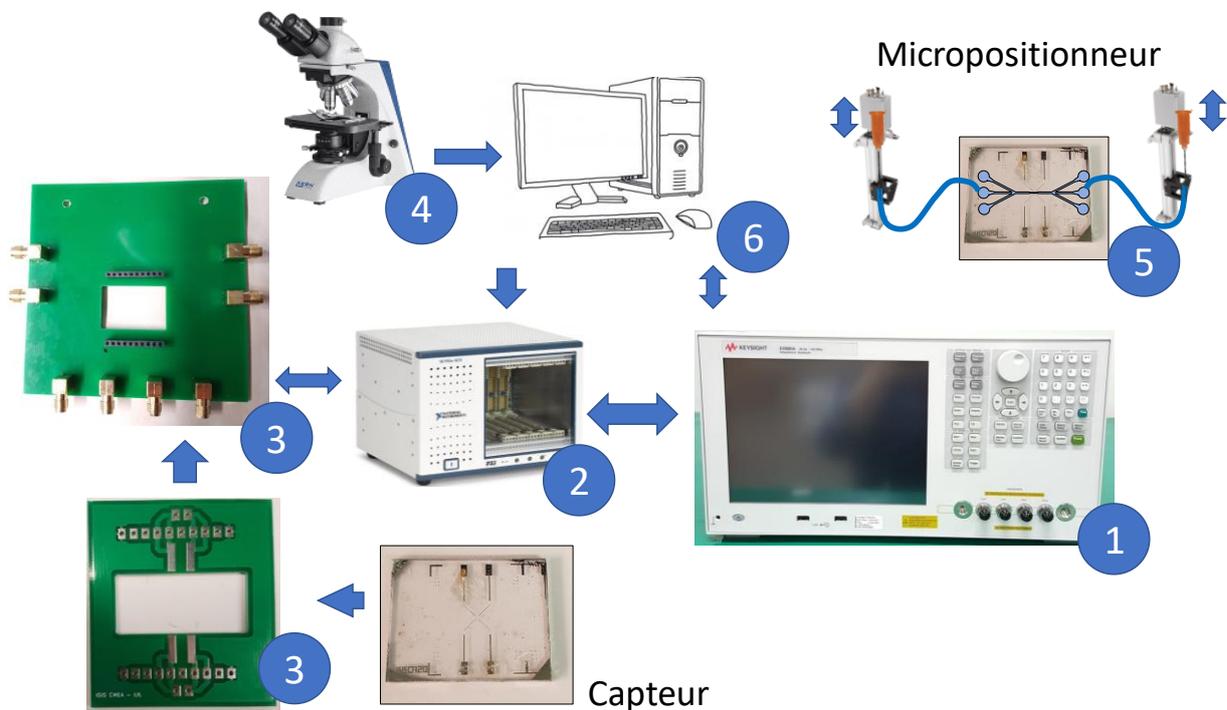


Figure 3-18. Schéma du banc de mesure.

Ce banc de mesure est centré sur l'impédancemètre de précision pour faire les mesures du spectre d'impédance. Cet impédancemètre est connecté à la matrice de switchs qui nous

permet de faire les mesures avec différentes configurations entre les électrodes. Pour connecter le capteur à la matrice de switches nous utilisons des cartes PCB. Le microscope nous permet de visualiser si les échantillons sont correctement placés sur les électrodes et le micropositionneur nous permet de placer les cellules entre les électrodes. Avec l'ordinateur nous commandons l'impédancemètre, la matrice de switches et la caméra du microscope, ainsi comme nous rapatrions les données.

- **L'impédancemètre**

L'impédancemètre de précision utilisé est le E4990A Keysight (Keysight Technologies®, Santa Rosa, U.S.A.) permettant de faire des mesures dans la bande de fréquence 20 Hz – 120 MHz avec des impédances entre 25 mΩ et 40 MΩ. La précision de cet appareil est de 10% aux conditions extrêmes jusqu'à 0,08% aux meilleures conditions (Figure 3-19). Cet impédancemètre est basé sur la méthode par pont auto accordé [89].

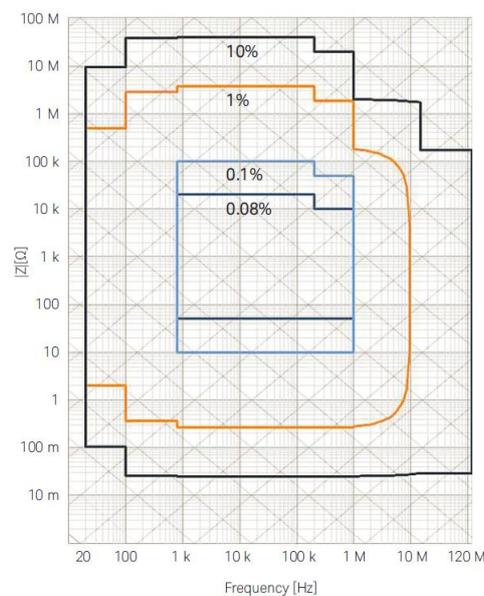


Figure 3-19. Plage de mesure de l'impédancemètre [89].

- **La matrice de switches**

Pour faciliter la connectique et faire des mesures adressables entre les électrodes, nous utilisons une matrice de switches. La matrice de switches est intégrée dans un châssis NI PXIe-1073 (National Instruments®, Austin-U.S.A) qui est connecté directement à l'ordinateur. Nous avons deux matrices de switches disponibles : la première est la NI PXIe-2529 (National

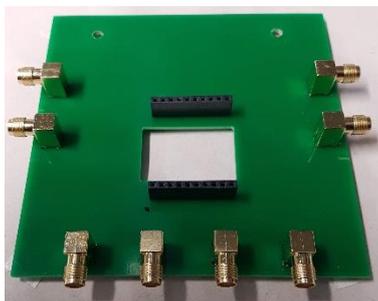
Instruments[®], Austin-U.S.A) et la deuxième est NI PXIe-2540 (National Instruments[®], Austin-U.S.A). Dans le Tableau 3-2 sont affichées les principales caractéristiques des matrices de switches. La deuxième matrice de switches est plus adaptée pour notre utilisation, cependant nous l'avons obtenu seulement très récemment au cours de la troisième année de ce projet de thèse.

Tableau 3-2. Caractéristiques des matrices de switches

	Matrice de switches 1	Matrice de switches 2
N° de lignes et colonnes	4 x 32	8 x 9
Fréquence max	10 MHz	350 MHz
Type de connexion	Bornier à vis	Connexion coaxiale
Type de relais	Relais électromécaniques	Relais reed

- **Les cartes PCB**

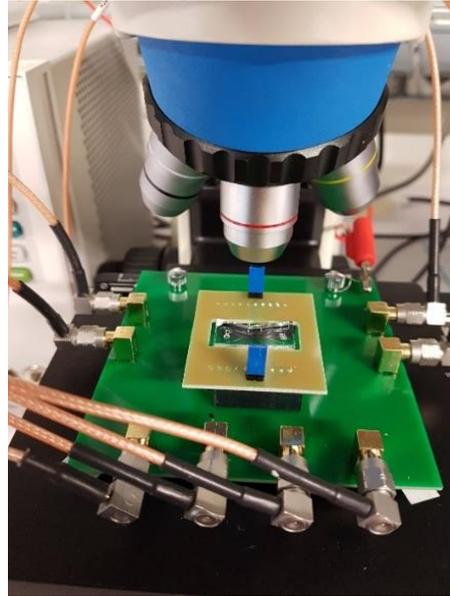
Pour faire la connectique entre le capteur et l'impédancemètre, nous avons utilisé des cartes PCB. Nous avons utilisé une carte (Figure 3-20(a)) pour connecter les câbles qui sortent de la matrice de switches et servent de base pour la connexion d'une deuxième carte sur laquelle nous soudons le capteur (Figure 3-20(b)). Dans la Figure 3-20(c) est affichée la connectique complète au microscope. Nous avons conçu les cartes PCB avec le logiciel KiCad (logiciel de licence publique générale) et sous-traité la fabrication par JLCPCB (Shenzhen JIALICHUANG Electronic Technology Development Co.,Ltd, Chine).



(a)



(b)



(c)

Figure 3-20. Images des cartes PCB (a) pour connecter les câbles (b) pour souder le capteur et (c) la connectique complète au microscope.

- **Système de déplacement de la cellule dans le microcanal**

À l'entrée et la sortie du canal microfluidique, nous introduisons un capillaire sur lequel est insérée une aiguille à l'autre extrémité. Nous plaçons les aiguilles de l'entrée et de la sortie à la même hauteur pour avoir un équilibre et l'aiguille est déplacée vers le haut ou vers le bas avec le micropositionneur pour réaliser une petite variation de la pression dans le microcanal. Cette petite variation de pression est suffisante pour déplacer l'échantillon dans le microcanal. Ce système de déplacement est basé sur le principe de Pascal.

3.5.1. Enregistrement des données

Les images du microscope ont été sauvegardées avec le logiciel Motic Images Plus 2.0 fourni par le fabricant de la caméra Moticam 3 (Motic[®], Hong Kong).

L'enregistrement des données de l'impédancemètre et le contrôle de la matrice de switches ont été faits avec Labview (National Instruments[®], Austin-U.S.A). Dans la Figure 3-21 est affichée la face avant du programme utilisé pour commander l'acquisition de données. La structure de cette face avant est partagée en cinq parties :

- La première partie permet de réaliser le choix des appareils à utiliser (l'impédancemètre et la matrice de switches) ;

- La deuxième partie permet la configuration de l'impédancemètre avec la bande de fréquence de mesure, le nombre de points, la tension d'excitation et le type de balayage en fréquence ;
- La troisième partie permet de choisir la configuration des électrodes à utiliser ;
- La quatrième partie sert à configurer le dossier et le nom du fichier à sauvegarder les données en .csv et ;
- La cinquième partie affiche une pré-visualisation des données à enregistrer.

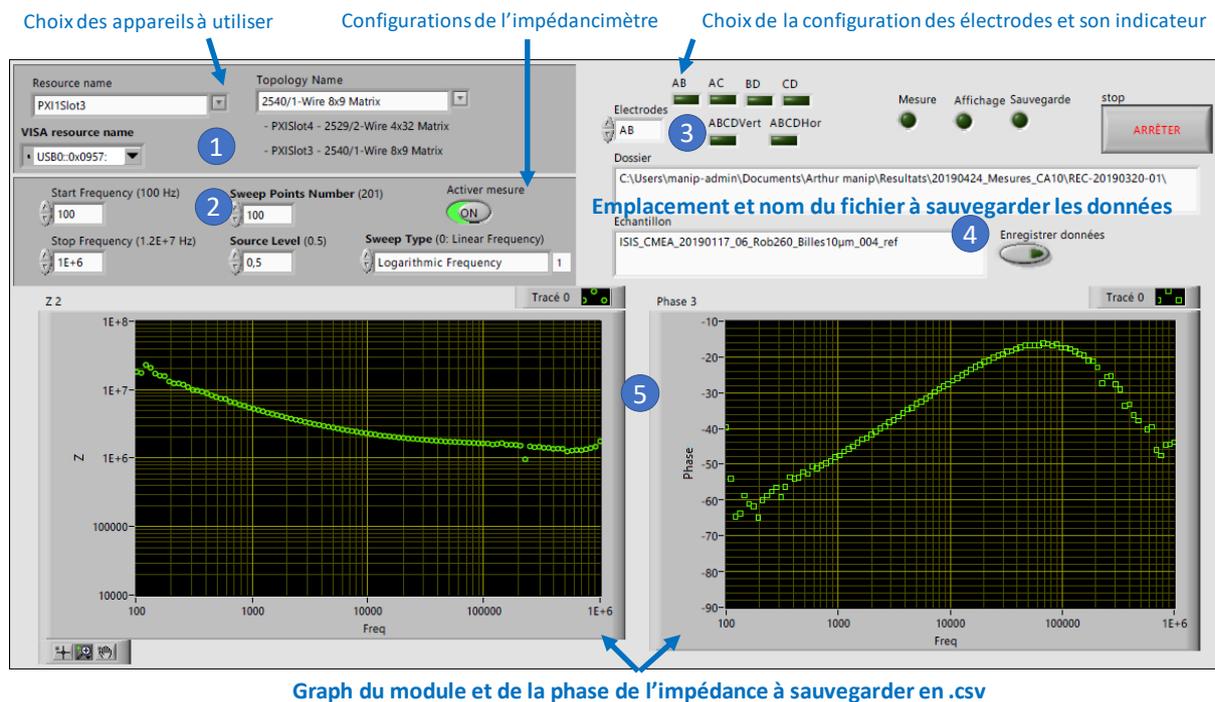


Figure 3-21. Face avant du programme Labview utilisé pour commander l'acquisition de données.

3.6. Conclusion

Ce chapitre a abordé la conception du capteur, les matériaux utilisés pour la fabrication, les principales techniques de fabrication du capteur en salle blanche et la réalisation d'un banc de mesure.

La première partie traite la conception du capteur avec les détails de la structure et les dimensions des électrodes développées. Sont notamment décrits les schémas des géométries des pistes de connexion, de la couche d'isolant et de la couche du puits. Enfin la structure globale du microcanal est décrite.

Les matériaux du capteur sont biocompatibles, à bas coûts, compatibles avec les procédés en salle blanche et transparente. Leur choix s'est établi ainsi : le verre comme substrat, le platine pour les électrodes, le SiO_2 pour la couche d'isolant et le PDMS pour le canal microfluidique.

Bien qu'ayant utilisé des procédés classiques dans la salle blanche, il a fallu beaucoup de temps pour fabriquer les capteurs principalement à cause des problèmes de fixation de la partie microfluidique à la partie sensible du capteur. Plusieurs capteurs dont la partie microfluidique était à l'origine bien fixée à la partie sensible se sont détériorés après quelques passages de solution. Le décollement de cette partie microfluidique n'a pas permis une caractérisation complète de ces capteurs. Ce problème a été résolu par l'utilisation d'une procédure alternative par plasma Corona.

Chapitre 4 :
Étude expérimentale : mesures et validation
du capteur

4.1. Introduction

Ce chapitre porte sur l'étude expérimentale des capteurs réalisés en salle blanche tels que décrits au chapitre précédent. Après leur réalisation, nous avons procédé à une campagne de mesures pour caractériser et vérifier les analyses/hypothèses de la partie modélisation. Avant de caractériser les capteurs eux-mêmes, nous avons vérifié l'impact de l'ajout d'une matrice de switches entre les capteurs et l'impédancemètre. Une fois l'utilisation de la matrice de switches testée nous avons validé l'ensemble du banc expérimental.

Les premières mesures ont été réalisées avec les capteurs sans canal microfluidique, avec et sans la couche d'isolant sur les pistes de connexion pour observer dans un premier temps l'influence de celle-ci. Une fois vérifié que la couche d'isolant pouvait diminuer les effets des pistes de connexion, nous avons pu passer aux mesures sur des capteurs avec canal microfluidique. Nous avons utilisé quatre structures de capteurs avec et sans couche d'isolant (avec électrodes de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ puis avec électrodes de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$) de sorte que nous avons pu comparer les effets dus aux dimensions des électrodes et à l'utilisation de la couche d'isolant sur les pistes de connexion. Comme les dimensions des pistes de connexion exposées à la solution sont différentes, nous avons aussi pu analyser leurs effets.

Sont présentées et discutées les résultats obtenus avec des solutions calibrées en conductivité pour caractériser et étalonner les capteurs. Des microbilles calibrées ont été utilisées pour réaliser une analyse quantitative de la variation d'impédance normalisée en mode statique. Avec ces mesures nous avons pu observer une augmentation de la variation d'impédance normalisée due aux améliorations amenées au capteur et la possibilité d'utiliser celui-ci pour la détection de cellules unitaires.

Dans la dernière partie, nous présentons la possibilité de mesurer la variation de concentration cellulaire en régime dynamique.

4.2. Validation du banc de mesures : utilisation d'une matrice de switches

Pour réaliser des mesures adressables entre les quatre électrodes et éviter de débrancher et rebrancher les câbles à l'impédancemètre à chaque mesure, nous avons utilisé une matrice de switches (décrite au chapitre précédent) pilotée par Labview.

Une fois la matrice de switches intégrée au banc de mesures nous avons effectué des mesures comparatives avec et sans la matrice de switches pour analyser son impact sur les mesures et nous avons aussi analysé la compensation de l'impédancemètre. Les mesures ont été faites avec de l'eau du robinet (0,027 S/m environ) en utilisant un capteur d'électrodes 20x20 μm^2 simple. L'eau du robinet a été précaractérisée avec l'impédancemètre et son kit de caractérisation pour liquides (16452A Liquid Test Fixture, Keysight Technologies[®], Santa Rosa, U.S.A.).

Nous observons dans le graphique de la Figure 4-1 (dont Sw1 représente la matrice de switches 1 et Sw2 représente la matrice de switches 2, détaillées dans la section 3.5):

- que la compensation des effets parasites (en circuit ouvert et circuit fermé) de l'appareil permet une augmentation d'environ 500% de la bande de fréquence utile (de $B = 7,87$ kHz à $B = 52,95$ kHz). Cette augmentation est dû à la compensation de l'impédance parasite des câbles et des pistes de connexion de la carte électronique ;
- que la mesure **sans compensation** avec la matrice de switches 1 (courbe verte) ne subit que les effets de l'impédance parasite des câbles et des pistes de connexion de la carte électronique ;
- que la mesure **sans compensation** et sans switches (courbe rouge) et la mesure **sans compensation** et avec le switch 1 (courbe magenta) présentent un palier résistif à peine visible, car les effets capacitifs parasites du système réduisent la fréquence de coupure haute;
- que les mesures **avec compensation** ont une coupure de fréquence plus haute, mais la mesure **avec compensation** et le switch 1 (courbe cyan) a une fréquence de coupure haute plus petite que la mesure **avec compensation** et avec switch 2 (courbe noire).

Par ces observations, nous avons conclu que compte tenu des impédances à mesurer une compensation du système est nécessaire et que la matrice de switches 2 induit moins d'effets parasites que la première. Cela justifie que nous l'ayons retenue pour le banc de mesure.

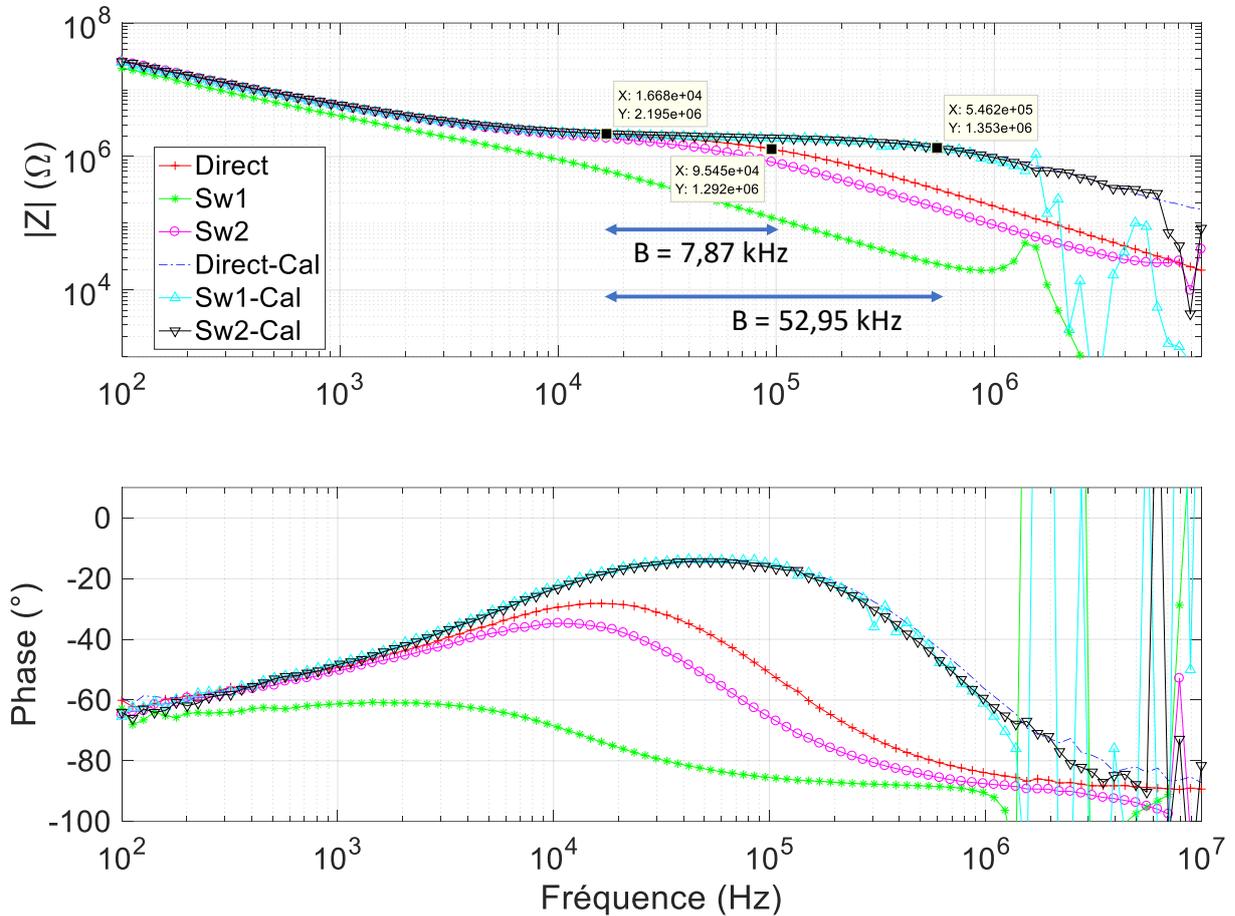


Figure 4-1. Graphiques de l'impédance et de la phase avec et sans la matrice de switches et avec et sans compensation des effets parasites des câbles et de la carte électronique.

4.3. Mesures avec des capteurs sans canal microfluidique

Les premières mesures ont été réalisées avec le capteur sans canal microfluidique. Nous avons effectué les tests avec trois capteurs sans canal microfluidique: un simple, un avec une couche d'isolant sur les pistes de connexion et un autre avec une couche d'isolant sur les pistes de connexion et avec un puits. Pour ces premiers tests nous avons utilisé les capteurs avec 4 électrodes de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ (Tableau 4-1).

Tableau 4-1. Caractéristiques des premiers capteurs utilisés

Capteur	Dimensions électrodes	N° électrodes	Isolant	Puits
C1	20 x 20 μm	4		
C2	20 x 20 μm	4	x	
C3	20 x 20 μm	4	x	x

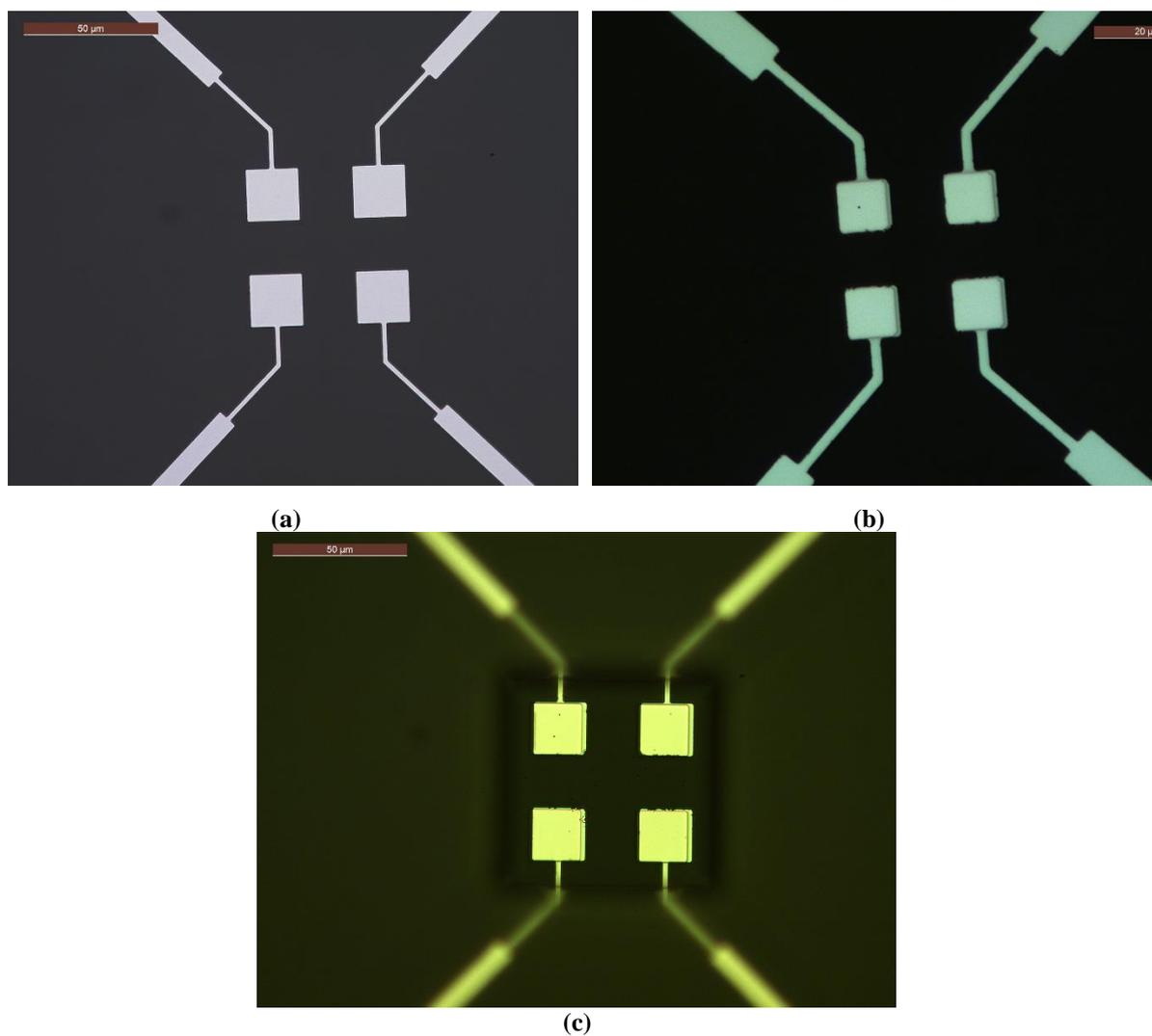


Figure 4-2. Images microscopiques des électrodes (a) du capteur C1 (simple) (b) du capteur C2 (avec la couche d'isolant) et (c) du capteur C3 (avec la couche d'isolant et le puits).

4.3.1. Mesure à vide et avec solutions étalons

Les premières mesures ont été effectuées à vide pour pouvoir déterminer les valeurs de capacités parasites. Comme la capacité des électrodes à vide (théoriquement aux alentours de 0,14 fF) est beaucoup plus petite que la capacité mesurée (aux alentours de 40 fF) nous pouvons

associer cette capacité mesurée aux capacités parasites, principalement due aux pistes de connexion. Pour le capteur C1 nous avons obtenu une capacité à vide égale à 43 fF, pour le capteur C2 à 42 fF et pour le capteur C3 égale à 71 fF. Ces résultats sont cohérents, car la couche d'isolant sur les pistes de connexion est très fine. Cependant, la couche de la résine pour créer le puits est épaisse de sorte que la capacité augmente.

Nous avons utilisé une solution étalon (conductivité électrique de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$ Hanna Instruments, Inc., Rhode Island, USA) pour analyser les effets des pistes de connexion, de la variation du volume et du positionnement des gouttes sur les mesures d'impédance. Nous avons utilisé la micropipette Eppendorf[®] 200(Hamburg, Allemagne) avec un volume de 1 μL . Comme montré dans la Figure 4-3, nous centrons la micropipette sur les électrodes (Figure 4-3 (a) et (b)), mais une fois que la goutte est sur les électrodes elle s'étale et touche une surface importante des pistes de connexions Figure 4-3(c).

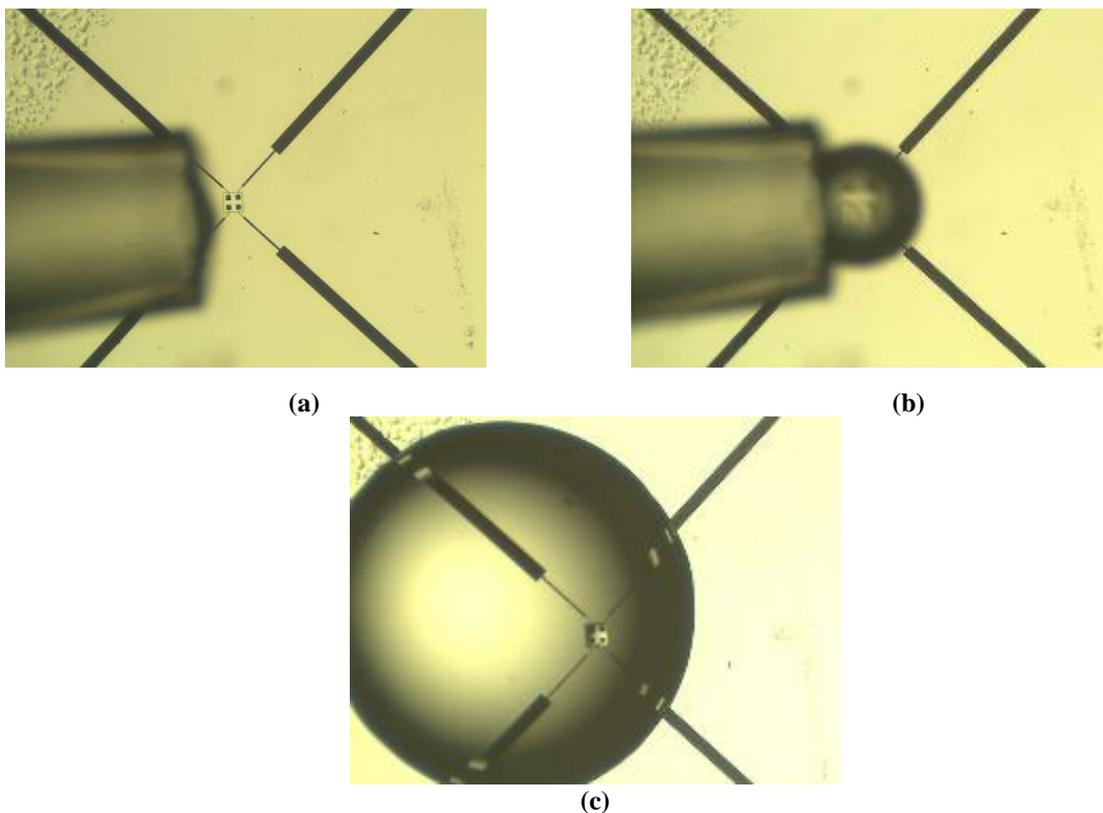


Figure 4-3. Les étapes de dépôt d'une goutte de solution étalon sur les microélectrodes. (a) Approximation du microtube, (b) dépôt de la goutte et (c) image de la goutte déposée sur les microélectrodes.

Même si nous avons une bonne précision par rapport au volume de la goutte déposée sur les électrodes, son étalement touche les pistes de connexion aléatoirement de sorte que les mesures dépendent fortement du positionnement de la goutte.

Pour diminuer les effets des pistes de connexions, nous avons réalisé un capteur avec une couche d'isolant sur les pistes de connexion. Pour analyser l'effet de l'ajout de la couche d'isolant sur les pistes de connexion, nous avons effectué des mesures avec la même solution tampon que précédemment pour deux volumes différents ($0.2 \mu\text{L}$ et $1 \mu\text{L}$) avec le capteur C1 et le capteur C2 (Figure 4-4). Nous avons aussi voulu tester le capteur C3, mais comme la résine SU-8 est hydrophobe la solution ne rentre pas facilement dans le puits et les résultats ne sont pas exploitables.

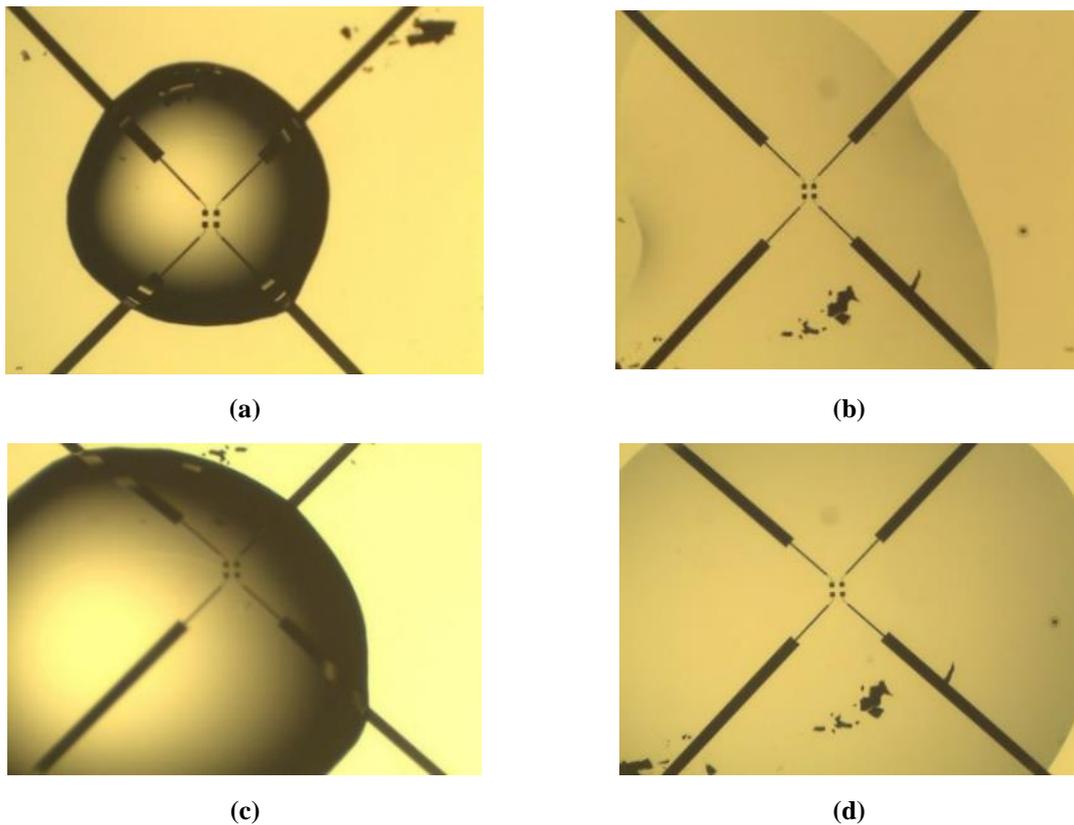


Figure 4-4. Disposition de la goutte avec un volume fixe de (a) (b) $0,2 \mu\text{l}$ et (c) (d) $1 \mu\text{L}$ sur les électrodes (a) (c) du capteur C1 et (b) (d) du capteur C2.

Le spectre d'impédance pour chaque situation décrite ci-dessus est donné dans la Figure 4-5. Les courbes noires (avec le volume $0,2 \mu\text{L}$) et verte (avec le volume $1 \mu\text{L}$) sont les spectres d'impédance pour le capteur C1 et les courbes bleues (avec le volume $0,2 \mu\text{L}$) et magenta (avec le volume $1 \mu\text{L}$) sont les spectres d'impédance pour le capteur C2.

Les impédances de la double couche (au-dessous de 10 kHz) ont les mêmes valeurs pour les capteurs C1 et C2, quel que soit le volume de la goutte. Cela veut dire que le courant en basse fréquence ne passe que par les électrodes indépendamment de la taille et de la position de la goutte. Cependant, pour le capteur C1, l'impédance est plus petite pour une goutte plus

grande. Cette diminution est due au fait que le courant passe donc principalement par les pistes de connexion au lieu de passer par les électrodes. Ces mesures ne sont donc pas exploitables, car trop dépendantes du placement de la goutte. Ces résultats prouvent la nécessité de déposer une couche d'isolant sur les pistes de connexions, comme cela avait été décrit dans la partie théorique.

À partir d'environ 300 kHz, les impédances du capteur C2 commencent à être dépendantes du volume de la solution ce qui indique que la capacité de la couche d'isolant commence à être court-circuitée. La couche d'isolant amène donc une amélioration au niveau des mesures en basses et moyennes fréquences, mais pas sur l'ensemble des fréquences utiles. Pour éviter cette dépendance au volume qui persiste en fréquence haute, nous avons développé par la suite des capteurs avec un canal microfluidique afin d'obtenir des mesures à volume constant.

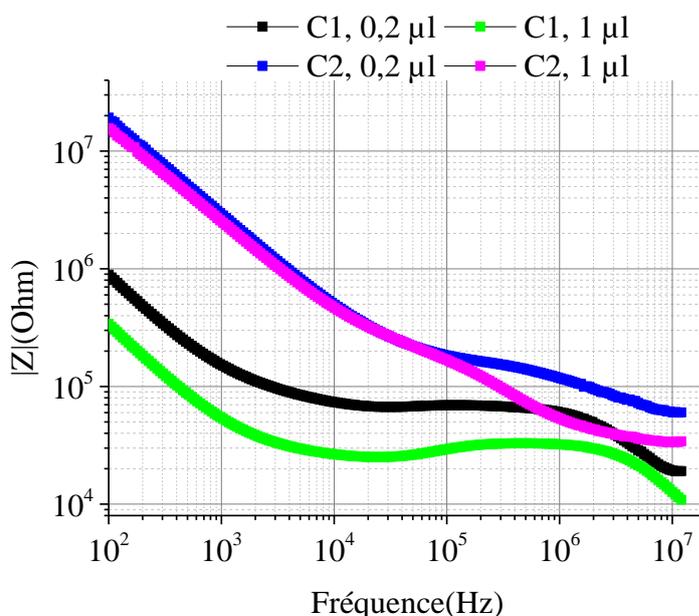


Figure 4-5. Spectre d'impédance du capteur C1 (courbes vertes et noires) et du capteur C2 (courbes magenta et bleue) avec des volumes différents sur les électrodes

4.4. Caractérisation des capteurs avec canal microfluidique

Nous avons fabriqué presque une centaine de capteurs avec deux structures différentes (le capteur simple et le capteur avec une couche d'isolant sur les pistes de connexions) avec deux dimensions d'électrodes ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$ et $20 \times 20 \mu\text{m}^2$). L'hauteur du canal microfluidique est de $20 \mu\text{m}$ et les largeurs sont de $60 \mu\text{m}$ et $100 \mu\text{m}$. Pour chaque capteur nous avons fait des mesures entre les quatre électrodes pour différentes configurations (2 électrodes et 2 paires d'électrodes). Le schéma de la Figure 4-6 montre les différentes configurations utilisées par des

flèches de couleur (les courbes du module et de la phase de l'impédance suivent les mêmes couleurs) ainsi que les noms donnés aux électrodes. « Ho » désigne la configuration où le champ électrique circule dans le sens horizontal, « Ve » désigne la configuration pour laquelle le champ électrique circule dans le sens vertical. Dans ces deux dernières configurations, les mesures sont effectuées entre deux paires d'électrodes. Dans le Tableau 4-2 est affiché un résumé avec les principales caractéristiques des capteurs.

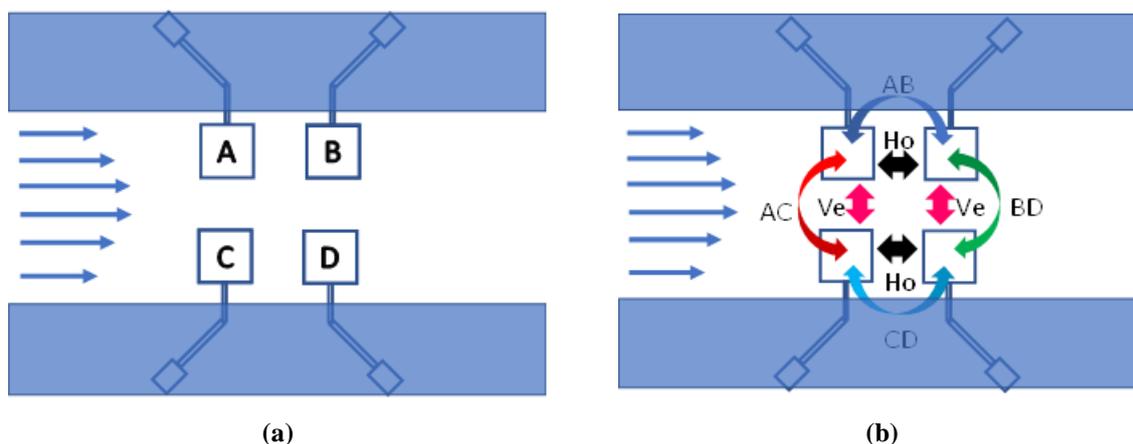


Figure 4-6.(a)Schéma et nomenclature des électrodes. (b) Schéma des combinaisons entre les électrodes.

Tableau 4-2. Caractéristique des capteurs avec canal microfluidique

Capteur	Dimensions des électrodes	Avec isolant	Hauteur du canal	Largeur du canal
CA20	20 μm x 20 μm		20 μm	100 μm
CA20ISO	20 μm x 20 μm	Oui	20 μm	100 μm
CA10	10 μm x 10 μm		20 μm	100 μm
CA10ISO	10 μm x 10 μm	Oui	20 μm	100 μm

4.4.1. Mesure à vide

Les mesures à vide nous permettent de vérifier la connectique des câbles avec le capteur et nous permettent d'extraire les valeurs des capacités des capteurs et pistes de connexion. Nous avons ainsi effectué des mesures à vide préalablement à toute autre mesure. Pour extraire la valeur de la capacité, nous avons calculé la réactance $X=|Z|\sin(\alpha)$ puis la capacité par $C = 1/(2 \times \pi \times f \times X)$. Dans la Figure 4-7(a) sont affichés le module et la phase de l'impédance pour les mesures adressables entre les électrodes et dans la Figure 4-7(b) est affichée la courbe

des capacités pour le capteur **CA20**. Les valeurs de capacités pour toutes les configurations et capteurs sont données dans le Tableau 4-3.

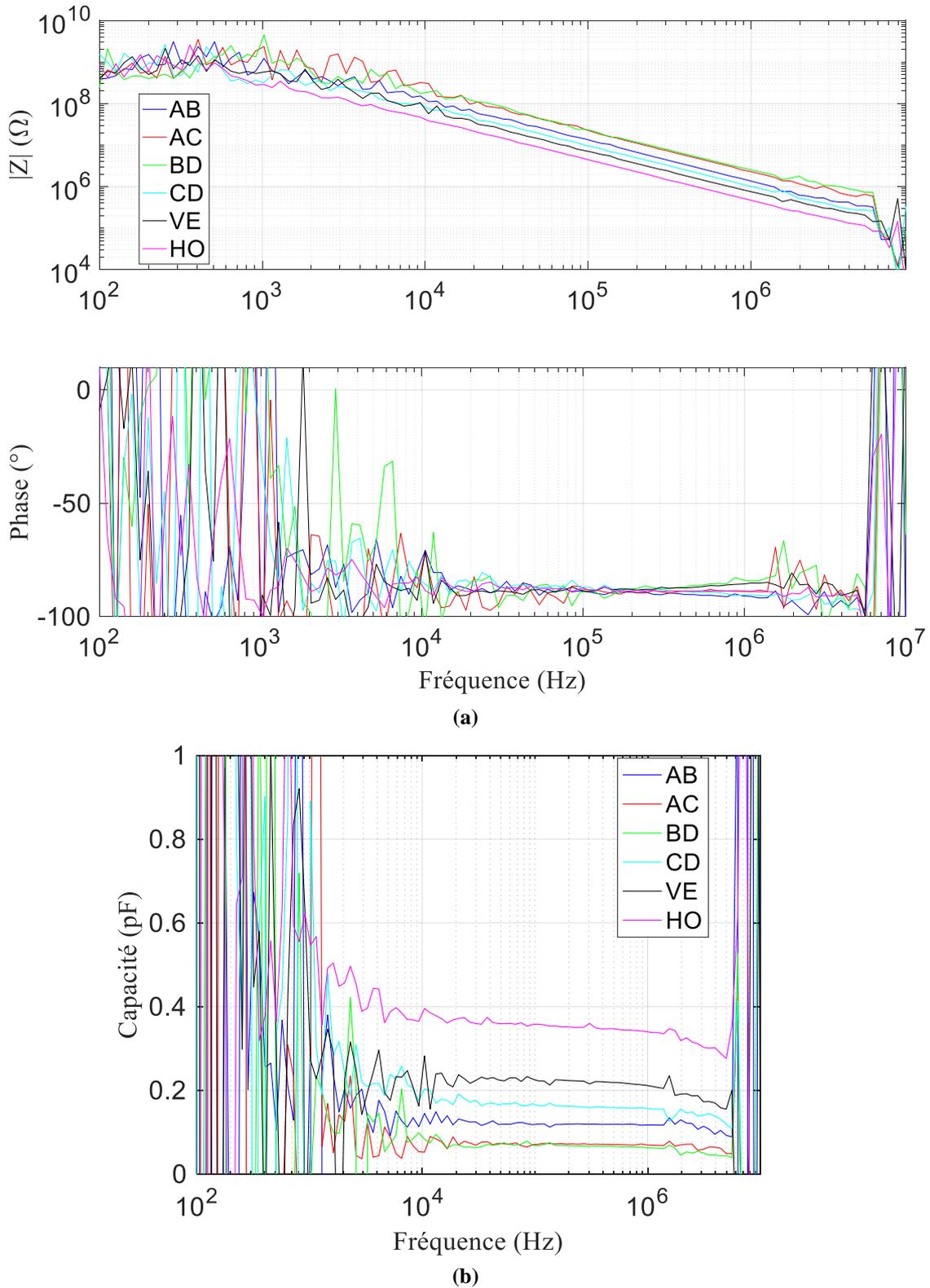


Figure 4-7. Graphiques du (a) module et phase de l'impédance et (b) de la capacité pour toutes les configurations des électrodes.

Comme nous pouvons observer dans les courbes de la Figure 4-7(a), le module et la phase de l'impédance sont très bruités en dessous de 10 kHz, ainsi qu'au au-dessus de 1 MHz pour la phase. Cela est dû aux limitations de l'appareil de mesure (affichés dans la partie 3.5). En basse fréquence l'impédance des capteurs est de l'ordre de dizaines de $M\Omega$ (l'impédancemètre est limité à $40 M\Omega$) et en hautes fréquences il y a les effets parasites de câbles. Quand une solution électrolytique est utilisée, l'impédance est réduite de sorte que ses valeurs ainsi que la plage de fréquences exploitable restent dans le domaine de mesures du système avec des courbes d'impédance (module et phase) de meilleure qualité comme nous le verrons dans les parties suivantes.

Comme nous pouvons voir sur les courbes de la Figure 4-7(b) et dans le Tableau 4-3, les mesures à paires d'électrodes pour le capteur **CA20** ont des capacités plus grandes que les mesures à 1x1, car la surface des électrodes et pistes de connexion sont plus grandes. Nous observons aussi que pour les mesures **Ho** (courbe magenta de la Figure 4-7(b)), la capacité est plus grande que les mesures **Ve** (courbe noire de la Figure 4-7(b)). Cela est dû au fait que les pistes de connexions sont plus proches pour les mesures horizontales. On observe cet effet de proximité des pistes de connexions aussi avec les mesures avec simple paire d'électrodes, car les capacités pour AB (courbe bleue de la Figure 4-7(b)) et CD (courbe cyan de la Figure 4-7(b)) sont plus grandes que pour AC (courbe rouge de la Figure 4-7(b)) et BD (courbe verte de la Figure 4-7(b)). Les valeurs de capacités pour **CA20** et **CA20ISO** ont le même comportement, cependant pour les capteurs **CA10** ces phénomènes ne sont pas reproduits. Comme les valeurs des capacités, pour les capteurs **CA10** et **CA10ISO**, sont presque les mêmes pour toutes les configurations et comme la valeur de capacité des électrodes est très petite nous pouvons dire que ces capacités correspondent aux capacités parasites du système. Les valeurs de capacités affichées dans Tableau 4-3 ont été prises à 100 kHz, fréquence à laquelle les mesures sont les plus stables.

Tableau 4-3. Valeurs de capacités des capteurs ($f = 100$ kHz)

Capteur	AB (pF)	AC (pF)	BD (pF)	CD (pF)	Ve (pF)	Ho (pF)
CA20	0,13 ± 8%	0,08 ± 11%	0,08 ± 11%	0,15 ± 7%	0,23 ± 10%	0,35 ± 3%
CA20ISO	0,08 ± 12%	0,05 ± 15%	0,05 ± 15%	0,1 ± 10%	0,21 ± 8%	0,3 ± 3%
CA10	0,06 ± 13%	0,06 ± 13%	0,06 ± 13%	0,05 ± 15%	0,18 ± 8%	0,05 ± 10%
CA10ISO	0,05 ± 15%	0,06 ± 13%	0,05 ± 12%	0,05 ± 12%	0,15 ± 12%	0,06 ± 15%

4.4.2. Mesures avec solutions calibrées

Nous avons utilisé trois solutions calibrées avec les conductivités électriques de 100 $\mu\text{S/cm}$, 1413 $\mu\text{S/cm}$ et 5000 $\mu\text{S/cm}$ plus l'eau du robinet. Les solutions calibrées nous servent à obtenir le facteur de forme et l'eau du robinet est utilisée pour avoir une composition et une conductivité proche de l'eau utilisée pour la consommation. Les solutions calibrées ont été caractérisées avec la sonde de haute précision 16452A *Liquid Test Fixture* (Keysight Technologies®, Santa Rosa, U.S.A.) à $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ et leurs conductivités sont affichées dans le Tableau 4-4.

Tableau 4-4. Valeurs de la conductivité mesurée ($\mu\text{S/cm}$) des solutions à 23°C

Solution	100 $\mu\text{S/cm}$	Robinet	1413 $\mu\text{S/cm}$	5000 $\mu\text{S/cm}$
Conductivité mesurée ($\mu\text{S/cm}$)	97,22 ± 4,5%	262,65 ± 5,5%	1308,5 ± 5,3%	4621 ± 4,5%

- **Mesure du facteur de forme**

En connaissant les valeurs de la conductivité nous pouvons obtenir les valeurs du facteur de forme expérimental via $K = 1/(\sigma|Z|\cos(\alpha))$. Pour obtenir la valeur du module et de la phase de l'impédance, nous avons fait circuler les solutions (de la conductivité plus petite jusqu'à la plus grande) dans les microcanaux et nous avons mesuré l'impédance pour chaque solution. À partir du module et de la phase, nous avons calculé le facteur de forme comme donné dans le Tableau 4-5. Ces facteurs de forme prennent en compte les dimensions des

électrodes et des pistes de connexion. Ainsi, les configurations avec des pistes de connexion moins exposées à la solution ont un facteur de forme plus petit.

Pour **CA20**, la configuration CD a environ 87% de moins de pistes de connexion exposées à la solution. Avec cette différence d'exposition à la solution des pistes de connexion, la réduction du facteur de forme est de 40% pour CD comparé à AB. Cependant, la variation du facteur de forme pour les capteurs **CA20ISO** et **CA10ISO** (avec la couche d'isolant sur les pistes de connexion) est très faible. Pour **CA20ISO**, la réduction du facteur de forme de la configuration CD par rapport à AB est de 2,3%, tandis que la variation de la longueur des pistes de connexion exposées à la solution est de 60%. Pour **CA10ISO**, la réduction de la configuration CD par rapport à AB est de 0,2%, tandis que la variation de la longueur des pistes de connexion exposée à la solution est de 38%.

La variation du facteur de forme la plus grande pour les configurations AC et BD est pour le capteur **CA10ISO** avec une valeur de 11%. Ces faibles variations du facteur de forme pour les configurations AC et BD sont dues au fait que les pistes de connexion sont perpendiculaires et sont plus loin les unes des autres de sorte qu'elles ont moins d'influence sur les mesures.

Tableau 4-5. Valeurs du facteur de forme expérimental

	K(μm)					
	AB	AC	BD	CD	ABCDVe	ABCDHo
CA20	20.42	16.6	15.92	12.22	44.53	44.23
CA20ISO	14.24	14.97	15.32	13.9	45.57	43.31
CA10	6.11	12.6	12.4	9.1	39.28	27.58
CA10ISO	5.34	5.71	5.08	5.35	15.79	13.62

- **Analyse de la bande de fréquences (F_{low} et F_{high})**

Nous avons obtenu les valeurs des fréquences de coupure F_{low} et F_{high} à partir des mesures expérimentales pour chaque solution. Comme analysé dans la partie théorique, plus grande est la conductivité de la solution plus grandes sont les fréquences de coupure. Comme le facteur de forme change avec la configuration d'électrodes, la fréquence de coupure peut

changer aussi. Dans la Figure 4-8 sont affichés le module et la phase avec le tracé des fréquences de coupure mis en évidence pour un capteur **CA20** avec l'eau du robinet.

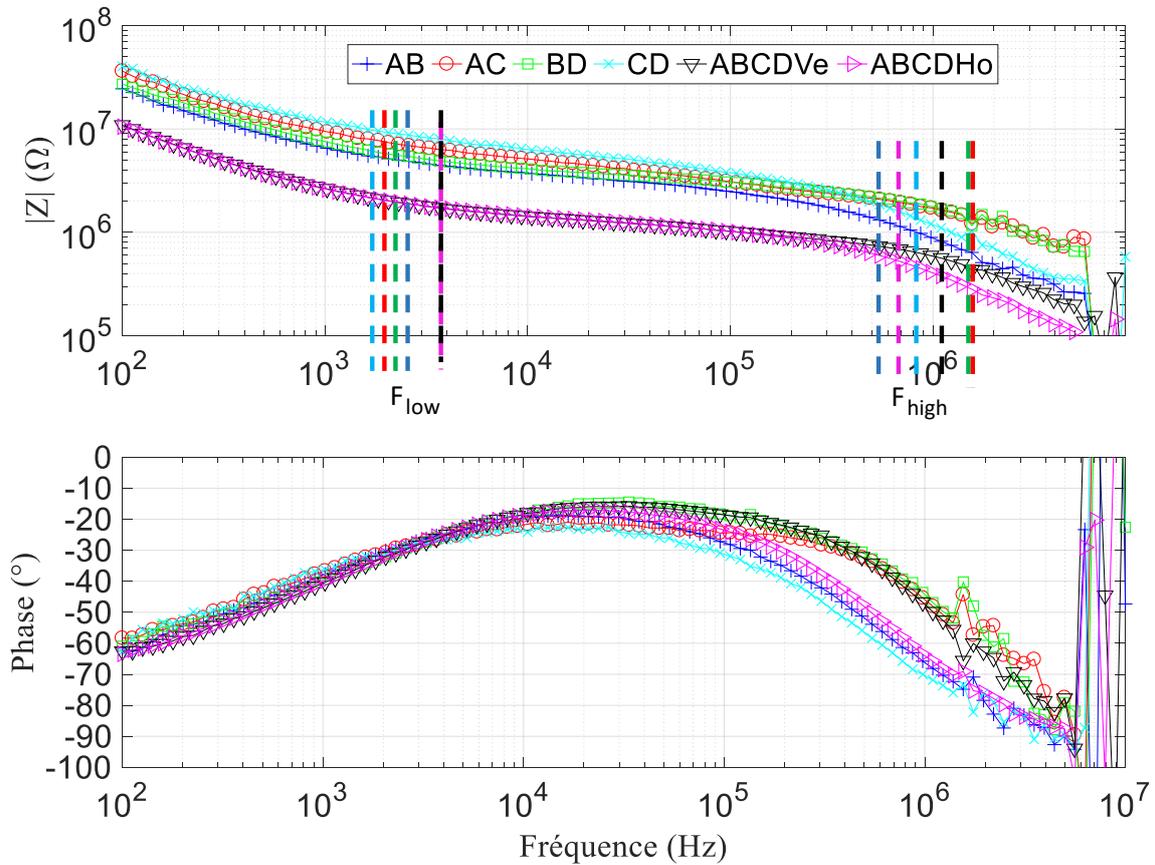


Figure 4-8. Module et phase mesurés pour le capteur **CA20** avec l'eau du robinet.

La fréquence de coupure basse est obtenue au niveau de l'intersection des asymptotes du palier et de la première pente. La fréquence de coupure haute est obtenue de la même façon avec le palier et de la seconde pente. Dans le Tableau A1 (en annexe) sont affichées les valeurs des fréquences F_{low} et F_{high} pour tous les capteurs et configurations des électrodes et dans la Figure 4-9 sont affichés les bandes de fréquences utiles (bandes de fréquences entre F_{low} et F_{High}). À partir de ces résultats, nous observons :

- que plus grande est la surface des électrodes plus petite est la fréquence de coupure F_{low} quand il n'y a pas la couche d'isolant ;
- que l'addition de la couche d'isolant réduit les fréquences de coupure par rapport aux capteurs sans la couche d'isolant et ;
- que l'addition de la couche d'isolant permet d'obtenir des fréquences de coupure plus proches entre les différentes configurations.

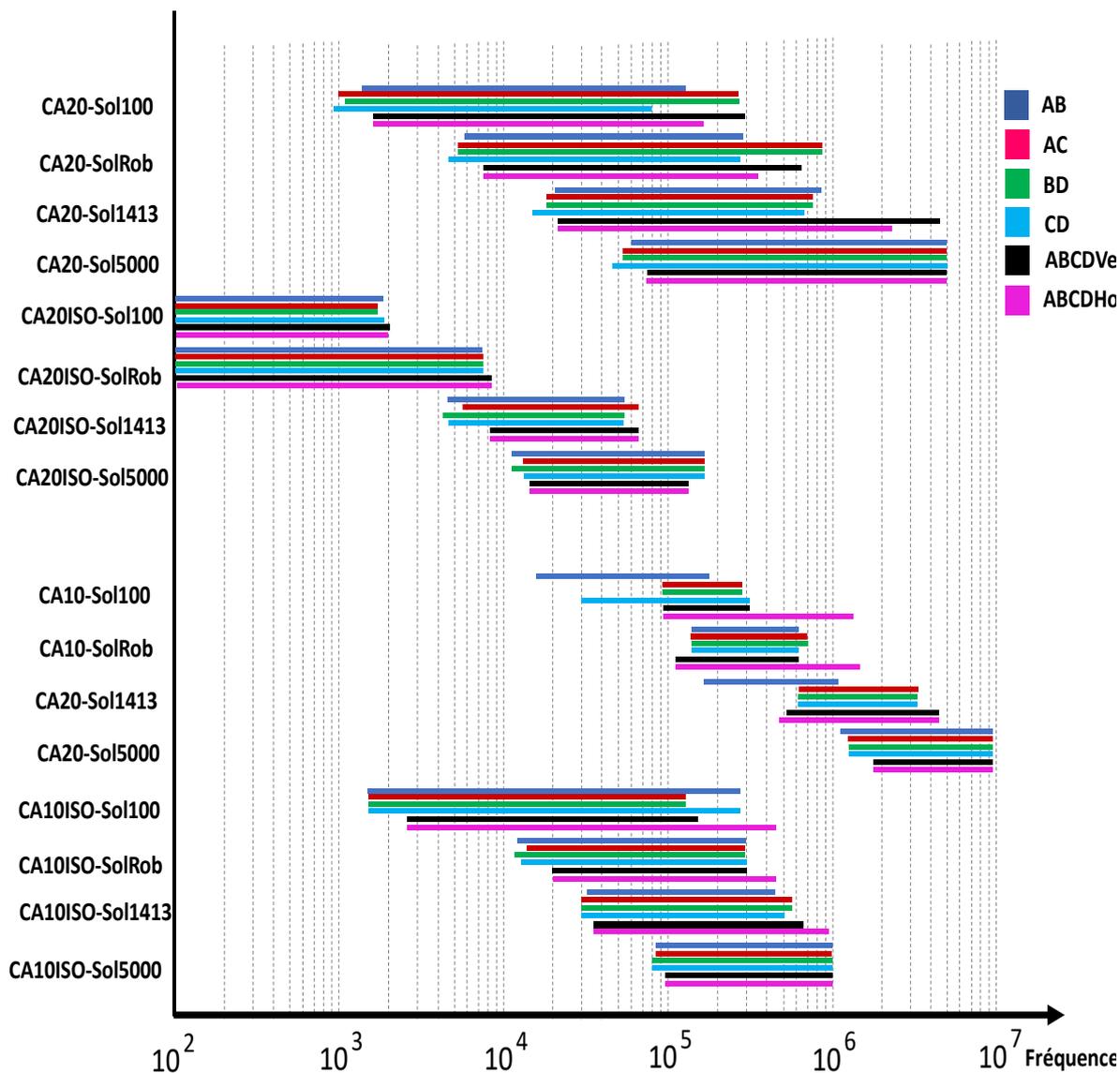


Figure 4-9. Schéma des bandes de fréquences utiles pour toutes les structures des capteurs.

4.5. Mesures en régime statique

Les mesures en régime statique signifient que les mesures ont été faites avec les échantillons positionnés de façon fixe sur les électrodes. Les mesures avec des microbilles calibrées nous ont permis de quantifier la variation d'impédance normalisée en fonction des paramètres du capteur comme les dimensions des électrodes, exposition des pistes de connexion à la solution et l'utilisation de la couche d'isolant.

4.5.1. Mesures avec microbilles calibrées

Nous avons utilisé des microbilles de polystyrène de $10 \mu\text{m} \pm 0,344 \mu\text{m}$ avec concentration d'environ $4,55 \times 10^7$ particules/ml (Polybead®Black Dyed Microspheres,

Polysciences Europe GmbH, Allemagne) diluées dans l'eau du robinet dans la proportion 1:8,3 (120 μl de microbille dans 1 ml). Cette proportion a été obtenue en augmentant de 20 μL la quantité de microbilles dans 1 mL de la solution jusqu'à obtenir une grande quantité de microbilles dans le microcanal sans qu'elles ne se touchent entre elles. Les mesures avec de microbilles nous permettent de valider la structure pour la détection de cellules biologiques/particules en faible concentration voire unitaires et nous permettent d'analyser la variation d'impédance normalisée en fonction des dimensions des électrodes, des dimensions des pistes de connexion exposées à la solution et en fonction de l'utilisation ou non d'une couche d'isolant sur les pistes de connexion..

Pour calculer la variation d'impédance normalisée expérimentale, nous avons utilisé l'équation $\Delta|Z|_n = 100 \times (|Z_{\text{cell}}| - |Z_{\text{ref}}|) / |Z_{\text{ref}}|$. Comme le polystyrène est un matériau isolant, le champ électrique ne pénètre pas dans les microbilles de sorte que nous faisons une mesure du volume de la microbille. Les résultats dans cette partie sont comparables aux résultats analytiques et de simulations se référant au premier palier du spectre d'impédance.

Nous avons placé la microbille entre les électrodes(Figure 4-10(a)) pour mesurer Z_{cell} . Nous avons ensuite déplacé la microbille dehors la zone des électrodes et nous avons mesuré Z_{ref} (Figure 4-10(b)). Comme nous pouvons le voir dans la Figure 4-10, les pistes de connexion des électrodes A et B sont plus exposées à la solution. Cela est dû au fait que le placement du canal microfluidique sur les électrodes est fait sans l'aide d'un micropositionneur, elle a été faite en utilisant simplement un microscope comme précisé dans le chapitre fabrication du capteur. Dans le Tableau 4-6 sont donnés les labels des capteurs avec les longueurs des pistes de connexion exposées à la solution des capteurs utilisés.

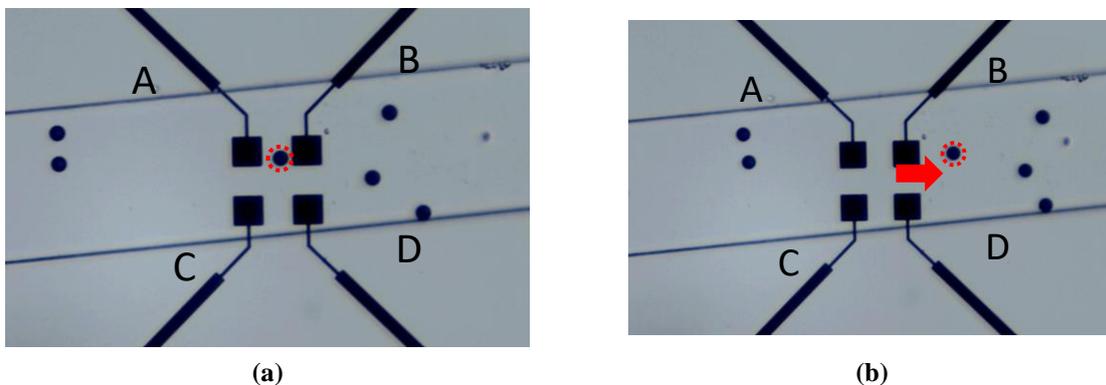


Figure 4-10. Image microscopique des électrodes (a) sans microbille et (b) avec une microbille entre les électrodes.

Tableau 4-6. Tableau des capteurs utilisés avec les longueurs des pistes de connexion exposées à la solution

	Lp(μm)			
	A	B	C	D
CA20	35,81	46,08	6,36	4,54
CA20ISO	11,34*	11,34*	27,54*	28,62*
CA10	11,64	12,36	25,55	25,466
CA10ISO	13,6*	12,73*	20,68*	23,41*

*Avec la couche d'isolant au-dessus

Les mesures d'impédance ont été faites dans la bande de 100 Hz à 10 MHz et le calcul de la variation d'impédance normalisée a été fait à la fréquence où la phase est la plus petite: c'est à cette fréquence que la composante résistive de l'impédance est prépondérante et la mesure la plus stable. Dans la Figure 4-11 sont affichés le module et la phase de l'impédance pour les mesures Z_{ref} et Z_{cell} pour les configurations AB, CD, AC et BD du capteur **CA20**.

- **Analyse de la variation d'impédance normalisée en fonction des dimensions des électrodes**

Dans la Figure 4-12 est donnée la distribution de la variation d'impédance normalisée des capteurs **CA20** et **CA10** pour les microbilles de 10 μm. Pour tracer cette distribution ont été utilisées 63 campagnes de mesures (mesures de Z_{ref} et mesures de Z_{cell}) dont 40 avec le capteur **CA20** et 23 avec le capteur **CA10**. Comme nous pouvons l'observer dans cette distribution et comme cela avait été prévu dans la partie théorique, la diminution des électrodes augmente la variation d'impédance normalisée. Dans ce cas, la moyenne de la distribution pour **CA20** est à 2,83% et celle de **CA10** à 5,9%. Cela représente un facteur de 2,08 de $\Delta|Z|_n$ pour une diminution de facteur 4 de la surface des électrodes.

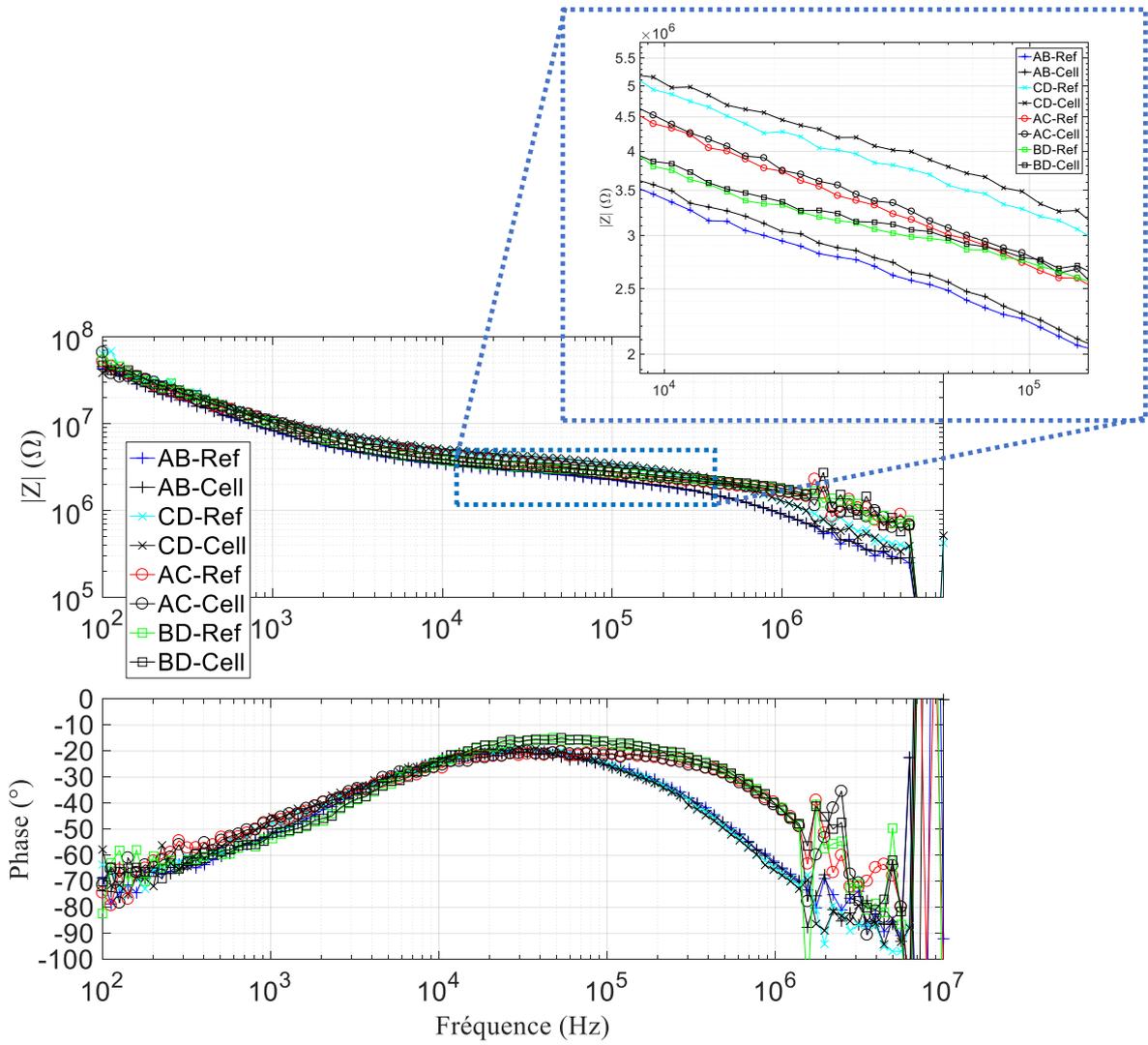


Figure 4-11. Module et phase de l'impédance des mesures Z_{ref} et Z_{cell} pour les configurations AB, CD, AC et BD.

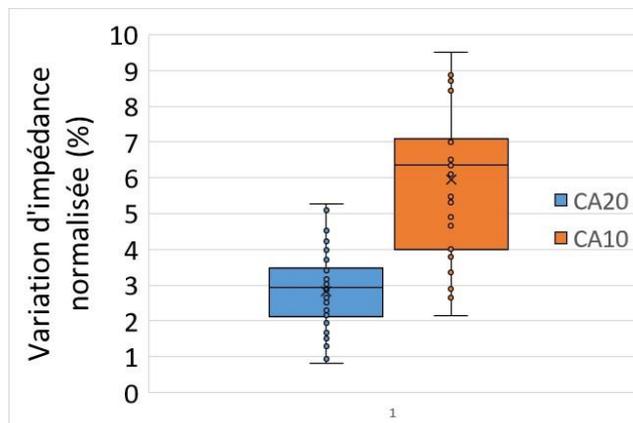


Figure 4-12. Distribution de la variation d'impédance du capteur CA20 et du capteur CA10.

- **Analyse de la variation d'impédance normalisée en fonction des dimensions de pistes de connexion exposées à la solution**

Comme la variation d'impédance normalisée est plus grande pour le capteur **CA10**, nous avons poursuivi les analyses avec ce capteur. Les dimensions des pistes de connexion des électrodes C et D sont plus exposées à la solution que les pistes des électrodes A et B pour le capteur **CA10** (Tableau 4-6). Cela nous permet de voir l'effet des pistes de connexion sur la variation d'impédance normalisée à l'aide de la distribution de la variation d'impédance normalisée de la Figure 4-13.

Pour tracer cette distribution ont été utilisées 23 campagnes de mesures (mesures de Z_{ref} et mesures de Z_{cell}) dont 12 pour la configuration AB et 11 pour la configuration CD. La configuration CD (plus exposée à la solution) a une distribution moyenne de $\Delta|Z|_n$ à 4,29% et la configuration AB (moins exposée à la solution) de 7,45%. Ce facteur de 1,74 pour $\Delta|Z|_n$ est due à la diminution de l'exposition des pistes de connexion d'un facteur de 2,1 entre les configurations CD et AB.

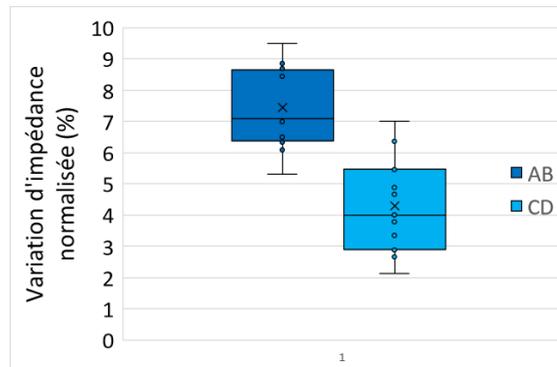


Figure 4-13. Distribution de la variation d'impédance pour les configurations AB et CD du capteur **CA10**.

- **Analyse de la variation d'impédance normalisée en fonction de l'utilisation de la couche d'isolant sur les pistes de connexion**

Pour analyser les effets de l'ajout de la couche d'isolant, nous avons fait les mesures avec les capteurs **CA10** et **CA10ISO**. Dans la Figure 4-14 est donnée la distribution de la variation d'impédance normalisée des capteurs **CA10** et **CA10ISO**. Cette distribution a été tracée avec 42 campagnes de mesures (mesures de Z_{ref} et mesures de Z_{cell}) dont 23 avec le capteur **CA10** et 19 avec le capteur **CA10ISO**.

La moyenne de la distribution pour le capteur **CA10** est d'environ 5,9% et pour le capteur **CA10ISO** de 11,5%. Cette différence représente un facteur d'environ 1,95 entre le dispositif avec et sans couche d'isolant.

Le facteur entre la moyenne (5,9%) et la valeur plus petite (2,14%) de la distribution du capteur **CA10** est de 2,8 et pour le capteur **CA10ISO** ce facteur est de 2,67 (dont la moyenne est de 11,5% et la valeur plus petite est de 4,3%). Par rapport à la valeur plus grande de la distribution, les facteurs sont de 0,62 pour **CA10** (dont la moyenne est de 5,9% et la valeur plus grande est de 9,5%) et 0,58 pour **CA10ISO** (dont la moyenne est de 11,5% et la valeur plus grande est de 19,5%). Avec ces résultats, nous observons que les plages de la distribution des valeurs pour les deux capteurs sont proportionnellement proches. Ces écarts de $\Delta|Z|_n$ par rapport à la moyenne de la distribution est dû au placement des microbilles sur les électrodes, comme nous avons vu dans la partie de simulations.

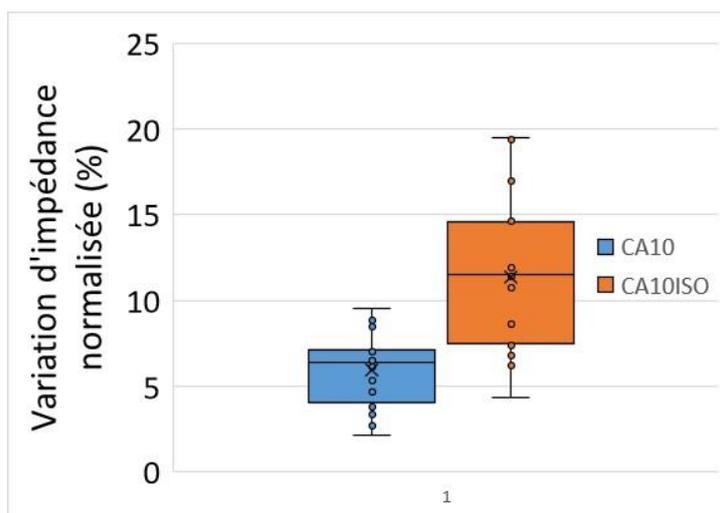


Figure 4-14. Distribution de la variation d'impédance pour les capteurs **CA10** et **CA10ISO**.

4.6. Mesures en régime dynamique

Les mesures d'impédance en régime dynamique ont la particularité de devoir être faites rapidement (de l'ordre de ms, mais pouvant être contrôlés avec la vitesse du fluide et la fréquence du signal d'excitation) lorsque nous voulons mesurer des cellules unitaires. Cette vitesse de mesure est moins critique lorsque nous mesurons des concentrations de cellules. Nous pouvons détecter une variation de concentration dans une large bande de fréquence en considérant que la concentration est uniforme. Dans une première approche, nous avons fait des mesures avec différentes concentrations de levures de boulanger pour vérifier la faisabilité

de nos hypothèses. Faute de temps nous n'avons pas pu faire (dans l'immédiat) une analyse quantitative et nous nous sommes limités à une analyse qualitative.

S'agissant de premiers tests de faisabilité, nous avons préparé uniquement trois échantillons différents contenant des levures de boulanger par dilutions successives d'un premier échantillon de concentration C3 ($C1 < C2 < C3$) dans une solution tampon de $1413 \mu\text{S}/\text{cm}$. Les concentrations n'ont donc pas été déterminées avec précision. Nous pouvons voir ces trois échantillons de concentrations différentes dans le microcanal dans la Figure 4-15.

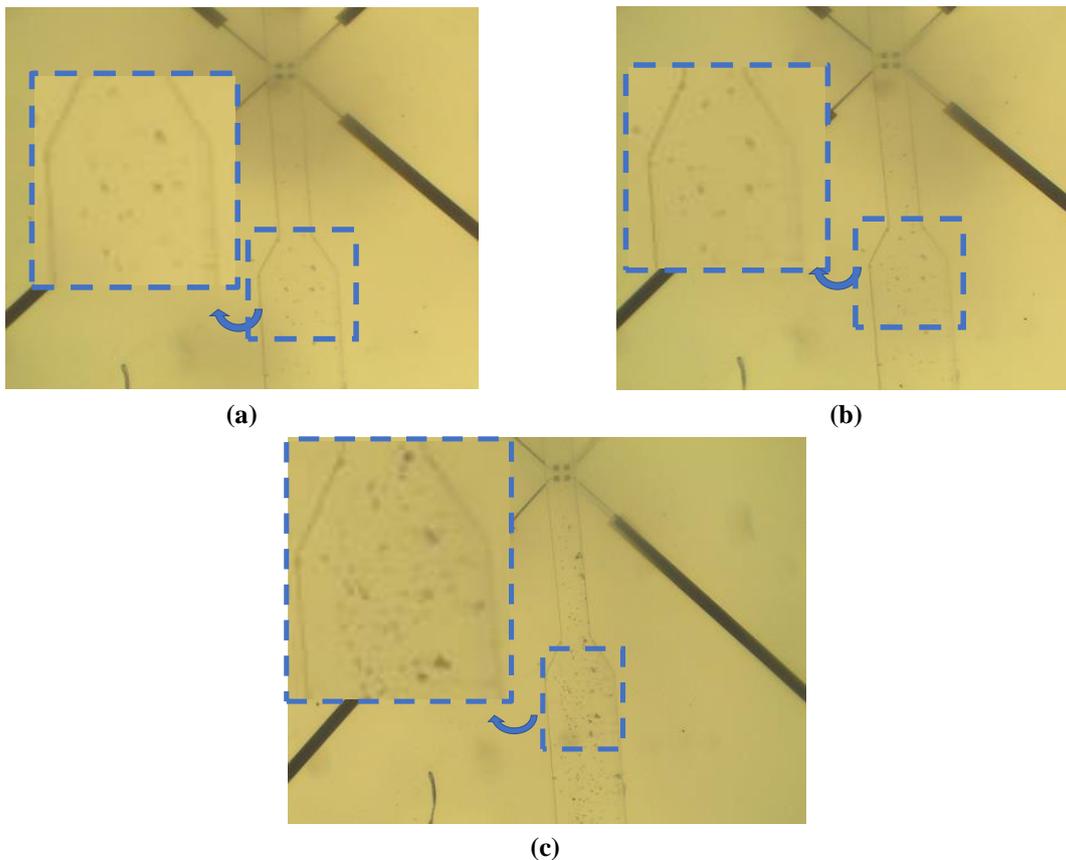


Figure 4-15. Images microscopiques des échantillons (a) C1, (b) C2 et (c) C3 de levures de boulanger dans le microcanal d'un capteur CA20.

Les échantillons biologiques ont été injectés dans le canal microfluidique à l'aide d'une seringue avec une aiguille. L'échantillon est déplacé jusqu'à ce que les levures soient présentes entre les électrodes dans la zone de mesure. Une fois que nous avons vérifié le placement au microscope, l'injection est stoppée. Nous avons ensuite lancé une première série de mesures d'impédance entre deux électrodes (configuration AC) puis de même entre deux paires d'électrodes (configuration Ho). Avant l'insertion d'un nouvel échantillon avec une concentration différente, le canal a été nettoyé avec l'eau désionisée.

Dans la Figure 4-16 sont affichés le module et la phase de l'impédance pour la configuration AC et pour la configuration Ho d'un capteur CA20. En prenant C1 comme référence et en faisant le calcul de $\Delta|Z|_n$ à 30 kHz pour la configuration AC et à 100 kHz pour la configuration Ho, nous obtenons les variations d'impédance normalisée égales à 2,6% et 26,2% (pour C2 et C3, respectivement, avec la configuration AC) et de -3,6% et 5,7% (pour C2 et C3, respectivement, pour la configuration Ho). Les valeurs de fréquences ont été choisies à la fréquence où la phase est la plus petite. Au vu de ces résultats nous pouvons en conclure qu'il est possible de détecter une variation de concentration de cellules avec notre dispositif et nous observons que le $\Delta|Z|_n$ est plus grand pour la configuration AC. Cela est dû au fait que la configuration Ho a une distribution plus grande des lignes du champ électrique de sorte que la distorsion du champ électrique causé par les levures est plus petite. Il faudra cependant réitérer ces résultats avec plus de campagnes de mesures pour avoir une analyse quantitative et comparative.

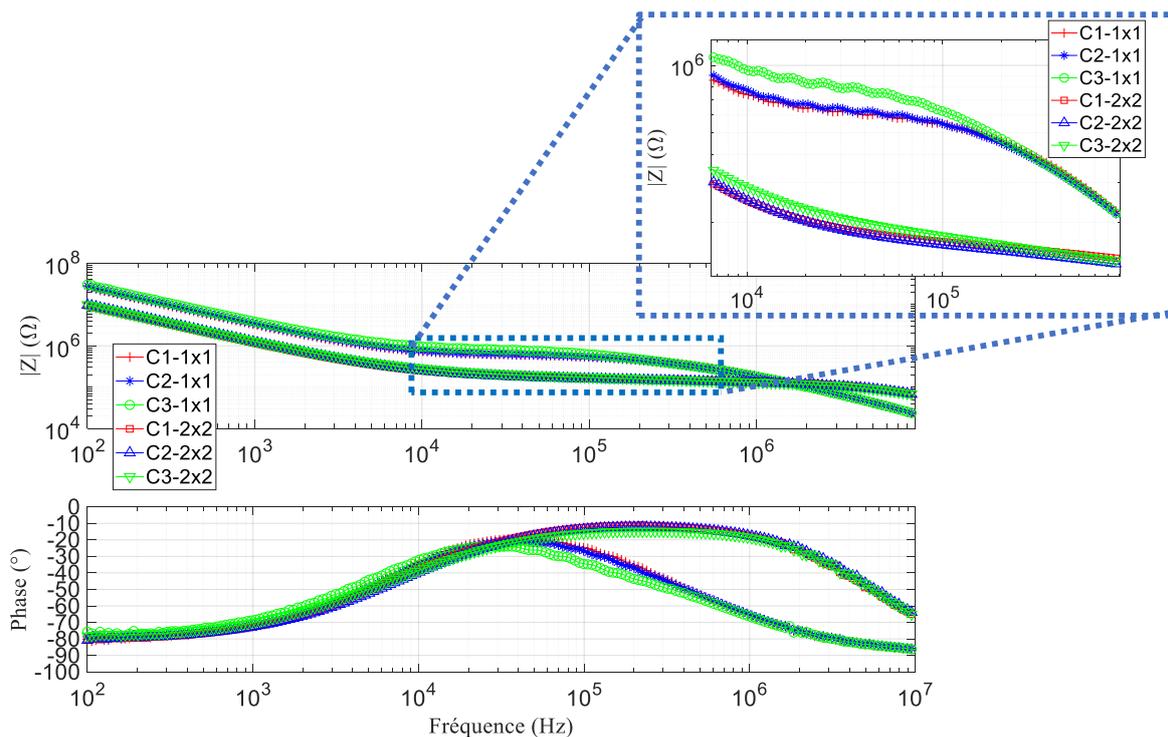


Figure 4-16. Graphiques du module et phase de l'impédance pour les mesures effectuées avec les configurations AC (courbes avec les symboles plus, astérisque et ronde pour les concentrations C1,C2 et C3 respectivement) et Ho (courbes avec les symboles carré, triangle vers le haut et triangle vers le bas pour les concentrations C1,C2 et C3 respectivement) pour trois concentrations différentes de levures de boulanger.

4.7. Conclusion

Dans ce chapitre de mesures et validation du capteur, nous avons étudié l'utilisation d'une matrice de switches entre le capteur et l'impédancemètre pour effectuer des mesures adressables. Une fois l'utilisation de la matrice de switches validée nous avons réalisé des mesures avec des capteurs avec et sans couche d'isolant sur les pistes de connexion, avec et sans puits et avec et sans canal microfluidique. Ces campagnes de mesures nous ont permis d'observer que les mesures d'impédance sont évidemment dépendantes du volume de l'échantillon entre les électrodes et de montrer ainsi l'utilité d'un canal microfluidique pour maintenir le volume constant. Les mesures avec le puits et sans canal microfluidique ne sont pas exploitables, car la résine SU-8 (matériau utilisé pour créer le puits), à cause de ces propriétés hydrophobes, ne permet pas de correctement placer l'échantillon dans le puits.

Nous avons ensuite effectué des mesures avec des électrodes de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ et $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ avec et sans couche d'isolant en utilisant des capteurs avec canaux microfluidiques. Avec des solutions calibrées, nous avons calculé les facteurs de forme et les fréquences de coupure pour toutes les configurations des électrodes. Avec ces résultats nous avons observé que plus grande est la surface des électrodes plus petite est la fréquence de coupure basse quand il n'y a pas la couche d'isolant. Nous avons aussi observé que l'addition de la couche d'isolant diminue les fréquences de coupure par rapport aux capteurs sans couche d'isolant, les variations des fréquences de coupure et les facteurs de forme entre les différentes configurations de mesure.

Pour analyser la faisabilité de détection de cellules unitaires entre les électrodes et analyser l'influence des dimensions des électrodes, de l'ajout ou non d'une couche d'isolant sur les pistes de connexion sur la variation d'impédance normalisée, nous avons utilisé des microbilles calibrées de $10 \mu\text{m}$. Nous avons vu que la diminution des dimensions des électrodes augmente la variation d'impédance normalisée d'un facteur pouvant aller jusqu'à 2 ainsi que l'utilisation de la couche d'isolant sur les pistes de connexion. Nous avons vu aussi que la variation d'impédance normalisée peut diminuer jusqu'à un facteur de 1,74 lorsque les pistes de connexion sont exposées à la solution. Ces éléments montrent de façon certaine que les optimisations proposées, en termes d'ajout de couche d'isolant sur les pistes de connexions, de l'utilisation d'un microcanal et de diminution de la largeur des pistes de connexion améliorent nettement les performances de notre capteur.

Dans la dernière partie de ce chapitre, nous avons montré sur des levures de boulanger que la variation de concentration de cellules en régime dynamique peut être détectée par les capteurs optimisés.

Conclusion générale et perspectives

La mesure des cellules et tissus biologiques par spectroscopie d'impédance permet d'obtenir des caractéristiques telles que leur concentration, leur taille et leur physiologie. Ces caractéristiques peuvent être utilisées pour identifier et traiter au mieux les maladies. La spectroscopie de bio-impédance électrique permet aussi la détection de cellules unitaires dans une solution uniforme et ainsi détecter des agents pathogènes.

Pour augmenter la variation d'impédance normalisée et pouvoir ainsi détecter des cellules plus petites à l'échelle unitaire, nous avons réduit les dimensions des électrodes à l'échelle des cellules biologiques. Cependant, le taux de détection est également réduit. L'utilisation d'une matrice d'électrodes peut augmenter le taux de détection; toutefois, les pistes de connexion des électrodes (principalement pour les électrodes situées au centre de la matrice) créent des effets parasites qui réduisent la variation d'impédance normalisée.

Une des originalités de ce travail de thèse est le développement d'un modèle électrique qui prend en compte tous les éléments parasites. Ce modèle prend en compte les effets à l'interface entre l'électrode et la solution électrolytique, la capacité parasite du substrat, les caractéristiques du matériau du canal microfluidique et l'effet capacitif et résistif des pistes de connexion.

Pour analyser les effets de pistes de connexion, proposer des améliorations et observer la faisabilité, nous avons conçu et utilisé une matrice d'électrode carrée coplanaire. Avec cette structure nous avons analysé analytiquement, par simulation numérique et par mesures expérimentales l'influence de pistes de connexion sur la bande de fréquence et sur la variation d'impédance normalisée. Quand les pistes de connexion ont des dimensions plus exposées à la solution, la variation d'impédance normalisée diminue. Nous avons alors réduit les dimensions des pistes de connexion et nous avons utilisé une couche d'isolant sur les pistes de connexion. Avec ces améliorations nous avons augmenté la variation d'impédance normalisée par rapport à la structure sans ces ajouts.

Avec le biocapteur développé, nous avons fait des mesures du spectre d'impédance en statique avec le positionnement d'une seule cellule entre les électrodes et nous avons montré aussi la possibilité de détecter une variation d'impédance avec la variation d'une concentration de levures de boulanger en régime dynamique.

La modélisation analytique et numérique nous a permis d'analyser le comportement de la variation d'impédance et des fréquences de coupure en fonction de paramètres intrinsèques au biocapteur et à la cellule biologique. Ces comportements ont été vérifiés et validés avec les résultats expérimentaux. Cette approche peut servir ainsi à dimensionner des biocapteurs avant fabrication.

Malgré les difficultés de fabrication (centrage et collage du microcanal sur les électrodes) et d'utilisation (faible débit et problèmes liés à l'interface micro-macrofluidique), l'utilisation du canal microfluidique est primordiale pour maintenir un volume constant de solution sur les électrodes et pour contrôler le positionnement de la cellule entre les électrodes.

Un autre défi a été la mise en place d'un banc de mesure permettant la mesure adressable entre les électrodes avec une cellule unitaire entre eux et la captation d'une image au moment de la mesure pour enregistrer le positionnement de la cellule.

Perspectives

Dans ce projet de thèse de doctorat, nous avons amélioré la structure d'un biocapteur pour augmenter la variation d'impédance normalisée de sorte à améliorer la limite de détection de cellules biologiques. Dans la partie modélisation, nous avons vu qu'il est possible de réaliser une caractérisation électrique des cellules biologiques quand la bande de fréquence utile est suffisamment grande pour prendre les effets de la pénétration du champ électrique dans le cytoplasme de la cellule. Ainsi, parmi les continuités possibles de ce projet il est envisageable d'augmenter encore plus la bande de fréquence pour extraire des paramètres intrinsèques de la cellule telle que la permittivité de la membrane et la conductivité du cytoplasme. Cette augmentation de la bande de fréquence peut être faite en jouant avec l'épaisseur de la couche d'isolant (qui change la fréquence de coupure haute), la réduction des dimensions des pistes de connexion (qui change aussi la fréquence de coupure haute) et l'utilisation de platine noir pour augmenter la surface d'électrodes et ainsi réduire les effets de polarisation interfaciale et diminuer la fréquence de coupure basse.

Nous avons proposé l'utilisation du canal microfluidique avec un puits aux alentours des électrodes pour piéger les cellules. Le piégeage de cellules sert à pouvoir les mesurer en statique en prenant le temps de réaliser une signature spectrale de la cellule notamment par des mesures adressables entre les électrodes.

Dans une continuité de ce projet, une électronique dédiée peut être développée pour faire la surveillance du passage de cellule entre chaque paire d'électrodes. Dans ce cas, les mesures de cellules unitaires peuvent être faites en mode dynamique. Dans ce mode de mesure le temps de passage de la cellule entre les électrodes est très court de sorte que les mesures doivent être très rapides à quelques fréquences spécifiques.

Une autre approche de l'utilisation de la matrice d'électrodes ici développée est la caractérisation en 2D de cellules biologiques et tissus musculaires. Grace aux mesures d'impédance entre les différentes configurations d'électrodes, il est possible de tracer une carte de l'impédance de la cellule et d'ainsi différencier les cellules biologiques.

Bibliographie

- [1] N. Kolluri, C. M. Klapperich, and M. Cabodi, “Towards lab-on-a-chip diagnostics for malaria elimination,” *Lab Chip*, vol. 18, no. 1, pp. 75–94, 2017.
- [2] A. K. Tran, A. Sapkota, J. Wen, J. Li, and M. Takei, “Linear relationship between cytoplasm resistance and hemoglobin in red blood cell hemolysis by electrical impedance spectroscopy & eight-parameter equivalent circuit,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 119, no. August, pp. 103–109, 2018.
- [3] L. Váradi *et al.*, “Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: Past, present, and future,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 46, no. 16, pp. 4818–4832, 2017.
- [4] R. Wang, J. Lum, Z. Callaway, J. Lin, W. Bottje, and Y. Li, “A label-free impedance immunosensor using screen-printed interdigitated electrodes and magnetic nanobeads for the detection of *E. coli* O157:H7,” *Biosensors*, vol. 5, no. 4, pp. 791–803, 2015.
- [5] S. I. Han, Y. D. Joo, and K. H. Han, “An electrorotation technique for measuring the dielectric properties of cells with simultaneous use of negative quadrupolar dielectrophoresis and electrorotation,” *Analyst*, vol. 138, no. 5, pp. 1529–1537, 2013.
- [6] J. Claudel, M. Nadi, O. Elmazria, and D. Kourtiche, “An electrical model optimization for single cell flow impedance spectroscopy,” *Int. J. Smart Sens. Intell. Syst.*, vol. 9, no. 2, pp. 526–536, 2016.
- [7] J. Liu, Y. Qiang, O. Alvarez, and E. Du, “Electrical impedance microflow cytometry with oxygen control for detection of sickle cells,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 255, pp. 2392–2398, 2018.
- [8] J. Rho, W. Jang, I. Hwang, D. Lee, and C. Heon, “Biosensors and Bioelectronics Multiplex immunoassays using virus-tethered gold microspheres by DC impedance-based flow cytometry,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 102, no. November 2017, pp. 121–128, 2018.
- [9] Y. Zhao *et al.*, “Tumor cell characterization and classification based on cellular specific membrane capacitance and cytoplasm conductivity,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 57, pp. 245–253, 2014.
- [10] Y. R. F. Schmid, S. C. Bürgel, P. M. Misun, A. Hierlemann, and O. Frey, “Electrical Impedance Spectroscopy for Microtissue Spheroid Analysis in Hanging-Drop Networks,” *ACS Sensors*, vol. 1, no. 8, pp. 1028–1035, 2016.
- [11] A. L. A. De Araujo, J. Claudel, M. Nadi, and D. Kourtiche, “Detection and characterization of biological cells by impedance spectroscopy,” *Proc. Int. Conf. Sens. Technol. ICST*, vol. 2018-Decem, pp. 309–314, 2019.
- [12] C. Kokkinos, A. Economou, and M. I. Prodromidis, “Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 79, pp. 88–105, 2016.
- [13] Y. Zhao *et al.*, “A microfluidic system for cell type classification based on cellular size-independent electrical properties,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 12, pp. 2272–2277, 2013.
- [14] L. F. E. Huerta-Nuñez *et al.*, “A biosensor capable of identifying low quantities of breast cancer cells by electrical impedance spectroscopy,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12,

- 2019.
- [15] A. L. Furst and M. B. Francis, "Impedance-Based Detection of Bacteria," *Chem. Rev.*, vol. 119, no. 1, pp. 700–726, 2019.
- [16] E. Du, S. Ha, M. Diez-Silva, M. Dao, S. Suresh, and A. P. Chandrakasan, "Electric impedance microflow cytometry for characterization of cell disease states," *Lab Chip*, vol. 13, no. 19, pp. 3903–3909, 2013.
- [17] F. Asphahani and M. Zhang, "Cellular impedance biosensors for drug screening and toxin detection," *Analyst*, vol. 132, no. 9, pp. 835–841, 2007.
- [18] M. R. Stoneman *et al.*, "Correction of electrode polarization contributions to the dielectric properties of normal and cancerous breast tissues at audio/radiofrequencies," *Phys. Med. Biol.*, vol. 52, no. 22, pp. 6589–6604, 2007.
- [19] A. Butterworth, E. Blues, P. Williamson, M. Cardona, L. Gray, and D. K. Corrigan, "SAM composition and electrode roughness affect performance of a DNA biosensor for antibiotic resistance," *Biosensors*, vol. 9, no. 1, 2019.
- [20] H. Morgan, T. Sun, D. Holmes, S. Gawad, and N. G. Green, "Single cell dielectric spectroscopy," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 1, pp. 61–70, 2007.
- [21] M. Varshney and 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, no. 11, pp. 2408–2414, 2007.
- [22] S. K. Ameri, P. K. Singh, M. R. Dokmeci, A. Khademhosseini, Q. Xu, and S. R. Sonkusale, "All electronic approach for high-throughput cell trapping and lysis with electrical impedance monitoring," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 54, pp. 462–467, 2014.
- [23] K. Cheung, S. Gawad, and P. Renaud, "Impedance spectroscopy flow cytometry: On-chip label-free cell differentiation," *Cytom. Part A*, vol. 65, no. 2, pp. 124–132, 2005.
- [24] A. C. Sabuncu *et al.*, "Dielectric properties of isolated adrenal chromaffin cells determined by microfluidic impedance spectroscopy," *Bioelectrochemistry*, vol. 119, pp. 84–91, 2018.
- [25] P. Wang and Q. Liu, *Biomedical Sensors and Measurement*. Berlin, 2011.
- [26] D. T. Price, A. R. A. Rahman, and S. Bhansali, "Design rule for optimization of microelectrodes used in electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 7, pp. 2071–2076, 2009.
- [27] Fabien Miomandre, Saïd Sadki and R. M.-R. Pierre Audebert, *Électrochimie*, 3e édition. 2014.
- [28] Kartable, "Cohésion et dissolution des solides ioniques et moléculaires." [Online]. Available: <https://www.kartable.fr/ressources/physique-chimie/cours/cohesion-et-dissolution-des-solides-ioniques-et-moleculaires/20627>. [Accessed: 09-Jul-2019].
- [29] H. Fricke and S. Morse, "The Electric Resistance and Capacity of Blood for Frequencies Between 800 and 4(1/2) Million Cycles.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 9, no. 2, pp. 153–67, 1925.
- [30] F. Jaspard, "Caractérisation diélectrique du sang par spectroscopie de bio-impédance

- dans la bande [1 MHz - 1GHZ]: conception et réalisation d'une cellule de mesure," Université de Lorraine, 2011.
- [31] P. Debye, *Polar Molecules*. New York, 1929.
- [32] K. S. Cole and R. H. Cole, "Dispersion and absorption in dielectrics I. Alternating current characteristics," *J. Chem. Phys.*, 1941.
- [33] H. P. Schwan, "Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions," in *Advances in biological and medical physics*, 5th ed., 1957, pp. 147–209.
- [34] Gersing E, "Impedance spectroscopy on living tissue for determination of the state of organs," *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, vol. 45, no. 2, pp. 145–149, 1998.
- [35] Keysight Technologies, "Impedance Measurement Handbook, A guide to measurement technology and techniques, 6th Edition - Application Note," pp. 5-02-5–04.
- [36] S. Gupta, K. Ramesh, S. Ahmed, and V. Kakkar, "Lab-on-chip technology: A review on design trends and future scope in biomedical applications," *Int. J. Bio-Science Bio-Technology*, vol. 8, no. 5, pp. 311–322, 2016.
- [37] P. Chen, D. Chen, S. Li, X. Ou, and B.-F. Liu, "Microfluidics towards single cell resolution protein analysis," *TrAC Trends Anal. Chem.*, no. xxxx, 2019.
- [38] D. Barthès-Biesel, *Microhydrodynamique et fluides complexes*, 1st ed. 2011.
- [39] M. Hejazian, W. Li, and N. T. Nguyen, "Lab on a chip for continuous-flow magnetic cell separation," *Lab Chip*, vol. 15, no. 4, pp. 959–970, 2015.
- [40] K. B. Kim, H. Chun, H. C. Kim, and T. D. Chung, "Red blood cell quantification microfluidic chip using polyelectrolytic gel electrodes," *Electrophoresis*, vol. 30, no. 9, pp. 1464–1469, 2009.
- [41] Á. Jobbágy, P. Csordás, and A. Mersich, "Blood Pressure Measurement at Home," vol. 14, no. or II, pp. 3453–3456.
- [42] K. Balavalad, B. G., and V. B., "Design and Simulation of MEMS Capacitive Pressure Sensor Array for Wide Range Pressure Measurement," *Int. J. Comput. Appl.*, vol. 163, no. 6, pp. 39–46, 2017.
- [43] C. González-Sánchez *et al.*, "Capacitive sensing for non-invasive breathing and heart monitoring in non-restrained, non-sedated laboratory mice," *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, no. 7, 2016.
- [44] C. Schwandt, R. V. Kumar, and M. P. Hills, "Solid state electrochemical gas sensor for the quantitative determination of carbon dioxide," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 265, pp. 27–34, 2018.
- [45] H. Wan, H. Yin, L. Lin, X. Zeng, and A. J. Mason, "Miniaturized planar room temperature ionic liquid electrochemical gas sensor for rapid multiple gas pollutants monitoring," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 255, pp. 638–646, 2018.
- [46] Surfíx, "Biosensors," 2019. [Online]. Available: <https://www.surfíx.nl/applications/biosensors>. [Accessed: 09-Jul-2019].
- [47] M. Yemini, M. Reches, E. Gazit, and J. Rishpon, "Peptide nanotube-modified electrodes for enzyme-biosensor applications," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 16, pp. 5155–5159, 2005.

- [48] P. Bollella and L. Gorton, "Enzyme based amperometric biosensors," *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 10, pp. 157–173, 2018.
- [49] S. G. Dastider, S. Barizuddin, M. Dweik, and M. Almasri, "A micromachined impedance biosensor for accurate and rapid detection of E. Coli O157:H7," *RSC Adv.*, vol. 3, no. 48, pp. 26297–26306, 2013.
- [50] X. Liu, L. Li, and A. J. Mason, "High-throughput impedance spectroscopy biosensor array chip Subject Areas : Author for correspondence ;," *Philos. Trans. R. Soc.*, 2014.
- [51] A. Manickam, A. Chevalier, M. McDermott, A. D. Ellington, and A. Hassibi, "A CMOS electrochemical impedance spectroscopy (EIS) biosensor array," *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 4, no. 6 PART 1, pp. 379–390, 2010.
- [52] J. M. Irudayaraj, *Biomedical Nanosensors*. 2018.
- [53] L. Bousse, "Whole cell biosensors," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 34, no. 1–3, pp. 270–275, 1996.
- [54] A. Hasan *et al.*, "Recent Advances in Application of Biosensors in Tissue Engineering," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–18, 2014.
- [55] N. Gupta, V. Renugopalakrishnan, D. Liepmann, R. Paulmurugan, and B. D. Malhotra, "Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 141, no. May, p. 111435, 2019.
- [56] A. K. Pulikkathodi *et al.*, "A Comprehensive Model for Whole Cell Sensing and Transmembrane Potential Measurement Using FET Biosensors," *ECS J. Solid State Sci. Technol.*, vol. 7, no. 7, pp. Q3001–Q3008, 2018.
- [57] L. Du, J. Wang, W. Chen, L. Zhao, C. Wu, and P. Wang, "Dual functional extracellular recording using a light-addressable potentiometric sensor for bitter signal transduction," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1022, pp. 106–112, 2018.
- [58] J. C. Owicki and J. Wallace Parce, "Biosensors based on the energy metabolism of living cells: The physical chemistry and cell biology of extracellular acidification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 7, no. 4, pp. 255–272, 1992.
- [59] P. L. Voyvodic *et al.*, "Plug-and-play metabolic transducers expand the chemical detection space of cell-free biosensors," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–8, 2019.
- [60] S. K. Ameri, P. K. Singh, M. R. Dokmeci, A. Khademhosseini, Q. Xu, and S. R. Sonkusale, "All electronic approach for high-throughput cell trapping and lysis with electrical impedance monitoring," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 54, pp. 462–467, 2014.
- [61] C. Gagny, "Conception et réalisation d'une sonde de mesure des caractéristiques électromagnétiques des tissus biologiques et de l'instrumentation associée : spectroscopie de bioimpédance par la méthode V/I dans la bande 1MHz, 1GHZ" Université de Lorraine, 1998.
- [62] J.-F. Chateaux, "Conception et réalisation d'une cellule de caractérisation des tissus biologiques par spectroscopie de bioimpédance dans la gamme fréquentielle, 100 Hz-1MHz : application aux tissus osseux, prise en compte de l'anisotropie," Université de Lorraine, 2000.
- [63] J. Cridlig, "Spectroscopie d'impédance appliquée à la composition corporelle en

- néphrologie et en dialyse : caractérisation des facteurs d'influence," Université de Lorraine, 2013.
- [64] C. H. Clausen *et al.*, "Bacteria detection and differentiation using impedance flow cytometry," *Sensors (Switzerland)*, vol. 18, no. 10, pp. 1–12, 2018.
- [65] C. K. Fuller *et al.*, "Microfabricated Multi-Frequency Particle Impedance Characterization System," *Micro Total Anal. Syst. 2000*, pp. 265–268, 2000.
- [66] S. Gawad, K. Cheung, U. Seger, A. Bertsch, and P. Renaud, "Dielectric spectroscopy in a micromachined flow cytometer: Theoretical and practical considerations," *Lab Chip*, vol. 4, no. 3, pp. 241–251, 2004.
- [67] M. Varshney, Y. Li, B. Srinivasan, and S. Tung, "A label-free, microfluidics and interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor in combination with nanoparticles immunoseparation for detection of Escherichia coli O157:H7 in food samples," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 128, no. 1, pp. 99–107, 2007.
- [68] L. Yang, "Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes," *Talanta*, vol. 74, no. 5, pp. 1621–1629, 2008.
- [69] M. Dweik, R. C. Stringer, S. G. Dastider, Y. Wu, M. Almasri, and S. Barizuddin, "Specific and targeted detection of viable Escherichia coli O157:H7 using a sensitive and reusable impedance biosensor with dose and time response studies," *Talanta*, vol. 94, pp. 84–89, 2012.
- [70] K. Settu, J. T. Liu, C. J. Chen, J. Z. Tsai, and S. J. Chang, "Concept for E.coli detection using interdigitated microelectrode impedance sensor," *Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. EMBS*, pp. 1712–1715, 2013.
- [71] R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, and B. Wolf, "On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures," *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 36, no. 3, pp. 365–370, 1998.
- [72] D. K. and M. N. T.-T. Ngo, A. Bourjilat, J. Claudel, "Design and Realization of a Planar Interdigital Microsensor for Biological Medium Characterization," in *Next Generation Sensors and Systems*, vol. 16, Springer, 2015, pp. 1–330.
- [73] R. Rodriguez-Trujillo, O. Castillo-Fernandez, M. Garrido, M. Arundell, A. Valencia, and G. Gomila, "High-speed particle detection in a micro-Coulter counter with two-dimensional adjustable aperture," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 2, pp. 290–296, 2008.
- [74] J. Claudel, M. Nadi, O. Elmazria, and D. Kourtiche, "Microfluidic biosensor for single cell high speed flow impedance spectroscopy," *8Th Conf. Sens. Technol.*, no. Umr 7198, pp. 343–347, 2014.
- [75] J. Claudel, "Spectroscopie d'impédance électrique par biocapteur à micro-électrodes : application à la cytométrie de flux de cellules sanguines," Université de Lorraine, 2013.
- [76] T. T. NGO, "Contribution à la mesure de bioimpédance électrique de cellules biologiques par micro-capteurs interdigités: optimisation, conception et validation de capteurs," Université de Lorraine.
- [77] M. IBRAHIM, "Mesure de bioimpédance électrique par capteurs interdigités,"

Université de Lorraine, 2012.

- [78] A. Bourjilat, “Étude et conception d’une plateforme microfluidique pour la détection de séquence ADN par spectroscopie d’impédance,” Université de Lorraine.
- [79] D. A. Borkholder, “Cell Based Biosensors Using,” Stanford University, 1998.
- [80] Q. Liu *et al.*, “Impedance studies of bio-behavior and chemosensitivity of cancer cells by micro-electrode arrays,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 5, pp. 1305–1310, 2009.
- [81] B. Pejdic and R. De Marco, “Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization,” *Electrochim. Acta*, vol. 51, no. 28, pp. 6217–6229, 2006.
- [82] A. Luiz, A. De Araujo, J. Claudel, D. Kourtiche, and M. Nadi, “Use of an Insulation Layer on the Connection Tracks of a Biosensor with Coplanar Electrodes to Increase the Normalized Impedance Variation,” 2019.
- [83] A. A. Nassr, W. H. Ahmed, and W. W. El-Dakhakhni, “Coplanar capacitance sensors for detecting water intrusion in composite structures,” *Meas. Sci. Technol.*, vol. 19, no. 7, 2008.
- [84] C. Qian *et al.*, “Dielectrophoresis for bioparticle manipulation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 10, pp. 18281–18309, 2014.
- [85] T. Ben-Arye, S. Park, J. Shemesh, D. Peer, S. Levenberg, and G. Yossifon, “Dielectrophoretic characterization of cells in a stationary nanoliter droplet array with generated chemical gradients,” *Biomed. Microdevices*, vol. 17, no. 5, pp. 1–10, 2015.
- [86] M. VARSHNEY, L. YANG, X.-L. SU, and Y. LI, “Magnetic Nanoparticle-Antibody Conjugates for the Separation of Escherichia coli O157:H7 in Ground Beef,” *J. Food Prot.*, vol. 68, no. 9, pp. 1804–1811, 2016.
- [87] K. Haubert, T. Drier, and D. Beebe, “PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system,” *Lab Chip*, vol. 6, no. 12, pp. 1548–1549, 2006.
- [88] Guilhem Velvé Casquillas; Timothée Houssin, “PDMS: A REVIEW.” [Online]. Available: <https://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/the-poly-di-methyl-siloxane-pdms-and-microfluidics/>. [Accessed: 11-Aug-2019].
- [89] Keysight-Technologies, “E4990A Impedance Analyzer,” 2016.

Liste des publications et communications

Articles de revues

- [1] A. Luiz, A. De Araujo, J. Claudel, D. Kourtiche, and M. Nadi, “*Use of an Insulation Layer on the Connection Tracks of a Biosensor with Coplanar Electrodes to Increase the Normalized Impedance Variation*,” *Biosensors*, 2019, 9, 108.
- [2] A. Luiz, A. De Araujo, J. Claudel, D. Kourtiche, and M. Nadi, “*Influence of Electrode Connection Tracks on Biological Cell Measurements by Impedance*,” *Sensors*, vol. 19, no. 13, p. 2839, 2019.
- [3] J. Claudel, A. Luiz, A. De Araujo, D. Kourtiche, and M. Nadi, “*Lab-On-A-Chip Device for Yeast Cell Characterization in Low-Conductivity Media Combining Cytometry and Bio-Impedance*,” *Sensors*, vol. 19, no. 15, p. 3366, 2019.

Articles de conférences

- [4] A. Luiz, A. De Araujo, J. Claudel, D. Kourtiche, and M. Nadi, “*Detection and characterization of biological cells by impedance spectroscopy*”, 12th International Conference on Sensing Technology 2018, Limerick-Irlande.
- [5] J. Claudel, A. Luiz, A. De Araujo, D. Kourtiche, and M. Nadi, “*Increasing operating frequency band of cytometric biosensor for single cell impedance characterization*”, 12th International Conference on Sensing Technology 2018, Limerick-Irlande.

Communications sans actes

- [6] A. Luiz, A. De Araujo, J. Claudel, D. Kourtiche, and M. Nadi, “*Caractérisation de cellules biologiques par spectroscopie d’impédance*”, Coloque GDR SOC SIP 2018, Paris.
- [7] A. Luiz, A. De Araujo, J. Claudel, D. Kourtiche, and M. Nadi, “*Influence du routage des pistes de connexions sur la sensibilité de biocapteurs à matrice d’électrodes carrées*”, Journées Nationales du Réseau Doctoral en Micro-nanoélectronique (JNRDM) 2017, Strasbourg.
- [8] J. Claudel, A. Luiz, A. De Araujo, D. Kourtiche, and M. Nadi, “*High reliability microfluidic biosensor for single cell impedance cytometry*”, Coloque GDR SOC SIP 2017, Bordeaux.

Annexe 1 : Calcul des pôles et zéros

Pour avoir les expressions des fréquences de coupures analytiques, nous avons calculé les fréquences de **pôles** et **zéros** à partir du modèle électrique.

À partir du modèle électrique, nous obtenons l'équation (A.1) pour l'impédance (fonction de transfert) en basse fréquence.

$$Z(S) = \frac{S^2 C_{dl} R_m C_{dtp} R_p + S(C_{dl} R_m + C_{dtp} R_p) + 1}{S^2 (C_{dtp} C_{dl} R_m + C_{dtp} C_{dl} R_p) + S(C_{dl} + C_{dtp})} \quad (A.1)$$

Pour obtenir les valeurs de **pôles** et **zéros**, la fonction de transfert doit être irréductible et dans le format de l'équation (A.2) pour une fonction de premier ordre et dans le format de l'équation (A.3) pour une fonction de transfert de deuxième ordre.

$$Z(S) = \frac{1}{ST + 1} \quad (A.2)$$

$$Z(S) = \frac{S^2}{\omega_n^2} + S \frac{2\delta}{\omega_n} + 1 \quad (A.3)$$

Nous observons que le numérateur de la fonction de transfert (équation (A.1)) est déjà au format irréductible (l'équation (A.3)). Cependant, le dénominateur peut être travaillé pour devenir irréductible :

$$D(S) = S^2 (C_{dtp} C_{dl} R_m + C_{dtp} C_{dl} R_p) + S(C_{dl} + C_{dtp})$$

$$D(S) = S [S(C_{dtp} C_{dl} R_m + C_{dtp} C_{dl} R_p) + C_{dl} + C_{dtp}]$$

$$D(S) = S \left[\frac{S(C_{dtp} C_{dl} R_m + C_{dtp} C_{dl} R_p)}{C_{dl} + C_{dtp}} + 1 \right] (C_{dl} + C_{dtp}) \quad (A.4)$$

En rassemblant le numérateur et le dénominateur, nous obtenons la fonction de transfert irréductible comme l'équation (A.5).

$$Z(S) = \frac{1}{(C_{dl} + C_{dlp})} \frac{S^2 C_{dl} R_m C_{dlp} R_p + S(C_{dl} R_m + C_{dlp} R_p) + 1}{S \left(\frac{S(C_{dlp} C_{dl} R_m + C_{dlp} C_{dl} R_p)}{C_{dl} + C_{dlp}} + 1 \right)} \quad (\text{A.5})$$

La fonction de transfert de l'équation (A.5) a le même format que l'équation modèle (A.6) :

$$Z(S) = K \frac{\frac{S^2}{\omega_n^2} + S \frac{2\delta}{\omega_n} + 1}{S(S\tau + 1)} \quad (\text{A.6})$$

Ainsi nous pouvons dire qu'il y a un **pôle** à zéro et un **pôle** à $S = \frac{C_{dlp} C_{dl} R_m + C_{dlp} C_{dl} R_p}{C_{dl} + C_{dlp}}$. Pour les **zéros** ils peuvent être **zéros** complexes (si $0 \leq \delta < 1$), double **zéros** (si $\delta = 1$) ou **zéros** réels et différents (si $\delta > 1$), placés à $\omega_n = \frac{1}{\sqrt{C_{dlp} R_p C_{dl} R_m}}$. Le coefficient d'amortissement est ainsi $\delta = \frac{0,5(C_{dl} R_m + C_{dlp} R_p)}{\sqrt{\frac{1}{C_{dlp} R_p C_{dl} R_m}}}$.

Annexe 2 : Capacité d'électrodes coplanaires avec milieu non homogène

La capacité d'une paire d'électrodes coplanaires dans un milieu non homogène (Figure A.1) est calculée par l'équation (A.7)[83].

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon_{eff} \frac{K(k'_0)}{K(k_0)} \quad (A.7)$$

dont $K(k)$ est l'intégrale elliptique complète de première espèce et ε_{eff} est la constante diélectrique effective équivalente pour deux couches différentes.

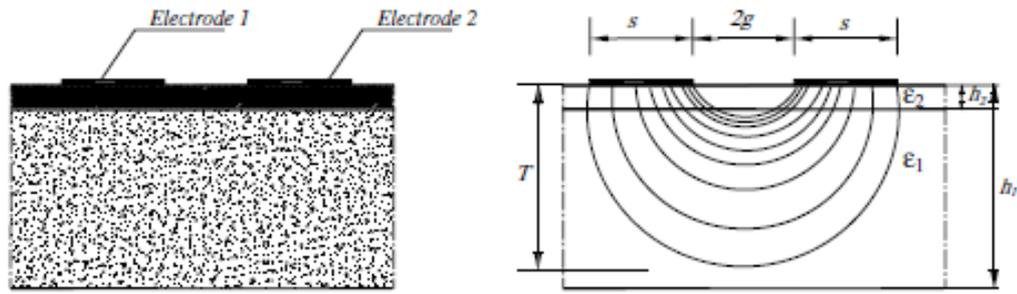


Figure A.1. (a) Schéma d'une paire d'électrodes coplanaires dans un milieu non homogène et (b) la distribution du champ électrique.

L'intégrale elliptique complète de première espèce est calculée par l'équation (A.9).

$$K(m) = \int_0^{\pi/2} \frac{1}{\sqrt{1 - m \sin^2 \theta}} d\theta \quad (A.8)$$

Et les coefficients k_0 et k'_0 sont calculés par les équations (A.9) et (A.10), dont g est la moitié du gap entre les électrodes et s la largeur des électrodes

$$k_0 = \frac{g}{s + g} \quad (A.9)$$

$$k'_0 = \sqrt{1 - k_0^2} \quad (A.10)$$

La constante diélectrique effective équivalente est calculée par l'équation (A.11), dont ε_2 est la permittivité du matériau plus proche d'électrode et ε_1 est la permittivité du matériau plus loin. Les facteurs q_1 et q_2 sont calculés avec l'équation (A.12) et les facteurs k_1 et k_2 par les équations (A.13) et (A.14).

$$\varepsilon_{eff} = 1 + (\varepsilon_1 - 1)q_1 + (\varepsilon_2 - \varepsilon_1)q_2 \quad (A.11)$$

$$q_i = \frac{1}{2} \frac{K(k'_i)K(k_0)}{K(k_i)K(k'_0)}, \quad i = 1, 2 \quad (A.12)$$

$$k_i = \frac{\tanh\left(\frac{\pi g}{2h_i}\right)}{\tanh\left(\frac{\pi(s+g)}{2h_i}\right)}, \quad i = 1, 2 \quad (\text{A.13})$$

$$k_i = \sqrt{1 - k_i^2}, \quad i = 1, 2 \quad (\text{A.14})$$

Annexe 3 : Valeurs de fréquence de coupure F_{low} et F_{high} expérimental

Dans le tableau A1 sont affichées les valeurs de la fréquence de coupure basse F_{low} et de la fréquence de coupure haute F_{high} pour quatre structures de biocapteurs différents et pour quatre solutions calibrées.

Tableau A1. Fréquences de coupures F_{low} et F_{high} en kHz

Capteur	Solution	AB		AC		BD		CD		ABCDVe		ABCDHo	
		F_{low}	F_{high}										
CA20	S100	1,4	120	1	270	1,15	270	0,9	85	1,8	300	1,8	170
	Rob	5,8	192	5,2	870	5,2	870	4,6	272	7,4	620	7,4	340
	S1413	21,05	870	18,74	770	18,74	770	16,68	690	23,64	4430	23,64	2470
	S5000	60	5000	54,34	5000	54,34	5000	47,51	5000	75,65	5000	75,65	5000
CA20ISO	S100	-	1,8	-	1,7	-	1,7	-	1,8	-	2	-	2
	Rob	-	7,4	-	7,4	-	7,4	-	7,4	-	8,3	-	8,3
	S1413	4,6	53,37	5,8	67,34	4,1	53,37	4,6	53,37	8,3	67,34	8,3	67,34
	S5000	11,7	170	14,85	170	11,7	170	14,85	170	16,68	120	16,68	120
CA10	S100	18,74	190	95,45	270	95,45	270	29,84	310	95,45	310	95,45	1230
	Rob	152	610	152	690	152	690	152	610	107	613	107	1380
	S1413	170,7	1090	614	3120	614	3120	614	3120	546	4430	486	4430
	S5000	1233	-	1385	-	1385	-	1385	-	1963	-	1963	-
CA10ISO	S100	1,78	271	1,78	107	1,78	107	1,78	271	2,85	155,6	2,85	433,2
	Rob	13,85	300	15,2	300	13	300	14	300	20	300	20	430
	S1413	32	470	30	570	30	570	30	500	38,54	628	38,54	911
	S5000	89	-	89	-	81	-	81	-	97	-	97	-

Conception et réalisation d'un biocapteur à matrice d'électrodes pour la caractérisation de milieux biologiques par spectroscopie d'impédance

La connaissance des propriétés électromagnétiques des cellules peut fournir des signaux précoces de maladie ou de conditions anormales dans le corps humain pour des applications médicales. Combinée à des dispositifs microfluidiques, la spectroscopie d'impédance peut constituer un outil puissant pour le tri, l'analyse, le comptage et la discrimination de cellules. L'objectif principal de cette thèse est la caractérisation de cellules biologiques isolées par spectroscopie d'impédance .

La conception et le développement d'un biocapteur à matrice d'électrodes coplanaires sont le second objectif de ce travail, l'idée étant *in fine* de pouvoir effectuer des mesures simultanées sur plusieurs cellules unitaires. La structure en forme de matrice d'électrodes permet d'augmenter le nombre de cellules mesurées lorsque le nombre d'électrodes augmente. Cependant, les pistes de connexion des électrodes peuvent réduire la variation d'impédance normalisée et ainsi augmenter la difficulté de mesurer les cellules entre les électrodes. Pour analyser les effets des pistes de connexion, proposer des améliorations et observer la faisabilité, nous avons d'abord utilisé une matrice simple 2x2. Avec cette structure, nous analysons de façon analytique, par simulation et par mesures expérimentales l'influence des pistes de connexion sur la bande de fréquence et sur la variation d'impédance normalisée. Pour réduire les effets de pistes de connexion, nous avons réduit leurs dimensions et nous avons montré l'avantage d'utiliser une couche d'isolant sur les pistes de connexion.

Mots clés : Spectroscopie d'impédance, biocapteur, électrodes coplanaires, matrice d'électrodes, microfluidique et cellules unitaires

Design of an electrode matrix biosensor for the characterization of biological mediums by impedance spectroscopy

Knowledge of the electromagnetic properties of cells can provide early signals of disease or abnormal conditions in the human body for medical applications. In combination with microfluidic devices, impedance spectroscopy can be a powerful tool for sorting, analyzing, counting and discriminating cells. The main objective of this thesis is the characterization of isolated biological cells by measurement of unit-scale impedance spectroscopy and thus to be able to characterize them, in this thesis project we have done.

The design and development of a coplanar electrode matrix biosensor are the second objective of this work, the idea being ultimately to be able to perform simultaneous measurements on several unit cells. The electrode matrix-shaped structure makes it possible to increase the number of cells measured as the number of electrodes increases. However, the electrode lead tracks can reduce the normalized impedance variation and thereby increase the difficulty in measuring cells between the electrodes. To analyze the effects of the connection tracks, propose improvements and observe the feasibility, we first used a simple 2x2 matrix. With this structure, we analyze analytically, by simulations and by experimental measurements, the influence of the connection tracks on the frequency band and on the standardized impedance variation. To reduce the effects of connection tracks, we have reduced their dimensions as well and we have used shown the advantage of using an insulator layer on the connection tracks.

Keywords : Impedance spectroscopy, biosensors, coplanar electrodes, electrode matrix, microfluidic, single cells