

# Analyse des signaux pour un dispositif de mesure et de stimulation du système nerveux central

C. MOULIN<sup>1</sup>, D. BARBIER<sup>6</sup>, G. CHARVET<sup>1</sup>, R. GUILLEMAUD<sup>1</sup>, M. ANTONAKIOS<sup>1</sup>, H. FANET<sup>1</sup>, B. YVERT<sup>2</sup>, S. JOUCLA<sup>2</sup>, P. MEYRAND<sup>2</sup>, L. ROUSSEAU<sup>3</sup>, V. PERRAIS<sup>3</sup>, B. MERCIER<sup>3</sup>, F. GOY<sup>4</sup>, S. BENOIT<sup>4</sup>, S. SPIRKOVITCH<sup>5</sup>

<sup>1</sup>CEA LETI, Département pour les Micro Technologies pour la Biologie et la Santé, 17 r. des martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9  
celine.moulin@cea.fr

<sup>2</sup>Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux, CNRS UMR5816 Bâtiment B2 av. des facultés, 33405 Talence Cedex  
b.yvert@lnr.u-bordeaux1.fr

<sup>3</sup>Groupe ESIEE, 2 Bd. Blaise Pascal Cité Descartes, 93162 Noisy Le Grand  
mercierb@esiee.fr

<sup>4</sup>Bio-Logic, 1 r. Europe, 38640 Claix  
francois.goy@bio-logic.fr

<sup>5</sup>MEMSCAP S.A., parc des fontaines, 38 926 Crolles Cedex  
serge.spirkovitch@memscap.com

<sup>6</sup>INSA de Lyon, Laboratoire Physique de la Matière, Bâtiment Blaise Pascal, 69621 Villeurbanne Cedex  
daniel.barbier@insa-lyon.fr

**Résumé** – Un des enjeux actuels en Neurosciences est de pouvoir enregistrer simultanément les activités d'un grand nombre de cellules au sein de grands réseaux de neurones, et de pouvoir stimuler de manière dynamique ces réseaux afin d'en contrôler les activités. Le but du projet Neurocom est de réaliser un système multiélectrode haute densité intégré sur silicium, permettant d'enregistrer et de stimuler de grands réseaux de neurones in vitro. Ce dispositif sera constitué d'une microstructure d'électrodes stérilisable hybridée sur un circuit analogique intégré (préamplification, filtrage, multiplexage, stimulation), lui-même interfacé via une carte numérique de commande et acquisition reliée à un PC. Afin de pouvoir mieux appréhender les phénomènes bioélectriques et électrochimiques à l'interface capteur et donc mieux spécifier le cahier des charges et l'architecture du système, la maquette de test NEUROCOM1 a été conçue en électronique discrète et est actuellement utilisée pour conduire différents tests.

**Abstract** – *One of the current issues in Neurosciences is to be able to simultaneously record the activities of a large number of cells within large-area networks of neurons, and to be able to stimulate in a dynamic way these networks in order to control their activities. The goal of the Neurocom project is to develop a high density microelectrode array system integrated on silicon, to record and stimulate wide-area networks of living (in vitro) neurons. This device will consist of an electrode microstructure connected to an integrated analog circuit (preamplification, filtering, multiplexing, stimulation) interfaced via a digital board connected to a PC for acquisition and control. In order to better apprehend the bioelectric and electrochemical phenomena occurring at the sensor interface, and thus to better specify the architecture of the system, the NEUROCOM1 prototype was created using discrete electronics and is currently being used to lead various tests.*

## 1. Introduction

L'analyse des activités du système nerveux repose actuellement principalement sur deux grands champs d'exploration très fertiles : d'un côté l'électrophysiologie cellulaire (ex. : patch clamp [1], [2]), et d'un autre les techniques d'imagerie fonctionnelle (ex. : IRMf, EEG...). A l'heure actuelle, un des enjeux des neurosciences est de parvenir à combiner ces deux niveaux d'analyse en enregistrant un réseau de neurones biologiques dans sa globalité, tout en préservant l'accès simultané à l'information cellulaire [3], [4]. La maîtrise des procédés de microfabrication développés pour l'industrie de la microélectronique a permis aux matrices de micro électrodes ou MEAs (Micro Electrode Array) de se développer depuis maintenant une trentaine d'années pour proposer une direction afin de traiter cette problématique [5]. Les systèmes commerciaux actuels (MCS, Panasonic...) sont basés sur une électronique d'acquisition et/ou de stimulation discrète,

s'interfaçant avec des MEAs d'une centaine de microélectrodes au maximum, ce qui s'avère insuffisant pour obtenir une cartographie de l'activité bioélectrique de la totalité de l'échantillon biologique (ex. : moelle épinière de souris : dimensions 1mm \* 1cm ou plus).

## 2. Le projet NEUROCOM

Le projet Neurocom, financé en partie par le ministère de la recherche, a pour vocation de construire un système d'étude du système nerveux in vitro (ex vivo), à partir d'une MEA de plusieurs centaines de microélectrodes au pas de 100  $\mu\text{m}$ . Le projet comprend plusieurs axes de développement : la MEA elle-même qui constitue l'interface avec le milieu biologique, un ASIC analogique (Application Specific Integrated Circuit) permettant la stimulation et l'enregistrement du tissu nerveux en parallèle sur toutes les microélectrodes, une carte numérique d'acquisition,

commande et traitement, ainsi qu'une interface homme-machine (IHM) intégrant des outils logiciels de visualisation et de traitement des données adaptée aux besoins des biologistes.

Le système Neurocom est composé de 4 modules principaux (FIG. 1) :

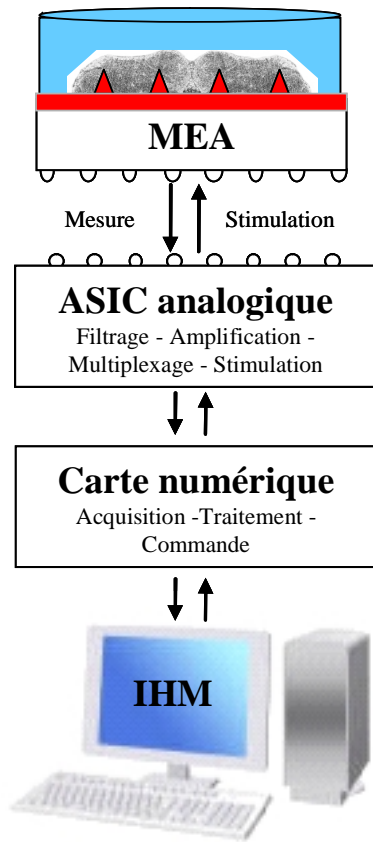


FIG. 1 : système Neurocom

**La MEA** constitue à la fois un capteur et un stimulateur électrochimique de la bioélectricité émanant des réseaux de neurones. Elle est actuellement en cours de développement à l'ESIEE en collaboration avec MEMSCAP, et doit comporter à terme un millier de microélectrodes microstructurées en platine, de dimensions de l'ordre de la dizaine de microns, avec un pas d'une centaine de microns.

**L'ASIC analogique** développé par le CEA-LETI, a pour but d'acquérir (amplification, filtrage), et multiplexer les signaux biologiques de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{V}$  au  $\text{mV}$  (potentiels d'action (PAs) et champ de potentiels locaux (LFPs)), et de générer les stimuli en courant ou tension adéquats au plus près de la MEA pour éviter les problèmes dus aux couplages, qui, ici, sont accentués par la forte valeur des impédances des microélectrodes.

**La carte numérique** convertit les signaux analogiques transmis par l'ASIC, en signaux numériques. Cette carte permet de plus de gérer les signaux de commande logiques de l'ASIC, et de générer des signaux de stimulation analogique à transférer vers l'ASIC.

**L'IHM-PC** permettra de visualiser tout ou partie des signaux, avec des fonctions de traitement des signaux en ligne pour offrir une visualisation de la cartographie des signaux biologiques adaptée aux besoins des biologistes.

Un montage mécanique spécifique a également été créé pour permettre la connexion entre la MEA et le système de

mesure, et pour assurer une protection électromagnétique adaptée.

### 3. Compréhension des signaux en vue d'une intégration électronique

#### 3.1 Problématique

Une des difficultés majeures des mesures et stimulations avec des MEAs, réside en la complexité de l'interface capteur et stimulateur bio-électrochimique [6]. En effet, l'interface électrochimique que constituent les microélectrodes métalliques plongées dans le liquide physiologique, est modifiée par son environnement (pH, T, matériaux des microélectrodes, composition de l'électrolyte...) [7], [8]. Les systèmes commerciaux actuels proposent des solutions de traitement du signal analogique réglables pour pallier les variations du fonctionnement du capteur, ce qui apparaît difficilement réalisable sur l'ASIC compte tenu du nombre de voies à traiter en parallèle. Dans le cadre du projet Neurocom, il devient donc important de mieux comprendre et maîtriser les signaux électriques mis en jeu en mesure et stimulation de tissus vivants comme des réseaux de neurones. Or ces informations ne sont pas disponibles dans la littérature et/ou ne correspondent pas à notre cas d'étude ; nous avons donc été amenés à développer un dispositif expérimental dédié : la maquette de test Neurocom1, et à réaliser des campagnes d'expérimentations avec les biologistes.

#### 3.2 La maquette de test Neurocom1

Les objectifs de cette maquette sont de permettre de tester les différentes fonctionnalités à implémenter sur l'ASIC et de permettre d'enregistrer les signaux biologiques et électrochimiques afin d'analyser leurs caractéristiques, de comprendre leur origine et les paramètres qui influent sur leur valeur.

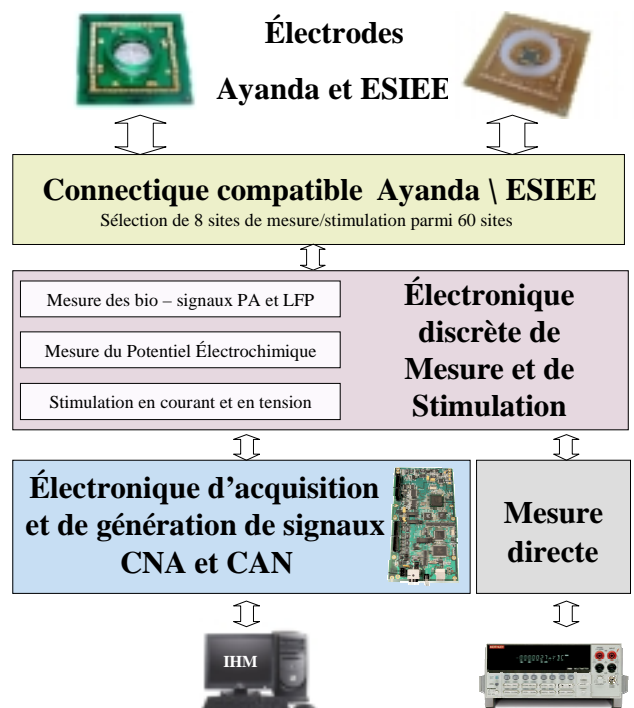


FIG. 2 : synoptique de la maquette Neurocom1

Ce prototype est constitué (FIG. 2) :

- d'une **carte analogique de test** développée au CEA-LETI permettant de s'interfacer avec des MEAs commerciales de type MCS et Ayanda et également avec des MEAs développées par le groupe ESIEE ;
- d'une **carte numérique** Data Translation pour l'acquisition, le traitement des données et la commande de la carte analogique ;
- et d'un **logiciel** permettant le pilotage de la carte numérique et l'acquisition des signaux.

La carte analogique est constituée de 11 voies de test qui permettront d'enregistrer des potentiels électrochimiques, les signaux biologiques, de stimuler en courant ou en tension avec possibilité de passer de l'enregistrement à la stimulation avec des commutateurs CMOS, et également de configurer l'électronique des électrodes de référence (FIG. 3).

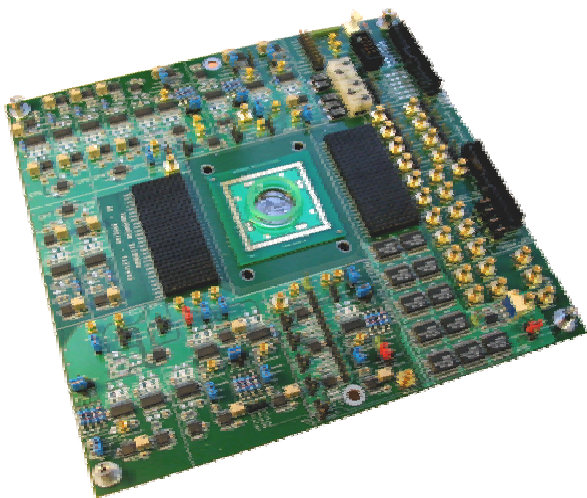


FIG. 3 : carte analogique de mesure et stimulation

## 4. La campagne d'expérimentation

La campagne d'expérimentation s'effectue sur deux fronts. Un premier type de test concerne la compréhension des phénomènes physiques à l'interface capteur, un deuxième l'acquisition d'informations sur les signaux bioélectriques.

### 4.1 Tests « physiques »

Les tests « physiques » sont effectués dans des conditions « idéales », c'est-à-dire que l'on n'a pas de perturbation biologique, que les milieux électrolytiques employés sont simples (ex. : PBS (Phosphate Buffered Saline)), que les mesures sont effectuées à température ambiante dans des conditions électrochimiques stationnaires (à savoir aucun mouvement de fluide de convection, ou lié à de la fluidique). Voici une liste des tests principaux :

- Caractérisation des impédances des microélectrodes et de leur modification en fonction : de la fréquence et de l'amplitude du signal imposé, du type de microélectrodes étudiées (matériau et surface), et de l'électrolyte utilisé (composition ionique...) ;
- Etude des limites de réversibilité (voltamétrie cyclique) des électrodes ;
- Etude des caractéristiques (fréquences, amplitudes) du bruit et du potentiel électrochimique en fonction du type

de référence utilisé (matériau, connexion électrique, forme, surface), du type d'électrolyte, et des microélectrodes employées.

Certains tests tels que la voltamétrie cyclique ou les mesures d'impédances ont été conduits à l'aide d'appareils commerciaux bas courants adaptés (VMP2/Z, et BiStat de Bio-Logic).

### 4.2 Tests « biologiques »

Les tests « biologiques » sont réalisés dans des conditions expérimentales réelles permettant au tissu nerveux de rester vivant [9]. Le milieu électrolytique peut donc être plus complexe (présence de protéines, de gaz dissout...) et peut être amené à changer au cours de l'expérimentation pour « faire réagir » le tissu nerveux. Il y a présence de tissu nerveux au contact des microélectrodes et éventuellement on peut avoir une couche de « coating » entre le tissu et les microélectrodes pour permettre de faire adhérer le tissu aux microélectrodes. Il peut y avoir circulation de fluide dans la cuve de la MEA. La température peut être amenée à changer au cours de l'enregistrement, et sera la plupart du temps différente de la température ambiante. Les buts de ces tests sont donc de :

- Déterminer les caractéristiques en terme de fréquence et d'amplitude des signaux bioélectriques en fonction du type de tissu nerveux (et pour des conditions de test données) ;
- Déterminer dans quelle mesure les conditions expérimentales font varier les mesures physiques (potentiel électrochimique, impédances...) mesurées dans des conditions « idéales ».

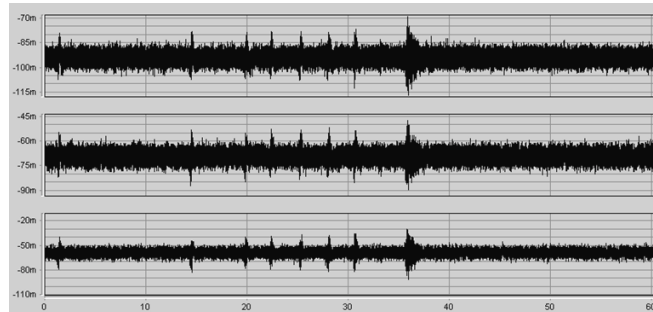


FIG. 4 : exemple de signaux d'activités spontanées enregistrées dans un bulbe rachidien avec la maquette

## 5. Résultats préliminaires

La maquette Neurocom 1 nous a permis d'enregistrer l'activité bioélectrique (PAs et LFPs) (FIG. 4) de neurones de moelle épinière de souris mises en culture avec un bruit électronique équivalent aux systèmes commerciaux actuels (environ 1  $\mu$ Vrms). Nous avons donc pu valider la chaîne de mesure à intégrer sur l'ASIC et vérifier les caractéristiques des biosignaux (amplitudes et fréquences). Le système de lecture est très sensible aux bruits ; en effet, nous avons pu observer des bruits d'origine électromagnétique tels que le 50 Hz ou induits par des éléments actifs de la maquette tels qu'un filtre à capacités commutées, ou encore les circuits de stimulation. Nous avons également pu nous rendre compte de la sensibilité du système aux vibrations mécaniques de

l'environnement de travail (activité humaine, incubateur, système de perfusion). Ces observations vont nous permettre de spécifier le système Neurocom aussi bien du point de vue de l'environnement expérimental que de l'électronique et de la MEA, afin de le rendre moins sensible à ces perturbations.

- De même nous avons vérifié le principe de la chaîne de stimulation en générant divers stimuli en courant biphasiques et monophasiques. Nous avons pu nous rendre compte lors des expérimentations de l'importance de bien contrôler les stimuli envoyés. En effet on a pu observer des réactions irréversibles qui, à plus ou moins long terme, endommagent à la fois les microélectrodes et le tissu nerveux [7].

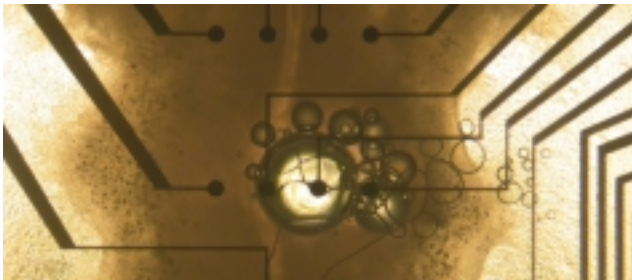


FIG. 5 : dégagement d'O<sub>2</sub> dû à un courant de fuite continu de 500 nA appliqué pendant 30 min sur une moelle épinière de souris de 12 jours embryonnaires mise en culture pendant 7 jours sur une matrice Ayanda au LNR

Enfin la maquette ainsi que le BiStat de Bio-Logic ont permis de donner des informations sur les MEAs :

- spectroscopie d'impédance (FIG. 6) ;
- voltamétrie cyclique (limites de réversibilités) ;
- mesure des potentiels électrochimiques et des bruits induits par l'environnement capteur.

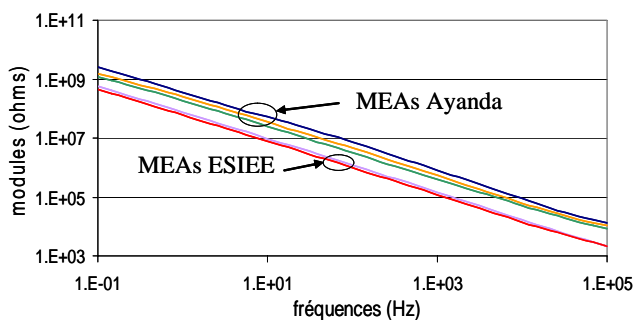


FIG. 6 : impédances moyennes des microélectrodes de différentes MEAs en platine d'Ayanda et développées dans le cadre de Neurocom par le groupe ESIEE

## 6. Conclusion

Le projet Neurocom, avec le développement d'un système de matrice de micro-électrodes à haute densité avec une électronique intégrée, a mis en évidence la nécessité d'améliorer la compréhension et la connaissance des signaux électriques mis en jeu pour des applications dans le domaine de la biologie. Cette connaissance n'est disponible que de façon partielle dans la littérature en particulier parce que la problématique est multidisciplinaire (biologie, électrochimie, électronique, micro-technologie), et à une échelle nouvelle (micro-électrode).

Une carte électronique spécifique a été développée de façon à tester des configurations multiples et avec un accès à tous les signaux importants à la fois pour les enregistrements et la stimulation de tissus. L'étude expérimentale nous a permis ensuite de caractériser les signaux et d'identifier les facteurs importants sur la qualité des mesures. Les connaissances ainsi acquises vont être utilisées à différents niveaux :

- Elles permettront de mieux appréhender les phénomènes électrochimiques et bioélectriques à l'interface afin de pouvoir déterminer des configurations d'expérimentation préférentielles (ex. : choix de la référence...) ou donner des indications sur la MEA à développer (matériaux, dimensions) ;
- Elles vont permettre de déterminer un cahier des charges pour l'ASIC (type de stimulation, caractéristiques des signaux : dynamique d'entrée, impédance d'entrée, amplification, bande passante...) ;
- Des architectures intégrables innovantes (adaptées) pourront être développées en fonction des caractéristiques des signaux (ex. : circuit de suppression de la composante électrochimique).

Enfin ces connaissances vont permettre de développer des dispositifs où les signaux d'enregistrement sont mieux maîtrisés et donc plus reproductibles. Cette évolution permettra d'envisager des développements futurs pour l'analyse automatique de signaux en connexion avec le système nerveux central (tri de spike par exemple [10]) pour des recherches en biologie mais aussi en vue de développements d'implants.

## Références

- [1] M. Joffe. *Electrophysiologie moléculaire : La technique du patch clamp*. vol. 1, Hermann, 2001.
- [2] J. T. Fulton. *Processes in biological vision, The analysis of individual neural circuits*. ch. 10.8.2, 2004.
- [3] G. Buzsaki. *Large-scale recording of neuronal ensembles*. Nature Neuroscience, vol. 7, pp. 446-451, 2004.
- [4] M. Chicurel. *Windows on the brain*. Nature, vol. 412, pp. 266-268, 2001.
- [5] L. Bousse. *Whole cell biosensors*. TRANSDUCERS '95 - EUROSENSORS IX, pp. 483-486, 1995.
- [6] G. T. Kovacs. *Electronic sensors with living cellular components*. Proceeding of the IEEE, vol. 91, pp. 915-929, 2003
- [7] E. Margalit et al.. *Retinal prosthesis for the blind*. Survey of ophthalmology. vol. 47, pp. 335-356, 2002.
- [8] W. L. Rutten. *Selective electrical interfaces with the nervous system*. Annual Review of Biomedical Engineering, vol. 4, pp. 407-452, 2002.
- [9] Yvert B, et al.. *Multiple Spontaneous Rhythmic Activity Patterns Generated by the Embryonic Mouse Spinal Cord Occur Within a Specific Developmental Time Window*. J. Neurophysiol., vol. 91, pp. 2101-2109, 2004.
- [10] C. Pouzat et al.. *Improved spike-sorting by modeling firing statistics and burst-dependent spike amplitude attenuation: a Markov chain Monte Carlo approach*. J. Neurophysiol., vol. 6, pp. 2910-2928, 2004.