



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>

Faculté des Sciences et Technologies

École Doctorale

Informatique Automatique Électronique Électrotechnique Mathématique
Département de Formation Doctorale
Électronique Électrotechnique Automatique

Thèse
présentée pour l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE
Spécialité : Systèmes électroniques
par

Mouhamad IBRAHIM

**MESURE DE BIOIMPEDANCE ELECTRIQUE PAR
CAPTEURS INTERDIGITES**

Soutenance publique le 07 Décembre 2012

Jury :

Rapporteurs :

M. BERQUEZ Laurent. Professeur, Université Paul Sabatier Toulouse III
M. MOHAMMED-BRAHIM Tayeb Professeur, Université de Rennes 1

Examineurs :

M. GINDRE Marcel Professeur, Université de Cergy Pontoise
M. NADI Mustapha Professeur, Université de Lorraine ; Co-directeur de thèse
M. KOURTICHE Djilali Professeur, Université de Lorraine ; Directeur de thèse

Remerciements

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

Je remercie également Monsieur Marcel Gindre, Professeur à l'Université de Cergy-Pontoise, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime mes remerciements à Monsieur Djilali Kourtiche, Professeur à l'Université de Lorraine, pour avoir dirigé ces travaux de thèse et pour son soutien dans les bons comme les mauvais moments.

Je tiens également à remercier Monsieur Mustapha Nadi, Professeur à l'Université de Lorraine, et co-directeur de ma thèse.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Gwladys Lengaigne et Monsieur Laurent Bouvot, ingénieurs au CC Minalor de l'Institut Jean Lamour pour leurs aides et leurs conseils concernant les manipulations des microélectrodes.

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

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

Je tiens finalement à remercier ma femme et mes parents qui ont su m'apporter réconfort et soutien dans les moments difficiles et de doutes. Un GRAND merci.

Table des matières

I.	Mesure des propriétés électriques des milieux biologiques	1
I.1	Antécédents des mesures de bioimpédance électrique	3
I.2	Définition de la bioimpédance électrique	4
I.3	Propriétés électriques des tissus biologiques	5
I.3.1	Conductivité électrique des tissus vivants	5
I.3.2	Conductivité électrique cellulaire	12
I.3.3	Impédance d'un tissu	14
I.3.4	Modèles de conduction des tissus vivants	16
I.4	Spectroscopie d'impédance	20
I.5	Difficultés de mesure par spectroscopie de Bioimpédance	22
I.5.1	Conditionnement de l'échantillon	22
I.5.2	Impédance d'interface	22
I.5.3	Température	24
I.5.4	Anisotropie	24
I.5.5	Évaporation	25
I.5.6	Miniaturisation	25
I.5.7	Étalement de la goutte	25
I.6	Les micros technologies	25
I.6.1	Naissance des technologies BioMEMS	26
I.7	Capteurs de bioimpédance à microélectrodes	27
I.7.1	ECIS (Electrode Cell-substrate Impedance Sensing)	27
I.7.2	Structure matricielle, Cell-Based Biosensor	29
I.7.3	Structure multi-électrodes	30

I.7.4	Real-time Cell Electronic Sensing (RT-CES™)	31
I.7.5	Structure à trois électrodes	33
I.7.6	Structures interdigitées	34
I.8	Conclusion.....	40
II.	Capteurs à électrodes interdigitées : optimisation théorique et validation	43
II.1	Optimisation des capteurs microélectrodes	45
II.2	Optimisation analytique du capteur	46
II.2.1	Modèle du circuit électrique équivalent.....	46
II.2.2	Optimisation de la géométrie des électrodes	51
II.3	Modélisation par éléments finis	63
II.3.1	Présentation du simulateur CoventorWare®	63
II.3.2	Le maillage	64
II.3.3	Formulation du problème.....	65
II.3.4	Modélisation tridimensionnelle du système	66
II.3.5	Résultats de simulation.....	69
II.4	Conclusion.....	80
III.	Conception et réalisation des micros capteurs à électrodes interdigitées .	83
III.1	Conception des dispositifs.....	85
III.1.1	Choix des matériaux	85
III.1.2	Géométrie des dispositifs	88
III.2	Procédé technologique.....	92
III.2.1	Fabrication des électrodes	92
III.2.2	Fabrication des puits.....	94
III.2.3	Problème liés aux réseaux d'électrodes court-circuitées	97
III.3	Connexion des micro-dispositifs au matériel de mesure	99
III.3.1	Connexion des dispositifs aux circuits imprimés	99

III.4	Conclusion	100
IV.	Spectroscopie de Bioimpédance et caractérisation du sang par un microcapteur à électrodes interdigitées.....	103
IV.1	Dispositif expérimental.....	105
IV.1.1	L'impédance mètre HF2IS	106
IV.1.2	Utilisation et interfaces de mesure d'analyseur d'impédance ...	107
IV.1.3	Manipulation de l'échantillon fluide.....	108
IV.2	Caractérisation des électrodes	110
IV.2.1	Caractérisation à vide des microélectrodes	111
IV.2.2	Caractérisation des microélectrodes par des solutions étalons – Validation des systèmes	114
IV.3	Mesures sur des échantillons sanguins	124
IV.3.1	L'anticoagulant	124
IV.3.2	Protocole et conditions de mesure.....	125
IV.3.3	Influence de l'héparine.....	126
IV.3.4	Influence du nettoyage - Reproductibilité des mesures	127
IV.3.5	Sensibilité de détection	130
IV.3.6	Influence de la température.....	133
IV.3.7	Evolution temporelle.....	135
IV.3.8	Vérification de la théorie d'optimisation	139
IV.4	Compensation des effets d'interfaces : méthode de mesure différentielle.....	143
IV.5	Conclusion	148
V.	Conclusion générale et perspectives	151

Notations

Constantes

Symbole	Nom	Valeur	Unité
ϵ_0	Permittivité du vide	$8.8541 \cdot 10^{-12}$	$F.m^{-1}$
π	Pi	3.14159265	-

Variables

Symbole	Nom	Unité
Z	Impédance	Ω
V	Tension	V
I	Courant électrique	A
K	Constante de cellule	m^{-1}
σ	Conductivité électrique du milieu	$S.m^{-1}$
ω	Pulsation angulaire	$Rad.s^{-1}$
ϵ_r	Permittivité diélectrique relative du milieu	-
ϵ_0	Permittivité du vide	$F.m^{-1}$
j	Symbole imaginaire	-
C	Capacitance	F
G	Conductance	S
A	Aire d'une section	m^2

d	Distance	m
Y	Admittance	S
R	Résistance	Ω
X	Réactance	Ω
z	Impédance spécifique	$\Omega.m^{-1}$
ρ	Résistivité	$\Omega.m^{-1}$
L	Longueur	m
S	Surface	m^2
α	Facteur de dispersion du modèle de Cole-Cole	-
τ	Temps de relaxation	s
σ_s	Conductivité électrique statique	$S.m^{-1}$
φ	Phase	Degré
Q	Facteur d'amplitude d'un CPE	$S.s^n$
Z_{CPE}	Impédance d'un CPE (Elément à phase constante)	Ω
n	Facteur de phase d'un CPE	-

C_{Cell}	Capacitance due aux propriétés diélectriques de l'échantillon	F
C_{DL}	Capacité de double couche	F
R_{Sol}	Résistance électrique due aux propriétés de conduction de l'échantillon	Ω
C_{H}	Capacité de Helmholtz	F
C_{G}	Capacité de Gouy-Chapman	F
d_{OHP}	Epaisseur de la double couche	m
L_{D}	Longueur de Debye	m
K_{Cell}	Constante de cellule	m^{-1}
N	Nombre d'électrodes	-
$K(k)$	Intégrale incomplète elliptique au premier degré	-
S	Espacement entre deux électrodes consécutives	m
W	Largeur d'une électrode	m

L	Longueur d'une électrode	m
k	Module de l'intégrale elliptique du premier ordre	-
$C_{DL, \text{ Surface}}$	Capacité caractéristique de double couche	$F.m^{-1}$
F_{Low}	Fréquence de coupure basse	Hz
F_{High}	Fréquence de coupure haute	Hz
Z_{DL}	Impédance de double couche	Ω
σ_{Sol}	Conductivité électrique l'échantillon	$S.m^{-1}$
ϵ_r, Sol	Permittivité diélectrique relative du milieu	-
f	Fréquence	Hz
t	Temps	s

Introduction générale

De nos jours, nombreuses sont les applications biomédicales basées sur la spectroscopie d'impédance électrique (Rigaud, et al., 1996), (Katz & Willner, 2003). Il s'agit d'une technique couramment mise en œuvre dans le domaine médical avec plus de 60 années d'applications dans le cadre d'investigations cliniques ou en recherche (Schwan, 1999). La spectroscopie de bioimpédance compare la réponse électrique d'un milieu biologique à une excitation électrique extérieure variant dans le temps (Grimnes & Martinsen, 2000). Cette technique non invasive permet d'accéder comme méthode de mesure de variation (structure et composition de tissus biologiques) liée à des changements engendrés par des processus physiopathologiques à une caractérisation électrique du vivant. Elle permet de déterminer l'état physiologique de tissus *ex vivo* ou directement sur des organes biologiques par leur caractérisation électromagnétique (Faes, et al., 1999).

Les interactions entre les rayonnements non ionisants et la matière biologique progressent en matière diagnostique et en matière thérapeutique. Ces progrès passent par la détermination des propriétés électromagnétiques du milieu de propagation. Les problèmes de santé publique liés à la présence de champs électromagnétiques (dosimétrie, effets biologiques) constituent un autre aspect applicatif pour lequel les valeurs de caractéristiques électriques telles que la conductivité et la permittivité des tissus biologiques sont nécessaires. Ces valeurs des tissus biologiques aux fréquences d'intérêt restent mal connues.

La caractérisation électromagnétique des milieux biologiques basée sur la bioimpédance en utilisant des techniques de mesure par le biais des microélectrodes est en train de devenir un outil de diagnostic très important pour l'étude des changements électro physiologiques et biophysiques dus à des infections virales (McCoy & Wang, 2005), la détection du cancer (Aberg, et al., 2004), et le contrôle qualité des médicaments (Huang, et al., 2003).

Les avantages de l'utilisation des microélectrodes comparées à des électrodes classiques macroscopiques sont entre autres l'économie de fabrication (Judy, 2001), les grandes densités de courant au cours de la mesure (Justin, et al., 2009), et la

latitude de pouvoir intégrer ces microélectrodes dans d'autres dispositifs instrumentaux pour développer des systèmes de mesure portables (Park & Shuler, 2003) voire des bio puces ou lab-on-chip.

En raison des faibles courants, les microélectrodes ont le potentiel pour effectuer des mesures non destructives et faciliter l'étude des échantillons biologiques de très faible conductivité (Matysik, et al., 1995).

En revanche, un inconvénient des microélectrodes, est leur impédance beaucoup plus élevée par rapport aux macro-électrodes en raison des phénomènes d'interface. Ces phénomènes se manifestent par une capacité d'interface, ou double couche, résultant de l'interaction entre les ions et les molécules à la frontière entre la surface de l'électrolyte et les électrodes de mesure. Cette capacité est inversement proportionnelle à la surface des électrodes (Franks, et al., 2005). Par conséquent, cette capacité de double couche crée une contrainte et augmente l'erreur de mesure (Price, et al., 2009), (Barsoukov & Macdonald, 2005).

Pour cela, la conception géométrique de microélectrodes doit être optimisée afin de réduire l'impédance due à la capacité d'interface et d'élargir la gamme de fréquences utiles.

L'optimisation de la conception des capteurs à microélectrodes est essentielle pour un emploi efficace de la spectroscopie d'impédance dans les domaines médical et pharmaceutique.

L'objectif principal de cette thèse est la conception d'un biocapteur de caractérisation de milieux biologiques par spectroscopie d'impédance. Plus précisément, l'optimisation géométrique de sa structure à électrodes interdigitées. Cette optimisation permet d'élargir la plage fréquentielle de mesure. (Pejcic & Marco, 2006) rappellent que l'optimisation du capteur est l'une des étapes les plus délicates dans la réalisation d'un dispositif de mesure de bioimpédance.

Ce travail de thèse s'articule autour de quatre chapitres. Le premier chapitre *Mesure des propriétés électriques des milieux biologiques* synthétise les données fondamentales relatives au comportement électrique des tissus biologiques ainsi que leurs propriétés électriques. Celles-ci constituent un préalable indispensable pour toute étude visant au développement de techniques de mesure appropriées.

Les propriétés diélectriques et conductrices des milieux biologiques ainsi que leur dépendance fréquentielle du fait des phénomènes de relaxations sont énoncées et discutées sur la base de la description des principaux constituants des tissus influençant le comportement électrique. Un état de l'art des techniques fondamentales de mesure d'impédance basées sur les électrodes micrométriques est décrit. Enfin, la géométrie de cellule retenue pour la caractérisation de nos échantillons biologiques est présentée.

Le deuxième chapitre *Optimisation des capteurs à électrodes interdigitées par simulation analytique et numérique* concerne une approche théorique pour l'optimisation de la structure géométrique d'un capteur à électrodes interdigitées. Nous détaillons les démarches et les équations qui ont permis cette optimisation. Cette optimisation géométrique sert à élargir la bande de fréquence utile de mesure. Une modélisation tridimensionnelle du système d'électrodes chargé par un modèle du milieu biologique sous le logiciel ConventorWare est présentée. Ainsi, les résultats de la simulation du système par la méthode numérique des éléments finis sont discutés et la théorie d'optimisation validée.

Dans le troisième chapitre *Conception et réalisation des micros capteurs à électrodes interdigitées*, les dispositifs développés au cours de cette thèse sont décrits. La conception et la fabrication des composants sont présentées.

Enfin, le quatrième chapitre *Microélectrodes interdigitées pour l'analyse du sang humain par Bioimpédancemétrie* concerne l'étude d'une chaîne de mesure complète pour la caractérisation de très faibles volumes de fluides biologiques déposés dans les microréservoirs des capteurs. Les mesures effectuées sur des solutions étalons ainsi que la validation des dispositifs sont discutées. Nous présentons dans un second temps, les différentes mesures effectuées sur des échantillons sanguins. Enfin nous comparons nos résultats à des valeurs publiées dans la littérature et nous justifions expérimentalement la théorie d'optimisation développée.

Une conclusion générale synthétise ces travaux et les résultats obtenus.

I. Mesure des propriétés électriques des milieux biologiques

Ce premier chapitre traite de la mesure des propriétés électriques des milieux biologiques. Pour cela nous commençons par un rappel sur les mesures de bioimpédance électrique ainsi que sa définition. Cependant, la définition d'une chaîne instrumentale parfaitement adaptée à la mesure spectroscopique des paramètres électriques nécessite tout d'abord la définition du comportement physiologique et électrique global du milieu d'étude. Nous présentons les fondamentaux relatifs au comportement électrique des tissus biologiques ainsi que leurs propriétés électriques. Les différents modèles rendant compte du comportement électrique global sont également décrits. Nous abordons aussi les difficultés de la caractérisation électrique des milieux biologiques ainsi que l'intérêt des micro-technologies pour la spectroscopie d'impédance des tissus biologiques. Les techniques majeures de mesure d'impédance basées sur des électrodes micrométriques sont également revues. Enfin, la géométrie de cellule retenue pour la caractérisation de nos échantillons biologiques est présentée.

I.1 Antécédents des mesures de bioimpédance électrique

L'histoire des mesures de bioimpédance électrique sur les tissus biologiques remonte à la fin du XVIII^{ème} siècle, avec les expériences réalisées par Galvani (Schwan, 1995). Les mesures de bioimpédance électrique donnent des informations sur le milieu biologique sous test. Selon (Rigaud, et al., 1996), il a fallu attendre le début du XX^{ème} siècle, pour que soient démontrées les propriétés électriques passives des tissus biologiques, rendant leur caractérisation fréquentielle interprétable.

Les mesures de bioimpédance électrique fondamentales peuvent être classées dans deux catégories :

- La première est l'étude des changements de bioimpédance électrique liée à un processus physiologique ou physiopathologique. Citons comme exemple la cardiographie par impédance qui analyse le système circulatoire ou la pneumographie par impédance qui surveille le système respiratoire. L'objectif de ces applications est de trouver des informations qualitatives et quantitatives sur les changements d'impédance électrique produits par les changements structurels ou fonctionnels du système sous test.

- La deuxième catégorie contrôle les caractéristiques des tissus biologiques de l'organisme, telles que: l'hydratation, l'œdème, le volume des fluides corporels, le volume intra et extracellulaire, le pourcentage de matières grasses et en termes généraux, l'état des tissus et les cellules qui les composent.

L'instrumentation utilisée dans la mesure de bioimpédance est très abordable. En outre, elle utilise une technique à base d'agent physique non-ionisant qui peut être appliquée d'une façon non invasive. Ces caractéristiques de la spectroscopie de bioimpédance ont favorisé les applications possibles dans plusieurs domaines. Toutefois, cette mesure est influencée par de nombreux facteurs : la géométrie, la conductivité des tissus et la circulation sanguine, entre autres (Patterson, 2000). Citons pour exemple la tomographie d'impédance électrique : l'utilisation de

multiples électrodes permet d'obtenir des données de conductivité permettant de fournir des renseignements sur le volume en générant une image de coupe des parties du corps explorées. Mais sa résolution spatiale est encore très pauvre en comparaison avec d'autres techniques d'imagerie médicale actuellement utilisées.

La spectroscopie d'impédance électrique est encore utilisée pour la caractérisation des tissus sains et pathologiques en se basant sur le spectre de leurs propriétés diélectriques constitué de la conductivité et la permittivité complexe. Cette approche diagnostique est basée sur la différence établie de modifications des valeurs de ces grandeurs entre tissus sains et tissus cancéreux (Foster et Schwan, 1996 ; chapter 1 in Handbook of Biological effects of EMF, Polk editor).

I.2 Définition de la bioimpédance électrique

L'impédance électrique d'un matériau est son aptitude à s'opposer à l'écoulement des charges électriques qui le traversent. Si le matériel est d'origine biologique, on parlera de bioimpédance.

L'impédance (Z) est un nombre complexe défini par la loi d'Ohm comme le rapport entre la tension mesurée (V) et le débit total de courant (I).

En raison de la nature des tissus, l'impédance peut varier avec la fréquence des mesures du signal. L'impédance diminue quand la fréquence augmente. La relation entre l'impédance et la fréquence n'est pas linéaire. Plus la fréquence augmente, plus l'impédance diminue.

Dans le cas d'un milieu homogène et isotrope, l'impédance est une fonction de la conductivité et de la permittivité. Et dépend des facteurs géométriques déterminés par le facteur de cellule (k).

$$Z = k \frac{1}{\sigma + j\omega\epsilon_0\epsilon_r}$$

Avec :

k = facteur de cellule (m^{-1}),

σ = conductivité électrique (S/m),

j = symbole imaginaire,

ω = pulsation angulaire (rad/s),

ϵ_0 = permittivité du vide,

ϵ_r = permittivité relative du milieu.

I.3 Propriétés électriques des tissus biologiques

I.3.1 Conductivité électrique des tissus vivants

La conductivité électrique d'un tissu biologique est déterminée par ses constituants. Les tissus comprennent le fluide extracellulaire et les cellules. En première approche, ces cellules contiennent un fluide intracellulaire et une membrane. En réalité leur constitution est beaucoup plus complexe. Le liquide extracellulaire est le milieu dans lequel baignent les cellules, également nommé espace extracellulaire. Il contient des protéines et des électrolytes (plasma, liquide interstitiel). La cellule est délimitée par une membrane plasmique lipidique bicouche contenant du cytoplasme qui contient les organites et le noyau de la cellule (Figure I-1).

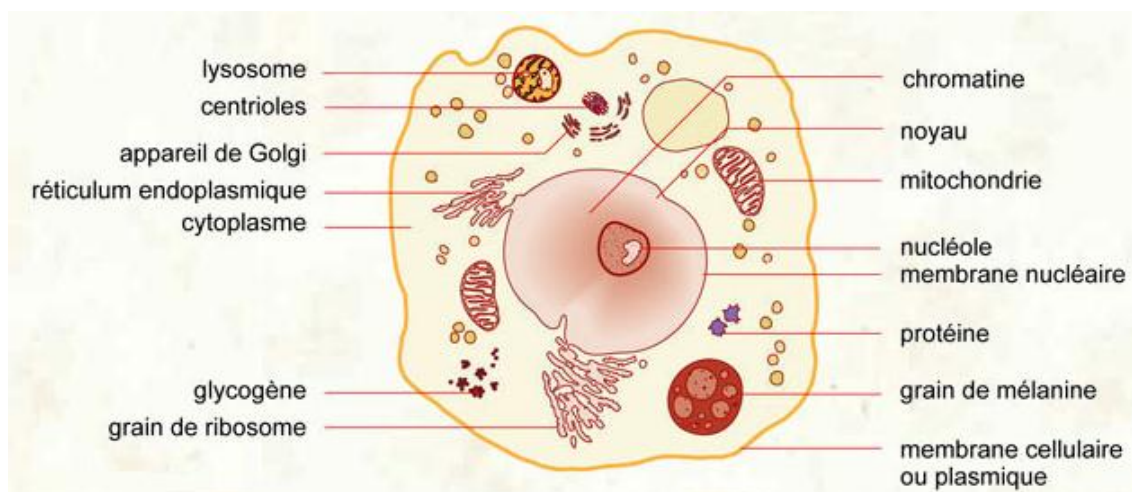


Figure I-1 : Structure simplifiée d'une cellule vivante (source : http://www.infovisual.info/03/001_fr.html)

Une définition globale d'un tissu vivant est la suivante :

c'est tout ou partie d'un organe constitué d'un agrégat de cellules semblables et de substances intercellulaires qui les entourent organisées en une structure à fonction physiologique spécifique.

I.3.1.1 Liquides tissulaires - électrolytes

Dans les métaux, les porteurs des charges électriques sont des électrons, mais dans les électrolytes, les porteurs des charges sont des ions, des cations si leur charge est positive et les anions si la charge est négative. Un électrolyte présente une conductivité ionique continue, et peut être défini comme :

un composé chimique qui, lorsqu'il est dissous dans une solution, se dissocie en ions et est capable de conduire le courant électrique en présence d'un champ électrique externe.

Les deux fluides intracellulaires et extracellulaires sont des électrolytes, car ils contiennent des ions, qui sont libres de migrer et de transporter les charges électriques. Par conséquent, nous pouvons considérer les tissus biologiques électriquement et macroscopiquement comme un conducteur ionique. La conductivité ionique totale d'une solution dépend de la concentration, l'activité, la charge et la mobilité de tous les ions libres dans la solution. Les ions les plus importants qui contribuent à l'intensité du courant ionique dans les tissus vivants sont les K^+ , Na^+ et Ca^{2+} (Table I-1). Il convient de noter que trois d'entre eux sont des cations. La viscosité et la température de la solution sont également des facteurs importants qui influent sur la conductivité ionique.

	Intracellulaire	Extracellulaire
Na^+	10-20 mM	150 mM
K^+	100 mM	5 mM
Ca^{2+}	10(-4) mM	1 mM

Table I-1 : Concentration des ions dans les tissus vivants (Guyton & Hall, 2001).

La conductivité ionique est un transfert de charges accompagné par le mouvement d'une substance, produisant des changements dans la majeure partie de l'électrolyte. La conductivité ionique continue est une fonction linéaire du champ

seulement pour une période de temps limitée, et lorsque l'intensité du champ électrique appliqué externe n'est pas élevée.

Pour plus d'informations sur les électrolytes et la conductivité ionique continue dans les tissus vivants, voir (Grimnes & Martinsen, 2000).

I.3.1.2 La membrane plasmique

La membrane plasmique entoure complètement la cellule. Il s'agit d'une structure mince et élastique avec une largeur de 75 à 100 Å et est principalement constituée de protéines (55%) et de lipides (43%).

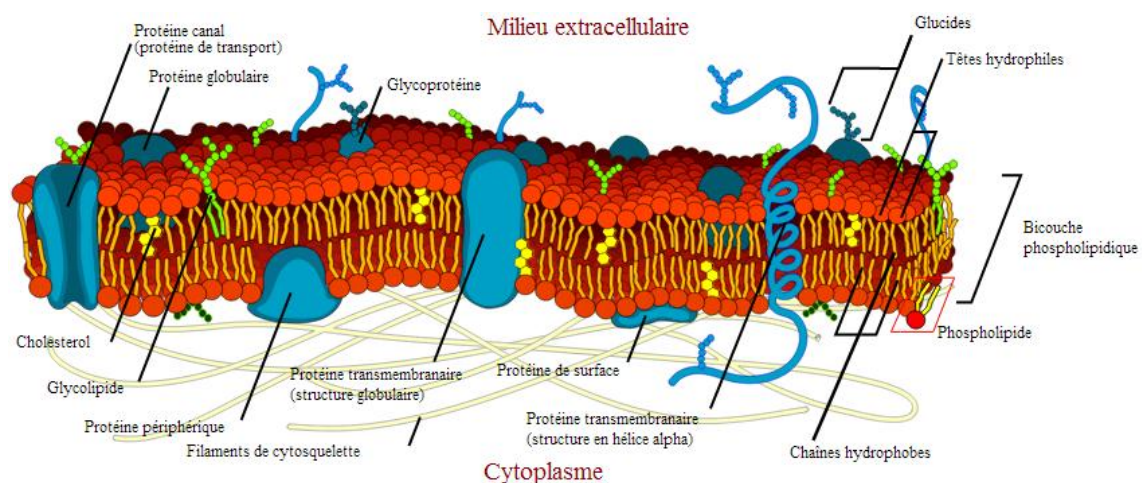


Figure I-2 : La structure bicouche lipidique de la membrane plasmique (source : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_\(biologie\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_(biologie)))

I.3.1.2.1 La Structure bicouche lipidique

La structure élémentaire de la membrane plasmique est une bicouche phospholipidique. Les molécules lipidiques formant la bicouche ont un côté hydrophile et un côté hydrophobe; les côtés hydrophobes s'attirent créant une trilamination de la membrane cellulaire. Cette structure, qui est en permanence reproduite, crée la membrane plasmique. Voir Figure I-2.

La conductivité électrique intrinsèque de la membrane cellulaire est très faible. La membrane est considérée comme un diélectrique. La structure totale formée par le fluide intracellulaire, la membrane plasmique et le fluide extracellulaire (conducteur-diélectrique-conducteur) se comporte comme un condensateur, avec une capacité d'environ 0,01 F/m².

I.3.1.2.2 Les canaux transmembranaires

Entrelacées avec la structure bicouche lipidique, il existe des protéines de différents types. L'une d'elles est la protéine intégrée. Ce type de protéine est inséré dans la bicouche lipidique traversant et créant des canaux très étroits pour faire passer les substances à travers la membrane plasmique, tels que des ions ou de l'eau. D'un point de vue électrique, ces canaux permettent au courant de passer à travers la membrane isolante d'une manière passive.

I.3.1.3 Nature diélectrique des tissus vivants

Tout matériel qui présente la possibilité de stocker de l'énergie capacitive peut être classé comme un diélectrique, et les tissus vivants ont cette capacité grâce à ses constituants à n'importe quel niveau, moléculaire, subcellulaire, ou cellulaire.

Les compositions des liquides extracellulaires et intracellulaires, et en particulier les organites, contribuent à la création d'un comportement global de nature diélectrique du tissu. La membrane plasmique est une structure cellulaire ayant une contribution majeure au comportement diélectrique des tissus vivants.

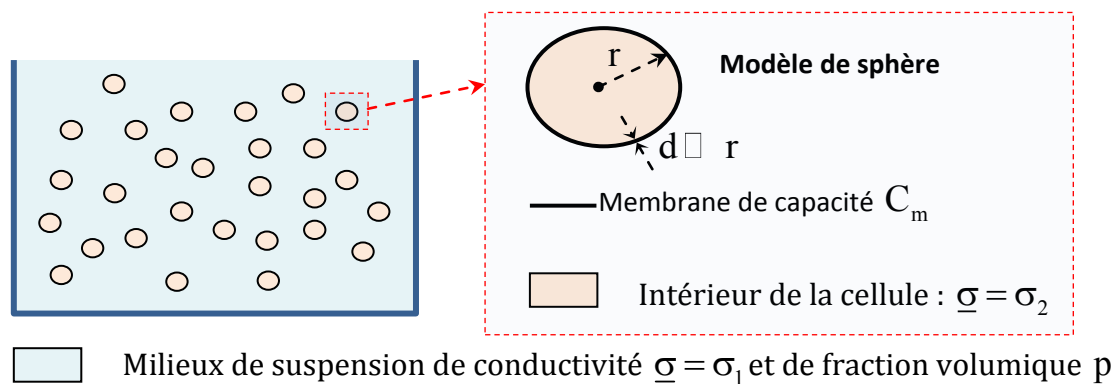


Figure I-3 : Modèle de suspension cellulaire prenant en considération la conductivité du milieu de suspension, la capacité des membranes et la conductivité interne des cellules. Approximation de Pauly & Schwan (Pauly & Schwan, 1959)

Certaines théories diélectriques ont été développées pour analyser le comportement des tissus biologiques : la relaxation générale, la relaxation structurale et la relaxation polaire. Mais aucune d'elles n'est en mesure d'expliquer en détail tous les résultats expérimentaux. Une étude approfondie des propriétés

diélectriques des tissus, y compris les théories développées, peuvent être trouvées dans (Schwan, 1957) (Foster & Schwan, 1989).

I.3.1.3.1 Théorie diélectrique: Concepts de base et définitions

Basiquement, la théorie diélectrique s'explique en se basant sur le concept du condensateur électrique. Dans un condensateur, les propriétés électriques passives de la matière diélectrique maintenue entre deux électrodes planes et parallèles sont complètement caractérisées par la capacité C mesurée expérimentalement et la conductance G correspondant aux pertes ohmiques. La conductance est définie par l'Équation I-1 et la capacité par l'Équation I-2 lorsqu'une différence de tension constante est appliquée entre les électrodes :

Ici A est la surface des électrodes planes et d est la distance entre les électrodes (cf. Figure I-4).

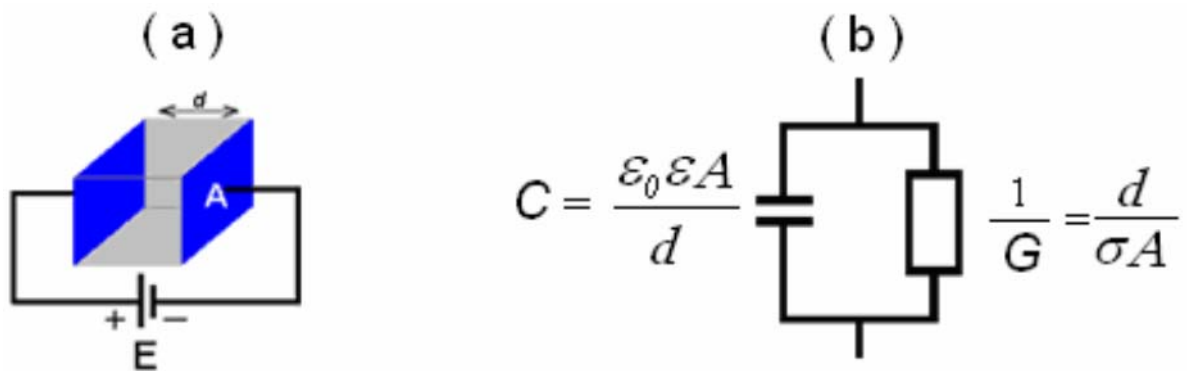


Figure I-4 : a)-milieu diélectrique entre deux plaques métalliques. b)- circuit équivalent composé d'une capacité en parallèle avec un élément conducteur

$G = \frac{\sigma A}{d}$	Équation I-1
$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d}$	Équation I-2

Où σ désigne la conductivité électrique du matériau, et représente la densité de courant induit en réponse à un champ électrique appliqué. Elle indique l'aptitude des porteurs de charge à se déplacer à travers le matériau, sous l'influence du champ électrique. Dans le cas de tissu vivant, la conductivité résulte principalement de la mobilité des ions extracellulaires et intracellulaires.

On désigne par ε_0 la permittivité diélectrique de l'espace de vide, et sa valeur constante est 8.854×10^{-12} F / m et ε_r dénote la permittivité relative du matériau par rapport à ε_0 . La permittivité reflète la façon dont les distributions des charges dans le matériau sont déformées ou polarisées en réponse à un champ électrique externe appliqué. Dans le cas d'un tissu biologique, les charges sont principalement liées à des structures électriques de doubles couches, à savoir la membrane plasmique, autour de macromolécules présentes et avec des molécules polaires qui, par définition, ont un moment dipolaire électrique permanent.

I.3.1.3.2 Admittance - impédance et conductivité - résistivité

Dans le cas où la différence de tension est sinusoïdale, les caractéristiques électriques du circuit équivalent de la Figure I-4 varient avec la fréquence et peuvent être caractérisées de plusieurs manières. Avec la pulsation ω , l'admittance complexe Y^* peut s'exprimer comme suit :

$Y^* = G + j\omega C = \frac{A}{d}(\sigma + j\omega C \varepsilon_0 \varepsilon_r)$	Équation I-3
---	---------------------

Et à partir de laquelle la conductivité complexe σ^* , également appelée admittance spécifique, est définie :

$\sigma^* = \sigma + j\omega \varepsilon_0 \varepsilon_r$	Équation I-4
---	---------------------

L'unité de σ^* selon le système international des unités (SI) est le Siemens par mètre, S.m⁻¹. L'impédance complexe est définie comme l'inverse de l'admittance complexe, elle peut s'écrire :

$Z^* = \frac{1}{Y^*} = R + jX = \frac{G - j\omega C}{G^2 + (\omega C)^2}$	Équation I-5
---	---------------------

Et à partir de laquelle l'impédance complexe spécifique z^* du matériau est définie :

$z^* = \frac{1}{\sigma^*} = \frac{\sigma - j\omega \varepsilon_0 \varepsilon_r}{\sigma^2 + (\omega \varepsilon_0 \varepsilon_r)^2} = \rho^*$	Équation I-6
--	---------------------

Notez que l'impédance complexe spécifique z^* peut aussi être nommée résistivité complexe, et dans un tel cas, elle est désignée par ρ^* . Dans les deux cas, telle qu'elle est exprimée dans l'Équation I-6 les deux sont l'inverse de la conductivité complexe σ^* .

I.3.1.4 Dépendance en fréquence - Dispersion spectroscopique

Un tissu vivant est considéré comme un milieu dispersif: les deux propriétés diélectriques telles que la permittivité et la conductivité sont des fonctions de la fréquence; voir la Figure I-5. Cette dépendance de fréquence observée est nommée dispersion et elle provient de plusieurs mécanismes (Foster & Schwan, 1989). (Schwan, 1957) a identifié et nommé trois dispersions principales: les dispersions α , β , et γ . Une autre dispersion subsidiaire a été montrée dans un premier temps en 1948 (Rajewsky & Schwan, 1948) et identifiée par la suite comme la dispersion δ (Schwan, 1994) (cf Figure I-5).

I.3.1.4.1 Dispersion α

La compréhension de la dispersion α reste incomplète (Schwan, 1994). Divers mécanismes et éléments contribuent à cette dépendance en fréquence et trois points peuvent être distingués (Schwan & Taka-shima, 1993) :

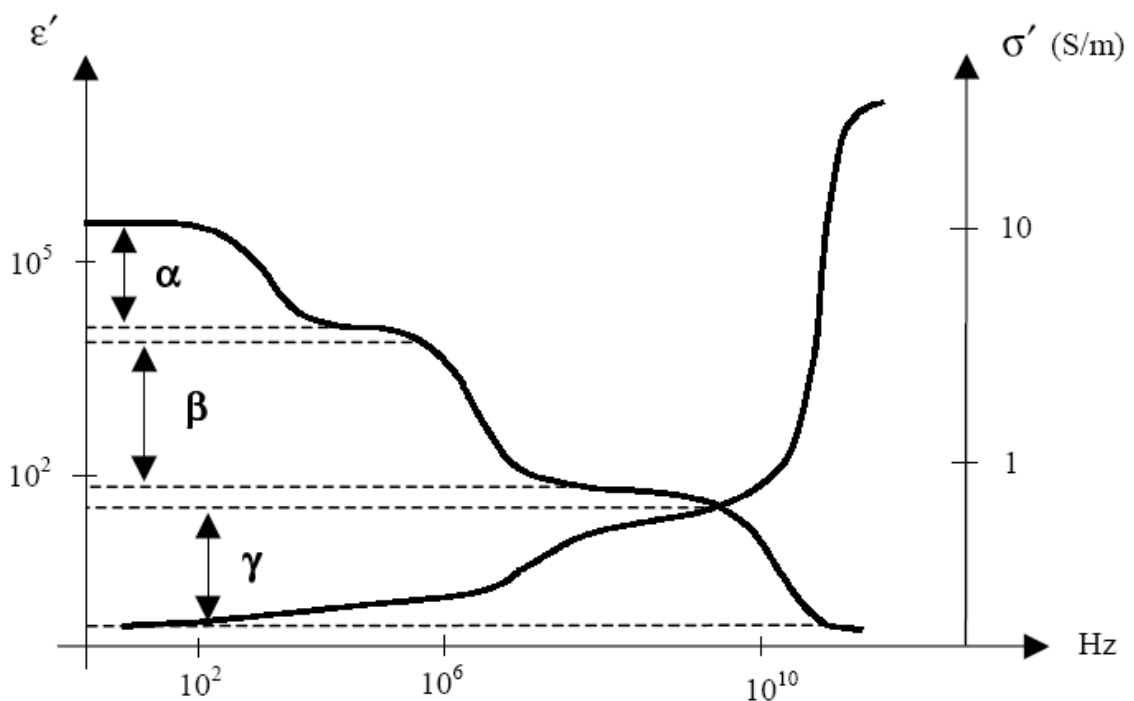


Figure 5 : Variations spectroscopiques de la conductivité et de la permittivité

- La conductivité dépend de la fréquence des échanges des protéines dans les canaux présents dans la membrane cellulaire.
- La dépendance en fréquence liée à la diffusion des nuages de contre-ions à proximité des surfaces de cellules.
- L'effet du réticulum endoplasmique, quand il existe.

I.3.1.4.2 Dispersion β

La dispersion β est principalement due aux structures cellulaires de tissu, en raison de la faible conductivité de la membrane plasmique des cellules formant le tissu. Il faut du temps pour charger les membranes à travers les milieux conducteurs, les fluides extracellulaires et intracellulaires. La constante de temps est déterminée par la capacité de membrane, de rayon de la cellule et des conductivités de fluide (Schwan, 1957).

Contribuant à la dispersion β causée par la structure de la cellule, il y a d'autres constituants des tissus (Foster & Schwan, 1989): les protéines, les résidus d'acides aminés et les organites. Pour une description plus détaillée des contributions des différents constituants des tissus aux dispersions différentes, on pourra se référer à Pethig (Pethig & Kell, 1987).

I.3.1.4.3 Dispersion γ

Cette dépendance fréquentielle est provoquée par la teneur élevée en eau dans les cellules ainsi que dans les tissus. L'eau du tissu est identique à l'eau normale, qui se relaxe à 20 GHz. La présence des protéines et d'acides aminés et autres constituants cellulaires affichent quant à eux un large spectre de dispersion à partir de quelques centaines de MHz à quelques GHz.

I.3.1.4.4 Dispersion δ

Il s'agit d'un effet d'une faible dispersion subsidiaire observée autour de 100 MHz causé par des protéines liées à l'eau.

I.3.2 Conductivité électrique cellulaire

Les caractéristiques électriques des tissus biologiques sont, pour simplifier, un composite des caractéristiques des cellules constitutives. Il est utile de représenter l'équivalent des modèles de circuits électriques des cellules et des tissus, car ils

nous aident à comprendre le phénomène de la conductance et d'attribuer un sens physique aux paramètres d'impédance dans le matériel biologique.

I.3.2.1 Circuit électrique équivalent d'une cellule biologique

Considérant les principaux constituants de la cellule introduits dans le paragraphe précédent et, en appliquant la théorie des circuits électriques, il est possible de déduire un modèle électrique de base pour la cellule. (cf Figure I-6).

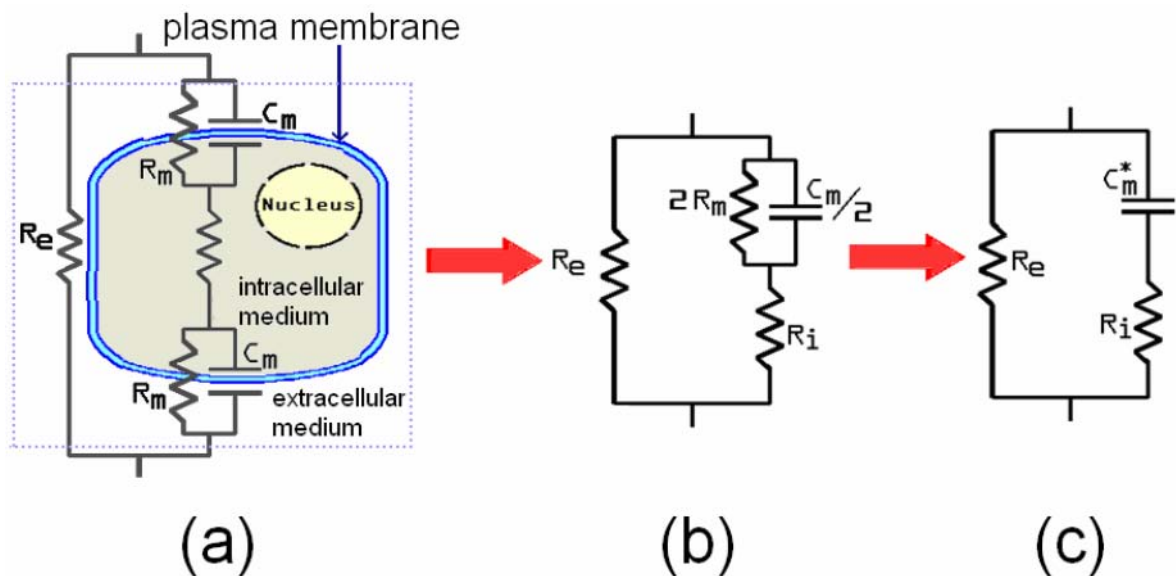


Figure I-6 : a) Circuit électrique équivalent d'une cellule. b) son modèle équivalent après quelques simplifications du circuit. c) circuit équivalent de la cellule, en négligeant l'effet de R_m . Noter que C_m^* est égal à $C_m/2$ (Fricke, 1924).

Si le courant est injecté dans le milieu extracellulaire, il peut y avoir:

- a) Un écoulement de courant autour de la cellule par l'intermédiaire du liquide extracellulaire, ce qui équivaut à la circulation par le biais de R_e dans le circuit équivalent.
- b) Un écoulement à travers la cellule traversant la membrane plasmique; C_m représente cette possibilité dans le circuit équivalent.
- c) Un écoulement à travers le canal transmembranaire ionique, ce qui équivaut à la circulation par le biais de R_m dans le circuit équivalent.

Compte tenu de la conductivité extrêmement faible de la membrane plasmique, la valeur de R_m est très élevée. Aux basses fréquences, proches du continu, la membrane plasmique agit comme un isolant et le courant n'est pas en mesure de pénétrer dans la cellule. La plupart des flux de courant contournent la cellule. L'effet isolant de la membrane cellulaire diminue lorsque la fréquence augmente, et une partie du courant est capable de s'écouler à travers la cellule. A des fréquences supérieures à 1 MHz, la capacité de la membrane n'est pas un obstacle devant le courant et ce dernier peut couler sans discernement par le milieu intra et extracellulaire. Voir Figure I-7.

Souvent, comme la conductivité membranaire est très faible, l'effet de R_m est négligé et le circuit électrique équivalent est très simple. Dans ce cas, seule une seule dispersion existe : la dépendance en fréquence introduite par le condensateur C_m , voir Figure I-6 (c). L'utilisation de ce modèle simplifié est très répandue et il est utilisé correctement pour expliquer les mesures d'impédance dans un large éventail allant du continu à quelques dizaines de MHz.

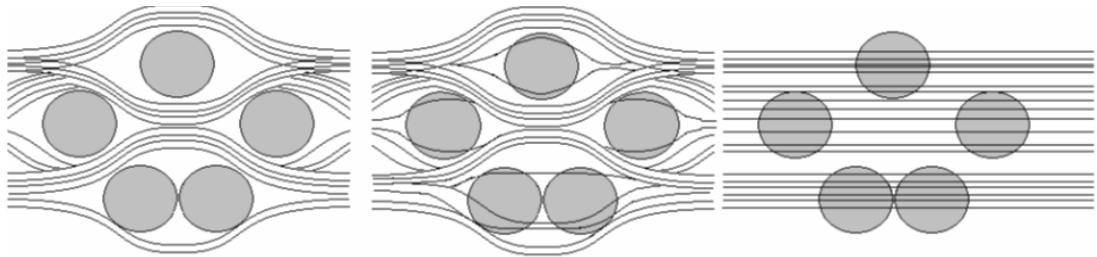


Figure I-7 : Trajets de courant dans une suspension de cellules à des fréquences différentes.

I.3.3 Impédance d'un tissu

L'impédance électrique d'un matériau est donnée par son impédance spécifique, $z^*(\omega)$, multipliée par un facteur de forme, k , comme indiqué dans l'Équation I-7. Un tel facteur de forme dépend de la longueur du tissu conducteur L , et de la surface adéquate S au courant électrique (dépendant de E). Cette surface est normale à la direction du gradient. Voir Figure I-8.

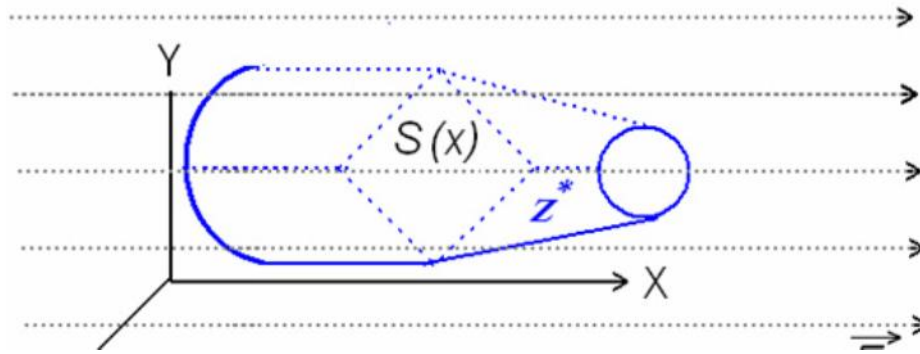


Figure I-8 : Conducteur de volume, avec impédance spécifique z^* , de longueur L et de section transversale S . On note que S change le long de l'axe X .

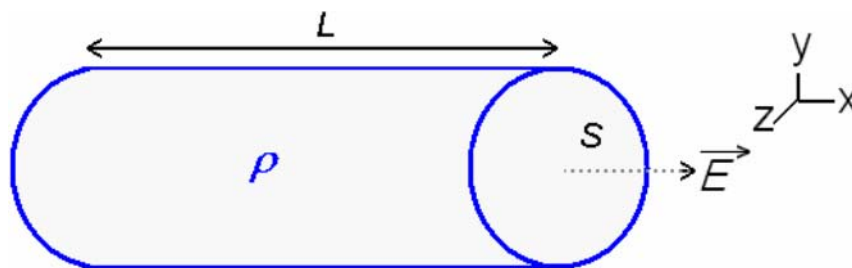


Figure I-9 : Conducteur cylindrique de résistivité ρ , de longueur L et de surface S ; coupe transversale, perpendiculaire au champ électrique E

$$Z(\omega) = z^*(\omega)k = z^*(\omega) \int_0^L \frac{dx}{S(x)}$$

Équation I-7

Dans le cas simple d'un milieu résistif pur ayant une résistivité constante le long de la fréquence avec la forme d'un conducteur cylindrique (voir la Figure I-9), la résistance totale R du conducteur le long de l'axe X est donnée par :

$$R = \rho \frac{L}{S}$$

Équation I-8

L est la longueur du cylindre, S est la surface en coupe transversale du conducteur et ρ est la résistivité du matériau.

N.B. L'aire de section transversale perpendiculaire au champ électrique est constante le long de X .

I.3.4 Modèles de conduction des tissus vivants

I.3.4.1 Modèle de Fricke

Dès le début du XXème siècle, plusieurs modélisations du comportement électrique des tissus biologiques sont proposées. En 1925, Fricke a développé une théorie de la résistance des suspensions de cellules sphériques, la modélisation du comportement des cellules dans le milieu extracellulaire.

La Figure I-10 montre le schéma de circuit électrique utilisé par Fricke et Morse (Fricke & Morse, 1926) comme un modèle de tissu. Ce modèle simplifié de tissus a été utilisé plus tard par (Morimoto, et al., 1990); (Morimoto, et al., 1993); (Chauveau, et al., 1999); (Ohmine, et al., 2000). Dans ce schéma, R_e représente la résistance extracellulaire, R_i est la résistance intracellulaire, et C_m est la capacité de la membrane plasmique. Bien que Fricke ait montré que son modèle, incorporant une capacité pure indépendante de la fréquence, est satisfaisant dans la représentation des propriétés électriques des suspensions de globules rouges, d'autres tissus ont montré un comportement plus complexe. En termes de simples circuits RC, la permittivité est généralement considérée comme indépendante de la fréquence. Les tissus présentent un comportement dépendant de la fréquence qui dépasse le simple modèle RC. Ceci étant dû aux différents composants (liquide intracellulaire, liquide extracellulaire et la membrane plasmique) qui contribuent de façon différente à l'impédance totale.

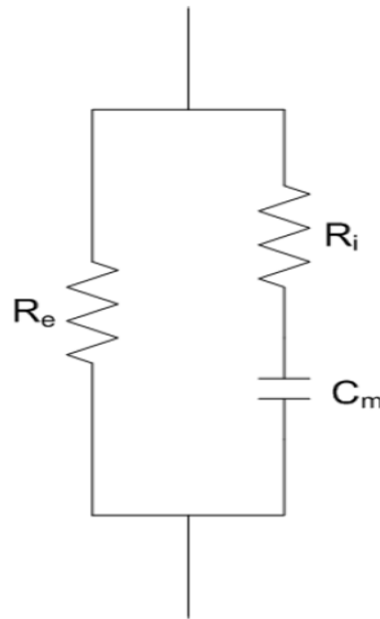


Figure I-10 : Exemple simplifié du circuit électrique équivalent correspondant au comportement électrique des tissus (utilisé par Morimoto, et al 1990; Morimoto, et al 1993; Chauveau, et al 1999; Ohmine et al 2000).

I.3.4.2 Modèle de Cole

Cole (Cole, 1928) dans ses premiers travaux en 1928 a développé une approche d'un circuit électrique équivalent aux tissus, en trouvant l'impédance d'une cellule fondamentale, puis il a élargi le travail vers une suspension de sphères homogènes qui modélisaient les tissus du milieu global. La nouveauté de l'étude de Cole est qu'il intégrait un élément d'impédance à phase constante (constant phase : CP) dans le schéma de circuit. Il a également montré que n'importe quel réseau contenant toute combinaison de résistances et une simple impédance variable avec un angle de phase constant indépendant de la fréquence produit des courbes de réactance en fonction de résistance sous la forme d'un arc de cercle avec un centre déplacé le long de deux axes (demi-cercle).

L'angle de phase entre la résistance et la réactance (Figure I-11) est $\theta = \tan^{-1} (X / R)$, qui est une constante dans l'élément à phase constante CP et résulte d'une relation linéaire entre les deux, $R = mX$, où m est une constante. Noter que l'élément CP ne contient pas la forme explicite de la réactance X et devient un conducteur parfait dans la limite des fréquences élevées.

L'article de Cole-Cole en 1941 (Cole & Cole, 1941) a fourni un point tournant majeur dans l'histoire de la recherche des propriétés électriques des tissus et des membranes. La dispersion et l'absorption de nombreux liquides et diélectriques ont été trouvées sous la forme de l'expression empirique suivante :

$\varepsilon - \varepsilon_{\infty} = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_{\infty}}{1 + (j\omega\tau)^{1-\alpha}}$	Équation I-9
--	---------------------

Dans cette équation, ε est une constante diélectrique complexe, et ε_0 et ε_{∞} sont des constantes diélectriques dans les limites de fréquence basse et haute, respectivement, τ est le temps de relaxation générale, et α est un paramètre variant entre 0 et 1. L'Équation I-9 a été modifiée en se basant sur la théorie classique de l'effet pour les liquides polaires par Debye, où $\alpha = 0$ (Cole & Cole, 1941).



Figure I-11 : Une partie du circuit électrique composé d'une résistance R et d'une réactance X.

Dans ce cas particulier, pour $\alpha = 0$, l'Équation I-9 peut être utilisée pour obtenir la relation entre σ et ε . Avec l'ajout du terme de conduction statique à l'Équation I-9 en utilisant la définition de la conductivité complexe sous forme d'Équation I-4, on a ce qui suit :

$\varepsilon - \varepsilon_{\infty} = \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_{\infty}}{1 + (j\omega\tau)^{1-\alpha}} - \frac{j\sigma_s}{\omega}$	Équation I-10
---	----------------------

Avec $\alpha = 0$, après la séparation de l'Équation I-10 en parties réelle et imaginaire, en multipliant la composante imaginaire par $j\omega$, nous pouvons trouver la limite de l'expression obtenue pour ω tendant vers l'infini :

$j\omega\varepsilon'' = \lim_{\omega \rightarrow \infty} \left[\frac{\omega^2\tau(\varepsilon_0 - \varepsilon_{\infty})}{1 + (\omega\tau)} + \sigma_s \right] = \sigma_{\infty}$	Équation I-11
---	----------------------

L'Équation I-12 donne la relation suivante entre la permittivité et la conductivité exclusivement lorsque $\alpha = 0$:

$\sigma_{\infty} - \sigma_s = \frac{(\varepsilon_0 - \varepsilon_{\infty})}{\tau}$	Équation I-12
--	----------------------

Malgré le fait que l'Équation I-12 occupe seulement la forme de Debye de l'Équation I-10, c.à.d. $\alpha = 0$ (sinon la limite supérieure n'existe pas), certains chercheurs l'ont généralisé pour $\alpha \neq 0$ (Jossinet & Schmitt, 1999).

Lorsqu'on trace le diagramme de Nyquist (Figure I-12), l'Équation I-9 représente un arc de cercle avec le centre déplacé le long de deux axes, et un aplatissement d'un arc représenté par l'angle $\alpha\pi / 2$.

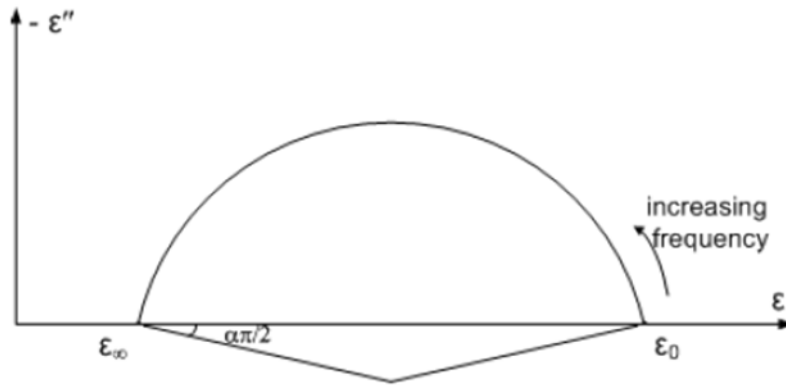


Figure I-12 : Courbe complexe de l'Équation I-9 représentant le demi-cercle avec un aplatissement déterminé par l'angle $\alpha\pi / 2$. Ici ε' et ε'' sont les parties réelle et imaginaire de la constante diélectrique, et ε_0 et ε_{∞} sont les constantes diélectriques dans les limites basse et haute fréquence, correspondantes.

Pour adapter un modèle précis qui représente le comportement des tissus biologiques, nous nous référons au travail de (Cole, 1932); (Chauveau, et al., 1999), (McAdams & Jossinet, 1995). La Figure I-13 montre le circuit modifié à partir de la Figure I-10 avec la capacité remplacé par l'élément de phase CP.

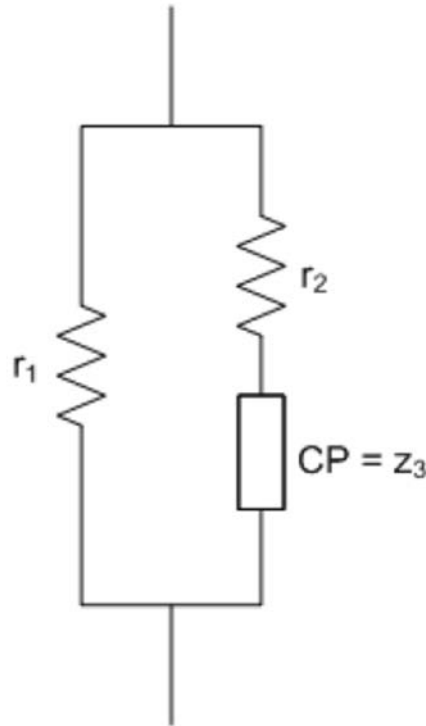


Figure I-13 : Schéma de circuit équivalent au tissu. r_1 est une résistance extracellulaire, r_2 est une résistance intracellulaire, et CP est l'élément de phase constante avec une impédance spécifique z_3 .

I.4 Spectroscopie d'impédance

En utilisant la spectroscopie d'impédance, les propriétés électriques des tissus biologiques avec et sans changement physiologique ou/et morphologique peuvent être mesurées. Dans des conditions linéaires, la loi d'Ohm complexe s'applique à des signaux alternatifs. La Figure I-14 montre ces signaux alternatifs, le potentiel mesuré et le courant appliqué, dans un matériau diélectrique. En raison des propriétés diélectriques du matériau, des différences de phase et d'amplitude entre la source et le signal de réponse sont observées. Lorsqu'un courant alternatif est appliqué avec une amplitude I et une phase φ de I selon la formule suivante :

$I = I_0 e^{j(\omega t + \varphi_I)}$	Équation I-13
---------------------------------------	---------------

Alors le potentiel mesuré a une amplitude V et une phase φ de V sera :

$V = V_0 e^{j(\omega t + \varphi_V)}$	Équation I-14
---------------------------------------	---------------

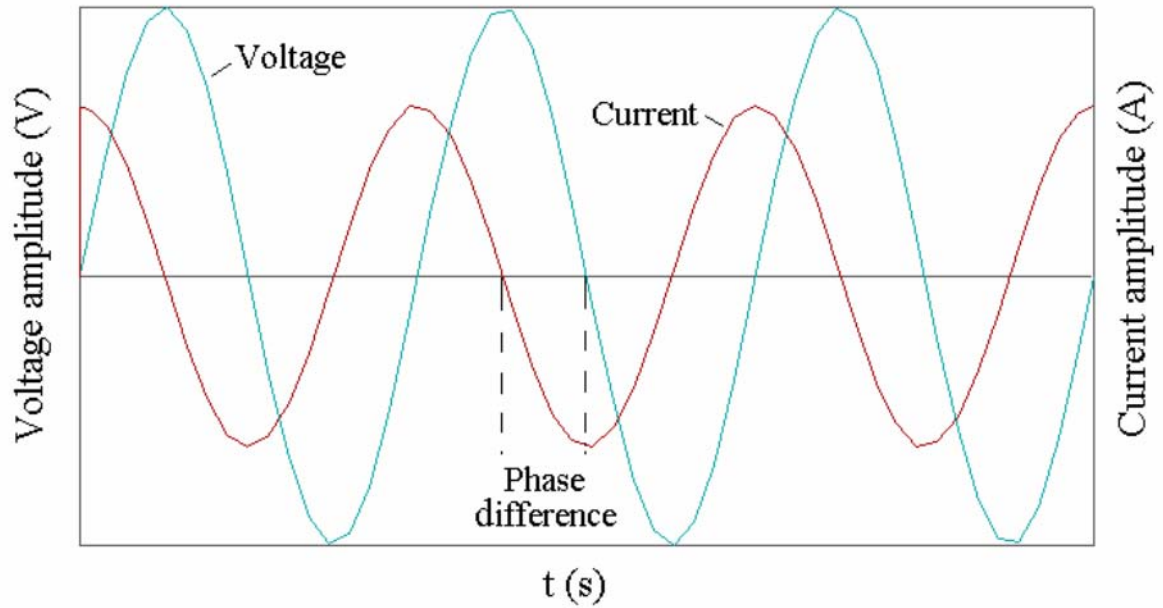


Figure I-14 : Réponse en tension et en courant d'un matériau diélectrique.

$Z = \frac{V}{I} = \frac{V_0 e^{j(\omega t + \varphi_V)}}{I_0 e^{j(\omega t + \varphi_I)}} = \frac{V_0}{I_0} e^{j(\varphi_V - \varphi_I)}$ $= Z_0 e^{j\theta}$	Équation I-15
--	---------------

Pour un milieu biologique linéaire, homogène et isotrope, l'impédance est une fonction de ses propriétés diélectriques, la conductivité et la permittivité, mais dépend aussi des facteurs géométriques de la cellule, on l'appellera facteur de cellule "k" avec l'unité (m^{-1}). Ceci se traduit par l'équation suivante :

$Z^* = k \frac{1}{\sigma + j\omega \epsilon_0 \epsilon_r} = k \frac{1}{\sigma^*} = k \rho^*$ $= k(r + jx)$	Équation I-16
--	---------------

La détermination des propriétés électriques d'un milieu biologique passe donc par la mesure de l'impédance complexe et par la connaissance de la géométrie de la zone de mesure caractérisée par le facteur de cellule k . La maîtrise de tous ces paramètres permet de résoudre le problème inverse pour remonter à la conductivité et à la permittivité.

I.5 Difficultés de mesure par spectroscopie de Bioimpédance

I.5.1 Conditionnement de l'échantillon

On peut distinguer deux types de mesure. La première mesure est celle *in vivo* réalisée directement sur un organe accessible d'un sujet vivant. La deuxième mesure est celle *ex vivo* réalisée sur un tissu prélevé sur le sujet étudié.

Pour la plupart des tissus, il n'est pas possible de réaliser les mesures permettant la caractérisation électrique *in vivo* (sauf pour le sang dont on peut faire la mesure *ex vivo* juste après le prélèvement). Selon les possibilités, des mesures peuvent être effectuées *ex vivo* sur des échantillons excisés sur patient ou *post mortem*. Ces échantillons présentent alors, comparées aux mesures *in vivo*, des modifications dues aux variations de propriétés électriques post mortem (Foster & Schwan, 1989) ainsi qu'à leur hétérogénéité localisée, leur anisotropie et leur variation de température entre autres.

I.5.2 Impédance d'interface

Aux fréquences inférieures au GHz, les mesures nécessitent toujours un contact physique entre le système de caractérisation et le tissu à étudier. Ce contact constitue une interface entre un conducteur (électrodes du dispositif de mesure) et un milieu conducteur ionique (milieu biologique étudié). La présence d'un champ électrique à cette interface entraîne la formation d'une "double couche" dans chaque milieu (Figure I-15) (Grimnes & Martinsen, 2000). Cette double couche est constituée d'une zone vide de charge et d'une zone où se concentrent les porteurs de charges. Dans le cas des bons conducteurs électroniques (métaux conducteurs), les

électrons se concentrent au voisinage immédiat de l'interface et la double couche correspondante est d'épaisseur très faible (de l'ordre de 0.01 nanomètre). Dans le cas des conducteurs ioniques, l'application d'un champ électrique entraîne la formation d'une zone vide de charges au voisinage immédiat de l'interface, et d'une couche diffuse où se concentrent les porteurs de charges. En l'absence d'adsorption (fixation des ions sur l'électrode), les ions ne peuvent pas s'approcher de l'électrode à moins de quelques 0.1nm (correspondant au diamètre des atomes du solvant entourant les cations ou étant adsorbés par l'électrode). Il se forme donc une zone correspondant au diélectrique d'un condensateur. L'épaisseur de la couche diffuse (ou couche de Gouy-Chapman) peut être de l'ordre de quelques nanomètres. La répartition des charges dans cette zone est soumise à des phénomènes physiques complexes (diffusion, convection, force électrique) et dépend fortement de la fréquence de variation du champ électrique appliqué. Cette répartition particulière des charges au niveau des interfaces résulte en une impédance très importante entre l'électrode et le milieu biologique pour les fréquences inférieures à quelques kHz. L'étude spectroscopique de cette impédance d'interface montre qu'elle peut être modélisée sous la forme (Schuhmann, 1978) (Zoltowski, 1998) :

$Z_i = K (j\omega)^{-\alpha}$, avec $0 < \alpha < 1$	Équation I-17
---	----------------------

Ce modèle d'impédance d'interface correspond à la constante de phase CPE (Constant Phase Element) définie auparavant. Elle vérifie les relations de Kramers-Krönig (relations entre parties réelles et imaginaires). La valeur des paramètres K et α dépend de nombreux paramètres comme par exemple :

- Le matériau constitutif de l'électrode.
- L'état de surface de l'électrode.
- Le type d'ions présents dans le milieu.
- La concentration en ions du milieu.

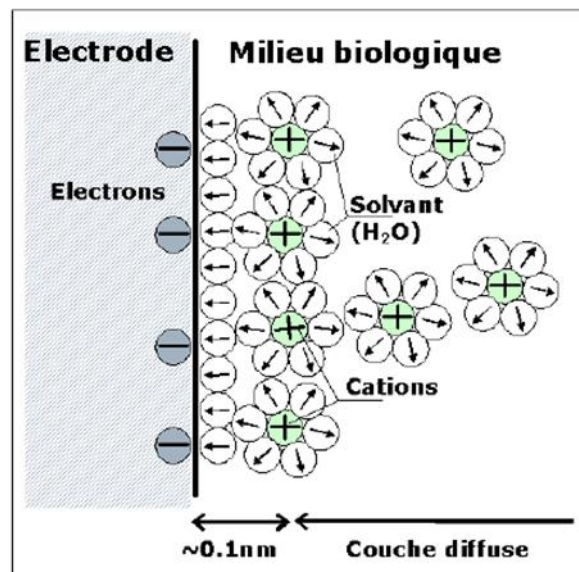


Figure I-15 : Interface électrode/milieu biologique.

I.5.3 Température

Les tissus biologiques liquides peuvent, dans une première approche être considérés proches d'un électrolyte, leur conductivité étant fonction de la température. Cette variation est d'environ 2%/°C (Schwan, 1957) ce qui est similaire au coefficient de température d'une solution saline. Une dépendance plus faible de la permittivité a été observée par Schwan et Li (Schwan & Li, 1953). Elle dépend de la fréquence et varie de -0.4 % à 1.3 %. La connaissance de la température à laquelle les mesures sont effectuées est donc indispensable, surtout pour la conductivité.

I.5.4 Anisotropie

Les tissus biologiques présentent une orientation de leur structure. Cette orientation structurale est également observée au niveau des fibres musculaires et peut se révéler très complexe, comme c'est le cas pour le tissu cardiaque (Steendijk, et al., 1993). Cette orientation se traduit par une anisotropie des propriétés électriques des tissus. Cette anisotropie constitue un problème métrologique de première importance car les différences enregistrées suivant les directions de

mesure ne sont pas négligeables (Saha & Williams, 1992), (Steendijk, et al., 1993) (Chateaux, 2000). En ce qui nous concerne, le milieu d'intérêt étant le sang en régime statique (microgoutte) et les échantillons très petits, l'anisotropie sera négligée pour cette étude.

I.5.5 Évaporation

L'évaporation est un facteur non négligeable dans les mesures des milieux fluidiques qui modifie constamment le volume et la densité. Ce facteur est fortement influent pour des micro volumes et nécessite une attention particulière en expérimentation.

I.5.6 Miniaturisation

La surface de contact entre les électrodes et le tissu sous test devient un élément très important quand le milieu est de taille très faible, ce qui fait appel à la miniaturisation tout en assurant une surface très spécifique du dispositif afin d'augmenter la sensibilité des mesures.

I.5.7 Etalement de la goutte

L'étalement de la goutte par gravité fait augmenter le taux d'évaporation dans le cas d'un milieu fluide comme le sang ou le plasma sanguin et cela quand il n'y a pas un réservoir pour contenir la goutte surtout sur des milieux microbiologiques. Il s'accompagne aussi de phénomènes de sédimentation qui apparaissent pour des durées assez faibles lorsqu'il s'agit de micro volumes.

I.6 Les micros technologies

Comme nous l'avons vu, l'étude des propriétés diélectriques des tissus biologiques permet de répondre à de nombreuses problématiques en biologie et santé. Toutefois, un enjeu majeur réside depuis maintenant plusieurs années dans la miniaturisation des dispositifs d'analyse. En effet, un des objectifs majeurs à l'heure actuelle, consiste à développer des biocapteurs permettant de travailler non

plus à l'échelle des tissus mais à l'échelle de la cellule unique. Jusqu'alors, il n'était possible de faire une observation que sur un grand nombre de cellules. Ainsi, l'information obtenue représentait une moyenne de la population analysée et c'est pourquoi les chercheurs s'intéressent aujourd'hui à une caractérisation cellule par cellule prises individuellement. Le développement des micro-technologies a rendu possible cette avancée technique en levant un verrou technologique à savoir, la réalisation de très petits objets compatibles avec la taille de la cellule biologique.

I.6.1 Naissance des technologies BioMEMS

Les micro-technologies permettent ainsi la mise au point de nouvelles approches pour l'investigation des milieux biologiques afin d'améliorer considérablement les applications biomédicales (Peterson, 1982) (Wise & Najafi, 1991). Il devient alors possible d'imaginer de nouveaux outils d'analyse à la fois plus sensibles, plus rapides et permettant une analyse en temps réel des échantillons. Ainsi, il est très rapidement apparu intéressant d'appliquer les micro-technologies aux domaines biologiques et biomédicaux faisant ainsi émerger les technologies bioMEMS (Biological Micro-Electro-Mechanical Systems) qui facilitent le développement de puces biologiques complexes permettant une analyse complète d'éléments biologiques depuis leur manipulation jusqu'à leur analyse.

De façon générale, les BioMEMS peuvent être définis comme des « dispositifs ou systèmes construits grâce à des techniques inspirées des micro/nanotechnologies. Ils se retrouvent donc utilisés pour le développement, la distribution, la manipulation, l'analyse ou la construction d'entités biologiques et chimiques » (Bashir, 2004.). Ainsi, en permettant la mise en commun d'un nombre important de données, ces véritables « laboratoires sur puces » ou « lab-on-a-chip », représentent une avancée technique fondamentale pour la recherche biomédicale. Leur utilité est en effet incontestable car il devient alors possible, outre l'étude de cellules très ciblées, d'étudier de manière indépendante, des mécanismes biologiques particuliers indispensables aujourd'hui à la compréhension de nombreux phénomènes biologiques. On peut citer comme exemple le développement des cancers ou leur détection précoce, l'apoptose cellulaire, ou encore l'identification de nouveaux traitements et la mise au point de nouveaux outils de diagnostic.

I.7 Capteurs de bioimpédance à microélectrodes

Les techniques de mesure de bioimpédance ont été utilisées pour caractériser électriquement plusieurs organes dans le corps, pour caractériser des tissus nerveux (Cole & Curtis, 1939); le sang et les érythrocytes (Fricke & Morse, 1926), pour étudier des suspensions de cellules en culture (Schwan, 1957), la détection de la croissance des bactéries (Hause & al., 1981), et la culture des cellules d'ancrage dépendantes (Giaever & Keese, 1991). Tous ces travaux sont macroscopiques et ne sont pas directement liés à notre recherche, mais peuvent donner un grand nombre d'informations pertinentes concernant la caractérisation des tissus biologiques.

Nous présentons dans ce qui suit les structures essentielles de capteurs à microélectrodes développés dans ce domaine.

I.7.1 ECIS (Electrode Cell-substrate Impedance Sensing)

Le travail des chercheurs Ivar Giaever et Charles Keese a conduit à de nombreuses applications utilisant la technique (ECIS) comme un outil viable pour l'analyse physiologique (Lo & al., 1998.) (Hug, 2003). ECIS est un système de mesure d'impédance à deux électrodes, comprenant une électrode de charge d'un diamètre de 250 μm et une large contre-électrode comme électrode de référence. Un faible courant de 1 μA est appliqué entre les électrodes et la tension résultante complexe est mesurée à travers les deux mêmes électrodes (Keese & al., 1994). L'impédance résultante est la moyenne des impédances mesurées dans chaque électrode de charge. La conception de l'ECIS fait preuve de la sensibilité de mesure pour la détection des cellules en culture.

Le principe repose sur la modification de l'impédance mesurée entre chacune des deux électrodes actives et celle référence entre lesquelles sont cultivées des cellules. Un courant alternatif (4 kHz) de l'ordre de 1 μA est appliqué entre ces 2 électrodes et la différence de potentiel résultante (qq mV) est mesurée afin de déterminer l'impédance. En l'absence de cellule (milieu de culture seul), le courant peut circuler librement entre les deux électrodes et l'impédance mesurée est relativement faible. Lorsque les cellules sont insérées, celles-ci tendent à adhérer à la surface des électrodes. La présence des cellules sur les électrodes contraint alors

le courant à circuler par un chemin plus restreint sous et entre les cellules. Même si ce phénomène existe sur la petite comme sur la grande électrode, l'impédance de la plus petite électrode est par nature déjà beaucoup plus grande que celle de la grande électrode, et les variations d'impédances liées à l'adhésion des cellules sur la grande électrode sont négligeables devant celles liées à l'adhésion des cellules sur la petite électrode. Lors de l'adhésion ou la croissance des cellules, le module et la phase mesurés s'en trouvent affectées. La croissance de la culture de cellules et son attachement à la surface peuvent ainsi être surveillées en temps réel. La méthode de mesure est capable de détecter des changements subtils dans la culture cellulaire liés par exemple à l'ajout de toxines, de médicaments ou d'autres substances chimiques. Sur la base de ce principe, des études variées ont pu être menées sur des cultures cellulaires (Wegener, et al., 2000) (Giaever & Keese, 1991) (Xiao, et al., 1998) (Arndt, et al., 2004).

La Figure I-16 illustre les électrodes ECIS avec la configuration de mesure. Bien que l'ECIS ait été couronnée de succès dans la détection des micromouvements des cellules de mammifères, ce système ne fournit pas en temps réel les paramètres électrochimiques des données d'impédance pour surveiller les interactions cellule-cellule. Par exemple, dans la Figure I-17, la capacité d'interface (entre les cellules) est absente dans le modèle utilisée pour la détermination des paramètres électrochimiques.

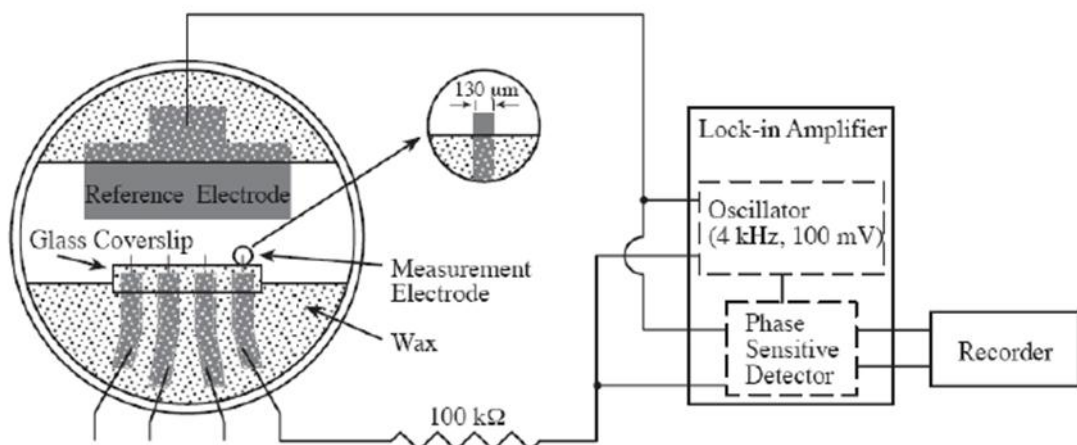


Figure I-16 : Illustration du système ECIS. Source (Borkholder, 1999).

A 4 KHz, le courant d'un signal alternatif ne peut pas pénétrer à travers la capacité d'interface entre les cellules. Il n'est pas clair si une résistance peut être utilisée pour représenter complètement le phénomène d'interface. Des modèles fondamentaux ont été développés en particulier par Wegener (Wegener, et al., 1996), Lo (Lo, et al., 1999) et Goda (Goda, 2005).

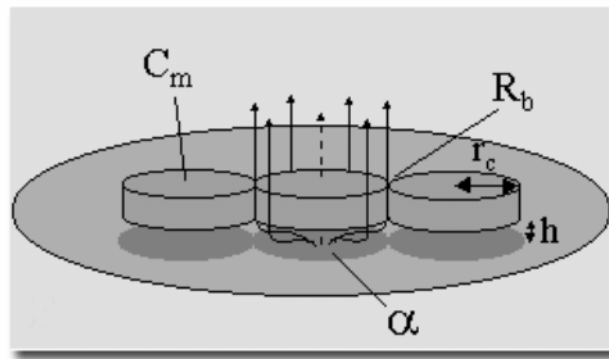


Figure I-17 : Modèle utilisé pour paramétrer les données obtenues à l'aide d'impédance ECIS. (Source: <http://www.biophysics.com/ecismodel.php>)

I.7.2 Structure matricielle, Cell-Based Biosensor

Borkholder (Borkholder, 1999) a développé un capteur de 40 électrodes sous forme de structure matricielle pour analyser les effets de composants pharmaceutiques sur la membrane cellulaire. Ce système enregistre les potentiels d'action ainsi que l'impédance des cellules cultivées pour déterminer ces effets (Figure I-18). Borkholder a utilisé la spectroscopie d'impédance pour caractériser l'impédance des électrodes et des cellules. La tension appliquée est de 100 mV, ce qui est bien au-delà de la limite de linéarité dans la spectroscopie de bioimpédance, qui est d'environ 25 mV à la température ambiante (Barsoukov & Macdonald, 2005). Un comportement non-linéaire a été observé dans les données enregistrées. L'extraction de paramètres n'a pas été effectuée. Bien que des mesures d'impédance aient été enregistrées sur une gamme de fréquences entre 100 Hz et 100 KHz, les résultats n'ont pas été interprétés par comparaison à un modèle électrique équivalent.

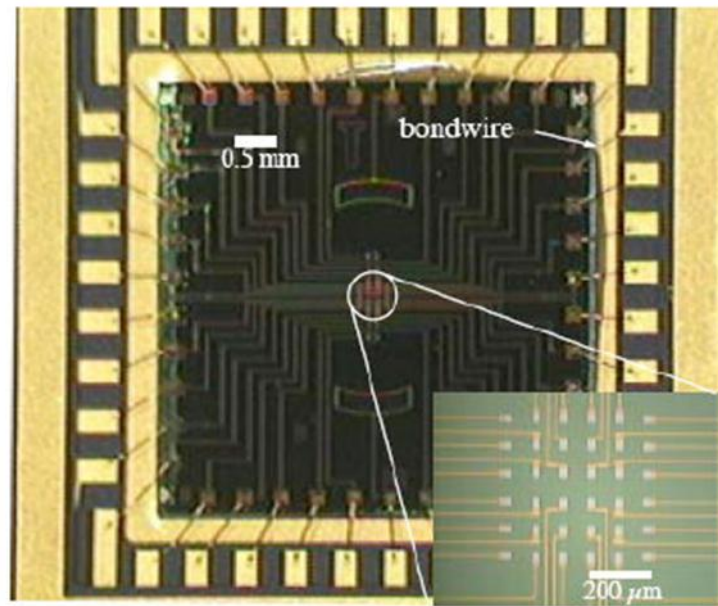


Figure I-18 : Structure matricielle avec des multi-électrodes de mesure d'impédance des cellules cultivées. Source: (Borkholder, 1999).

Un des problèmes dans cette configuration est dû au fait que le positionnement des cellules n'est pas maîtrisé. Toutes les électrodes ne sont pas systématiquement recouvertes ou sont partiellement recouvertes et donc il est souvent nécessaire d'utiliser un microscope pour contrôler la localisation des cellules.

I.7.3 Structure multi-électrodes

Huang et al (Huang, et al., 2003) ont développé un système de mesure d'impédance basé sur des multi-électrodes pour l'étude du comportement des cellules. Ils ont étudié deux géométries de structures différentes (Figure I-19) :

- a) Un réseau d'électrodes à disposition variable contenant des électrodes de charge et une électrode de référence de forme demi circulaire.
- b) Un réseau d'électrodes à disposition fixe contenant des électrodes de charge et une électrode de référence commune.

Cependant, cette conception a quelques inconvénients. Dans la structure A, les électrodes de détection sont de tailles différentes et disposées sur les 4 bords de la zone de culture, compte tenu de la taille moyenne d'une cellule de 30 μm ; la sensibilité de détection est faible.

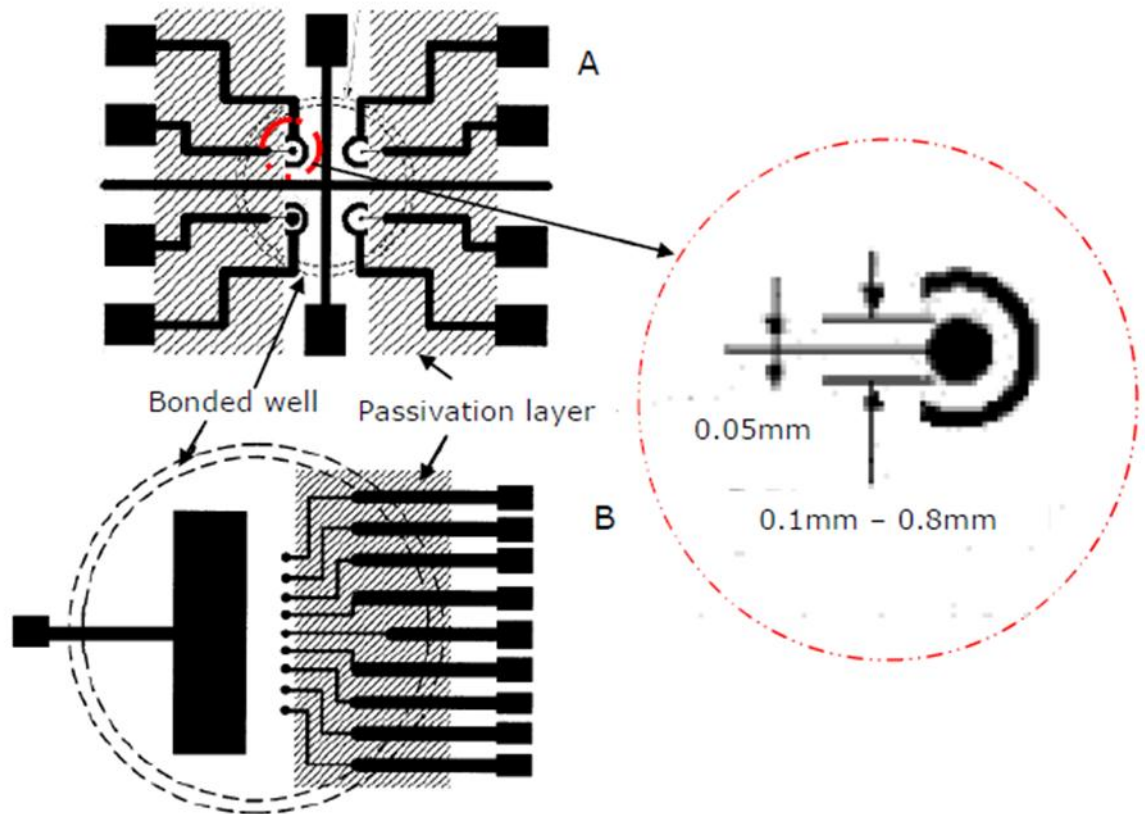


Figure I-19 : Biocapteur de réseau multi électrodes pour le suivi de culture de cellules. Source (Lo, et al., 1999).

I.7.4 Real-time Cell Electronic Sensing (RT-CES™)

(RT-CES™) fabriqué par l'ACEA Biosciences, est un dispositif de surveillance de culture cellulaire basé sur un réseau d'électrodes de capteur microélectronique cellulaire intégré dans des plaques de micro-titrage avec un format standard. RT-CES™ fonctionne en mesurant l'impédance électrique entre les capteurs pour détecter la présence, l'absence ou le changement dans l'état des cellules. Le système peut être programmé pour collecter des données plusieurs fois par minute. L'envoi de courant nominal à travers les capteurs se fait à intervalles réguliers. Les capteurs électroniques fournissent des informations sur les valeurs d'impédance,

qui sont ensuite converties en une mesure appelée Indice de Cellule, (CI : Impédance des cellules / Impédance du milieu sans cellule) (Matthew, 2006).

L'état cellulaire est surveillé en continu en utilisant (RT-CES™). Le résultat de cytotoxicité qui est accompagnée par des changements morphologiques, tels que la perte de l'intégrité du cytosquelette d'actine et l'arrondissement des cellules qui est finalement accompagnée par l'adhésion des cellules. Tous ces événements morphologiques conduisent à une perte de signal d'impédance au cours du temps. Le logiciel intégré est capable d'afficher toute l'histoire de l'expérience de l'ensemencement des cellules à la fin de la cytotoxicité. La géométrie RT-CES électrode™ est illustré à la Figure I-20. La sortie de la RT-CES™ système est représenté sur la Figure I-21.

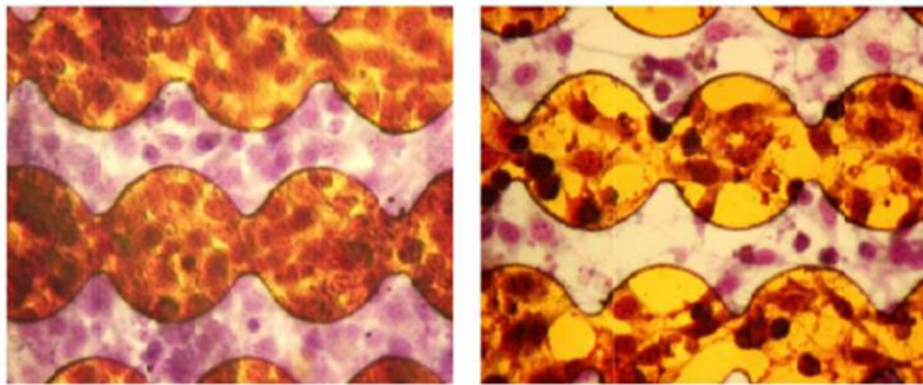


Figure I-20 : Géométrie de l'électrode de la RT-CES™. Source (Zhu & al., 2006).

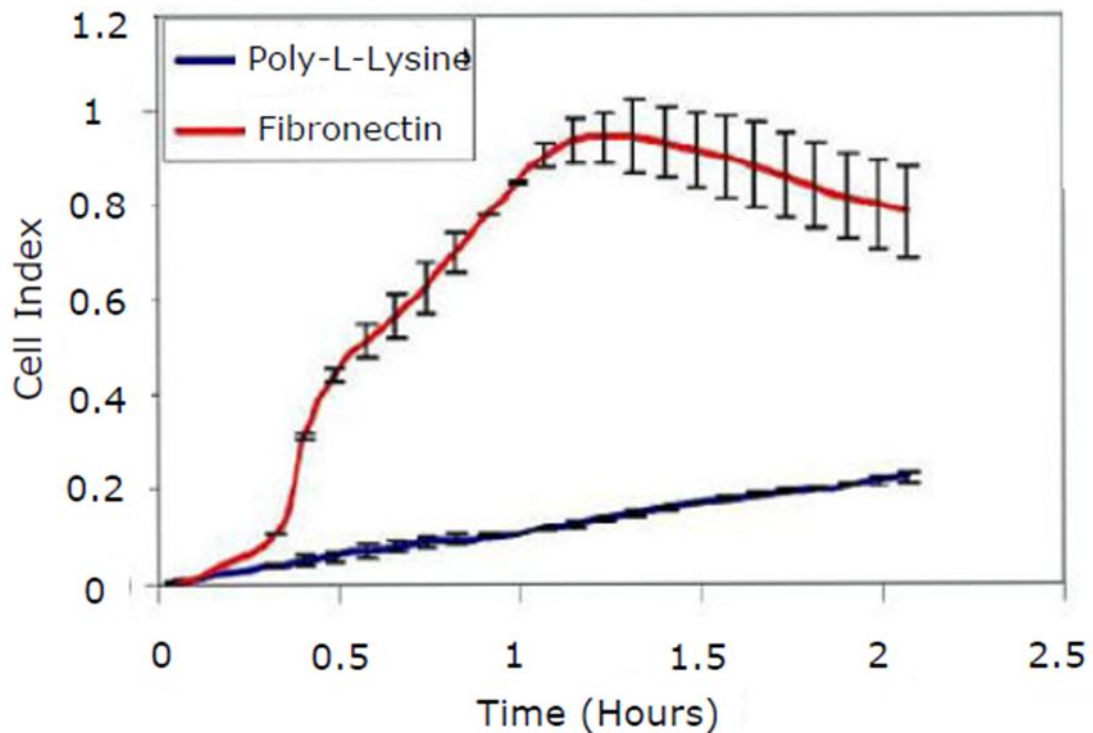


Figure I-21 : Sortie des courbes du système RT-CES™. Source (Barsoukov & Macdonald, 2005).

I.7.5 Structure à trois électrodes

Popovtzer et al. ont réalisé un dispositif comprenant huit systèmes de trois électrodes micrométriques disposées au fond de micro cuvettes (R.Popovtzer, et al., 2006) (Figure I-22). Quelques nano litres de solution biologique à analyser sont ensuite déposés dans ces micros cuvettes. Ces trois microélectrodes peuvent être utilisées dans la même configuration que des électrodes macroscopiques de travail, auxiliaire et référence permettant ainsi des mesures de voltamétrie. Popovtzer et al. ont ainsi mesuré des réactions d'oxydoréduction causées par un agent réducteur p-aminophenol apparaissant lors de l'attaque du phénol sur des bactéries d'E. Coli. Ces bactéries sont stabilisées dans de la gélose au sein des bioréacteurs.

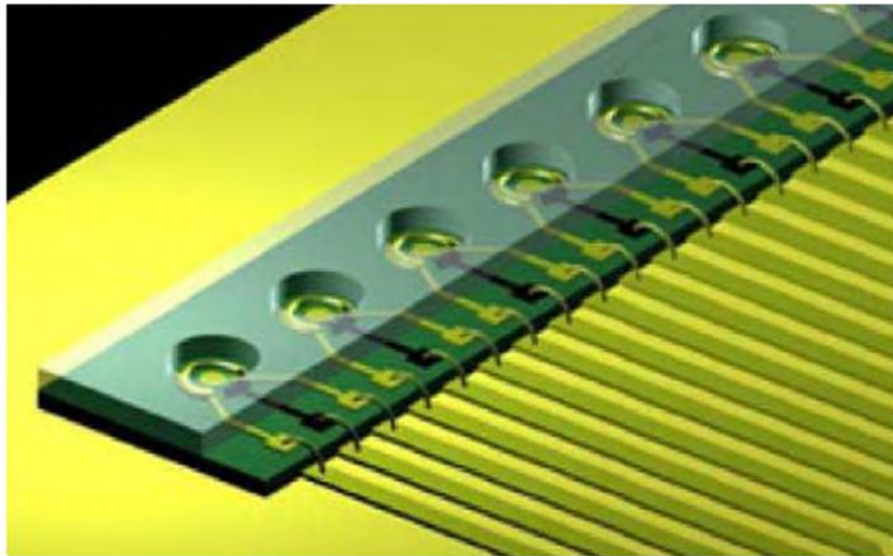


Figure I-22 : Schéma des cellules de mesure (800 μ m de rayon) réalisées par Popovtzer et al. (R.Popovtzer, et al., 2006) Ces cellules contiennent les trois électrodes d'ampèrométrie intégrées.

I.7.6 Structures interdigitées

Les capteurs à électrodes interdigitées ont été utilisés pour différentes applications biologiques. Nous en citons quelques-unes.

Ils ont été utilisés pour la détection des cellules bactériennes (Figure I-23) (Varshney & Li, 2009), la détection des bactéries rapides (Figure I-26) (Tang, et al., 2011), pour étudier l'écoulement d'un fluide (Da Silva, et al., 2007), la détection des cellules cancéreuses et leur caractérisation (Frank, et al., 2010), détecter la protéine C réactive (CRP) (Singh, et al., 2010), analyser les parasites de l'eau polluée comme la *Cryptosporidium Parvum* (Houssin, et al., 2010), étudier l'humidité de la peau et la détection de l'humidité d'environnement (Huang, et al., 2008), pour la surveillance en temps réel de la croissance des bactéries (Figure I-25) (Choi, et al., 2009). C'est cette structure que nous avons retenue pour ce travail. Dans cette thèse nous utilisons donc des capteurs interdigitaux afin de caractériser des échantillons biologiques du sang humain.

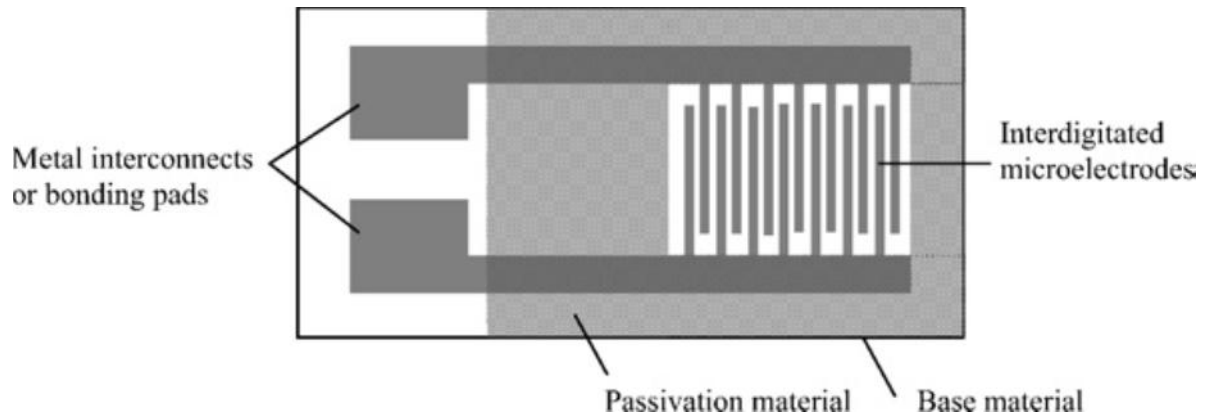


Figure I-23 : La conception schématique d'une puce coplanaire composée de réseau de microélectrodes interdigitées. Le raccordement des électrodes à l'analyseur d'impédance est effectué par des interconnexions métalliques. La zone autour des électrodes est isolante (la surface de mesure utile correspond à la zone blanche) (Varshney & Li, 2009).

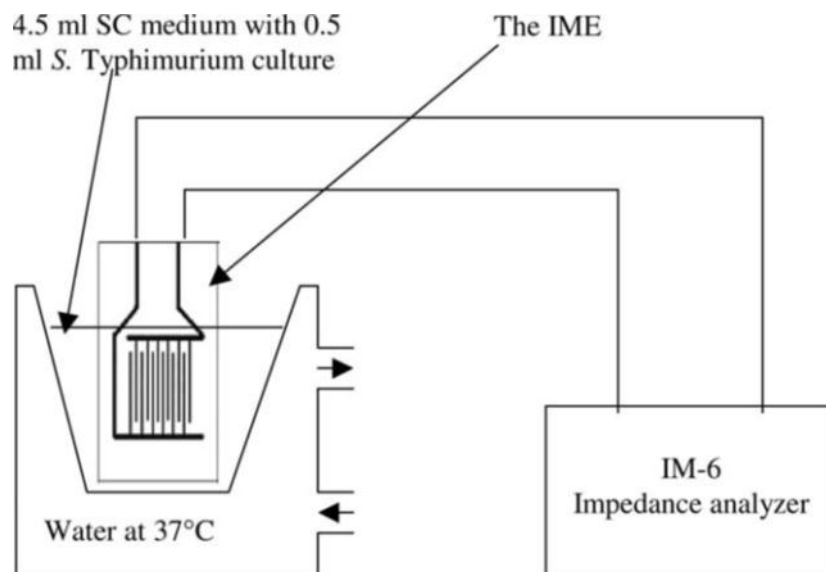


Figure I-24 : Dispositif expérimental de la mesure d'impédance avec des électrodes interdigitées (IME) pour la détection de Salmonella typhimurium en culture pure et dans des échantillons de lait (Yang, et al., 2004).

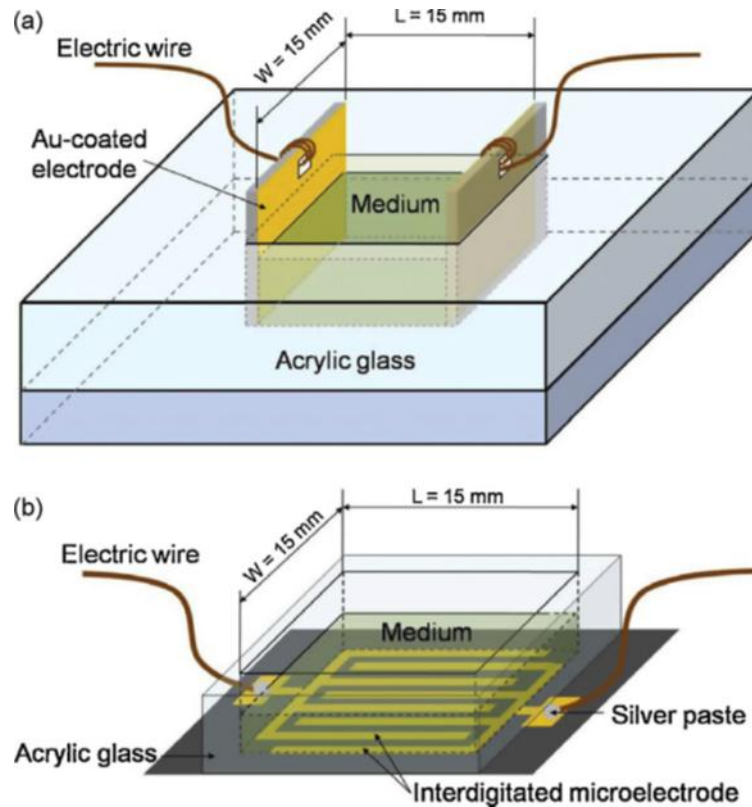


Figure I-25 : Présentation d'électrodes interdigitées dans un réservoir. Ce réservoir apparaît comme un carré de 15mm de côté. Les microélectrodes interdigitées (IME) ont été placées au fond (Choi, et al., 2009).

L'utilisation des capteurs interdigitaux rend le processus de mesure rapide et approprié pour les opérations en continu (Choi, et al., 2009). Un avantage supplémentaire est qu'il est également non-destructif et non-intrusif ; les échantillons testés ne sont pas détruits.

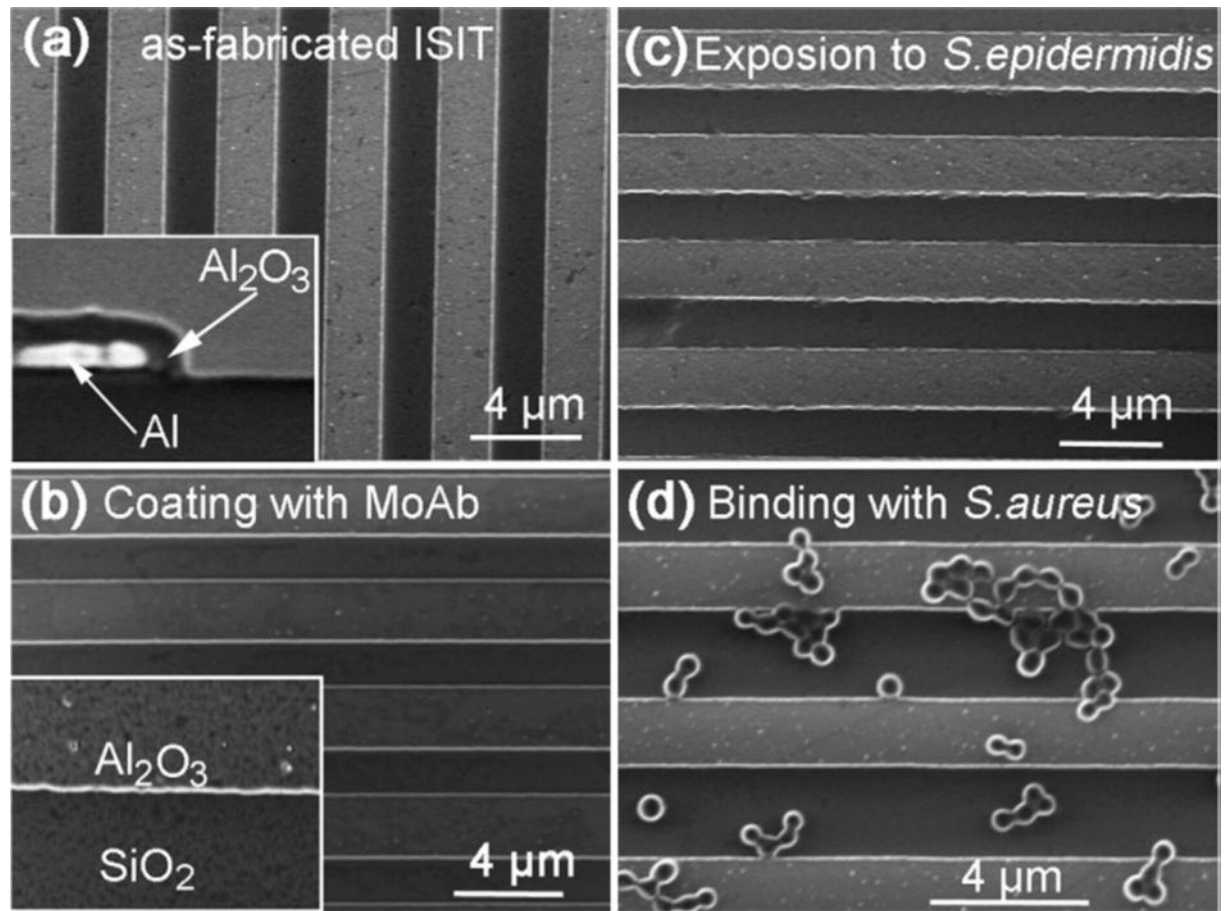


Figure I-26 : Morphologie de surface de capteur à électrodes interdigitées (Tang, et al., 2011).

I.7.6.1 Principe de fonctionnement de capteurs interdigitaux

Le principe de fonctionnement d'un capteur interdigité est le même que celui d'un condensateur à plaques parallèles (Mamishev, et al., 2004) (Sundara-Rajan, et al., 2003). La relation entre le capteur et le condensateur est donnée dans la Figure I-27. Un champ électrique, créé entre l'électrode positive et négative (polarité instantanée), est présenté dans la Figure I-27. Quand un matériau est placé sur le capteur, le champ électrique passe à travers le matériau en cours de test ; la Figure I-27 (c). Les propriétés diélectriques du matériau ainsi que la géométrie de l'objet à mesurer affectent la capacité et la conductance entre les deux électrodes. La modification du champ électrique peut être utilisée pour déterminer les propriétés du matériau en fonction de l'application.

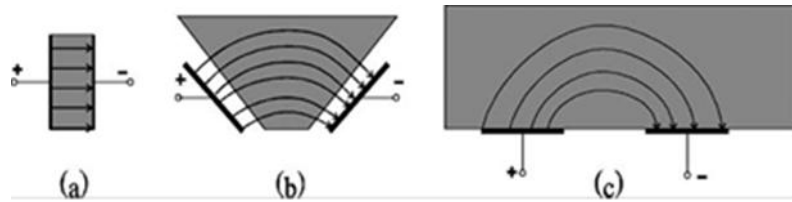


Figure I-27 : Principe de fonctionnement d'un capteur interdigité (Mamishhev, et al., 2004).

Le capteur interdigité est conçu par un ensemble d'électrodes positives et négatives disposées en forme de peignes entrelacés. La Figure I-28 montre un exemple de capteur alimenté par une source de tension alternative. Un champ électrique est formé entre les électrodes reliées à la source et ceux connectées à la masse. Les électrodes du capteur interdigité sont coplanaires. De ce fait, la capacité mesurée a un très faible rapport signal sur bruit. Selon l'exigence, le motif d'électrodes peut être répété plusieurs fois pour obtenir un signal important.

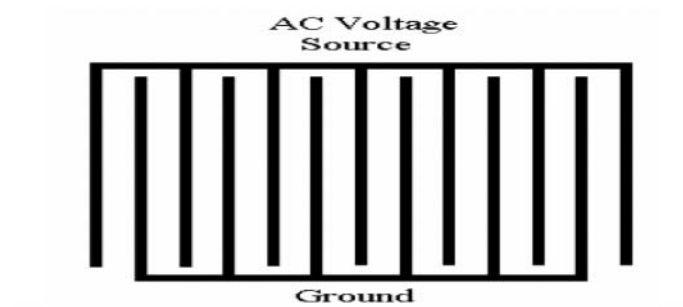


Figure I-28 : Structure du capteur interdigité (Mamishhev, et al., 2004).

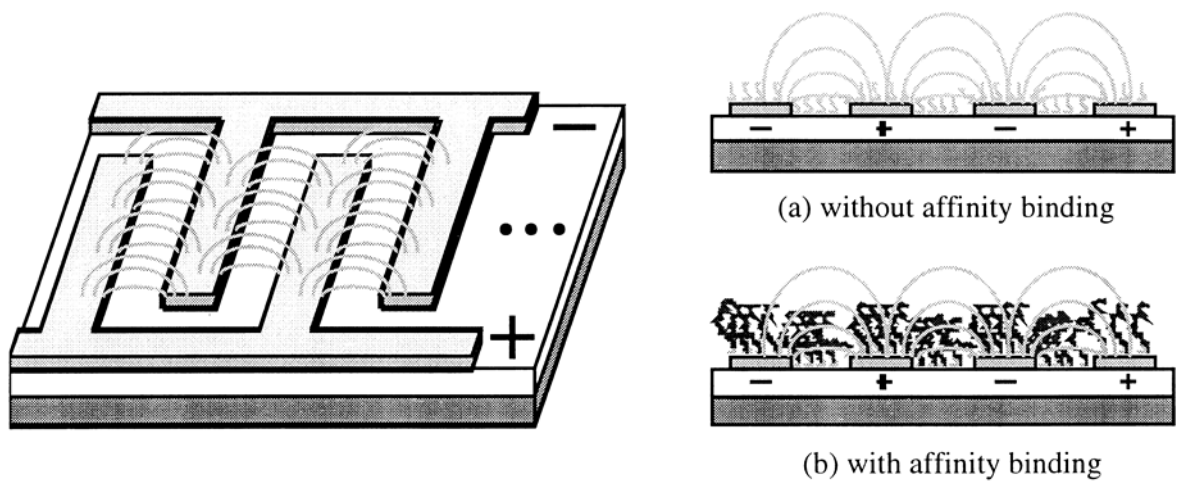


Figure I-29 : Principe d'un biocapteur à électrodes interdigitées pour la détection d'ADN (Laureyn, et al., 2000).

Les lignes de champ électrique entre les électrodes peuvent avoir des longueurs différentes. Dans la Figure I-30, l_1 correspond à la distance de séparation minimale entre les électrodes et l_3 correspond à la distance de séparation maximale. En fonction de l'exigence dans la mesure souhaitée, le champ électrique peut être obtenu en faisant varier la longueur entre les électrodes modifiant ainsi la force du signal. Ce contrôle peut être obtenu en contrôlant le motif d'électrode.

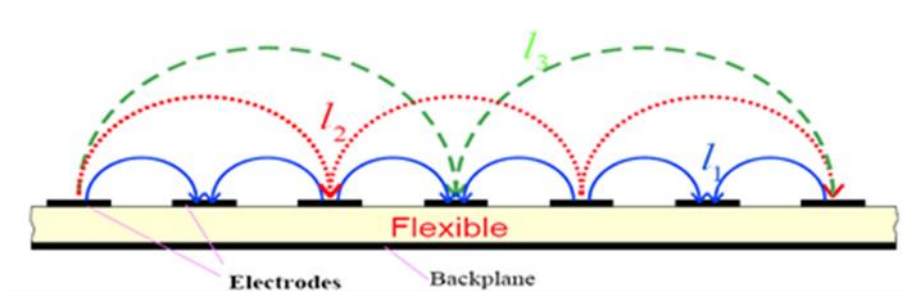


Figure I-30 : Allure des lignes de Champ électrique formé entre deux électrodes (Mamishhev, et al., 2004).

La longueur entre les deux électrodes adjacentes de même type est appelée longueur d'onde spatiale (λ) et généralement la profondeur de pénétration correspond à un tiers de la longueur d'onde spatiale (Mamishhev, et al., 2004). La profondeur de pénétration augmente avec l'augmentation de la longueur d'onde spatiale.

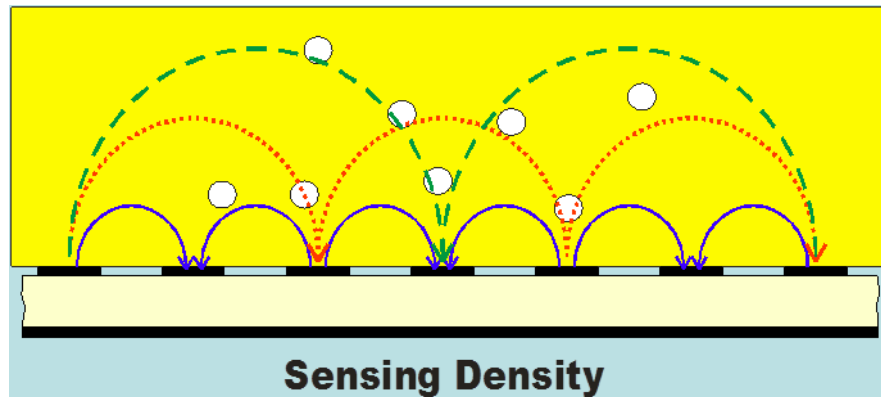


Figure I-31 : Détection de la densité du matériau (Sundara-Rajan, et al., 2008).

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

L'accès à l'échantillon à caractériser par un seul côté, conséquence de la géométrie coplanaire des électrodes. Ce qui permet de réaliser une mesure de manière moins contraignante qu'avec une géométrie parallèles de type condensateur plan par exemple (car l'autre côté du milieu peut être laissé libre).

La flexibilité d'usage : en effet l'ajustement des paramètres (nombre de digits, longueur et largeur des digits, écarts inter digits) offre la possibilité de répondre à des applications spécifiques. Par exemple, on pourra choisir de travailler avec des distances inter-électrodes faibles pour caractériser de fines structures, car la profondeur de pénétration des lignes de champs électriques est directement liée à cette distance. Technologiquement ce gap peut être réduit à des distances très faibles (Laureyn, et al., 2000). Si l'on souhaite dans le même temps limiter les impédances d'interfaces métal-milieu, on pourra choisir d'augmenter la surface globale des électrodes en jouant sur le nombre de digits. L'amplitude du signal récupéré (donc le rapport signal sur bruit) peut également être réglée par l'ajustement de ces paramètres.

I.8 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les concepts de base permettant de comprendre les propriétés électriques des milieux biologiques.

Nous avons ainsi rappelé la notion de bioimpédance électrique et présenté les modèles permettant de décrire le comportement électrique des tissus vivants. Ces modèles macroscopiques (Fricke et Cole & Cole) ont souvent été utilisés pour répondre à ce type d'analyse. La compréhension de différentes difficultés de mesure, liées aux paramètres d'influence, ont été abordées dans ce chapitre comme une condition préalable à une étude visant à la caractérisation des milieux biologiques. Un état de l'art sur les techniques majeures de spectroscopie d'impédance existantes a été présenté. Les raisons qui nous ont motivées à choisir une cellule à électrodes interdigitées ont été aussi justifiées (flexibilité d'usage, accès à l'échantillon, facilité de mise en œuvre...). Le prochain chapitre traite de l'optimisation par simulation numérique et analytique de ces électrodes interdigitées.

II. Capteurs à électrodes interdigitées : optimisation théorique et validation

A l'issue de l'étude bibliographique, nous avons sélectionné un capteur de type capacitif à électrodes interdigitées pour la caractérisation des milieux biologiques. Ce deuxième chapitre traite de l'optimisation de la structure géométrique de ce capteur.

Nous présentons, dans un premier temps, les optimisations majeures faites sur les capteurs à microélectrodes. L'optimisation théorique des paramètres géométriques est effectuée en développant les équations d'impédance. Notre objectif est d'obtenir le rapport optimal entre la largeur des électrodes et l'écart inter-électrodes afin d'élargir la bande de fréquence utile.

Dans un deuxième temps, une modélisation tridimensionnelle a été réalisée sous le logiciel ConventorWare. La simulation du système d'électrodes chargé par un modèle de milieu biologique et la validation de cette théorie est présentée.

Nous avons, dans la dernière partie de ce chapitre, étudié l'influence des propriétés électriques du milieu sur l'impédance électrique mesurée.

II.1 Optimisation des capteurs microélectrodes

Un des inconvénients des capteurs à microélectrodes est leur impédance électrique beaucoup plus élevée par comparaison aux capteurs à macro électrodes en raison de la capacité d'interface. Comme rappelé au chapitre précédent, cette capacité d'interface, ou capacité de double couche résulte de l'interaction entre les ions et les molécules à l'interface de la surface de l'électrolyte et l'électrode qui ont été mis en place. Cette capacité est inversement proportionnelle à la surface d'électrode (Franks, et al., 2005). Cette capacité de double couche induit une contrainte sur les mesures et augmente l'erreur de mesure dans les basses fréquences (en dessous de 10 kHz).

Un capteur géométriquement optimisé pour les mesures de bioimpédance peut induire une augmentation de la plage de mesure et une diminution des erreurs. (Pejcic & Marco, 2006) 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 de bioimpédance. Des expériences ont été réalisées afin d'optimiser les conceptions d'électrodes pour diverses applications.

(Fosdick & Anderson, 1986) ont travaillé sur l'optimisation de la géométrie d'une matrice de microélectrodes d'un détecteur de flux concernant la réponse ampérométrique.

(Min & Baeumner, 2004) ont étudié les paramètres géométriques (hauteur des électrodes, matériau, largeur des électrodes et l'espacement) des microélectrodes interdigitées pour optimiser les réactions d'oxydation et de réduction de ferro / ferricyanure de potassium. (Sandison, et al., 2002) ont étudié la géométrie d'une matrice d'électrodes d'un capteur (distance entre les centres des électrodes, le diamètre).

(Lempka, et al., 2006) ont optimisé un capteur à microélectrodes pour les enregistrements d'activité de neurones.

(Wang, et al., 2008) ont étudié la sensibilité des micro-capteurs interdigités en fonction des paramètres géométriques pour la culture des cellules.

(Frank, et al., 2010) ont travaillé sur l'optimisation d'électrodes interdigitées basées sur l'impédance électrique pour l'étude des cellules cancéreuses Hs578T dans le but de l'augmentation de la sensibilité de détection.

Toutes ces optimisations des microélectrodes étaient effectuées pour des applications spécifiques. Les études d'optimisation des interdigitées mentionnées ci-dessus ont été fait en se basant sur des changements arbitraires des paramètres géométriques et avec une surface non constante de contact électrodes/échantillon. Le volume d'échantillon en contact avec les électrodes n'était pas similaire dans chaque essai, et par conséquent les optimisations inadaptées.

II.2 Optimisation analytique du capteur

II.2.1 Modèle du circuit électrique équivalent

Nous présentons dans ce paragraphe un modèle analytique précédemment utilisé par (Linderholm, et al., 2004), (Timmer, et al., 2002) et par (Hong, et al., 2005). Les éléments électriques présentés dans ce circuit équivalent modélisent d'une manière électrique les phénomènes physiques présentés lorsque l'électrolyte est soumis à un champ électrique crée par les électrodes.

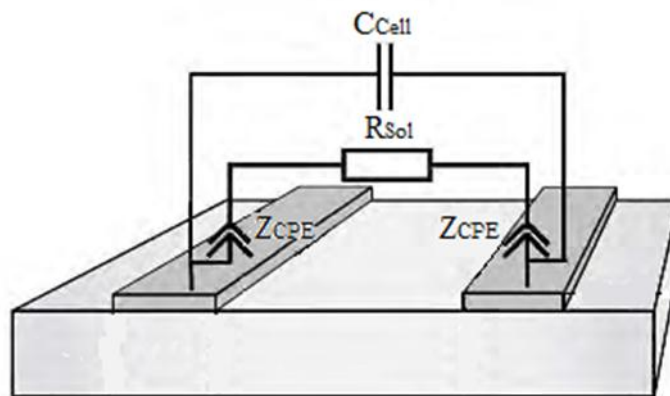


Figure II-1 : Schéma du modèle de circuit électrique équivalent utilisé, (Linderholm, et al., 2004).

Ce circuit consiste en une capacité C_{Cell} modélisant les propriétés diélectriques de l'échantillon biologique en parallèle d'une résistance R_{Sol} décrivant les propriétés de conduction électrique de l'échantillon. Cette résistance est en série avec un élément à phase constante CPE présentant une impédance Z_{CPE} pour modéliser le phénomène de double couche électrique aux interfaces électrodes/électrolyte.

R_{Sol} et C_{Cell} sont placées en parallèle car les courants se propagent à la fois sous la forme de courants de conduction et de déplacement.

II.2.1.1 Capacité d'interface

L'impédance de l'élément à phase constante représente la mesure de l'impédance non faradique résultante de capacité d'interface, ou de polarisation. Elle est donnée par la relation empirique suivante (McAdams, et al., 1995) :

$Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega Q)^n}$	Équation II-1
-------------------------------------	---------------

Où Q est en $S.s^n$ (siemens×secondⁿ) et n un réel entre 0 et 1.

Lorsque $n = 1$, Z_{CPE} représente un élément d'impédance purement capacitif correspondant à une capacité d'interface nommée éventuellement C_{DL} .

Une résistance peut être aussi considérée comme un cas particulier de CPE pour lequel $n=0$. Pour $0 < n < 1$, l'impédance d'un CPE présente donc simultanément un comportement résistif et réactif.

Le cas $n=1$ a été largement utilisé par plusieurs chercheurs (Hong, et al., 2005) (Yang, et al., 2004) (Laureyn, et al., 2001) (Yang & Bashir, 2008) (Laureyn, et al., 2000) pour expliquer leurs données expérimentales de mesure d'impédance.

Ce modèle simplifié peut être utile pour développer les équations d'impédance et pour faciliter la modélisation physique du système (capteur + milieu) ainsi que la simulation.

Notons que l'impédance de Warburg due à la diffusion des réactifs chimiques en solution n'est pas incluse dans ce modèle parce que c'est un cas particulier de l'élément à phase constante pour lequel $n=1/2$ (Houssin, 2011).

Une estimation théorique de la capacité d'interface est donnée par le modèle de Gouy-Chapman-Stern (GCS) (Bard & Faulkner, 2001). La capacité d'interface est prise égale à la combinaison en série de la capacité de double couche, dite capacité de Helmholtz C_H , et la capacité de couche diffusée, la capacité de Gouy-Chapman C_G , et est donnée par la formule suivante:

$\frac{1}{C_I} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G} = \frac{d_{OHP}}{\epsilon_0 \epsilon_r} + \frac{L_D}{\epsilon_0 \epsilon_r \cosh\left(\frac{z\phi_0}{2U_t}\right)}$	Équation II-2
--	----------------------

Où d_{OHP} est l'épaisseur de la double couche, ϵ_0 est la permittivité à vide, ϵ_r est la permittivité de la zone de double couche, Z est la charge des ions en solution, ϕ_0 est le potentiel d'électrode appliqué, et U_t c'est la tension thermique. La longueur de Debye L_D , est donnée par :

$L_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r U_t}{2n^0 z^2 q}}$	Équation II-3
---	----------------------

où n^0 est la concentration des ions en solution et q est la charge élémentaire. Le tableau I résume les valeurs des constantes et des variables utilisées ici.

Paramètre	Valeur
d_{OHP}	5 Å
ϵ_0	8.85. (10) ¹² F/m
ϵ_r	78
z	4
U_t	0.0259 V
n^0	9.3. (10) ²⁵ ions/m ³
q	1.602. (10) ⁻¹⁹ C

Table II-1 : Données utilisées pour l'estimation de la valeur théorique de C (Kovacs, 1994) (Bard & Faulkner, 2001) (Borkholder, 1999).

Nous pouvons dorénavant estimer l'épaisseur de la double couche C_{DL} par la somme de $d_{ohp} + L_D = 50$ Å. Comme mentionné ci-dessus, nous avons remplacé le composant d'élément à phase constante CPE par une simple capacité électrique nommée C_{DL} , pour faciliter la modélisation physique du système (capteur + milieu) ainsi que la simulation. La Figure II-2 (a) montre la configuration d'une structure

coplanaire d'un capteur à électrodes interdigitées lorsqu'elle est utilisée comme une cellule de mesure d'impédance bioélectrique. Quand une telle cellule est immergée dans un milieu électrolyte, le circuit électrique équivalent adopté est représenté comme dans la Figure II-2 (b). Les composants électriques présents dans ce circuit représentent les différents comportements fréquentiels observés dans le spectre de l'impédance bioélectrique totale Z qui est en principe mesurée par la cellule de mesure (voir Figure II-2 (a)).

Les éléments du modèle équivalent peuvent être exprimés en termes de quantités physiques et électriques.

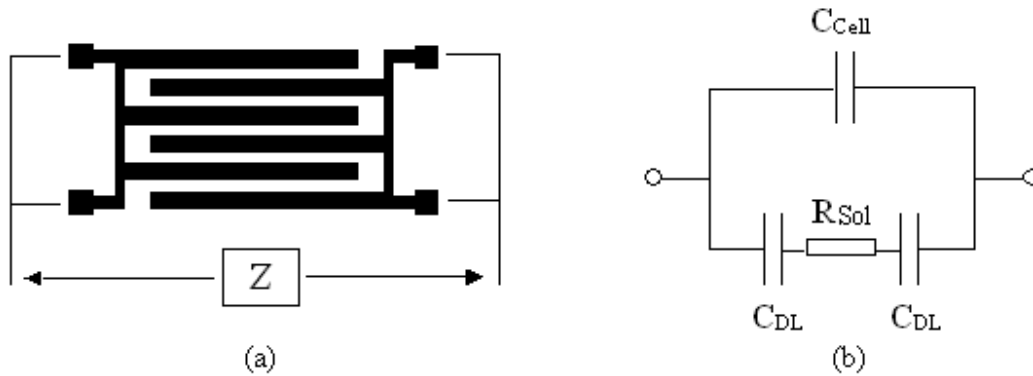


Figure II-2 : (a) Configuration d'électrodes interdigitées comme capteur de bioimpédance (b) le modèle simplifié du circuit équivalent. C_{Cell} et R_{Sol} modélisent les propriétés diélectriques du milieu sous test, et C_{DL} modélisent les propriétés des phénomènes d'interfaces de double couche (Double Layer).

R_{Sol} présentée dans le circuit modélise les propriétés conductrices du milieu sous l'effet d'un champ électrique. C'est la résistance de la solution électrolyte et est nommée aussi le module de l'impédance. Ce composant est l'élément sensible de la mesure. Il est en relation avec la conductivité σ_{Sol} du milieu électrolyte par la constante de cellule K_{Cell} (Olthuis, et al., 1995):

$R_{Sol} = \frac{K_{Cell}}{\sigma_{Sol}}$	Équation II-4
---	----------------------

$K_{Cell} = \frac{2}{(N-1)} \cdot \frac{K(k)}{K(\sqrt{1-k^2})}$	Équation II-5
Où $K(k) = \int_0^1 \frac{1}{\sqrt{(1-t^2) \cdot (1-k^2 t^2)}} dt$ et $k = \cos\left(\frac{\pi}{2} \cdot \frac{W}{S+W}\right)$	

Où N est le nombre d'électrodes, S est l'espacement entre deux électrodes consécutives, W est la largeur d'une électrode et L est la longueur d'une électrode.

Dans la Figure II-3 nous présentons la structure d'un capteur à quatre électrodes interdigitées composé de deux électrodes coplanaires parallèles dont la conception (largeur W, espacement entre électrodes S, longueur L) est répétée périodiquement (Igreja & Dias, 2004).

La fonction K(k) est l'intégrale incomplète elliptique au premier degré. Nous remarquons, suivant (Olthuis, et al., 1995), la constante de cellule K_{Cell} dépend entièrement de la géométrie du capteur.

Le couplage capacitif direct entre les deux électrodes est représenté par une capacité C_{Cell} qui à son tour modélise la partie diélectrique du milieu sous test. Cette capacité est reliée à la permittivité diélectrique par:

$C_{Cell} = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_{r,Sol}}{K_{Cell}}$	Équation II-6
$\epsilon_{r,sol} = \epsilon_{r,water} = 80$	

Les impédances décrivant les phénomènes d'interface qui se produisent aux interfaces électrodes-électrolyte sont simplifiées par la capacité de double couche C_{DL} . Ces impédances sont dépendantes du type de matériau constituant les électrodes et de la solution électrolyte l (Grimnes & Martinsen, 2000) (Grimnes & Martinsen, 2008).

On peut estimer que pour des électrodes à surface coplanaire horizontale la capacité de double couche peut être estimée par:

$C_{DL} = 0.5 \cdot A \cdot C_{DL, Surface} = 0.5 \cdot W \cdot L \cdot N \cdot C_{DL, Surface}$	Équation II-7
--	----------------------

Nous désignons par A la surface totale des électrodes. Dans le cas des électrodes interdigitées cette surface est égale à la longueur d'électrode multipliée par leur largeur multipliée par le nombre d'électrodes. Notons que le facteur de 0.5 correspond à une seule capacité C_{DL} qui est déterminée par la moitié des deux capacités d'interfaces provenant des phénomènes d'interfaces qui se produisent à la surface totale des électrodes, A . le terme $C_{DL, Surface}$ représente la capacité caractéristique de double couche par unité de surface.

La capacité caractéristique de double couche $C_{DL, Surface}$ est supposée égale à la capacité de double couche caractéristique de Stern (Bard & Faulkner, 2001) pour des milieux électrolytes ayant une très haute concentration ionique. Cette capacité de double couche caractéristique de Stern est dénommée $C_{Stern, Surface}$ et elle est de l'ordre de 10-20 $\mu F/cm^2$ (Bard & Faulkner, 1980).

Nous pouvons estimer la valeur de $C_{DL, Surface}$ selon les équations (Équation II-2, Équation II-3). Nous obtiendrons 15 $\mu F/cm^2$.

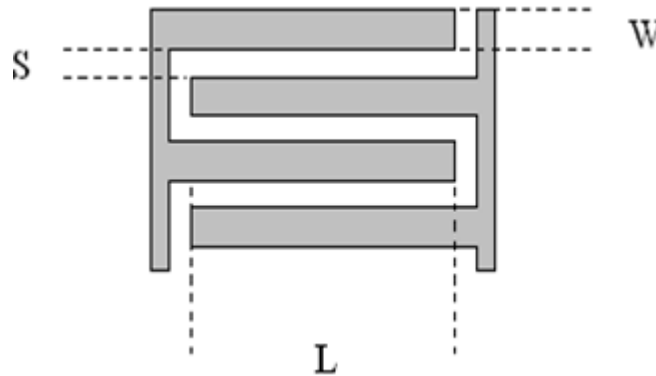


Figure II-3 : Structure d'un capteur à 4 électrodes interdigitées et ces paramètres géométriques tels que la longueur L , largeur d'une électrode W et l'espacement entre deux électrodes consécutives S .

II.2.2 Optimisation de la géométrie des électrodes

En se basant sur le circuit électrique équivalent présenté dans la Figure II-2 (b), l'impédance totale observée peut être exprimée comme suit:

$Z(j\omega) = \frac{Z_1}{j \cdot \omega \cdot C_{Cell} \cdot Z_1 + 1}$	Équation II-8
--	----------------------

$$Z_1 = R_{Sol} + \frac{2}{j \cdot \omega \cdot C_{DL}}$$

Selon la Figure II-4 nous montrons une représentation de l'impédance totale simulée comme la réponse du modèle de circuit électrique équivalent (Figure II-2 (b)). Sur cette figure nous pouvons remarquer trois zones différentes dans le spectre d'impédance. Ces trois zones correspondent à la contribution majoritaire des trois types d'éléments existant dans le circuit électrique équivalent. Ainsi, le comportement fréquentiel dans chacune de ces zones peut être analysé en se référant au circuit équivalent mentionné ci-dessus.

Comme le montre la Figure II-2 (b), le circuit comporte deux branches comportant chacune une capacité électrique. Les deux capacités sont en parallèle (C_{Cell} et C_{DL}). Lorsque la fréquence n'est pas très élevée comparée à F_{High} qui est la fréquence de coupure haute, le courant ne peut pas traverser le milieu d'un condensateur diélectrique, voir C_{Cell} car $C_{Cell} \ll C_{DL}$. Donc, cette capacité est inactive, et elle agit comme un circuit ouvert. Ainsi, l'impédance totale ne dépend que de la capacité de double couche C_{DL} et de la résistance R_{Sol} de la solution, qui sont en série.

Bien que les deux éléments C_{DL} et R_{Sol} interviennent dans l'impédance totale pour des fréquences inférieure à F_{High} , chacune d'entre elles domine dans une gamme de fréquences différente.

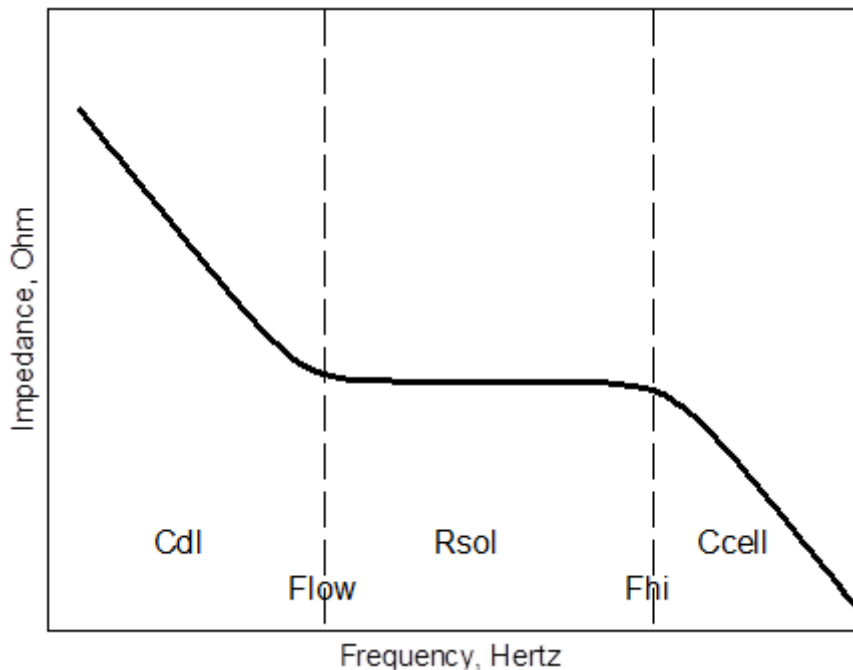


Figure II-4 : Allure type de la variation fréquentielle de l'impédance totale. On distingue trois régions: Pour les basses fréquences (avant F_{Low}), l'impédance totale dépend uniquement de la capacité de double couche C_{DL} . Dans la gamme intermédiaire l'impédance forme un plateau et ne dépend que de la résistance du milieu R_{Sol} . Pour les hautes fréquences (après F_{High}), l'impédance dépend de la capacité C_{Cell} de la cellule.

La capacité de double couche C_{DL} présente un phénomène essentiellement capacitif à des fréquences inférieures à F_{Low} qui est la fréquence de coupure basse. Ainsi l'impédance Z_{DL} issue de la double couche est beaucoup plus élevée que la résistance R_{Sol} , et contribue principalement à la valeur totale d'impédance Z :

$Z \approx \frac{2 + j \cdot \omega \cdot C_{DL} \cdot R_{Sol}}{j \cdot \omega \cdot C_{DL}}$	Équation II-9
$F_{Low} \approx \frac{1}{\pi \cdot R_{Sol} \cdot C_{DL}}$	Équation II-10

L'impédance diminue avec l'augmentation de la fréquence jusqu'à F_{Low} . Cependant, au-dessus de la fréquence de coupure F_{Low} , la capacité de double couche n'intervient pas dans l'impédance totale. Ceci s'explique par le fait que seule la résistance R_{Sol} (ou module de l'impédance totale) contribue à l'impédance en dessous de F_{High} dont C_{Cell} n'est pas encore indicatif. Dans cette gamme de

fréquence l'impédance totale est indépendante de la fréquence. Cette bande de fréquence est limitée par F_{Low} et F_{High} .

Dans cette gamme, les résultats significatifs pour la mesure réelle sur des échantillons biologiques (par exemple la conductivité qui peut être calculée d'après la valeur de R_{Sol}), sont déduits de l'impédance observée en s'appuyant sur l'impédance totale :

$Z(j\omega) = R_{Sol}$	Équation II-11
------------------------	-----------------------

Nous retrouvons que R_{Sol} est l'élément sensible de la mesure d'impédance. Nous pouvons donc conclure qu'afin d'augmenter la sensibilité de mesure fréquentielle, nous devons élargir la gamme de fréquence dans le spectre d'impédance dans lequel le module R_{Sol} est dominant.

En élargissant la bande de fréquences (que nous appellerons dorénavant bande de fréquences utile), les phénomènes d'interfaces représentés par la capacité de double couche peuvent être éliminés. Ceci peut se produire en décalant la fréquence de coupure basse F_{Low} , le plus possible vers les fréquences basses (vers zéro).

C'est ainsi que nous présentons l'idée d'optimisation de la cellule de mesure d'impédance qui consiste à rendre plus large le plateau de l'impédance prenant la valeur du module R_{Sol} et délimité par les deux fréquences de coupures basse et haute respectivement de la Figure II-4.

Ensuite, lorsque la fréquence devient plus élevée que F_{High} , le courant passe dans le milieu du condensateur diélectrique au lieu de traverser la résistance de la solution d'électrolyte.

L'impédance C_{Cell} devient tellement faible qu'elle court-circuite la résistance R_{Sol} et la capacité de double couche. L'impédance globale du système est alors dominée par C_{Cell} . La branche ($C_{DL} + R_{Sol} + C_{DL}$) est donc inactive, et la branche (C_{Cell}) est active. Cependant, la valeur d'impédance totale est inversement proportionnelle à la fréquence :

$Z \approx \frac{R_{Sol}}{j \cdot \omega \cdot C_{Cell} \cdot R_{Sol} + 1}$	Équation II-12
---	-----------------------

$F_{High} \approx \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot R_{Sol} \cdot C_{Cell}}$	Équation II-13
---	-----------------------

Nous allons décrire les fréquences de coupures basses et hautes en fonction des propriétés électriques du milieu (conductivité et permittivité).

En remplaçant R_{Sol} d'après l'Équation II-4, C_{DL} d'après l'Équation II-7 et C_{Cell} d'après l'Équation II-6, les équations des fréquences de coupures (Équation II-10, Équation II-13) deviennent respectivement:

$F_{Low} \approx \frac{\sigma_{Sol}}{0,5 \cdot \pi \cdot W \cdot L \cdot N \cdot C_{DL, Surface} \cdot K_{Cell}}$	Équation II-14
---	-----------------------

$F_{High} \approx \frac{\sigma_{Sol}}{2 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_{r, Sol}}$	Équation II-15
--	-----------------------

Nous remarquons que la fréquence de coupure haute F_{High} ne dépend pas de la géométrie mais seulement des propriétés électriques du milieu sous test. Nous remarquons encore que F_{Low} dépend de la conductivité du milieu, de la capacité caractéristique des phénomènes d'interfaces et aussi de la géométrie du capteur d'impédance. Cette dépendance de la géométrie se manifeste par le facteur de cellule (ou facteur de forme) et les paramètres géométriques constituant la structure du capteur.

Nous remarquons que l'élargissement de la bande de fréquence utile ne peut être réalisable que par la diminution de la valeur de F_{Low} .

La conductivité σ_{Sol} et la capacité de double couche $C_{DL, Surface}$ sont des propriétés du milieu sous test. Par conséquent, pour rendre la fréquence de coupure basse plus petite, le terme géométrique suivant doit être augmenté.

$W \cdot L \cdot N \cdot K_{Cell}(N, L, S, W)$	Équation II-16
--	-----------------------

Pour augmenter ce terme, il faut augmenter K_{Cell} , W , L et N . Nous avons évoqué précédemment que le facteur de cellule dépend entièrement de la géométrie du capteur ainsi que de W , L et N .

Pour cela nous recherchons la nature de cette dépendance et en analysons la variation de facteur de cellule en fonction de W , N et L .

Nous avons mentionné dans l'introduction qu'une optimisation efficace de la structure d'une cellule de mesure d'impédance ne peut être réalisée qu'en optimisant la géométrie de la cellule ayant une surface de contact bien déterminée entre les électrodes et le milieu sous test.

L'étude des paramètres géométriques du capteur doit être réalisée à surface de contact constante. De ce fait, la valeur de la longueur L peut être choisie en fonction du milieu d'intérêt et ne constitue pas un paramètre influant sur l'optimisation. Dans ces conditions nous allons étudier uniquement l'influence de la largeur W et du nombre d'électrodes N sur le facteur de cellule K_{Cell} .

Les deux figures suivantes (Figure II-5, Figure II-6) mettent en évidence la variation du facteur de cellule (appelé aussi constante de cellule) en fonction de la largeur d'électrodes et en fonction du nombre d'électrodes respectivement.

Dans les deux cas, le facteur de cellule est inversement proportionnel à ces deux paramètres ; l'augmentation de W ou de N conduit à la diminution de K_{Cell} . Alors qu'il est impossible d'augmenter le terme géométrique de l'Équation II-16. Cette conclusion est correcte si nous n'adoptons pas une structure d'électrodes coplanaires formant une surface de forme carrée.

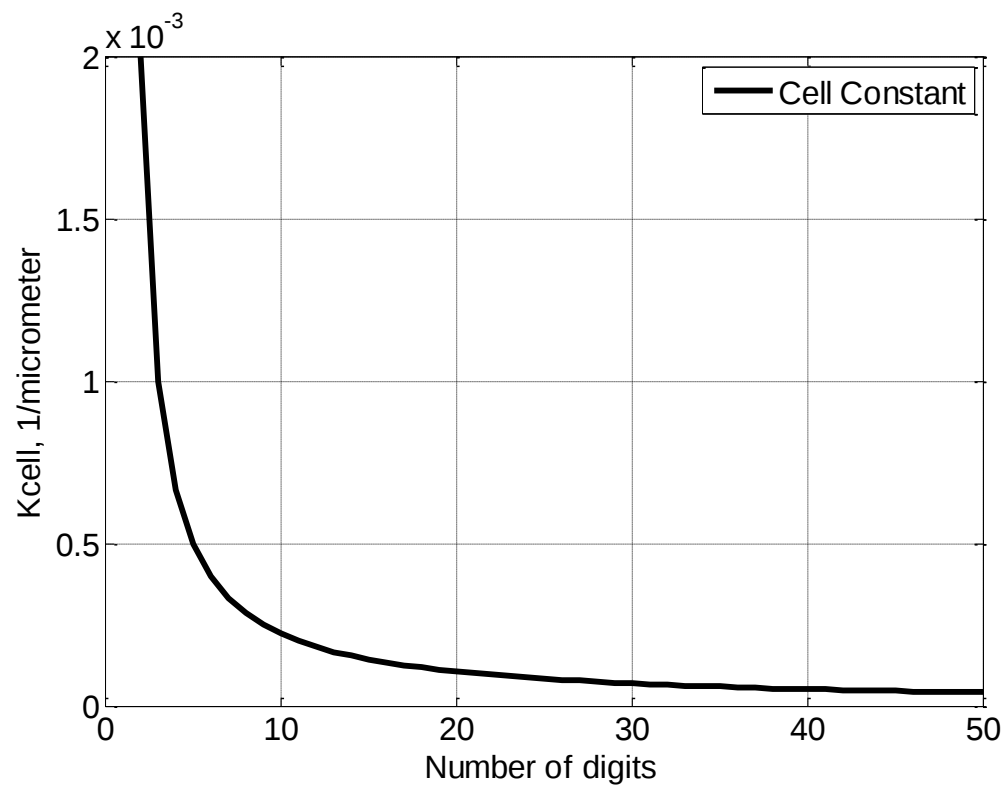


Figure II-5 : Constante de cellule en fonction du nombre d'électrodes.

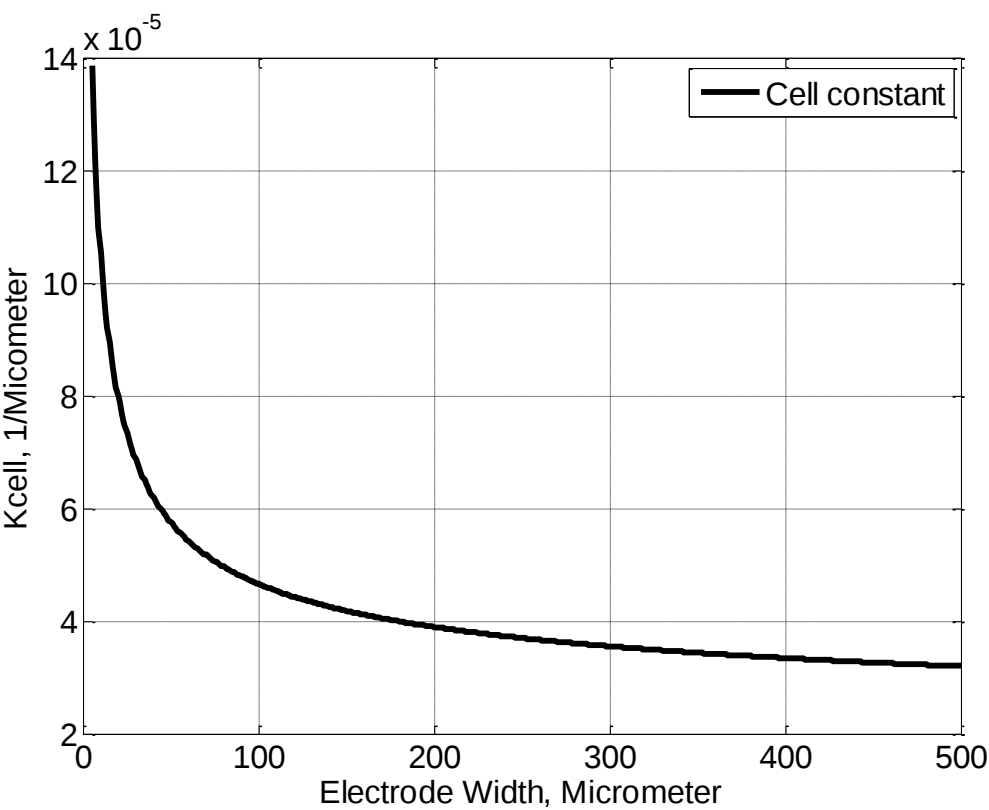


Figure II-6 : Constante de cellule en fonction de la largeur d’électrode.

Lorsque, nous utilisons une structure carrée de $L * L$, un des paramètres géométriques peut être éliminé simplifiant donc l'optimisation. Pour une structure à électrodes interdigitées avec un nombre pair d’électrodes, la largeur totale de la structure est donnée par :

$N \cdot (W + S) - S$	
-----------------------	--

Pour une structure carrée :

$L \times L : L = N \cdot (W + S) - S$	Équation II-17
--	----------------

Avec L en mm et S en microns.

Nous pouvons faire l’approximation suivante :

$L \approx N \cdot (W + S)$	Équation II-18
-----------------------------	----------------

Cependant, il est plus pratique d'effectuer le changement de variable suivant en introduisant un facteur nommé a comme le rapport entre l'espacement et la largeur d'électrode soit :

$$a = S / W$$

Avec ce nouveau paramètre W et S peuvent s'écrire :

$W = \frac{L}{N} \cdot \frac{1}{(a+1)} \text{ et } S = \frac{L}{N} \cdot \frac{a}{(a+1)}$	Équation II-19
---	-----------------------

L'expression (Équation II-16) du terme géométrique à étudier devient:

$\frac{2 \cdot L}{(N-1)} \cdot \frac{1}{(a+1)} \cdot \frac{K(k)}{K(\sqrt{1-k^2})} = X(N, L) \times Y(a)$	Équation II-20
Avec $X(N, L) = \frac{2 \cdot L}{(N-1)}$ et $Y(a) = \frac{1}{(a+1)} \cdot \frac{K(k)}{K(\sqrt{1-k^2})}$	

L'expression d'optimisation désignée est donnée par l'Équation II-20. Ce terme géométrique qui doit être porté au maximum pour donner la plus basse valeur à F_{Low} , peut être divisé en deux parties.

La première est le terme $X(N, L)$. Ce terme dépend de la longueur d'électrode et du nombre d'électrodes. Comme mentionné ci-dessus la longueur d'électrode L peut être choisie en fonction du milieu d'intérêt. Dans cette thèse nous avons opté pour une longueur d'électrode de 1 mm, ainsi la surface totale de la structure coplanaire sera de $1 * 1 \text{ mm}^2$.

Nous remarquons que ce terme $X(N, L)$ ne peut être optimisé qu'en diminuant le nombre N . Le nombre optimal de doigts (électrodes) N présente un minimum pour $N = 2$, qui est le plus petit nombre possible de doigts.

Néanmoins, la sensibilité de mesure d'impédance dans des milieux de volume micrométrique n'augmente que si la surface de contact électrodes-milieu (Frank, et al., 2010) et le nombre de doigts augmentent.

Devant cette contradiction, nous allons étudier dans la suite par une approche analytique et par la modélisation physique l'effet du nombre d'électrodes N sur la mesure d'impédance bioélectrique.

La deuxième partie de l'expression d'optimisation est le terme $Y(N, L)$. Ce terme dépend entièrement du rapport α . Dans la Figure II-7, nous présentons Y en fonction de α en variant ce dernier de 0 à 10.

Le cas $\alpha = 1$ (la largeur d'électrode = écart entre deux électrodes consécutives) n'est pas idéal.

Le terme géométrique Y passe par un maximum pour $\alpha = 0.66$, stipulant ainsi que pour optimiser la structure d'un capteur à électrodes interdigitées, nous devons choisir $W = 3S/2$, comme rapport entre la largeur et l'écart entre deux électrodes consécutives.

Par conséquence, la structure carrée du capteur optimisé devrait avoir une longueur d'électrodes reliée à l'écart S et au nombre d'électrodes N selon l'équation suivante :

$L = \left(\frac{5}{2} \cdot N - 1\right) \cdot S$	Équation II-21
--	-----------------------

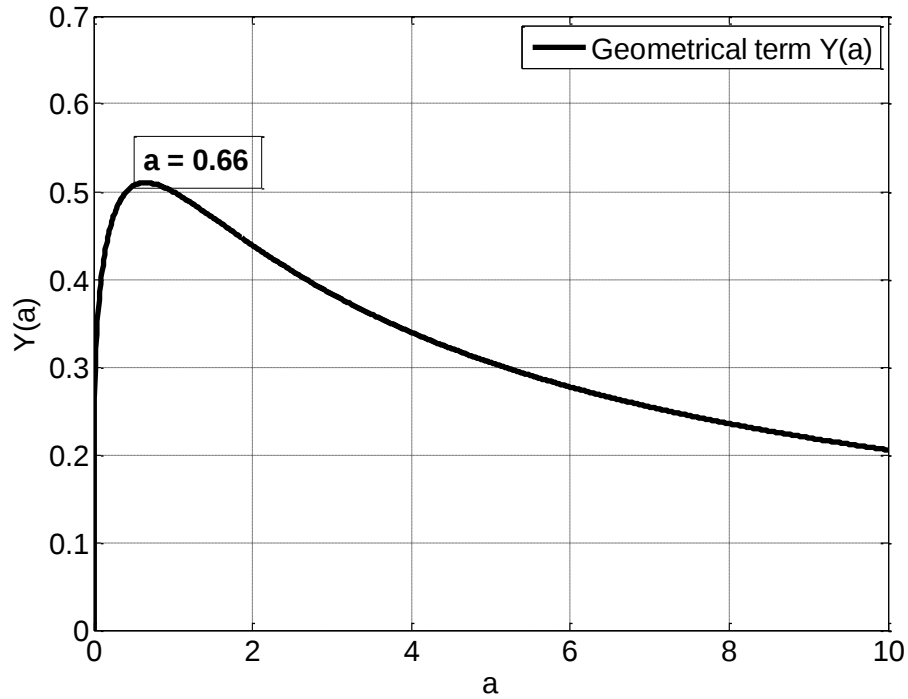


Figure II-7 : Optimisation analytique des paramètres géométriques, de la largeur W et de l'espace S . Le terme géométrique Y est une fonction de S et W , où le rapport a est égal à S / W . La valeur de l'optimisation est de 0,66.

Une fois que le rapport $a = S/W$ est déterminé en vue d'optimiser la structure du capteur, il reste à trouver la valeur optimale de N .

Comme mentionné ci-dessus, lors des mesures sur des échantillons biologiques de dimensions micrométriques, il est préférable d'utiliser des structures d'électrodes qui ont le plus faible module d'impédance R_{Sol} . En effet, les variations d'impédance générées par les changements électro physiologiques de cellules sont plus facilement détectées (Timmer, et al., 2002).

Et par conséquent, il est préférable d'utiliser des structures à électrodes interdigitées avec un facteur de cellule plus faible, parce que R_{Sol} dépend directement de K_{Cell} (voir Équation II-4).

Pour cela, nous avons étudié analytiquement la variation du facteur de cellule (ou constante de cellule) K_{Cell} en fonction du nombre N (voir Figure II-8). Cette étude analytique est réalisée complémentirement à la première règle d'optimisation mentionnée ci-dessus (S / W égale 0.66) sur les paramètres géométriques du facteur de cellule.

Selon Figure II-8, nous constatons une baisse de la constante de cellule avec l'augmentation du nombre de doigts N . Nous pouvons observer une grande variation de la constante de cellule K_{Cell} pour N allant de 2 jusqu'à 20 électrodes. Ensuite les variations de la constante de cellule sont presque négligeables pour $N > 20$.

Les deux règles d'optimisation ont été étudiées analytiquement en faisant une surface de contact d'électrodes-milieu d'une valeur constante (1 mm^2). La première règle d'optimisation consiste à choisir une largeur d'électrode W égale à une distance d'inter électrodes S multipliée par 1.5. Cette règle consiste encore à réduire le nombre d'électrodes le plus possible.

Par contre, la deuxième règle consiste à augmenter le nombre d'électrodes afin de diminuer la constante de cellule le plus possible. De même que la constante de cellule ne varie pas d'une manière significative avec l'augmentation du nombre d'électrodes au-dessus de 20, et en superposant les deux règles d'optimisation, nous pouvons choisir N égal à 20 comme une optimisation théorique d'électrodes interdigitées pour une surface de 1 mm^2 .

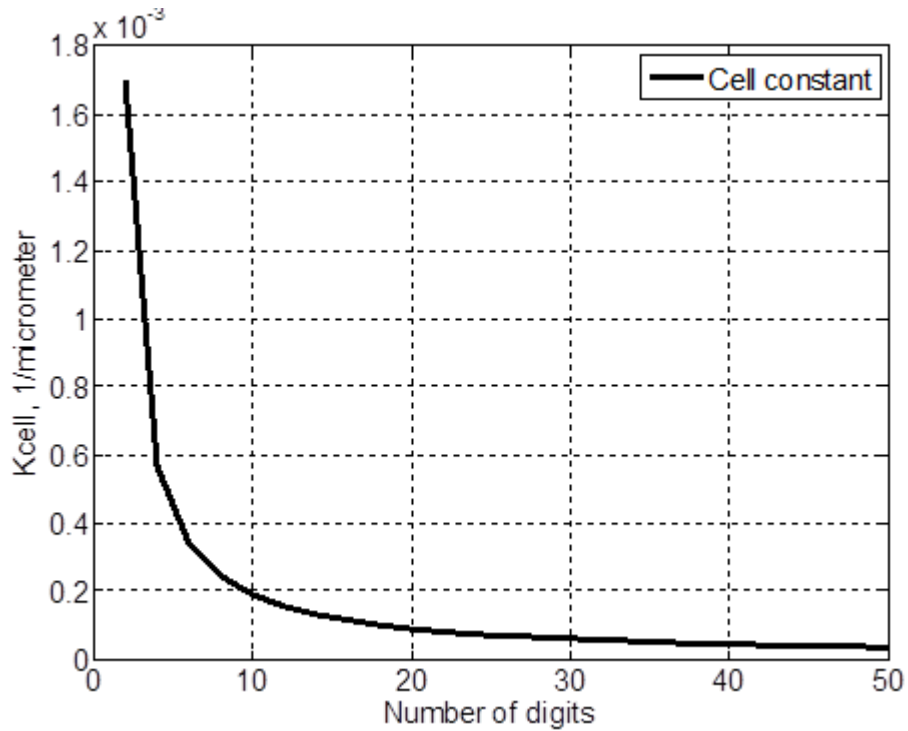


Figure II-8 : Constante de cellule K_{Cell} en fonction du nombre N d'électrodes dans le cas d'optimisation $W = S * 3/2$. La longueur du doigt L est $1000 \mu\text{m}$.

II.3 Modélisation par éléments finis

Pour vérifier nos résultats analytiques nous avons utilisé le logiciel de simulation CoventorWare® pour évaluer l'influence des paramètres géométriques de la structure interdigitée du capteur ainsi que les propriétés diélectriques du milieu sur l'impédance bioélectrique. Notons qu'on se place dans le cas d'un milieu présentant des propriétés électriques homogènes.

II.3.1 Présentation du simulateur CoventorWare®

Le logiciel est divisé en quatre modules distincts:

- « Architect » propose une vue du MEMS au niveau système et permet de réaliser des simulations comportementales de la structure.
- « Designer » permet à partir de la structure étudiée sous Architect de créer le masque de la structure et un modèle en 3 dimensions. Nous pouvons aussi démarrer la modélisation physique à partir de ce module en utilisant l'éditeur graphique en 2D de CoventorWare ®.
- « Analyser » est un solveur éléments finis qui permet à partir d'une structure 3D de déformer la structure du MEMS en fonction de différents types d'actuation (électro quasi-statique, thermique ...).

Le logiciel CoventorWare® permet donc une étude complète de l'aspect électro quasi-statique du système depuis une modélisation haut niveau jusqu'à une simulation par éléments finis. En effet, ce logiciel est capable de réaliser une étude complète des MEMS tout en combinant la partie électronique et la partie mécanique du système et en fournissant en entrée les matériaux utilisés, leurs caractéristiques et la géométrie de la structure. Il nécessite la définition de masques et d'étapes technologiques pour générer les volumes de la structure. Il est ainsi possible d'importer directement les masques utilisés en fabrication (compatibilité avec Cadence entre autres) pour simuler les mêmes structures que celles réalisées en technologie.

II.3.2 Le maillage

C'est l'étape critique dans l'utilisation du simulateur. En effet, les choix de la taille de maille et de l'élément sont primordiaux pour la convergence d'une part et pour la validité des résultats. Différents types de maillages sont possibles. Ainsi des mailles tétraédriques simples ou paraboliques et des briques sont disponibles. Les premières sont assez délicates à faire converger mais sont dotées de fonctions de raffinement automatique assez intéressantes, gérant le nombre d'éléments verticaux par couches. Le principal problème est la correspondance des mailles entre les différents niveaux. S'il n'y a pas une parfaite correspondance, la simulation diverge. Quant aux briques de type tétraédrique à 16 nœuds, elles n'ont pas la possibilité de raffinement par couche et donc pour des grands facteurs de forme, le nombre de mailles augmente rapidement avec la complexité et le temps de calcul nécessaire. Par ailleurs, le fait que le maillage converge, ne garantit pas des résultats réalistes. Il est donc nécessaire de descendre graduellement la taille de la maille de façon à s'assurer de la reproductibilité des résultats. Une fois la maille adéquate au problème trouvée, il est possible de lancer différentes simulations pour l'optimisation.

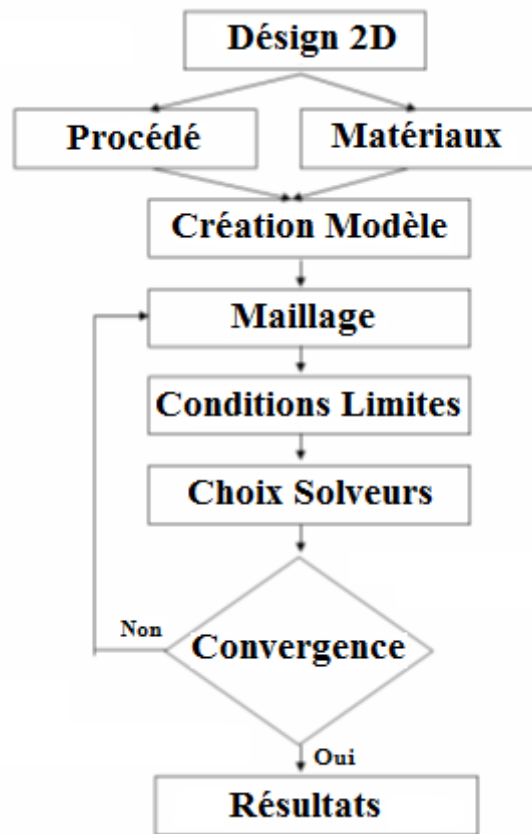


Figure II-9 : Schéma bloc du déroulement d'une simulation sous CoventorWare®™.

II.3.3 Formulation du problème

La méthode des éléments finis permet de résoudre des systèmes physiques pouvant être décrits par des équations aux dérivées partielles. Elle consiste à utiliser une approximation simple des variables inconnues pour transformer les équations aux dérivées partielles en équations algébriques (Dhatt, et al., 2005) (Zimmerman, 2006). La modélisation d'un système physique par cette méthode repose donc en premier lieu, sur un choix approprié, des équations aux dérivées partielles décrivant le problème. Dans le cas des problèmes liés aux phénomènes électromagnétiques, les équations sous-jacentes décrivant le problème sont les équations de Maxwell. Sous certaines conditions, ces équations peuvent être simplifiées. Dans notre cas, les milieux d'étude peuvent être considérés comme amagnétiques. De plus les dimensions du domaine modélisé sont très petites devant les longueurs d'ondes des champs électriques utilisés justifiant l'hypothèse

d'une approximation quasi-statique. L'équation aux dérivées partielles à résoudre à l'intérieur du domaine d'étude est alors simplement donnée par :

$-\nabla(\sigma + j\omega\varepsilon_0\varepsilon)\nabla V = 0$	Équation II-22
---	-----------------------

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

II.3.4 Modélisation tridimensionnelle du système

Dans ce paragraphe, nous décrivons la conception du modèle physique du capteur chargé par un milieu biologique, le sang.

II.3.4.1 Modélisation des électrodes

La structure du capteur d'impédance à électrodes interdigitées utilisée dans cette simulation est à l'échelle micrométrique. Le capteur est composé de deux couches superposées, la première couche formant le substrat en verre et la deuxième couche formant la structure des électrodes en platine. Une vue de dessus est montrée à la Figure II-10. Une vue en 3D est donnée sur la Figure II-11, les deux couches 1 et 2 représentent le substrat et les électrodes respectivement.

La couche formant le substrat en verre consiste en une forme carrée de côté 1300 μm avec une épaisseur de 1000 μm (couche 1 sur la Figure II-11). Le verre est un bon isolant électrique dont la conductivité est de 10^{-17}S.m^{-1} , et une permittivité relative autour de 5-7 (CRM, 2000) qui est relativement faible. Comme le verre possède une permittivité très petite, nous n'avons pas besoin de mettre une couche isolante entre le substrat et les électrodes.

Ensuite, nous avons défini un masque d'électrodes en platine d'épaisseur 1 μm déposé sur le substrat (couche rouge sur la Figure II-10, la couche 2 sur la Figure II-11). Le platine est un bon conducteur possédant une conductivité de $9.66.10^6\text{S.m}^{-1}$ (CRM, 2000). La surface totale occupée par les électrodes correspond à celle d'un carré de 1000 μm de côté.

Comme mentionné au paragraphe II.2.2, cette surface est toujours la même pour les différentes géométries d'électrodes que nous allons étudier.

Par conséquent, pour respecter cette condition, les paramètres géométriques de chaque structure étudiée doivent obéir à l'Équation II-17.

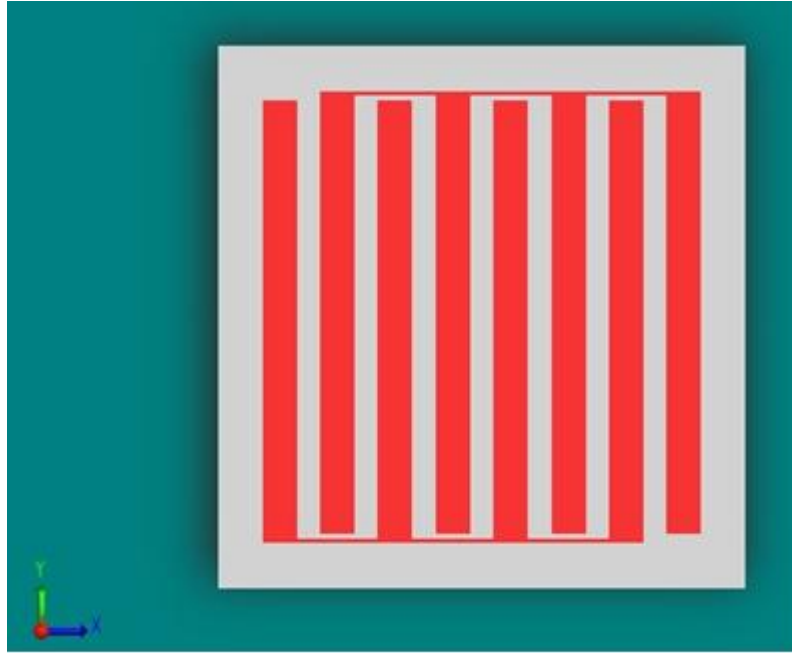


Figure II-10 : Modèle d'un capteur coplanaire à 8 électrodes interdigitées (Vue de dessus).

II.3.4.2 Modélisation du milieu, sang

Dans la Figure II-2 et Figure II-4, les composants C_{Cell} et R_{Sol} modélisent les propriétés électriques du milieu. C_{DL} modélise les propriétés des phénomènes d'interface. Il y aura besoin de deux milieux pour représenter les propriétés électriques et les propriétés des phénomènes d'interface. Le milieu total à modéliser se compose alors de deux sous-milieux.

Le premier sous-milieu représente une couche isolante modélisant ainsi les phénomènes d'interface à la surface des électrodes (couche 4) (Bard & Faulkner, 2001). Le deuxième sous-milieu permettant la modélisation des propriétés électriques correspond à une couche diélectrique possédant une conductivité et une permittivité (couche 3). Les deux sous-couches sont superposées l'une sur l'autre comme le montre la Figure II-11.

La couche 3 représentant la double couche d'une capacité C_{DL} qui à son tour décrit les phénomènes d'interface doit avoir une épaisseur d'environ 50 Å (paragraphe II.2.1.1) et une permittivité relative d'environ 97 (Bard & Faulkner, 2001).

Nous avons remarqué que pour une valeur de 50 Å, l'épaisseur de cette couche pose des problèmes de maillage et un dépassement de la mémoire de l'ordinateur lors des simulations.

Pour cela nous avons appliqué un changement d'échelle en multipliant cette couche par 2x1000. Ensuite la permittivité est encore multipliée par le même facteur 2x1000, soit 194000, afin de maintenir la même valeur de la capacité électrique correspondante.

La deuxième couche modélisant les propriétés électriques du milieu a été définie de manière à avoir une épaisseur de 500 µm, une conductivité de 0,7 S / m et une permittivité relative de 80. La valeur de la conductivité est tirée de (ifac, 2012) dans la gamme de fréquence 100 – 10⁷ Hz. La valeur de la permittivité est considérée pour des fréquences élevées (> 10⁷ Hz (Jaspard, et al., 2003)).

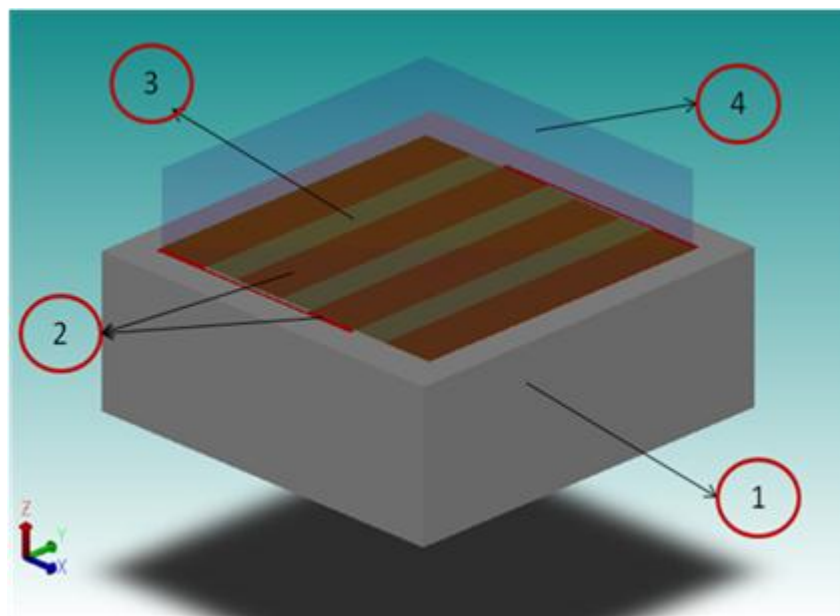


Figure II-11 : Vue 3D, Capteur à 4 électrodes interdigitées (couche 2) chargé par le milieu complet : la double couche DL (couche 3) et le milieu (couche 4).

L'ensemble du système est située sur un substrat en verre (couche 1).

II.3.5 Résultats de simulation

Le modèle du système complet a été développé pour la simulation avec la méthode des éléments finis FEM proposé par le logiciel CoventorWare ®. Nous avons utilisé le module électro quasi-statique. Cette approche est valable pour des fréquences en-dessous de 10^7 Hz.

Comme mentionné dans le paragraphe II.3.2, le maillage est une étape essentielle dans la simulation. Un maillage approprié contribue grandement à l'optimisation de la précision du calcul de système. Dans le cas de notre configuration, le maillage a été créé en utilisant des briques de Manhattan d'éléments linéaires d'un côté de $5\text{ }\mu\text{m}$ dans les directions Z X, Y, (voir Figure II-12).

Après avoir maillé la structure, il faut définir les conditions aux limites. Dans notre cas il s'agit d'imposer:

- L'application d'une tension sinusoïdale de 1V sur le port d'entrée d'une des électrodes;
- L'application d'une tension nulle sur le port de l'autre électrode.
- Un potentiel zéro à l'infini.

Nous notons qu'il faut appliquer les tensions sur les surfaces des électrodes sinon elles ne sont pas prises en compte lors de la simulation.

Les simulations ont été effectuées dans une gamme de fréquence allant de 100 Hz à 10 MHz.

L'amplitude de l'impédance électrique Z est calculée à partir de la capacité C et de la conductance G du milieu totale. C et G sont délivrées par le logiciel comme un résultat de simulation sous la forme de l'Équation II-23. Nous pouvons donc calculer l'impédance Z à partir de l'admittance Y selon $Z = 1 / Y$.

Dans les premiers modèles, nous avons choisi arbitrairement N égal à 16 électrodes.

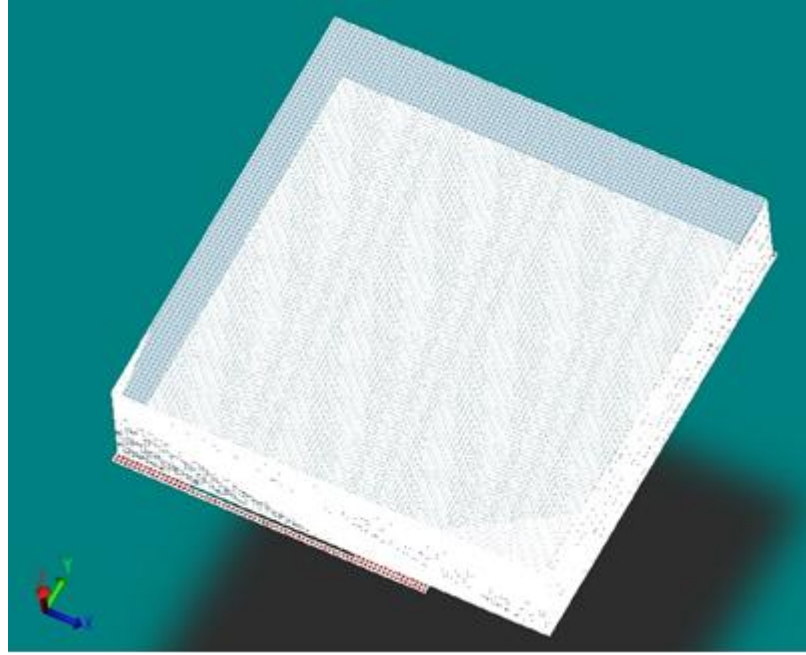


Figure II-12 : Vue 3D du maillage utilisé en simulation : maillage Manhattan brique de 5 μm .

$\frac{1}{Z} = Y = G + j\omega C$	Équation II-23
-----------------------------------	-----------------------

Où ω est la pulsation angulaire et j est le nombre imaginaire.

II.3.5.1 Vérification du choix de deux couches

Afin de vérifier le choix de la structure du milieu (sang) composée de deux couches, DL et la couche représentant les propriétés électriques du sang, nous avons comparé les résultats de simulation de deux modèles, avec et sans DL. Les résultats de simulation (Figure II-13) montrent l'influence de la couche DL sur la réponse d'impédance électrique obtenue du système complet.

L'allure de cette courbe (avec la couche DL) est similaire à celle du spectre observé de la variation d'impédance dans le cas général (Figure II-4). L'effet dû à la capacité C_{Cell} n'apparaît pas sur cette courbe car la fréquence de coupure haute F_{HI} est plus élevée que 10^7 Hertz. Les courants de conduction passant par R_{Sol} sont soumis aux phénomènes d'interface, car ils se propagent à travers l'échantillon par l'intermédiaire de DL.

Dans le cas du modèle sans DL, nous pouvons remarquer que l'impédance est constante tout le long de la gamme de fréquence et ne tient pas compte de la fréquence de coupure haute.

En fait, les effets d'interface n'existent pas dans le modèle sans la présence de la couche DL (couche 3 dans la Figure II-11). L'absence de la couche DL dans le modèle physique se traduit par l'absence de deux capacités C_{DL} dans le circuit équivalent. Ainsi le circuit consiste en une simple résistance R_{Sol} qui est en parallèle avec la capacité C_{Cell} . Cette capacité a un effet négligeable dans les basses fréquences. Par conséquent, le choix d'avoir deux couches, DL et la couche représentant les propriétés électriques du sang, afin de constituer un milieu biologique complet est justifié.

II.3.5.2 Vérification du choix des valeurs diélectriques

Dans le but de justifier le choix des valeurs constituant les propriétés diélectriques de sang, en particulier la permittivité, nous avons étudié l'influence du changement de la valeur de ce paramètre sur la réponse de l'impédance simulée d'un capteur à 16 électrodes interdigitées, Figure II-14. Nous comparons les résultats de simulation pour deux permittivités différentes 80 et 5200 respectivement. Nous avons choisi la valeur 80 car dans la gamme des hautes fréquences la permittivité est d'environ 80. La deuxième valeur est choisie parce qu'en basses fréquences la permittivité d'un milieu biologique en générale est très élevée et est d'environ 5200 (ifac, 2012).

Nous pouvons observer que la valeur de la permittivité ne change pas le spectre d'impédance dans la gamme de fréquence allant de 100 à 10^7 Hertz.

Nous remarquons aussi que la valeur de la permittivité n'influe pas sur la fréquence de coupure basse F_{Low} . Ce résultat est en cohérence avec l'Équation II-14 représentant la fréquence de coupure basse en fonction de la conductivité mais qui ne dépend pas de la permittivité du milieu.

Dans la Figure II-15 nous présentons l'influence de la conductivité du milieu. Les résultats de simulation sont réalisés pour deux valeurs de conductivité différentes: 0,7 et 9 S/m respectivement. Nous pouvons constater que l'augmentation de la conductivité, génère une diminution du module R_{Sol} (valeur du

plateau). En outre, le changement de la valeur (amplitude) du plateau implique un changement de la fréquence de coupure basse.

Ces deux résultats sont en accord avec les deux équations (Équation II-4 et Équation II-14), respectivement.

II.3.5.3 Vérification de la première règle d'optimisation

L'objectif principal de cette simulation est la vérification des résultats analytiques issus du développement théorique des équations reliant les paramètres géométriques du capteur et les fréquences de coupures. Nous rappelons que cette règle consiste à choisir un rapport S / W égale 0.66 pour la conception d'un capteur optimisé.

Pour cela nous allons étudier l'influence de ce ratio sur le spectre d'impédance (Figure II-16 et Figure II-17). Comme le montre la Figure II-16, nous présentons l'impédance simulée pour trois cas différents de S / W , 0.66, 0.1 et 5.

Pour cette étude nous avons utilisé un capteur possédant 8 électrodes, car la simulation d'un capteur de 16 électrodes avec S / W égal à 0.1 a généré un dépassement de mémoire rendant le maillage impossible pour cette configuration.

Sur la Figure II-16, les fréquences de coupure F_{Low} sont très proches. Pour pouvoir les distinguer, nous présentons dans la Figure II-17 les courbes de phase correspondant à chaque cas.

Les trois fréquences de coupure relevées sont 7.10^3 , 10.10^3 et 20.10^3 Hertz. Ces valeurs correspondent au rapport S/W de 0.66, 0.1 et 5 respectivement. Dans la Table II-2 nous présentons les pourcentages de différence relative de F_{Low} de chacun des cas par rapport à 0.66.

Le cas $S/W = 0.1$ présente un pourcentage de 43%. Le cas $S/W = 5$, a un pourcentage de 186%. Nous remarquons que ces valeurs sont relativement élevées comparé au cas $S/W = 0.66$.

Cela justifie bien la théorie d'optimisation développée.

S/W	F_{Low} (Hz)	ΔF_{Low} (Hz)	Relative change %
0.66	$7 \cdot 10^3$	0	0
0.1	$10 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$	43
5	$20 \cdot 10^3$	$13 \cdot 10^3$	186

Table II-2 : Table représentative des fréquences de coupure F_{Low} de 3 géométries étudiées.

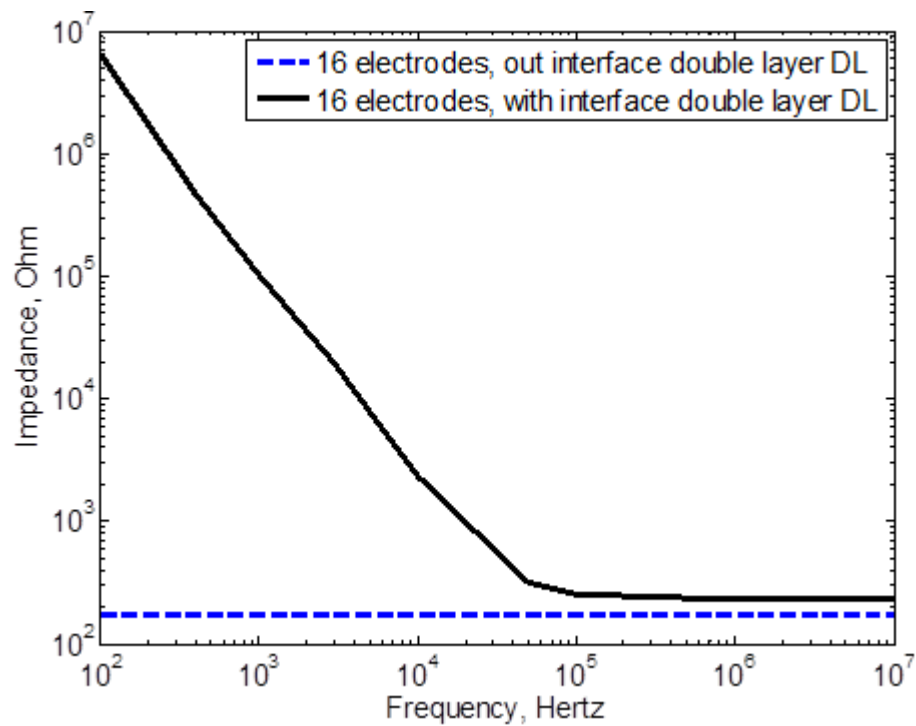


Figure II-13 : Impédance électrique simulée pour deux modèles, avec et sans la double couche d'interface DL.

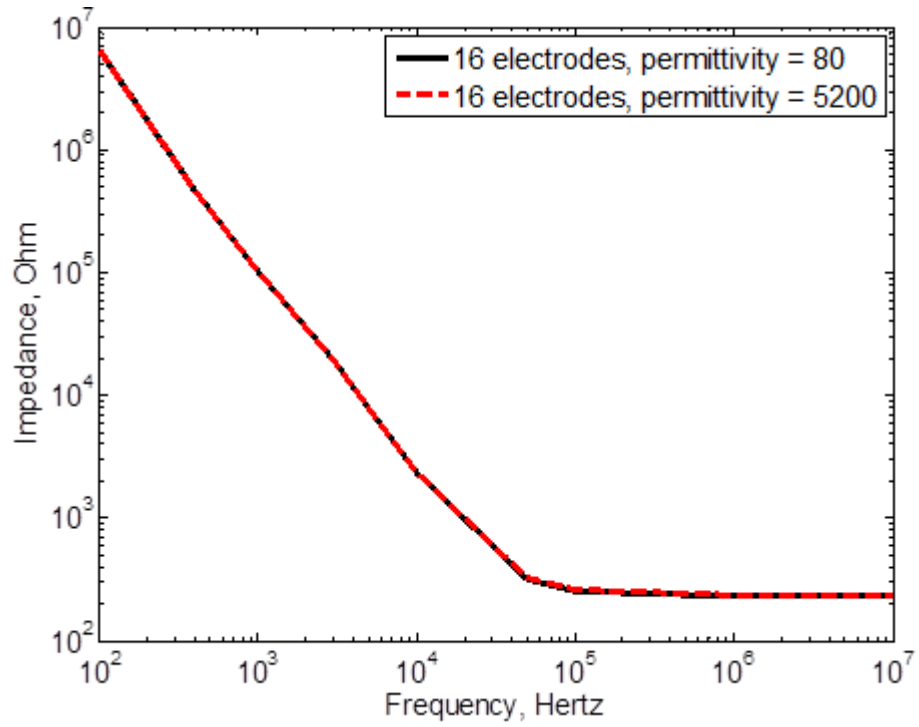


Figure II-14 : Impédance électrique simulée pour deux permittivités relatives différentes, 80 et 5200.

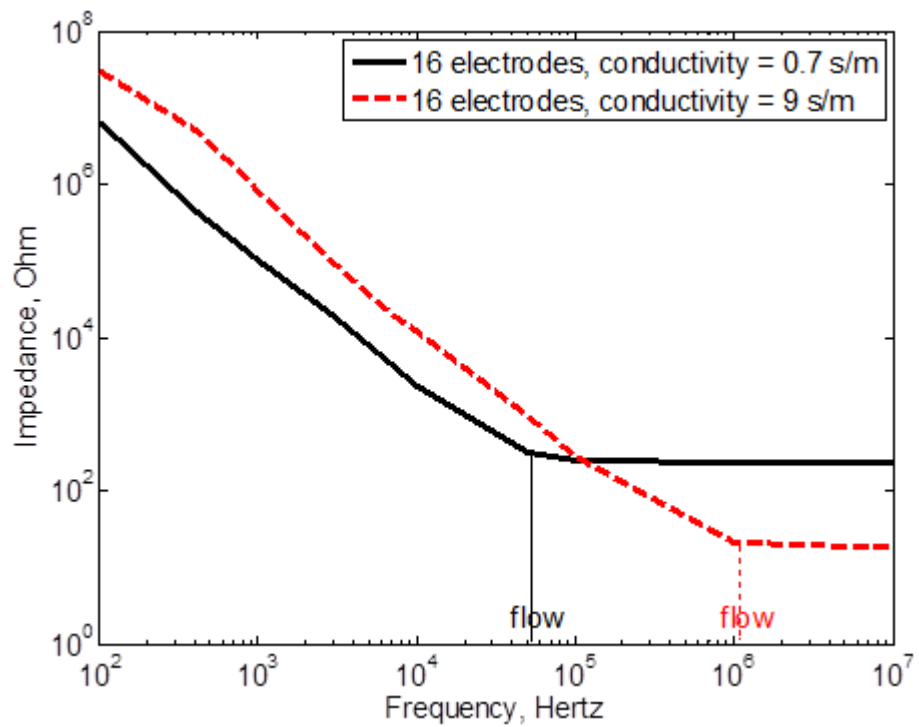


Figure II-15 : Impédance électrique simulée pour deux conductivités différentes, 0,7 s / m et 9 s/m.

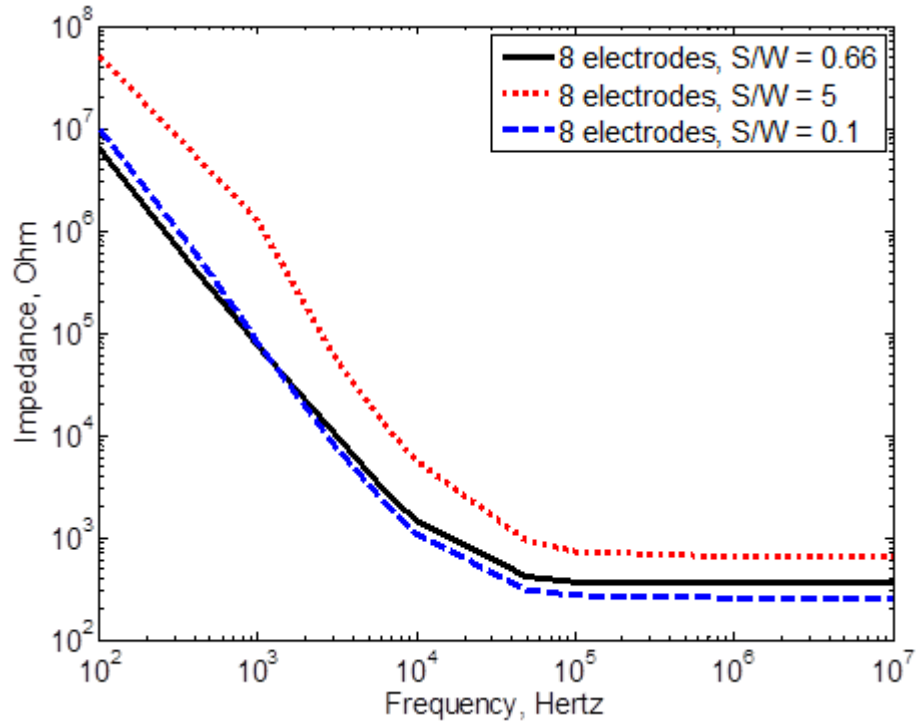


Figure II-16 : Comportement de l'impédance électrique simulée pour trois cas différents : $S/W = 0.1$, 0.66 et 5 .

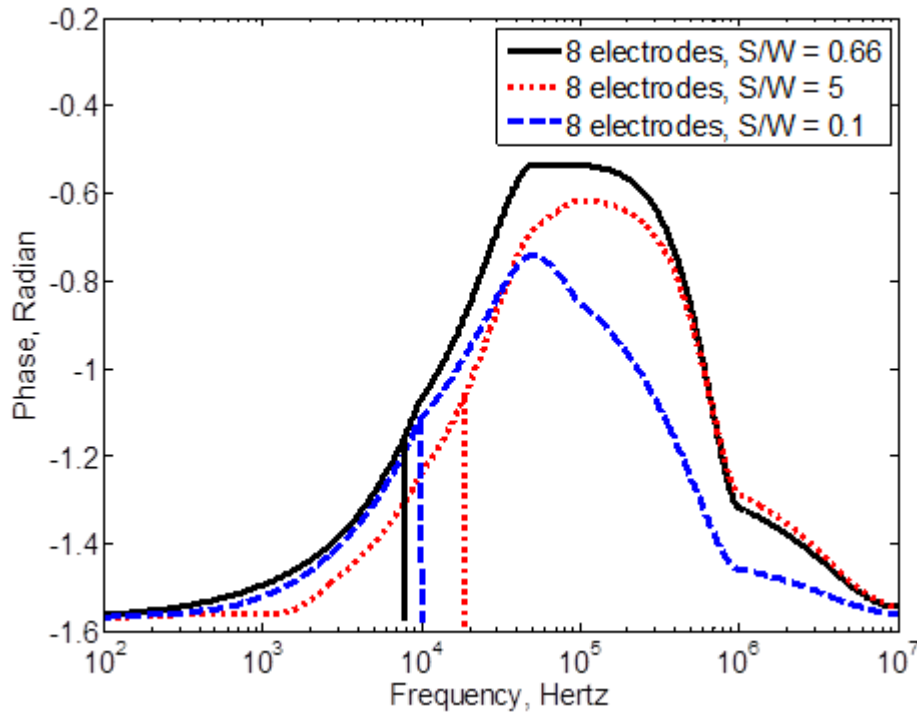


Figure II-17 : Comportement de la phase électrique pour trois cas différents : $S/W = 0.1$, 0.66 et 5 .

II.3.5.4 Vérification de la deuxième règle d'optimisation

Afin de vérifier la deuxième règle d'optimisation concernant le nombre d'électrodes N , nous présentons sur les figures (Figure II-18 et Figure II-19) l'effet de N sur les résultats de simulation de l'impédance électrique et de la phase.

Cette fois, nous appliquons les conditions de la première règle d'optimisation validée au paragraphe précédent $S/W = 0.66$. Nous rappelons que les six structures différentes ont été développées de manière à avoir une même surface totale équivalente occupée par les électrodes.

Nous étudions les cas de $N = 2, 4, 8, 12, 16$ et 20 .

Pour le cas $N = 2$, nous pouvons observer une valeur de R_{Sol} (valeur du plateau) d'environ 2000Ω et une fréquence de coupure basse F_{Low} d'environ 3.10^3 Hz.

Pour le cas $N = 4$, R_{Sol} est égale 700Ω et F_{Low} prend une valeur d'environ 5.10^3 Hz. R_{Sol} a beaucoup diminué par rapport au cas $N = 2$.

Pour $N = 8$, R_{Sol} est égale à 350Ω , tandis que F_{Low} est égale à 7.10^3 Hz. Même remarque sur R_{Sol} par rapport au cas précédent $N = 4$.

Pour $N = 12$, R_{Sol} est égale à 260Ω et F_{Low} est égale à 10^4 Hz. Nous constatons pour ce cas que la valeur de R_{Sol} a légèrement diminué par rapport à $N = 8$.

Finalement nous remarquons que les cas $N = 16$ et 20 électrodes présentent quasiment la même valeur de R_{Sol} (220Ω) et une valeur de F_{Low} d'environ $1.6.10^4$ et $1.7.10^4$ Hz respectivement.

Nous constatons d'après cette analyse que l'augmentation du nombre d'électrodes entraîne une augmentation de la fréquence de coupure basse et une diminution du module de l'impédance. Ce résultat est cohérent avec les équations Équation II-5, Équation II-14 et Équation II-20.

Nous remarquons aussi que le module R_{Sol} ne change pas d'une manière significative après $N = 16$ voire 20 . Ceci est en accord avec la courbe de K_{Cell} de la Figure II-8.

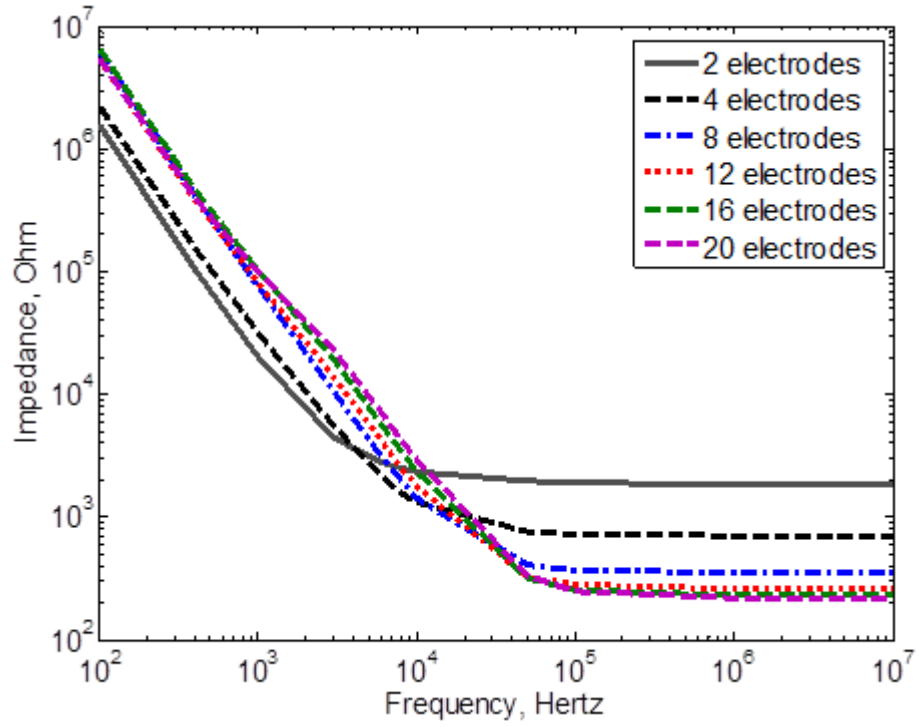


Figure II-18 : Comportement de l'impédance électrique simulée en fonction du nombre d'électrodes N.

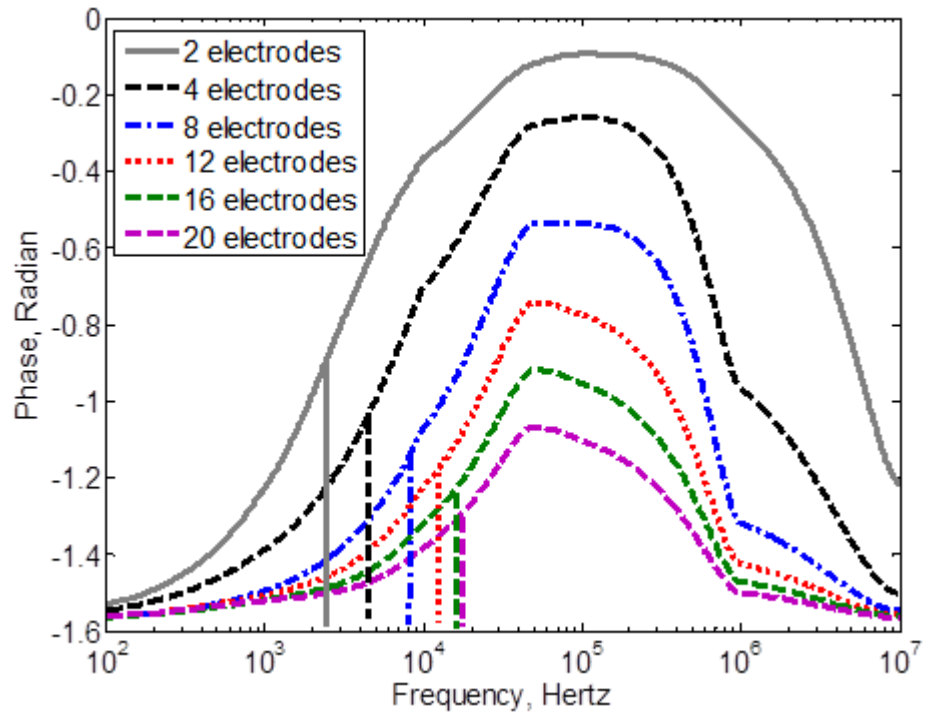


Figure II-19 : Comportement de la phase électrique en fonction du nombre d'électrodes N.

A partir des courbes d'impédance (Figure II-18), nous ne pouvons pas observer les fréquences de coupure haute, tandis que cette information est observable sur les courbes de phase (Figure II-19).

Cette fréquence de coupure est d'environ 10^6 hertz pour toutes les géométries étudiées. Ceci peut être expliqué de deux manières.

La première explication s'appuie sur le fait qu'un phénomène capacitif de C_{Cell} se présente autour de 10^6 hertz. Cet effet capacitif n'est pas pur et en plus les valeurs de la conductance G sont très grandes par rapport aux valeurs de C totale du milieu. Pour cela nous ne pouvons pas observer ces phénomènes sur la courbe d'impédance.

La deuxième explication est liée au module de simulation électro quasi statique et à son comportement au-dessus de 10^7 Hz. Les valeurs au-delà de 10^7 Hz ne sont pas garanties.

Comme mentionné au paragraphe optimisation de la géométrie des électrodes, lors des mesures sur des échantillons biologiques de dimensions micrométriques, il est préférable d'utiliser des structures d'électrodes qui ont le plus faible module d'impédance R_{Sol} . En effet, les variations d'impédance générées par les changements électro physiologiques de cellules sont plus facilement détectées (Timmer, et al., 2002).

Pour cela, et afin d'exploiter d'une manière plus illustrative les changements du module d'impédance dus à la variation du nombre d'électrodes, nous avons tracé les pourcentages différentiels de ces changements par rapport au cas $N = 2$ dans la Figure II-20.

La sensibilité de détection de chaque capteur est donnée par rapport au cas $N = 2$. Elle est évaluée par :

$(Z_i - Z_2) / (Z_2 \cdot \text{Volume})$, avec i le nombre d'électrodes.

Nous pouvons remarquer que la sensibilité de détection du capteur est très faible pour des fréquences inférieures à F_{Low} ($<10\%$), et qu'elle présente de bonnes valeurs pour des fréquences plus grandes que F_{Low} . Cela justifie l'hypothèse que R_{Sol} est l'élément sensible de la mesure d'impédance mentionnée dans le

paragraphe II.2.1, et que ce type de capteur est bien sensible pour des fréquences plus grandes que F_{Low} . Ceci justifie notre démarche d'élargir la bande de fréquence utile.

Sur la Figure II-20, la sensibilité du capteur à 4 électrodes présente une valeur de 16%.

- Pour 8 électrodes nous avons une valeur de 42%, ceci est équivalent à une augmentation de 26%.
- Pour 12 électrodes nous avons une valeur de 58%. Ceci est équivalent à une augmentation de 16%.
- Pour 16 électrodes la valeur est 68%. Cette augmentation n'est que de 10% par rapport à au cas précédent (12 électrodes).
- Finalement, pour 20 électrodes la sensibilité n'augmente que de 4% et présente une valeur de 72% par rapport au cas de 2 électrodes.

Cependant, nous remarquons que les variations du module d'impédance R_{Sol} sont quasiment négligeables au-dessus de 16 électrodes et négligeables pour $N > 20$.

Ce résultat concorde avec la Figure II-8 et justifie la deuxième règle d'optimisation.

Tenant compte de deux règles d'optimisation vérifiées par la simulation, nous pouvons confirmer que la structure optimale d'un capteur à électrodes interdigitées consiste à choisir un rapport $S/W = 0.66$.

Ce résultat montre qu'il est possible d'optimiser un capteur à électrodes coplanaires et montre qu'il ne suffit pas de choisir la distance inter électrodes beaucoup plus grande que leur largeur comme proposé dans (Hong, et al., 2005) (Ivorra, et al., 2001).

Nous pouvons aussi confirmer que la sensibilité d'un tel capteur ne varie pas d'une manière significative au-dessus de 20 électrodes pour une surface de 1 mm^2 .

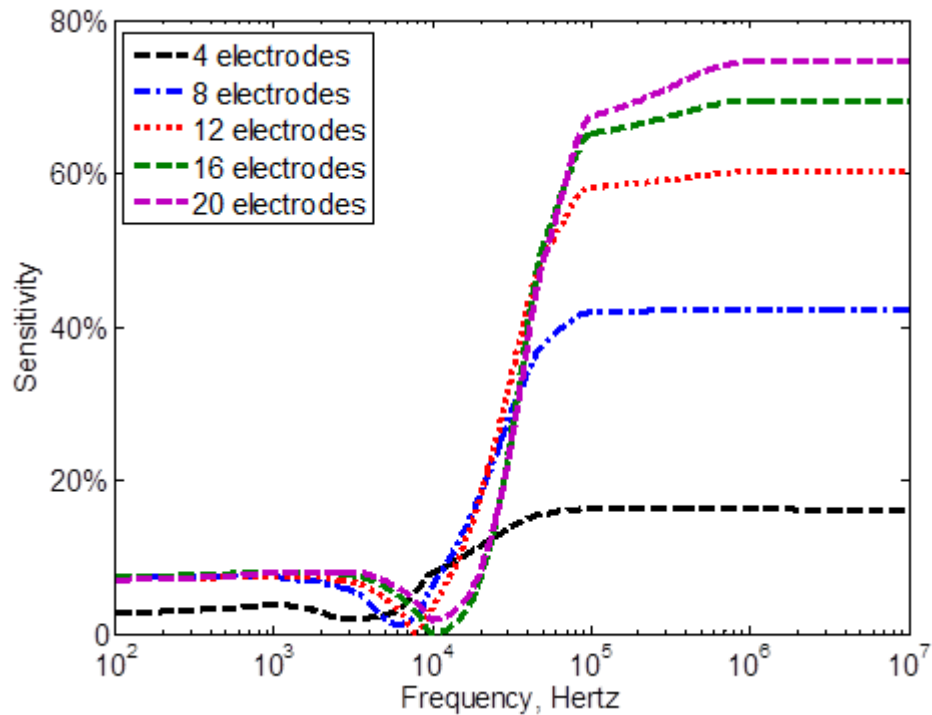


Figure II-20 : Sensibilité en % de détection de plusieurs géométries par rapport à la géométrie à 2 électrodes. La sensibilité est calculée par $(Z_i - Z_2) / (Z_2 \times \text{Volume})$, i est le nombre d'électrodes.

II.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté une nouvelle approche d'optimisation d'une cellule de mesure de type capteur à électrodes interdigitées. A l'issu d'un modèle de circuit électrique équivalent, la corrélation entre les paramètres géométriques de la conception et le comportement des fréquences de coupures notamment la fréquence de coupure basse a été présentée. Cette optimisation géométrique consiste à choisir un rapport de distance inter-électrodes sur largeur d'électrode égale à 0.66.

A l'aide du logiciel CoventorWare® nous avons pu simuler l'influence des paramètres géométriques des micros électrodes interdigitées sur l'impédance bioélectrique d'un milieu biologique, le sang. Les résultats du développement théorique de l'optimisation du capteur et ceux de la simulation représentée par la

modélisation 3D du système électrodes/milieu ont été discutés et la théorie d'optimisation validée.

Le chapitre suivant présente la conception et la réalisation des capteurs à électrodes interdigitées pour la spectroscopie de bioimpédance.

III. Conception et réalisation des micros capteurs à électrodes interdigitées

Ce chapitre, porte sur la fabrication de différents capteurs à électrodes interdigitées. Certains ont été conçus de façon optimisée, d'autre non en vue de valider notre modèle théorique. Nous présentons d'abord l'élaboration des micros dispositifs utilisés au cours de cette thèse. Pour cela, nous discutons du choix des différents matériaux et des critères qui ont permis de déterminer la géométrie des dispositifs. Nous décrivons ensuite les procédés de micro-fabrication des électrodes et des micros réservoirs. Nous discutons aussi des interfaces de connexion des dispositifs aux appareils de mesure. Nous présentons ensuite l'impédance mètre ainsi que le logiciel nous permettant d'enregistrer et de traiter les données issues de la mesure.

III.1 Conception des dispositifs

Au chapitre II, nous avons établi un modèle théorique du capteur avec un rapport optimum de largeur sur l'écart d'électrodes, chargé par un échantillon biologique. Nous avons conçu des modèles et simulé ce type de capteur interdigital en trois dimensions chargé par un biofluide comme le sang pour analyser les variations de ses propriétés électriques par mesure spectroscopique de l'impédance. Ce modèle, essentiellement numérique, est obtenu par éléments finis à l'aide du logiciel CoventorWare®.

La seconde partie expérimentale vise à réaliser et valider des prototypes de micro capteur interdigité pour la caractérisation par spectroscopie de bio impédance du fluide biologique. L'étude et la mise en place d'une instrumentation basée sur ce capteur permet d'obtenir directement l'impédance complexe et par conséquent la permittivité et la conductivité électrique du milieu sur une gamme de fréquences allant de 10Hz à 10 MHz.

La réalisation de nos capteurs interdigités, a été effectuée en collaboration avec et par le centre de compétences MINALOR dirigé par le Pr. Montaigne de l'Institut Jean Lamour (IJL) de l'Université de Lorraine.

III.1.1 Choix des matériaux

III.1.1.1 Substrat

Pour réaliser nos bio-MEMS, nous avons le choix entre trois types de substrat couramment utilisés pour la conception de bio-MEMS et présents dans le centre MinaLor de l'institut Jean Lamour, au sein duquel furent effectués les procédés micro-technologiques: le silicium, les polymères (comme le PDMS) et le verre.

Le silicium présente l'avantage d'être le matériau de prédilection pour la microélectronique. Ces travaux ayant été réalisés dans un centre de micro et nanotechnologies, le savoir-faire dans ces techniques y est important. La grande majorité du matériel de salle blanche est dédié à des procédés sur substrat de

silicium. Cependant, le silicium n'est pas transparent. Il ne permet donc pas d'observations microscopiques par transmission. Nous avons donc décidé de ne pas travailler avec des substrats en silicium.

Du point de vue financier, les matériaux polymériques restent préférables car leurs coûts sont très abordables. Certains matériaux polymères, comme le PDMS, sont de plus transparents. Seulement, le dépôt de métal sur ce genre de substrat est encore en voie de développement. Il reste difficile de réaliser un dispositif uniquement en polymère.

Le verre est transparent. Il est de plus biocompatible avec les milieux biologiques. Le verre a donc été retenu comme substrat pour nos composants.

III.1.1.2 Electrodes

Les bio-MEMS développés au cours de cette thèse ont été utilisés pour l'analyse électrique d'échantillons de sang humain *in vitro*. Les électrodes ne doivent pas avoir d'effets toxiques sur les cellules de l'échantillon. Nous avons également voulu développer rapidement un procédé technologique concluant. Nous avons donc préféré utiliser des métaux dont le dépôt est couramment réalisé au centre MinNaLor. De plus, nous avons utilisé des métaux pour pouvoir mesurer des courants électrochimiques biologiques de faibles amplitudes. Considérant ces contraintes, nous avons eu le choix entre deux métaux pour réaliser les électrodes de nos bio-MEMS: le platine et l'or.

L'or et le platine possèdent les conductivités suivantes (CRM, 2000):

$$\sigma_{\text{Or}} = 45.2 \cdot 10^6 \text{ S / m},$$

$$\sigma_{\text{platinum}} = 9.43 \cdot 10^6 \text{ S / m}.$$

Malgré la plus grande conductivité de l'or, notre choix de travailler avec des électrodes de platine a été motivé par une observation de (Capone, et al., 2001), qui ont comparé les électrodes en or avec les électrodes en Platine dans le cadre d'une étude de capteur de gaz (Capone, et al., 2001). Ils sont arrivés à la conclusion que les électrodes en or étaient moins stables que les électrodes en Platine : En augmentant la température, les atomes d'or ont été diffusés à partir du contact

avec la couche adhésive, et les électrodes en platine ont montré une résistance supérieure à celles faites avec l'or sous la même géométrie.

Le platine est plus stable, nous avons donc choisi ce métal pour réaliser nos électrodes.

III.1.1.3 Microréservoir d'échantillon biologique

La principale propriété de nos réservoirs, sous forme de puits carré, est qu'ils ne doivent pas altérer le milieu liquide biologique. Afin d'optimiser la rapidité de prototypage, ont été utilisés deux polymères faciles à mettre en œuvre: le PDMS et la SU-8.

Le PDMS est un matériau très répandu pour les applications micro-fluidiques. De nombreux chercheurs l'utilisent pour sa facilité d'utilisation et son coût modéré. L'usage du PDMS pour des applications biomédicales et son intégration *in vitro* et *in-vivo* sont aussi très répandues. Le PDMS est souvent utilisé dans les technologies molles pour lesquelles chaque micro-objet est fabriqué séparément.

Comparé au PDMS, la résine photosensible SU-8 est utilisée à la base en microélectronique, et trouva dans la micro-fluidique un champ d'applications encore plus vaste. Elle possède une adhérence élevée, permettant de réaliser des motifs plus épais que les résines classiques utilisées pour la réalisation de motif par gravure, et avec un fort rapport de forme (typiquement 1 :20).

De plus c'est une résine transparente. Pour une observation correcte, il est aussi important de considérer la distance focale des objectifs ainsi que l'épaisseur de la SU 8.

S'agissant d'une résine négative, elle devient très résistante aux solvants après insolation. Elle peut ainsi résister aux liquides biologiques (pouvant être corrosifs) ainsi qu'aux solvants de nettoyage tels que l'acétone et l'isopropanol. Elle peut conserver des parois latérales verticales dans le processus de lithographie. Il s'agit aussi de l'une des résines les plus biocompatibles, donc parfaitement apte à être en contact avec des tissus biologiques.

Nous avons voulu utiliser les techniques classiques de lithographie et de gravure plutôt que les techniques molles. Nous avons donc décidé d'utiliser la SU 8 pour constituer les réservoirs des échantillons biologiques étudiés.

III.1.2 Géométrie des dispositifs

III.1.2.1 Géométries des électrodes

Comme décrit précédemment, nous avons opté dans cette thèse pour la géométrie d'électrodes planaires interdigitées car elle permet de recouvrir le maximum de surface avec un conducteur et donc en théorie de récupérer le maximum de signal tout en assurant une résolution de détection micrométrique.

Nous avons voulu vérifier expérimentalement les règles d'optimisation de la structure interdigité qui sont étudiées dans le chapitre précédent. Ces règles se basent sur l'optimisation du rapport entre la largeur d'électrodes et la distance entre deux électrodes consécutives et, sur le nombre d'électrodes afin d'élargir la gamme de fréquence utile de mesure.

Pour cela, la surface du contact entre les électrodes et l'échantillon sous test doit alors rester égale et de forme carrée pour toutes les géométries à comparer. Nous avons choisi de réaliser des réseaux d'électrodes de 1 mm^2 (Longueur x Largeur).

Afin d'étudier empiriquement les différentes géométries de structures interdigitées, dans le but de vérifier la théorie d'optimisation développée, cinq géométries d'électrodes distinctes ont été réalisées. Chaque dispositif est monté sur un substrat différent pour éviter les capacités mutuelles parasites qui pourraient être créées entre les différents capteurs dans le cas d'un montage sur le même substrat.

Parmi les cinq géométries, trois d'entre elles possèdent des rapports de largeur d'électrodes/distance inter-électrode différents et un nombre d'électrodes formant le réseau égal. Et trois d'entre elles possèdent un nombre d'électrodes différent mais le rapport de largeur d'électrodes/distance inter-électrode étant égal.

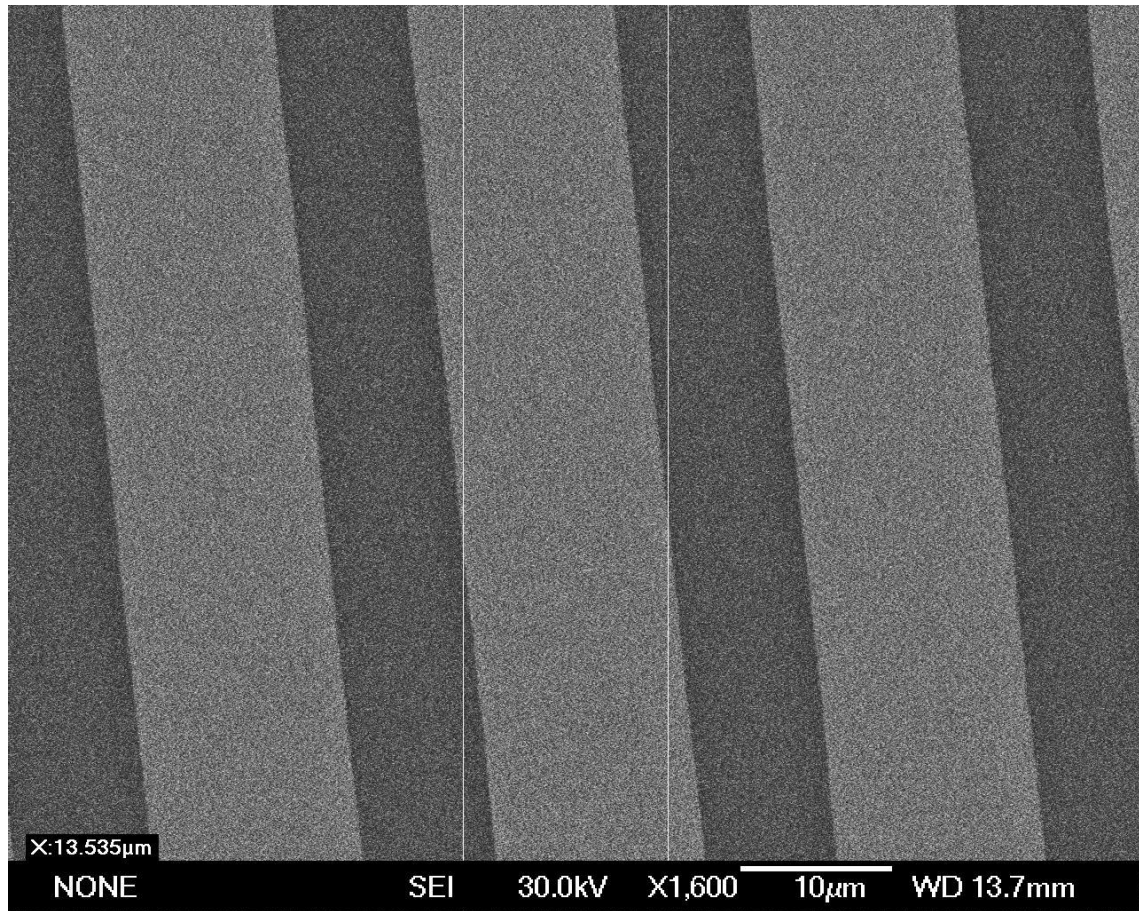


Figure III-1 : Photo MEB de la géométrie 5, $W = 15 \mu\text{m}$, $S = 10 \mu\text{m}$.

Numéro du dispositif	N	W (μm)	S (μm)	S/W	K_{Cell} (m^{-1})
4	20	30	20	0.66	90
5	40	15	10	0.66	43
6	80	8	5	0.66	21
7	40	5	20	4	87
8	40	20	5	0.25	30

Table III-1 : Paramètres des différentes géométries.

La figure suivante (Figure III-2) illustre le masque utilisé pour la réalisation des microélectrodes. Au début, l'objectif était de tester plusieurs géométries dont la

surface de contact n'est pas toujours la même pour les différents dispositifs mais à la fin nous avons opté pour 5 géométries présentant une surface de contact égale à 1 mm^2 (géométries 4, 5, 6, 7 et 8).

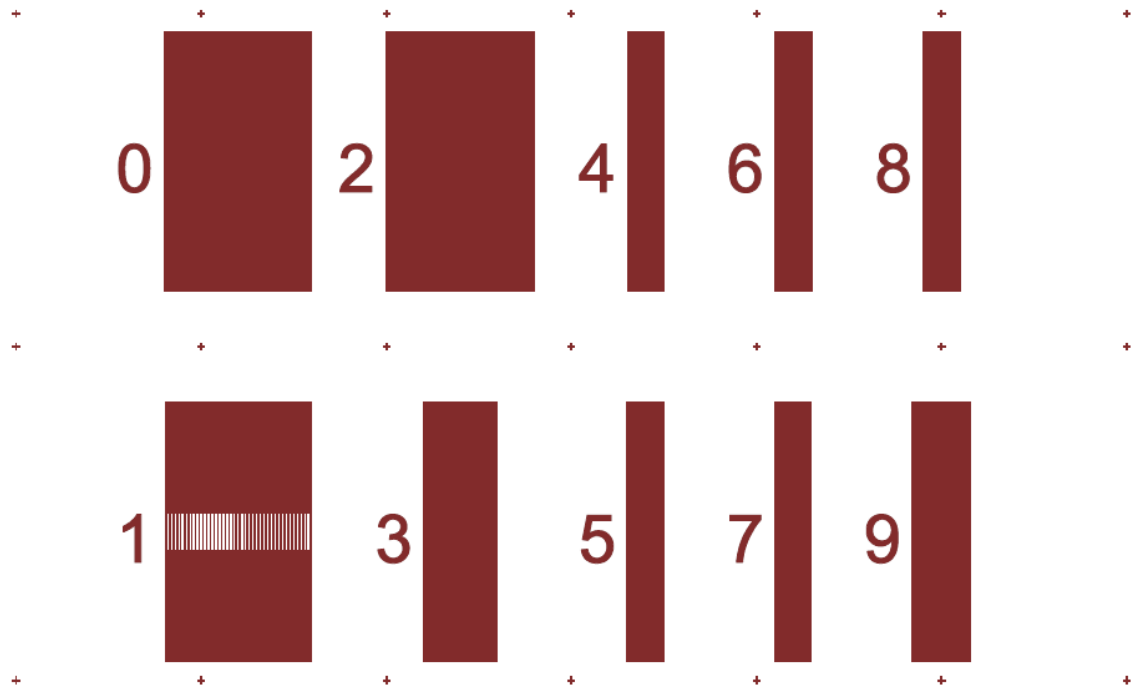


Figure III-2 : Schéma du masque 1 utilisé pour la réalisation des différentes géométries indiquées.

III.1.2.2 Géométries des puits

Les puits en SU 8 ont été réalisés par les techniques de lithographie directement au-dessus des substrats portant les électrodes. Les puits ont la forme carrée avec des Longueurs = Largeurs = 1 mm , et une épaisseur de $200 \mu\text{m}$.

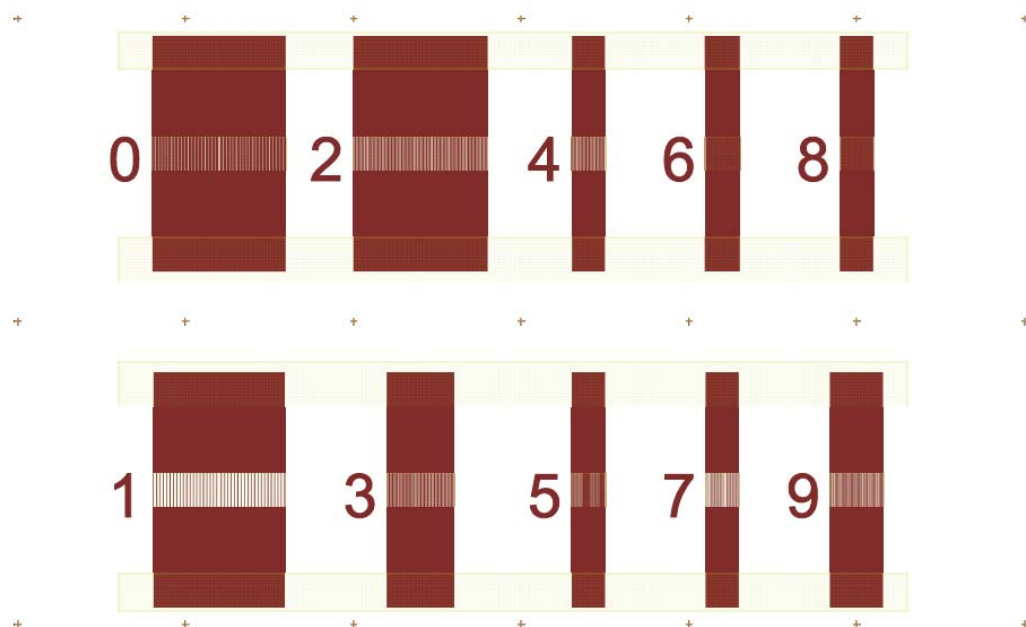


Figure III-3 : Schéma du masque 2 des puits superposé avec le masque 1 des électrodes.

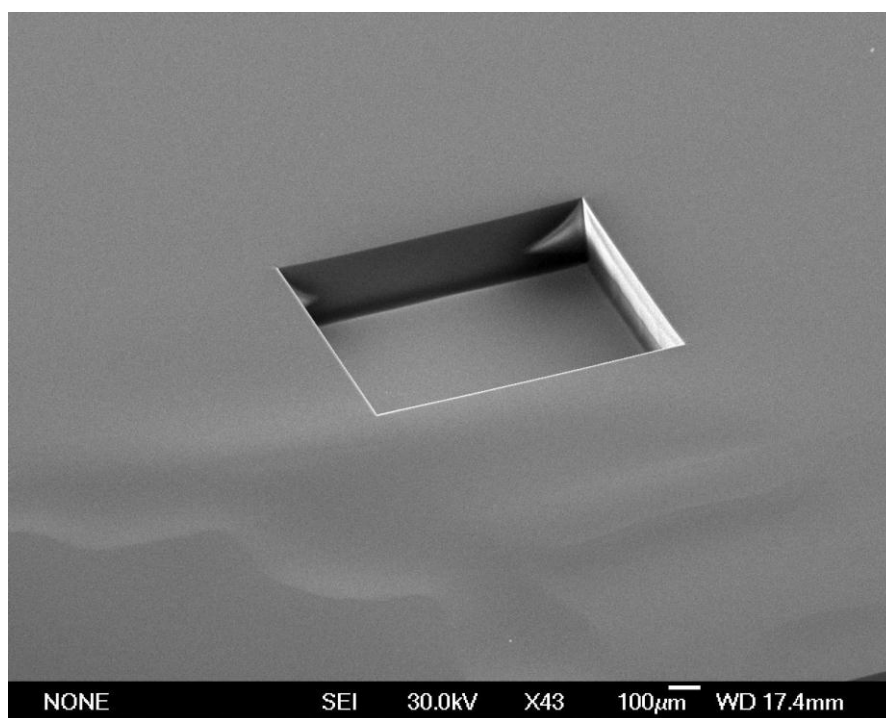


Figure III-4 : Photo prise au MEB d'un puits réalisé sur un substrat du verre sans les électrodes.

III.2 Procédé technologique

Nous détaillons dans ce paragraphe les différentes étapes du procédé de fabrication des dispositifs et de leur interface de mesure.

III.2.1 Fabrication des électrodes

III.2.1.1 Procédé de fabrication

Les électrodes sont réalisées sur des substrats rectangles de verre (2 cm x 2.5 cm de côté et 0.7 mm d'épaisseur). Avant le processus de dépôt en pulvérisation cathodique du platine, les substrats sont nettoyés successivement avec de l'acétone pendant 600s à 20°C sous ultrasons et de l'isopropanol pendant 10s à 20°C sans ultrasons.

Il n'y a pas eu besoin de déposer une couche adhérente (ex. couche de titane) entre le substrat du verre et les électrodes en platine qui est souvent utilisée pour maintenir ces derniers. Cependant, il a fallu faire un décapage des échantillons de verre avant le dépôt du platine sur la machine AC 450. Cette étape de décapage consiste à nettoyer la surface du substrat avec une gravure au plasma de type pulvérisation cathodique en utilisant l'Argon comme gaz de "process", avec un débit de 20 SCCM sur 120 secondes, une tension de 455 V et un faisceau de courant de 0.23 A, sur une cible DC de platine. La pression a été maintenue à 0.0072 mbar pendant tout le processus de décapage et la température du porte substrat était de 42 °C.

L'étape suivante consiste à déposer le platine sur les substrats de verre par pulvérisation cathodique toujours avec le même gaz (l'Argon) mais cette fois avec un débit différent de 16 SCCM et la même cible platine en DC à une tension aussi différente de 478 V. Le dépôt a été réalisé sous une pression de 0.003 mbar sur une durée de 64 secondes avec une température du porte substrat de 34 °C pour réaliser une couche de platine de 100 nm.

La résine positive S1813 est ensuite déposée à la tournette Gyrset RC5, capot ouvert, pendant 60 secondes sur les substrats couverts de platine avec une vitesse de 3000 tours/min et une accélération de 5000 tours/min/sec pour obtenir une

couche de résine de l'ordre de $1\mu\text{m}$ d'épaisseur. Les substrats sont ensuite recuits pendant 60 secondes à 115°C sur des plaques chauffantes.

Après cela, ils sont exposés pendant 3 secondes sous une lampe UV à une longueur d'onde de 360 nm avec une puissance 11 mW/cm^2 au travers d'un masque optique en contact avec l'échantillon. Celui-ci est réalisé en Chrome (masque 1) par lithographie électronique. Cette machine permet d'insoler un substrat recouvert de résine photosensible à travers un masque, et d'obtenir ainsi après révélation les motifs du masque, ou son inverse si l'on travaille avec une résine négative.

La résine photosensible exposée est ensuite retirée en immergeant et en agitant le substrat dans du photo-développeur MF319 pendant 40 secondes à 20°C . Les substrats sont enfin rincés pendant 10 secondes dans de l'eau dé-ionisée à la température ambiante 20°C .

Une fois que la résine a été développée selon les motifs précédemment décrits, une gravure ionique IBE de la couche platine, non couverte par la résine, est réalisée jusqu'au substrat de verre par un faisceau d'ion d'Argon à une pression de 0.000207 mbar, une tension de 200 V et d'un courant de 2.56 mA. Le porte-substrat avait une tension de 300 V et un courant de 1.01 mA. Le temps de gravure était de 4300 secondes avec une dose de courant de 72 mA/min.

Finalement, l'excès de métal est retiré en même temps que le reste de résine par un procédé classique de lift-off en immergeant successivement les substrats pendant 18000 secondes dans de l'acétone sous ultrasons et ensuite dans de l'isopropanol pendant 10 secondes à 20°C sans ultrasons.

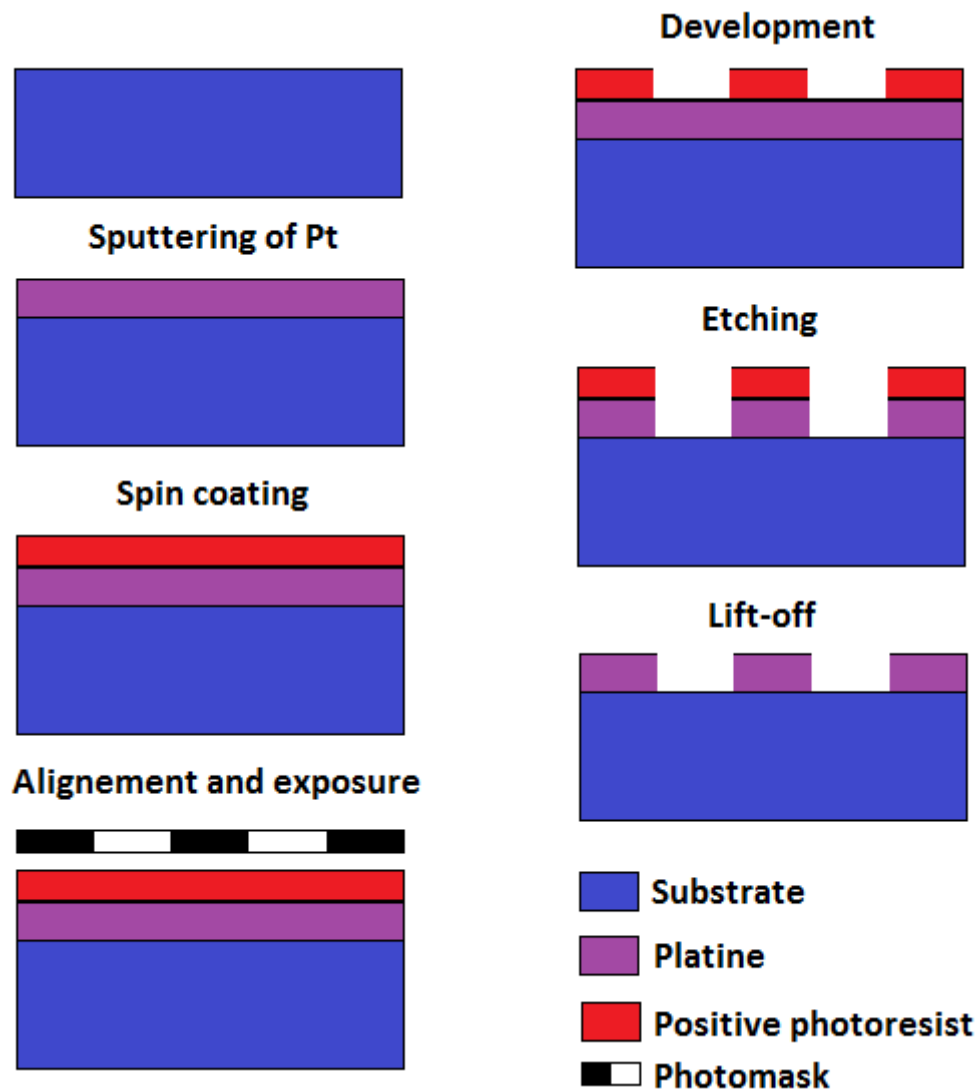


Figure III-5 : Etapes technologiques de fabrication des électrodes.

III.2.2 Fabrication des puits

Les puits sont réalisés avec la résine SU 8 de type 3050 directement sur les substrats de verre portants les électrodes en platine par un processus de lithographie optique compliqué et assez long.

Avant le processus de photolithographie de la résine, les substrats sont nettoyés à la tournette Gyrset RC8 successivement avec de l'acétone et de l'isopropanol suivis d'un flux d'azote pendant 30 secondes à 20°C.

L'enduction du promoteur d'adhérence MCC Primer 80/20 sur les substrats est une étape nécessaire afin de bien faire adhérer la résine SU 8 sur le verre. L'enduction a été réalisée à la tournette Spin 150 avec une vitesse de 7000 tours/min et une accélération de 1000 tours/min/sec pendant 30 secondes. Les substrats sont ensuite recuits sur une plaque chauffante d'une température de 115°C pendant 30 secondes.

La résine négative SU 8 3050 est déposée par la suite sur les substrats à la tournette Spin 150 successivement en deux étapes et sans ouvrir le capot de la tournette. La première étape consiste à appliquer une vitesse de 500 tours/min avec une accélération de 100 tours/min/sec pendant 15 secondes et la deuxième étape consiste à appliquer une vitesse de 1000 tours/min avec une accélération de 300 tours/min/sec pendant 30 secondes pour obtenir une couche de résine d'environ 200µm d'épaisseur.

Avant de faire exposer les substrats portant les électrodes et la résine SU 8 sous UV, il fut nécessaire de passer par les trois phases suivantes : une phase de relaxation, un premier recuit (Soft Bake) et une phase de refroidissement.

La phase de relaxation consiste à laisser les substrats sur une surface plane et recouverts d'un verre de montre pendant 24 heures à température ambiante de 20°C. Cette phase permet de supprimer les bulles d'air emprisonnées dans la résine et d'homogénéiser l'épaisseur de la résine sur toute la surface et ainsi diminuer les effets de bord.

Dans un second temps, les substrats sont recuits (premier recuit, Soft Bake) sur la plaque chauffante Hot-Plate à une température de 95°C sur deux phases consécutives et différentes pendant un temps total de 45 minutes. La première comprend une descente des substrats à mi-parcours pendant 120 secondes puis un contact de la plaque durant 900 secondes. La deuxième consiste en une descente directe des substrats sur la plaque puis un contact durant 1800 secondes.

Après cela les substrats sont refroidis pendant 10 minutes à la température ambiante 20°C sur une surface plane.

Par la suite, les substrats sont exposés pendant 37.5 secondes sous la lampe UV à une longueur d'onde de 360 nm avec une puissance 11 mW/cm², au travers d'un

masque optique en contact avec l'échantillon, réalisé en Chrome (masque 2) par lithographie électronique. Les substrats composés des électrodes recouvertes de résine photosensible négative sont insolés à travers le masque, pour obtenir ainsi après révélation l'inverse des motifs du masque.

Un microscope est aussi utilisé pour permettre d'aligner le dessin du masque 2 avec les motifs des électrodes en platine déjà développées sur les substrats pour une construction optimale des micro-puits.

Une fois que les substrats sont exposés au rayonnement UV, un deuxième recuit (Post Exposure Bake) des substrats sur la plaque chauffante Hot-Plate HP8 à une température 95°C pendant 5 minutes est réalisé jusqu'à l'apparition de l'image latente du masque sur la résine.

Il faut noter que si l'image du masque n'apparaît pas après ce deuxième recuit : l'exposition et/ou la température de recuit insuffisant(e).

Cela est suivi d'une phase de refroidissement des substrats sur une surface plane pendant 5 minutes à la température ambiante avant de faire le développement de la résine.

La résine négative photosensible est ensuite retirée en immergeant les substrats dans du photo-développeur SU 8 Developer et en les agitant pendant 10 minutes à 20°C. Les substrats sont enfin rincés en les agitant pendant 10 secondes dans de l'isopropanol.

Finalement les substrats portant les électrodes avec les puits sont recuits pour la troisième fois (Hard Bake) sur la plaque HP 8 à une température variante de 150°C jusqu'à 200°C pendant quelques minutes.

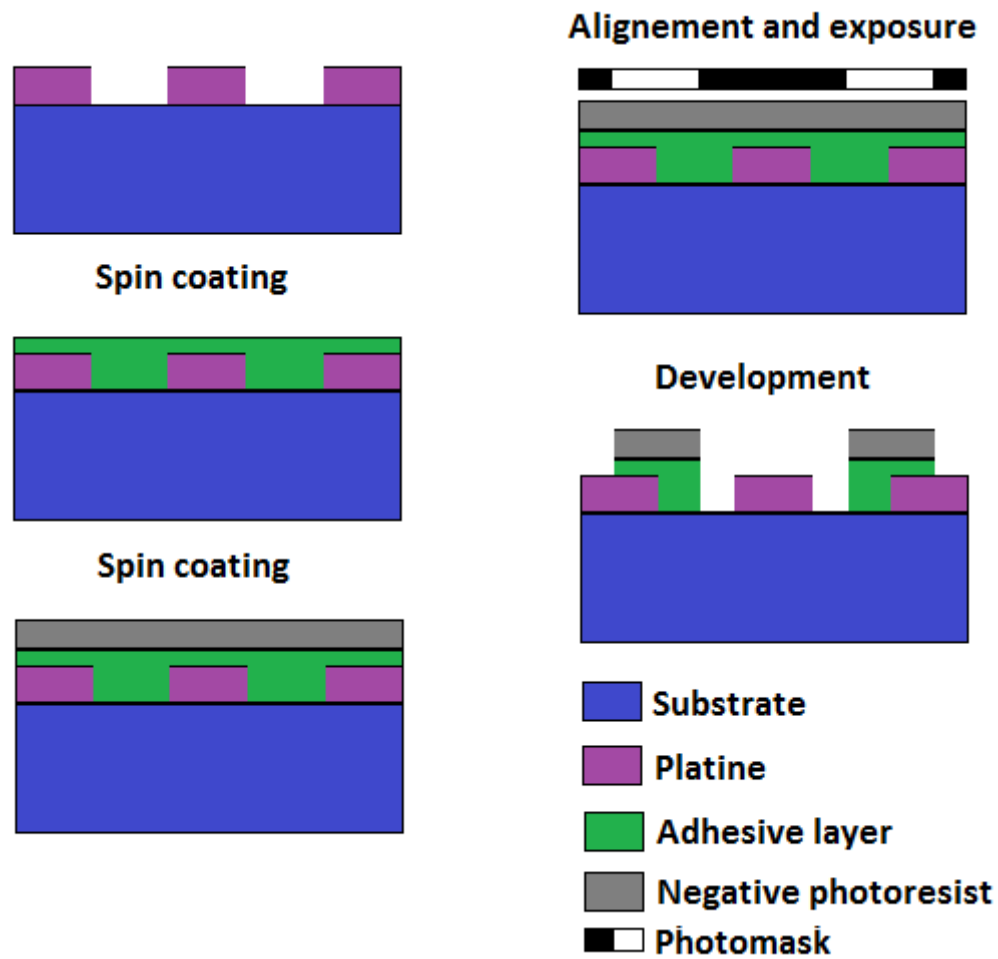


Figure III-6 : Etapes technologiques de fabrication des puits.

III.2.3 Problème liés aux réseaux d'électrodes court-circuitées

Pendant la réalisation des microélectrodes interdigitées, certains réseaux ont été court-circuités. Il est en effet difficile d'éviter le dépôt de la moindre poussière sur une surface de 1 mm^2 (aire d'un carré de 1 mm de côté).

Plus les dimensions des électrodes sont petites, plus la présence d'une poussière au sein du réseau a de chances de provoquer une liaison métallique entre les électrodes et donc un court-circuit.

Ce problème devient particulièrement gênant pour la réalisation des réseaux d'électrodes de $5 \mu\text{m}$ qui contiennent dans une surface de 1 mm^2 40 électrodes. En

effet, si une seule électrode sur les 40 du réseau se court-circuite, le réseau entier devient inutilisable.

Si une poussière se dépose avant l'enduction de la résine, elle empêchera la résine de s'y déposer correctement et risque de la décoller pendant la révélation. Si une poussière se dépose après cette enduction, elle empêchera l'exposition correcte de la résine.

La conséquence de l'une ou l'autre de ces situations est le dépôt accidentel de métal entre deux électrodes (Figure III-7) ce qui provoque le court-circuitage de l'ensemble du réseau.

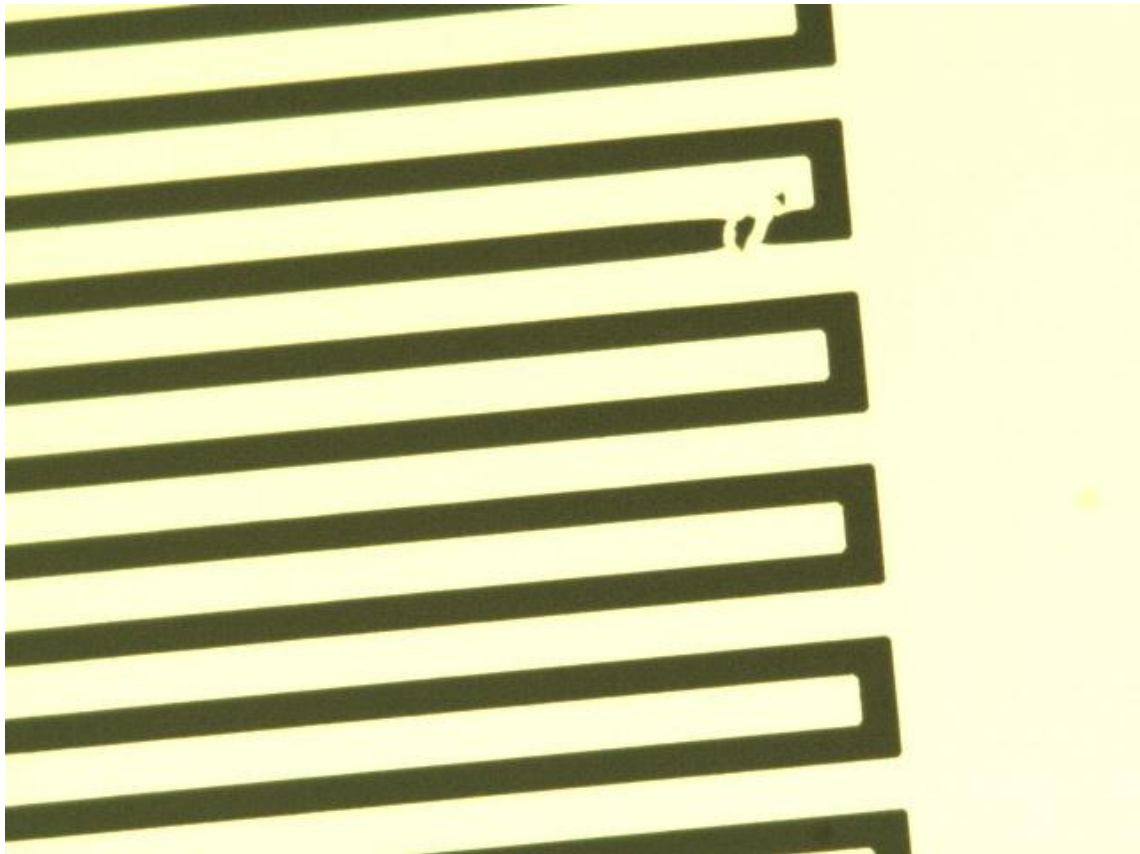


Figure III-7 : Photo d'électrodes court-circuitées prise au microscope.

La solution choisie pour résoudre ce problème technique récurrent a été d'injecter dans le réseau un courant suffisamment important pour évaporer le métal au niveau d'une zone fragilisée de l'électrode court-circuitée. En injectant un courant de plus en plus important, l'effet joule augmente la température des électrodes, particulièrement au niveau du court-circuit.

III.3 Connexion des micro-dispositifs au matériel de mesure

Pour connecter nos micro-dispositifs, nous aurions pu utiliser des pointes couramment employées pour la caractérisation de système microélectronique ou des circuits imprimés. Les pointes présentent l'avantage de pouvoir réaliser un contact électrique très rapidement au dispositif. Seulement ce contact peut être assez fragile et entraîner une variabilité de la résistance de contact difficilement contrôlable.

Nous avons donc opté pour des circuits imprimés qui permettent d'assurer un contact électrique stable avec une facilité dans la mise en œuvre des expériences biologiques.

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé un impédance-mètre très récent basé sur un amplificateur à verrouillage : le HF2IS Impedance Spectroscope, de Zurich Instrument.

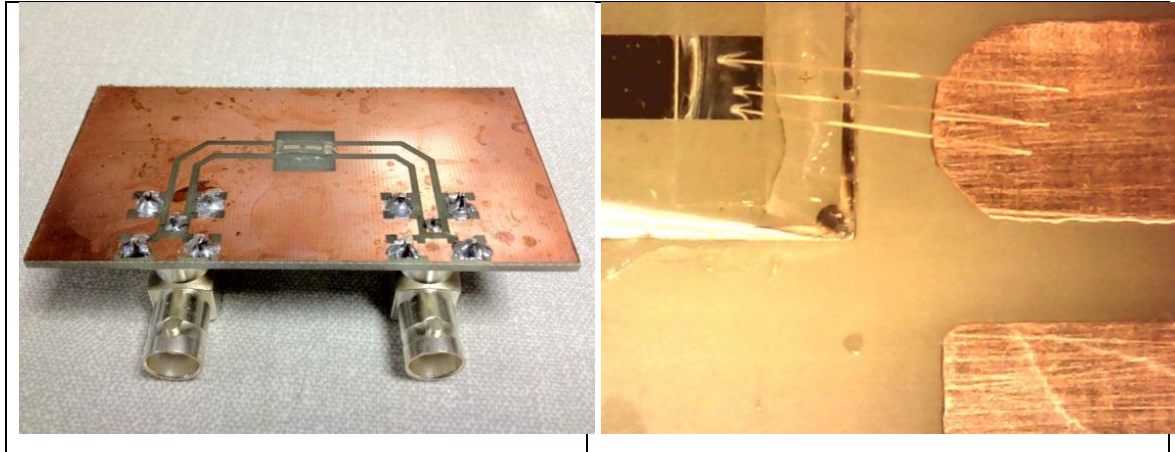
Pour éviter tout parasite entre les dispositifs et améliorer la manipulation des échantillons biologiques, nous avons jugé utile de ne pas monter les cinq dispositifs sur un même circuit imprimé. Chaque réseau de microélectrodes a été monté sur un circuit imprimé séparément.

Pour relier l'impédance-mètre à ces circuits imprimés, nous avons choisi d'utiliser des câbles BNC.

III.3.1 Connexion des dispositifs aux circuits imprimés

Les dispositifs ont été connectés aux circuits imprimés par des fils d'or (Bonding). Pour réaliser cette soudure, nous avons dû déposer de l'or en soudant par pression avec des ultrasons, et avec éventuellement un chauffage du substrat. Les fils d'or ont un diamètre de 25 μm .

Ces soudures sont visibles sur la Figure III-8.



**Figure III-8 : Photo du micro-dispositif monté sur son circuit imprimé (gauche).
Connexion par fil d'or (bonding) du dispositif à son circuit imprimé (droite).**

III.4 Conclusion

Ce chapitre bien que principalement descriptif est essentiel. Il nous a permis de présenter les différents critères qui ont guidé la conception des Bio-MEMS utilisés pour nos mesures d'impédancemétrie. Concernant le choix des matériaux, nous avons utilisé des substrats en verre car ils sont transparents, nous avons choisi de réaliser des électrodes en platine car c'est l'un des métaux les plus conducteurs et plus stables et pour les réservoirs des échantillons biologiques, la résine SU8 car c'est un matériau transparent, biocompatible et ainsi facilite le prototypage des techniques classiques de lithographie. Pour connecter nos micros dispositifs aux appareils de mesures, nous avons utilisé des BNC classiques et des circuits imprimés pour assurer une résistance de contact minimale et reproductible.

IV. Spectroscopie de Bioimpédance et caractérisation du sang par un microcapteur à électrodes interdigitées

Ce quatrième et dernier chapitre traite de la mesure d'impédance sur des échantillons biologiques sanguins.

Dans un premier temps nous décrivons le dispositif expérimental utilisé pour la mesure ainsi que la procédure de manipulation associée.

Dans un deuxième temps, nous abordons la caractérisation des microélectrodes par des mesures à vide. Des mesures sur des solutions étalons sont ensuite effectuées permettant ainsi d'analyser le comportement des capteurs en charge.

Dans une troisième partie, les résultats obtenus sur les échantillons sanguins sont présentés. L'importance de l'influence de certains facteurs (température, le temps de mesure...) sur l'échantillon sont analysés. Nous discutons aussi de la validation expérimentale du système et de la méthode développés en termes de reproductibilité et de sensibilité.

IV.1 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est illustré en Figure IV-1. Il se compose des éléments suivants :

- L'impédance mètre HF2IS couvrant une gamme de fréquences de 100 HZ à 10 MHz.
- L'amplificateur et convertisseur courant-tension faible bruit (HF2TA).
- Le biocapteur à électrodes interdigitées.
- Un microscope pour le contrôle du positionnement du volume fluide.
- Un thermomètre pour mesurer la température ambiante.
- Un ordinateur pour le contrôle des acquisitions et le traitement des données.

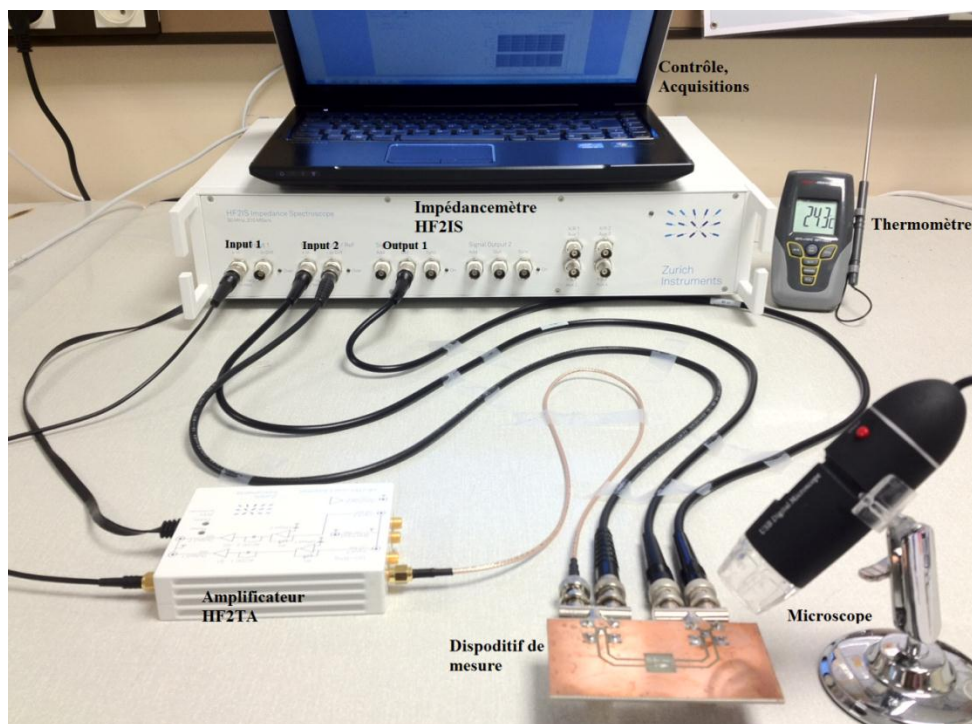


Figure IV-1 : Dispositif expérimental composé de l'impédance mètre HF2IS, de l'amplificateur HF2TA, du dispositif de mesure, d'un microscope, d'un thermomètre et de l'ordinateur pour le pilotage des acquisitions.

IV.1.1 L'impédance mètre HF2IS

Le HF2IS est un appareil spécifiquement destiné à la spectroscopie d'impédance électrique. Plusieurs équipes l'ont déjà utilisé dont celle de Renaud à l'EPFL-Lausanne dont les travaux sur le sujet sont une référence. Ce domaine croissant profite de nombreuses avancées de la mesure électronique et des outils d'interprétation amenant la spectroscopie d'impédance électrique au niveau d'autres méthodes déjà établies.

Deux unités de mesure différentielles couvrent une large gamme de fréquence de 1 μ Hz à 50 MHz avec 4 démodulateurs de phase double. Le bruit de la tension d'entrée est très bas (5 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$) . L'instrument comporte :

- 2 unités de mesure de haute fréquence
- 2 générateurs de signal de multi-sinus de haute fréquence
- 1 Balayeuse de Réponse de Fréquence haute résolution
- 1 Analyseur de Spectre FFT haute résolution
- 1 oscilloscope de basse résolution (2048 échantillons) & FFT

L'impédance mètre HF2IS utilisé couvre une gamme de fréquences allant de 100 HZ à 10 MHz. Nous avons opté pour effectuer les mesures pour la méthode des 4 points. Cette méthode nécessite la mesure du courant traversant la charge (milieu) et de la tension à ces bornes mais présente une bonne précision.

Le signal d'excitation généré par l'impédancemètre est appliqué à l'électrode du capteur. La différence de potentiel V aux bornes de la charge est directement mesurée par l'entrée différentielle de l'impédancemètre (Input 2). Le courant I traversant la charge est amplifié et converti en tension par l'amplificateur HF2TA. L'image du courant est ensuite mesurée par l'entrée (signal Input 1).

Cependant nous obtiendrons la tension $V_{\text{input } 2} = V$ et la tension $V_{\text{input } 1} = K.I$.

L'impédance ainsi obtenue est déterminée par l'équation $Z = (V_{\text{input } 2}/V_{\text{input } 1}) \cdot K$. Où K est le facteur d'amplification choisi par l'utilisateur pour l'HF2TA.

IV.1.2 Utilisation et interfaces de mesure d'analyseur d'impédance

Pour mesurer une impédance, l'appareil enregistre le courant traversant le système lorsque celui-ci est soumis à une tension alternative d'amplitude connue. Pour réaliser un spectre d'impédance, le courant est mesuré en faisant varier progressivement la fréquence de la tension alternative d'excitation.

En effectuant pour chaque fréquence le rapport des amplitudes du courant et de la tension tout en mesurant leur déphasage, l'évolution fréquentielle de l'impédance complexe peut être déterminée. La spectroscopie d'impédance correspond à l'étude de cette évolution fréquentielle.

La durée de mesure d'un spectre fréquentiel varie selon la plage de fréquences étudiée (100 Hz – 10 MHz), le nombre de points de mesure (100 points), le type de moyenne effectuée sur ces points (moyenne de 2) et le type de balayage fréquentiel linéaire ou logarithmique (logarithmique).

Typiquement, la mesure d'un spectre fréquentiel avec le HF2IS Impedance Spectroscope en appliquant ces paramètres prend 45s.

IV.1.2.1 Enregistrement et traitement des données

Afin de rapatrier numériquement les données des mesures effectuées avec l'impédance-mètre, une application Labview® disponible avec l'instrument permet de saisir les paramètres de mesure décrits précédemment et d'enregistrer les valeurs des spectres d'impédance sous la forme de fichiers texte. Le transfert des données s'effectue par une liaison USB.

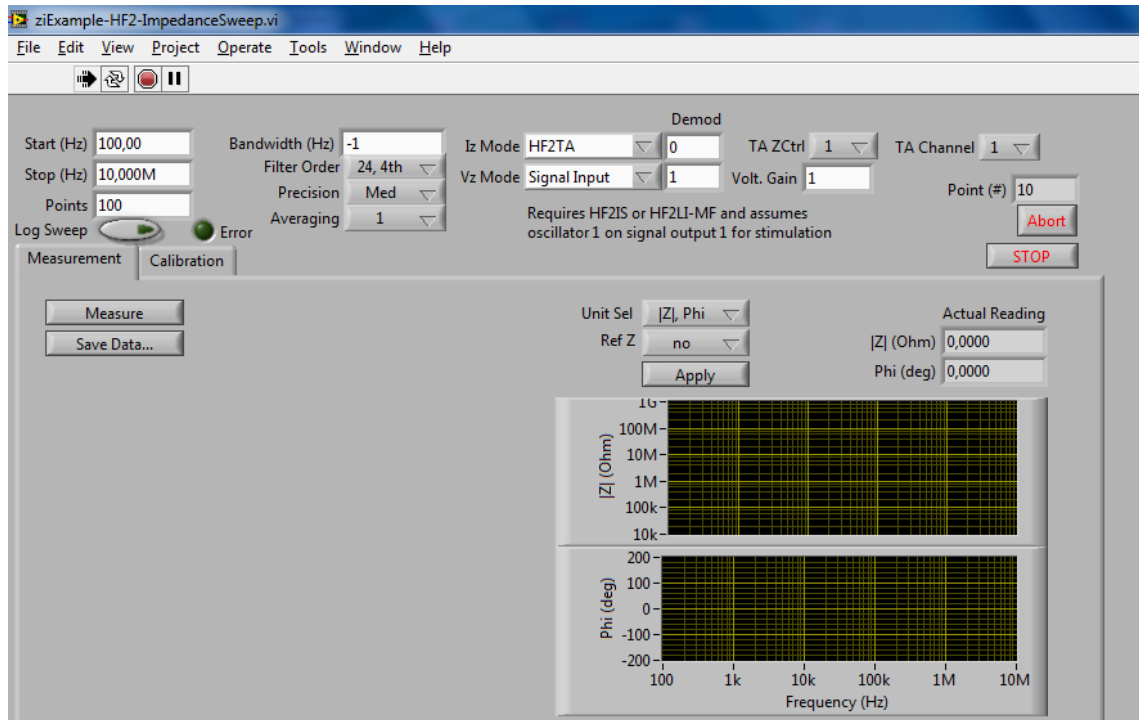


Figure IV-2 : Capture d'écran de l'application Labview permettant la commande de l'impédancemètre

IV.1.3 Manipulation de l'échantillon fluide

La manipulation des échantillons sanguins de très faibles volumes est une tâche difficile. Idéalement, le mode d'accès le plus pratique d'un point de vue applicatif est de déposer simplement le volume de l'échantillon à la surface des électrodes puis de réaliser la mesure.

Pour répondre à cette contrainte, nous avons opté pour un dépôt mécanique qui consiste à utiliser une micropipette de volume variable (Socorex, Acura 825) entre 0.1 μl et 2 μl (Figure IV-3).

En effet, le volume compris dans les réservoirs des microélectrodes est de 1mm*1mm*200 μm , soit 0.2 μl .

La micropipette est équipée d'un mécanisme de réglage de précision, le dosage est continuellement ajustable avec une résolution de volume très fine (3% d'erreur).

L'échantillon à déposer est prélevé dans un bécher de 5 ml et éjecté à une distance de quelques millimètres environ en direction du réservoir (capteur

interdigité) afin d'éviter tout contact physique entre la pointe de la micropipette et les électrodes. Cette tâche délicate, effectuée sous microscope, nécessite un entraînement pour éviter de rayer la surface des électrodes.

Pour décrocher de façon efficace la microgoutte ; la pointe de la micropipette devait entrer en contact avec les bords du réservoir des électrodes (Figure IV-4), réalisé en matière SU 8, sous contrôle d'un microscope commercial présentant l'avantage de contrôler le dépôt de nos volumes qui sont particulièrement faibles.



Figure IV-3 : La micropipette utilisée (Micropipette Socorex, Acura 825) pour déposer le volume fluide de 0.2 µl.

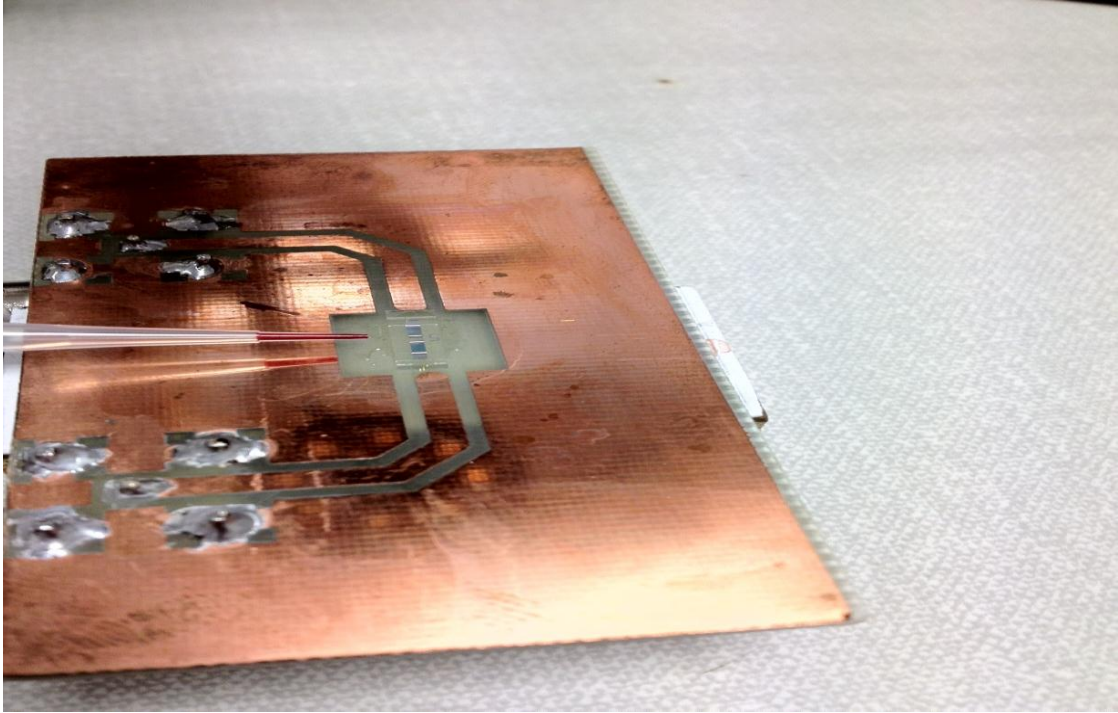


Figure IV-4 : Illustration du dépôt du volume fluide par micropipette dans le réservoir du capteur.

IV.2 Caractérisation des électrodes

Dans la suite de ce chapitre, le terme “capteur” sera utilisé pour désigner les dispositifs interdigités montés sur circuit imprimé et utilisés pour les mesures.

La première caractérisation de nos systèmes a été réalisée en effectuant une série de mesures avec les électrodes à vide, (sans charge). Ce type de mesure nous donne accès à la capacité de couplage entre les électrodes et par la suite à la détermination de la permittivité du système à vide.

Avant de tester nos capteurs avec des échantillons de sang humain, le comportement du capteur interdigité de mesure d'impédance a été évalué en utilisant des solutions étalons ; une solution ionique de chlorure de sodium (NaCl) et une solution d'eau distillée. Ces mesures nous donnent des informations sur la réponse des électrodes exposées à des charges ioniques mobiles. D'après les résultats obtenus nous pouvons valider nos capteurs interdigités par la comparaison du facteur de forme mesuré et théorique.

IV.2.1 Caractérisation à vide des microélectrodes

Les deux figures suivantes (Figure IV-5, Figure IV-6) présentent les spectres d'impédance et de phase respectivement obtenus avec les cinq capteurs lors de mesure à vide. La plage fréquentielle étudiée va de 100 Hz à 10 MHz.

Toutes ces mesures montrent les caractéristiques fréquentielles d'une capacité avec une décroissance linéaire de l'impédance en fonction de la fréquence f . La phase est constante autour de -90° (sauf entre 10^2 - 10^4 Hz où elle présente des fluctuations).

Cette capacité est provoquée par l'air ou/et le substrat de verre portant les microélectrodes qui agissent tous les deux comme des isolants entre les électrodes de polarisations. Ces spectres d'impédance confirment en même temps l'absence de tout court-circuit dans les réseaux d'électrodes.

Sur les graphiques, nous constatons que les écarts types et les variations d'impédance et de déphasage issus des spectres des cinq géométries sont plus élevés en basses fréquences (10^2 - 10^4 Hz) qu'en moyennes fréquences et hautes fréquences. Ces variations importantes sont dues aux impédances très élevées ($> 10\text{ M}\Omega$) mesurées. Comme ces impédances sont très grandes, l'impédance-mètre mesure un très faible niveau de courant électrique, avec un rapport signal sur bruit faible ce qui dégrade la qualité de la mesure et par conséquent les analyses à vide.

Pour déterminer la capacité de couplage équivalente de ces systèmes à vide, nous avons calculé la capacité issue de l'amplitude d'impédance de ces spectres à différentes fréquences (100 KHz, 1 MHz et 10 MHz) selon la formule d'impédance dans le cas d'un condensateur:

$Z = \frac{1}{C_{cell} \cdot \omega}$	Équation IV-1
---------------------------------------	---------------

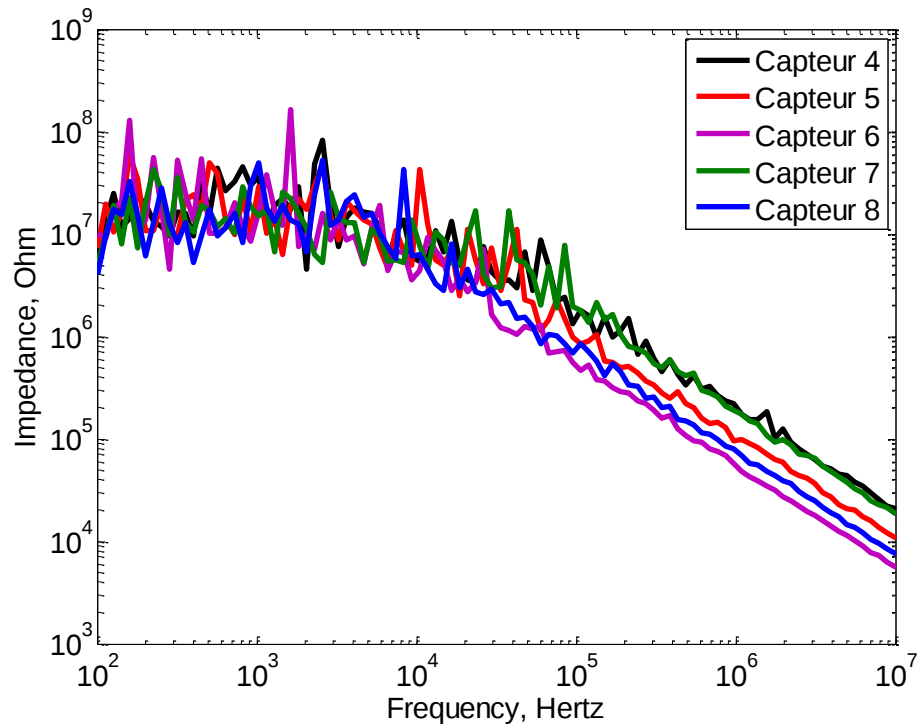


Figure IV-5 : Mesures moyennées de l'impédance à vide des différents capteurs.

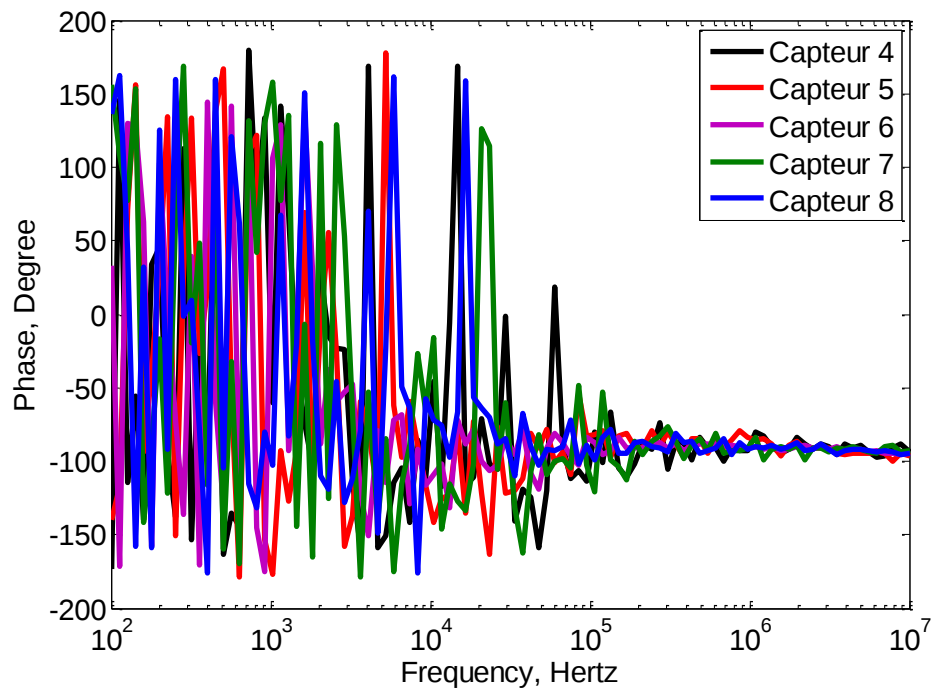


Figure IV-6 : Mesures moyennées de la phase à vide des différentes géométries d'électrode.

Nous avons ensuite moyenné les différentes valeurs obtenues.

D'après cette analyse, les électrodes des capteurs présentent une capacité de 0.74 pF, de 1.47 pF, 3.02 pF, 0.84 pF, 2.04 pF pour les capteurs 4, 5, 6, 7 et 8 respectivement.

D'après l'Équation II-6 et la Table III-1, ces valeurs de capacités nous permettent de calculer la permittivité relative du milieu diélectrique mesurée entre les électrodes. La table suivante (Table IV-1) présente les permittivités diélectriques relatives obtenues avec les différentes géométries interdigitées :

	Capteur 4	Capteur 5	Capteur 6	Capteur 7	Capteur 8
ϵ_r à vide	7.28	7.04	7.14	8.04	6.77

Table IV-1 : Permittivités diélectriques relatives mesurées à vide avec les différents capteurs.

Ces permittivités diélectriques relatives ne correspondent pas à celle de l'air dont la valeur est de 1, mais correspondent aux permittivités diélectriques du verre qui est entre 5 et 8 (CRM, 2000).

Ces résultats montrent que les lignes de champ électriques ne circulent pas dans l'air mais bien dans le verre.

En effet, le verre possède une permittivité diélectrique relative comprise entre 5 et 8 et une résistivité électrique comprise entre 1.10^9 et $3.98.10^{11} \Omega.m$ (CRM, 2000).

Alors que l'air sec possède à 18°C une permittivité diélectrique relative de 1 et une résistivité électrique d'environ $4.10^{14} \Omega.m$ (CRM, 2000).

Pour les courants de déplacement, d'après l'Équation II-6, l'air présente donc une capacité plus faible que celle du verre. L'impédance présentée par l'air est ainsi plus élevée que celle présentée par le verre (Équation IV-1). Les courants de déplacement ont donc tendance à se propager plus dans le verre que dans l'air.

De même pour les courants de conduction, ici très faibles, l'air possède une résistivité électrique au moins 1000 fois supérieure au verre. Les courants de

conduction passent donc préférentiellement par le substrat en verre plutôt que par l'air ambiant.

Les mêmes remarques peuvent être faites à propos des réservoirs, la SU8 possède une permittivité diélectrique relative de 3 environ (microchem.com) et donc une capacité plus faible que celle du verre et une impédance plus élevée (résistivité d'environ $7.8.10^{12} \Omega.m$).

IV.2.2 Caractérisation des microélectrodes par des solutions étalons – Validation des systèmes

IV.2.2.1 Validation expérimentale des microélectrodes

Nous présentons ici les résultats expérimentaux obtenus sur deux solutions étalons de NaCl et l'eau distillée avec les cinq géométries à structure interdigitées que nous avons réalisées. Une procédure complémentaire de celle précédemment décrite sur les électrodes à vide est présentée. Elle porte sur la validation à l'aide de solutions étalons.

IV.2.2.1.1 Mesures sur solutions salines calibrées

Afin de valider les systèmes de microélectrodes, des mesures ont été entreprises sur des solutions étalons à différentes conductivités. Les mesures sont réalisées à une température ambiante stable. Le capteur est nettoyé après chaque mesure. Les courbes des figures suivantes : Figure IV-7, Figure IV-8, Figure IV-9, Figure IV-10 et Figure IV-11, représentent le module et la phase d'impédance obtenus pour les deux solutions étalons calibrées de conductivités différentes pour les cinq géométries. Chaque courbe représentée correspond à la moyenne d'au moins 3 acquisitions successives.

Les figures montrent les spectres d'amplitude d'impédance en fonction de la fréquence pour deux solutions. La solution de NaCl dont la conductivité est de 0.7 S/m est proche de la conductivité du sang (Gabriel, 1996), et l'eau dé-ionisée à une faible conductivité de $4.3.10^{-4}$ S/m.

En regardant les courbes associées aux résultats obtenus pour l'eau, il y a en général trois régions dans le spectre d'impédance pour les cinq géométries, qui

correspondent chacune au comportement des trois types de composants du circuit électrique équivalent de la Figure II-4:

- L'impédance capacitive avec une décroissance linéaire en fonction de la fréquence ($1/f$) et une phase quasi-constante et proche de -90° pour des fréquences $f < 1$ kHz ; effet de la capacité de double couches C_{DL} .
- Puis, cette contribution diminue et une région en forme de plateau devient visible pour des fréquences ($1 \text{ KHz} < f < 100 \text{ KHz}$). Dans cette région, la phase est supérieure à -30° et atteint -20° au sommet de la courbe. Ces déphasages produits devraient être en théorie négligeables. L'existence de capacités parasites en parallèle avec le milieu d'étude pourrait être à l'origine de ce déphasage. La valeur de l'impédance du plateau est déterminée par la résistance de la solution R_{Sol} .
- A des fréquences encore plus élevées ($f > 100 \text{ kHz}$), l'impédance diminue avec la fréquence et le déphasage redevient capacitif avec des valeurs proches de -90° . Ce comportement est fortement dominé par la capacité de la cellule C_{Cell} .

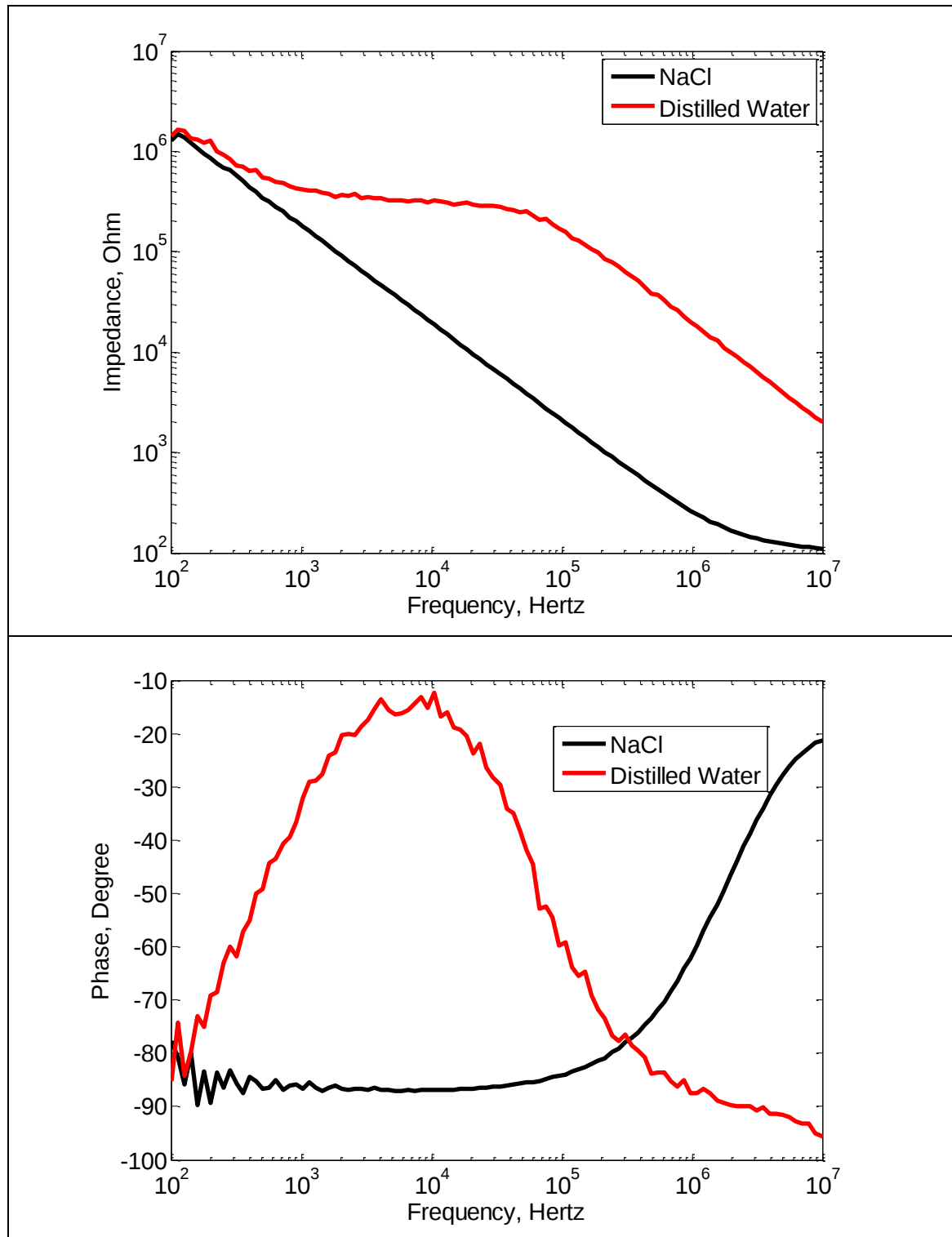


Figure IV-7 : Mesures moyennées de l'impédance (en haut) et de la phase (en bas) de l'eau distillée et du NaCl effectuées avec le capteur 4.

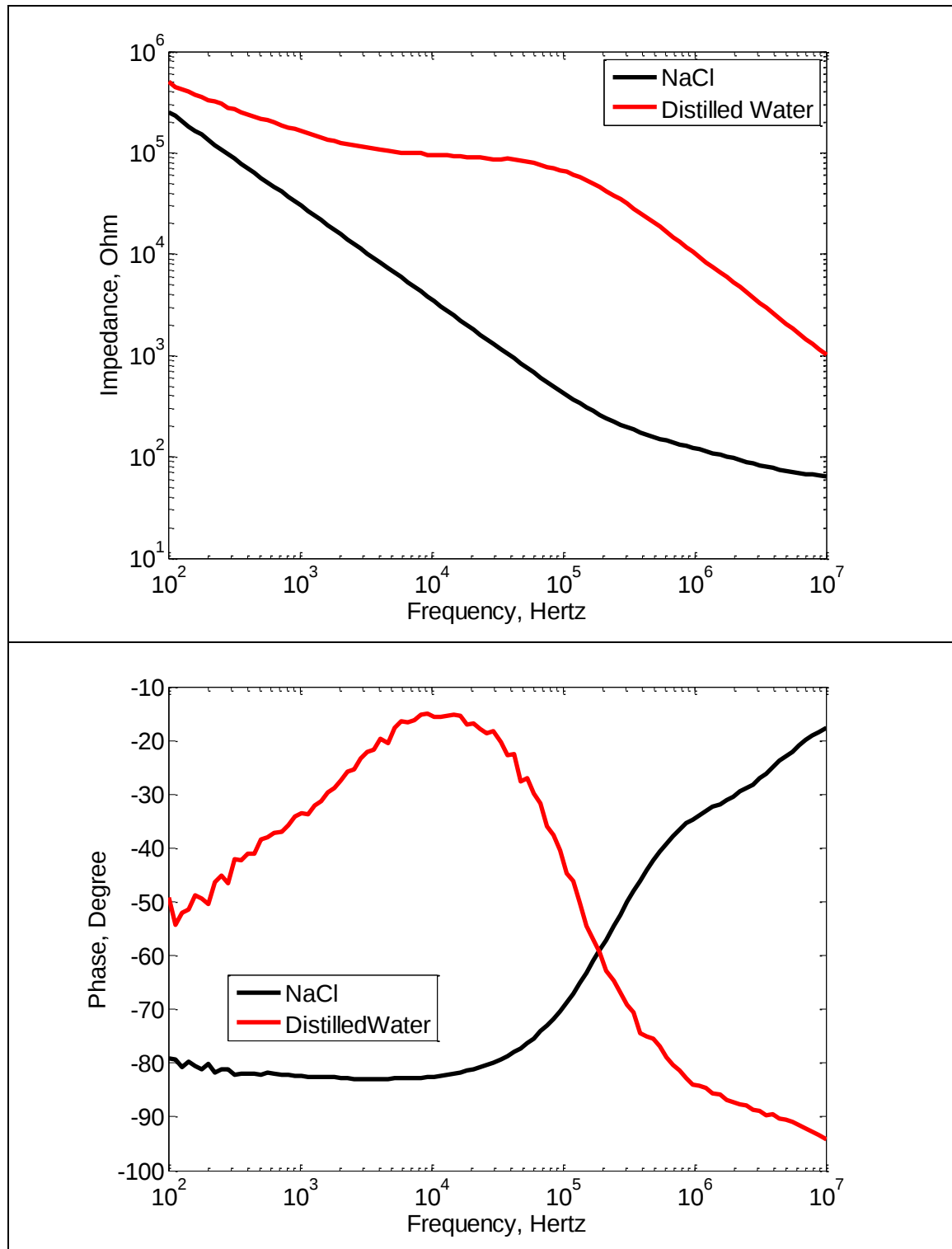


Figure IV-8 : Mesures moyennées de l'impédance (en haut) et de la phase (en bas) de l'eau distillée et du NaCl effectuées avec le capteur 5.

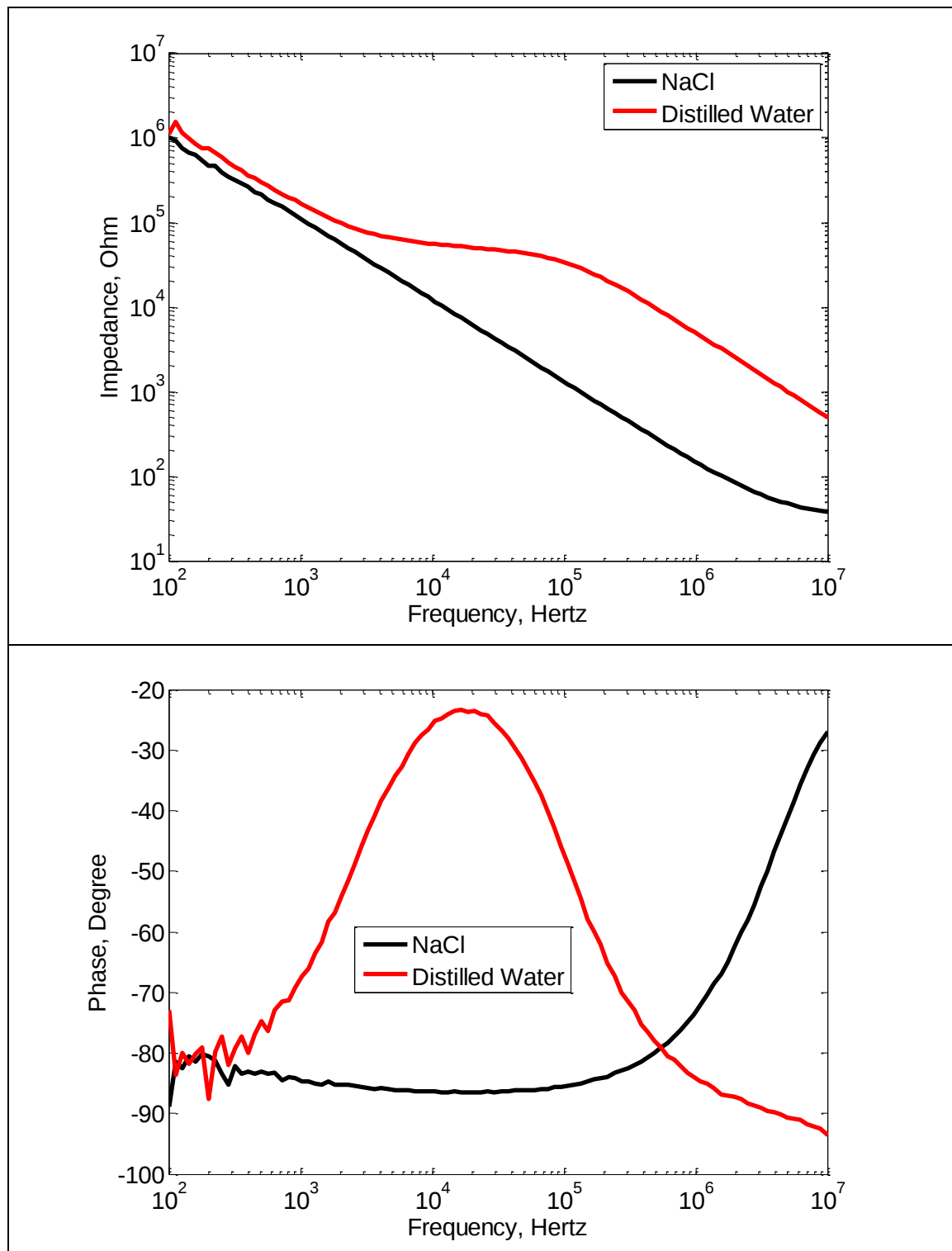


Figure IV-9 : Mesures moyennées de l'impédance (en haut) et de la phase (en bas) de l'eau distillée et du NaCl effectuées avec le capteur 6.

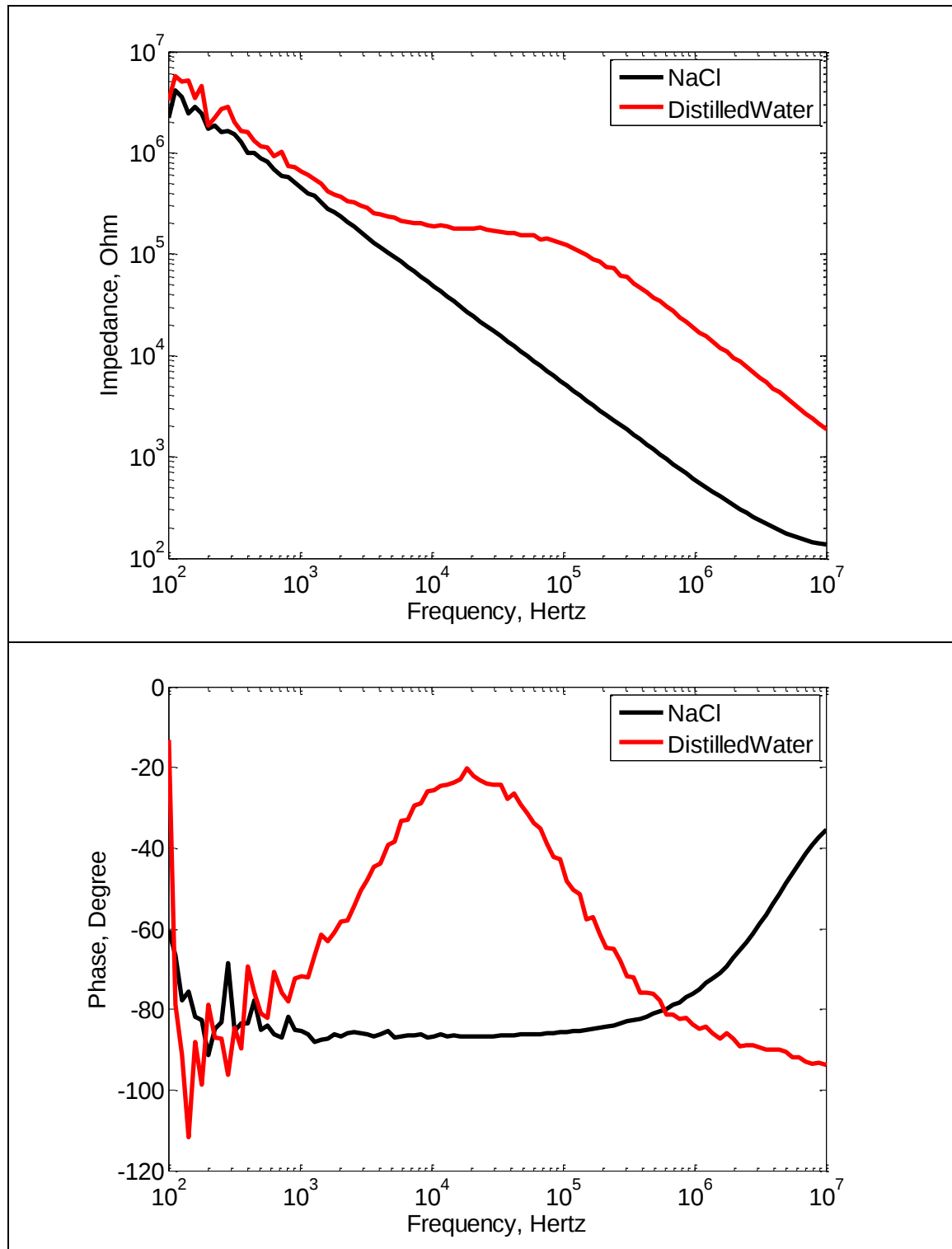


Figure IV-10 : Mesures moyennées de l'impédance (en haut) et de la phase (en bas) de l'eau distillée et du NaCl effectuées avec le Capteur7.

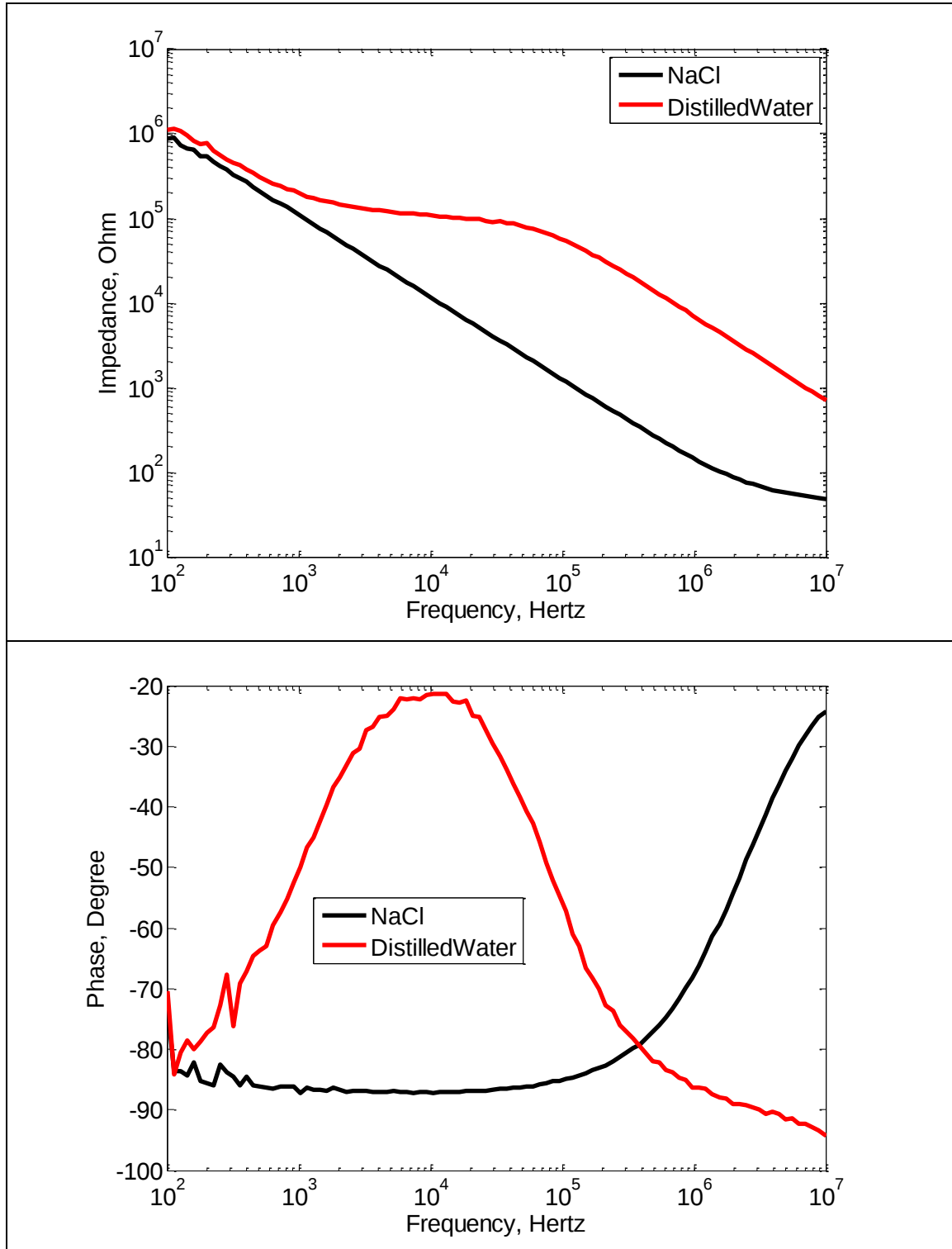


Figure IV-11 : Mesures moyennées de l'impédance (en haut) et de la phase (en bas) de l'eau distillée et du NaCl effectuées avec le capteur 8.

Les courbes associées aux résultats obtenus pour la solution NaCl ne présentent en général que deux régions dans le spectre d'impédance pour les cinq capteurs, et

non pas trois comme pour l'eau. Cela est lié à notre plage fréquentielle d'étude que nous avons limitée à une fréquence de 10 MHz. De plus, nous avons remarqué une réponse inadéquate de l'instrument au-delà de cette valeur.

La troisième région n'apparaît qu'au-dessus de cette fréquence. Ces deux régions correspondent bien au comportement des deux types de composants du circuit électrique équivalent de la Figure II-2:

- L'impédance capacitive avec une décroissance linéaire en $1/f$ et une phase quasi-constante et proche de -90° pour des fréquences ($f < 1$ MHz), qui est due à la capacité de double couche C_{DL} . Nous remarquons des variations de déphasages comme des parasites qui sont produits pour les fréquences ($f < 1$ KHz) et qui devraient être en théorie -90° . L'existence de ces déphasages est probablement due à la limitation de l'instrument en basses fréquences.
- Puis, cette contribution diminue et une région en forme de plateau devient visible pour des fréquences ($1 \text{ MHz} < f$). Dans cette région la phase est supérieure à -30° , et atteint -20° au sommet de la courbe. Les mêmes remarques que dans le cas précédent (eau). La valeur de l'impédance du plateau est déterminée par la résistance de la solution R_{Sol} .

Sur les courbes des deux solutions et pour les cinq capteurs, nous pouvons observer un comportement quasi-similaire, à savoir un module constant dans les fréquences intermédiaires pour l'eau et en hautes fréquences pour la solution de NaCl qui vient juste après une chute pour les fréquences les plus basses associées à une phase capacitive.

A titre d'exemple, pour le capteur 5, l'eau distillée de conductivité $4.3 \cdot 10^{-4} \text{ S/m}$ produit un module d'impédance d'environ $9 \cdot 10^4 \Omega$. La solution NaCl de 0.7 S/m un module de 65Ω . La distinction entre ces différentes conductivités pour les deux solutions utilisées est ainsi clairement visible. A ces fréquences, c'est-à-dire ($1 \text{ KHz} < f < 100 \text{ KHz}$) pour l'eau et ($1 \text{ MHz} < f$) pour NaCl, le comportement est purement résistif et le rapport des modules d'impédances est proche de l'inverse du rapport des conductivités. En connaissant la valeur des conductivités des solutions utilisées, il est ainsi possible d'estimer la valeur du facteur géométrique de cellule K_{Cell} par l'Équation II-4.

Sur la base de cette approximation, nous donnons dans la Table IV-2 les facteurs de cellule déterminés expérimentalement à partir des mesures sur les deux solutions. Les valeurs de R_{Sol} désignent les valeurs moyennes obtenues à partir de deux solutions. Ces valeurs sont également comparées à celles obtenues théoriquement par le biais de l'Équation II-5.

La capacité de cellule C_{cell} des électrodes dans le demi-espace au-dessus de la solution étalon ou en dessous du verre est donnée par l'Équation II-6.

Alors que pour le verre $\epsilon_r = 4$, $\epsilon_r \approx 80$ pour l'eau en raison de la grande polarisabilité électrique de la molécule d'eau. Ceci indique que la contribution dominante de la capacité de cellule est due à l'eau.

Par conséquent, nous pourrions nous baser sur l'Équation II-6 afin d'estimer le facteur de cellule K_{Cell} à partir des valeurs de C_{Cell} élevées des courbes de l'eau en hautes fréquences.

De même, nous donnons dans la Table IV-3 les facteurs de cellule déterminés expérimentalement à partir des mesures sur l'eau. Ces valeurs sont également comparées à celles obtenues théoriquement.

	$R_{Sol} (\Omega)$	$K_{Cell, \text{estimé}} (m^{-1})$	$K_{Cell, \text{théorique}} (m^{-1})$
Capteur 4	120	84	90
Capteur 5	65	45	43
Capteur 6	35	24	21
Capteur 7	129	90	87
Capteur 8	49	34	30

Table IV-2 : Facteur de cellule estimé d'après R_{Sol} .

	$1/C_{\text{Cell}} (.10^{12})$ (F ⁻¹)	$K_{\text{Cell, estimé}}$ (m ⁻¹)	$K_{\text{Cell, théorique}}$ (m ⁻¹)
Capteur 4	0.12	85	90
Capteur 5	0.06	42	43
Capteur 6	0.03	21	21
Capteur 7	0.12	85	87
Capteur 8	0.04	28	30

Table IV-3 : Facteur de cellule estimé d'après C_{Cell} .

Au regard des facteurs de cellules déterminés expérimentalement pour chaque géométrie et qui sont représentés dans la Table IV-2 et la Table IV-3, on constate une bonne concordance sur la détermination des facteurs de cellules en fonction de la conductivité de deux solutions dans la Table IV-2 et en fonction de la permittivité de l'eau dans la Table IV-3. On remarque également une bonne adéquation entre le facteur de cellule empirique déterminée par le biais de l'Équation II-4 (R_{Sol}) et le facteur de cellule déterminé par le biais de l'Équation II-6 (C_{Cell}).

Plusieurs explications peuvent être avancées sur l'écart entre le facteur de cellule théorique et expérimental. Il est possible, par exemple que les effets de bords induits par la résine SU 8 aux extrémités des électrodes, non pris en compte via la détermination théorique, ne soient pas négligeables dans la configuration réelle (Figure IV-12). De plus l'épaisseur non nulle du dépôt métallique constituant les électrodes peut également avoir une influence sur la distribution du courant électrique dans le milieu.

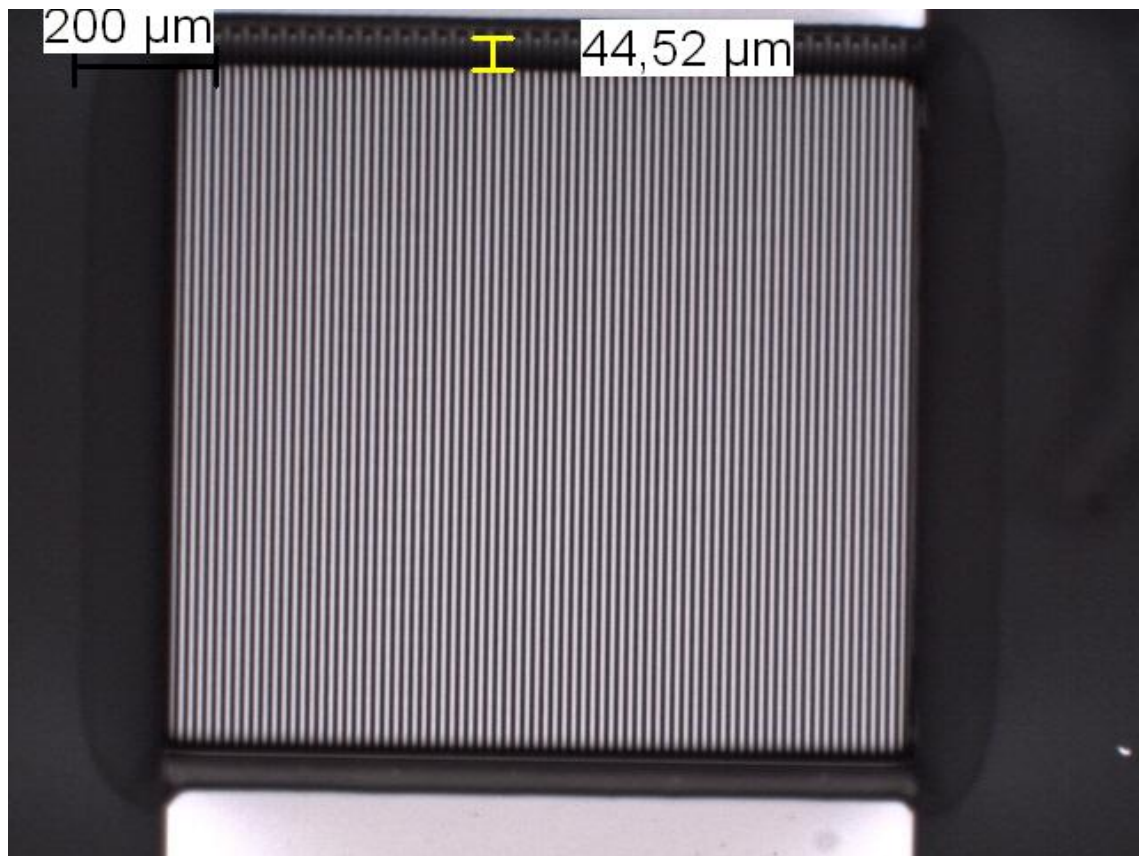


Figure IV-12 : Débordement de la SU 8 aux périphériques des électrodes.

IV.3 Mesures sur des échantillons sanguins

Dans ce paragraphe nous présentons des résultats obtenus avec les microsystèmes à électrodes interdigitées, équipés de microréservoirs de forme carrée avec une surface de 1 mm², sur des échantillons sanguins. Seuls les plus significatifs et reproductibles sont résumés ici. Ainsi les évolutions fréquentielles sont présentées pour des échantillons sanguins dans plusieurs cas, à savoir l'effet de la température, l'effet temporel, la validation de la théorie d'optimisation,...

IV.3.1 L'anticoagulant

Le sang est un tissu biologique dont le phénomène de coagulation provoque un rapide changement d'état physique et physiologique. Quelques secondes d'exposition à l'air suffisent pour modifier la structure de ce tissu. La manipulation

in vitro du sang nécessite donc l'emploi d'un anticoagulant dont le rôle est d'inhiber la phase de la coagulation plasmatique. Le produit le plus couramment employé est l'héparine.

L'héparine est un polysaccharide qui se fixe sur les protéines de la membrane plaquettaire. Elle empêche la transformation de la prothrombine en thrombine et l'action de la thrombine sur le fibrinogène. Elle contrarie l'agglutination des plaquettes, premier temps de la coagulation. Employée couramment dans les thérapeutiques anticoagulantes, elle est utilisée à titre préventif chez toute personne exposée aux thrombophlébites et à titre curatif lors de thromboses constituées. On utilise également l'héparine dans le revêtement des prothèses vasculaires et plus généralement avec des matériaux destinés à être en contact avec le sang.

IV.3.2 Protocole et conditions de mesure

Les prélèvements de sang humain ont été effectués sous contrôle médical au CHU de Nancy sur un même donneur. Ces prélèvements sont contenus dans des tubes de 5 ml héparinés. Les tubes ont été conservés dans un réfrigérateur dans les 10 mn suivant le prélèvement.

Notons que le volume nécessaire pour une mesure est d'environ 0.2 μ l.

Afin de garantir une bonne reproductibilité des mesures, chaque échantillon déposé sur le capteur a subi 3 séries de mesures à différents instants (à quelques minutes d'intervalles).

La procédure suivante est répétée pour chaque mesure :

- Le tube de prélèvement est agité lentement 1 min avant le prélèvement de l'échantillon désiré, dans un but d'homogénéisation.
- Une dose de 0.2 μ l est prélevée dans le tube puis insérée dans le microréservoir recouvrant la matrice d'électrodes, à l'aide de la micropipette.
- Quelques secondes plus tard, l'acquisition du spectre d'impédance est lancée.

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

IV.3.3 Influence de l'héparine

L'anticoagulant ne modifie pas de manière mesurable les propriétés électriques du sang, résultat publié par notre équipe (Jaspard, 2001) pour les fréquences entre 1MHz et 1 GHz. La méthode utilisée pour atteindre ce résultat consistait à mesurer les caractéristiques électriques du sang avec et sans héparine.

Les mesures sur les échantillons sanguins étaient réalisées sur trois matinées dans des conditions similaires (même horaire et température constante de 22 °)

Pour déterminer si l'anticoagulant (héparine) modifie les propriétés diélectriques du sang, une première mesure a été faite le premier jour sur un échantillon prélevé d'un tube. Une seconde mesure a été réalisée le troisième jour (72 h) sur un échantillon prélevé du même tube après ajout d'héparine. Les deux mesures ont été réalisées avec le même capteur 4.

Ces résultats sont présentés sur la Figure IV-13.

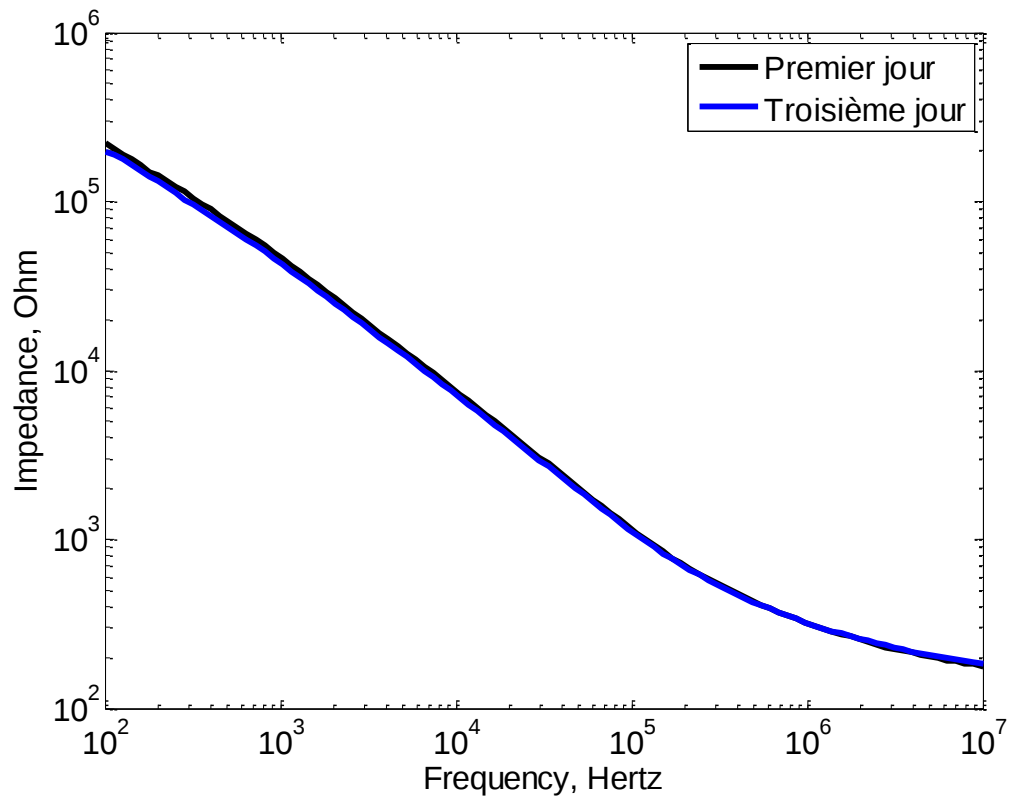


Figure IV-13 : Effet de l'anticoagulant (Héparine) : Mesures moyennées effectuées le premier jour et le troisième jour de l'impédance sur un échantillon sanguin.

Ces mesures montrent que les deux prélèvements ont la même allure et donc l'héparine n'a pas d'influence sur la signature électrique des deux échantillons prélevés du même tube à 72h d'intervalle.

IV.3.4 Influence du nettoyage - Reproductibilité des mesures

Une des conditions pour avoir des mesures comparables entre différentes analyses sur échantillons est que le système d'analyse soit lui-même non modifié entre les mesures en raison de traces sanguines coagulées accrochées aux électrodes, ceci malgré un nettoyage soigneux. Pour vérifier que le système reste identique au cours des manipulations, nous avons choisi de vérifier l'impédance du milieu à vide entre chacune de nos mesures. Si le système de mesure à vide n'est pas modifié, cette impédance doit rester identique pour toute mesure à vide.

Pour répondre à cette condition, nous avons prélevé une dose de 0.2 μ l et l'avons versée dans le microréservoir de la géométrie 4. Nous l'avons faite suivre d'un nettoyage du système après quelques minutes, temps pour lequel la coagulation a déjà opéré (Figure IV-14). Ainsi, nous avons lancé l'acquisition du spectre d'impédance. Nous avons répété ce processus une deuxième fois afin de faire une deuxième mesure après le deuxième nettoyage (Figure IV-15).

Les deux images (Figure IV-14, Figure IV-15) du capteur montrent que celui-ci n'est pas efficacement nettoyé et il reste toujours des traces de sang coagulé.

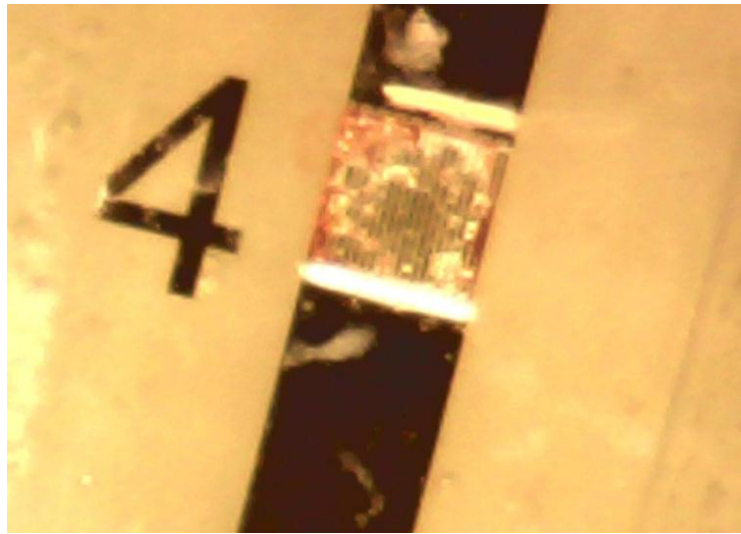


Figure IV-14 : Image du capteur 4 après le premier nettoyage.

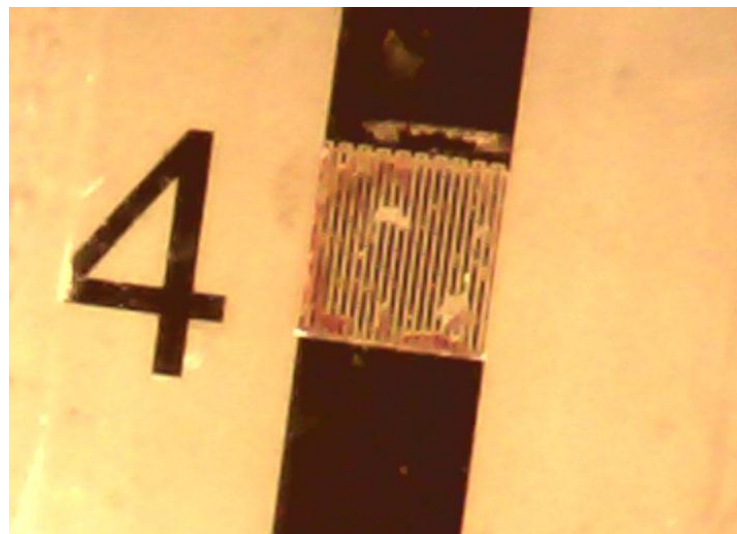


Figure IV-15 : Image du capteur 4 après le deuxième nettoyage.

Les résultats obtenus sont présentés et comparés au spectre de l'impédance à vide relevé avant toute mesure dans la Figure IV-16.

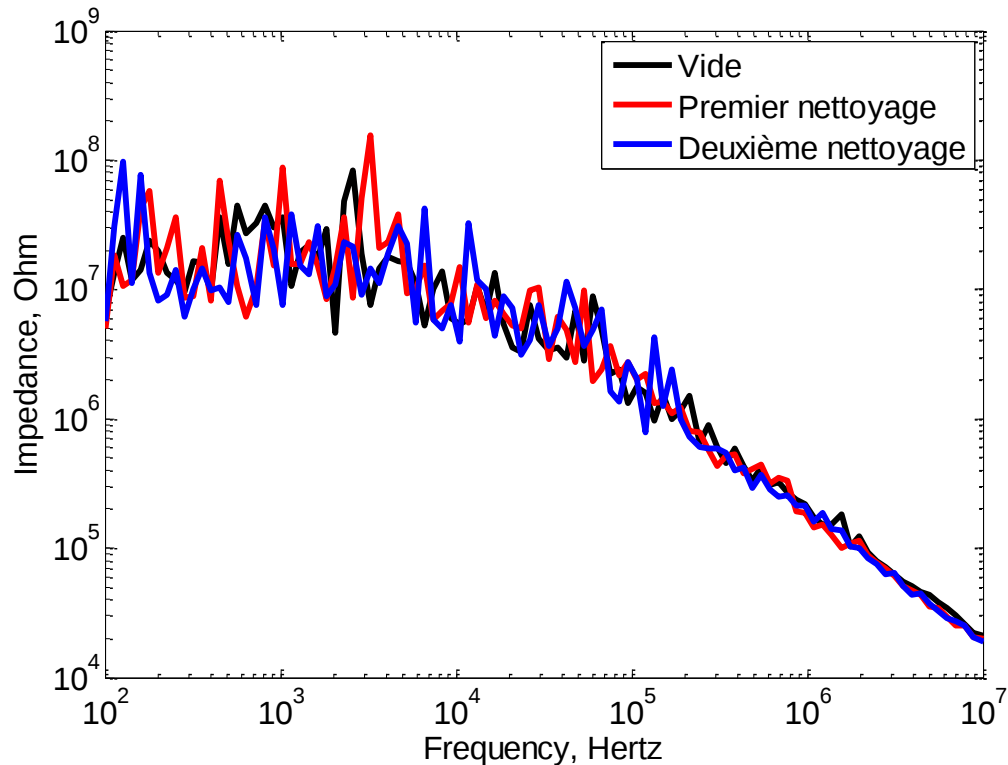


Figure IV-16 : Mesures moyennées de l'impédance à vide du capteur 4 pour les trois cas suivant : avant toute mesure, après le premier nettoyage et après le deuxième nettoyage.

Ces courbes montrent que les deux mesures ont la même allure que la mesure à vide effectuée avant toute analyse. Les trois courbes montrent une chute capacitive décroissante capacitive en $1/f$ avec un déphasage de -90° .

Nous constatons que l'exposition plus ou moins importante des électrodes aux traces sanguines n'influence pas la signature électrique du système à vide. Ceci confirme que tout le courant électrique passe par le verre.

Ces résultats montrent que les lignes de champ électriques ne circulent pas dans les traces sanguines coagulées mais bien dans le verre. Une conclusion peut-être utile et intéressante pour les biologistes est que la permittivité des traces du sang coagulé est plus petite que celle du verre, à savoir plus petite de 5.

A noter que nous avons essayé d'utiliser divers produits de nettoyage pour régénérer les électrodes : de l'acétone, de l'isopropanol et de l'eau distillée.

Nous ne présentons pas la comparaison entre les effets de chaque produit de nettoyage dans ce manuscrit mais nous avons trouvé que le protocole de nettoyage qui a donné les meilleurs résultats de reproductibilité consiste en un simple rinçage des puits avec de l'eau distillée, sans utilisation d'autres produits de nettoyage.

On peut supposer que la réussite de ce nettoyage est due à la dilution successive des espèces ioniques encore présentes dans le réservoir et à la surface des électrodes. Pour la suite des manipulations, ce protocole de nettoyage a donc été conservé de façon à pouvoir réutiliser plusieurs fois le même capteur au cours des manipulations et y obtenir des mesures reproductibles et comparables.

IV.3.5 Sensibilité de détection

Une vérification a été effectuée pour tester nos systèmes de microélectrodes par l'injection d'une solution d'une conductivité différente de celle du sang durant la mesure de ce dernier, afin de confirmer que les électrodes pouvaient effectuer la détection de la moindre variation dans les caractéristiques électriques intervenant sur les échantillons sanguins. Cet objectif est envisagé comme perspective, consistant au développement d'une bio-puce basée sur la mesure d'impédance électrique et capable de mesurer en continu la moindre variation de celle-ci pour des cellules en culture. C'est-à-dire détecter la variation de la conductivité qui peut fluctuer lors de changements physiologiques de l'échantillon sanguin.

Comme le montre la Figure IV-17, nous avons injecté un volume de 0.2 μ l de sang humain sur les microélectrodes de la géométrie 7 entourées par le microréservoir. La première mesure nommée (sans injection) est donc réalisée. Ensuite et juste après la fin de l'acquisition de la première mesure nous avons lancé une deuxième mesure d'impédance. Durant cette deuxième mesure et plus particulièrement quand la fréquence est arrivée à 100 KHz, soit environ 10 secondes avant la fin de l'acquisition, nous avons injecté une dose de 0.2 μ l d'eau

distillée dont la conductivité est de $4.3.10^{-4}$ S/m (Figure IV-18). La troisième mesure est ensuite déclenchée 1 minute après l'injection de l'eau.

Les résultats obtenus pour des trois mesures sont présentés dans la Figure IV-19.

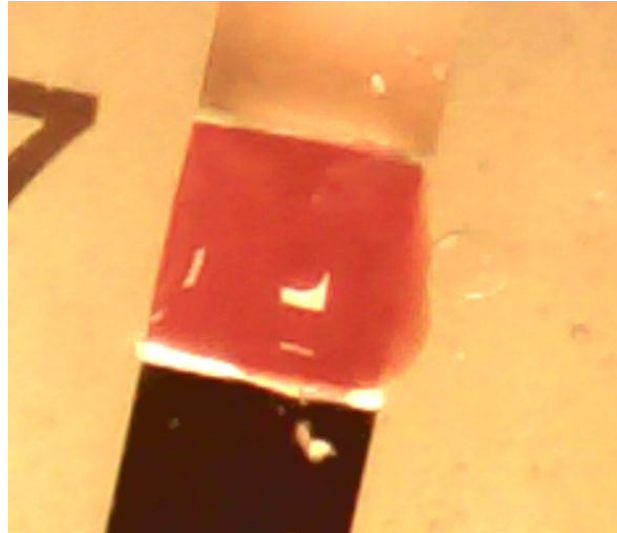


Figure IV-17 : Image du capteur 7 chargé par le volume fluide (sang) sans injection d'eau distillée.

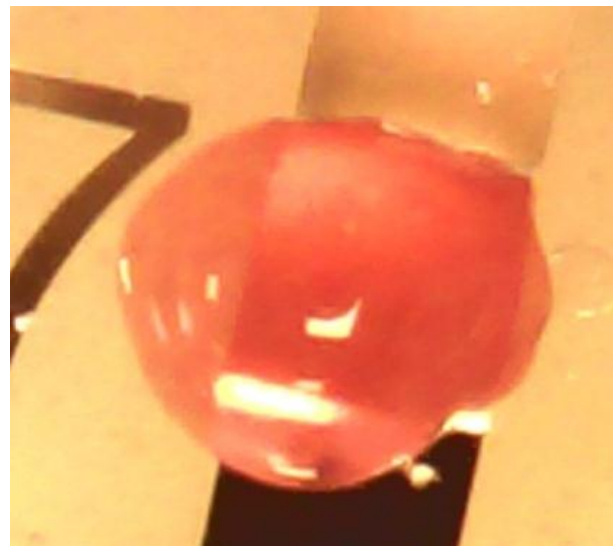


Figure IV-18 : Image du capteur 7 chargé par le volume fluide (sang) après injection d'eau distillée.

Nous constatons que les trois courbes de spectre d'impédance obtenues montrent un comportement quasi-similaire : une chute d'impédance capacitive avec une

phase de -90° , suivi d'une zone constante (on remarque sur la courbe uniquement le début).

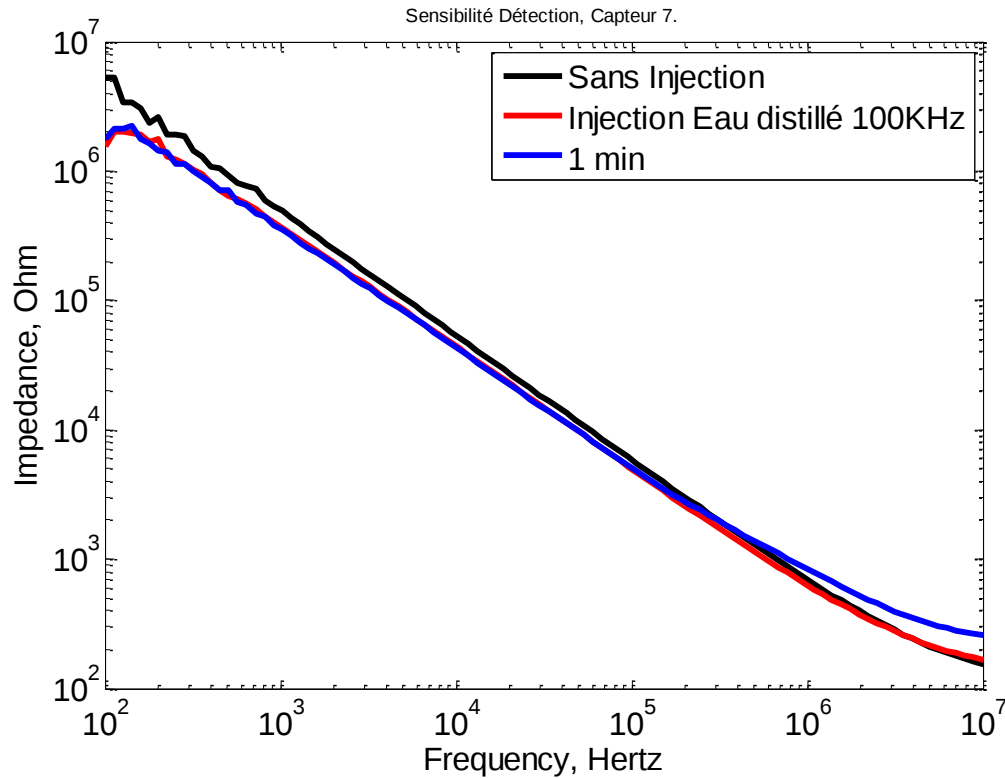


Figure IV-19 : Mesures moyennées de l'impédance obtenues par le capteur 7 pour les trois cas suivant : sans injection, injection d'eau et au bout d'une minute.

Les courbes correspondant à la première mesure et à celle de l'injection à 100 kHz ont une allure similaire et un module mesuré de 166Ω à la fréquence de 10 MHz. Ceci peut être expliqué par le fait que les microélectrodes n'ont pas pu détecter la variation d'impédance due à la variation de conductivité en seulement quelques secondes, notamment parce que les deux milieux n'étaient pas encore mélangés.

La troisième mesure effectuée une minute seulement après l'injection de l'eau a présenté un module de 257Ω à la même fréquence de 10 MHz.

On constate une variation d'impédance de $(257-166) / 166$ soit 55 %. Cela correspond bien au facteur de dilution d'une solution avec une conductivité donnée par l'eau distillée dont la conductivité est relativement négligeable (comme dans notre cas $4.3 \cdot 10^{-4} \text{ S/m}$).

Le facteur de dilution est ainsi donné comme le rapport entre le volume initial (0.2 μ l) et le volume final (0.4 μ l). Ce facteur vaut 50 %, il est légèrement plus petit que la variation d'impédance mesurée de 55 %, ceci étant fortement dû à l'évaporation qui a eu lieu 2 minutes environ après de l'injection du volume initial de sang.

D'une autre manière, ce facteur est défini par le rapport de la concentration finale sur la concentration initiale, ou de même par la conductivité finale sur la conductivité initiale, qui est ici égale à 1 / 2.

Nous remarquons aussi que notre système de microélectrodes a pu détecter la variation de l'impédance après une minute correspondant à la stabilité de la solution finale.

IV.3.6 Influence de la température

Nous avons cité précédemment que nous avons opté pour la réalisation de nos mesures sur les échantillons sanguins durant la matinée pour des questions de maintien d'une atmosphère à ambiante constante sous une température de 22 ° C.

Afin d'évaluer l'influence de la température sur les spectres d'impédances fréquentielles nous présentons dans ce paragraphe les résultats obtenus par deux mesures d'impédance sur des échantillons sanguins de deux températures différentes.

La première mesure était réalisée le matin à 22 °C, et la deuxième mesure à 28°C l'après-midi.

La Figure IV-20 montre les deux courbes obtenues à des températures différentes.

Les deux mesures présentent un comportement quasi similaire. Elles produisent deux modules d'impédances différents. L'écart de température est d'environ 6 °C. Ceci se traduit par une décroissance du module de l'impédance d'environ 40 Ω à la fréquence 10 MHz.

Si l'on assimile la variation du module observée à la variation de la conductivité du sang sous l'effet de la température, alors cela correspond à une variation de la conductivité de l'ordre de 22 % pour un écart de température de 6 °C ; soit en supposant une caractéristique conductivité / Température linéaire dans cette plage (Greve, et al., 2007) (Jaspard & Nadi, 2002), un taux de variation de la conductivité d'environ -3.67 % / °C, ce qui correspond aux données de la littérature (Schwan, 1963) (Grimnes & Martinsen, 2000). Cette étude sur l'influence de la température permet de retrouver un taux de variation habituel pour les milieux biologiques, et permet dans le même temps d'éliminer le facteur température comme pouvant être à l'origine des dérives observées qui sont bien plus significatives. La conception d'un capteur multifonctionnel de mesure d'impédance et de température locale de la bio-puce peut répondre à ce souci.

Dorénavant, dans les mesures présentées, la température sera un facteur constant (à 1 ou 2 °C près).

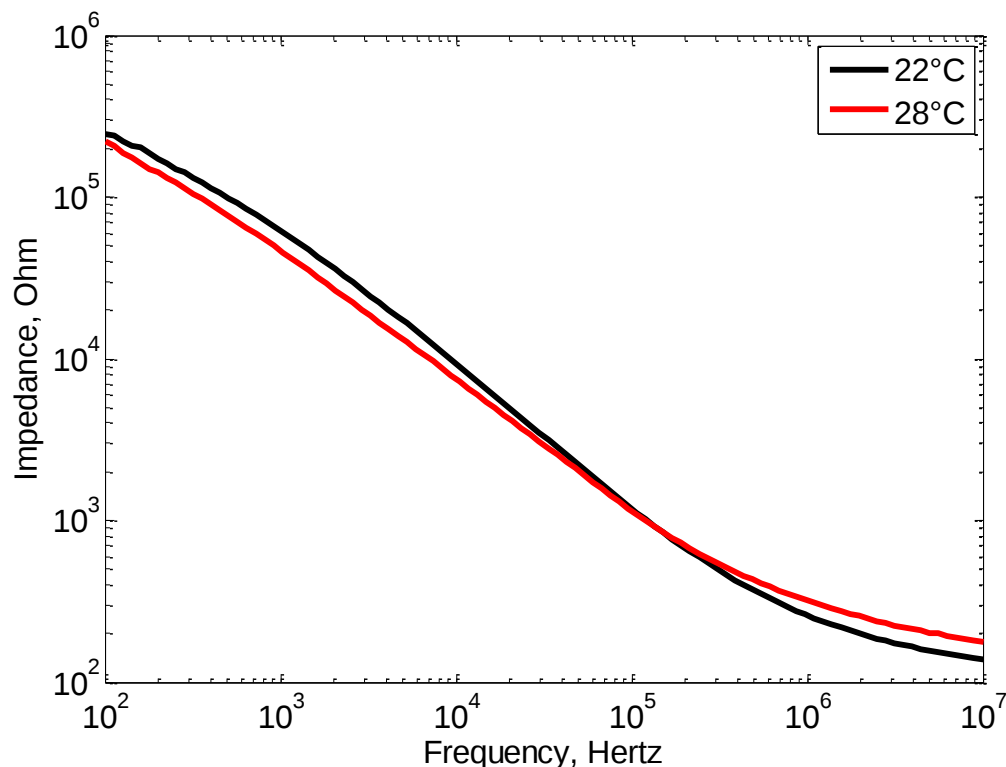


Figure IV-20 : Mesures moyennées de l'impédance obtenues pour deux températures différentes (22° et 28°) effectuées avec le capteur 4.

IV.3.7 Evolution temporelle

Dans ce paragraphe, l'analyse porte sur l'évolution temporelle du spectre d'impédance mesurée sur un échantillon sanguin d'un volume de 0.2 μl . L'évolution temporelle du volume fluide sanguin est montrée dans la Figure IV-21.

Sur les courbes de la Figure IV-22 et de la Figure IV-23, on observe l'évolution temporelle de l'allure de l'impédance et de la phase respectivement. Les courbes présentées correspondent à une évolution de 10 minutes.

L'objectif étant de vérifier la dégradation de la mesure au-delà des durées communément admises de conservation à l'air ambiant. Précisons d'ores et déjà qu'au-delà de la dizaine de minutes, l'échantillon sanguin commence à se dégrader notablement du point de vue biologique.

Sur la Figure IV-22 on observe que les trois premières courbes correspondant respectivement à la première mesure qui a eu lieu juste après le dépôt de la dose de l'échantillon sanguin, à la mesure qui a eu lieu 2 minutes après l'injection et la troisième mesure intervenant 5 minutes après l'injection, ont un comportement quasi-similaire à savoir une chute d'impédance capacitive avec un déphasage d'environ -90° .

Nous avons remarqué que la variation du module d'impédance n'est pas continue durant la mesure,

En fait, la première mesure a donné accès à un module d'impédance de 52Ω à 10 MHz. La deuxième mesure (après 2 minutes) a produit un module de 40Ω . Cette variation négative de l'impédance de 23 % est surtout expliquée par le fait d'un phénomène partiel d'évaporation. Notons qu'avec l'évaporation d'un milieu, le volume du liquide diminue, ainsi la concentration des ions chargés augmente et par conséquent la conductivité du milieu augmente aussi.

Par contre, la troisième mesure (après 5 minutes) a produit un module de 343Ω beaucoup plus élevé par rapport aux deux premières acquisitions. Cette variation d'impédance de 757 % est due au phénomène partiel de la coagulation sanguine. Ceci s'explique par le changement d'état de l'échantillon malgré la présence d'anticoagulant dont les effets sont limités dans le temps surtout sur un petit

volume. La mobilité des charges en est diminuée provoquant ainsi une augmentation de l'impédance. Pour la phase, la dérive se caractérise par une légère diminution avec l'augmentation brusque du module d'impédance.

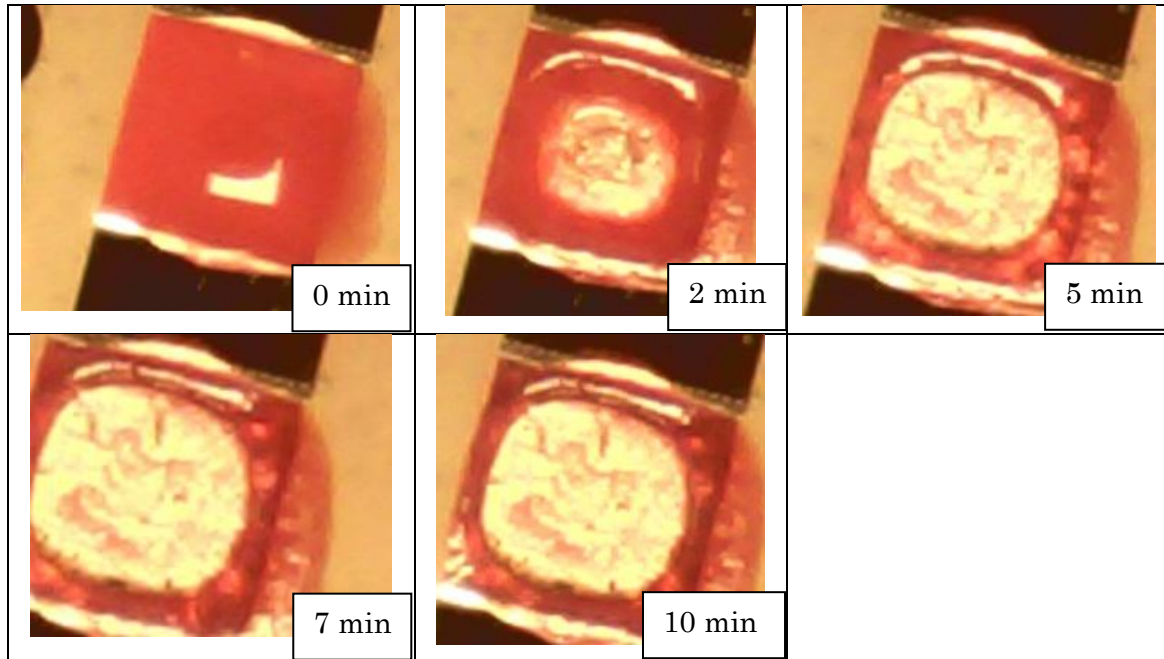


Figure IV-21 : Evolution temporelle du volume fluide sanguin déposé dans le capteur 8.

Les deux dernières courbes correspondant respectivement à la quatrième mesure qui était prise 7 minutes après l'injection et la dernière 10 minutes après l'injection. Les courbes ont un comportement quasi-similaire à savoir une décroissance d'impédance capacitive en $1/f$ tout au long de la gamme fréquentielle. Ce nouveau comportement qui apparait ne présente plus l'allure d'un spectre d'impédance électrique d'un milieu biologique en son état liquide. Il est proche du spectre d'impédance d'électrodes à vide. Cela se traduit par le phénomène agressif de coagulation et de la dégradation de l'échantillon.

Ce comportement capacitif, qui a une pente moins faible que celle de l'allure du spectre d'impédance du phénomène de double couche dans les basses fréquences, ne reflète pas une phase de -90° mais bien une phase légèrement plus grande de -50° . Nous avons interprété cette variation par le fait que, comme la majorité du milieu liquide au départ devient de plus en plus sec, les ions ne peuvent ainsi pas former la double couche, soit le phénomène d'interface entre les électrodes et le milieu. Bien que le milieu de mesure entre les électrodes ne soit pas vide pour

produire une phase de -90° , il existe cependant encore des dégradations des cellules provoquant un spectre d'impédance non totalement capacitif, mais aussi résistif. D'où la valeur -50° .

Calculons la permittivité d'après la dernière courbe quand l'échantillon est totalement coagulé : en se basant sur la valeur de C_{Cell} de la courbe et en utilisant l'Équation II-6, on trouve une valeur de 12. Cette valeur ne correspond pas à la permittivité du verre ni à celle de l'air. Cette permittivité ne peut être attribuée qu'au milieu du sang coagulé, c'est-à-dire les agrégats des cellules restés au fond du microréservoir.

Dans la littérature nous avons trouvé que les chercheurs ne s'intéressaient pas à la caractérisation électrique du sang coagulé. Et cette valeur de permittivité reste toujours à valider.

A long terme et en perspective, il semble donc envisageable de mener une étude pour approfondir l'exploitation des variations temporelles en particulier après la phase de coagulation complète du milieu sanguin en vue de réaliser un outil diagnostic de suivi de la dégradation d'un fluide biologique.

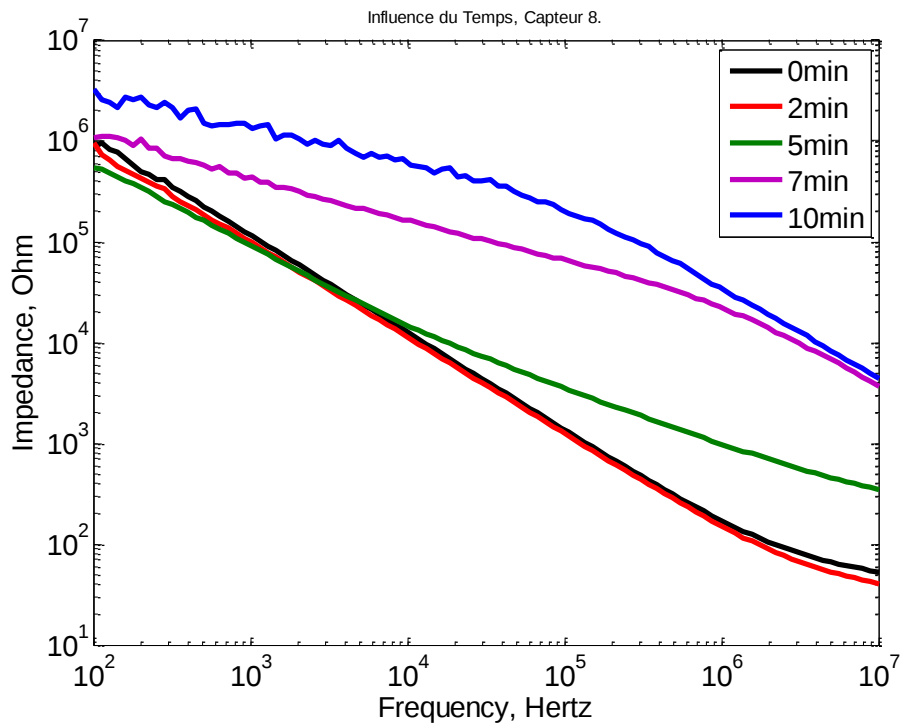


Figure IV-22 : Mesures moyennées de l'impédance obtenues par le capteur 8 à différents instants après le dépôt du volume fluide.

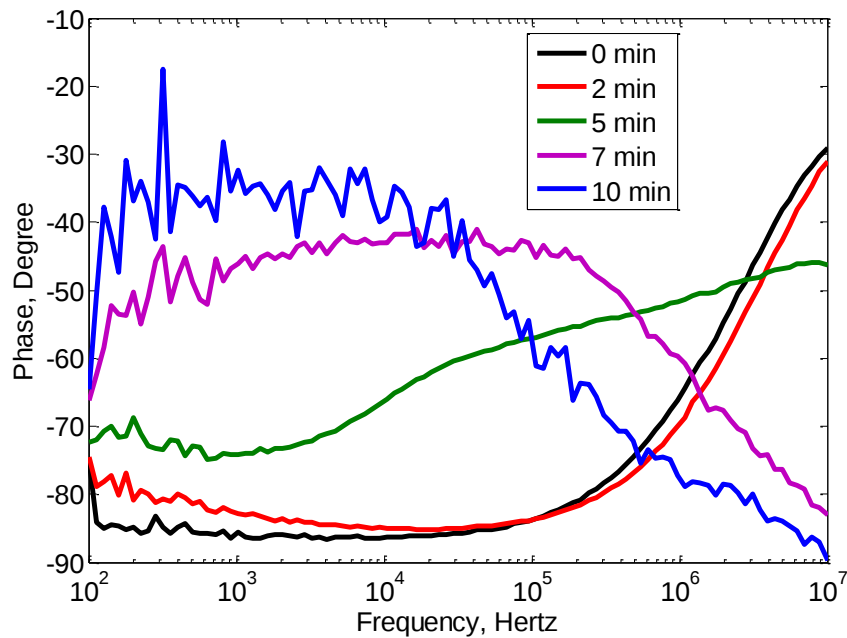


Figure IV-23 : Mesures moyennées de la phase obtenues par le capteur 8 à différents instants après le dépôt du volume fluide.

IV.3.8 Vérification de la théorie d'optimisation

La théorie d'optimisation concernant la largeur d'électrodes et la distance de séparation entre eux était validée par la modélisation numérique dans le chapitre II. Toutefois cette vérification prend toujours un aspect théorique. Pour cela nous présentons dans ce paragraphe l'influence de la géométrie sur l'impédance bioélectrique mesurée.

La Figure IV-24 présente les spectres de l'amplitude et la Figure IV-25 ceux de la phase de l'impédance du sang obtenus avec les trois géométries utilisées. La géométrie 5 est optimisée, tandis que les deux géométries 7 et 8 ne sont pas optimisées.

Sur la Figure IV-24 nous observons que les trois mesures présentent un comportement quasi similaire. Néanmoins, elles produisent trois modules d'impédances différents ainsi que trois fréquences de coupure basse différentes.

Dans la Table IV-4 nous présentons les valeurs de F_{Low} obtenues pour chaque géométrie, et l'écart relatif ΔF_{Low} par rapport à la géométrie 5 optimisée.

	F_{Low}	ΔF_{Low} (Hz)	Relative change %
Capteur 5	$1.2 \cdot 10^5$	0	0
Capteur 7	$40 \cdot 10^5$	38.8	3233
Capteur 8	$20 \cdot 10^5$	18.8	1566

Table IV-4 : Fréquences de coupure des trois géométries 5, 7 et 8.

Nous remarquons que ces valeurs sont très élevées par rapport au cas de la géométrie optimisée. Nous constatons aussi que nous avons gagné environ une décade et demie dans la gamme de fréquence utile. Ce qui justifie l'utilité de cette théorie d'optimisation que nous avons développée.

Le spectre d'impédance obtenu est assez proche d'un spectre d'impédance classique obtenu sur une solution saline calibrée. Sous l'hypothèse que l'impédance

mesurée suit une dépendance linéaire entre la conductivité et le facteur géométrique de cellule, la conductivité calculée de l'échantillon peut être approximée par l'Équation II-4.

Pour cela, nous avons obtenu les valeurs du module d'impédance R_{Sol} de chaque courbe à la fréquence la plus grande (10 MHz).

En utilisant les facteurs de cellule déterminés, expérimentalement pour les trois géométries, la conductivité détectée par les géométries 5 est de l'ordre de 0.66 S/m. Elle est de l'ordre de 0.55 S/m pour les géométries 6 et 8.

Dans la Table IV-5 nous donnons les erreurs relatives maximales de la conductivité entre les valeurs obtenues sur nos mesures et celles données par Gabriel (Gabriel, 1996) qui sont de l'ordre de 0.7 S/m.

	σ (S/m)	Relative change %
Capteur 5	0.66	4
Capteur 7	0.55	22
Capteur 8	0.55	22

Table IV-5 : Valeurs de la conductivité obtenues par les capteurs 5, 7 et 8.

Nous constatons une bonne concordance sur la valeur de conductivité mesurée par nos capteurs notamment par la géométrie 5 comparée à celle généralement annoncée (Gabriel, 1996). Nous expliquons les erreurs relatives des deux autres géométries par le fait que leur fréquence de coupure est beaucoup plus grande que celle de la géométrie 5. Ainsi nous n'arrivons pas à la valeur stable du plateau R_{Sol} . Cela justifie encore une fois la théorie d'optimisation.

Dans tous les cas, la valeur déterminée est inférieure à la valeur de la conductivité du sang généralement annoncée (Gabriel, 1996) de 0.7 S/m. Reste à savoir si cette différence observée est imputable à une réelle différence de conductivité de l'échantillon, ou plus probablement à des hétérogénéités de la surface des électrodes qui peuvent influencer de manière notable le facteur de

cellule. On sort, dans ce cas, du modèle classique d'un milieu homogène. A ces échelles, les cellules sanguines constituent des hétérogénéités, et le sang ne peut probablement pas être assimilé à une masse liquide homogène. Rappelons que les valeurs obtenues par d'autres auteurs jusqu'à présent portaient sur des échantillons macroscopiques pour lesquels l'homogénéité était assurée par des dispositifs classiques en laboratoire d'hématologie. Aux dimensions où nous travaillons cela n'est plus possible.

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

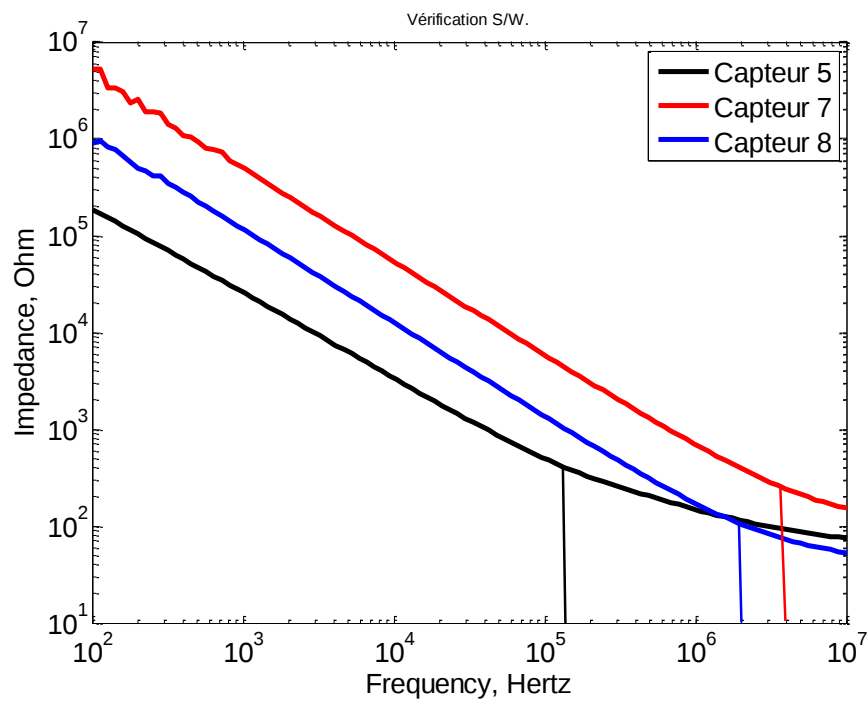


Figure IV-24 : Mesures moyennées de l'impédance obtenues par le capteur 5 (optimisé), capteurs 7 et 8 (non optimisés).

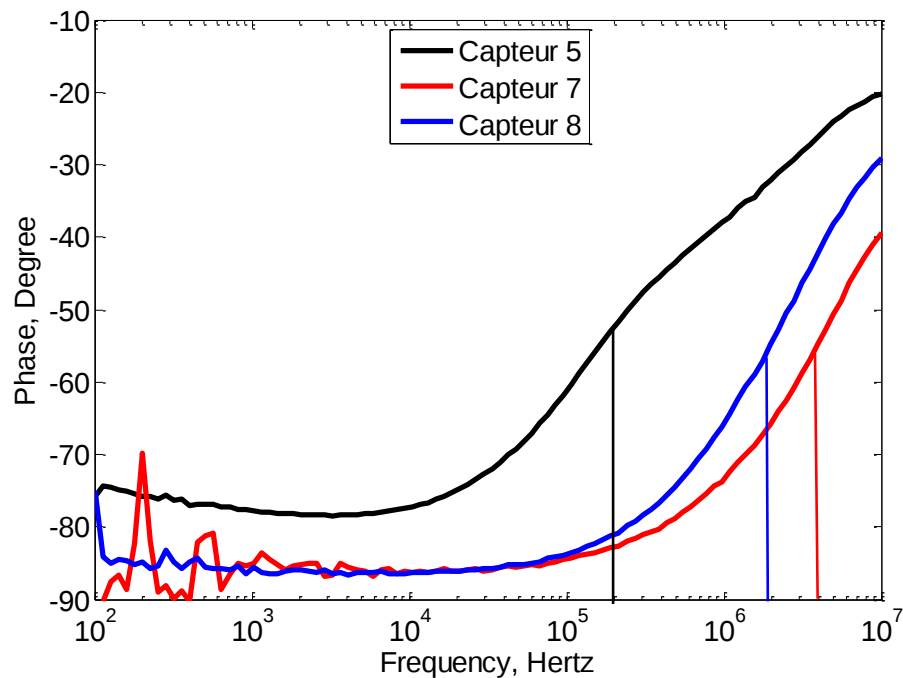


Figure IV-25 : Mesures moyennées de la phase obtenues par le capteur 5 (optimisé), capteurs 7 et 8 (non optimisés).

IV.4 Compensation des effets d'interfaces :

méthode de mesure différentielle

Nous avons vu que la majeure source d'erreur dans la mesure de l'impédance biologique est la polarisation qui apparaît au niveau de la surface de contact entre l'échantillon biologique et les électrodes.

Si une électrode métallique est immergée dans une suspension liquide ou cellulaire, une couche créant un potentiel apparaît entre l'électrode et le fluide ou la suspension. Ce potentiel apparaît en raison du fait que les ions positifs et négatifs sont attirés par les charges de surfaces d'électrodes négative et positive, respectivement. L'effet de polarisation devient très fort lorsque les mesures sont effectuées à des basses fréquences, comme dans notre cas.

La méthode d'optimisation géométrique nous a permis un décalage des effets d'interfaces vers les basses fréquences. Nous proposons dans ce paragraphe une méthode de mesure différentielle pour compenser complètement ces effets de la mesure. Nous nous intéressons à la mesure de la permittivité diélectrique en fonction de la fréquence.

Pour une suspension cellulaire biologique et en basses fréquences, deux facteurs majeurs contribuent à la permittivité diélectrique du milieu biologique. La première contribution concerne la réorientation des dipôles diélectriques des cellules individuelles et la deuxième concerne la polarisation des charges accumulées sur la surface de la membrane cellulaire. Ces charges sont directement proportionnelles au potentiel de la membrane. Nous supposons que l'effet de rotation devient négligeable pour des très faibles champs électriques appliqués. C'est le cas de nos mesures (10 mV), la permittivité diélectrique est directement proportionnelle au potentiel de membrane créée par les charges accumulées, et donc dans cette hypothèse nous pourrions extraire les effets d'interfaces apportés par la membrane cellulaire de la courbe de permittivité diélectrique.

Pour corriger les effets d'interfaces, nous avons appliqué la technique de la variation de distance entre deux plaques ou électrodes parallèles (Prodan, et al.,

2004). Cette technique est basée sur le fait que l'impédance de polarisation est la même pour les différentes distances entre les plaques.

Le principe de cette technique va être présenté dans un premier temps, et nous détaillerons notre démarche pour l'appliquer sur les électrodes interdigitées dans un second temps.

Dans le cas de deux plaques parallèles, l'impédance mesurée Z_m est en fait la somme des deux impédances, Z_{sol} impédance d'échantillon et Z_p impédance de polarisation. Les équations générales suivantes s'appliquent pour deux positions différentes d'électrodes (Schwan, 1963), position 1 et position 2 :

$Z_{1m} = Z_{1sol} + Z_p$	Équation IV-2
---------------------------	---------------

$Z_{2m} = Z_{2sol} + Z_p$	Équation IV-3
---------------------------	---------------

Nous remarquons que par soustraction des deux impédances mesurées :

$Z_{1m} - Z_{2m} = Z_{1sol} - Z_{2sol}$	Équation IV-4
---	---------------

Ce résultat d'impédance différentielle mesurée est indépendant de l'impédance de polarisation due à l'effet d'interfaces.

On modélise l'impédance de la suspension de cellules en tant que résistance $R = d / \sigma A$ en parallèle avec une capacité $C = \epsilon A / d$, où σ et ϵ sont la conductivité et la permittivité diélectrique de la suspension cellulaire et A et d représentent la surface des électrodes et la distance entre eux. Nous pouvons alors écrire :

$Z_{1m} - Z_{2m} = Z_{1sol} - Z_{2sol}$ $= \frac{d_1 - d_2}{A(j\omega\epsilon_0\epsilon_r + \sigma)}$	Équation IV-5
---	---------------

Notons ici que la constante de cellule d'une géométrie à deux plaques parallèles est égale à d/A . Ainsi on peut déduire la conductivité et la permittivité sans avoir les effets d'interfaces :

$\sigma = Re \frac{(d_1 - d_2)}{A(Z_{1m} - Z_{2m})}$	Équation IV-6
$\varepsilon_r = Img \frac{(d_1 - d_2)}{\varepsilon_0 \omega A(Z_{1m} - Z_{2m})}$	Équation IV-7

Dans notre cas des électrodes interdigitées le facteur d/A sera la constante de cellule K_{Cell} .

Nous allons utiliser deux géométries de nos dispositifs interdigités. Les surfaces de contact entre l'échantillon et les électrodes, A , étant égales pour les cinq géométries. Alors les effets d'interfaces sont les mêmes. Cependant les impédances de polarisation sont aussi égales.

Plusieurs essais réalisés avec l'ensemble des capteurs, ont montré que seuls les capteurs 4 et 7 ont permis de réaliser cette compensation en basses fréquence. En effet les résultats avec les autres capteurs présentés de trop grande variation à cause de l'écart entre leurs facteurs de forme. Les capteurs 4 et 7 ont un facteur de forme très proche.

	
$K_{1Cell} = 90 \text{ m}^{-1}$	$K_{2Cell} = 87 \text{ m}^{-1}$
$Z_{1m} = Z_{1DL} + Z_{1Sol}$	$Z_{2m} = Z_{2DL} + Z_{2Sol}$
$A1 = A2$	
$Z_{1DL} = Z_{2DL}$	
$Z_{1m} - Z_{2m} = Z_{1Sol} - Z_{2Sol} = \frac{K_{1Cell} - K_{2Cell}}{(j\omega\varepsilon_0\varepsilon_r + \sigma)}$	

Ainsi nous pouvons écrire :

$\sigma = Re \frac{(K_{1Cell} - K_{2Cell})}{Z_{1m} - Z_{2m}}$	Équation IV-8
---	---------------

$\varepsilon_r = Img \frac{(K_{1Cell} - K_{2Cell})}{\varepsilon_0 \omega (Z_{1m} - Z_{2m})}$	Équation IV-9
--	---------------

Où Z_{1m} et Z_{2m} représentent les valeurs complexes de l'impédance mesurée du volume fluide par les deux capteurs 4 et 7.

Nous avons testé cette technique pour la mesure de permittivité diélectrique de l'eau et nous avons comparé les résultats à la valeur standard (=78).

Les résultats sont présentés sur la Figure IV-26.

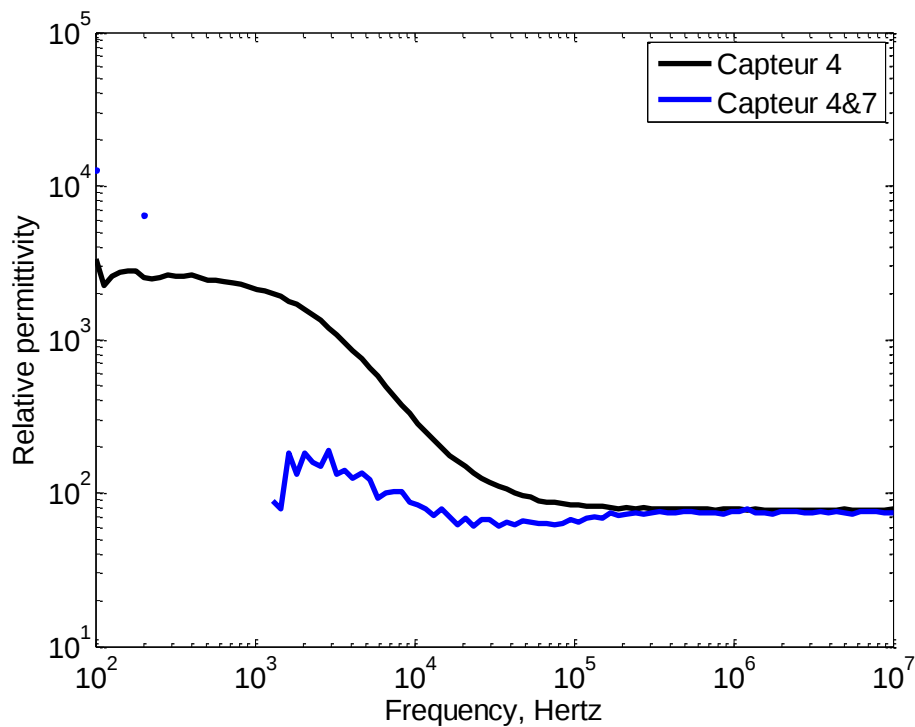


Figure IV-26 : Mesures de la permittivité diélectrique de l'eau sans compensation des effets de la polarisation (capteur 4) et avec compensation des effets de la polarisation (capteurs 4, 7).

Nous pouvons constater que pour la courbe sans compensation, au-dessus de 100 kHz, les valeurs que nous avons obtenues concordent parfaitement avec la valeur

standard, 78. Au-dessous de 100 kHz, les effets de polarisation ont sensiblement augmenté avec la décroissance de la fréquence.

Nous observons que pour la courbe avec compensation, cette technique a pour effet de compenser la contribution de la polarisation jusqu'à 1 KHz. Au-dessous de cette valeur les résultats ne concordent pas. Cette anomalie est due aux valeurs très élevées de l'impédance des deux capteurs 4 et 7 en basses fréquence.

Nous appliquons maintenant la méthode de compensation sur un échantillon sanguin. Les mesures ont été effectuées avec les capteurs 4 et 7 dans les mêmes conditions.

La permittivité diélectrique relative d'une suspension de cellules comme pour notre cas des cellules sanguines dans le plasma varie entre 10^4 et 10^5 en basses fréquences. Cette valeur diminue avec les effets de dispersion α et β (Figure IV-27) dues principalement à l'effet de polarisation à des fréquences plus élevées. Elle approche, pour des hautes fréquences, la permittivité diélectrique relative de l'eau, 78.

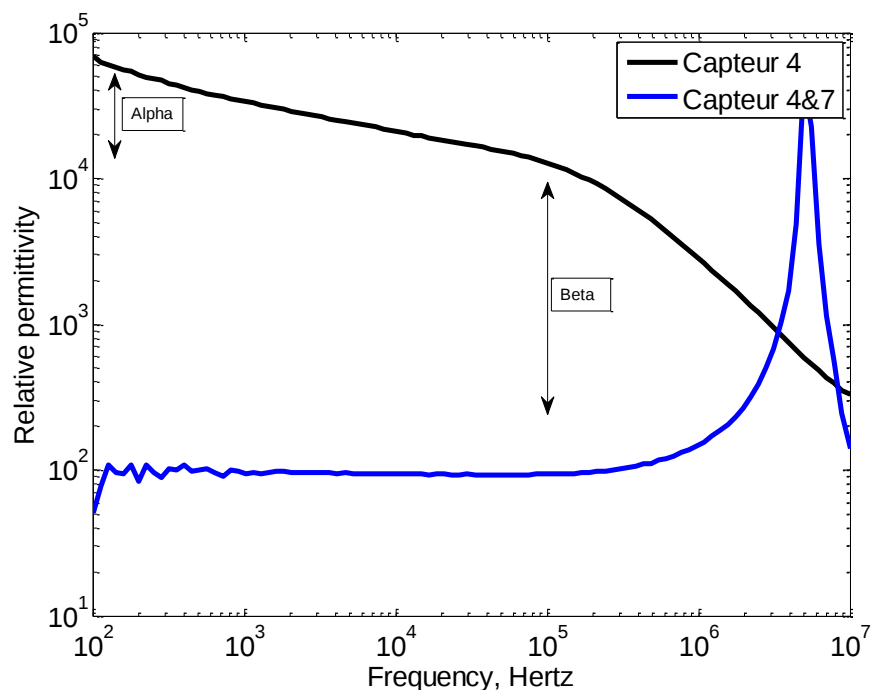


Figure IV-27 : Mesures de la permittivité diélectrique d'un échantillon sanguin sans compensation des effets la polarisation (capteur 4) et avec compensation des effets de la polarisation (capteurs 4, 7).

La Figure IV-27 présente les résultats obtenus sans compensation avec le capteur 4 et avec compensation pour les capteurs 4 et 7. Nous remarquons un plateau quasiment constant sur toute la gamme fréquentielle avec une valeur d'environ 85. Le pic observé en haute fréquences est dû aux limitations de l'impédance mètre en hautes fréquences.

Nous avons développé une technique de spectroscopie diélectrique pour les basses fréquences. La méthode a été testée sur l'eau distillée avec une permittivité diélectrique connue et son efficacité établie à des fréquences allant de 100 à 10^7 Hz. La méthode a été utilisée pour mesurer les courbes de dispersion de la permittivité diélectrique de milieux biologiques. Les résultats de mesure sont cohérents avec les prédictions théoriques.

IV.5 Conclusion

Dans ce chapitre, la spectroscopie de bio impédance a été appliquée pour la mesure de très faibles volumes de fluides (solutions étalons, sang humain) à l'aide des micros capteurs à électrodes interdigitées. Les mesures sur des solutions étalons sont effectuées avec les 5 capteurs réalisés. Ces mesures ont permis de déduire une estimation de la constante de cellule de nos micros dispositifs qui va nous aider à estimer la valeur de conductivité de l'échantillon sanguin. Nous avons analysé la sensibilité de détection des micros dispositifs. Les mesures sont reproductibles et la comparaison des résultats obtenus avec des valeurs publiées dans la littérature présente une bonne concordance. Nous avons aussi validé notre théorie d'optimisation.

Enfin, nous avons proposé une démarche différentielle permettant de limiter l'influence des problèmes de polarisation.

V. Conclusion générale et perspectives

La caractérisation des milieux biologiques peut tirer profit de la spectroscopie d'impédance. Jusqu'à présent essentiellement orientées vers les mesures macroscopiques, des applications visant les niveaux microscopiques sont en développement croissant depuis une dizaine d'années. Les contraintes liées aux mesures en basses fréquences constituent également un défi pour la caractérisation diélectrique des milieux biologiques. Les phénomènes de polarisation bien connus en spectroscopie d'impédance deviennent très importants pour des applications à l'échelle micrométrique. En effet, les dimensions des microélectrodes et le niveau du signal à mesurer constituent alors un verrou technologique fort qui ne permet pas d'effectuer les mesures en dessous de quelques Méga Hertz.

Le principe de base d'un dispositif de spectroscopie de bioimpédance consiste en un micro capteur chargé par un échantillon de tissu biologique, dont l'influence des différents paramètres (géométrie, nature des électrodes, matériaux, etc...) sur les caractéristiques électriques est formalisée et quantifiée. Les valeurs de l'intensité et de la densité de courant, du potentiel électrique et du champ électrique, permettent de déduire l'impédance complexe de l'échantillon sous test. Le facteur de forme (nommé aussi constante de cellule) permet de remonter aux valeurs électriques du milieu (permittivité et conductivité).

La diversité des possibilités ainsi que les difficultés métrologiques et instrumentales de mesure nous ont imposé une revue de l'existant qui fait l'objet d'un premier chapitre. Ce chapitre synthétise les concepts de base permettant de comprendre les propriétés électriques des milieux biologiques. Il traite aussi des micros électrodes développées potentiellement utilisables pour la spectroscopie de bioimpédance. Les raisons qui nous ont motivées à choisir une cellule à électrodes interdigitées ont été aussi présentées. En effet, l'ajustement de différents paramètres (gap inter-digits, nombre de digits, largeur des digits, etc...) rendent leur utilisation flexible.

Le deuxième chapitre traite de l'optimisation de la structure géométrique du capteur. Notre objectif est d'élargir la bande de fréquence utile dont les effets de polarisation n'ont pas une influence significative. Cette optimisation géométrique est effectuée en développant les équations théoriques d'impédance. En effet elle consiste à choisir un rapport optimum de distance inter-électrodes sur largeur

d'électrode qui est égale à 0.66 pour une surface active de (1mm*1mm). Dans un deuxième temps, une modélisation tridimensionnelle a été réalisée sous le logiciel ConventorWare. Afin de valider cette modélisation, nous avons étudié l'influence des propriétés électriques du milieu sur l'impédance électrique simulée. La simulation du système d'électrodes chargé par un modèle de milieu biologique et la validation de cette théorie sont présentées.

Nous avons ensuite exposé la démarche pour la conception des dispositifs utilisés pour nos mesures d'impédancemétrie. Les techniques et protocoles de fabrication ont été détaillés.

Dans le dernier chapitre, nous avons réalisé une campagne de mesure sur de très faibles volumes de fluides (solutions étalons, sang humain) à l'aide des cinq micros capteurs à électrodes interdigitées que nous avons réalisés. Ces mesures ont permis de déduire une estimation de la constante de cellule de nos micros dispositifs permettant ainsi l'obtention de la valeur de conductivité des échantillons sanguins. L'influence importante de certains facteurs (température, temps de mesure...) sur l'échantillon biologique ont été analysés. Nous avons étudié la sensibilité de détection des micros dispositifs. Les mesures sont reproductibles et la comparaison des résultats obtenus avec des valeurs publiées dans la littérature présente une bonne concordance. Nous avons aussi validé notre théorie d'optimisation.

Nous avons présenté en fin de ce chapitre, une technique de mesure différentielle en basses fréquences permettant de réduire les effets de polarisation des électrodes. La méthode a été testée sur l'eau distillée avec une permittivité diélectrique connue. Les résultats obtenus sont prometteurs et ouvre ainsi la voie à d'autres investigations. La méthode a été utilisée pour mesurer les courbes de dispersion de la permittivité diélectrique de milieux biologiques. Les résultats de mesure sont cohérents avec les prédictions théoriques.

Les travaux présentés dans ce manuscrit constituent une première investigation vers la caractérisation à l'échelle micrométrique d'échantillons biologiques. Les réalisations faites dans ce sens ont permis de dégager des critères qui serviront pour les travaux futurs. C'est notamment le cas pour une caractérisation temps réel du sang en régime dynamique.

Une modélisation numérique à l'échelle cellulaire sous le logiciel CoventorWare permet une analyse fine des problèmes d'interfaces et tend à expliquer les phénomènes d'interaction entre champs électromagnétiques et cellules.

Concernant la mesure sur des nano échantillons sanguins, un contrôle plus précis des échantillons sera nécessaire, et il serait intéressant d'étudier l'apport d'une circulation micro fluide du sang. L'application de ce type de structure pour la surveillance d'échantillons sanguins à l'échelle microscopique (agrégation plaquettaire, micro-sédimentation, coagulation, etc..) au sein de canaux micro fluidiques est une des perspectives envisagées à moyen terme.

Les variations de température constituent un facteur important qui perturbent la caractérisation électrique des milieux biologiques. Ainsi la détermination de la température locale permet d'éliminer l'influence de ce facteur. La conception d'un capteur interdigité multifonctionnel de mesure d'impédance régulé en température peut répondre à ce problème.

Les possibilités offertes aujourd'hui en terme d'intégration de circuit mixtes (analogique/numérique) permettent largement d'envisager le développement et l'intégration d'un système électronique sur une seule puce. Comme perspective à plus long terme, la combinaison du circuit de conditionnement et du microsystème de mesure intégrant les électrodes sur le même substrat pourra être envisagée, afin de disposer d'un outil d'analyse autonome.

Plusieurs domaines liés au diagnostic médical comme la caractérisation d'une cellule unique, de détection des changements induits pendant une culture cellulaire et la caractérisation d'ADN par exemple, peuvent faire appel aux capteurs interdigités compte tenu de leur flexibilité d'utilisation.

Une configuration miniaturisée d'électrodes interdigitées sera idéalement adoptée vu la sensibilité d'une telle configuration. Sa réalisation pourra tirer profit des micros technologies existantes. Ces objectifs, atteignables à plus ou moins long terme, concordent bien avec les besoins croissants d'outils d'analyse biologiques déportés dans le domaine du diagnostic biomédical.

Bibliographie

Aberg, P. et al., 2004. Skin cancer identification using multifrequency electrical impedance--a potential screening tool. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Volume 51 , pp. 2097- 2102.

Arndt, S. et al., 2004. Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6), pp. 583-594.

Bard, A. & Faulkner, L., 1980. *Electrochemical methods, fundamentals and applications*. 1 éd. New York: John Wiley and Sons.

Bard, A. J. & Faulkner, L. R., 2001. *Electrochemical. Methods: Fundamentals and Applications*. 2e éd. New York: Wiley & Sons.

Barsoukov, E. & Macdonald, J., 2005. *Impedance spectroscopy : theory, experiment, and applications*. 2e éd. Hoboken, N.J: John Wiley.

Barsoukov, E. & Macdonald, J. R., 2005. *Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications*. 2e éd. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc..

BASHIR, R., 2004.. BioMEMS : State-of-the-art in detection, opportunities and prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 56, pp. 1565-1586.

Borkholder, D., 1999. *Cell-based biosensors using microelectrodes.*, California: Stanford University.

Capone, S. et al., 2001. Moisture influence and geometry effect of Au and Pt electrodes on CO sensing response of SnO₂ microsensors based on sol-gel thin film. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 77(1-2), pp. 503-511.

Chateaux, J. F., 2000. “*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’anisotropi*”, Nancy: Université Henri Poincaré.

Chauveau, N. et al., 1999. Ex vivo discrimination between normal and pathological tissues in human breast surgical biopsies using bioimpedance spectroscopy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volume 873 , pp. 42-50.

Choi, A., Park, J.-S. & Jung, H.-I., 2009. Solid-medium-integrated impedimetric biosensor for real-time monitoring of microorganisms. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 137, p. 357–362.

Cole, K., 1932. Electric phase angle of cell membranes. *The Journal of General Physiology*, Volume 15 , pp. 641-649.

Cole, K. & Curtis, H., 1939. , Electric Impedance of the Squid Giant Axon During Activity. *The Journal of General Physiology*, 22(5), pp. 649-670.

Cole, K. S., 1928 . Electric impedance of suspensions of spheres. *The Journal of General Physiology*, Volume 12 , pp. 29-36.

Cole, K. S. & Cole, R. H., 1941. Dispersion and absorption in dielectrics. I. Alternating current. *Journal of Chemical Physics*, Volume 9, pp. 341-351.

CRM, 2000. *Formulaires et tables*. s.l.:Tricorne.

Da Silva, M. et al., 2007. Planar array sensor for high-speed component distribution imaging in fluid flow applications. *Sensors*, Volume 7, pp. 2430-2445.

Dhatt, G., Touzot, G. & Lefrançois, E., 2005. *Méthodes des éléments finis, Une présentation*. s.l.:Hermes Science Publications.

Faes, T. J. C., Meij, H. A. v. d., Munck, J. C. d. & Heethaar, R. M., 1999. The electric resistivity of human tissues (100 Hz-10 MHz): a meta-analysis of review studies. *Physiological Measurement*, 20(4).

Fosdick, L. & Anderson, J., 1986. Optimization of microelectrode array geometry in a rectangular flow channel detector. *Analytical Chemistry*, 58(12), pp. 2481-2485.

Foster, K. R. & Schwan, H. P., 1989. Dielectric Properties of Tissues and Biological Materials: A Critical Review. Dans: *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. s.l.:CRC, pp. 25-104.

Frank, A. J., Dorielle, T. P. & Shekhar, B., 2010. *Optimization of interdigitated electrode (IDE) arrays for impedance based evaluation of Hs 578T cancer cells*. Florida, International Conference on Electrical Bioimpedance.

Franks, W., Schenker, I., Schmutz, P. & Hierlemann, A., 2005. Impedance characterization and modeling of electrodes for biomedical applications. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 52(7), pp. 1295-1302 .

Fricke, H., 1924. Mathematical Treatment of the Electrical conductivity of Colloids and Cell Suspensions. *Journal of General Physiology*, pp. 375-383.

Fricke, H. & Morse, S., 1926. The electric capacity of tumors of the breast. *Journal of Cancer Research*, Volume 10, pp. 340-376.

Fricke, H. & Morse, S., 1926. The electric capacity of tumors of the breast. *Journal of Cancer Research*, Volume 10, pp. 340-376.

Gabriel, C., 1996. *Compilation of the Dielectric Properties of Body Tissues at RF and Microwave Frequencies*. s.l.:Final technical rept.

Giaever, I. & Keese, C., 1991. , Micromotion of Mammalian Cells Measured Electrically. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(17), pp. 7896-7900.

Goda, N. e. a., 2005. Evaluation of micromotion of vascular endothelial cells in Electrical Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) method using a mathematical model. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, 5(2), pp. 357-368.

Greve, F. et al., 2007. A perforated CMOS microchip for immobilization and activity monitoring of electrogenic cells. *ournal of Micromechanics and Microengineering*, 17(3), pp. 462-471.

Grimnes, S. & Martinsen, O., 2008. *Bioimpedance and bioelectricity basics*. 2e éd. London: Academic Press.

Grimnes, S. & Martinsen, O. G., 2000. *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*. 1e éd. s.l.:Academic Press.

Guyton, A. C. & Hall, J. E., 2001. *Textbook of Medical Physiology*. 10e éd. Philadelphia: W.B.Saunders Company.

Hong, J. et al., 2005. AC frequency characteristics of coplanar impedance sensors as design parameters. *Lab Chip*, 5(3), pp. 270-279.

Houssin, T., 2011. *BioMEMS pour l'analyse de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance*, Lille: Université des Sciences et Technologies de Lille.

Houssin, T. et al., 2010 . Label-free analysis of water-polluting parasite by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* , 25(5), pp. 1122-1129.

<http://nirem.ifac.cnr.it/tissprop/htmlclie/htmlclie.htm#stsftag>, 2012. s.l.: s.n.

Huang, T.-H., Chou, J.-C., Sunc, T.-P. & Hsiung, S.-K., 2008. A device for skin moisture and environment humidity detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 134, p. 206–212.

Huang, X., Greve, D., Nguyen, D. & Domach, M., 2003. *Impedance based biosensor array for monitoring mammalian cell behavior*. Toronto, IEEE Sensors.

Hug, T., 2003. Biophysical Methods for Monitoring Cell-Substrate Interactions in Drug Discovery. *Assay and Drug Development Technologies*, 1(3), pp. 479-488.

ifac, 2012. Dielectric Properties of Body Tissues in the frequency range 10Hz-100GHz. <http://nirem.ifac.cnr.it/tissprop/htmlclie/htmlclie.htm#stsftag>.

Igreja, R. & Dias, C., 2004. Analytical evaluation of the inter-digital electrodes capacitance for a multi-layered structure. *Sensors and actuators A* , Volume 112, pp. 291-301.

Ivorra, A., Aguilo, J. & Millan, J., 2001. *Design considerations for optimum impedance probes with planar electrodes for bioimpedance measurements*. s.l., Semiconductor, International Conference.

JASPARD, F., 2001. *Caractérisation diélectrique du sang par spectroscopie de bio-impédance dans la bande [1 MHz -1 GHz]: Conception et réalisation d'une cellule de mesure*, Nancy: Université Henri Poincaré.

Jaspard, F. & Nadi, M., 2002. Dielectric properties of blood : an investigation of temperature dependence. *Physiological measurement*, 23(3), pp. 547-554.

Jaspard, F., Nadi, M. & Rouane, A., 2003. Dielectric properties of blood : an investigation of haematocrit dependance. *Physiological Measurement*, Volume 24, pp. 134-147.

Jossinet, J. & Schmitt, M., 1999. A review of parameters for the bioelectrical characterization of breast tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volume 873, pp. 30-41.

Judy, J. W., 2001. Microelectromechanical systems (MEMS): fabrication, design and applications. *Smart Materials and Structures*, Volume 10, pp. 1115-1134.

Justin, G., Finley, S., Rahman, A. A. & Guiseppi-Elie, A., 2009. Biomimetic hydrogels for biosensor implant biocompatibility: electrochemical characterization using micro-disc electrode arrays (MDEAs). *Biomedical Microdevices*, 11(1), pp. 103-115.

Katz, E. & Willner, I., 2003. Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. *Electroanalysis*, 15(11), p. 913-947.

Keese, C. R. & al., 1994. A biosensor that monitors cell morphology with electrical fields. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, 13(3), pp. 402-408.

Kovacs, G. T. A., 1994. Introduction to the Theory, Design and Modeling of Thin-Film Microelectrodes for Neural Interfaces. Dans: D. A. Stenger & E. T. McKenna, éds. *Enabling Technologies for Cultured Neural Networks*. London: Academic Press, pp. 121 - 166.

Laureyn, W. et al., 2001. Characterization of Nanoscaled Interdigitated Palladium Electrodes of Various Dimensions in KCl Solutions. *Electroanalysis*, 13(3), p. 204-211.

Laureyn, W. et al., 2000. Nanoscaled interdigitated titanium electrodes for impedimetric biosensing. *Sensors and Actuators B*, Volume 68, p. 360–370.

Lempka, S. et al., 2006. Optimization of Microelectrode Design for Cortical Recording Based on Thermal Noise Considerations. *Engineering in Medicine and Biology Society, 2006. EMBS '06. 28th Annual International Conference of the IEEE*, pp. 3361-3364.

Linderholm, P., Bertsch, A. & Renaud, P., 2004. Resistivity probing of multi-layered tissue phantoms using microelectrodes. *Physiol Meas*, 25(3), pp. 645-658.

Lo & al., 1998. . Cell-substrate separation: effect of applied force and temperature. *European Biophysics Journal*, 27(1), pp. 9-17.

Lo, C., Keese, C. & Giaever, I., 1999. Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters. *Experimental Cell Research*, 250(2), pp. 576-580.

Mamishv, A. et al., 2004. Interdigital sensors and transducers. *Proceedings of the IEEE*, Volume 92, pp. 808-845.

Matthew, A., 2006. Current biosensor technologies in drug discovery. *Drug Discovery*, p. 69.

Matysik, F. M., Meister, A. & Werner, G., 1995. Electrochemical detection with microelectrodes in capillary flow systems. *Analytica Chimica Acta*, Volume 305, p. 114–120.

McAdams, E. T. & Jossinet, J., 1995 . Tissue impedance: a historical overview. *physical measurement*, Volume 16, pp. A1-13.

McAdams, E. T. et al., 1995. The linear and nonlinear electrical properties of the electrode-electrolyte interface. *Biosensors Bioelectron*, Volume 10, p. 67–74.

McCoy, M. H. & Wang, E., 2005. Use of electric cell-substrate impedance sensing as a tool for quantifying cytopathic effect in influenza A virus infected MDCK cells in real-time. *Journal of Virological Methods*, Volume 130, p. 157–161.

Min, J. & Baeumner, A., 2004. Characterization and Optimization of Interdigitated Ultramicroelectrode Arrays as Electrochemical Biosensor Transducers. *Electroanalysis*, 16(9), p. 724–729.

Morimoto, T. et al., 1993. A study of the electrical bio-impedance of tumors. *Journal of Investigative Surgery*, Volume 6, pp. 25-32.

Morimoto, T. et al., 1990. Measurement of the electrical bio-impedance of breast tumors. *European Surgical Research*, Volume 22, pp. 86-92.

Ohmine, Y. et al., 2000. Noninvasive measurement of the electrical bioimpedance of breast tumors. *Anticancer Research*, Volume 20, pp. 1941-1946.

Olthuis, W., Streekstra, W. & Bergveld, P., 1995. Theoretical and experimental determination of cell constants of planar-interdigitated electrolyte conductivity sensors. *Sensors and Actuators B*, Volume 24-25, pp. 252-256.

Park, T. H. & Shuler, M. L., 2003. Integration of Cell Culture and Microfabrication Technology. *Biotechnology Progress*, 19(2), p. 243–253.

Patterson, R., 2000. Bioelectric Impedance Measurements. Dans: P. H. S. i. c. b. IEEE, éd. *The Biomedical Engineering Handbook*. Boca Raton: Press, CRC, p. 71–78..

Pejcic, B. & Marco, R. D., 2006. Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochimica Acta*, 51(28), p. 6217–6229.

PETERSON, K. E., 1982. *Silicon as mechanical material*. s.l., IEEE.

Pethig, R. & Kell, B. D., 1987. The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology. *Physics in medicine and biology*, 32(8), pp. 933-970.

Price, D. T., Rahman, A. R. A. & Bhansali, S., 2009. Design rule for optimization of microelectrodes used in electric cell-substrate impedance sensing (ECIS). *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 24, p. 2071–2076.

Prodan, C. et al., 2004. Low-frequency, low-field dielectric spectroscopy of living cell suspensions. *J. Appl. Phys.*, Volume 95, p. 3754.

R.Popovtzer, et al., 2006. Electrochemical detection of biological reactions using a novel nano-bio-chip array. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 119(2), pp. 664-672.

Rajewsky, B. & Schwan, H. P., 1948. The dielectric constant and conductivity of blood at ultrahigh frequencies. *Naturwissenschaften*, Volume 35, p. 315.

Rigaud, B., MORUCCI, J. & CHAUVEAU, N., 1996. BIOELECTRICAL-IMPEDANCE TECHNIQUES IN MEDICINE. 1. BIOIMPEDANCE MEASUREMENT - 2ND SECTION - IMPEDANCE SPECTROMETRY. Dans: *Critical reviews in biomedical engineering*. Boca Raton: Press, CRC, pp. 257 - 351.

Saha, S. & Williams, P., 1992. Electrical and dielectric properties of wet human. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 39(12), pp. 1298-1304.

Sandison, M., Anicet, N., A, G. & Cooper, J., 2002. Optimization of the geometry and porosity of microelectrode arrays for sensor design. *Analytical Chemistry*, 74(22), pp. 5717-5725.

Schuhmann, D., 1978. *Propriétés électriques des interfaces chargées*. Paris: Masson.

Schwan, H., 1957. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Advances in Biological and Medical Physics*, Volume 5, pp. 147-209.

Schwan, H., 1963. Determination of biological impedances. *Physical techniques in biological research*, 6(B), pp. 323-406.

Schwan, H., 1995. *The bioimpedance field: some historical observations*. Heidelberg, International Conference on Electrical Bio-Impedance.

Schwan, H. P., 1963. Physical Techniques in Biological Research. Dans: *Electrophysiological Methods*. New York: Academic, p. 323–337.

Schwan, H. P., 1994. *Electrical properties of tissues and cell suspensions: mechanisms and models*. Baltimore, International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.

Schwan, H. P., 1999. The Practical Success of Impedance Techniques from an Historical Perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volume 873, p. 1–12.

Schwan, H. P. & Li, K., 1953. *Capacity and conductivity of body tissues at ultrahigh frequencies*. s.l., I.R.E.

Schwan, H. P. & Taka-shima, S., 1993. Electrical conduction and dielectric behavior in biological systems. Dans: V. publishers, éd. *Encyclopedia of Applied Physics (Vol. Biophysics and Medical Physics)*. s.l.:New York and Weinheim.

Singh, K. et al., 2010. 3D nanogap interdigitated electrode array biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(4), pp. 1493-502.

Steendijk, P., Mur, G. & Velde, E. T. V. D., 1993. The four electrode resistivity technique in anisotropic media : theoretical analysis and application on myocardial tissue in vivo. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 40(10), pp. 1135-1148.

Sundara-Rajan, K., Byrd II, L. & Mamishev, A., 2003. Moisture content estimation in paper pulp using fringing field impedance spectroscopy. *IEEE Sensors Journal*, Volume 4, pp. 378-383.

Sundara-Rajan, K., Mathur, A. & Mamishev, A. V., 2008. Characterization of Plastic Packaging with Fringing Electric Field Sensors. *ECS Transactions*, 14(1), pp. 641-650.

Tang, X. et al., 2011. A new interdigitated array microelectrode-oxide-silicon sensor with label-free, high sensitivity and specificity for fast bacteria detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156(2), p. 578–587.

Timmer, B. et al., 2002. Optimization of an electrolyte conductivity detector for measuring low ion concentrations. *Lab Chip*, 2(2), pp. 121-124.

Varshney, M. & Li, Y., 2009. Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 24, p. 2951–2960.

Wang, L. et al., 2008. Analysis of the sensitivity and frequency characteristics of coplanar electrical cell-substrate impedance sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 24, p. 14–21.

Wegener, J., Keese, C. & Giaever, I., 2000. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Experimental Cell Research*, 259(1), pp. 158-166.

Wegener, J., Sieber, M. & Galla, H., 1996. Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 32(3), pp. 151-170.

WISE, K. & NAJAFI, K., 1991. Microfabrication techniques for integrated sensors and Microsystems. *Sciences*, Volume 254, pp. 1335-1342.

Xiao, C., Lachance, B., Sunahara, G. & Luong, J., 1998. Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing : concentration and time response function approach. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 11(2), pp. 183-192.

Yang, L. & Bashir, R., 2008. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances*, Volume 26, p. 135–150.

Yang, L., Li, Y., Griffis, C. L. & Johnson, M. G., 2004. Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 19, p. 1139–1147.

Zhu, J. & al., e., 2006. Dynamic and label-free monitoring of natural killer cell cytotoxic activity using electronic cell sensor arrays. *Journal of Immunol Methods*.

Zimmerman, W., 2006. Multiphysics Modeling With Finite Element Methods. Dans: *Series on Stability, Vibration and Control of Systems*. NJ: World Scientific Publishing Co., Inc. River Edge.

Zoltowski, P., 1998. On the electrical capacitance of interfaces exhibiting constant phase element behaviour. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 443(1), p. 149–154

Résumé

Ce travail de thèse traite de la caractérisation par spectroscopie d'impédance d'échantillons biologiques de très faibles dimensions. Les phénomènes de polarisation, classiques en spectroscopie d'impédance, créent une contrainte et augmentent l'erreur de mesure en basses fréquences. L'objectif principal de cette thèse est l'optimisation géométrique de la structure d'un capteur à électrodes interdigitées afin d'élargir la bande de fréquence utile. Le premier chapitre synthétise les données fondamentales relatives au comportement électrique des tissus biologiques ainsi que leurs propriétés électriques. Un état de l'art des techniques fondamentales de mesure d'impédance basées sur les électrodes micrométriques est aussi décrit. Le deuxième chapitre concerne une approche théorique pour l'optimisation du capteur. Cette optimisation sert à élargir la bande de fréquence utile de mesure. Elle consiste à choisir un rapport optimum de distance inter-électrodes sur largeur d'électrode. Une modélisation tridimensionnelle du système d'électrodes chargé par un milieu biologique a été simulée sous ConventorWare®. Les résultats de cette simulation sont discutés. Le troisième chapitre traite de la conception et de la réalisation des biocapteurs. Les dispositifs technologiques développés sont décrits. La conception et la fabrication des composants sont présentées. Dans le dernier chapitre, une campagne de mesure sur des micro-volumes de fluides (solutions étalons, sang humain) est réalisée. Les mesures sont effectuées à l'aide de cinq micros capteurs à électrodes interdigitées. Les mesures réalisées sur des échantillons (solution étalons, sang humain) ainsi que la validation des dispositifs sont discutées. Les résultats obtenus sont comparés à des valeurs publiées dans la littérature et la théorie d'optimisation développée est validée et justifiée expérimentalement.

Mots-clés : Spectroscopie d'impédance électrique, bioimpédance, microélectrodes, ingénierie biomédicale, instrumentation électronique, biocapteur, polarisation électrique, propriétés électriques.

Summary

The characterization by impedance spectroscopy of biological micro samples is one of the objectives of this thesis. The well known polarization phenomena at low frequency is a constraint that increases the measurement error. The main objective of this thesis is to optimize the geometric structure of an interdigitated electrode sensor in order to obtain confident experimental results in an extended useful frequency band without a significant influence of the polarization effect. The first chapter synthesizes fundamental data on the electrical behavior of biological tissues and their electrical properties. A state of the art techniques of the fundamental impedance measurement based on micrometric electrodes is also presented. The second chapter develops a theoretical approach for optimization of the biosensor. This optimization is used to expand the usable measurement. Indeed, it leads to determine the optimum distance between electrodes versus electrode width. A 3D modeling of the electrode system loaded by a biological medium was simulated using ConventorWare and the results are discussed. In the third chapter, the devices developed in this work are described. Design and manufacture of the biosensor components are described. In the last chapter, measurements on microvolumes of fluids (standard solutions, human blood) using five micros sensors with interdigitated electrodes are presented and discussed. Finally we compare these results to published values in the literature and the optimization theory is experimentally validated.

Keywords : Electrical impedance spectroscopy, bioimpedance, microelectrodes, biomedical engineering, electronic instrumentation, biosensor, electrical polarization, electrical properties.