La mesure de la bio-impédance d'un végétal comme moyen d'introduire le domaine de la biologie dans une formation E.E.A.

Olivier Français, Bruno Le Pioufle
Département EEA, ENS de Cachan, 61 Avenue du Prdt Wilson, 94230 Cachan
SATIE, CNRS UMR 8029, Institut d'Alembert, ENS Cachan, France
Contact : olivier.francais@ens-cachan.fr

RESUME :

Cet article présente l'utilisation d'un tissu biologique végétal comme support pédagogique auprès d'élèves dans une formation EEA de niveau L3 pour les sensibiliser aux interactions entre le champ électrique et le vivant, et les initier à l'électrophysiologie. Il permet de montrer aux élèves le rôle que peut avoir l'E.E.A. et la physique appliquée, dans des disciplines scientifiques très variées, et ici en particulier dans le domaine de la biologie. La partie expérimentale de cet enseignement, inclue une phase d'instrumentation pour la mesure, puis d'extraction des paramètres pour la détermination d'un modèle électrique du tissu biologique et enfin une phase d'étude d'effets induits par un choc électrique sur ce tissu. En s'appuyant sur la mesure d'une bio-impédance dans la gamme [100Hz – 5MHz] les élèves établissent le modèle équivalent électrique du tissu végétal (ici un simple morceau de pomme de terre). Ils mettent en évidence le comportement en fréquence du tissu biologique et sa nature: assemblage de cellules au sein d'un milieu extracellulaire conducteur (conduction ionique). Deux modèles électriques sont confrontés aux mesures expérimentales (modèle de Fricke et de Cole-Cole) par une extraction des paramètres en utilisant la méthode des moindres carrés et comparés pour en voir les limites. Enfin, une fois ces modèles assimilés, les élèves étudient l'évolution de la valeur des paramètres trouvés lors de l'application d'un choc électrique sur le tissu biologique et tente d'analyser ce qui se passe au sein du tissu. Au final, les élèves de L3 y ont vu un regard qu'ils n'imaginaient pas de l'EEA, très appliqué et original à l'aide d'un support étonnant que constitue une pomme de terre.

Mots clés : Bio-impédance, modèles électriques, électroporation, estimation de paramètres.

1 INTRODUCTION

Dans le cadre de la formation SAPHIRE, dispensée au niveau L3 à l'ENS de Cachan, un module d'ouverture d'électrophysiologie est nouvellement proposé aux élèves suivant le parcours Génie Electrique [1].

Ce module (8hC / 4hTD / 4hTP) propose une orientation des enseignements autour de l'interaction entre le champ électrique et le vivant. Il introduit les effets de l'électricité et son utilisation au sein de tissu biologique [2]. Il permet de montrer que le domaine du génie électrique (Electrical Engineering) où l'on étudie principalement la conduction électronique, peut aussi adresser des domaines scientifiques variés, moins usuels dans les formations traditionnelles EEA, tels que la chimie ou la biochimie (conduction ionique dans des solutions). Dans le cas présenté ci-après, le matériau support de la conduction est un tissu biologique.

Dans ce cadre, une étude expérimentale a été proposée aux étudiants sur la caractérisation par Impédancemétrie d'une pomme de terre (fig. 1). Très simple à mettre en œuvre, cette mesure de bio-impédance sert alors de support pour faire comprendre aux élèves comment aborder une thématique qui n'est pas à priori de leur champ de compétences (la biologie) avec un regard propre à l'EEA. Cette notion de bio-impédance est celle que l'on retrouve sur certains pèse-personnes modernes qui permettent d'avoir une image de la quantité de graisse corporelle [3].

2 NOTION DE BIO-IMPEDANCE

La notion de bio-impédance caractérise le comportement des tissus biologiques soumis au passage d'un courant alternatif de faible intensité ($< \text{mA}$) [4]. Dans le cadre de ce module, nous nous sommes limités à la gamme de fréquence [100Hz – 5MHz] qui correspond à la conduction des ions au sein du tissu biologique. Les effets de polarisation n'ont pas été abordés mais constituent une perspective de développement intéressante.

fig 1 : Exemple de tissu biologique constituant un dipôle pour une mesure de bio-impédance : la pomme de terre

2.1 Tissu biologique

On peut présenter un tissu biologique comme un assemblage de cellules (constituées d'un fluide intracellulaire « homogène » entouré d'une membrane pro-

tectrice, isolante) en suspension dans un fluide dit extracellulaire essentiellement constitué d'eau et d'ions. Ces 2 fluides sont de compositions différentes. Ils présentent une conduction σ (ionique) et une polarisation (permittivité ϵ) qui leur est spécifique.

A basse fréquence, le courant ne circule qu'au sein du milieu extracellulaire (autour des cellules, la membrane isolant électriquement la cellule – fig. 2-a) ; alors qu'en haute fréquence, le courant traverse la membrane et se propage ainsi dans le milieu intracellulaire modifiant alors le parcours des lignes de courant (fig 2-b) [5].

fig 2 : Comportement des lignes de courant au sein d'un tissu biologique : (a) cas basse fréquence – $f < 10\text{kHz}$ (b) cas haute fréquence – $f > 500\text{kHz}$.

Il y a donc une fréquence de transition caractéristique de l'état physiologique des cellules qui dépend des caractéristiques de la membrane et des fluides intra/extra cellulaires. En effectuant une mesure d'impédance à ces fréquences, il est possible de caractériser cet effet et ainsi de pouvoir le modéliser. Deux approches ont été proposées aux étudiants : le modèle de Fricke [6] et le modèle de Cole-Cole [7].

2.2 Modèle de bio-impédance

2.2.1 Modèle de Fricke

Le comportement « électrique » du tissu biologique (dans la gamme 1kHz – 1MHz) peut se représenter à l'aide du schéma électrique suivant (fig. 3):

fig 3 : Représentation par le modèle de Fricke d'une cellule biologique dans son milieu nutritif.

C'est une structure simple que les étudiants de niveau L3 manipulent très aisément. L'analogie avec le tissu biologique traduit le comportement de celui-ci. En

basse fréquence, seule la résistance R_m est 'visible', elle caractérise le milieu extracellulaire. Avec l'augmentation de la fréquence, la membrane cellulaire, représentée par la capacité C_m , devient 'transparente' électriquement. On fait alors apparaître la résistance R_i , image du milieu intracellulaire, en parallèle de la résistance R_m (fig. 3).

C'est un modèle qui est très rapidement assimilé par les élèves et admis dans un premier temps. Le calcul de l'impédance associé donne le résultat suivant :

$$\underline{Z}_{bio} = R_m \frac{1 + jR_i C_m \omega}{1 + j(R_i + R_m) C_m \omega}$$

La représentation de son module en fonction de la fréquence a cette allure (fig. 4) :

fig 4 : Tracé de l'allure du module de l'impédance équivalente dans le cadre du modèle de Fricke ($R_m = 8\text{k}\Omega$, $R_i = 300\Omega$, $C_m = 1\text{nF}$)

2.2.2 Modèle de Cole-Cole

Un tissu biologique est souvent constitué de cellules présentant des caractéristiques hétérogènes (fig. 5) [8]. Ces variations peuvent se caractériser par le circuit suivant où chaque cellule a ces propres caractéristiques.

fig 5 : Illustration de l'hétérogénéité d'un tissu biologique par la mise en parallèle de modèle élémentaire.

Le modèle permettant de globaliser ces variations pour en avoir une vision « moyennée » est le modèle dit de « Cole-Cole ». Dans ce cas, on fait apparaître une résistance en basse fréquence (R_o), une résistance en haute fréquence (R_∞) et une capacité dite fractionnelle (CPE : Constant Phase Element) définie par une impédance capacitive telle que :

$Z_{CPE} = 1/(jC\omega)^\alpha$ avec C la capacité et α son ordre ($0 < \alpha \leq 1$). On associe alors les éléments selon le schéma suivant (fig. 6) :

fig 6 : Globalisation de la représentation d'un tissu par le modèle de Cole-Cole

C'est un modèle plus complexe à introduire auprès des étudiants. Celui-ci est présenté aux élèves une fois qu'ils se rendent compte que le modèle de Fricke ne correspond pas de manière fidèle au comportement expérimental. L'expression de la bio-impédance devient alors :

$$Z = R_\infty + \frac{R_0 - R_\infty}{1 + (j\omega\tau)^\alpha}$$

Ces deux modèles deviennent équivalents lorsque $\alpha=1$. On demande alors aux élèves de montrer les relations suivantes par un travail sur l'égalité des deux impédances :

$$R_o = R_m$$

$$R_\infty = R_m // R_i = \frac{R_m * R_i}{R_m + R_i}$$

$$\tau = (R_m + R_i) * C$$

Nous avons ainsi orienté notre démarche pédagogique sur la compréhension des modèles vis à vis de la physiologie du tissu biologique mais aussi sur l'analyse de la validité du modèle employé (Fricke puis Cole-Cole).

3 DEMARCHE PEDAGOGIQUE

Comme on le voit, une bio-impédance peut se représenter simplement à l'aide d'un réseau de circuit R-C. Son analyse est alors simple et on peut facilement à partir d'une mesure en déduire leur valeur effective.

3.1 Instrumentation

Une maquette a été mise en place afin d'effectuer le relevé de la bio-impédance (fig. 7). Le modèle proposé est un montage dit « Trans-impédance » (fig. 8). Une mesure deux pointes est utilisée pour caractériser le tissu biologique (Z_{bio}). Elle est mise en œuvre en 'plantant' deux électrodes (pointes) dans le tissu.

Ici, les effets de polarisation des électrodes ne sont pas étudiés car non visible aux fréquences de mesure. Un amplificateur opérationnel rapide a été utilisé (AD-847 ; GBW 50MHz), son influence est mineure sur la mesure et son étude n'a pas été approfondie par les élèves. Par contre, c'est deux aspects sont abordés

durant la mesure et peuvent faire l'objet d'approfondissement par la suite.

fig 7 : Carte électronique permettant la mesure de la bio-impédance en mesure 2 pointes.

La fonction de transfert du circuit est :

$$\underline{H} = \frac{V_s}{V_e} = - \frac{R_{Trans.}}{Z_{bio}}$$

La fonction de transfert $\underline{H}$ du montage permet de déterminer la valeur de la bio-impédance Z_{bio} et de tracer son évolution (Module et phase) en fonction de la fréquence.

fig 8 : Schéma électronique du montage utilisé

3.2 Extraction des paramètres

Une fois le relevé effectué et tracé, on propose deux méthodes aux étudiants pour déterminer les paramètres. La première exploite le tracé en lien avec l'expression du modèle de Fricke afin d'en déduire les 3 paramètres associés (R_m , R_i et C_m). Ils retrouvent ainsi par un raisonnement aux limites les valeurs de R_m et R_i . En estimant les deux fréquences de coupure du module apparaissant dans le tracé, ils peuvent remonter à la valeur de C_m . Ils se rendent compte alors de la mauvaise adéquation du modèle avec la réalité. En effet, la valeur de C_m n'est pas la même pour les 2 fréquences.

On passe alors à la deuxième méthode qui consiste à utiliser les moindres carrés pour extraire l'expression des paramètres à partir du modèle de Fricke. On s'appuie sur le logiciel Matlab© et la fonction « lsqcurvefit ». Un exemple de programme commenté leur est fourni et ils doivent l'adapter au problème posé :

```

% Exemple : cas d'un premier ordre avec comme in-
connues: Gain statique Go : a(1) et Fréquence de cou-
pure fo : a(2)
% Ici Calcul sur le module : expression mis dans 'f'
f = @(a,x)abs(a(1)./(1+(i*a(2)*x)));
% remarque : a : les coeff inconnus et x la variable
% @ : permet d'utiliser des paramètres non encore dé-
finis (donc inconnus)
% Mesures effectuées
% yi (module) la valeur de la fonction 'f' aux points x
(fréquence) de mesure
x = [1 10 100 1000];
yi = [5 4.89 3.6 4];
% Initialisation de la valeur de a (les inconnues)
% pour démarrer le calcul
% On suppose a(1)=3 et a(2)=1
a0 = [3 1];
% fitting :détermine a pour que f soit au plus proche
% des points de mesure connus (x, yi) avec
% ao comme points de départ pour trouver a
a = lsqcurvefit ( f , a0 , x , yi);
% Affichage du résultat
Go = a(1)
fo = a(2)
semilogx(x, yi)
hold on
semilogx(x, f(a, x),'o')

```

Les résultats obtenus permettent d'avoir une valeur pour les trois paramètres. Cela illustre l'intérêt de cette méthode vis à vis de l'analyse directe du résultat. Mais le tracé superposant relevé et modèle extrait montre invariablement une différence dans la dynamique de transition entre R_m et R_m/R_i . La figure 9 correspond à cet écart. Elle montre le relevé de la bio-impédance, effectué par un étudiant (extrait de son rapport). Ce relevé donne la mesure (courbe en bleue) ainsi que sa correspondance avec le modèle de Fricke, obtenu par la méthode des moindres carrés (courbe rouge).

On interroge alors l'étudiant sur le résultat qu'il trouve globalement acceptable bien qu'il soit explicite qu'il y a un écart entre mesure et modèle, dans la zone de transition.

fig. 9 : Exemple de relevé de bio-impédance obtenu par un étudiant et analysé avec le modèle de Fricke.

On questionne alors les étudiants sur ce fait et leur force à admettre qu'il y a un problème ! Cela permet alors d'introduire le modèle de Cole-Cole.

Ils adaptent alors leur programme pour pouvoir extraire les 4 paramètres du modèle de Cole-Cole (R_o , R_∞ , τ et α). Cette fois-ci, le résultat trouvé se superpose d'une manière beaucoup plus fidèle à la mesure (fig.10). Les élèves prennent alors conscience de l'hétérogénéité d'un tissu biologique et de la manière d'en rendre en compte à l'aide d'un modèle associé.

fig. 10 : Exemple de relevé de bio-impédance obtenu par un étudiant et analysé avec le modèle de Cole-Cole.

Cette étude se fait aussi dans le plan de Nyquist afin de familiariser les élèves avec ce type de représentation. Elle met bien en évidence les différences obtenues par les deux modèles sur le modèle électrique de la bio-impédance (Fricke et Cole-Cole) (Fig. 11).

fig. 11 : Représentation dans le plan de Nyquist de la bio-impédance mesurée (courbe continue) et "fittée" par le modèle de Fricke (étoiles) ou de Cole-Cole (ronds).

3.3 Exploitation dans le cadre d'un choc électrique

Une fois acquises les notions précédentes (Bio-impédance, modèles associés), on fait alors étudier aux élèves l'effet du choc électrique sur le tissu biologique [9] [10]. C'est un sujet d'actualité qui parle aux étudiants. C'est une technique que l'on trouve en électrochimiothérapie du cancer pour améliorer les rendements des médicaments ou encore c'est aussi une technique d'extraction de jus de fruit avec une meilleure efficacité.

L'objectif ici est d'effectuer une électroperméabilisation des cellules qui consiste à venir déstructurer les membranes cellulaires par l'élévation de la différence de potentiel appliquée localement sur la membrane cellulaire suite à l'application d'une impulsion de champ électrique. Pour cela, il faut appliquer une dizaine d'impulsions de champ électrique d'une amplitude typique de 500V/cm et d'une durée de 100us à la fréquence 1Hz. Les cellules soumises à ce profil de champ, perdent alors le rôle protecteur que leur apporte leur membrane. Il y a alors une fuite d'ions entre les milieux intracellulaire et extracellulaire qui modifie la valeur du modèle en basse fréquence mais pas en haute fréquence.

Afin d'atteindre ces niveaux de champs, on utilise un amplificateur de puissance spécifique large bande (NF HSA4101) qui permet de délivrer des tensions jusqu'à $\pm 75V$ sur une bande de fréquence allant du continu à 10MHz. De plus, on utilise alors des électrodes dédiées qui sont espacées de 1mm entre elles (fig. 12).

fig 12 : Electrode permettant l'application du pulse de champ électrique d'électroperméabilisation

Afin de mettre en œuvre les pulses, on utilise un générateur en mode « Burst » déclenché manuellement, pour générer 10 impulsions de durée 100us, d'amplitude 0 – 5V avec une fréquence de répétition de 1Hz (fig. 13). Ce signal est associé à l'amplificateur de puissance avec un gain de 10 en tension, pour obtenir un pulse d'amplitude en champ de 500V/cm.

fig. 13 : Profil du champ pulsé appliqué

Les élèves effectuent un relevé avant l'application des pulses puis après. Il leur est alors demandé d'analyser le résultat en utilisant leur programme d'extraction des paramètres.

Sur la figure 14, un exemple des résultats obtenus par des étudiants montre le suivi de la bio-impédance suite à l'envoi de plusieurs « pulses » d'électroperméabilisation. On y voit une diminution notable de l'impédance basse fréquence qui traduit la fuite d'ions intracellulaire vers le milieu extracellulaire.

On notera sur les courbes de la figure 14, une remontée de l'impédance (en basse fréquence). Cette remontée est caractéristique de l'interface électrochimique entre les électrodes (conduction d'électrons) et le tissu biologique (conduction d'ions). Ce contact se traduit alors, en terme de modèle, par la présence d'un condensateur reflet de la polarisation des électrodes. A noter que cet effet ne perturbe pas l'analyse lors du fitting mais permet ici de l'introduire auprès des élèves.

fig. 14: Evolution de la bio-impédance dans le plan de Nyquist lors d'application de pulses d'électroperméabilisation : rouge avant application des impulsions, bleue après 5 impulsions, verte après 10 impulsions.

4 BILAN ET EXPLOITATION

Au delà de la surprise de voir un tissu végétal utilisé (une pomme de terre) comme modèle expérimental, les étudiants ont montré un vif intérêt lors du déroulement des séances et y ont vu une manière efficace d'utiliser leurs connaissances en Génie Electrique. Cette approche leur a montré que l'électricité n'est pas que dans les circuits, elle est aussi manipulable et analysable sur un tissu biologique. L'implication des élèves qui en a découlée peut s'expliquer pour plusieurs raisons :

- la mesure c'est faite sur un « objet » insolite (pomme de terre) mais dont le comportement s'est trouvé similaire à celui d'un circuit électrique que l'on pourrait réaliser à l'aide de composants en discret.
- chaque élément que compose le circuit électrique modèle est associé à une signification physique que les étudiants de L3 comprennent bien.
- la mise en œuvre d'un programme pour effectuer une extraction de paramètres les impressionne car elle leur montre une technique robuste pour déterminer les éléments mesurés.
- la remise en cause d'un modèle (Fricke) qui leur est proposé et qui semble a priori cohérent mais qui au final s'avère approximatif leur montre qu'il faut toujours vérifier la cohérence modèle-mesure.
- la mise en place d'un modèle qui est plus précis (Cole-Cole) leur montre qu'il y a des méthodes mathématiques pour prendre en compte des variations statistiques de paramètres.

- la dernière étape de la manipulation que constitue l'application du choc électrique leur a fait prendre conscience que l'utilisation judicieuse d'un profil de champ électrique pouvait permettre de modifier un milieu biologique et donc d'agir dessus sans pour autant le détruire. De plus, ils ont pu analyser cette modification et lui associer une signification physique.

Ces travaux pédagogiques autour de la mesure de bio-impédance ont été étendus autour de Travaux d'Etude et de Recherche (TER), cette fois-ci de niveau M1. Les élèves ont pu choisir soit d'approfondir l'instrumentation en étudiant l'influence de l'électronique sur la mesure (prise en compte des défauts de l'A.Op) ou bien la mise en œuvre d'une mesure 4 pointes. L'aspect traitement du signal a aussi fait l'objet d'un TER, mais cette fois-ci en étudiant la réponse impulsionnelle du tissu végétal.

5 CONCLUSION

Dans cet article, nous vous avons présenté la démarche pédagogique mise en place autour de la mesure de la bio-impédance d'un tissu biologique dans le cadre d'une formation en « Electrical Engineering ». Il a été ainsi proposé aux étudiants, principalement de niveau L3, d'utiliser des savoirs de l'E.E.A. (Impédancemétrie, Modèle équivalent électrique, traitement du signal, Application de champ électrique pulsé) pour aborder le monde de la biologie avec un regard physique appliquée.

C'est un premier pas vers le monde des biotechnologies où le rôle des formations type E.E.A. va devenir croissant.

Bibliographie

- [1] <http://www.eea.ens-cachan.fr/version-francaise/formations/>
- [2] L. Bernard, "Caractérisation électrique des tissus biologiques et calcul des phénomènes induits dans le corps humain par des champs électromagnétiques de fréquence inférieure au GHz, Thèse de doctorat, spécialité E.E.A. Ecole Centrale de Lyon, 20 Sept. 2007.
- [3] M. Jaffrin, M.V. Moreon, "Les pèse-personnes impédancemètres ou comment connaître sa composition corporelle en se pesant", *Kinésithérapie, Les annales*, N°44-45, Sept. 2005, pp 44-56.
- [4] D. Miklavcic, N. Pavselj, "Electric properties of tissues", *Wiley Encyclopedia of biomedical engineering*, 2006.
- [5] S. Grimnes, O. Martinsen, "Bioimpedance and bioelectricity – Basics", Academic Press, 2008
- [6] H. Fricke, S. Morse, "The electric resistance and capacity of blood for frequencies between 800 and 4.5 Million cycles", *Journal of General Physiology*, 1925, Vol 9, pp 153-167.
- [7] K.S. Cole, "Permeability and impermeability of cell membranes for ions", *Quant. Biol.*, 1940, Vol. 8, pp 110-122.
- [8] W. Kuang, S.O. Nelson, "Low-frequency dielectric properties of biological tissues: a review with some new insights", *American Society of Agricultural Engineers*, 1998, Vol. 41 (1), pp 173-184.

- [9] M. Fincan, P. Dejmek, "In situ visualization of the effect of a pulsed electric field on plant tissue", *Journal of Food Engineering*, 2002, Vol. 55, pp 223-230.
- [10] B. Blad, B. Persson, "An electrical impedance indicator to assess electroporation in tissue, a preliminary study", *ITBM-RBM*, 2005, Issues 5-6, pp 328-332.