



Mesures pour le vivant : quelles évolutions ?

Measures for living matter: about new developments

Mustapha NADI ; Djilali KOURTICHE

Université de Lorraine ; Laboratoire d'Instrumentation Electronique de Nancy ; FST, Bd des Aiguillettes, 54506 ; Vandœuvre-lès-Nancy

mustapha.nadi@univ-lorraine.fr

Mots-clefs : Caractérisation électrique - caractérisation magnétique - bioimpédance - biomagnétisme – biocapteur, spectroscopie de bioimpédance ;

Key-words: Electrical characterization - magnetic characterization - Bioimpedance - biomagnetism – biosensor; bioimpedance spectroscopy

Résumé

Les interactions entre les champs électromagnétiques et le vivant passent par ses caractérisations électriques et magnétiques tant pour des applications médicales que dosimétriques. Les évolutions technologiques, notamment la miniaturisation des biocapteurs, permettent désormais d'envisager des mesures à l'échelle cellulaire plus fines et fiables. Cette meilleure connaissance des propriétés électriques et magnétiques à l'échelle cellulaire (voire infra) du vivant peut permettre d'ouvrir une voie à l'établissement de corrélations entre les propriétés aux échelles macroscopique et microscopique.

1.1 Introduction

Les recherches menées en dosimétrie EM sont généralement établies à l'échelle microscopique pour les biologistes et les médecins et essentiellement à l'échelle macroscopique (dosimétrie) pour les physiciens.

Outre les problèmes de non linéarités, d'anisotropie, d'hétérogénéité du vivant, le problème d'établir une homothétie des caractéristiques électriques et/ou magnétiques des milieux biologiques constitue un problème fondamental qui reste ouvert [1]. Une relation permettant de relier des caractéristiques physiques (électriques, mécaniques) du subcellulaire à la cellule (microscopique) (figure 1), puis de la cellule à l'agrégat de cellules (mésoscopique), à l'organe voire au corps entier (macroscopique) reste un défi majeur.

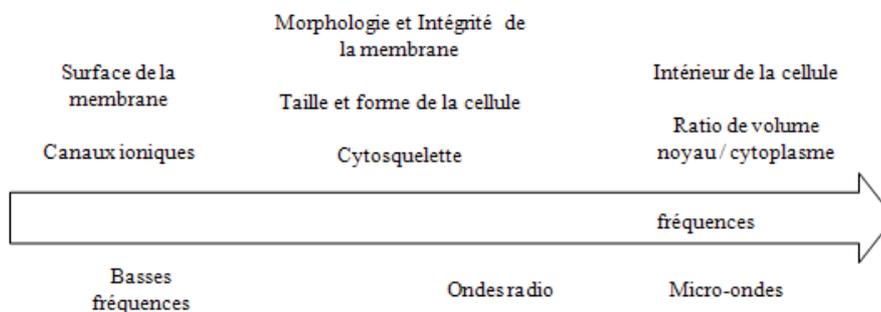


Figure 1 : Exploration d'une cellule biologique par champ électromagnétique en fonction de la fréquence

Cette question d'établir une corrélation des propriétés entre ses différentes échelles n'en est qu'à ses débuts et peu de théories ou de validations expérimentales peuvent être rapportées. Se pose par exemple la question de savoir si la valeur de la conductivité ou de la permittivité d'une cellule est corrélable à celle, globale, d'un agrégat de cellules. La caractérisation diélectrique d'un agrégat (ou d'une suspension de cellules) dépend à la fois de la fraction volumique, des dimensions et de la forme des particules en suspension. Les interactions entrant en jeu sont difficiles à évaluer. Plusieurs équipes se sont intéressées à ce problème multiéchelles mais les résultats restent à développer et à conforter. Citons le modèle proposé par Asami [3, 4] qui prend en compte la polarisation membranaire et la déformation (ellipse) des cellules. Le groupe de Miklavcic [5] a simulé la conductivité de cellules en suspension. La conductivité effective de cellules en suspension a été calculée pour différentes fractions volumiques. Les cellules ont été modélisées par des sphères ayant une conductivité équivalente et ont été organisés en réseaux cubiques, en couches et en clusters. Les résultats ont été comparés à différentes expressions analytiques (Maxwell ; Rayleigh ; Bruggeman) pour la conductivité effective avec comme conclusion que la théorie de Maxwell peut s'étendre à une fraction volumique cellulaire élevée.

Ces problèmes fondamentaux, théoriques et expérimentaux ne pourront trouver de validation sans des systèmes de mesures *ad hoc*. Ces dispositifs nécessitent de modéliser le comportement en charge des micros et nano-interactions en interface avec le vivant. Ces systèmes hybrides connaissent un développement important depuis une quinzaine d'années. Les caractérisations électrique et magnétique des milieux biologiques restent un champ d'investigation essentiel en termes prospectifs. Deux projets en développement par notre groupe sont succinctement décrits ci-dessous à titre d'illustration des évolutions de la mesure sur le vivant : la caractérisation électrique de globules rouges par spectroscopie de bioimpédance dynamique et la caractérisation magnétique du sang par magnétorésistance géante (GMR).

1.2 Caractérisations électrique et magnétique des milieux biologiques

Caractérisation électrique

La caractérisation électrique des milieux biologiques passe généralement par des mesures d'impédance. Qu'il s'agisse d'un organe [6] ou une cellule isolée le problème consiste toujours à remonter aux valeurs de la permittivité et de la conductivité à partir des caractéristiques dimensionnelles et géométriques du capteur [1]. Pour le cas d'agrégats cellulaires ou de cellule isolée les technologies de miniaturisation ont été mises à profit depuis une quinzaine d'années pour reprendre des travaux initiés par Fricke ou Cole dès les années trente [7, 8]. En se basant sur le principe de la bioimpédancemétrie des travaux ont été développés par plusieurs équipes [9, 10, 11] afin de réaliser une biopuce avec des micro-canaux intégrant des électrodes de quelques μm de diamètre.

Un biocapteur basé sur l'association de la mesure de bioimpédance avec un microsystème fluide pour des mesures sur le sang en dynamique a été développé par notre groupe [12]. L'objet de ce projet est d'associer la spectroscopie de bioimpédance aux techniques microfluidiques en vue d'obtenir une caractérisation électrique de cellules sanguines en régime dynamique. Une structure capillaire est utilisée pour effectuer des mesures sur des cellules isolées une à une. Le principe du micro Coulter Counter adapté à la bioimpédancemétrie permet d'obtenir un flux laminaire transportant les cellules sanguines à travers la zone de mesure avec une vitesse maximale de 100 échantillons/s. L'impédance de chaque cellule passant dans la zone d'analyse est mesurée par des microélectrodes en utilisant une électrode de référence. L'application de cette approche pour le diagnostic dynamique avec tri de cellules isolées au sein de canaux micro fluidiques a été développée par le groupe sur la base de microélectrodes interdigitées [12]. La conception a permis des simulations numériques intégrant le comportement des champs électriques dans la cellule de mesure en charge (figure 2). Un modèle multiphysique a permis le dimensionnement des microélectrodes. Les performances (sensibilité, reproductibilité, étalonnage,...) de la structure interdigitée ont été évaluées pour différentes dimensions en fonction de la fréquence.

Le développement de ce type de mesure nécessite de se pencher sur le problème de la fabrication d'un biocapteur hybride (choix des matériaux, gravure de micro-canaux, dimensionnement des

microélectrodes). L'épaisseur du canal devra être d'environ $4,3\mu\text{m}$, celle des électrodes d'environ $4\mu\text{m}$, l'écart entre les électrodes est approximativement de $7\mu\text{m}$ et leur largeur de $8\mu\text{m}$ dans un premier temps. Avec ces dimensions, il est possible de faire des mesures sur des cellules isolées avec une bonne sensibilité. Ce dimensionnement doit être optimisé pour améliorer la sensibilité et la reproductibilité. Le choix de la configuration des électrodes d'excitation et de mesure joue un rôle primordial. Le canal formé au centre a une épaisseur comprise entre 300 à $400\mu\text{m}$ d'épaisseur. Les cellules sont stockées dans un microréservoir dans lequel un dispositif à ondes acoustiques de surface (SAW) permet de « lancer » les cellules une à une à travers le microcanal de mesure. Cette même ouverture est raccordée à une pompe de précision dont le débit d'aspiration est réglé de façon très fine pour faire passer les cellules au centre du canal à vitesse constante. Le flux laminaire devra transporter les cellules sanguines à travers la zone de mesure avec une vitesse maximale de 100 échantillons/s.

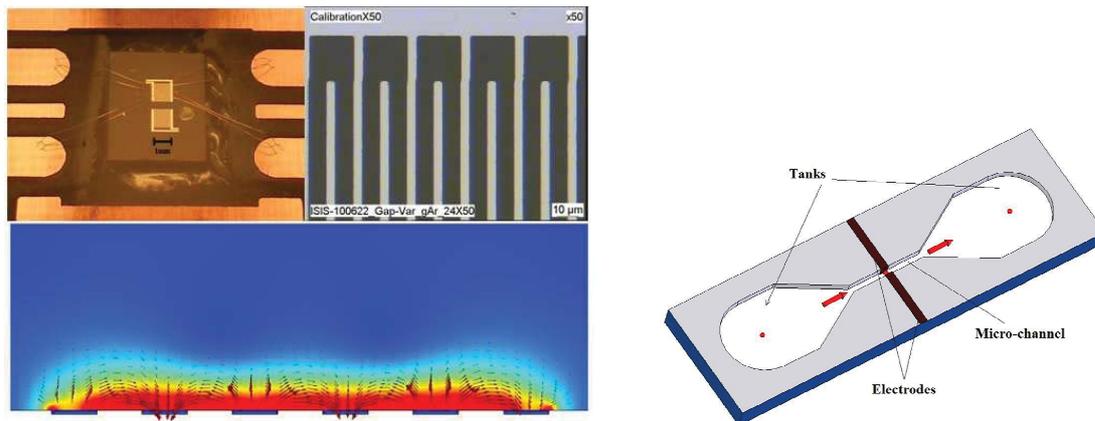


Figure 2 : photos de la structure interdigitée ; simulation des lignes de champ électrique ; structure du biocapteur permettant la mesure des cellules une à une avec l'emplacement des microélectrodes.

Cette technique permet d'obtenir une importante quantité d'informations jusque là uniquement mesurables par des instruments plus lents ou plus coûteux. En outre, la mesure ne requiert pas l'utilisation de marqueurs ; les cellules ne sont ainsi pas modifiées par la mesure, ce qui présente un avantage majeur dans de nombreuses applications.

Caractérisation magnétique

Les milieux biologiques sont supposés amagnétiques. On sait cependant, notamment par les travaux en RMN que le sang peut-être para ou diamagnétique en fonction de sa composition [1]. Les propriétés magnétiques du sang constituent un champ d'investigation moins développé que la caractérisation électrique tant pour des applications diagnostiques que thérapeutiques. Jusqu'à présent, cette question a surtout été étudiée pour les besoins d'optimisation des signaux de l'IRM.

Comme exemple d'application, citons la surcharge en fer (Hémochromatose) dans les organes qui constitue une pathologie aux conséquences graves. La nécessité d'un diagnostic se heurte à différents verrous technologiques et/ou scientifiques et les méthodes existantes présentent des limitations. Une voie diagnostique possible vise à déterminer une pathologie sur la base des propriétés magnétiques du sang. Cette mesure est actuellement très difficile à acquérir et chaque technique présente des inconvénients forts. La ponction biopsie du foie est abandonnée sauf s'il s'agit de cirrhose. En dehors de cette technique, on peut citer l'utilisation des SQUIDS pour l'analyse de ce taux de ferritine dans le foie mais, outre leur prix et leur encombrement, il n'en existe que quelques dizaines à travers le monde. L'IRM permet d'apprécier la surcharge en fer du foie avec certains inconvénients.

Nous nous intéressons à la mesure du taux de ferritine dans le sang. Ce travail est réalisé en collaboration avec le Pr Yamada de l'Université de Kanazawa [13]. Notre objectif à terme est de développer une

méthode de caractérisation à haute sensibilité à base de magnétorésistance géante et son électronique de conditionnement en vue de caractériser magnétiquement des Ferro fluides dans un premier temps et à terme le sang. Pour cela un biocapteur magnétique de type GMR a été développé pour la caractérisation magnétique du sang dans un but prospectif car les variations fréquentielles des valeurs de la susceptibilité et de la perméabilité magnétiques du sang restent mal connues.

La figure 3 montre la chaine expérimentale destinée à la caractérisation de Ferro fluides. Le capteur à base de GMR a une sensibilité d'environ $12,5 \text{ mV} / \mu\text{T}$. Un champ magnétique uniforme est appliqué via des bobines de Helmholtz. Le milieu Ferro fluide consiste en nano billes diluées de diamètre calibré. Des mesures et des simulations (figure 3) ont permis d'établir une relation entre la perméabilité relative la densité massique et la sensibilité. Une estimation de la perméabilité à faible concentration D_w (moins de 1%) s'est avérée difficile à cause d'un mauvais rapport signal/bruit. Des mesures expérimentales ont permis d'obtenir une sensibilité de 10^{-3} qu'il est nécessaire de descendre à 10^{-4} pour obtenir un signal facilement exploitable. D'autres résultats préliminaires montrent un comportement spectroscopique révélant des fréquences-signatures fonction des dimensions des billes calibrées et de leur concentration.

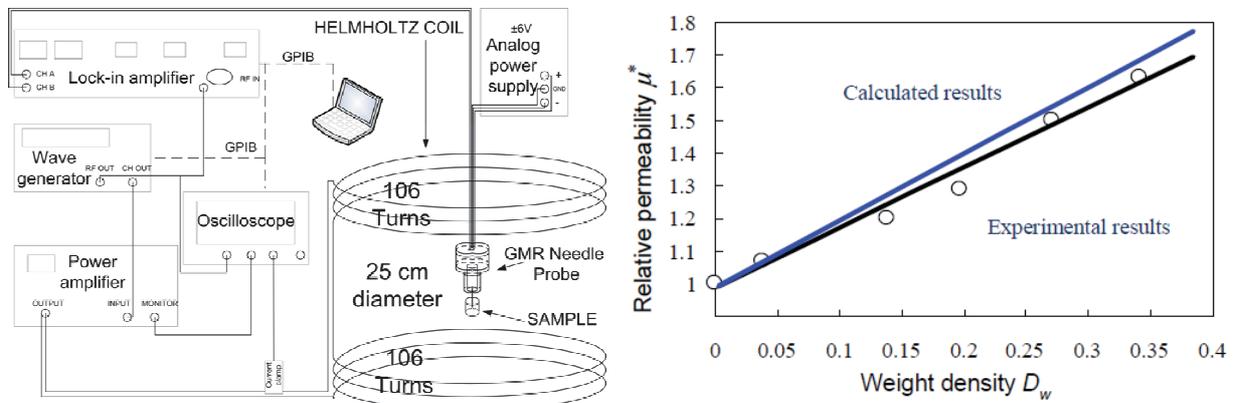


Figure 3 : Montage expérimental de mesure de la perméabilité et de la susceptibilité magnétique de Ferro fluide ; exemple de résultat de simulation et de mesure : variation de la perméabilité relative en fonction de la densité massique.

Cette technique reste encore à améliorer par une fiabilité de la mesure et une meilleure sensibilité. Son développement passe par des améliorations des performances techniques et surtout une électronique de conditionnement robuste. Ces développements sont en cours. Les résultats obtenus sont prometteurs et permettent d'envisager à court terme une méthode de caractérisation par spectroscopie magnétique de bios fluides comme le sang complémentaire des résultats obtenus à l'échelle macroscopique [14].

Conclusion

Les problématiques posées par l'usage des champs électromagnétiques pour des applications médicales ou pour des calculs dosimétriques peuvent tirer profit de modélisations et d'analyses multiéchelles. Les évolutions technologiques, notamment la miniaturisation des biocapteurs, permettent d'envisager des mesures à l'échelle cellulaire plus fines et fiables. Cette meilleure connaissance des propriétés à l'échelle cellulaire (voire infra) du vivant peut permettre d'ouvrir une voie à l'établissement de corrélations entre les propriétés aux échelles macroscopique et microscopique.

De nouvelles méthodes sont en développement depuis une quinzaine d'années. Ce n'est que le début d'une métrologie innovante pour le vivant mais les résultats préliminaires permettent d'envisager des perspectives nouvelles dans le domaine des interactions CEM milieux biologiques.

Références

1. Foster Kenneth R. and Schwan Herman P.- Dielectric properties of tissues - Chapter 1-"Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields" - 2ème édition - Ed : Polk C. et Postow E; CRC Press - pp 27-102-1996
2. Nadi M., «Dielectric Characterization of Biological Tissues: Constraints Related to Ex Vivo Measurements», in *Sensors*, (2008) 75-90 Springer Berlin Heidelberg S.C. Mukhopadhyay and R.Y.M. Huang
3. Asami Koji; Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy ; *Journal of Non-Crystalline Solids* 305 (2002) 268–277
4. Asami K, T Hanai, and N Koizumi ; Dielectric analysis of Escherichia coli suspensions in the light of the theory of interfacial polarization. *Biophys J.* 1980 August; 31(2): 215–228.
5. Pavlin M, Slivnik T, and Miklavcic Damijan ; Effective Conductivity of Cell Suspensions ; *IEEE Transactions on BME*, Vol 49, N° 1, Jan 2002 77
6. Nadi M, Kourtiche D, Roth P, Schmitt P; Analyse of Dispersion of Ex Vivo Electric Properties Measurements of Female Breast Tissues between 1 MHz and 1 GHz ; *Progress in Electromagnetics Research Symposium (PIERS 2011)* ; Marrakesh, Morocco, March 20-23, 2011
7. H Fricke 1932 "The theory of electrolytic polarisation" ; *Phil. Mag.* (14) 310-318
8. H P. Schwan ; "Determination of biological impedances" - in *Physical techniques in biological research*, Academic press (1963)
9. A Ivorra, R Gomez, N Noguera, R Villa, A Sola, L Palacios, G Hotter and J Aguilo, "*Minimally invasive silicon probe for electrical impedance measurements in small animals*" *Biosensors Bioelectron.* (19) pp 391–399 (2003)
10. S.Gawad, S. Metz, L. Schild, and Ph. Renaud, "*Impedance Spectroscopy Cell Analysis in Microchannels*", *Micro Total Analysis Systems*, pp. 253-255 (2001)
11. Borkholder David A. - Cell based biosensors using microelectrodes - Thesis -The department of electrical engineering and the committee on graduates studies of Standford University - November 1998
12. Ibrahim M., Claudel J., Kourtiche D., Assouar B. and Nadi M.; Physical and Electrical Modeling of Interdigitated Electrode Arrays for Bioimpedance Spectroscopy ; in *New Developments and Applications in Sensing Technology Lecture Notes in Electrical Engineering*, 2011, Volume 83, 169-189, DOI: 10.1007/978-3-642-17943-3_9
13. Haraszczuk R., Kakikawa M., Ueno T., Yamada S., and Nadi M.; "Spectroscopic Susceptibility Measurements of Magnetic Markers by SV-GMR Needle Probe" ; *Journal of Magnetic society of Japan MSJ* ; Volume 35, No. 32 ; 157-162 (2011)
14. Jaspard F, Nadi M., «Dielectric properties of blood : an investigation of haematocrit dependance», , *Physiological Measurement*, (2003-02) Vol 24 17 137-147