

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques
Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé ED 258

Institut des Sciences de la Vie et de la Santé
EA 3176 Glycobiologie Biotechnologie

N° 33 - 2003

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Carole ROUGIER

Le 27 octobre 2003

Etude des interactions entre la bactérie *Escherichia coli* et les micro-ondes appliquées en mode discontinu dans des conditions faiblement thermiques

Directeurs de Thèse : Yves CENATIEMPO et Patrick LEPRAT

Jury :

Rapporteurs :	M. Luis MIR	Directeur de Recherche, IGR
	M. Jacques-Marie MOREAU	Maître de conférences, Université Bordeaux I
Examineurs :	M. Yves CENATIEMPO	Professeur, Université de Poitiers
	M. Abderrahman MAFTAH	Professeur, Université de Limoges
	M. Patrick LEPRAT	Maître de Conférences, Université de Limoges
	M. Philippe LEVEQUE	Chargé de Recherche, Université de Limoges
Membres invités :	M. Philippe BARATON	Ingénieur, EDF
	M. Bernard VEYRET	Directeur de Recherche, Université Bordeaux I

A mon Arrière grand-Mère,

A mes parents,

A Sylvain.

Remerciements

Et voilà, je viens de coucher 4 ans de travail de thèse sur le papier et l'heure est maintenant aux remerciements des personnes qui de près ou de loin y ont contribué. La tâche n'est pas simple mais il faut bien se lancer...

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Patrick Leprat, co-directeur de ma thèse, pour m'avoir fait partager et participer à ses idées innovantes, pour m'avoir donné une vision de la recherche différente de celle que je m'étais faite, ainsi que pour s'être toujours préoccupé de mon avenir. Merci de m'avoir fait découvrir le monde si riche de la pluridisciplinarité.

Je voudrais également remercier Monsieur Yves Cenatiempo, co-directeur de ma thèse pendant 2 ans, pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail, pour toutes les discussions à Poitiers où à Limoges ainsi que pour son soutien et ses encouragements.

J'aimerais ensuite exprimer toute ma gratitude à Monsieur Raymond Julien pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour avoir contribué au lancement de ce sujet de thèse. Un grand merci également à Monsieur Abderrahman Maftah, pour son accueil au sein de l'équipe « Glycobiologie et Biotechnologie » ainsi que pour l'intérêt qu'il a toujours porté à ce travail.

Je voudrais ensuite remercier mes deux rapporteurs, Monsieur Jacques Marie Moreau ainsi que Monsieur Luis Mir pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'intérêt qu'il ont porté à ce sujet.

Je tiens également à remercier Monsieur Philippe Barraton, responsable du démarrage de ce projet, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Ce travail n'aurait pas pu se développer sans la patience et les nombreuses discussions avec Philippe Lévêque, célèbre physicien de son état et philosophe à ces heures. Je ne trouve pas les mots pour t'exprimer toute ma gratitude tant j'ai appris de choses à tes côtés (sur les micro-ondes mais aussi dans bien d'autres domaines...). Merci de m'avoir supportée, au téléphone, à l'IRCOM ou à Québec, merci de m'avoir fait partager tes connaissances, de m'avoir fait confiance, de m'avoir encourager dans les moments difficiles, ..., merci pour tout.

Un grand merci à Floriane Leglise. Les mots me manquent pour exprimer tout ce que tu m'a apporté en 2 ans. Merci pour ton implication dans mon travail, pour ton aide dans la rédaction des publications et du manuscrit, pour tes conseils toujours avisés et bien d'autres choses encore. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, les crises de rires, les bonnes bouffes et les « piratisations » !!! J'espère que tout ça continuera encore longtemps.

Michèle, tu m'a appris bien des choses que ce soit sur le plan professionnel ou sur le plan personnel. Certains disent que tu as mauvais caractère, je dirais que tu as un certain caractère (ou un caractère

certain !) mais surtout ne changes rien. Tu es une des personnes les plus importantes que j'ai rencontré pendant cette thèse et j'espère que l'amitié qui nous lie durera encore bien longtemps.

Chère LN, qu'aurait été cette thèse sans toi... je ne peux même pas l'imaginer. Je ne pourrais jamais assez te remercier pour tous les bons moments, les moins bons aussi, à l'ENSIL, au labo, à côté crêpe, chez toi, chez moi et j'en passe. Merci d'avoir toujours été présente à mes côtés même dans mes moments de mauvaise humeur. On s'est suivi un long moment dans la galère, j'espère que les jours meilleurs vont bientôt nous rattraper et qu'on pourra en profiter toutes les deux.

Vient maintenant la « dream-team » du labo, qui a participé de bien des manières à cette thèse. Je commencerais par les « anciens » avec qui j'ai partagé de très bons moments que ce soit au labo ou en dehors. Un grand merci à Vincent pour m'avoir légué son bureau (et tout ce qui restait dans les tiroirs !!), merci de m'avoir appris et apporté autant de choses, tu es vraiment quelqu'un d'exceptionnel que ce soit intellectuellement ou humainement. Jean- Pierre, alias John-Pete ou Knackus pour les intimes, je regretterais toute ma vie de ne pas avoir fait de westerns à ta façon ni même d'avoir appris à les faire. Merci pour toute la gentillesse dont tu fais preuve et pour toutes tes attentions, toi aussi tu es exceptionnel ! Merci à Héléne, pour sa gentillesse et ses encouragements. J'espère qu'on fera encore bien des voyages ensemble, pour Sarlat par exemple !! Bruno, je n'oublierais jamais ton aide lors de mes déboires « spectrophotométriques », merci pour tes conseils et ta gentillesse. Je n'oublies pas non plus Renaud avec qui j'ai passé de très bons moments, merci pour ton écoute, tes conseils avisés et ta bonne humeur toujours présente.

Christophe, et non je ne t'ai pas oublié (même si j'ai changé !!!). Je voudrais te remercier pour ta contribution professionnelle et personnelle à ces quatre années de ma vie. Merci pour ta gentillesse, tes conseils, ton humour, des dons de patience et de bonne humeur, et bien d'autres choses encore, la liste est longue. Même si on se prend la tête parfois, saches que tu es quelqu'un d'important pour moi et que j'espère que notre amitié durera encore longtemps...

Pégouille, reine du hip hop, merci pour tous les bons moments passés ensemble, pour ta bonne humeur et ta franchise. Bonne chance pour la suite et la fin de ta thèse et ne t'inquiètes pas, même si je suis loin le jour de ta soutenance, je reviendrais pour passer ce moment avec toi. Lydoche, reine du « body sculpt » et de la « pistoche », je voudrais te remercier pour toutes les discussions que nous avons eu, pour les bons moments passés ensemble et pour ta joie de vivre. Bonne chance pour la dernière ligne droite. Chère Céline, j'ai aussi une pensée pour toi. Je voudrais te remercier pour ta confiance et tes encouragements. Bonne chance à toi aussi pour la suite. Merci à Michaël pour ses encouragements et toutes les discussions que nous avons pu avoir. Merci aussi pour avoir soutenu (et supporté !) Sylvain dans biens de moments. Lionel et Fabienne, merci à vous deux pour vos encouragements. Lionel, merci pour tes conseils et pour ta bonne humeur ; Fabienne, merci pour ton soutien et ta gentillesse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux filles de l'ENSIL. Un grand merci à Magali pour son soutien, ses encouragements et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Merci aussi de m'avoir fait découvrir la quiche aux moules !! Un grand merci à Florence, pour son soutien, sa gentillesse et son aide. Bonne chance à toi pour la fin.

Je tenais également à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées à l'ENSIL pour leur accueil et leur bonne humeur. Merci à Geneviève, Christophe, Géraldine, Corinne, Guy, Cécile, Martin.

Merci aussi à tous les membres de l'équipe « Glycobiologie et Biotechnologie » : Fabrice, merci pour tes conseils avisés et ta « bonne » humeur ; Agnès, merci pour tes encouragements ; Sabine, un grand merci pour ton soutien et ta bonne humeur sans faille ; Guy, merci pour toutes ces discussions, le soir au coin de mon bureau ; Danièle, merci pour votre gentillesse et votre soutien ; Michel, merci pour vos encouragements et votre écoute ; Pascal, merci pour tous les petits services que tu m'as rendu, pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude à Daniel pour les tests statistiques, ses encouragements et sa gentillesse.

Un énorme MERCI à Chantal, pour les études cytométriques, pour son aide, sa disponibilité, sa bonne humeur, son soutien et les bons moments passés en cyto.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire qui de près ou de loin ont participé à ce travail : Marie, Christelle, Jean-Claude, François, Ahmad, Jean-Michel... Une pensée particulière pour Loulou.

Je tiens également à remercier mes amies les plus chères, pour leur soutien, leur écoute et leur présence dans tous les moments, bons ou mauvais, de ma vie. Merci à Guytou, Aude, Véro et Céline. Ces quatre années n'auraient pas été ainsi sans votre soutien : merci d'être toujours là près de moi.

Un grand merci à mes amies de toujours, Olivia et Lucie. Merci pour tout ce que vous faites pour moi, pour votre soutien et vos encouragements, merci de me pardonner bien des choses et d'être toujours près de moi.

Je ne pourrais pas terminer ces remerciements sans une énorme pensée pour mes parents et ma famille. Maman, Papa, MERCI pour votre soutien sans faille, pour votre confiance, pour votre amour et pour tout ce que vous me donnez. Sans vous, je n'aurais jamais pu aller au bout. J'espère être digne de vous. Un grand merci à Claudine, Philippe, Pierre pour leur soutien et leurs encouragements. Un grand merci à ma « petite » sœur-cousine, Kaki, pour tout ce qu'elle m'apporte et ce que l'on partage. Merci de m'avoir soutenue et de me soutenir encore et toujours. Merci également à mes grands parents, qui m'ont toujours soutenue et encouragée.

Cher Sylvain, merci pour ton soutien, tes efforts, ta patience,... et tout ce que tu fais pour moi. Je n'en dirais pas plus, tu sais bien des choses que je n'ai pas besoin de t'écrire... Merci pour tout ce que nous partageons ensemble.

Résumé

Les radiofréquences (de 10 kHz à 300 GHz) sont une gamme de fréquences très largement utilisées et exploitées. La prolifération des procédés utilisant cette bande de fréquences, pour des applications domestiques et industrielles, a entraîné des questions relatives aux effets éventuels de ces ondes sur l'Homme. Ces questions ne sont pas récentes puisqu'elles ont émergé dès l'utilisation des radars. Aujourd'hui, avec l'avènement de la téléphonie mobile, de nombreuses études portent sur les interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques.

L'objectif de ces travaux consiste d'une part, à étudier les interactions entre les micro-ondes appliquées dans des conditions faiblement thermiques (37, 50 et 60°C) à la fréquence de 2,45 GHz avec la bactérie *Escherichia coli*, et, d'autre part, à étudier la possibilité d'utiliser cette technique pour la décontamination de produits thermosensibles. Les effets des micro-ondes, appliquées de façon discontinue, ont été étudiés avec des protocoles d'exposition différents. Une étude préliminaire a été réalisée avec des puissances moyennes allant jusqu'à 200 W. Les résultats de cette première étude ont montré que les micro-ondes appliquées de façon discontinue à 60°C, dans ce cas avec un signal modulé, induisent des effets bactéricides similaires à ceux obtenus avec un chauffage traditionnel à 60 °C. En revanche, les résultats obtenus à la température finale de 37°C semblent montrer que les micro-ondes entraînent une modification de la perméabilité membranaire des bactéries *E. coli*. La deuxième partie de ces travaux a été réalisée avec des puissances crêtes allant jusqu'à 2000 W. Dans ce cas, les résultats ont montré que les micro-ondes, appliquées à la température finale de 37°C, induisaient également une modification de la perméabilité membranaire des bactéries pour des puissances comprises entre 400 à 2000 W. Cette modification d'intégrité membranaire semble cependant être transitoire. D'autre part, il semblerait qu'une telle exposition entraîne la transcription de certains gènes impliqués dans la réponse au choc thermique. Les résultats obtenus avec une température finale de 50 °C montrent que les micro-ondes ont un effet sur l'intégrité membranaire mais n'induisent pas une mortalité plus importante qu'un chauffage traditionnel à la même température.

En prenant seulement en compte les résultats de la caractérisation thermique de la suspension, on pourrait conclure que les modifications de l'intégrité membranaire des bactéries sont dues à un effet non thermique des micro-ondes. Cependant, en tenant compte des résultats des simulations numériques, nous avons pu déterminer que les effets biologiques induits par les micro-ondes appliquées dans des conditions faiblement thermiques étaient probablement dus à la présence de « points chauds » au sein de la suspension bactérienne exposée. Ces travaux montrent bien l'importance de la caractérisation des systèmes d'exposition ainsi que la nécessité de combiner dosimétrie expérimentale et dosimétrie numérique pour l'étude des interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques.

En terme d'application, ces travaux montrent que l'utilisation des micro-ondes discontinues dans des conditions faiblement thermiques ne semble pas envisageable en tant que tel, bien que les temps d'exposition utilisés soient plus courts que ceux utilisés en chauffage traditionnel. En revanche et en raison des effets observés sur la modification de la perméabilité membranaire, il serait probablement intéressant de poursuivre les investigations où les micro-ondes seraient couplées avec d'autres technologies biologiques (bactériocines) ou physiques (UV).

Mots clés : micro-ondes, bactérie, interaction, membrane, dosimétrie, effet thermique et non thermique.

Abréviations et Sigles

A : Ampère

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

BSA : Bovine Serum Albumin (Albumine sérique bovine)

CEP : Champs Electriques Pulsés

CMF : CytoMétrie en Flux

DCS : Digital Communication System

DiOC₆(3) : 3,3'-dihexyloxacarbo-cyanine

DMSO : diméthylsulfo-xide

DO₅₈₀ : Densité Optique à 580 nm

E : Champ électrique ou amplitude du champ électrique en V.m⁻¹

ELF : Extremely low Frequency (extrême basses fréquences)

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

f : Fréquence

FDTD : Finite Differences in Time Domain (Méthode des différences finies dans le domaine temporel)

FEM : Finite Element Method (méthode des éléments finis)

FSC : Forward Scatter (diffusion de la lumière aux petits angles)

GSM : Global System for Mobile communications

H : Champ magnétique ou amplitude du champ électromagnétique en $A.m^{-1}$

HSP : Heat Shock Protein (protéine du choc thermique)

Hz : Hertz (MHz : megaHertz ; GHz : gigaHertz)

IP : Iodure de Propidium

IR : InfraRouge

LB : Luria Bertani (milieu de culture)

LPS : LipoPolySaccharide

NaCl : Chlorure de sodium

PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salin)

PCA : Plate Count Agar

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

Radar : RADio Detection And Ranging

RLU : Relative Unit of Light (unité relative de lumière)

rpm : Rotations Par Minute

RT : Reverse Transcription (Transcription inverse)

S : Siemens

SAR : Specific Absorption Rate (taux d'absorption spécifique) en $W.kg^{-1}$

SSC : Side Scatter (Diffusion à angle droit)

TDMA : Time Division Multiple Access

UFC : Unité de Formation de Colonie

UMTS : Universal Mobile Telecommunications System

UV : UltraViolet

V : Volt

W : Watt

ε_0 : Permittivité du vide

ε_r : Permittivité relative

λ : Longueur d'onde

ρ : Masse volumique en kg.m^{-3}

σ : Conductivité en S.m^{-1}

ω : Pulsation en rad.s^{-1}

Communications

Publications :

Rougier C., Lévêque P., Solano-Serena F., Jayat-Vignoles C., Maftah A. and Leprat P. (2003) Effect of discontinuous microwaves (2.45 GHz) on *Escherichia coli* membrane: investigations on thermal versus non thermal effects. Bioelectromagnetics. Révisée. (Annexe 1)

Rougier C., Lévêque P., Solano-Serena F., Maftah A., and Leprat P. (2003) Effect of discontinuous microwaves (2.45 GHz) on *Escherichia coli* in pasteurization conditions. Radiat. Res. En cours de rédaction.

Brevet

Cazals F., Leprat P., Lévêque P., Vergne M., Rougier C., Le Pape H., Georgeot O. et Hartmann E. (2001) Brevet d'invention FR 2 820 419-A1 « Dispositif compact de décontamination d'effluents liquides à risques infectieux par voie physique ».

Communications orales

Rougier C., Vergne M. et Hartmann E. (2000) De la mise au point d'un procédé de décontamination de liquides par micro-ondes à la création d'une entreprise : EDOL Biotechnologies. Salon Pollutec, 17-20 octobre, Lyon.

Rougier C., Rabaste J., Lévêque P., Leprat P. et Jecko B. (2001) Effets des micro-ondes pulsées sur la bactérie *Escherichia coli*. Séminaire de la pluridisciplinarité, 31 mai, Limoges.

Rougier C. et Vergne M. (2001) Mesures de toxicité sur *Escherichia coli* : Apport de la cytométrie en flux. Université d'automne, Limoges.

Communications écrites

Rougier C., Lévêque P. et Leprat P. (2000) Effets des champs micro-ondes pulsés sur la bactérie *Escherichia coli*. Séminaire de la Pluridisciplinarité, 27 juin, Limoges.

Vergne M., Rougier C., Lévêque P. et Leprat P. (2000) Pluridisciplinarité et création d'entreprise. Séminaire de la Pluridisciplinarité, 27 juin, Limoges.

Vergne M., Rougier C., Lévêque P. and Leprat P. (2001) Interaction of 900 MHz electromagnetic fields modulated or not at 217 Hz with membrane functions of an *Escherichia coli* strain. XXIII annual Meeting of the BioElectroMagnetic Society (BEMS), June 10-14, St Paul, Minnesota, USA.

Rougier C., Rabaste J., Lévêque P., Leprat P. et Jecko B. (2001) Effets des micro-ondes pulsées sur la bactérie *Escherichia coli*. Séminaire de la pluridisciplinarité, 31 mai, Limoges.

Rougier C., Rabaste J., Solano-Serena F., Lévêque P. and Leprat P. (2002) Effect of pulsed microwaves (2.45 GHz) on *Escherichia coli* at 37°C. XXIV annual Meeting of the BioElectroMagnetic Society (BEMS), June 23-27, Quebec city, Quebec, Canada.

Rougier C., Lévêque P., Solano-Serena F., Leprat P. (2003) Effect of discontinuous microwaves (2.45 GHz) on *Escherichia coli* in sub-lethal conditions. Controversial explanations depending on thermal measurements and dosimetry. XXV annual Meeting of the BioElectroMagnetic Society (BEMS), June 22-27, Maui, Hawaiï.

Lévêque P., Rougier C. and Leprat P. (2003) Dosimetry and thermal distributions in a glass tube exposed in cylindrical cavity at 2.45 GHz. XXV annual Meeting of the BioElectroMagnetic Society (BEMS), June 22-27, Maui, Hawaiï.

Table des matières

Introduction.....	1
Partie 1 : EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
CHAPITRE A : LES ONDES ELECTROMAGNETIQUES ET LA DECONTAMINATION BACTERIENNE.....	4
I. LES ONDES ELECTROMAGNETIQUES.....	6
I.1. Généralités et grandeurs caractéristiques.....	6
I.2. Interactions onde – matière.....	8
II. TECHNOLOGIES DE DECONTAMINATION.....	10
II.1. Les ultraviolets (UV) et la lumière pulsée.....	11
II.2. Les infrarouges (IR).....	11
II.3. Les micro-ondes.....	12
II.4. Les ondes radio.....	13
II.5. Cas des basses fréquences.....	14
II.5.1. Les Champs électriques pulsés (CEP).....	14
II.5.2. Combinaison avec des antimicrobiens naturels.....	16
CHAPITRE B : LES MICRO-ONDES ET LES SYSTEMES BIOLOGIQUES	18
I. GENERALITES SUR LES MICRO-ONDES.....	19
I.1. Un peu d’histoire.....	19
I.2. Bandes de fréquences et applications.....	20
II. INTERACTIONS MICRO-ONDES ET SYSTEMES BIOLOGIQUES : PARAMETRES IMPORTANTES.....	22
II.1. Dosimétrie.....	22
II.1.1. Le débit d’absorption spécifique (DAS) ou specific absorption rate (SAR).....	22
II.1.2. Détermination du SAR.....	24
II.2. Puissance et mode d’exposition.....	25
II.3. Caractéristiques du matériau exposé.....	27
CHAPITRE C : ETAT DE L’ART DES RECHERCHES SUR LES INTERACTIONS MICRO-ONDES ET SYSTEMES BIOLOGIQUES.....	28
I. EXISTENCE D’UN PHENOMENE NON THERMIQUE ?.....	29
II. CAS DE LA TELEPHONIE MOBILE.....	30

III. MICRO-ONDES ET MICROORGANISMES.....	32
III.1. Les interactions à 2,45 GHz.....	33
III.1.1. Effet global	33
III.1.2. Effet sur la membrane cellulaire	34
III.1.3. Effet génotoxique.....	36
III.1.4. Induction des protéines du choc thermique.....	36
III.2. Interactions à des fréquences supérieures : les ondes millimétriques	38
IV. CONCLUSION	39
Partie 2 : MATERIELS ET METHODES	40
I. LES SOUCHES BACTERIENNES	40
I.1 Caractéristiques	40
I.2. Milieux de culture	40
I.3 Conditions de culture et de conservation.....	40
II. LES SYSTEMES D'EXPOSITION MICRO-ONDES.....	41
II.1. Généralités	41
II.1.1. Le système d'exposition.....	41
II.1.2. Le protocole d'exposition.....	43
II.2. Les différents générateurs	44
II.2.1. Puissances comprises entre 0 et 200 W.....	44
II.2.2. Puissances comprises entre 200 et 2000 W	45
III. LE CHAUFFAGE TRADITIONNEL.....	46
IV. LES PARAMETRES BIOLOGIQUES ETUDIES.....	46
IV.1. Mortalité cellulaire	46
IV.2. Croissance cellulaire.....	47
IV.3. Intégrité membranaire	47
IV.3.1. Principe de la cytométrie en flux (CMF)	47
IV.3.2. Protocoles de marquage des cellules à l'iodure de propidium et à la DiOC ₆ (3)	48
IV.3.3. Analyses cytométriques	49
IV.3.4. Tri des cellules marquées.....	50
IV.4. Etude du contenu cellulaire en ATP.....	50
IV.5. Fuite de composants cellulaires.....	51
IV.6. Test de génotoxicité.....	51
IV.7. RT-PCR semi-quantitative	53
IV.7.1. Extraction des ARN.....	53
IV.7.2. Transcription inverse	54
IV.7.3. PCR semi-quantitative	54
IV.8. Combinaison micro-ondes et nisine	56

V. LES PARAMETRES PHYSIQUES	57
V.1. Caractérisation électromagnétique du système d'exposition	57
V.2. Caractérisation thermique	57
V.2.1. La sonde Luxtron	57
V.2.2. Principe et analyse des mesures	58
V.3. Simulation numérique du SAR	60
VI. STATISTIQUES.....	61
Partie 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	62
CHAPITRE A : MISE EN PLACE DU SYSTEME ET DES PROTOCOLES D'EXPOSITION	63
I. CARACTERISATION ELECTROMAGNETIQUE DU SYSTEME D'EXPOSITION	63
II. DETERMINATION DES PROTOCOLES D'EXPOSITION.....	64
II.1. Protocoles d'exposition avec le générateur SNEA	65
II.2. Protocoles d'exposition avec le générateur SAIREM.....	67
III. DOSIMETRIE.....	68
III.1. Simulation électromagnétique	68
III.2. Simulation de la distribution du SAR	70
IV. MESURES DE LA DISTRIBUTION DE TEMPERATURE.....	72
V. DISCUSSION	73
CHAPITRE B : ETUDE PRELIMINAIRE : Effets biologiques des micro-ondes - Générateur SNEA (Puissance maximale 200 W).....	75
I. LES EFFETS BIOLOGIQUES DES MICRO-ONDES A 60°C.....	75
I.1. Les effets bactéricides	75
I.2. Les effets sur la croissance cellulaire	76
I.3. Les effets sur l'intégrité et le potentiel membranaires.....	78
I.4. Discussion des résultats.....	81
II. LES EFFETS BIOLOGIQUES DES MICRO-ONDES A 37°C	81
II.1. Les effets bactéricides	81
II.2. Les effets sur la membrane bactérienne	82
II.3. Estimation des cellules viables et cultivables	83
II.4. Autres paramètres testés	84
II.5. Discussion des résultats	85

CHAPITRE C : EFFETS DES MICRO-ONDES A 37°C - GENERATEUR	
SAIREM (Puissance de 200 à 2000 W)	87
I. LES EFFETS SUR LA MORTALITE ET LA CROISSANCE CELLULAIRES	87
II. LES EFFETS SUR LA MEMBRANE CELLULAIRE	87
III. EFFET DE LA COMBINAISON NISINE MICRO-ONDES	94
IV. EFFET SUR LA TRANSCRIPTION DE CERTAINS GENES	96
V. CARACTERISATION THERMIQUE	98
VI. DISCUSSION DES RESULTATS.....	99
CHAPITRE D : EFFETS DES MICRO-ONDES A 50 °C – GENERATEUR	
SAIREM (Puissance de 200 a 2000 W)	103
I. EFFETS SUR LA MORTALITE ET LA CROISSANCE CELLULAIRES	103
II. EFFETS SUR LA MEMBRANE CELLULAIRE	103
III. EFFET DE LA COMBINAISON NISINE MICRO-ONDES	108
IV. CARACTERISATION THERMIQUE.....	109
V. DISCUSSION DES RESULTATS	110
Conclusion	113
Nouveau chapitre de la thèse	115
I. Place et enjeux de la thèse	115
II. Gestion du projet et moyens mis en œuvre.....	116
III. Compétences développées dans le cadre du projet.....	118
IV. Evaluation des retombées de la thèse.....	119
Références bibliographiques	121
ANNEXES.....	134
ANNEXE 1 : Publication 1	134
ANNEXE 2 : Quelques aspects réglementaires	173

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de fréquences micro-ondes allouées (GSM : Global System for Mobile communications, DCS : Digital Communication system, UMTS : Universal Mobile Telecommunications System). _____	21
Tableau 2 : Influence des ondes électromagnétiques utilisés pour la téléphonie mobile sur des fonctions biologiques. _____	31
Tableau 3 : Séquences des couples d'oligonucléotides pour chaque gène d'intérêt, d'après le génome d'Eschérichia coli K12 (numéro d'accession : GI : 16127994 NC 000913). _____	55
Tableau 4 : Protocoles d'exposition utilisé avec le générateur SNEA, en fonction de la température finale désirée et de la puissance micro-ondes émises. _____	66
Tableau 5 : Protocoles d'exposition utilisés avec le générateur SAIREM, en fonction de la température finale désirée et de la puissance micro-onde émise. _____	67
Tableau 6 : Valeurs des champs E et H au sein de la suspension (d'après Figure 20) pour 1 W incident. _____	70
Tableau 7 : Valeurs moyennes, maximales et minimales du SAR simulés. _____	71
Tableau 8 : Durée des phases de latence et temps de doublement des différentes suspensions bactériennes soumises à un chauffage traditionnel en bain marie à 60°C ou à un chauffage micro-ondes 50 ou 200 W à 60°C (d'après la Figure 25). _____	78
Tableau 9 : Moyenne et écart type des ratios obtenus par SOS chromotest. _____	85
Tableau 10 : Description des quatre protocoles d'exposition pour déterminer l'importance du temps de montée en température micro-ondes. _____	91
Tableau 11 : Valeurs de SAR pour chacune des expositions testées d'après les simulations numériques (SAR peak = SAR moyen dans la totalité de la suspension x puissance). _____	100

Tableau 12 : Pourcentages de cellules moyennement marquées à l'IP (Population R2) par rapport à la totalité des cellules marquées à l'IP. _____105

Liste des figures

- Figure 1 : Représentation des champs constitutifs d'une onde électromagnétique loin de tout obstacle (onde dite progressive) avec E : champ électrique variable de l'onde électromagnétique suivant l'axe OZ, H : champ magnétique variable de l'onde électromagnétique suivant l'axe OY. L'axe OX représente la direction de propagation de l'onde. _____ 6
- Figure 2 : Le spectre électromagnétique et exemples d'ordre de grandeur et d'utilisations associées. _____ 7
- Figure 3 : Comportement électromagnétique d'une onde au contact d'un matériau (cas d'une onde plane). _____ 9
- Figure 4 : Electroporation d'une membrane cellulaire par compression lors de l'exposition à un champ électrique très intense. E_c correspond à l'intensité de champ électrique critique. _____ 15
- Figure 5 : Le spectre électromagnétique divisé en bandes, par décades de fréquences _____ 20
- Figure 6 : Exemple de modulation : signal non modulé (a), signal modulé en amplitude avec un taux de modulation de 100% (b), signal modulé en amplitude avec un taux de modulation de 50% (c) et signal modulé en fréquence (d). _____ 26
- Figure 7 : Comparaison d'une cellule et d'un condensateur en terme de comportement électrique. _____ 34
- Figure 8 : Hypothèse du mécanisme des champs électromagnétiques basses fréquences (d'après Blanck et coll., 2000). _____ 38
- Figure 9 : Schéma général du système d'exposition aux champs micro-ondes discontinus. _____ 41
- Figure 10 : Coupe détaillée de la chambre d'exposition. _____ 42
- Figure 11 : Allure générale du protocole d'exposition à 37°C. _____ 43
- Figure 12 : Impulsions délivrées le générateur SNEA. _____ 45

Figure 13 : Schéma du principe du cytomètre en flux.	48
Figure 14 : Schéma général du principe de mesure et d'acquisition de la température.	58
Figure 15 : Exemple de résultat de mesure de température en un point de la suspension bactérienne exposée aux micro-ondes.	59
Figure 16 : Position de la sonde lors des mesures de température : coupes verticale (a) et horizontale (b) de la suspension bactérienne dans le tube. Les doubles flèches correspondent aux sens de variation de position de la sonde dans la suspension.	59
Figure 17 : Exemple de résultats de caractérisation thermique après compilation des résultats à l'aide du logiciel MATLAB.	60
Figure 18 : Variations de la température pendant l'exposition micro-onde pour le protocole à 37°C (A) et celui à 60°C (B). C : phase de chauffage, R : phase de repos, E : phase d'exposition.	66
Figure 19 : Schéma en transparence de la structure simulée.	68
Figure 20 : Cartographies des champs électrique (E) et magnétique (H) au sein de la cavité cylindrique vide (A) et de la cavité contenant le tube (B). Les lignes de champs verticales correspondent au champ H, les lignes horizontales au champ E.	69
Figure 21 : Distribution du SAR dans la suspension bactérienne exposée à 2,45 GHz dans la cavité cylindrique pour 1 Watt incident.	71
Figure 22 : Histogramme de la répartition du SAR en fonction du nombre de voxels dans la suspension entière.	72
Figure 23 : Distribution de températures mesurées après exposition aux micro-ondes discontinues (phase C) à 400 W (générateur SAIREM) à 37°C (A) et à 50°C (B).	73
Figure 24 : Taux de survie d'E. coli après exposition pendant 10 (■), 15 (□) et 20 minutes (■) à un chauffage micro-ondes à 60°C (25, 50 et 200 W moyens) ou à un chauffage traditionnel en bain marie à 60°C.	76

Figure 25 : Courbes de croissance pour une suspension d'E. coli non traitée (Témoin) (\diamond), pour des suspensions bactériennes soumises pendant 5 minutes à un chauffage micro-ondes à 60°C à 50 W (\blacktriangle) ou à 200 W (x) ou à un chauffage traditionnel à 60°C (\blacksquare). N : nombre de bactéries par mL.

77

Figure 26 : Exemples de cytogrammes obtenus après marquage au DiOC₆(3) et à l'IP avec A : suspension témoin, B : bactéries soumises à chauffage traditionnel 60°C, 15 min et C : bactéries soumises à 200 W 60°C, 15 minutes (avec FL1 : intensité de fluorescence verte et FL3 : intensité de fluorescence rouge).

80

Figure 27 : Intégrité membranaire de suspensions bactériennes soumises aux micro-ondes discontinues appliquées à 37°C (\blacksquare) ou à un chauffage bain marie à 37°C (\square).

82

Figure 28 : Contenu en ATP intracellulaire de cellules soumises à un chauffage traditionnel à 37°C pendant 5 minutes (\blacktriangle) et de cellules soumises à un chauffage micro-ondes discontinu à 37°C (\blacksquare).

84

Figure 29 : Exemples de cytogrammes obtenus pour des suspensions bactériennes témoin (A), soumise à un chauffage traditionnel en bain marie à 37°C pendant 5 min (B) et soumise à un champ micro-onde discontinu (400 W) à 37°C pendant 5 min (C).

88

Figure 30 : Effet des micro-ondes sur l'intégrité membranaire des bactéries E. coli. R1/T avec R1 : nombre de cellules fortement marquées à l'IP et T : population totale analysée. 0* correspond à l'exposition au temps de montée en température ou phase de chauffage uniquement.

89

Figure 31 : Effet de la température sur l'intégrité membranaire des bactéries E. coli : \diamond moyenne des valeurs de R1/T obtenues pour des traitements à 37, 40, 42, 45 et 46°C (valeurs quasi identiques), \blacksquare traitement à 47°C et \blacktriangle traitement à 48 °C.

90

Figure 32 : Effet du temps de montée en température sur l'intégrité membranaire des bactéries E. coli avec les protocoles 1 (\diamond), 2 (\blacksquare), 3 (\blacktriangle) ou 4 (\circ). A : 5 minutes d'exposition, B : 10 minutes d'exposition, C : 15 minutes d'exposition.

92

Figure 33 : Aptitude à la revivification de cellules soumises à un chauffage bain marie ou micro-ondes après tri des populations R1 (\square) et R2 (\blacksquare).

94

- Figure 34 : Aptitude des cellules à se revivifier après un traitement avec de la nisine seule ou après un traitement combiné nisine à 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (\square) ou à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (\blacksquare) et micro-ondes discontinues. _____ 95
- Figure 35 : Ratios d'expression des gènes dna k, mop A, rec A, lex A, sod A et kat G pour une souche d'Escherichia coli K12 soumise à une exposition micro-ondes 800 W à 37 °C pendant la phase de chauffage. _____ 97
- Figure 36 : Distributions spatio-temporelles de la température après une exposition à la phase de chauffage à 400W (1,15 s). A : Représentation surfacique, B : Représentation en lignes. _____ 98
- Figure 37 : Pourcentages de voxels en fonction de la température lors d'une exposition aux micro-ondes discontinues 37°C pendant la phase C. _____ 101
- Figure 38 : Effet d'un chauffage bain marie à 50 °C (\diamond), d'un chauffage micro-ondes à 50°C à 200 (\blacksquare), à 400 (\blacktriangle) et à 800 W (x) sur l'intégrité membranaire des bactéries E. coli. 0* correspond à l'exposition à la phase de chauffage uniquement. _____ 104
- Figure 39 : Pourcentages de cellules fortement marquées à l'P après exposition à 50°C en bain marie (\diamond), aux micro-ondes discontinues à 200 (\blacksquare), 400 (\blacktriangle) et 800 W (x) en fonction de la durée du traitement. 0* correspond à une exposition à la phase C. _____ 105
- Figure 40 : Effet du chauffage traditionnel et des micro-ondes discontinues sur la fuite de protéines dans le milieu extracellulaire. 0* correspond à l'exposition au temps de montée en température uniquement. _____ 106
- Figure 41 : Aptitude à la revivification de cellules soumises pendant C ou 5 min à un chauffage bain marie ou micro-ondes après tri des populations R1 et R2. _____ 107
- Figure 42 : Aptitude des cellules à se revivifier pour des suspensions bactériennes traitées avec la nisine, traitées par la combinaison nisine et bain marie 50°C, traitées par la combinaison nisine et micro-ondes discontinues 50°C aux différentes puissances. _____ 108
- Figure 43 : Distributions spatio temporelles des températures au sein de suspensions exposées aux micro-ondes discontinues à 50°C à 200, 400 et 800W. _____ 109

Figure 44 : Pourcentages de voxels en fonction de la température lors d'une exposition aux micro-ondes discontinues 50°C pendant la phase C. _____ 111

Liste des photographies

Photographie 1 : Système d'exposition avec le générateur SNEA (0 - 200 W)._____44

Photographie 2 : Système d'exposition avec le générateur SNEA (200 - 2000 W)._____45

Liste des annexes

Annexe 1 : Publication 1._____134

Annexe 2 : Recommandations d'exposition aux champs RF._____173

Introduction

Depuis la découverte et la maîtrise de l'électricité, l'Homme n'a eu de cesse de mettre à profit les champs électromagnétiques. Actuellement, les applications qui en sont faites sont omniprésentes et notre environnement s'en trouve constamment modifié.

Les systèmes vivants sont donc aujourd'hui soumis à un foisonnement de rayonnements artificiels utilisés pour améliorer notre confort (les ultraviolets utilisés en cosmétologie, les infrarouges pour le chauffage ou la commande à distance, le four micro-onde, les lignes de transport de courant haute tension), notre santé (radiothérapie, Imagerie par Résonance Magnétique, Rayons X) et pour faciliter nos communications (radio, télévision, téléphones mobiles).

Ces champs électromagnétiques ont-ils un effet sur la santé humaine ? La question reste posée. Les problèmes de compatibilité électromagnétique avec l'organisme humain ne sont pas nouveaux et alimentent la presse scientifique depuis plus d'une vingtaine d'années. Les propos de celle-ci, largement amplifiés par la presse grand public, contribuent à entretenir des rumeurs alarmistes qui signaleraient l'apparition de pathologies diverses suite à une exposition prolongée aux champs électromagnétiques, pathologies allant des maux de tête pour les moins graves aux tumeurs du cerveau ou leucémies pour les plus sérieuses.

Face aux questions sur d'éventuels effets sanitaires des ondes électromagnétiques, des chercheurs groupés au sein d'associations internationales (European BioElectromagnetics Association -EBEA-, the BioElectroMagnetics Society -BEMS-) européenne (COST), nationales (Elettra 2000 pour l'Italie, ForschungsGemeinschaft Funk -FGF- pour l'Allemagne) ou de centres privés (EDF, CNET) réalisent de nombreuses études pour apporter des éléments de réponse. Actuellement, priorité est donnée aux études *in vivo*, bien que l'extrapolation à l'Homme des résultats obtenus sur l'animal reste sujette à controverses. Cependant, les publications scientifiques concernant la mise en évidence d'effets sur des cellules - études *in vitro* - constituent une contribution non négligeable à l'élucidation des questions posées à la communauté scientifique.

Dans ce contexte, deux laboratoires de l'Université de Limoges développent des techniques complémentaires qui leur ont permis de s'investir dans des projets d'études *in vitro*, l'Institut de Recherche en Communications Optiques et Micro-ondes (IRCOM) qui conçoit des systèmes d'exposition adaptés et possède les outils dosimétriques indispensables à leur

caractérisation et l'Institut de Biotechnologie qui possède les outils biologiques nécessaires à ces études.

Le travail présenté ici s'inscrit dans la démarche scientifique actuelle qui consiste à mieux connaître les mécanismes d'action (si action il y a) des micro-ondes sur la plus petite entité vivante, à savoir la cellule. Le choix des paramètres étudiés a été fonction d'une part des compétences disponibles au laboratoire et développées dans nos précédents travaux, et d'autre part des résultats publiés dans la littérature. Dans ce cadre, les effets des micro-ondes à des puissances plus importantes que celles utilisées pour la téléphonie mobile ont été étudiés, une étude concernant les interactions entre les micro-ondes utilisées pour la téléphonie mobile et la bactérie *Escherichia coli* ayant fait l'objet d'un travail préalable au sein de notre équipe (Vergne, 2000).

L'objectif de ce travail est, d'une part, de mettre en évidence l'existence ou non d'une interaction non thermique ou thermique entre des champs électromagnétiques micro-ondes appliquées de façon discontinue (à des températures finales globales de 37, 50 ou 60°C) et la bactérie *Escherichia coli* et, d'autre part, d'étudier la faisabilité de cette technologie comme procédé de décontamination de milieux ou produits thermosensibles ou contenant des micro-organismes pathogènes.

Dans une **première partie**, nous décrivons quelques caractéristiques des ondes électromagnétiques ainsi que quelques applications de celles-ci dans le domaine de la décontamination bactérienne (Chapitre A). L'exposé bibliographique s'attache ensuite plus particulièrement aux interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques. Ainsi, le chapitre B décrit les caractéristiques des micro-ondes et les paramètres importants pour l'étude de leur interaction avec les systèmes biologiques. Le chapitre C établit un état de l'art sur la recherche menée en terme d'interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques. La **deuxième partie** constitue la description des moyens biologiques et physiques ainsi que les technologies employées pour réaliser ce travail. Enfin, la **troisième partie** consiste en la présentation et la discussion des résultats obtenus. Un premier chapitre (A) est consacré à la mise en place et à la détermination des paramètres physiques nécessaires à l'étude. Les chapitres suivants sont consacrés aux résultats obtenus lors d'une étude préliminaire réalisée avec un

générateur délivrant des puissances maximales moyennes de 200 W et à des températures finales de 60 et 37°C (Chapitre B), aux résultats obtenus avec un second générateur, délivrant des puissances crêtes allant de 200 à 2000 W, et où les micro-ondes sont appliquées de façon à ce que la température finale soit égale à 37°C (Chapitre C) et enfin, le chapitre D constitue la présentation et la discussion des résultats obtenus avec ce dernier générateur mais à la température finale de 50°C.

Partie 1 :
EXPOSE
BIBLIOGRAPHIQUE

L'exposé bibliographique s'articule autour de trois chapitres.

Le premier (Chapitre A) est consacré à la description de propriétés des ondes électromagnétiques puis expose certaines techniques de décontamination mettant en jeu des rayonnements non ionisants. En effet, un des objectifs de cette thèse étant d'étudier la faisabilité d'un système de décontamination basses températures par micro-ondes, la comparaison avec les technologies existantes s'avère intéressante.

Les chapitres B et C sont, quant à eux, consacrés aux interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques, ce qui constitue le deuxième objectif de cette étude. Ils s'attachent à décrire les paramètres importants pour l'étude de ces interactions (Chapitre B) et à établir un état de l'art de la recherche dans ce domaine (Chapitre C).

CHAPITRE A :

**LES ONDES ELECTROMAGNETIQUES ET
LA DECONTAMINATION BACTERIENNE**

Les traitements thermiques ou chimiques sont, de nos jours, les principaux moyens de décontamination bactérienne. Les traitements chimiques (ajout d'eau de Javel ou de glutaraldéhydes, par exemple) tendent à être supprimés à cause de la pollution secondaire qu'ils engendrent. Les traitements thermiques, quant à eux, lorsqu'ils sont utilisés dans le domaine de l'agroalimentaire, peuvent altérer la saveur, le goût, la teneur en vitamines et en nutriments de l'aliment. Avec la demande croissante des consommateurs pour des produits plus naturels et ressemblant le plus possible aux produits frais, les efforts d'amélioration vont dans le sens d'une minimisation des modifications des propriétés organoleptiques du produit tout en assurant une bonne « salubrité » de celui-ci. Les technologies développées depuis quelques années se sont donc axées sur des procédés thermiques induisant une montée rapide en température ou sur des traitements non thermiques. Les rayonnements électromagnétiques sont apparus comme étant une bonne alternative à ces traitements aussi bien pour remplacer les traitement thermiques classiques que les traitements chimiques.

Ce premier chapitre a pour but de décrire quelques nouvelles techniques de décontamination utilisant des rayonnements électromagnétiques non ionisants appliqués dans des conditions non thermiques ou induisant une montée rapide en température.

Une première partie rappelle quelques notions générales sur les ondes électromagnétiques. Une seconde partie est consacrée à la description sommaire de quelques techniques de décontamination utilisant des rayonnements électromagnétiques non ionisants avec des exemples d'applications de chacune d'elles.

I. LES ONDES ELECTROMAGNETIQUES

I.1. Généralités et grandeurs caractéristiques

De nombreuses sources naturelles et artificielles émettent de l'énergie sous la forme d'ondes électromagnétiques. Ces ondes sont caractérisées par un champ électrique et un champ magnétique, qui varient dans le temps et se propagent dans l'espace (Figure 1).

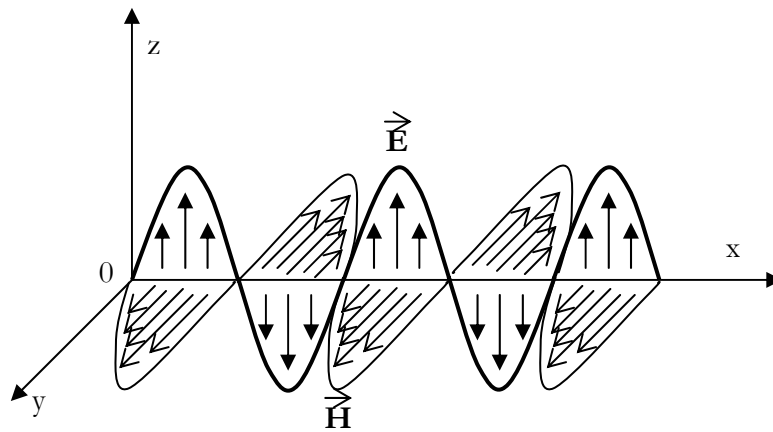


Figure 1 : Représentation des champs constitutifs d'une onde électromagnétique loin de tout obstacle (onde dite progressive) avec \vec{E} : champ électrique variable de l'onde électromagnétique suivant l'axe OZ, \vec{H} : champ magnétique variable de l'onde électromagnétique suivant l'axe OY.

L'axe OX représente la direction de propagation de l'onde.

Les ondes électromagnétiques, qui s'étendent sur un ensemble continu de fréquences appelé spectre électromagnétique (Figure 2), sont caractérisées par leur **fréquence**, leur **longueur d'onde** et leur **intensité**.

La fréquence (f) correspond au nombre d'oscillations en un point de l'espace par unité de temps. Elle se mesure en cycles par seconde ou Hertz (Hz) (1 cycle par seconde = 1 Hz). Pour une onde progressive, la longueur d'onde est la distance minimum qui sépare deux points de l'espace où les oscillations sont en phase. Elle se mesure en mètres (m). La fréquence est liée à la longueur d'onde par la relation :

$$\lambda = v/f \quad (1)$$

avec : λ : longueur d'onde en m, v : vitesse de propagation de phase dans le milieu en $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et f : fréquence en Hz.

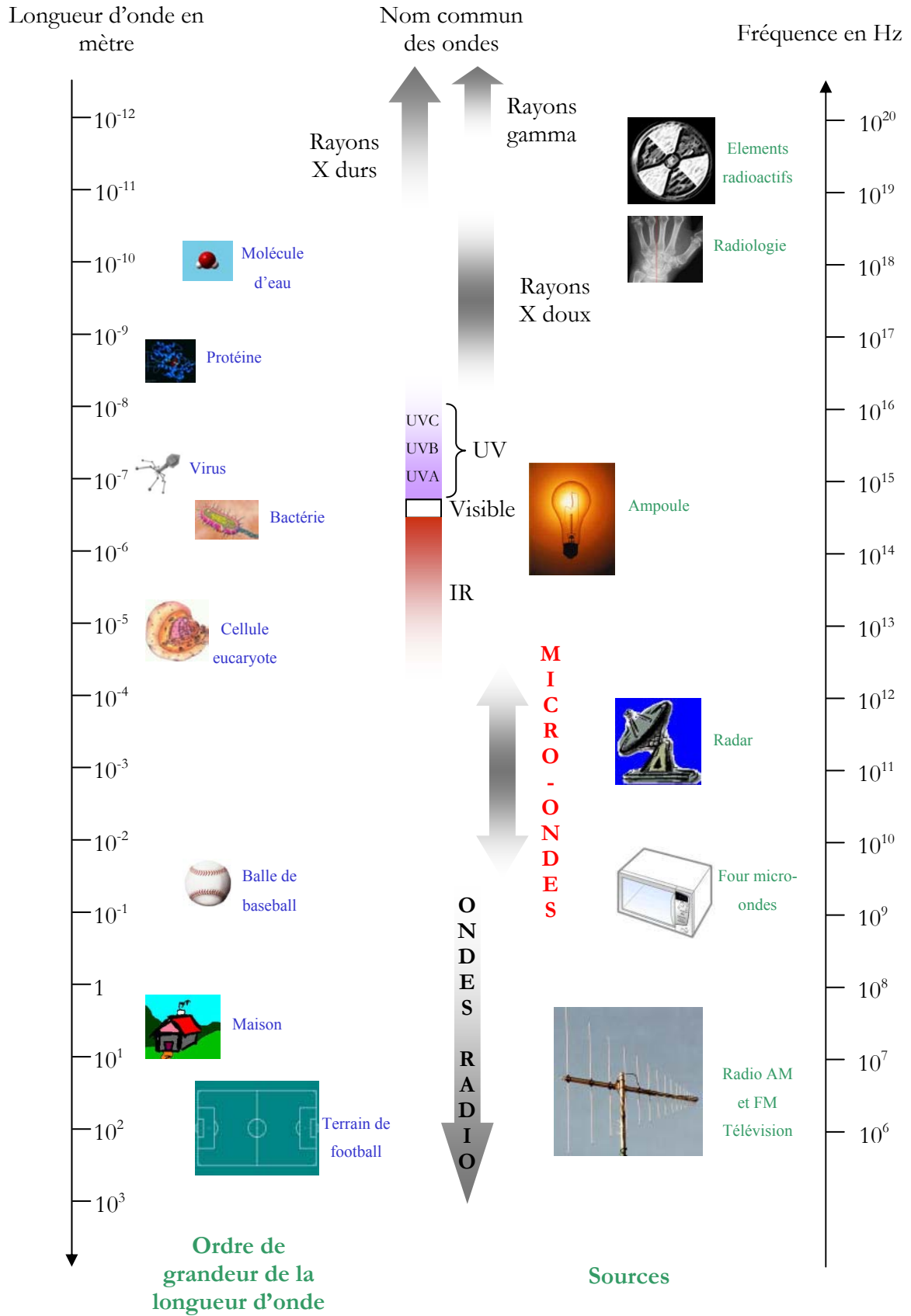


Figure 2 : Le spectre électromagnétique et exemples d'ordre de grandeur et d'utilisations associées.

La fréquence est donc d'autant plus élevée que la longueur d'onde est courte. Par exemple, les fours micro-ondes qui fonctionnent à la fréquence de 2,45 GHz ont une longueur d'onde de 12,2 cm.

A toute onde électromagnétique est associée une particule de masse pratiquement nulle appelée photon dont l'énergie est liée à la longueur d'onde par la relation :

$$E = h.f = h.c/\lambda \quad (2)$$

où h = constante de Planck ($6,62.10^{-34}$ joules seconde (J.s)).

On désigne par « champ électromagnétique » les ondes électromagnétiques à basses fréquences et par « rayonnement électromagnétique » les ondes à très hautes fréquences. Selon leur fréquence et leur énergie, les ondes électromagnétiques peuvent être classées parmi les « rayonnements ionisants » (rayons X et gamma) ou les « rayonnements non ionisants » (ultraviolets, visible, infrarouges, radiofréquences et micro-ondes, basses fréquences) (Figure 2). La limite entre les rayonnements ionisants et non ionisants est $\lambda=10$ nm : lorsque λ est inférieure à 10 nm, les rayonnements sont dits ionisants.

I.2. Interactions onde – matière

Une onde qui se propage peut rencontrer des obstacles de nature différente comme par exemple, l'air, l'eau, le plastique, un milieu biologique, etc.

Lorsque l'onde électromagnétique entre en contact avec la matière, il peut se produire plusieurs types d'interactions en fonction de la longueur d'onde, de la taille de l'objet rencontré par le rayonnement et des caractéristiques physiques des milieux traversés et de l'objet lui-même :

- réflexion ou réfraction lorsque les deux milieux sont séparés par une surface dont les dimensions sont très grandes et les irrégularités très petites par rapport à la longueur d'onde,

- diffraction lorsque les irrégularités de surface sont de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde ou si les dimensions de la surface de séparation sont du même ordre de grandeur que la longueur d'onde,

- diffusion lorsque l'onde rencontre sur son trajet un nombre important d'obstacles dont les dimensions sont du même ordre de grandeur ou plus petites que la longueur d'onde,

- absorption lorsqu'il y a perte énergétique sous quelque forme que ce soit (thermique ou autre) dans le milieu traversé.

Par exemple, dans le cas d'une interaction avec une onde plane (onde en propagation libre et considérée assez loin de l'émetteur), une partie de l'énergie transportée par l'onde électromagnétique est absorbée par les différents milieux qu'elle traverse, une autre est réfléchie et une autre est transmise à l'objet exposé (Figure 3).

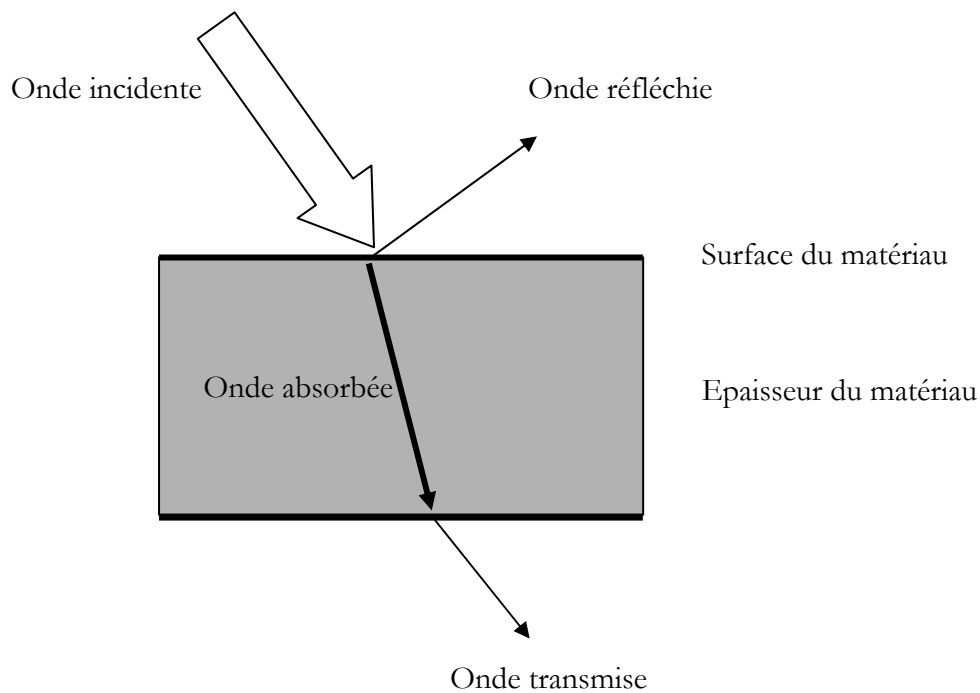


Figure 3 : Comportement électromagnétique d'une onde au contact d'un matériau (cas d'une onde plane).

Remarque : Le cas du comportement électromagnétique en onde plane, illustré ci-dessus, est un cas particulier bien connu en optique avec les lois de réflexion Snell - Descartes.

Les interactions entre les ondes et la matière dépendent des caractéristiques électromagnétiques du milieu à la fréquence de l'onde utilisée, comme la permittivité et la conductivité.

Les milieux sont caractérisés par une **permittivité relative** ϵ_r qui traduit à l'échelle macroscopique les phénomènes qui se passent au niveau microscopique tels que les différents types de polarisation électrique (Lévêque, 1994). La permittivité d'un matériau est un nombre complexe :

$$\epsilon_r = \epsilon' - j\epsilon'' \quad (3)$$

avec la partie réelle, ϵ' , qui traduit la capacité d'un matériau à être polarisé par un champ électrique externe et la partie imaginaire, ϵ'' , qui traduit les pertes diélectriques, c'est-à-dire l'énergie absorbée et généralement dissipée en chaleur.

La partie imaginaire peut être exprimée par une conductivité équivalente selon la relation :

$$\epsilon'' = \sigma / \epsilon_0 \cdot \omega_0 \quad (4)$$

avec σ , la conductivité en $S.m^{-1}$, ϵ_0 , la permittivité absolue du vide soit $8,854.10^{-12} A.s.V^{-1}.m^{-1}$ et ω_0 , la pulsation en $rad.s^{-1}$.

La permittivité dépend de nombreux paramètres tels que la fréquence ou la température.

Remarque : C'est la permittivité relative du matériau qui est prise en compte lors des interactions avec les hautes fréquences (> 1 MHz). Aux basses fréquences, c'est la **conductivité** (σ) qui définit l'aptitude du matériau à propager un courant de charge.

II. TECHNOLOGIES DE DECONTAMINATION

Il existe de nombreuses technologies de décontamination, aussi bien physiques que chimiques. Ce chapitre n'expose que les technologies utilisant des rayonnements électromagnétiques car, comme nous l'avons déjà mentionné, un des objectifs de cette thèse est la faisabilité d'un système de décontamination mettant en jeu des micro-ondes. Un dernier paragraphe traite cependant de l'utilisation d'antimicrobiens naturels, les bactériocines.

II.1. Les ultraviolets (UV) et la lumière pulsée

Les UV sont des ondes électromagnétiques dont le spectre se situe entre 10 et 400 nm (Figure 2). Ces ondes électromagnétiques se situent donc à la limite des rayonnements ionisants (longueurs d'onde inférieures à 10 nm). Ils se divisent en trois groupes : les UV A, les UV B et les UV C. Les UV C sont responsables de l'action bactéricide. Cette activité se manifeste notamment au niveau de l'ADN des micro-organismes. En effet, les UV C provoquent des altérations photochimiques au niveau des protéines et des acides nucléiques (formation de dimères de thymine par exemple) conduisant à la mort cellulaire (Montiel et Welté, 1991). L'une des utilisations de cette technique est la désinfection de l'eau et des effluents à la condition que leur turbidité soit faible.

Le système de lumière pulsée utilise quant à lui des flashes de lumière intense émise par une lampe à xénon. Les longueurs d'onde de cette lampe sont comprises entre 200 nm (UV) et 1 mm (infrarouges, IR). Les effets de cette technologie sont photochimiques (action des UV sur l'ADN par exemple) et photothermiques (action des IR qui provoqueraient une brève augmentation de température à la surface du produit). Cette technique est efficace sur tous les microorganismes, elle est rapide et permet un traitement athermique. Cependant, les liquides à traiter doivent avoir une faible turbidité. En effet, les matières en suspension du liquide à traiter semblent avoir un effet protecteur sur les micro-organismes car les UV ont de faibles longueurs d'onde et par conséquent pénètrent mal au sein des liquides à forte turbidité.

II.2. Les infrarouges (IR)

Le rayonnement infrarouge (IR) se situe entre le domaine des ondes visibles et celui des ondes radio, avec des longueurs d'onde de 0,8 μm à 1 mm (Figure 2). Il est transmis dans l'air comme le rayonnement visible.

Comme la plupart des rayonnements, l'absorption des IR par le produit entraîne une agitation moléculaire et se traduit par une élévation de température qui sera fonction de la nature physique et chimique du produit.

La profondeur de pénétration des infrarouges est faible, de l'ordre de quelques millimètres ; cette technique est donc essentiellement utilisée pour des traitements de décontamination de surface ou à coeur pour des produits dont l'épaisseur n'est pas trop importante (Le Ster, 1999).

De nombreuses applications potentielles des IR ont été étudiées, mais relativement peu sont développées à l'échelle industrielle. Plusieurs sociétés (japonaises notamment) utilisent les propriétés des infrarouges pour la décontamination des sols, en particulier, des sols des zones de travail des usines de transformation alimentaire.

Les applications de ces rayonnements en agroalimentaire concernent essentiellement la pasteurisation de produits dans leur emballage, du fait de la transparence de certains emballages au rayonnement infrarouge. Le principal intérêt de cette technique est d'éviter toute recontamination après conditionnement. Les applications industrielles de ce type de traitement sont, par exemple : la pasteurisation de quatre-quarts, d'œufs durs écalés (procédé breveté), de fruits secs, de plats cuisinés...

La décontamination par infrarouges permet de traiter le produit en continu. Elle permet également un transfert direct de l'énergie à distance mais aussi une montée rapide en température.

Ses principaux inconvénients sont d'abord un fort investissement, la nécessité d'utiliser des emballages transparents aux IR et une limitation du traitement (en surface ou à coeur de produits peu épais).

II.3. Les micro-ondes

Dans cette partie, seuls quelques exemples d'applications des micro-ondes dans le domaine de la décontamination microbiologique seront détaillés. Les caractéristiques ainsi que les interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques seront plus largement développées dans les chapitres B et C.

Les micro-ondes se situent dans la bande de fréquences comprises entre 300 MHz et 300 GHz. La technologie micro-onde a vu le jour avec la conception du radar vers 1930, puis s'est largement développée dans de nombreux domaines, dont celui de la décontamination.

Les principaux avantages de cette technologie sont sa rapidité et l'apport d'énergie calorifique directement dans la masse du produit à traiter. Par exemple, de nombreux essais de procédés de traitement micro-onde en continu ont été réalisés sur du lait (Kindle et coll., 1996 ; Villamiel et coll., 1996, 1997) et sur différents jus de fruits (Cañumir et coll., 2002 ; Tajchakavit et coll., 1998).

Bien que certains auteurs aient montré que l'application des micro-ondes n'altèrent pas les qualités nutritives des aliments (Cross et coll., 1982 ; Villamiel et coll., 1996), des études sur l'application des micro-ondes dans des conditions faiblement thermiques ont été réalisées. Par exemple, Kozempel et ses collaborateurs (1998) ont décrit un procédé de traitement de différents liquides alimentaires tels que de l'eau, des œufs liquides, de la bière, du jus de pomme et du jus de tomate. Les résultats de cette étude montrent une bonne efficacité des micro-ondes appliquées dans ces conditions faiblement thermiques (environ 40°C) avec un abattement de la charge microbienne compris entre 0,1 et 4,6 unités log selon le produit traité.

II.4. Les ondes radio

Les hautes fréquences (HF) comprises entre 3 MHz et 30 MHz appartiennent, comme les micro-ondes, à la bande des radiofréquences (Figure 2). Ces traitements utilisent deux fréquences particulières : 13,56 MHz et 27,12 MHz. C'est une technique qui se rapproche de celle des micro-ondes (Bernard, 1999).

La technologie des hautes fréquences est peu connue mais elle est cependant utilisée dans les domaines suivants : l'industrie du bois, l'industrie du plastique, l'industrie textile, l'industrie du papier/carton, l'industrie des composants et l'industrie des traitements de surface par plasma.

La technologie hautes fréquences se développe dans quatre domaines en agroalimentaire : le tempérage, la décongélation, le séchage et la cuisson.

II.5. Cas des basses fréquences

II.5.1. Les Champs électriques pulsés (CEP)

Les champs électriques basses fréquences sont utilisés dans le domaine de la décontamination. Cette technologie des champs électriques pulsés (CEP) consiste en l'application d'un champ électrique très intense (supérieur à 10 kV/cm) pendant un temps très court (de l'ordre de la microseconde) sur un produit (de préférence liquide) placé entre deux électrodes.

Les propriétés délétères des champs électriques sur les cellules ont été observées depuis longtemps. C'est en 1924 que le rapport de Beattie et Lewis met en évidence cette action et qu'un procédé, visant à stériliser par des décharges électriques, est mis en place. Il faudra attendre 1960, pour que Gossling suggère l'utilisation de champs électriques pulsés (Grahl et Märkl, 1996). Les premières études sur des cellules ont été réalisées par Sale et Hamilton, en 1967 et 1968. Ils ont ainsi mis en évidence que l'action bactéricide des champs électriques pulsés est uniquement due au phénomène électrique et non à un effet thermique secondaire engendré par la forte amplitude de ces champs.

Dans les années 90, de nombreuses études ont été réalisées sur différents microorganismes, en souche pure ou dans des milieux complexes (Ho et coll., 1995 ; Jarayam et coll., 1992 ; Pothakamury et coll., 1995, 1996, 1997 ; Yonemoto et coll., 1993 ; Zhang et coll., 1994) et ont montré son efficacité en terme de décontamination en particulier sur les formes végétatives.

L'efficacité de cette technologie de décontamination non thermique dépend de nombreux paramètres (Hülsheger et coll., 1981 ; Wouters et coll., 2001) comme par exemple :

- des paramètres physiques du système d'exposition (intensité du champ électrique, durée de l'impulsion, forme de l'impulsion, nombre de pulses,...),
- des paramètres du produit à traiter (pH, conductivité,...),
- des caractéristiques des microorganismes (espèce, souche, taille, phase de croissance,...).

Le mécanisme de destruction des microorganismes par les CEP n'est pas encore clairement élucidé. La formation d'instabilités locales au niveau de la membrane des

microorganismes par une compression électromécanique et la tension induite par le champ électrique entraîneraient la formation de pores. C'est ce phénomène d'électroporation qui jouerait un rôle majeur dans l'action des CEP sur les cellules (Ho et Mittal, 1996). Ces instabilités membranaires ne sont créées que si le champ électrique appliqué (E) atteint une valeur critique (E_c) (Figure 4). Une telle valeur de champ électrique induit un potentiel de membrane critique (approximativement 1 V). Une des conséquences majeures de l'électroporation est un phénomène appelé électroperméabilisation qui correspond à une augmentation drastique de la perméabilité cellulaire et dans certains cas aboutit à la rupture de la membrane. Cette électroperméabilisation peut être réversible ou irréversible selon le degré de changement organisationnel de la membrane. Les champs électriques très intenses induisent un effet irréversible et donc la mort de la cellule (Rowan et coll., 2000 ; Sale et Hamilton, 1967, 1968).

Remarque : Dans le cas des plus hautes fréquences, la membrane ne réagit pas comme dans le cas des basses fréquences. En effet, l'effet « capacité » de la membrane diminue.

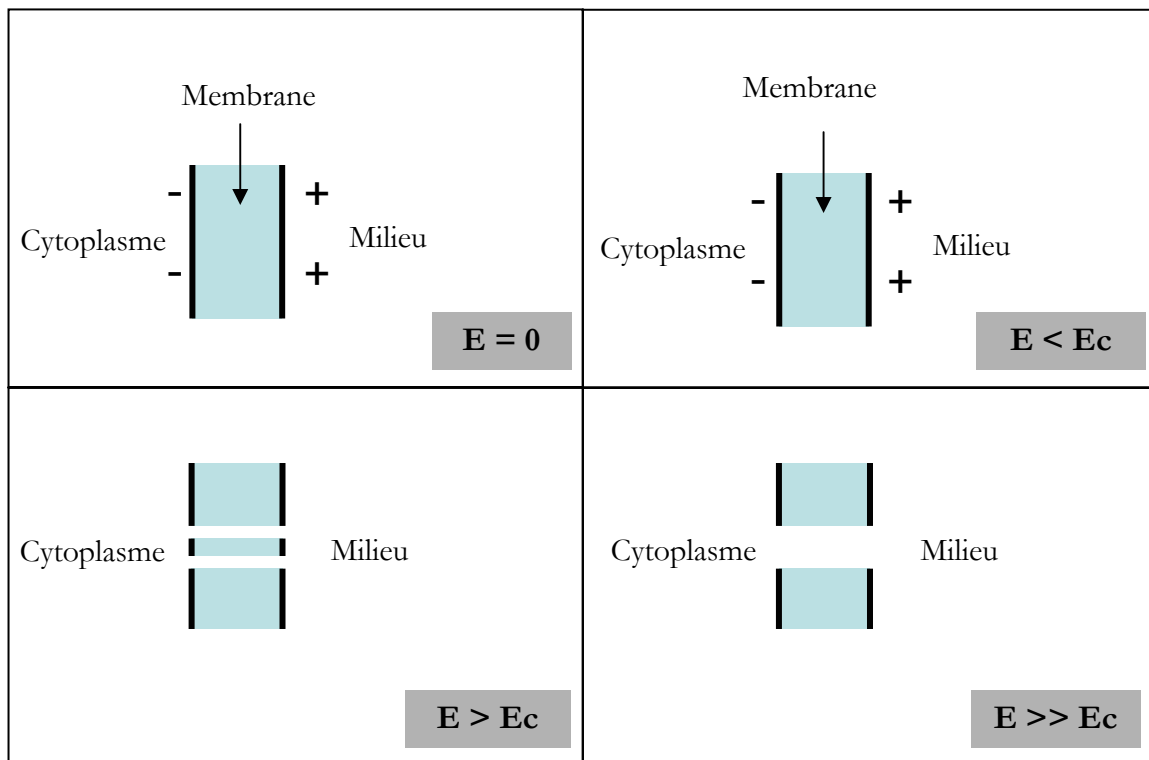


Figure 4 : Electroporation d'une membrane cellulaire par compression lors de l'exposition à un champ électrique très intense. E_c correspond à l'intensité de champ électrique critique.

La technologie des CEP est largement étudiée dans le domaine de l'agroalimentaire, en particulier pour le traitement de liquides tels que les jus de fruits. Des pilotes avec d'importantes

capacités de traitement existent aussi pour la décontamination de l'eau, par exemple pour traiter les eaux de refroidissement des centrales nucléaires, qui sont occasionnellement contaminées par des légionelles et des amibes (Vernhes et coll., 2002).

Cette technique n'existe cependant qu'à l'échelle de pilote. En effet, son industrialisation se révèle difficile essentiellement à cause du fort investissement et des coûts énergétiques que sa mise en place nécessite, et des conditions de sécurité importantes qu'elle implique.

Remarque : Une technologie de décontamination utilisant des champs magnétiques pulsés intenses a également été développée (Moreau, 1997). Ce procédé fait actuellement l'objet de travaux aussi bien sur le plan physique que biologique.

II.5.2. Combinaison avec des antimicrobiens naturels

Dans le domaine de la protection des aliments, la destruction des bactéries pathogènes à Gram - est problématique à cause de leur résistance aux antimicrobiens d'origine naturelle applicables ou présents dans les aliments. Ces antimicrobiens comprennent les bactériocines, comme par exemple le lantibiotique lactococcal, la nisine, qui est bactéricide pour les Gram + et les spores mais inefficace sur les Gram - (Calderón - Miranda et coll., 1999).

La nisine est la seule bactériocine autorisée dans les aliments, et ce, depuis environ 50 ans. Elle est produite, pendant la fermentation de produits laitiers modifiés, par certaines souches de *Lactococcus lactis*.

Son mécanisme d'action implique l'interaction avec les précurseurs des peptidoglycanes et la formation de pores transitoires dans la membrane cytoplasmique de l'organisme cible, avec une chute de potentiel membranaire et le relargage de matériel intracellulaire. L'incapacité de la nisine à détruire les bactéries Gram - réside dans le fait que ces bactéries possèdent une membrane externe qui recouvre la membrane cytoplasmique et la couche de peptidoglycanes. Cette membrane asymétrique contient des glycérophospholipides dans son feuillet interne et le feuillet externe est construit avec des lipopolysaccharides (LPS). A cause des LPS, la membrane externe exclut les substances hydrophobes et les macromolécules. La nisine, macromolécule hydrophobe ($M_r = 3353$), ne peut pas traverser cette membrane externe. La sensibilisation peut être faite par l'ajout d'EDTA qui chélate les cations stabilisants de la membrane externe et qui provoque la perte partielle de la couche de LPS (Helander et coll., 2000).

Des combinaisons de traitements ont déjà été publiées, comme par exemple la combinaison entre la nisine et les champs électriques pulsés (CEP) (Calderón - Miranda et coll., 1999). Cette étude a montré que la combinaison des traitements était plus efficace que les CEP utilisés seuls sur *Listeria innocua*. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, les CEP entraînent une poration de la membrane cellulaire et peuvent donc sensibiliser les bactéries à un antimicrobien tel que la nisine.

CHAPITRE B :
LES MICRO-ONDES ET LES SYSTEMES
BIOLOGIQUES

Les radiofréquences (de 10 kHz à 300 GHz) sont une gamme de fréquences très largement utilisées et exploitées. Elles sont présentes dans les domiciles (fours à micro-ondes, téléphones portables, etc...), sur les lieux de travail (réseaux informatiques, systèmes de chauffage industriels, équipement de diathermie médicale) et dans les espaces publics (émetteurs de radio et télévision, radars, etc...).

La prolifération des procédés utilisant cette bande de fréquences a entraîné des questions relatives aux effets éventuels de ces ondes sur l'Homme.

Ces questions ne sont pas récentes puisqu'elles ont émergé dès l'utilisation des radars. Le « bioélectromagnétisme » s'est ensuite largement développé dans le domaine des basses fréquences (ELF) (50/60 Hz correspondant à la production et au transport de l'énergie électrique). Aujourd'hui, avec l'avènement de la téléphonie mobile, de nombreuses études portent sur les interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques.

Ce chapitre a pour but de décrire les paramètres nécessaires à l'étude des interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques. Une première partie est consacrée aux propriétés des micro-ondes et à la description de certaines applications. Une deuxième partie décrit les paramètres importants pour l'étude des interactions entre ces ondes électromagnétiques et les systèmes biologiques.

I. GENERALITES SUR LES MICRO-ONDES

I.1. Un peu d'histoire

Le théoricien fondateur de l'électromagnétisme moderne, et par conséquent, des bases théoriques des micro-ondes est James Clerck Maxwell qui formula, dans les années 1860, les célèbres équations qui portent son nom et qu'il publia en 1873 dans son *Traité sur l'électricité et le magnétisme*.

Une vingtaine d'années plus tard, en 1888, Heinrich fut le premier à produire expérimentalement et à détecter des ondes électromagnétiques à une fréquence de l'ordre de 1 GHz. Lord Rayleigh, pour sa part, démontra théoriquement, en 1897, la possibilité de faire propager des ondes dans des tuyaux métalliques creux à section rectangulaire ou circulaire, que l'on a appelé guides d'ondes.

A la suite des travaux de Hertz, la radioélectricité connut un développement important. Les expériences de Marconi, dans les années 1890, montrèrent qu'il était possible d'établir une liaison entre deux points de la Terre par propagation d'ondes radioélectriques en espace libre. Kennelly et Heaviside, au début du XX^{ème} siècle, découvrirent les propriétés réfléchissantes, vis à vis d'ondes décamétriques, de certaines couches de la ionosphère située à environ 100 km d'altitude. Les radio ou télécommunications modernes (la TSF, Télégraphie Sans Fil, comme on disait alors) étaient nées.

Les ondes radioélectriques nécessaires pour ces liaisons de télécommunication étaient produites par des tubes électroniques inventés en 1907 par Lee de Forest. Pendant 50 ans, jusqu'à l'avènement des transistors et des dispositifs à l'état solide, ces tubes – triodes et tétrodes – furent universellement utilisés.

Des techniques radioélectriques nouvelles virent ensuite le jour. En 1920, les premières émissions de radiodiffusion eurent lieu, notamment en France, depuis un émetteur situé à la Tour Eiffel, sous l'impulsion du général Ferré, qui transposa ainsi dans le domaine civil, les progrès effectués par l'électronique dans le domaine militaire pendant la Première Guerre Mondiale.

Dans les années 1930, la mise au point du premier tube micro-ondes, le magnétron, et de la première antenne micro-onde, le réflecteur paraboloidal, permirent le développement d'un

système spécifiquement micro-onde : le radar (pour RAdio Detection And Ranging). Des recherches importantes furent alors effectuées dans les grands pays industrialisés. Les équipes françaises obtinrent des résultats importants, concrétisés par l'implantation de radars à bord des navires, notamment en 1935, à bord du paquebot Normandie. Les radars anglais, également très performants, permettaient dès 1939, une surveillance efficace de l'espace aérien britannique. L'apport des Etats-Unis pendant la Seconde Guerre Mondiale fut considérable et les recherches du Massachusetts Institute of Technology (MIT) furent publiées en 1945 et 1950, en une collection de 25 volumes qui servirent de bible aux étudiants et chercheurs en micro-ondes du monde entier. Dès lors, le développement des micro-ondes fut considérable et les applications, nombreuses et importantes, notamment pour le chauffage industriel et domestique (four micro-onde), la médecine (hyperthermie micro-onde), la radioastronomie, l'électronique...

I.2. Bandes de fréquences et applications

Les micro-ondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques qui se situent dans la bande de fréquences comprises entre 300 MHz et 300 GHz, ce qui correspond à des longueurs d'onde (λ) dans l'air ou dans le vide allant de 1 m à 1 mm (Figure 2, Chapitre A). Les micro-ondes sont donc des ondes décimétriques (entre 300 MHz, $\lambda = 10$ dm, et 3 GHz, $\lambda = 1$ dm), centimétriques (entre 3 GHz, $\lambda = 10$ cm, et 30 GHz, $\lambda = 1$ cm) et millimétriques (entre 30 GHz, $\lambda = 10$ mm, et 300 GHz, $\lambda = 1$ mm) (Figure 5).

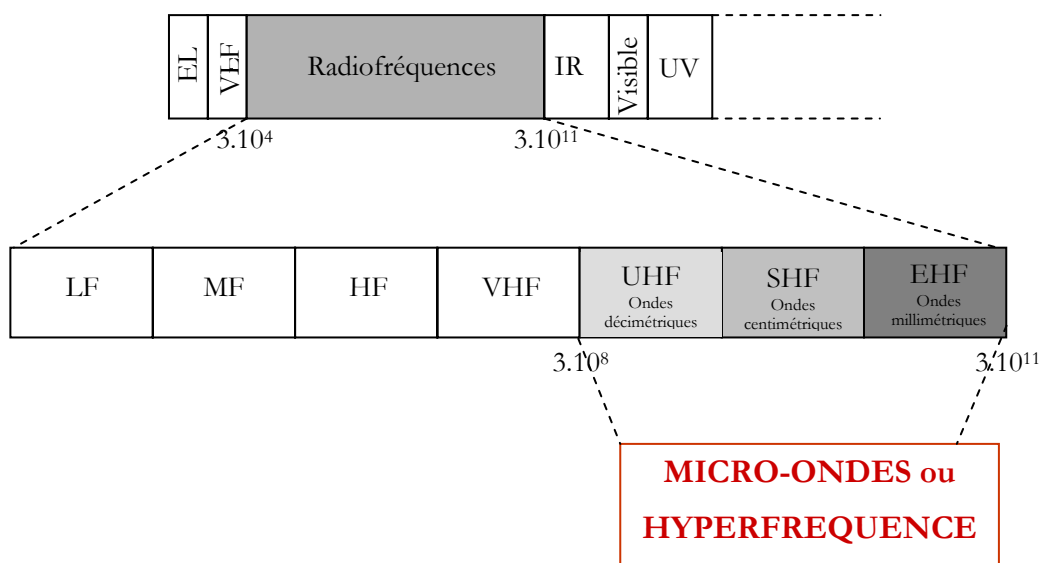


Figure 5 : Le spectre électromagnétique divisé en bandes, par décades de fréquences (F : frequency, L : low, E : extremely, V : very, M : medium, H : high, U : ultra, S : super).

La gestion des bandes hyperfréquences est réalisée par des organismes internationaux (Thuery, 1989 a). En effet, les micro-ondes sont utilisées pour de nombreuses applications industrielles, scientifiques et médicales. Il existe des fréquences allouées pour les différentes utilisations des micro-ondes (Tableau 1).

Tableau 1 : Exemples de fréquences micro-ondes allouées (GSM : Global System for Mobile communications, DCS : Digital Communication system, UMTS : Universal Mobile Telecommunications System).

Applications	Fréquence
GSM 900	890 - 915 MHz
	935 – 960 MHz
DCS 1800	1710 - 1785 MHz
	1805 – 1880 MHz
UMTS	1900 – 1980 MHz
	2010 – 2025 MHz
Chauffage industriel	2450 +/- 50 MHz
	5800 +/- 75 MHz

Les micro-ondes sont utilisées dans le domaine du chauffage industriel à cause de leur capacité à induire une augmentation rapide de température. Goldblith a décrit le principe de chauffage des micro-ondes comme un phénomène résultant des molécules diélectriques dissymétriques qui tendent à s'aligner avec le champ électrique alternatif rapide. Dans le champ micro-onde, les molécules oscillent autour de leur axe en réponse à un champ électrique qui arrive toutes les 2450 millions de fois par seconde dans un four micro-onde par exemple. Cette oscillation crée des frictions intermoléculaires qui résultent en une génération de chaleur. Les matériaux diélectriques, qui présentent un moment dipolaire important, comme les aliments ou l'eau sont dits « à perte ». Le taux de perte varie en fonction de la fréquence, de la température et la nature du matériau. L'augmentation de perte d'un matériau peut être directement reliée à une augmentation de l'absorption d'énergie micro-onde et, donc, à la production de chaleur.

Dans le domaine de l'agroalimentaire, le procédé le plus connu utilisant les propriétés de chauffage rapide des micro-ondes est le four micro-ondes. Le four micro-ondes permet de cuire

mais aussi de décongeler des aliments. D'autres procédés utilisant le chauffage micro-ondes sont développés pour la décontamination de produits secs et de produits sous emballage.

Hormis l'industrie agroalimentaire, l'utilisation des micro-ondes se développe pour le traitement thermique des déchets, comme par exemple les déchets hospitaliers, en tant qu'alternative à l'incinération.

Les micro-ondes trouvent aussi de nombreuses applications dans le domaine des télécommunications. Dans ce cas, elles ne sont pas utilisées comme vecteur d'énergie mais comme ondes porteuses d'informations. Pour la téléphonie mobile par exemple, les champs électromagnétiques utilisés s'étendent sur une plage de fréquences allant de 850 à 1900 MHz. En France, il existe actuellement deux systèmes : le système GSM 900 (GSM : Global System for Mobile communication) et le système DCS 1800 (Digital Cellular System). La bande porteuse est 900 MHz (de 872 à 960 MHz) pour le système GSM 900 et la bande 1800 MHz (de 1710 à 1815 MHz) pour le système DCS 1800 (Luc, 2002). A l'intérieur de ces gammes de fréquences, les antennes relais attribuent à chaque utilisateur une bande plus étroite aléatoire et variable lorsque l'utilisateur se déplace et le signal est modulé.

II. INTERACTIONS MICRO-ONDES ET SYSTEMES BIOLOGIQUES : PARAMETRES IMPORTANTS

Afin d'étudier et de quantifier les effets biologiques des ondes électromagnétiques, il est indispensable de maîtriser les paramètres physiques et biologiques qui caractérisent l'interaction de l'onde avec les systèmes biologiques.

II.1. Dosimétrie

II.1.1. Le débit d'absorption spécifique (DAS) ou specific absorption rate (SAR)

La quantité d'énergie absorbée par les systèmes biologiques semble être le paramètre le plus significatif pour étudier les interactions ondes – systèmes biologiques. En effet, une des

conséquences de l'interaction entre une onde électromagnétique et un système vivant est un effet thermique. Ainsi, afin de quantifier la dissipation d'énergie dans la matière, le DAS, plus communément appelé le SAR, a été officiellement désigné comme paramètre dosimétrique de référence par le « National Council on Radiation Protection and Measurements » (NCRP), en 1981.

Le SAR est défini comme la quantité de puissance absorbée par unité de masse et s'exprime en watt par kilogramme (W.kg^{-1}).

$$\boxed{\text{SAR} = dW / dm} \quad (5)$$

$$\boxed{\text{SAR} = \sigma E^2 / \rho} \quad (6)$$

$$\boxed{\text{SAR} = C_p \partial T / \partial t} \quad (7)$$

Avec : W : puissance absorbée en W

m : masse en kg

σ : conductivité du milieu en $S.m^{-1}$

E : intensité du champ électrique en $V.m^{-1}$

ρ : masse volumique en $kg.m^{-3}$

C_p : capacité calorifique du matériau biologique

$\partial T / \partial t$: variation de température (en $^{\circ}K$) au cours du temps (en s)

Le SAR est utile pour déterminer les niveaux d'exposition et donc comparer les effets biologiques obtenus sur des systèmes biologiques différents dans des conditions d'exposition différentes. Il permet également de définir les normes d'exposition en santé publique et dans des applications thérapeutiques comme l'hyperthermie (Annexe 2). Les normes sont basées sur le seuil thermique (une valeur de $\text{SAR} = 4 \text{ W.kg}^{-1}$ pendant 6 minutes sur un objet d'1 kg entraîne une élévation de température de $1^{\circ}C$) atténué d'un facteur 10 pour les travailleurs et d'un facteur 50 pour le grand public.

Remarque : Aux basses fréquences ($f < 10$ MHz), on utilise la densité de courant surfacique et non le SAR comme paramètre de quantification. En effet, dans cette gamme de fréquences, le phénomène de conduction est prédominant.

II.1.2. Détermination du SAR

La dosimétrie consiste en la mesure de la quantité absorbée du rayonnement auquel un être vivant a été exposé. Que ce soit pour la normalisation ou pour les études biologiques, la dosimétrie est un paramètre essentiel (OMS, 1997).

Des études de dosimétrie théorique (modélisation) et expérimentale (mesure sur fantômes) permettent de quantifier l'interaction en terme de champs électriques et magnétiques locaux. Les études expérimentales ne sont pas toujours faciles à mettre en œuvre, il est donc souvent nécessaire d'avoir recours à la modélisation. Néanmoins, il est nécessaire de comparer la dosimétrie théorique avec la dosimétrie expérimentale.

La modélisation consiste à évaluer par le calcul les valeurs de champs électromagnétiques à l'intérieur de la matière vivante dans des conditions d'exposition données. A cause des formes complexes de la matière en question, seules les méthodes numériques peuvent donner des résultats acceptables.

Les méthodes de modélisation numérique peuvent être classées en deux groupes : les méthodes qui ne nécessitent pas de maillage de l'espace entourant l'objet et celles qui doivent mailler l'espace, comme la méthode des différences finies (FDTD : Finite Difference in Time Domain) utilisée dans cette étude ou la méthode des éléments finis (FEM : Finite Element Method) (COST 244, 1996 ; COST 244 Bis, 2000).

Les méthodes telles que la FDTD et la FEM offrent la possibilité de prendre en compte des objets inhomogènes et semblent être les mieux adaptées pour étudier les interactions ondes - systèmes biologiques. La méthode FDTD (Taflove, 1975 ; Yee, 1966) est la plus utilisée dans le domaine du bioélectromagnétisme. Elle utilise les équations de Maxwell dans un espace entièrement discrétisé. L'espace est découpé en cubes élémentaires (ou voxels) contenant les composantes des champs E et H.

La fiabilité de la modélisation repose sur la connaissance précise des caractéristiques diélectriques du système biologique comme la permittivité et la conductivité.

II.2. Puissance et mode d'exposition

La nature et l'ampleur des effets des micro-ondes sur les systèmes biologiques dépendent des caractéristiques de l'onde (fréquence, longueur d'onde...). La **puissance** micro-onde est aussi un paramètre important puisque, plus la puissance est élevée, plus la quantité d'énergie envoyée, donc susceptible d'être absorbée par le système biologique, est élevée. Les interactions seront donc différentes en fonction des puissances appliquées.

Le mode d'exposition peut lui aussi influencer les interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques. En effet, les micro-ondes peuvent être appliquées en **mode continu** ou en **mode pulsé**.

Un rayonnement continu est émis de façon ininterrompue avec une puissance constante P . L'énergie délivrée pendant le temps d'utilisation est donc égale à :

$$E = P \cdot t \quad (8)$$

Avec E , énergie en joules, P la puissance en Watts et t le temps d'exposition en secondes.

Dans le cas d'une émission pulsée, le rayonnement est émis par des impulsions de durée τ . Ces impulsions sont, la plupart du temps, émises de façon itérative avec une fréquence de répétitions f_r en Hz. Dans ce cas, on distingue la puissance crête (P_c) et la puissance moyenne (P_m). La puissance crête correspond à la puissance maximale d'une impulsion, l'énergie délivrée pendant cette impulsion est alors égale à :

$$E = P_c \cdot \tau \quad (9)$$

La puissance moyenne représente, quant à elle, la puissance délivrée moyennée dans le temps et est égale à :

$$P_m = P_c \cdot \tau \cdot f_r \quad (10)$$

et l'énergie délivrée est alors : $E = P_m \cdot t$

L'émission, qu'elle soit continue ou impulsionnelle, peut être **modulée** de façon à ce qu'un seul de ses paramètres physiques varie. Par exemple pour la téléphonie mobile, le champ électromagnétique de 900 MHz est modulé à 217 Hz (mode TDMA : Time Division Multiple Access). Il existe principalement deux types de modulation : la modulation d'amplitude où la puissance d'émission varie dans le temps en fonction de la fréquence fixée du signal à transmettre, et la modulation de fréquence (cas de la téléphonie mobile) où la fréquence d'émission oscille dans une certaine bande fréquentielle en fonction de l'amplitude du signal à transmettre (Figure 6).

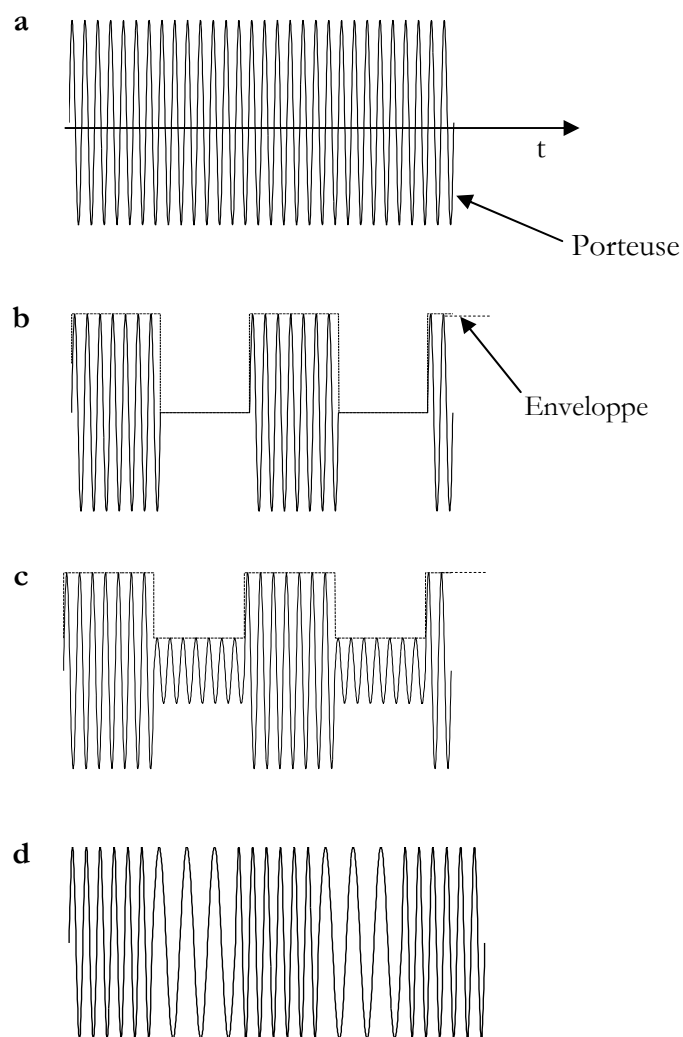


Figure 6 : Exemple de modulation : signal non modulé (a), signal modulé en amplitude avec un taux de modulation de 100% (b), signal modulé en amplitude avec un taux de modulation de 50% (c) et signal modulé en fréquence (d).

II.3. Caractéristiques du matériau exposé

Les micro-ondes, comme on l'a vu précédemment, induisent une oscillation des molécules, telles que celle de l'eau, qui résulte en une augmentation de température. Par conséquent, l'eau semble avoir un rôle majeur dans l'interaction micro-ondes – systèmes biologiques. En effet, des études montrent qu'un traitement micro-ondes appliqué sur des bactéries ou des spores bactériennes dans un environnement sec n'a aucun effet en terme de mortalité cellulaire (Jeng et coll., 1987 ; Wayland, 1977).

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre A, les caractéristiques diélectriques du système exposé, comme la permittivité ou la conductivité sont très importantes pour étudier les interactions entre les ondes électromagnétiques et un matériau. La composition du milieu joue donc un rôle important dans les interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques.

CHAPITRE C :

**ETAT DE L'ART DES RECHERCHES SUR
LES INTERACTIONS MICRO-ONDES ET
SYSTEMES BIOLOGIQUES**

La plupart de la recherche mondiale (américaine, asiatique et européenne) sur les interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques concerne aujourd'hui la téléphonie mobile (900 et 1800 MHz pour les bandes de fréquences utilisées en Europe). Cependant, de nombreuses études ont été réalisées sur les interactions possibles à d'autres fréquences micro-ondes, en particulier à 2,45 GHz et dans la bande de fréquences correspondant aux ondes millimétriques.

Ce chapitre a pour but de faire un état de l'art non exhaustif de la recherche dans le domaine des actions des micro-ondes sur les systèmes biologiques. Une première partie est consacrée aux différents effets des micro-ondes et en particulier à la controverse qu'ils induisent. Une seconde partie est consacrée aux résultats des études menées dans le domaine de la téléphonie mobile. Enfin, une troisième partie est consacrée aux effets des micro-ondes sur les micro-organismes.

I. EXISTENCE D'UN PHENOMENE NON THERMIQUE ?

Un effet biologique dû à un champ électromagnétique correspond à des modifications qui peuvent être de nature biochimique ou physiologique.

Depuis le début du siècle, on sait que les ondes électromagnétiques sont absorbées par les systèmes biologiques et qu'elles induisent une augmentation de température (Chapitre B, I). Cependant, depuis une quinzaine d'années, on a une connaissance plus précise de l'interaction rayonnement – systèmes biologiques (organisme, tissu, cellule) et de nombreuses expérimentations semblent montrer que l'effet thermique n'est pas le seul à agir.

Un effet dit « thermique » correspond à un échauffement local du système biologique exposé que les processus de thermorégulation (s'ils existent) ne peuvent pas compenser. Les pertes diélectriques sous forme de chaleur ne se produisent que si la puissance incidente de l'onde est suffisamment élevée : c'est le principe du four micro-ondes. Ces effets thermiques trouvent de nombreuses applications.

Un effet dit « athermique » a lieu lorsque le processus de thermorégulation du système biologique exposé est capable de maintenir sa température égale ou proche de sa température normale. Une cellule isolée ne possède pas de système de thermorégulation. Dans le cas d'une étude *in vitro*, la compensation de l'effet thermique ne peut donc pas avoir lieu et tout transfert d'énergie se traduira par une augmentation de température.

Les effets dits « non thermiques » ou « spécifiques » sont créés par l'interaction de l'onde électromagnétique avec le système biologique sans induire d'élévation de température.

L'existence de ces effets a entraîné une grande controverse. Par exemple, dans le domaine de la décontamination bactérienne, des études (Atmaca et coll., 1996 ; Salvatorelli et coll., 1996) ont montré que les micro-ondes, appliquées dans les mêmes conditions de température qu'un chauffage traditionnel, ont un effet bactéricide plus important que ce dernier. Certains auteurs (Dreyffus et Chipley, 1980 ; Khalil et Villota, 1988 ; Kozempel et coll., 1998 ; Tajchakavit et coll., 1998) pensent qu'il existe un effet bactéricide non thermique des micro-ondes alors que d'autres (Fujikawa et coll., 1992 ; Goldblith et Wang, 1967 ; Vela et Wu, 1979 ; Welt et coll., 1994) réfutent son existence. Il semble qu'actuellement l'existence de ces effets non thermiques soit acceptée, il reste cependant à déterminer leur nature et leur importance.

La controverse concernant l'existence des effets non thermiques des micro-ondes réside essentiellement dans la difficulté de maîtriser les conditions de température. En effet, la rapidité de montée en température induite par les micro-ondes est importante et peut par conséquent provoquer une inhomogénéité de chauffage. Des systèmes de mesures de température performants telles que des capteurs mettant en jeu des fibres optiques (sonde Luxtron) ou encore l'utilisation des infrarouges ont été mis au point pour contrôler et mesurer de façon plus précise les températures des systèmes exposés. Malgré la précision de ces techniques, la simulation numérique reste nécessaire à l'étude des interactions ondes – systèmes biologiques. La combinaison des mesures expérimentales et des résultats obtenus par simulation reste la meilleure façon de déterminer et de caractériser les conditions d'exposition, en particulier en terme de température et de SAR, notamment pour détecter des effets « subtils » de la température (COST 281, Londres).

II. CAS DE LA TELEPHONIE MOBILE

Comme nous l'avons vu précédemment, la téléphonie mobile en Europe utilise les fréquences de 900 et 1800 MHz. On estime que la tête de l'utilisateur du téléphone portable absorbe environ la moitié des micro-ondes émises par le téléphone. Un faible échauffement se produit au niveau de la peau mais les tissus plus en profondeur ne sont pas échauffés à cause, d'une part, de l'absorption des ondes par les tissus superficiels et d'autre part, de la faible puissance émise par les téléphones.

De nombreuses études ont été effectuées sur les éventuels effets biologiques des micro-ondes émises par les téléphones portables et les antennes relais. De nombreux rapports concernant les effets sanitaires des ondes ont aussi été rédigés ; par exemple, le rapport Zmirou (2001) commandé par la Direction Générale de la Santé (Ministère de la santé) au début de l'année dresse le bilan des connaissances sur les effets des radiofréquences sur la santé.

Le Tableau 2 présente une synthèse non exhaustive des résultats issus de certaines de ces études et publiés dans le rapport du sénat sur « l'incidence éventuelle de la téléphonie mobile sur la santé » de J.L. Lorrain et D. Raoul en novembre 2002.

Tableau 2 : Influence des ondes électromagnétiques utilisés pour la téléphonie mobile sur des fonctions biologiques.

Type d'affection	Type d'étude	Conclusions et remarques
CANCER	Etudes épidémiologiques	La plupart de ces études sont négatives mais certaines sont critiquées (1). Le manque de recul et la caractérisation insuffisante de l'exposition font que les revues récentes concluent à une absence d'association entre cancer et téléphone.
	Etudes sur l'Animal	Absence d'initiation de tumeurs. Pas de rôle de promotion de tumeurs. Une étude s'est révélée positive (2) mais elle est critiquée sur le plan dosimétrique.
	Etudes sur cellules animales en culture	Les études de génotoxicité sont en générale négatives pour des périodes courtes d'exposition (2 h).
REPRODUCTION ET DEVELOPPEMENT	Etudes sur l'Animal	Pas d'influence sur la reproduction et le développement.
SYSTEME NERVEUX	Etudes sur l'Homme	Pas de conclusion car les études diffèrent (3, 4).
	Comportement et fonctions cognitives (mémoire, attention, concentration)	Pas de conclusion. Quand SAR élevé donc augmentation de température, altération du comportement. Quand SAR moins élevé, des études montrent un effet (5) et d'autres non (6).
	Sommeil	Au vu des études, pas de conclusion.
	Barrière hémato-encéphalique (BHE)	Résultats contradictoires en terme d'effet sur la perméabilité de la BHE (7, 8).
SYSTEME ENDOCRINIEN ET IMMUNITAIRE	Etudes sur l'Homme	Aucun effet décelé (9)
PROTEINES DU CHOC THERMIQUE (HSP)	Etudes sur l'Animal	Induction des protéines du choc thermique (10)

(1) : Auvinen et coll., 2002 ; Dreyer et coll., 1999 ; Hardell et coll., 1999, 2000, 2001, 2002 ; Inskip et coll., 2001 ; Johansen et coll., 2001 ; Muscat et coll., 2000, 2002 ; Rothman et coll., 1996.

(2) : Repacholi et coll., 1997.

(3) : Preece et coll., 1999.

(4) : Koivisto et coll., 2001.

(5) : Lai et coll., 1994.

(6) : Dubreuil et coll., 2002.

(7) : Fritze et coll., 1997.

(8) : Töre et coll., 2002

(9) : Radon et coll., 2001.

(10) : De Pomerai et coll., 2000 ; Leszczynski et coll., 2002.

Les résultats présentés ci-dessus (Tableau 2) décrivent succinctement les résultats des études publiées. En effet, par exemple, une étude non publiée de Bastide montre un risque de mortalité des embryons de poulet.

Parmi le grand nombre d'études réalisées ces dernières années, seules quelques unes ont révélé des effets biologiques des téléphones mobiles. Cependant, il est à noter qu'un certain nombre de ces études ne sont pas reproductibles et par conséquent, il n'est pas possible de conclure avec certitude à d'éventuels effets sanitaires des champs électromagnétiques utilisés pour la téléphonie mobile.

Pour mieux appréhender l'incidence éventuelle de la téléphonie mobile sur la santé, de nombreuses études sont actuellement initiées, comme par exemple l'étude épidémiologique Interfone qui devrait fournir des informations sur la relation possible entre téléphones mobiles et tumeurs du cerveau. Cette étude devrait être réalisée dans de nombreux pays.

III. MICRO-ONDES ET MICROORGANISMES

Même si la plupart de la recherche actuelle sur les interactions micro-ondes et systèmes biologiques concerne l'incidence de la téléphonie mobile sur la santé publique, de nombreuses études ont été réalisées sur l'effet bactéricide des micro-ondes. En effet, comme nous l'avons

mentionné dans les chapitres précédents, les micro-ondes sont utilisées comme moyen de stérilisation ou de décontamination depuis de nombreuses années. De plus, l'utilisation très répandue du four à micro-ondes, qui fonctionne à la fréquence de 2,45 GHz, a contribué au développement des études sur les interactions micro-ondes et micro-organismes à cette fréquence.

III.1. Les interactions à 2,45 GHz

III.1.1. Effet global

L'effet bactéricide des micro-ondes à 2,45 GHz a été testé sur un grand nombre de microorganismes comme par exemple, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, etc., aussi bien sur des milieux solides (Rosaspina et coll., 1993, 1994 a, b ; Sahin et coll., 1998 ; Wu, 1996), que dans des milieux liquides (Atmaca et coll., 1996 ; Kindle et coll., 1996 ; Latimer et Matsen, 1977 ; Levre et Valentini, 1998 ; Salvatorelli et coll., 1996 ; Woo et coll., 2000).

Ces travaux, réalisés à des températures comprises entre 80 et 100°C, montrent que l'action destructrice des micro-ondes est essentiellement due à l'effet thermique associé. Cependant, comme nous l'avons mentionné dans la partie I de ce chapitre, certains auteurs pensent qu'il existe un effet bactéricide non thermique des micro-ondes.

Même si l'existence de ces effets non thermiques ou spécifiques des micro-ondes demeure controversée, plusieurs théories ont été avancées pour comprendre comment l'énergie micro-ondes pourrait détruire les micro-organismes. Une des explications serait liée à l'absorption sélective de l'énergie micro-onde par le micro-organisme résultant en son inactivation. Le milieu environnant resterait quant à lui à des températures inférieures (Sastry et Palaniappan, 1991). Khalil et Villota (1989) parlent d'un chauffage très important induit par les micro-ondes de certains composants cellulaires, tels que les protéines ou les lipides.

De manière à avoir plus d'informations sur les mécanismes d'action des micro-ondes, en particulier au niveau des effets non thermiques, de nombreuses études sur les interactions entre les micro-ondes et certains constituants cellulaires tels que la membrane, l'ADN et les protéines du choc thermique (HSP : Heat Shock Protein) ont été réalisées.

III.1.2. Effet sur la membrane cellulaire

De tous les éléments constitutifs d'une cellule, c'est la membrane qui semble être le siège des phénomènes les plus intéressants en présence d'un champ électromagnétique.

En raison de la différence de permittivité électrique entre le cytoplasme de la cellule et le milieu extérieur dans lequel elle baigne, une accumulation de charge apparaît à l'interface (Thuery, 1989 b). En effet, la membrane, constituée d'une bicouche lipidique, se comporte électriquement comme un diélectrique et l'ensemble, milieu externe chargé positivement, membrane isolante, cytoplasme chargé négativement, se comporte comme un condensateur (Figure 7). Ce modèle reste cependant adapté pour des interactions avec des basses fréquences. Aux fréquences plus élevées, telles que celles des micro-ondes, l'effet de « condensateur » diminue.

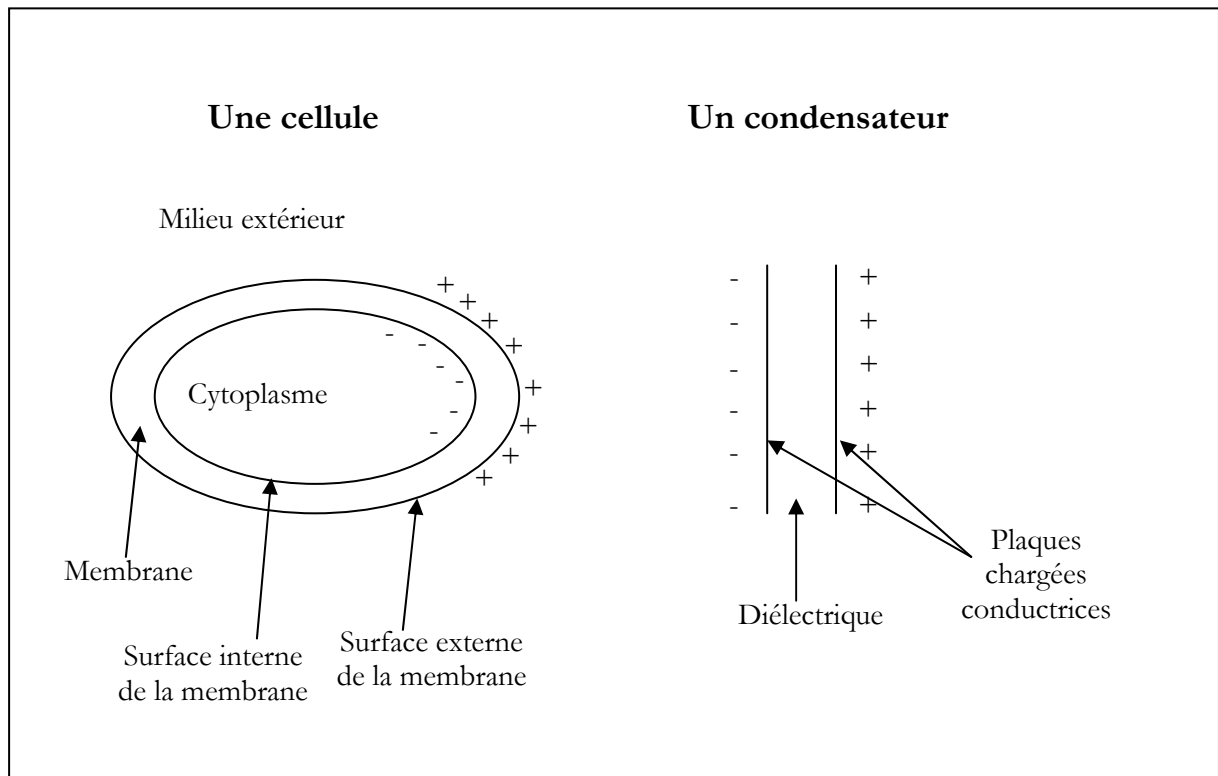


Figure 7 : Comparaison d'une cellule et d'un condensateur en terme de comportement électrique.

De nombreuses études portent sur l'effet des micro-ondes sur la membrane des micro-organismes. Ainsi, un changement de morphologie cellulaire a été observé par microscopie électronique sur des suspensions bactériennes irradiées à 2,45 GHz (Rosaspina et coll., 1993, 1994 a, b ; Salvatorelli et coll., 1996). Les différentes bactéries soumises à l'irradiation micro-ondes présentent des « cassures » de la membrane. Ces mêmes bactéries soumises à la même

température (environ 100°C) en chauffage traditionnel ne présentent pas d'altérations membranaires. Shin et Pyun (1997) ont montré que les micro-ondes, appliquées à 50°C, induisent des dommages irréversibles à la membrane de *Lactobacillus plantarum*, associés à une augmentation de perméabilité.

Des études d'interaction entre les micro-ondes et la membrane cellulaire ont été réalisées sur des liposomes, modèles de membranes biologiques. Des études ont montré une augmentation de perméabilité de liposomes unilamellaires sous exposition micro-ondes à 2,45 GHz à 37°C (Berquist et coll., 1994 ; Saalman et coll., 1991). Ces deux études sont pourtant en désaccord puisque Saalman et ses collaborateurs concluent à un effet non thermique des micro-ondes sur la perméabilité des liposomes alors que Berquist et son équipe montrent que cette augmentation de perméabilité est due aux effets thermiques des micro-ondes. Une autre étude sur l'influence des micro-ondes sur la libération d'enzyme contenue dans des liposomes montre qu'il y aurait un changement de perméabilité induit par l'exposition micro-onde et que ce changement de perméabilité serait dû à la formation de pores (Orlando et coll., 1994).

D'autres études, sur cellules animales, ont montré que les micro-ondes à 2,45 GHz modifiaient leur perméabilité : par exemple, modification de fluidité membranaire de cellules contenant de la mélanine (Phelan et coll., 1992), augmentation de perméabilité d'érythrocytes aux ions Na⁺ (Liburdy et Vanek, 1985), légère modification de fluidité de cellules photoréceptrices (Pologea-Moraru et coll., 2002), etc...

De nombreuses hypothèses concernant l'effet non thermique des micro-ondes sur la membrane cellulaire ont été émises. Un changement de concentration en ions de part et d'autre de la membrane et la réorientation de grosses molécules, comme les protéines membranaires, pourraient être une hypothèse sur le mécanisme non thermique des micro-ondes (Barnes et Hu, 1977). De plus, le comportement diélectrique des macromolécules biologiques (protéines, lipides, glucides, acides nucléiques) est fonction de la quantité de molécule d'eau en contact étroit avec elles (eau liée). L'eau liée à la membrane pourrait donc être responsable des effets des micro-ondes sur la membrane cellulaire (Liu et Cleary, 1995). L'eau pourrait donc être nécessaire pour induire et potentialiser des effets spécifiques des micro-ondes (Vela and Wu, 1979).

III.1.3. Effet génotoxique

D'une manière générale, la plupart des études portant sur l'effet génotoxique des micro-ondes à 2,45 GHz montrent qu'il n'y a pas d'effet spécifique ou non thermique des micro-ondes (pour revue, Verschaeve et Maes, 1998).

Cependant, des études sur l'action du chauffage par micro-ondes sur l'ADN se sont révélées positives. Kakita et ses collaborateurs (1995) ont montré que le chauffage micro-ondes induisait une fragmentation de l'ADN viral plus importante qu'un chauffage traditionnel. Aucune théorie n'a été proposée pour expliquer cette observation. Saffer et Profeno (1992) ont observé une augmentation de l'expression du gène de la β -galactosidase chez *Escherichia coli*. N'ayant pas mesuré d'élévation de température dans le milieu, ils ont émis l'hypothèse de la formation d'un gradient thermique entre les cellules et le milieu et concluent que les effets semblent être dus aux propriétés du chauffage micro-onde (rapidité et hétérogénéité).

Perrin et ses collaborateurs (2002) ont étudié l'influence de la modulation d'un signal à 2,45 GHz sur le taux de mutation de *Salmonella typhimurium*, par le test de génotoxicité appelé test d'Ames. Ils ont montré qu'un signal continu ou modulé n'induit pas le même effet. Leurs résultats suggèrent qu'une exposition micro-ondes à 2,45 GHz modulée à 217 Hz induirait un effet « protecteur » lié à la modulation. Actuellement, cette équipe cherche à déceler des effets thermiques associés grâce aux protéines du choc thermique (HSP).

III.1.4. Induction des protéines du choc thermique

En réponse à des élévations de température, à des stress chimiques ou physiques, les cellules eucaryotes et procaryotes synthétisent des protéines spécifiques impliquées dans la protection cellulaire. Ces protéines de stress comprennent une famille majeure appelée les HSP (pour Heat Shock Protein ou protéines du choc thermique). Certaines HSP sont exprimées de façon constitutive dans les cellules dans des conditions normales de culture. L'induction d'une forte expression de ces protéines apparaît lorsque les cellules sont soumises à un stress. Ces protéines sont considérées comme des « chaperons moléculaires » : elles interviendraient au niveau du repliement des protéines (Cleary et coll., 1997).

Il existe de nombreuses familles de HSP que l'on classe en fonction de leur poids moléculaire. Parmi elles, deux familles sont importantes : la famille des HSP 70 (dont le poids moléculaire est d'environ 70 kDa) et la famille des HSP 60 (protéines dont le poids moléculaire est d'environ 60 kDa). Chez *Escherichia coli*, la plus connue des HSP 60 est GroEL, la plus connue des HSP 70 est Dna K (Welch, 1993).

L'intérêt d'étudier ces protéines lors de l'exposition aux champs micro-ondes réside dans le fait qu'il est connu que les champs électromagnétiques ELF induisent une réponse au stress (Weisbrot et coll., 1993). De plus, certaines d'entre elles ne sont produites que lorsqu'il y a élévation de température et semblent intéressantes pour localiser l'existence de points chauds au sein d'un système exposé aux micro-ondes.

La plupart des études portant sur l'induction des HSP par des champs micro-ondes dans des conditions isothermales sont réalisées sur des cellules eucaryotes. Certaines études montrent une induction des protéines HSP, d'autres non (Cleary et coll., 1997). Les différences entre les résultats viennent probablement des conditions d'exposition qui sont différentes selon les études.

Certains auteurs proposent cependant des mécanismes pour expliquer l'existence d'une réponse au stress en conditions non thermiques. En fonction de la puissance micro-ondes, l'effet pourrait être différent. A de faibles niveaux de puissance, les champs micro-ondes pourraient altérer le bon repliement de certaines protéines mais de façon insuffisante pour induire une réponse au stress. Les protéines mal repliées ne sont donc pas protégées par ce système et un effet biologique est alors observé. A des puissances plus élevées, un plus grand nombre de protéines seraient altérées, la réponse au stress serait donc activée et empêcherait la mesure d'un effet biologique, la réponse au stress masquant les effets générés. A de très fortes puissances, la réponse au stress n'est pas suffisante pour protéger les cellules et des agrégats de protéines pourraient apparaître, un effet biologique pourrait alors être observé (Laurence et coll., 2000).

Blanck et ses collaborateurs (2000) décrivent des éléments de réponse aux champs électromagnétiques basses fréquences qui impliqueraient à la fois la réponse au stress mais aussi la voie de JUN/FOS (Figure 8).

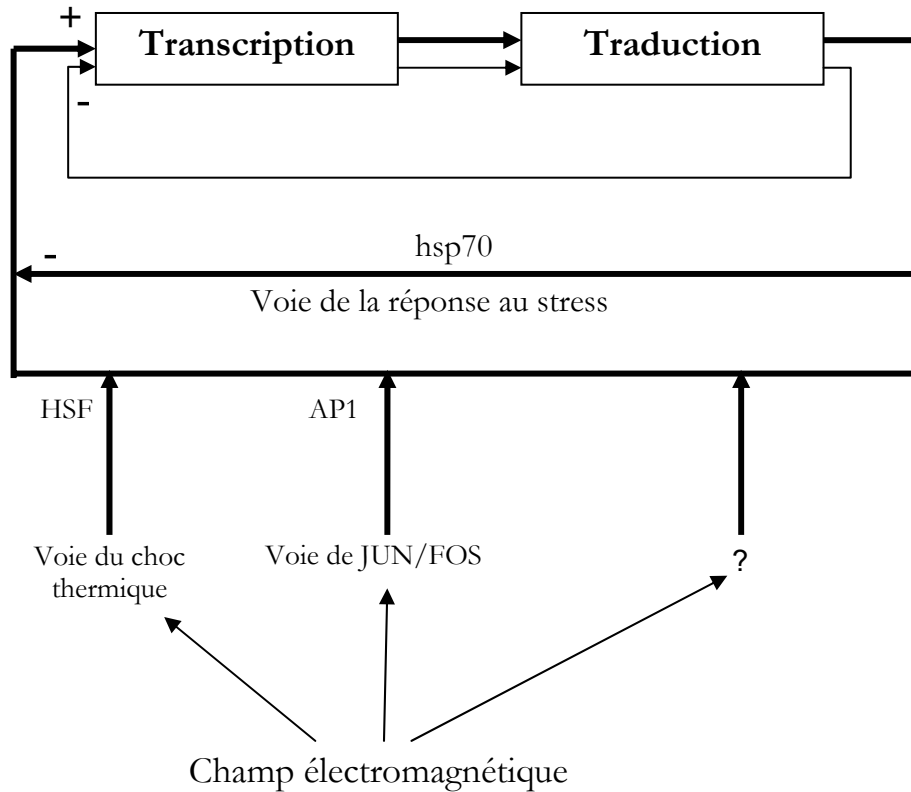


Figure 8 : Hypothèse du mécanisme des champs électromagnétiques basses fréquences (d'après Blanck et coll., 2000).

Les champs électromagnétiques seraient perçus comme un stress par les cellules. Ils pourraient agir sur la voie du choc thermique *via* le facteur de transcription HSF (Heat Shock Factor), sur la voie de JUN/FOS *via* le facteur de transcription AP1, ou d'autres voies qui ne sont pas encore identifiées (Blanck et coll., 2000). Ces voies activeraient la transcription et la traduction de hsp 70. Ce modèle n'est peut-être pas valable pour les hautes fréquences.

III.2. Interactions à des fréquences supérieures : les ondes millimétriques

De nombreux travaux sur les effets biologiques des ondes millimétriques, de 30 à 300 GHz, ont été réalisés (pour revue, Pakhomov et coll., 1998).

Des études ont porté sur la croissance cellulaire (Badea et coll., 1993 ; Gos et coll., 1997 ; Grundler et Keilmann, 1978), les effets génotoxiques (Belyaev et coll., 1992 ; Pakhomova et coll.,

1997 ; Shckorbatov et coll., 1998) ou encore la membrane cellulaire (Alekseev et Ziskin, 1995). La plupart de ces expositions ont été réalisées dans des conditions non thermiques. Comme dans le cas de la téléphonie mobile ou dans le cas des études menées à 2,45 GHz, certaines études montrent un effet biologique des ondes millimétriques, alors que d'autres non. En effet, comme dans les fréquences plus basses, les effets de ces ondes dépendent de nombreux paramètres aussi bien biologiques que physiques (Belyaev et coll., 2000 ; Shcheglov et coll., 2002).

Différents modèles ont été présentés pour expliquer les interactions possibles entre les ondes millimétriques et les systèmes biologiques. Un mécanisme possible serait lié au processus d'absorption des micro-ondes qui transférerait l'énergie du champ électromagnétique au mode vibrationnel des macromolécules altérant ainsi leur structure et leur conformation macromoléculaire (Taylor, 1981). En effet, les ondes millimétriques ont des périodes qui correspondent aux périodes des vibrations élastiques des macromolécules. Belyaev et ses collaborateurs (1992) parlent d'un effet de résonance des ondes millimétriques. En effet, les fréquences de résonance de certains constituants cellulaires tels que les protéines et les acides nucléiques (ADN et ARN) sont proches des fréquences des ondes millimétriques. Ces ondes seraient donc susceptibles d'induire des effets non thermiques et spécifiques sur des constituants cellulaires vitaux pour les cellules.

IV. CONCLUSION

L'étude des interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques, quels que soient les fréquences micro-ondes ou les systèmes biologiques étudiés, aboutit aux mêmes conclusions. Les études se révèlent positives dans certains cas et négatives dans d'autres. Ces différences résident à la fois dans la maîtrise des conditions d'exposition telles que la température ou les niveaux de SAR impliqués et dans la connaissance des paramètres biologiques du système exposé.

Partie 2 :
MATERIELS ET
METHODES

I. LES SOUCHES BACTERIENNES

I.1 Caractéristiques

Les souches bactériennes utilisées sont deux souches d'*Escherichia coli*. La première est une souche d'*E. coli*, isolée à partir d'un échantillon d'eau de ressource et issue du souchier de l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges (ENSIL). La seconde est une souche d'*E. coli* K12 (Institut Pasteur, France, Numéro CIP : 54117)

I.2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont :

- de l'eau peptonée (DIFCO, USA), qui contient 10 g.L⁻¹ de peptones et 5 g.L⁻¹ de NaCl
- du milieu LB (Luria Bertani) composé de 10 g de bactotryptone (DIFCO, USA), de 5 g d'extrait de levure (DIFCO, USA) et 10 g de NaCl (PROLABO, France), qsp 1 litre d'eau distillée.

Ces milieux sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C.

Les milieux solides LB sont obtenus par ajout d'agarose (Life technologies, France) à 1 % final soit 10 g.L⁻¹. Le milieu solide utilisé pour le dénombrement est la PCA (Plate Count Agar) (DIFCO, USA) contenant 5 g.L⁻¹ de caséine, 2,5 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 1 g.L⁻¹ de dextrose ainsi que 15 g.L⁻¹ d'agar.

I.3 Conditions de culture et de conservation

La souche est mise en culture dans des erlenmeyers contenant 100 mL de milieu de culture liquide (eau peptonée ou milieu LB) en respectant la proportion 9 volumes d'air pour un volume de liquide. Ils sontensemencés au 1/100 avec une suspension bactérienne en phase stationnaire puis incubés à 37°C sous agitation (250 rpm). La durée de l'incubation dépend de la

phase de croissance dans laquelle nous voulons étudier les souches bactériennes (environ 6 h pour une suspension en phase exponentielle de croissance, une nuit pour une suspension en phase stationnaire).

Pour leur conservation, les souches sont congelées en phase exponentielle de croissance à -80°C dans le milieu de culture liquide LB, additionné de 50% de glycérol stérile.

II. LES SYSTEMES D'EXPOSITION MICRO-ONDES

II.1. Généralités

II.1.1. Le système d'exposition

Pour l'étude des interactions entre les micro-ondes pulsées à 2,45 GHz et *Escherichia coli*, différents protocoles d'exposition ont été testés. Le banc d'exposition (Figure 9) reste le même dans les trois cas testés, seul le générateur change. Ce système d'exposition était initialement utilisé pour la synthèse de poudres céramiques par chauffage micro-ondes (Chenuaud, 1996). L'intérêt de l'utilisation de ce banc d'exposition pour notre étude réside essentiellement dans le fait que l'applicateur est une structure résonnante avec un bon rendement de puissance.

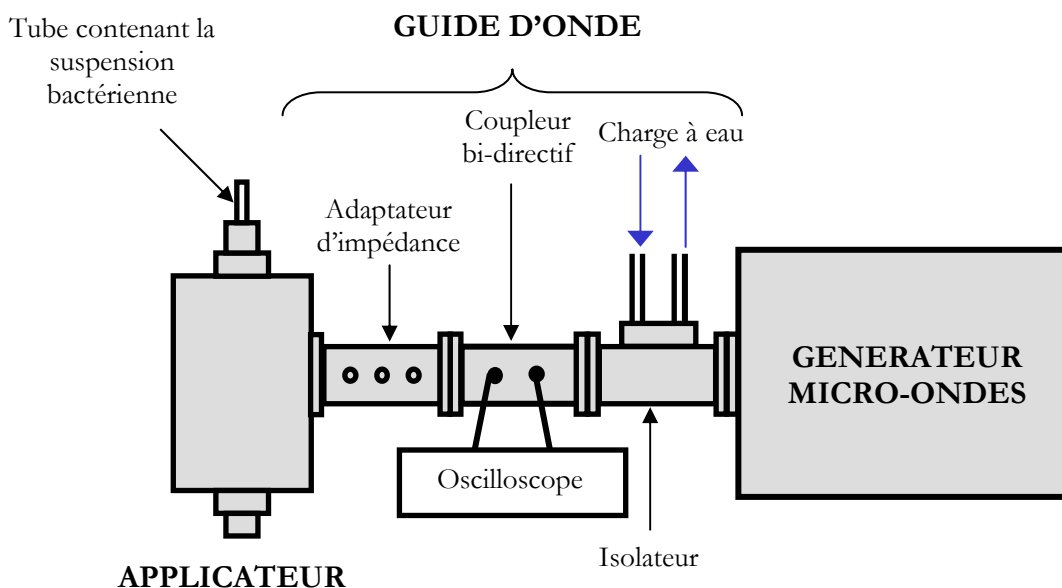


Figure 9 : Schéma général du système d'exposition aux champs micro-ondes discontinus.

Il est constitué de trois parties principales : un générateur micro-ondes, un dispositif à base de guide d'onde et un applicateur.

Différents **générateurs** micro-ondes ont été utilisés pour cette étude, leurs caractéristiques seront détaillées dans la partie II.2 ci-après.

Le dispositif à base de guide d'onde, qui mène l'onde électromagnétique depuis le générateur jusqu'à l'applicateur est composé :

- d'un système de réglage : un adaptateur d'impédance qui permet de régler grâce à trois plongeurs, l'adaptation de la cavité aux micro-ondes incidentes,
- d'un système de contrôle : un coupleur bi-directif avec des détecteurs reliés à un oscilloscope qui permet la mesure des puissances incidente et réfléchie,
- d'un système de protection : un isolateur couplé à une charge à eau qui dissipe, sous forme de chaleur, la puissance réfléchie nuisible pour le fonctionnement du générateur.

L'applicateur ou chambre d'exposition est une cavité cylindrique résonnant à 2,45 GHz (Figure 10). La taille de la cavité est réglable en hauteur grâce à des dumbbells coulissants situés de part et d'autre de celle-ci. C'est au sein de cette cavité que se trouve le tube à essai (diamètre 14 mm x hauteur 400 mm) contenant la suspension bactérienne exposée aux micro-ondes.

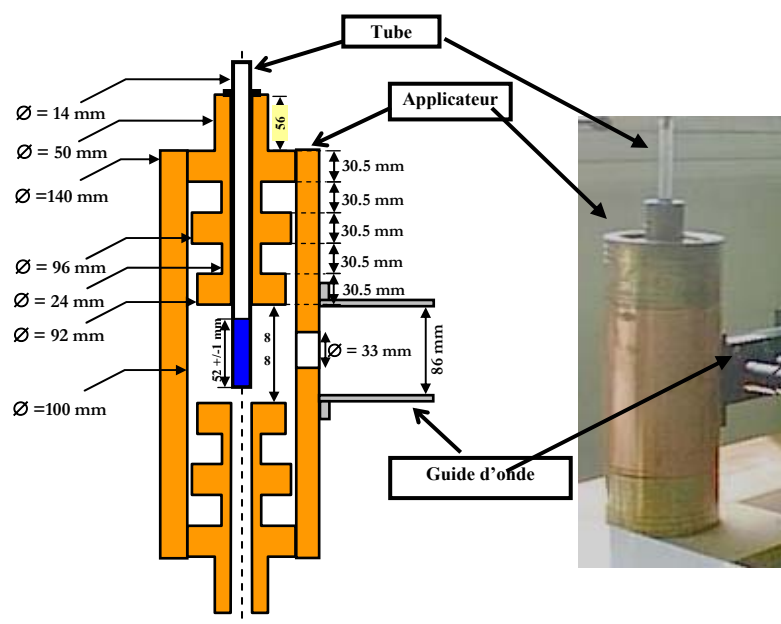


Figure 10 : Coupe détaillée de la chambre d'exposition.

II.1.2. Le protocole d'exposition

L'objectif de ce travail étant d'étudier les effets des micro-ondes dans des conditions faiblement thermiques, des protocoles d'exposition appropriés ont été mis en place. En effet, les micro-ondes ont, de par leurs propriétés intrinsèques, la capacité de chauffer rapidement (voir partie 1). Nous avons donc décidé d'envoyer des impulsions de micro-ondes de façon à ne pas induire d'augmentation trop forte de température.

D'une manière générale, le protocole d'exposition reste le même dans les trois cas testés (Figure 11). Il consiste en une phase initiale d'exposition micro-ondes ou phase de chauffage (C) qui permet la montée en température (de la température ambiante à la température désirée) et une phase de maintien de la température (M) pendant toute la durée de l'exposition, qui consiste en une alternance de phases d'exposition (E) et de phases de repos (R) (Figure 11).

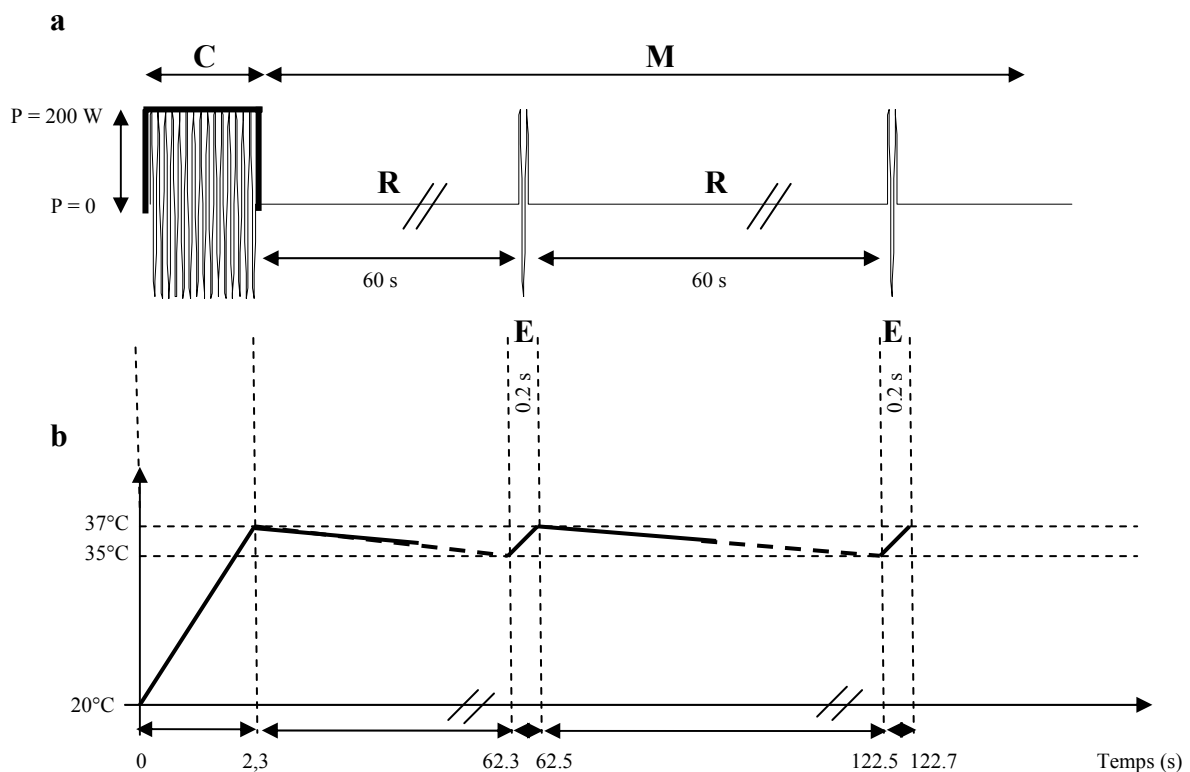


Figure 11 : Allure générale du protocole d'exposition à 37°C.

Exemple du protocole d'exposition pour une exposition à 200 W avec le générateur SAIREM avec l'allure des expositions (a) et l'évolution de la température associée (b).

Les temps totaux d'exposition aux micro-ondes varient de la durée de la phase C jusqu'à 30 minutes.

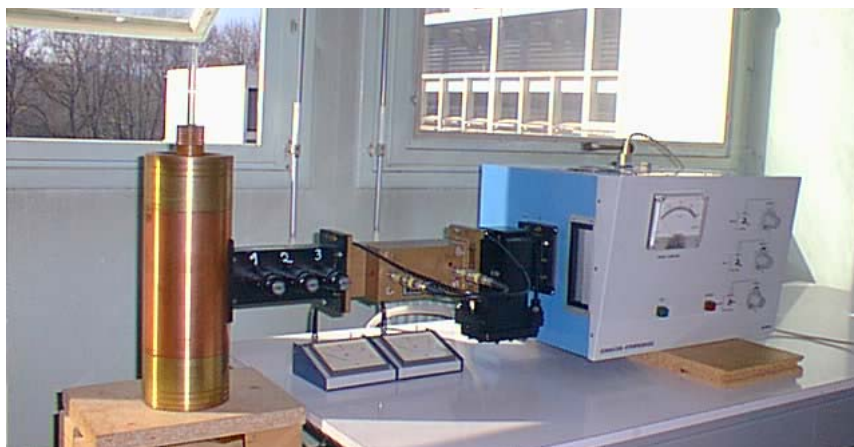
Remarque : Pour chacun des paramètres testés, des suspensions bactériennes témoin et « sham » (factices) ont été réalisées. Les suspensions témoin sont laissées à température ambiante dans les tubes utilisés pour les expositions. Les suspensions « sham » sont des suspensions témoin mises dans la cavité donc dans les conditions d'exposition mais sans rayonnement micro-ondes.

II.2. Les différents générateurs

Tous les générateurs utilisés ont une fréquence d'émission de 2,45 GHz.

II.2.1. Puissances comprises entre 0 et 200 W

Les premiers essais ont été réalisés avec un générateur hyperfréquences SNEA (France) pouvant délivrer des puissances comprises entre 0 et 200 W (Photographie 1). Ce générateur fonctionne en mode impulsif. Il délivre une impulsion d'une milliseconde toutes les 10 millisecondes (Figure 12). Les expériences préliminaires et la mise en place des protocoles ont été réalisées avec ce premier générateur. C'est pour cette raison que les premiers essais ont été réalisés à des températures élevées (60°C) avant de travailler à des températures plus basses (37°C). Nous avons testé des puissances de 25, 50 et 200 W. Les temps d'exposition associés aux puissances testées et à la température désirée sont détaillés dans la partie Résultats et Discussion.



Photographie 1 : Système d'exposition avec le générateur SNEA (0 – 200 W).

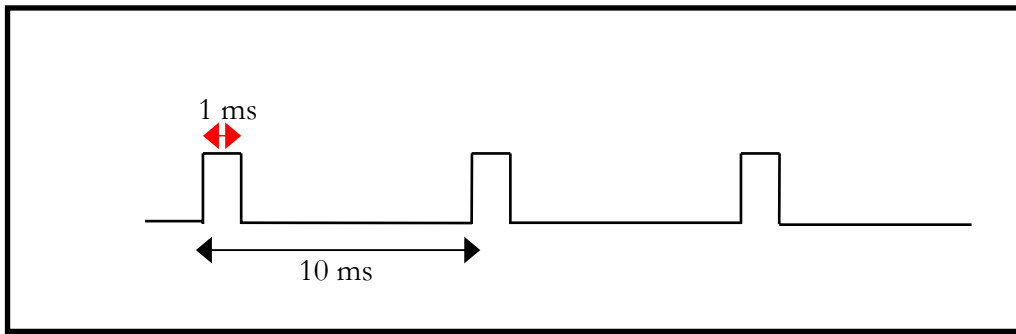


Figure 12 : Impulsions délivrées le générateur SNEA.

Pour ce générateur, le protocole d'impulsion étant fixé à 1 ms toutes les 10 ms, les temps réels d'exposition pendant C et E correspondent au dixième du temps. A titre d'exemple, lorsque l'on expose pendant 18 s à 25 W pour atteindre 37°C, l'irradiation réelle micro-ondes correspond à 1,8 s. Dans ce cas, la puissance appliquée est une puissance moyenne.

II.2.2. Puissances comprises entre 200 et 2000 W

Les études ont ensuite été réalisées avec un générateur hyperfréquences SAIREM GMP 20 KE/D (France) pouvant délivrer des puissances allant de 0 à 2000 W. Ce générateur est commandé par un générateur de fonction (Agilent, model 33120 A, USA) programmé pour délivrer des séries d'impulsions (Photographie 2).



Photographie 2 : Système d'exposition avec le générateur SAIREM (200 - 2000 W).

Les programmes, comme pour le premier générateur, consistent en une première phase de montée en température ou phase de chauffage (C) et une phase de maintien de la température (M) qui consiste en une alternance de phases de repos (R) et d'exposition (E), mais dans ce cas, la puissance incidente est une puissance crête. Les puissances crêtes testées sont 200, 400, 800, 1400 et 2000 W à des températures de 37 et 50 °C. Les temps d'exposition sont détaillés dans la partie Résultats et Discussion.

Dans ce cas, le temps d'exposition réel pour les expositions est de $C + XE$, avec C : temps de la phase de chauffage, E : temps de la phase d'exposition et X : le nombre de phase d'exposition.

III. LE CHAUFFAGE TRADITIONNEL

Le chauffage traditionnel est réalisé dans un bain marie thermostaté (LAUDA, model A 120 T, Allemagne). Les temps d'exposition varient du temps de montée en température, qui correspond à la phase de chauffage (C) comme dans le cas des micro-ondes, jusqu'à 30 minutes. Le temps de montée en température de l'échantillon a été déterminé pour 37 et 50°C à l'aide de la sonde Luxtron (Modèle 501, USA).

Les suspensions bactériennes sont exposées au bain marie dans des tubes similaires à ceux utilisés lors des expositions micro-ondes.

IV. LES PARAMETRES BIOLOGIQUES ETUDIES

IV.1. Mortalité cellulaire

La mortalité cellulaire a été évaluée par la méthode des dilutions / étalements, qui permet de quantifier l'aptitude des bactéries à se revivifier sur milieu solide.

100 μL de dilutions décimales successives des suspensions bactériennes soumises ou non aux différents traitements physiques sont ensemencés sur gélose nutritive PCA. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, les bactéries capables de se revivifier ou UFC (Unité de Formation de Colonies) sont dénombrées.

IV.2. Croissance cellulaire

Les suspensions bactériennes, initialement à la concentration de 10^8 cellules.mL⁻¹, et préalablement soumises aux champs micro-ondes ou au chauffage traditionnel, sont mises en culture en erlenmeyers contenant 100 mL d'eau peptonée pendant environ 14 h à 37°C sous agitation. L'absorbance à 580 nm de chacune de ces suspensions est mesurée toutes les 30 minutes.

IV.3. Intégrité membranaire

L'intégrité membranaire des suspensions bactériennes soumises ou non aux micro-ondes ou au chauffage traditionnel a été évaluée grâce à un marquage à l'iodure de propidium (IP) révélé par la technique de cytométrie en flux (CMF).

IV.3.1. Principe de la cytométrie en flux (CMF)

La CMF est une technique permettant l'analyse multiparamétrique de cellules passant une par une devant un faisceau de lumière. La CMF permet ainsi de compter des cellules en suspension dans un liquide, de discriminer des sous-populations au sein de la suspension analysée et, éventuellement, selon l'appareil, de les trier. La suspension cellulaire à analyser est injectée à grande vitesse dans une gaine liquide de façon à ce que les cellules coupent le faisceau de lumière individuellement (Figure 13). Sous l'effet de l'excitation lumineuse, la cellule réémet une partie de la lumière reçue sous un petit angle (inférieur à 10°), FSC (Forward Scatter), corrélée à la taille de la cellule et à angle droit, SSC (Side Scatter), corrélée à sa structure ou à sa granulosité. Lors de l'utilisation de fluorochromes marquant spécifiquement des constituants ou des fonctions cellulaires, le cytomètre en flux permet de recueillir, en plus des paramètres FSC et SSC, des

informations de fluorescence proportionnelles au paramètre biologique étudié. Les signaux lumineux émis par les cellules sont récoltés à l'aide des photomultiplicateurs (PMT).

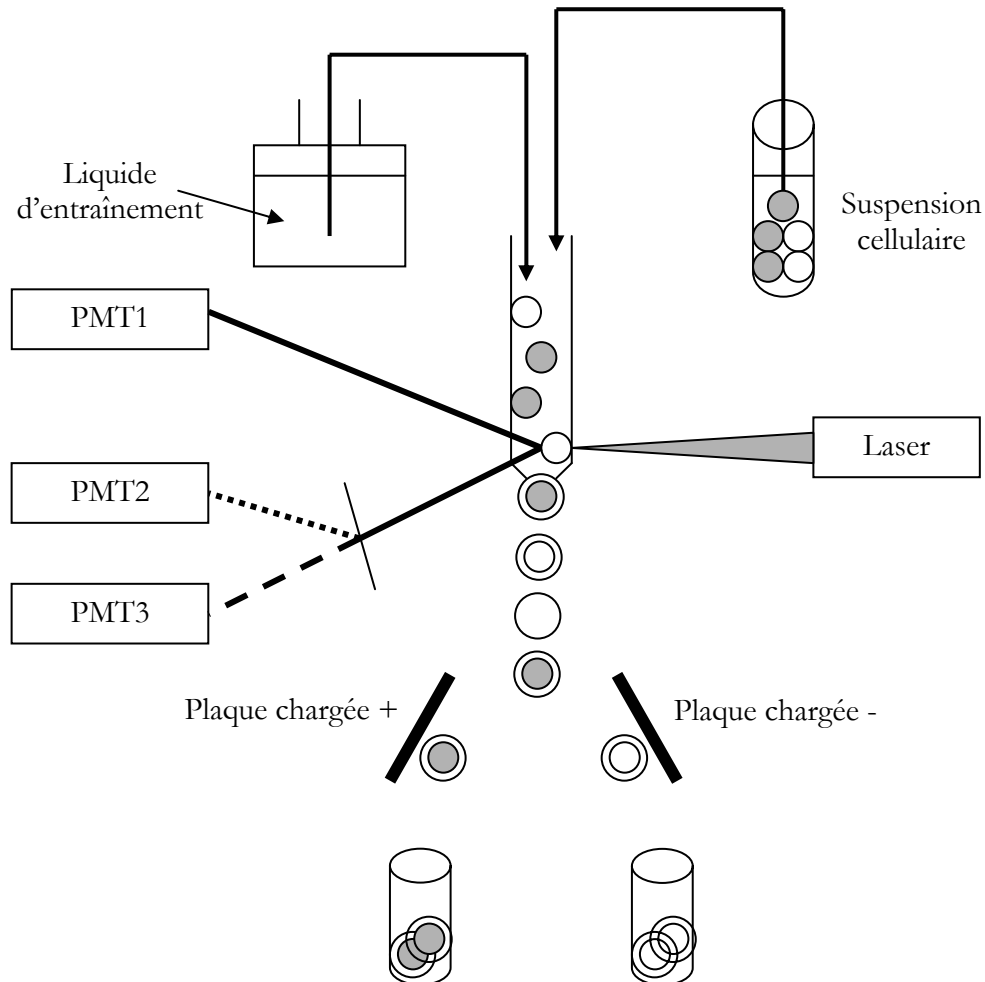


Figure 13 : Schéma du principe du cytomètre en flux.

IV.3.2. Protocoles de marquage des cellules à l'iodure de propidium et à la DiOC₆(3)

L'Iodure de Propidium (IP) (Molecular probes, USA) est préparé sous forme d'une solution stock à 0,5 mg.mL⁻¹ dans de l'eau distillée et conservé à l'abri de la lumière.

1 ml des suspensions bactériennes ajustées à 10^6 cellules.mL⁻¹, soumises ou non aux traitements physiques, est mis en présence d'IP à la concentration finale de 0,025 mg.mL⁻¹ au moment de l'analyse par CMF.

L'IP est un intercalant de l'ADN qui pénètre dans la cellule uniquement si sa membrane est endommagée. Il est excitable à 488 nm et réémet de la fluorescence rouge.

Le 3,3'-dihexyloxycarbocyanine ou DiOC₆(3) (Molecular probes, USA) est préparé sous forme d'une solution stock à 10 mM dans du DMSO et conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Les dilutions extemporanées sont faites dans de l'eau distillée.

1 mL des suspensions bactériennes ajustées à 10^6 cellules.mL⁻¹, soumises ou non aux traitements physiques, est incubé avec du DiOC₆(3) à la concentration finale de 0,75 µM pendant 20 minutes à température ambiante.

Le DiOC₆(3) est une cyanine, molécule chargée positivement, qui s'incorpore à l'intérieur de la cellule en fonction de son potentiel membranaire, selon l'équation de Nernst et de l'hydrophobicité membranaire. Cette cyanine, excitable à 488 nm réémet de la fluorescence verte. Elle a déjà utilisé comme marqueur de potentiel membranaire des bactéries (Diaper et coll., 1992).

IV.3.3. Analyses cytométriques

L'appareil utilisé est un analyseur-trieur FACS Vantage (Becton Dickinson, USA) équipé avec un laser argon (488 nm) d'une puissance de 50 mW, 488 nm étant la longueur d'onde d'excitation de l'IP. La fluorescence rouge de l'IP est collectée avec un filtre passe-haut de 600 nm et l'autofluorescence verte des bactéries est collecté à l'aide d'un filtre passe-bande de 530 (30) nm. Les paramètres enregistrés sont : FSC (Forward Scatter) corrélé à la taille des cellules, SSC (Side Scatter) corrélé à la structure des cellules, FL3 la fluorescence rouge de l'IP corrélée à l'intégrité membranaire et FL1 l'autofluorescence verte des cellules. Des acquisitions conditionnelles ont été effectuées sur des cytogrammes fluorescence rouge / fluorescence verte, de manière à avoir une meilleure séparation des populations bactériennes par rapport aux débris cellulaires et au bruit de fond électronique. FSC et les fluorescences sont visualisés sur une échelle logarithmique divisée en 4 décades et SSC sur une échelle linéaire. Le voltage du photomultiplicateur (PMT) est choisi de façon à ce que la population témoin n'émette pas de

fluorescence rouge avant la première décade. Les analyses sont réalisées sur un minimum de 10 000 cellules à la vitesse d'environ 500 cellules par seconde.

IV.3.4. Tri des cellules marquées

L'étude des bactéries viables et cultivables après marquage à l'IP a été réalisée grâce à la fonction tri du cytomètre en flux. En effet, en sortie de la gaine liquide, un champ électrique peut être appliqué sur les cellules isolées dans le liquide d'entraînement. Des plaques chargées positivement et négativement permettent de récolter les cellules dans un tube approprié (Figure 13). Dans notre cas, le tri stérile a été réalisé par rapport à l'intensité de fluorescence rouge des cellules. Grâce aux cytogrammes fluorescence rouge / fluorescence verte, nous avons défini des fenêtres de tri en fonction de l'intensité de fluorescence rouge des cellules. Pour chaque manipulation, des cellules bactériennes mortes (chauffées à 80°C pendant 15 min) sont triées et mises en culture en milieu solide de manière à contrôler la stérilité de l'appareil. Des cellules non marquées à l'IP sont aussi triées de manière à vérifier que le tri n'ait pas d'influence sur la croissance bactérienne. Pour chaque échantillon traité ou non aux micro-ondes ou au chauffage traditionnel, 10 000 cellules de chacune des sous-populations sélectionnées sont collectées dans des tubes séparés contenant 500 µL de milieu LB. Ces 10 000 cellules sont ensuite mises en culture sur milieu solide LB puis incubées à 37°C pendant 24 h. Les cellules capables de se revivifier sont ensuite dénombrées.

IV.4. Etude du contenu cellulaire en ATP

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un nucléotimètre M2500 Lumac (Perstorp Analytical, France) et le kit NRB/lumit-PM (Perstorp Analytical, France), contenant l'extractant (NRB) et un mélange enzyme (luciférase) – substrat (luciférine) lyophilisé.

50 µL des suspensions bactériennes, initialement à la concentration de 10^6 cellules.mL⁻¹, soumises ou non aux micro-ondes ou au chauffage traditionnel sont analysés.

Le principe du test (Selan et coll., 1992) est d'extraire l'ATP des bactéries en les perméabilisant et d'induire une production de lumière dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ATP libérée (Selan, 1992). Après extraction de l'ATP pendant 30 s, la luciférase et la luciférine sont ajoutées automatiquement au mélange réactionnel. L'émission de lumière est mesurée pendant 10 s et le résultat est converti par l'appareil en unité relative de lumière (RLU).

IV.5. Fuite de composants cellulaires

La quantité de protéines libérées dans le milieu extracellulaire, après une exposition ou non des cellules bactériennes aux micro-ondes ou au chauffage traditionnel, a été réalisée grâce à la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant le « BIO-RAD protein assay dye reagent » (BIO-RAD S.A., Allemagne). La BSA (Albumine Sérique Bovine) a été utilisée comme protéine standard.

Les cellules, ajustées à la concentration de 10^8 bactéries.mL⁻¹ dans du PBS (Phosphate Buffer Saline), sont exposées ou non aux champs micro-ondes ou au chauffage traditionnel. 1 ml de chacune de ces suspensions est ensuite centrifugé à 9000 rpm (Biofuge fresco, HERAEUS Instruments, Allemagne). La mesure de la quantité de protéines est ensuite réalisée sur le surnageant.

IV.6. Test de génotoxicité

Le SOS chromotest (Quillardet et Hofnung, 1993) est basé sur le système de réparation d'une cellule lorsque son ADN est lésé : la réponse SOS. La souche utilisée est *E. coli* PQ37 génétiquement modifiée: une fusion *Sfi A - Lac Z* a été effectuée entre le gène *Sfi A*, qui est un des gènes induits lors de la réponse SOS, et le gène *Lac Z* codant pour la synthèse de l'enzyme β -galactosidase.

Le principe du test est donc, que dès qu'une modification de l'ADN apparaît, le système SOS est déclenché, le gène *Sfi A* est induit et par conséquent le gène *Lac Z* aussi : il y a donc production de β -galactosidase. On mesure en parallèle la production d'une protéine ne répondant

pas à l'activation du système SOS : la phosphatase alcaline, ceci pour pallier à la production de faux négatifs. En effet, le produit testé peut inhiber la production de β -galactosidase s'il est en trop grande concentration par simple effet cytotoxique (altérations structurales et/ou fonctionnelles sur des cibles moléculaires autres que l'ADN, au niveau de la bactérie) et ainsi masquer tout effet génotoxique. Ce test quantitatif est révélé par dosage colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre.

La souche bactérienne, après 14 à 15 h de culture, est ajustée à la concentration d'environ 10^7 cellules.mL⁻¹ dans de l'eau peptonée avant d'effectuer les tests. Des fractions de 5 mL de la suspension bactérienne sont exposées aux micro-ondes à 37°C. On incube ensuite les bactéries préalablement soumises aux micro-ondes pendant 2 h à 37°C sous agitation.

Après incubation, on prélève des fractions de 0,3 mL dans chaque tube : on aura alors deux séries de tubes contenant chacun 0,3 mL bactéries exposées aux micro-ondes. Une série va servir à la recherche de l'activité de la β -Galactosidase, l'autre à la recherche de l'activité phosphatase alcaline.

Pour l'essai sur la β -Galactosidase, à chaque tube d'une série, on ajoute 2,7 mL de tampon B (composé de 16,1 g de Na₂HPO₄, 5,5 g de NaH₂PO₄, 0,75 g de KCl, 0,25 g de MgSO₄, 7H₂O, 2,7 mL de β -mercaptoéthanol, 1 g de SDS, pour 1 litre ajusté à pH 7,0 avec HCl), puis 0,6 mL de la solution d'ONPG à 4 mg.mL⁻¹. On attend ensuite l'apparition d'une coloration jaune correspondant à la production de β -galactosidase qui doit normalement intervenir dans un intervalle de temps compris entre 15 min et 2 heures, après l'ajout de la solution d'ONPG. L'essai est alors stoppé par l'ajout de 2 mL d'une solution de Na₂CO₃ 1M dans chaque tube. On lit ensuite la densité optique à 420 nm.

Pour l'essai sur la phosphatase alcaline, le protocole est similaire à celui de la β -galactosidase mais le tampon PA (composé de 121 g de TRIS aminométhane et 278 mg de SDS pour 1 litre d'eau distillée ajusté à pH 8,8 avec HCl) remplace le tampon B, la solution de PNPP à 4 mg.mL⁻¹ celle d'ONPG et l'essai est stoppé par ajout de 2 mL de NaOH 1,5M

Pour chaque série d'expérimentation (test β -galactosidase et test phosphatase alcaline), des contrôles sans adjonction de toxique (témoin négatif) et avec adjonction de substances génotoxiques (témoin positif) sont systématiquement effectués en vue de valider le test.

De façon à mettre en évidence la génotoxicité du produit testé, il est nécessaire de calculer des ratios (**R**) : $\mathbf{R} = A_{420} \text{ B} / A_{420} \text{ P}$ avec :

$A_{420} \text{ B}$: absorbance à 420 nm de l'essai pour la β -galactosidase

et $A_{420} \text{ P}$: absorbance à 420 nm de l'essai pour la phosphatase alcaline.

Il est à noter que lorsque le toxique est absent du milieu réactionnel, le ratio a une valeur de 1 +/- 0,2. On peut donc associer la génotoxicité d'un produit lorsque le ratio obtenu est supérieur à 1,2.

IV.7. RT-PCR semi-quantitative

La technique de RT-PCR semi-quantitative est utilisée pour quantifier le nombre de transcrits de gènes d'intérêt afin de comparer l'expression de ces transcrits dans une population cellulaire soumise à deux conditions expérimentales différentes : une condition standard ou témoin et une condition test, dans notre cas après irradiation micro-ondes.

IV.7.1. Extraction des ARN

Les ARN totaux d'*E. coli* exposées ou non aux micro-ondes sont extraits avec le kit RNeasy maxi kit (Qiagen, France). Après élution dans 1,6 mL d'eau RNase-free, la quantité d'ARN est estimée par mesure de la DO à 260 nm. La qualité de la préparation est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et par le rapport DO à 280 nm sur DO à 260 nm (ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2). Les ARN sont ensuite conservés à - 80°C

IV.7.2. Transcription inverse

Les ARN témoins (extraits d'une population bactérienne soumise au bain marie pendant un temps t) et les ARN traités (extraits d'une population bactérienne soumise à une exposition aux micro-ondes pendant un temps t) sont traités à la DNase I afin d'éliminer toute trace d'ADN. 1 μg d'ARN totaux, 1 μL de tampon 10X, 1 μL de DNase I (0,5 U) et de l'eau RNase-free, qsp 10 μL , sont incubés 15 min à 20°C. Après incubation, 1 μL de « solution stop » est ajouté au mélange et le tube est incubé 10 min à 70°C avant d'être stocké à 4°C dans la glace. Les ARN ainsi purifiés sont la matrice de la transcription inverse réalisée avec des amorces hexamères aléatoires et la transcriptase inverse Superscript II (SuperscriptTM II, Invitrogen). Les ADNc obtenus sont conservés à - 20°C et dilués au 1/20 avec de l'eau DNase-free au moment de l'utilisation.

IV.7.3. PCR semi-quantitative

Les analyses sont réalisées en utilisant le fluorochrome SYBR Green I (SYBR Green PCR Master mix, Applied Biosystem), un intercalant fluorescent de l'ADN. Chaque analyse est faite en triplicat dans une plaque 96 puits (Applied Biosystems). Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées dans un appareil 5700 Sequence Detection System (Perkin Elmer) dans un volume de 25 μL . Le programme d'amplification est de 10 min à 95°C (dénaturation) suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C puis 1 min à 65°C (hybridation et élongation).

Pour chaque gène d'intérêt, un couple d'oligonucléotides est choisi préférentiellement dans la région proche de la queue poly-A du transcrit d'intérêt (Tableau 3). Ces oligonucléotides sont dessinés grâce au logiciel Primer Express (Perkin Elmer) et leur spécificité vis-à-vis du gène d'intérêt est vérifiée par alignement informatique.

Tableau 3 : Séquences des couples d'oligonucléotides pour chaque gène d'intérêt, d'après le génome d'*Eschérichia coli* K12 (numéro d'accèsion : GI : 16127994 NC 000913).

Gène cible		Séquence (5'-3')	Position
ARNr 16S	sens	TTGACGTTACCCGCAGAAGAA	4164716-4164736
	antisens	ACGCTTGCACCCTCCGTAT	4164770-4164788
ARNr 23S	sens	GGCTGATACCGCCCAAGAG	4168673-4168691
	antisens	CAGGATGTGATGAGCCGACAT	4168722-416842
<i>mopA</i>	sens	CAGTTCGACCGTGGCTACCT	4369182-4369201
	antisens	AGGATGAACGGGCTTTCCA	4369246-4369264
<i>dnaK</i>	sens	CACCACGCCTTCTATCATTGC	12264-12284
	antisens	GACCAATCAGGCGTTTAATCG	12365-12385
<i>recA</i>	sens	CTTGCGGCACGTATGATGAG	2821275-2821294
	antisens	CGTGTGGACTGCTTCAGGTT	2821229-2821249
<i>lexA</i>	sens	AAACGCGGCTGAAGAACATC	4254813-4254832
	antisens	ATGCGCCGGAAACAATTTC	4254862-4254880
<i>sodA</i>	sens	TGGTGCTGAAAGGCGATAAAC	4098785-4098805
	antisens	CCGGAAGCGCCAGAAATAG	4098854-4098872
<i>katG</i>	sens	CCGGTCCGACATCAAATGTAG	4132238-4132258
	antisens	CGCCCAACCTAAACCTTGTTC	4132288-4132308

Ces différents couples d'amorces doivent être validés expérimentalement. Dans un premier temps, on recherche la concentration optimale en amorces. Trois concentrations en oligonucléotides (50, 300 et 900 nM) sont donc testées afin de déterminer la concentration qui permet d'obtenir le meilleur signal de fluorescence. Le mélange réactionnel est composé de 5 µL d'ADN à 2,5 ng.mL⁻¹, de 12,5 µL de Mix SYBR Green et de 2 µL d'amorces sens et antisens à 0,625 µM (pour une concentration finale de 50 nM) ou de 1 et 3 µL d'amorces sens et antisens à 7,5 µM pour une concentration finale de respectivement 300 et 900 nM. Le volume est complété à 25 µL par addition d'eau stérile.

L'étape suivante consiste à vérifier la relation entre le nombre de cycles (Ct) nécessaire pour que le signal de fluorescence atteigne une valeur seuil et le logarithme de la concentration en ADN matrice. Cinq dilutions successives au ¼ de l'ADN matrice sont réalisées. Le mélange réactionnel consiste alors en 12,5 µL de Mix SYBR Green, de 3 µL d'amorces sens et antisens à

7,5 μM (concentration finale de 900 nM), 1,5 μL d'eau RNase-free et de 5 μL d'ADNc test aux concentrations de 2,5, 0,625, 0,156, 0,040 et 0,010 ng.mL^{-1} . Pour une efficacité de PCR à 100%, la pente de la droite Ct en fonction de \log_{10} de la concentration en ADN matrice doit être égale à - 3,32.

Lorsque toutes ces manipulations préliminaires sont réalisées, on analyse les échantillons d'intérêt. Le mélange réactionnel dans chaque puits est composé de 5 μL d'ADN (12,5 ng soit ADN de cellules témoins, soit ADN de cellules exposées aux micro-ondes), 12,5 μL de Mix SYBR Green, de 3 μL d'amorces sens et antisens à 7,5 μM (concentration finale de 900nM), et de 1,5 μL d'eau RNase-free. Deux gènes calibrateurs (ARN 16S et ARN 23S) sont utilisés à chaque fois. Ces gènes dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes situations biologiques permettent d'éviter que des modifications de quantités d'ADN dans l'essai soient analysées comme des différences d'expression. Le taux d'expression du gène d'intérêt est déterminé par rapport à ces gènes calibrateurs ou gène de référence. La comparaison de l'expression des gènes entre les deux situations biologiques (bain-marie ou micro-ondes) est obtenue par le calcul :

$$[2^{-(\text{Ct gène d'intérêt exposé micro-ondes} - \text{Ct gène d'intérêt bain-marie})}] / [2^{-(\text{Ct gène référence exposé micro-ondes} - \text{Ct gène référence bain-marie})}].$$

Un gène est considéré comme surexprimé quand ce rapport est supérieur à 2 et sous-exprimé quand ce rapport est inférieur à 0,5.

IV.8. Combinaison micro-ondes et nisine

Une solution stock de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de nisine (10 mM nisin = $1.4.10^6$ IU. mL^{-1}) (Ref N-5764, SIGMA, France) est préparée dans du HCl 0,02 M, qui assure la stabilité de la bactériocine. Elle est stockée à 4°C. Un volume approprié de cette solution de nisine est ajouté à une suspension cellulaire ajustée à 10^6 cellules. mL^{-1} pour obtenir les concentrations finales de 250 ou de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Pour les suspensions cellulaires exposées à la combinaison des traitements, 100 μL de cet échantillon sont, immédiatement après l'exposition micro-ondes, étalées sur les géloses nutritives. Après 24 h d'incubation à 37°C, les UFC sont dénombrées.

V. LES PARAMETRES PHYSIQUES

V.1. Caractérisation électromagnétique du système d'exposition

Pour chacun des modes d'exposition (partie I), une caractérisation de la cavité a été effectuée. Comme les générateurs émettent une onde électromagnétique à la fréquence de 2,45 GHz, il est nécessaire d'adapter la cavité pour que la puissance réfléchi par celle-ci soit la plus faible possible. L'adaptation dépend de paramètres tels que la taille de la cavité et la présence d'un corps diélectrique (ici, la suspension bactérienne). En effet, le système répond différemment selon le liquide présent dans la cavité, et en particulier en fonction de sa permittivité et de sa conductivité.

Pour effectuer la caractérisation, les coefficients de réflexion de l'onde électromagnétique (S_{11}) sont calculés. Ce paramètre est mesuré à l'aide d'un analyseur de réseau vectoriel qui remplace le générateur. L'analyseur de réseau envoie une onde électromagnétique dans le système et calcule le S_{11} sur la plage de fréquence désirée (ici, entre 2,4 et 2,5 GHz). Des réglages sont effectués avec l'adaptateur d'impédance et les dumbbells de la cavité pour avoir un coefficient de réflexion le plus petit possible à 2,45 GHz (inférieur à -10 dB, c'est-à-dire moins de 10 % de puissance réfléchi).

Grâce à ces mesures effectuées avec le concours des physiciens, le volume d'échantillon biologique et la taille de la cavité permettant la meilleure adaptation possible ont été déterminés.

V.2. Caractérisation thermique

V.2.1. La sonde Luxtron

La caractérisation thermique a été réalisée avec une sonde fluorimétrique, Luxtron, modèle 501 (USA). Cette sonde est composée d'une fibre optique gainée assurant la liaison entre un module d'acquisition et un capteur de température, et en tant que telle insensible aux micro-ondes. La sonde Luxtron utilisée permet de mesurer des températures de 0 à 300°C avec une précision de 1%.

La sonde, par l'intermédiaire de la carte d'acquisition, transmet les informations de températures à un ordinateur (Figure 14). Ces informations sont traitées grâce à un logiciel d'acquisition développé au sein de l'IRCOM sous HPVee (Baiola et coll., 2003).

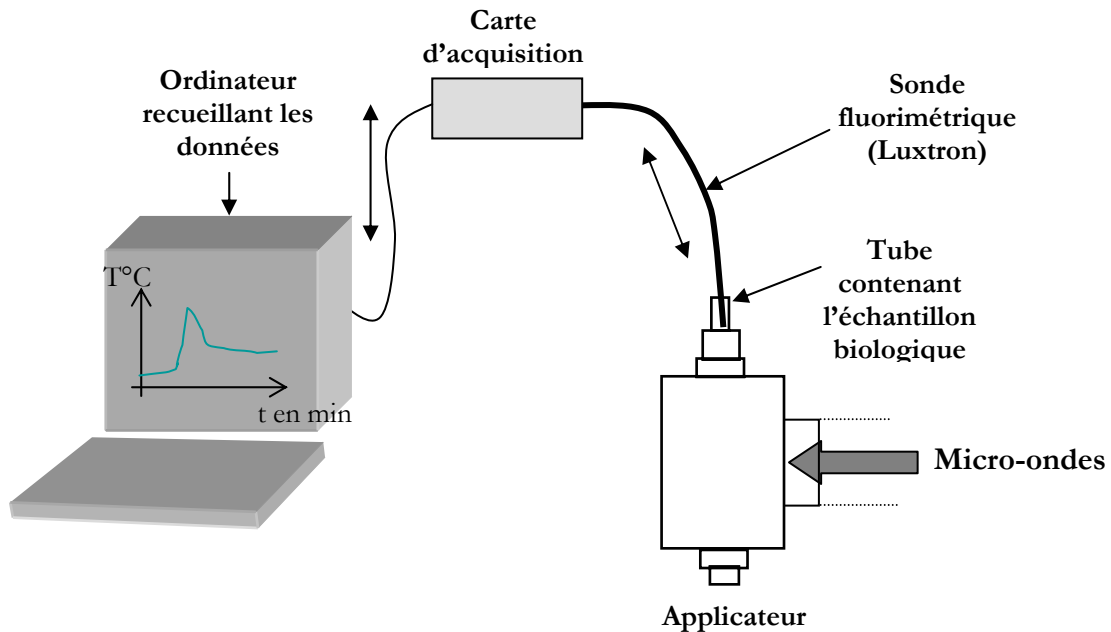


Figure 14 : Schéma général du principe de mesure et d'acquisition de la température.

V.2.2. Principe et analyse des mesures

L'échantillon contenant les bactéries est maintenu à température ambiante. On enregistre la température de l'échantillon à température ambiante pendant 30 secondes de manière à voir le profil de la montée en température. La température est ensuite mesurée pendant l'exposition micro-ondes pendant la phase C et pendant une minute après l'exposition (Figure 15). Lorsque l'on fait la caractérisation thermique pour une exposition durant 5 minutes, on enregistre la température en continu pendant 5 minutes selon le protocole d'exposition détaillé dans la partie II.1.2. ci-dessus.

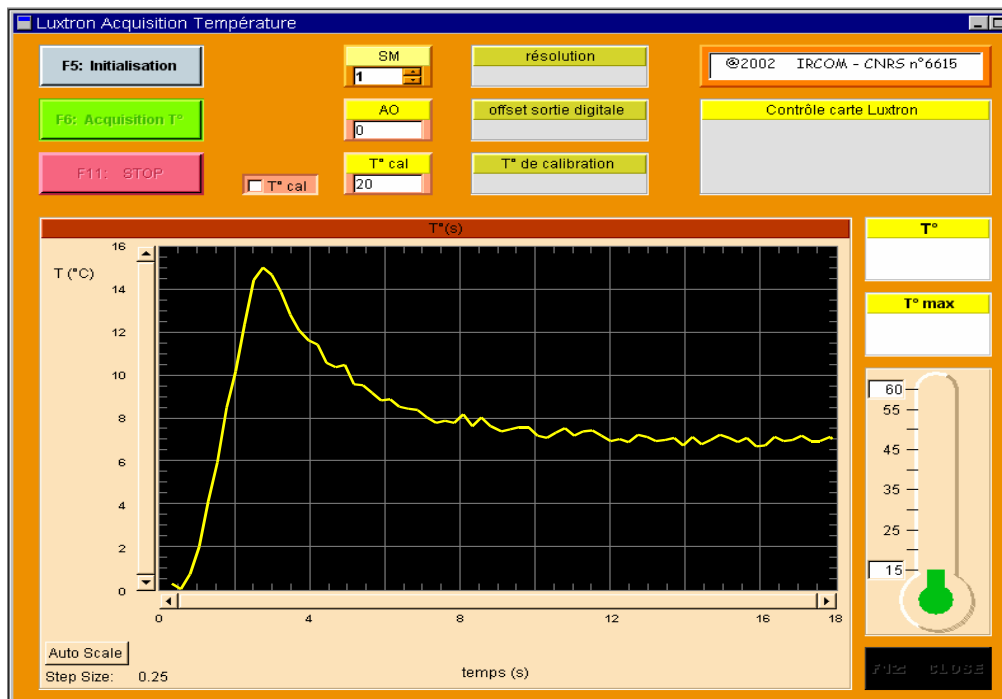


Figure 15 : Exemple de résultat de mesure de température en un point de la suspension bactérienne exposée aux micro-ondes.

Ces mesures ont été réalisées dans les trois dimensions du tube contenant la suspension bactérienne tous les millimètres de haut en bas, sur l'axe central, et de part et d'autre de cet axe (Figure 16).

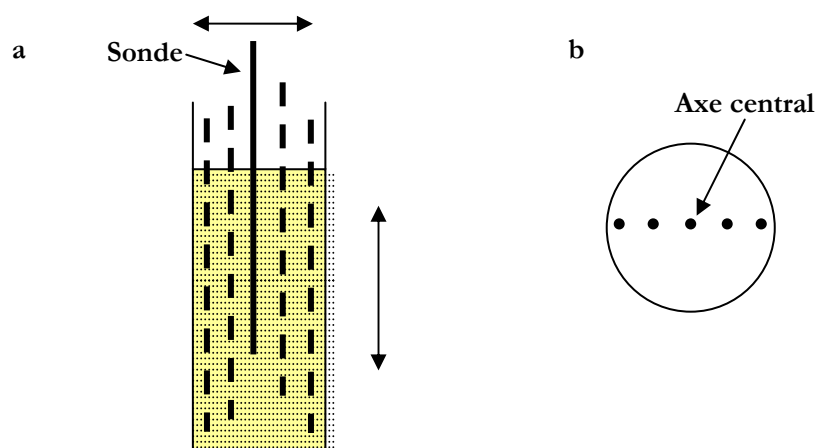


Figure 16 : Position de la sonde lors des mesures de température : coupes verticale (a) et horizontale (b) de la suspension bactérienne dans le tube. Les doubles flèches correspondent aux sens de variation de position de la sonde dans la suspension.

Les températures mesurées pour chacun des points sont ensuite traitées à l'aide du logiciel MATLAB. On obtient alors la représentation en 3 dimensions de la température au sein du tube exposé (Figure 17).

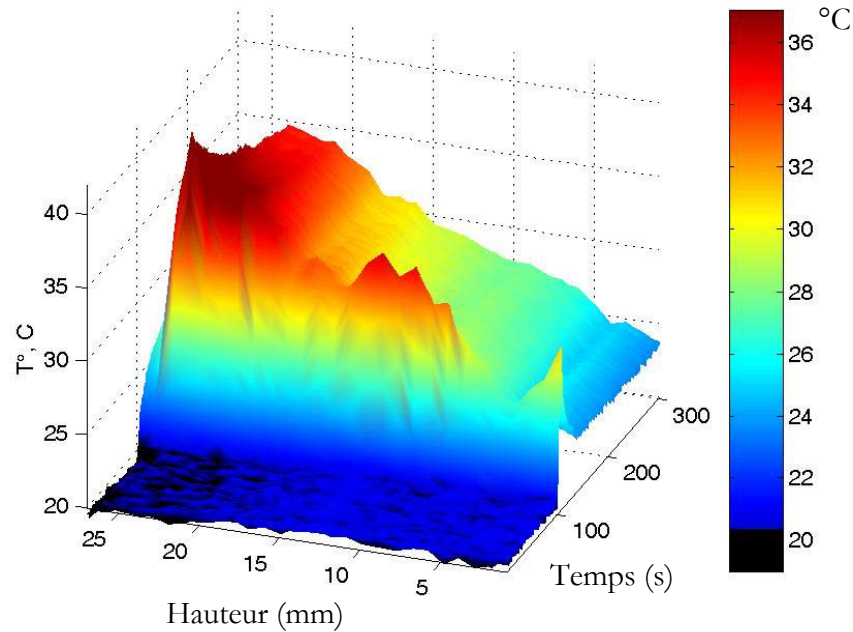


Figure 17 : Exemple de résultats de caractérisation thermique après compilation des résultats à l'aide du logiciel MATLAB.

V.3. Simulation numérique du SAR

Les simulations ont été effectuées sur un ordinateur NEC SX5 avec 40 processeurs et 128 Gbytes de mémoire vive de l'IDRIS-CNRS. La résolution employée était de 1 x 1 x 1 mm, ce qui correspond dans notre cas à un domaine d'une taille de 320 x 123 x 123 mm. Le guide d'onde, l'adaptateur d'impédance, la cavité cylindrique et son ouverture ont été simulés et résultent en un maillage d'environ 4,8 millions de voxels. L'excitation a été réalisée par un guide d'onde rectangulaire. Les paramètres diélectriques utilisés pour cette étude sont ceux d'un milieu aqueux typique. A 2,45 GHz et à 37°C, le milieu biologique est modélisé avec une permittivité

relative de 75, une conductivité de $2,85 \text{ S.m}^{-1}$ et une masse volumique de 1000 kg.m^{-3} . Le verre composant le tube à essai est modélisé sans perte avec une permittivité relative de 7,5.

La simulation présentée dans ce mémoire ne tient pas compte des phénomènes de mécanique des fluides car comme nos conditions de travail sont situées autour d'une température de 37°C , la permittivité du milieu ne varie pas ou très peu en fonction de la température.

VI. STATISTIQUES

Notre échantillonnage étant suffisant, nous avons réalisé des tests paramétriques basés sur l'analyse des variances (ANOVA), après avoir vérifié que notre population d'échantillon suivait une loi gaussienne. Compte tenu des faibles effets et des variations de conditions d'exposition d'une manipulation à une autre, le niveau de significativité (p) a été déterminé à 1%. Après avoir réalisé les tests ANOVA, nous avons appliqué un test de TUCKEY permettant une comparaison multiple en fonction des conditions d'exposition et du temps d'exposition.

Ces tests ont été réalisés avec le logiciel SYSTAT 7.0.

Partie 3 :

RESULTATS ET

DISCUSSION

La présentation et la discussion des résultats s'articulent autour de quatre chapitres. L'objectif de cette thèse étant d'étudier les effets biologiques des micro-ondes sur la bactérie *E. coli* dans des conditions faiblement thermiques, des protocoles d'exposition spécifiques ont été mis en place.

Le premier chapitre est donc consacré à la caractérisation du système d'exposition et à la mise au point des différents protocoles d'exposition aux micro-ondes.

Le second chapitre présente les résultats obtenus lors de la phase préliminaire de l'étude. Il consiste en la présentation et la discussion des effets biologiques des micro-ondes appliquées à une puissance moyenne de 200 W.

Les troisième et quatrième chapitres s'attachent à présenter et à discuter les effets biologiques des micro-ondes appliquées à des puissances crêtes comprises entre 200 et 2000 W, pour le troisième chapitre à la température finale de 37 °C, et pour le quatrième chapitre à la température finale de 50°C.

CHAPITRE A :

MISE EN PLACE DU SYSTEME ET DES

PROTOCOLES D'EXPOSITION

Ce premier chapitre est consacré à la détermination et à la caractérisation des différents paramètres physiques nécessaires à l'étude des interactions entre les micro-ondes et *E. coli*. Une première partie décrit la caractérisation électromagnétique ainsi que la détermination des conditions d'exposition pour que le système soit le mieux adapté possible. La seconde partie présente les protocoles d'exposition que nous avons déterminés pour chacune des conditions d'exposition micro-ondes testées. Enfin, les résultats des simulations électromagnétiques et de la dosimétrie constituent la troisième partie.

I. CARACTERISATION ELECTROMAGNETIQUE DU SYSTEME D'EXPOSITION

Comme nous l'avons déjà mentionné dans la Partie 2, le système d'exposition utilisé servait initialement à la synthèse d'une poudre céramique. Il a donc été nécessaire dans un premier temps de déterminer à la fois le volume de l'échantillon biologique à exposer ainsi que la taille de la cavité, réglable grâce aux dumbbells coulissants, pour que le système soit le mieux adapté possible.

La caractérisation électromagnétique du système d'exposition s'est effectuée en deux étapes. Dans un premier temps, nous avons caractérisé le guide d'onde afin de vérifier les systèmes de réglage, de contrôle et de protection. Cette étape nous a permis de nous familiariser avec les réglages de l'adaptateur d'impédance et de vérifier le bon fonctionnement des systèmes de contrôle de la puissance micro-ondes et de protection du générateur. Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé l'applicateur afin de déterminer la taille de la cavité et le volume de l'échantillon à traiter pour que la puissance réfléchie soit minimum et donc que l'échantillon biologique reçoive la majeure partie de l'énergie micro-onde.

Ces caractérisations électromagnétiques ont été réalisées à l'aide de mesures du coefficient de réflexion (S_{11}) par un analyseur de réseau qui remplace le générateur. Ce coefficient peut être exprimé en décibels (dB). Dans ce cas, pour une adaptation parfaite du système, c'est-à-dire aucune puissance réfléchie, ce coefficient doit être le plus petit possible. Par exemple, pour obtenir 99% de puissance acceptée par l'applicateur, donc seulement 1% de puissance réfléchie, les valeurs de S_{11} doivent être de l'ordre de - 20 dB à la fréquence de 2,45 GHz. Nous avons donc effectué des réglages de l'adaptateur d'impédance et des dumbbells (taille de la cavité) pour

atteindre ces conditions. Lors de l'exposition de l'échantillon aux micro-ondes, la valeur du S_{11} augmente, elle est de l'ordre de - 10 dB. La puissance réfléchie est donc d'environ 10%.

Le volume de la suspension bactérienne à exposer a été déterminé à 5 mL, la taille de la cavité, quant à elle, à 10 x 8,8 cm (Figure 10, Matériels et Méthodes). Le volume de suspension bactérienne à exposer et la taille de la cavité étant déterminés, l'étape suivante a consisté en la mise en place des protocoles d'exposition.

II. DETERMINATION DES PROTOCOLES D'EXPOSITION

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'objectif de cette étude est d'étudier les interactions entre les micro-ondes à 2,45 GHz et la bactérie *E. coli* dans des conditions faiblement thermiques. Depuis longtemps, il est connu que les micro-ondes ont la capacité de chauffer très rapidement (Golblith, 1966). Travailler dans des conditions faiblement thermiques (37, 50 ou 60°C) nécessite donc la mise en place d'un protocole d'exposition particulier. Certains auteurs utilisent des systèmes de refroidissement pour maintenir la température de l'échantillon relativement basse pendant l'exposition aux micro-ondes (Kozempel et coll., 1998), d'autres utilisent des micro-ondes pulsées (Shin et Pyun, 1997).

Pour notre part, nous avons choisi de réaliser un protocole d'exposition constitué d'alternances de phases d'exposition et de phases de repos. Notre mode d'exposition pourrait donc ressembler à une exposition « pulsée ». Cependant, en général, les temps d'exposition utilisés dans le mode pulsé sont de l'ordre de la microseconde. Dans notre cas, les durées d'exposition sont plus longues, c'est pour cela que nous avons choisi de parler d'exposition « discontinue ». De plus, nos conditions d'exposition étant différentes entre l'exposition initiale (C) et les expositions suivantes (E), cette terminologie est mieux adaptée à nos conditions expérimentales.

II.1. Protocoles d'exposition avec le générateur SNEA

Le générateur SNEA peut délivrer une puissance maximale de 200 W. Comme il émet les micro-ondes sous forme d'une impulsion d'une milliseconde toutes les 10 millisecondes (voir Matériels et Méthodes), les puissances appliquées dans ce cas sont des puissances moyennes.

Avec ce premier générateur, nous avons réalisé, dans un premier temps, des études à la température finale de 60°C (températures utilisées dans les procédés de pasteurisation), puis, dans un deuxième temps, des études à la température finale de 37°C (conditions de température optimales pour l'activité métabolique de la bactérie *E. coli*). Le choix de ces deux températures réside dans le fait que l'objectif des travaux réalisés au cours de cette thèse est double :

- étudier la faisabilité d'un système de décontamination basses températures par micro-ondes (températures de l'ordre de 50 à 60°C)
- étudier les interactions entre les micro-ondes et la bactérie dans des conditions de températures idéales pour la croissance bactérienne (37°C) de manière à détecter ou non des effets non thermiques des micro-ondes.

Comme nous l'avons vu dans la partie Matériels et Méthodes, le protocole d'exposition est divisé en deux phases :

- une phase de montée en température ou phase de chauffage (C)
- une phase de maintien (M) de la température de l'échantillon, constituée d'une alternance de phases d'exposition (E) et de phase de repos (R).

Nous avons donc déterminé les durées des différentes phases (C, R et E) en fonction, à la fois de la température finale désirée, mais aussi en fonction de la puissance micro-onde appliquée (Tableau 4). Les études à 60°C ont été réalisées à différentes puissances : 25, 50 et 200 W, celles à 37°C seulement à 200 W. En effet, de manière à avoir des expositions les plus courtes possibles, nous avons testé la puissance la plus importante.

Tableau 4 : Protocoles d'exposition utilisé avec le générateur SNEA, en fonction de la température finale désirée et de la puissance micro-ondes émises.

Température finale	Puissance (W)	Phase de montée en température (C)		Phase de maintien de la température (M)	
		Durée de la phase de chauffage (C) (s)	Durée de la phase de repos (R) (s)	Durée de la phase d'exposition (E) (s)	Durée de la phase d'exposition (E) (s)
60°C	25	30	60	7	
	50	15	60	3	
	200	5	60	1	
37°C	200	3	120	1	

Avec ces différents protocoles, les températures finales globales de l'échantillon exposé oscillent entre 60°C (à la fin des phases C ou E) et 57°C (à la fin des phases R) pour la première condition, et entre 37°C (à la fin des phases C ou E) et 34°C (à la fin des phases R) pour la seconde condition (Figure 18).

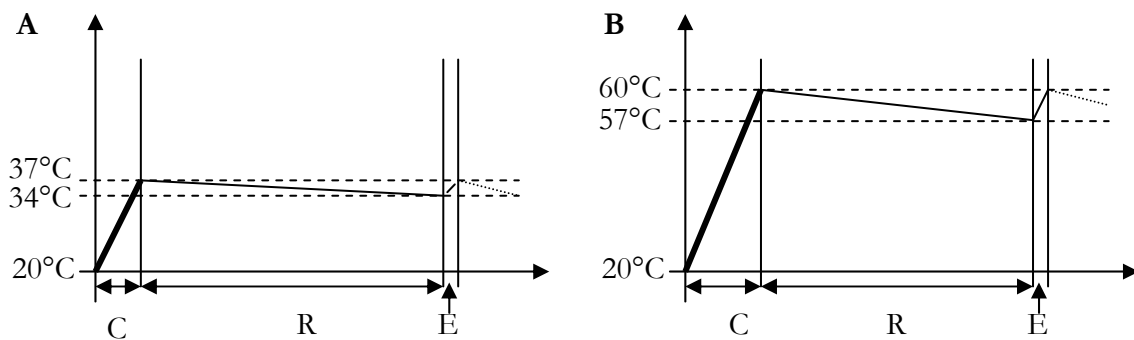


Figure 18 : Variations de la température pendant l'exposition micro-onde pour le protocole à 37°C (A) et celui à 60°C (B). C : phase de chauffage, R : phase de repos, E : phase d'exposition.

II.2. Protocoles d'exposition avec le générateur SAIREM

Avec ce générateur, l'étude des effets biologiques des micro-ondes sur *E. coli* a été réalisée pour des températures finales de 37 et de 50°C. Nous avons testé cinq puissances différentes pour les expositions à 37°C : 200, 400, 800, 1400 et 2000 W. Seules les puissances de 200, 400 et 800 W ont été testées pour les expositions à 50°C à cause des limites du générateur. Dans ce cas, l'émission des micro-ondes pendant les phases C et E est continue, les puissances mentionnées sont donc des puissances crêtes et non des puissances moyennes comme c'était le cas avec le générateur SNEA.

Remarque: Dans ce cas, nous avons travaillé dans des conditions sublétales (50°C) et non dans des conditions létales (60°C) comme dans le cas de l'étude préliminaire.

Les durées des phases C, R et E ont été déterminées en fonction de la puissance micro-onde et de la température finale désirée (Tableau 5).

Tableau 5 : Protocoles d'exposition utilisés avec le générateur SAIREM, en fonction de la température finale désirée et de la puissance micro-onde émise.

	Phase de chauffage		Phase de maintien en température	
	Puissance (W)	Durée de C (s)	Durée de R (s)	Durée de E (s)
37°C	200	2,3	60	0,2
	400	1,15	60	0,1
	800	0,575	60	0,05
	1400	0,328	60	0,028
	2000	0,23	60	0,02
50°C	200	4,6	60	0,4
	400	2,3	60	0,2
	800	1,15	60	0,1

Dans ce cas, la température finale globale de l'échantillon exposé oscille entre 37°C (à la fin des phases C ou E) et 35°C (à la fin des phases R) pour la première condition et entre 50°C (à la fin des phases C ou E) et 48°C (à la fin des phases R) pour la seconde.

Remarque : Comme le générateur SNEA émet les micro-ondes sous forme d'impulsions, on peut assimiler notre mode d'exposition à un signal modulé. Le générateur SAIREM, quant à lui, émet les micro-ondes de façon continue pendant la durée des différentes phases C et E. On ne parlera donc pas de modulation dans ce cas.

III. DOSIMÉTRIE

Comme nous l'avons vu dans l'exposé bibliographique, la dosimétrie est un paramètre essentiel pour l'étude des interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques. En effet, elle permet de connaître différents paramètres tels que les niveaux de champs ou encore la distribution du SAR.

III.1. Simulation électromagnétique

La structure simulée (Figure 19) comprend le guide d'onde, l'adaptateur d'impédance, la cavité cylindrique et l'ouverture couplée à celle-ci ainsi que le tube en verre contenant la suspension bactérienne.

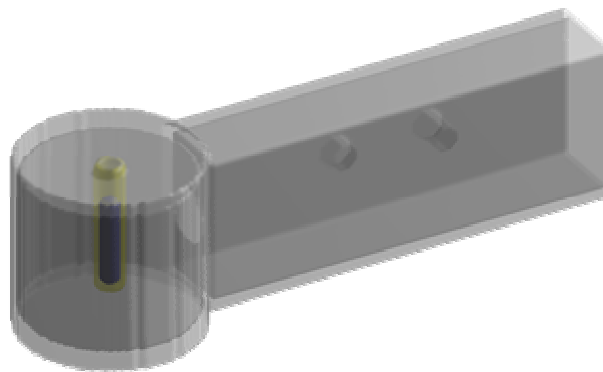


Figure 19 : Schéma en transparence de la structure simulée.

Les cartographies des champs électrique (E) et magnétique (H) au sein de la cavité à vide (Figure 20, A) montrent que le champ E est maximum au milieu et minimum sur les bords de celle-ci. Le champ H, quant à lui, a une répartition inverse : il est minimum au milieu et maximum sur les bords de la cavité. Comme notre échantillon biologique se situe au milieu de la cavité, il est donc placé à l'endroit où le champ E est maximum lorsque la cavité est vide.

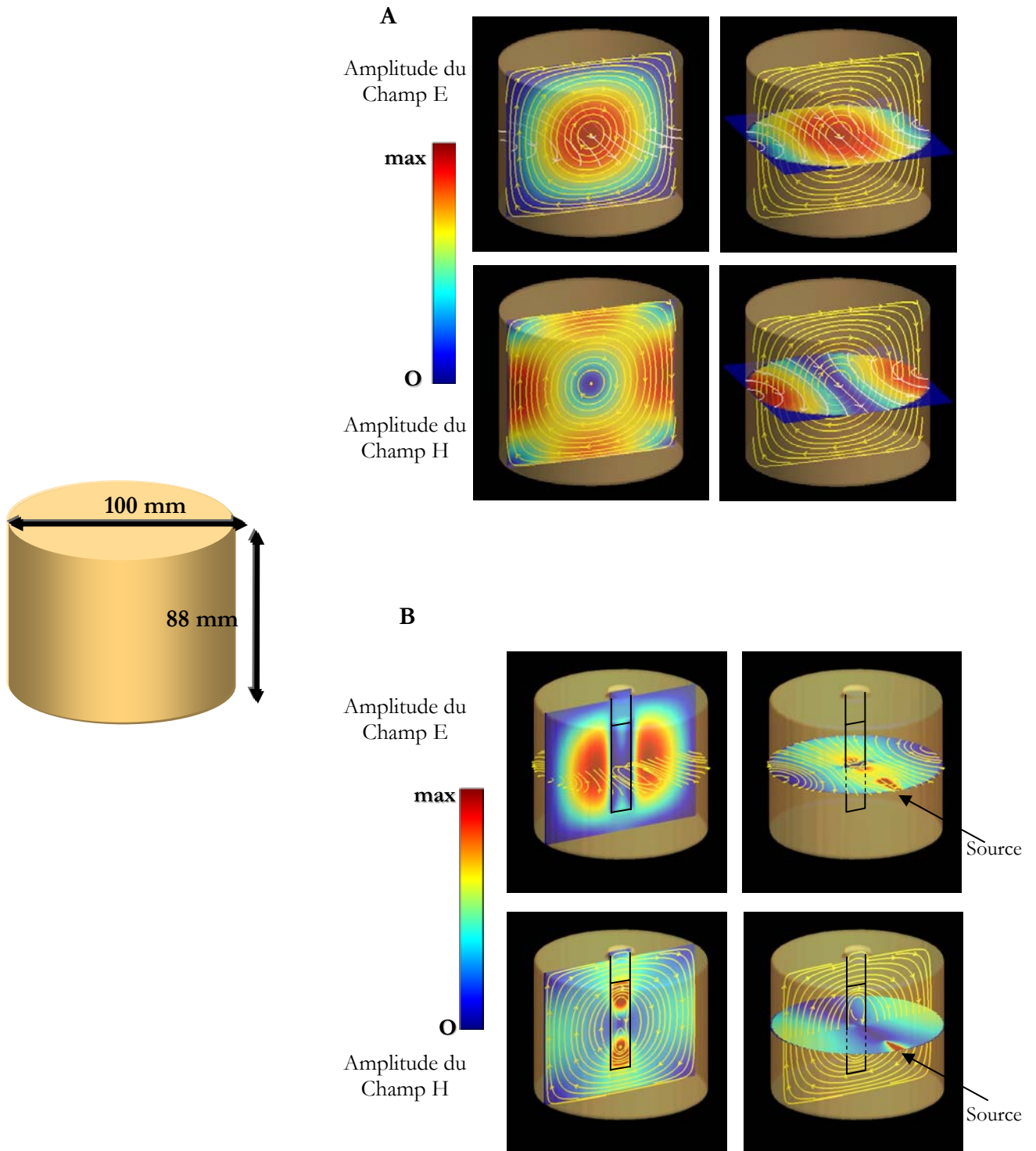


Figure 20 : Cartographies des champs électrique (E) et magnétique (H) au sein de la cavité cylindrique vide (A) et de la cavité contenant le tube (B). Les lignes de champs verticales correspondent au champ H, les lignes horizontales au champ E.

D'une manière générale, lorsque la cavité contient le tube et l'échantillon biologique (Figure 20, B), l'amplitude du champ H, comme celle du champ E, à l'extérieur du tube, restent quasi identiques à celles obtenues dans la cavité vide. Seules les amplitudes au sein de la suspension bactérienne changent. L'amplitude du champ E reste maximale au centre de la cavité mais elle est moins importante au sein du tube. Cette différence réside dans le fait que la suspension bactérienne a une permittivité très différente de celle du vide. Il est tout de même à noter que deux zones situées en haut et en bas du tube ont des amplitudes élevées par rapport au milieu du tube. Ces deux zones au sein de l'échantillon biologique sont à peu près identiques lorsque l'on regarde l'amplitude du champ H.

Le Tableau 6 présente les valeurs des champs E et H déterminées grâce à la cartographie avec le tube contenant la suspension bactérienne (Figure 20, B).

Tableau 6 : Valeurs des champs E et H au sein de la suspension (d'après Figure 20) pour 1 W incident.

	Valeur moyenne	Ecart type	Valeur max	Valeur min
E ($V.m^{-1}$)	364	323	373	2,3
H ($A.m^{-1}$)	6,5	4,2	18,4	0,3

Ces valeurs, calculées à partir des simulations numériques, révèlent une grande hétérogénéité des champs E et H au sein de la suspension exposée.

III.2. Simulation de la distribution du SAR

D'une manière générale, la répartition du SAR au sein de la suspension bactérienne n'est pas homogène (Figure 21). En effet, on peut distinguer trois zones : deux zones situées en haut et en bas de la suspension bactérienne présentant des valeurs de SAR très élevées et une zone correspondant au milieu de la suspension avec des valeurs de SAR beaucoup plus basses. D'après les coupes horizontales issues de différents niveaux dans la suspension, on peut voir que les valeurs les plus élevées de SAR se situent pratiquement au bord du tube et non au milieu de celui-ci pour les coupes 2, 3, 8 et 9.

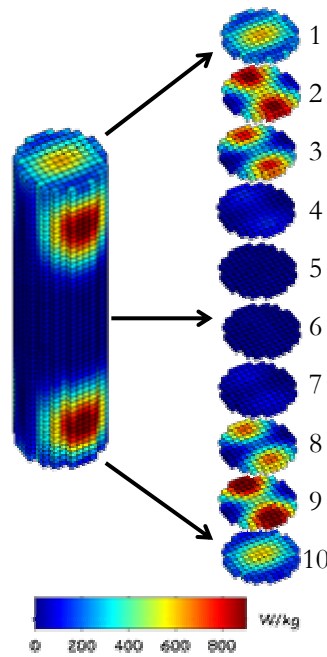


Figure 21 : Distribution du SAR dans la suspension bactérienne exposée à 2,45 GHz dans la cavité cylindrique pour 1 Watt incident.

Pour 1 W incident, le SAR moyen simulé au sein de la population entière est égal à 0,189 $W.g^{-1}$ (Tableau 7). Cette valeur est cohérente avec ce qu'on obtient par le calcul théorique du SAR. En effet, on sait que notre suspension bactérienne pèse environ 5 g (volume de 5 ml). Pour 1 W incident, le SAR est donc égal à 0,2 $W.g^{-1}$.

Remarque: Les valeurs de SAR sont exprimées en $W.g^{-1}$ pour donner des valeurs plus significatives par rapport à la masse de notre échantillon.

Cependant, les simulations montrent une très grande différence entre la valeur minimale et la valeur maximale du SAR (Tableau 7). L'hétérogénéité de la répartition du SAR au sein de la suspension exposée est donc importante.

Tableau 7 : Valeurs moyennes, maximales et minimales du SAR simulés.

	Moyenne	Ecart type	Maximum	Minimum
SAR ($W.g^{-1}$) pour 1 W incident	0,189	0,198	0,89	4.10^{-4}

La suspension bactérienne simulée est constituée de 5184 voxels ce qui correspond au volume de l'échantillon biologique exposé (5 mL). La répartition du nombre de voxels en fonction des valeurs de SAR simulées (Figure 22) met à nouveau en évidence l'hétérogénéité des valeurs de SAR au sein de la suspension. Même si une majorité des voxels présentent des valeurs de SAR relativement basses (jusqu'à $0,2 \text{ W.g}^{-1}$), une partie des voxels atteint des valeurs élevées, pouvant aller jusqu'à $0,9 \text{ W.g}^{-1}$ (Figure 22).

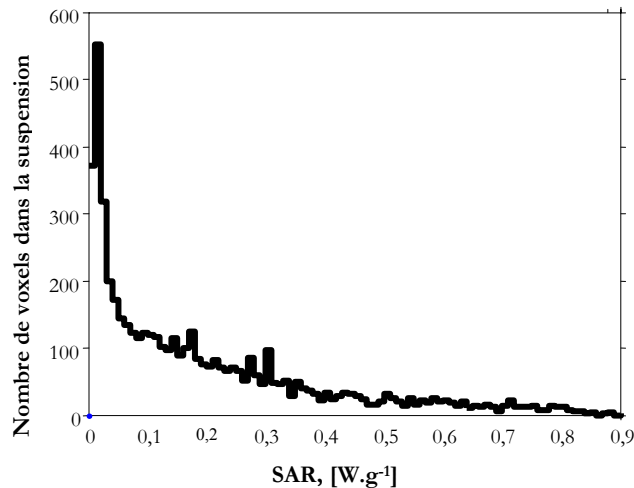


Figure 22 : Histogramme de la répartition du SAR en fonction du nombre de voxels dans la suspension entière.

IV. MESURES DE LA DISTRIBUTION DE TEMPERATURE

Les caractérisations thermiques réalisées sur des suspensions bactériennes soumises à une exposition micro-ondes, pendant la phase C, à 37 ou à 50°C avec le générateur SAIREM ont montré que la distribution de température est très hétérogène. A titre d'exemple, la Figure 23 montre la répartition de température obtenue après une exposition à 400 W.

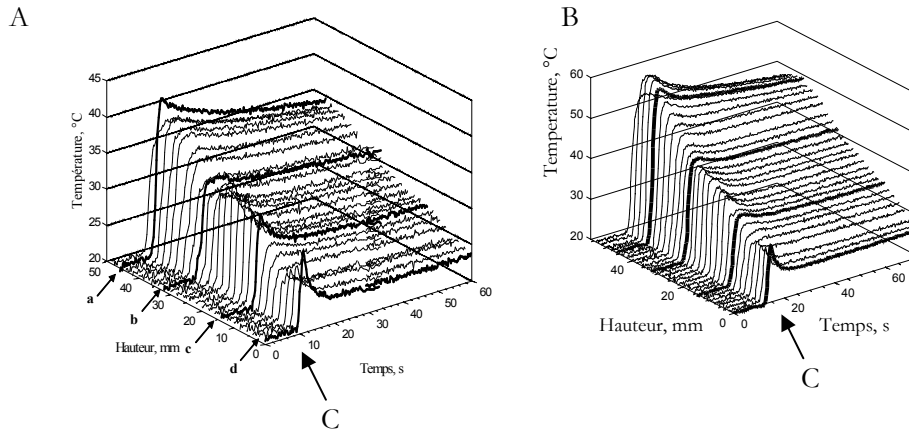


Figure 23 : Distribution de températures mesurées après exposition aux micro-ondes discontinues (phase C) à 400 W (générateur SAIREM) à 37°C (A) et à 50°C (B).

D'une manière générale, on remarque une différence de température entre le haut et le fond du tube. La température est moins importante au fond du tube qu'en haut de celui-ci. La vitesse de montée en température pendant la phase C est identique quel que soit le point de mesure. En revanche, la descente en température est plus rapide en haut qu'au fond du tube.

V. DISCUSSION

La caractérisation électromagnétique du système d'exposition nous a permis de déterminer le volume d'échantillon biologique ainsi que la taille de la cavité pour que le système soit le mieux adapté possible.

D'autre part, les résultats de dosimétrie révèlent que le SAR est réparti de façon hétérogène au sein de la suspension bactérienne exposée. Le SAR atteint des valeurs très élevées (jusqu'à $0,9 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$) mais ces valeurs sont probablement sur-estimées. En effet, les simulations numériques réalisées ne prennent pas en compte les phénomènes de convection et de conduction thermiques. Des simulations prenant en compte ces phénomènes devraient minimiser ces valeurs de SAR. Il est toutefois à noter que les zones de SAR élevés au sein de la suspension exposée correspondent aux zones où les champs E et H sont élevés.

La caractérisation thermique a permis de montrer une hétérogénéité de chauffage de la suspension bactérienne après la phase C. Les mesures n'ont cependant pas révélé de points au-delà de $45 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les expositions à 37°C et au-delà de $60 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les expositions à 50°C . Ces valeurs sont probablement sous-estimées à cause des limites de la sonde Luxtron. Les

caractérisations thermiques de chacun des cas testés seront détaillées dans les parties correspondantes (Chapitres C et D).

Ces résultats de caractérisation et de dosimétrie seront confrontés aux résultats biologiques obtenus dans les chapitres consacrés aux effets biologiques des micro-ondes.

Ce premier chapitre montre d'ores et déjà la difficulté d'étudier les effets non thermiques des micro-ondes et toute l'importance de la dosimétrie dans l'interprétation des résultats. En effet, nos protocoles d'exposition ont été déterminés de manière à obtenir une température globale de 37, 50 ou 60°C, selon les cas. Les premiers résultats de cartographie et de simulation numériques laissent présager une grande inhomogénéité de la température au sein de la suspension exposée. Cette hétérogénéité est retrouvée avec les mesures de températures mais de façon moins marquée. Les effets biologiques que nous détecterons devront donc être interprétés en fonction de ces données.

CHAPITRE B :

ETUDE PRELIMINAIRE :

Effets biologiques des micro-ondes -

Générateur SNEA (Puissance maximale 200 W)

Ce chapitre consiste en la présentation des effets biologiques obtenus avec le générateur SNEA pouvant délivrer une puissance moyenne maximale de 200 W. Il constitue la phase préliminaire de nos études. Ces premières expérimentations nous ont permis, à la fois de nous familiariser avec le système d'exposition, mais aussi de choisir les paramètres biologiques à étudier. Le choix des paramètres biologiques étudiés est lié aux cibles cellulaires d'interaction potentielle décrites dans la Partie 1, Chapitre C.

La première partie présente les résultats obtenus avec le protocole d'exposition permettant d'atteindre une température finale de 60°C. La seconde partie est consacrée aux résultats obtenus pour une température finale de 37°C.

I. LES EFFETS BIOLOGIQUES DES MICRO-ONDES A 60°C

Pour l'étude des effets biologiques des micro-ondes appliquées dans des conditions faiblement thermiques, les résultats sont comparés avec un contrôle réalisé en chauffage traditionnel en bain marie.

I.1. Les effets bactéricides

La mortalité cellulaire est le premier paramètre que nous avons testé puisque l'un des objectifs de cette étude est d'utiliser les micro-ondes comme technique de décontamination basse température. Nous avons comparé le taux de survie des bactéries soumises à un chauffage micro-ondes à 60°C à 25, 50 et 200 W moyens au taux de survie de bactéries soumises à un chauffage en bain marie à 60°C pendant les mêmes durées d'exposition.

Le taux de survie des bactéries exposées aux micro-ondes à la température finale de 60°C est de l'ordre de 2 à 3% quelle que soit la puissance appliquée et pour des temps d'exposition allant jusqu'à 20 minutes (Figure 24). Comparativement, lorsque la souche est soumise à un chauffage traditionnel de 60°C, le taux de survie est quasi identique (de l'ordre de 2%). Il semble donc qu'une exposition discontinue aux micro-ondes à 60°C n'ait pas une action létale plus marquée qu'un chauffage traditionnel.

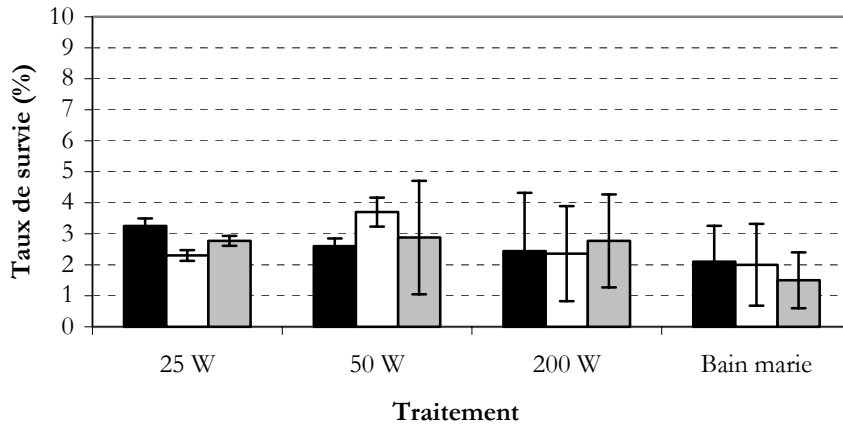


Figure 24 : Taux de survie d'*E. coli* après exposition pendant 10 (■), 15 (□) et 20 minutes (▒) à un chauffage micro-ondes à 60°C (25, 50 et 200 W moyens) ou à un chauffage traditionnel en bain marie à 60°C.

Néanmoins, lors de l'évaluation de la survie des suspensions d'*E. coli* exposées à ces différents traitements, nous avons observé que la taille des colonies dénombrées sur milieux solides après 24 h d'incubation était plus petite pour les suspensions soumises aux deux puissances micro-ondes les plus élevées, en particulier à 50 W et surtout à 200 W, que pour des suspensions soumises à de faibles puissances (25 W) ou à un chauffage traditionnel. Il semblerait donc que plus la puissance micro-ondes est importante, plus l'aptitude des bactéries viables à se revivifier est longue. En effet, après 36 h d'incubation, ces « petites » colonies ont une taille identique à celle observée après 24 h d'incubation pour les bactéries soumises au chauffage traditionnel ou à de faibles puissances. Nous avons donc mis en oeuvre des études sur la croissance bactérienne à partir des suspensions soumises aux différents traitements.

I.2. Les effets sur la croissance cellulaire

Un suivi de la croissance cellulaire de suspensions bactériennes exposées pendant 5 et 10 minutes à 60°C au chauffage traditionnel et aux micro-ondes (50 et 200 W) a été réalisé puisque c'est à ces deux puissances que nous avons observé les « petites » colonies. L'allure de la courbe de croissance des suspensions bactériennes soumises à un chauffage micro-ondes à 25 W est identique à celle obtenue pour des suspensions traitées en chauffage traditionnel.

Pour les suspensions soumises à 50 ou à 200 W, les allures des courbes de croissance sont quasi identiques pour les deux temps d'exposition (5 et 10 minutes). Nous ne présenterons donc que le suivi de la croissance des bactéries exposées pendant 5 min en bain marie ou en micro-ondes (Figure 25).

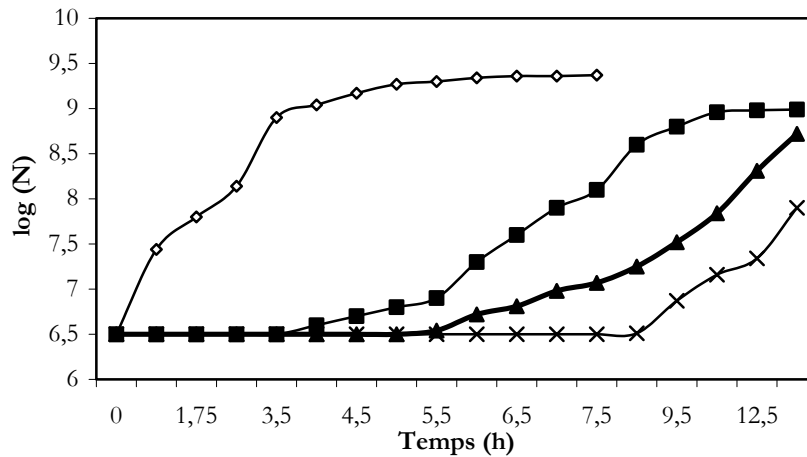


Figure 25 : Courbes de croissance pour une suspension d'*E. coli* non traitée (Témoin) (\diamond), pour des suspensions bactériennes soumises pendant 5 minutes à un chauffage micro-ondes à 60°C à 50 W (\blacktriangle) ou à 200 W (\times) ou à un chauffage traditionnel à 60°C (\blacksquare). N : nombre de bactéries par mL.

D'une manière générale, on remarque que l'aptitude à la revivification est modifiée lorsque les bactéries sont soumises à un chauffage micro-ondes ou à un chauffage traditionnel à 60°C par rapport à des bactéries témoin. Ce résultat est normal compte tenu de la température d'exposition (60°C) et cohérent avec les taux de survie déterminés sur milieux solides (Figure 24). On observe cependant une différence entre les courbes de croissance des bactéries soumises aux différents traitements. En effet, les bactéries exposées aux micro-ondes entrent en phase exponentielle de croissance plus tardivement que les cellules soumises au bain marie. De manière à mieux comparer l'influence des deux modes de chauffage, nous avons calculé la durée des phases de latence et le temps de doublement de chacune de ces populations (Tableau 8).

Tableau 8 : Durée des phases de latence et temps de doublement des différentes suspensions bactériennes soumises à un chauffage traditionnel en bain marie à 60°C ou à un chauffage micro-ondes 50 ou 200 W à 60°C (d'après la Figure 25).

	Durée phase de latence	Temps de doublement
Traditionnel	4h +/- 30 min	30 min +/- 5 min
Micro-ondes 50 W	5h30 +/- 45 min	45 min +/- 10 min
Micro-ondes 200 W	8h +/- 30 min	45 min +/- 15 min

La durée de la phase de latence est plus longue pour les suspensions soumises aux micro-ondes à 60°C que pour les suspensions traitées en bain marie à la même température. Cette durée est allongée d'environ 1 h 30 à 4 h (Tableau 8). Ces résultats sont en accord avec l'observation de la taille des colonies sur milieu solide. D'autre part, plus la puissance micro-onde est élevée, plus l'allongement de la durée de la phase de latence est important : de 5 h 30 +/- 45 min pour 50 W moyens à 8 h +/- 30 min pour 200 W moyens.

Le temps de doublement, quant à lui, est plus important pour les bactéries soumises aux micro-ondes que pour celles soumises au chauffage traditionnel (Tableau 8). Néanmoins, on ne note pas de différence lorsque la puissance augmente. Le fait que le temps de doublement soit allongé dans le cas des expositions micro-ondes est certainement dû à l'induction de dommages plus importants par les micro-ondes que par le chauffage traditionnel.

Les micro-ondes ont donc un effet sur la croissance bactérienne en prolongeant la phase de latence et le temps de doublement des bactéries par rapport à un chauffage traditionnel. Cet effet semble être puissance - dépendant.

Remarque : Les micro-ondes (50 et 200 W) appliquées à la température finale de 60°C ont un effet plus marqué sur l'allongement de la durée de la phase de latence des bactéries qu'un chauffage traditionnel à 70°C.

I.3. Les effets sur l'intégrité et le potentiel membranaires

Comme nous l'avons déjà mentionné, les expériences réalisées à une température finale de 60°C constituent une étude préliminaire. Dans un premier temps, nous nous sommes basés sur les données concernant le mode d'action des champs électriques pulsés basses fréquences (Qin et

coll., 1996). Nous avons donc choisi d'évaluer le mode d'action des champs micro-ondes appliquées dans des conditions faiblement thermiques sur deux paramètres de façon simultanée : l'intégrité membranaire grâce à l'iodure de propidium (IP) et le potentiel membranaire par marquage au 3,3'-dihexyloxycarbocyanine (DiOC₆(3)).

Ces tests cytométriques ont été réalisés sur des suspensions bactériennes soumises à un chauffage traditionnel et à un chauffage micro-onde discontinu à différentes puissances. Les suspensions bactériennes ont été traitées à 60°C pendant 15 minutes en chauffages traditionnel et micro-onde, conditions expérimentales nécessaires pour qu'il reste une fraction de bactéries revivifiables (de l'ordre de 0,5 à 2% selon le traitement). A titre d'exemple, la Figure 26 présente les cytogrammes obtenus pour une suspension bactérienne témoin et pour des suspensions bactériennes soumises pendant 15 min à un chauffage traditionnel ou à un chauffage micro-ondes pendant la même durée.

Les résultats obtenus avec les souches soumises à un chauffage traditionnel (Figure 26, B) montrent une diminution du paramètre FSC par rapport au témoin, ce qui traduit une diminution de la taille cellulaire ou une déstructuration progressive des cellules. De plus, les cytogrammes reflétant le double marquage DiOC₆(3)/IP révèlent trois populations distinctes R4, R5 et R6, après traitement. La population R6, majoritaire, présente un niveau de fluorescence faible révélant une chute du potentiel membranaire après chauffage traditionnel. Ces cellules sont probablement en voie de mortalité. Au contraire, la population R5 présente une augmentation d'incorporation en DiOC₆(3) sans perte de l'intégrité membranaire. Le potentiel membranaire de cette population est donc accru par rapport au témoin. Cependant, cette augmentation s'accompagnerait par la suite d'une perte de l'intégrité membranaire (population R4). On peut donc penser que ces cellules ont été endommagées mais que dans un premier temps, elles mettent en place des systèmes pour tenter de réparer les dommages induits, expliquant ainsi l'accroissement d'incorporation du DiOC₆(3).

Contrairement aux effets obtenus en chauffage traditionnel, le nombre de cellules de la population R6, dont le potentiel membranaire chute, est négligeable lorsque les bactéries sont soumises à un champ micro-onde discontinu (Figure 26, C). En revanche, on remarque systématiquement que le potentiel membranaire de la population R5 augmente et il semble que l'intégrité membranaire soit altérée lorsque le potentiel atteint de telles valeurs (population R4).

Ces résultats montrent que le chauffage traditionnel et le chauffage micro-onde discontinu n'induisent pas le même effet sur l'intégrité et le potentiel membranaires des bactéries.

Les micro-ondes auraient un effet plus important que le bain marie, tout au moins au niveau du potentiel membranaire. Cependant, le DiOC₆(3) peut diffuser dans les cellules si leur membrane est endommagée, ce qui est le cas pour les deux traitements. Les résultats concernant le potentiel membranaire sont donc à prendre avec des réserves puisque les cellules incorporent peut être le DiOC₆(3) par diffusion passive et ne subissent donc pas une augmentation du potentiel membranaire.

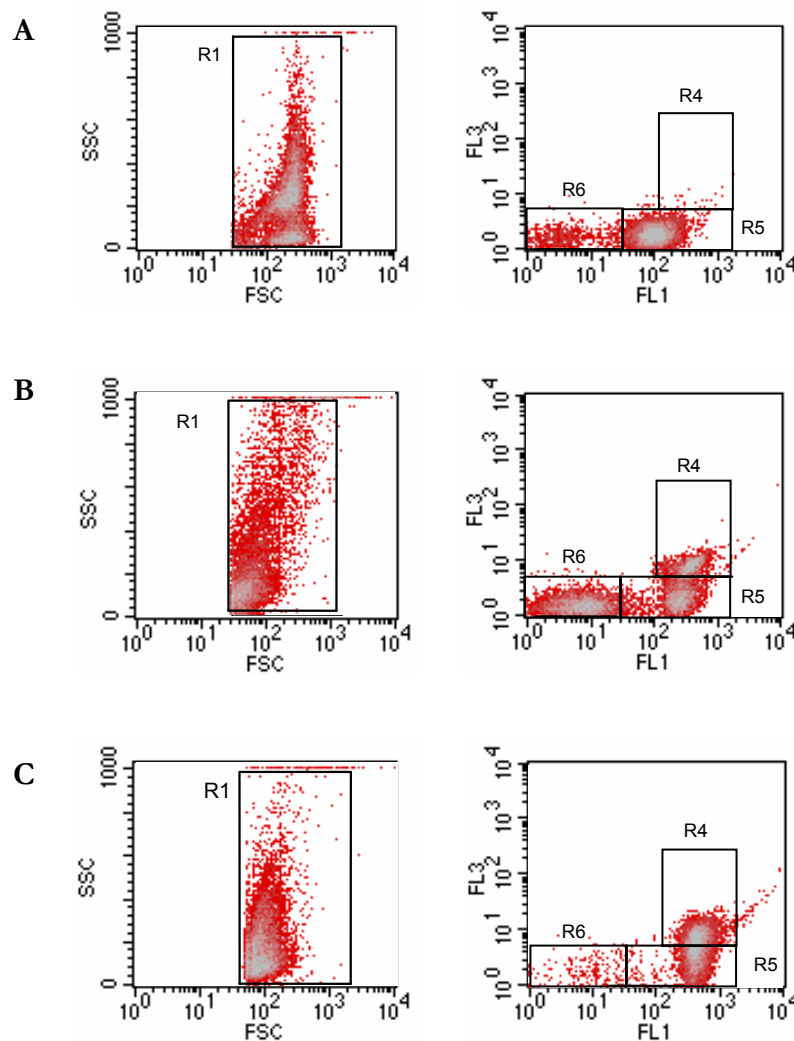


Figure 26 : Exemples de cytogrammes obtenus après marquage au DiOC₆(3) et à l'IP avec A : suspension témoin, B : bactéries soumises à chauffage traditionnel 60°C, 15 min et C : bactéries soumises à 200 W 60°C, 15 minutes (avec FL1 : intensité de fluorescence verte et FL3 : intensité de fluorescence rouge).

I.4. Discussion des résultats

Cette étude préliminaire réalisée dans des conditions d'exposition permettant de maintenir la température proche de 60°C a montré que les micro-ondes, appliquées dans de telles conditions, ont un effet bactéricide peu marqué sur *E. coli* par rapport à un chauffage traditionnel. Cependant, cette étude a révélé que la croissance des bactéries est modifiée de façon plus importante lorsqu'elles sont exposées aux micro-ondes que lors d'un chauffage traditionnel. La durée de la phase de latence ainsi que le temps de doublement des bactéries sont allongés. De plus, cet effet semble être puissance - dépendant.

Concernant les paramètres analysés en cytométrie en flux, nous avons pu mettre en évidence que l'intégrité membranaire des cellules était modifiée de façon différente selon le type de chauffage. Les premiers résultats semblent montrer que le potentiel membranaire serait lui aussi modifié de façon différente. Cependant, les mesures d'augmentation du potentiel membranaire peuvent être dues à un phénomène de diffusion passive du DiOC₆(3) dans les cellules perméabilisées. Pour les études ci-après, les études du potentiel par le DiOC₆(3) n'ont donc pas été poursuivies puisqu'il est difficile d'interpréter les phénomènes liés à l'augmentation de l'incorporation de la DiOC₆(3) (diffusion passive ou incorporation spécifique).

II. LES EFFETS BIOLOGIQUES DES MICRO-ONDES A 37°C

II.1. Les effets bactéricides

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si les micro-ondes appliquées de façon discontinue à 37°C induisaient une mortalité cellulaire. Comme cette température correspond à l'optimum de température pour le développement d'*E. coli*, un effet bactéricide des micro-ondes dans ces conditions serait dû à un phénomène non thermique.

Nous n'avons détecté aucun effet mesurable en terme de mortalité cellulaire (taux de survie d'environ 99%) induit par les micro-ondes appliquées dans ces conditions. Le suivi de la croissance cellulaire a montré que les micro-ondes n'induisaient ni d'allongement de la durée de la phase de latence, ni d'augmentation du temps de doublement des bactéries. Les allures des

courbes de croissance bactérienne restent identiques à celles obtenues pour des bactéries soumises à un chauffage traditionnel ou des bactéries témoin. De manière à avoir plus d'informations sur les mécanismes d'action des micro-ondes appliquées dans des conditions de température correspondant à l'optimum métabolique des bactéries, nous avons entrepris d'étudier les interactions entre ces ondes et la membrane cellulaire. En effet, comme nous l'avons mentionné dans l'exposé bibliographique, la membrane est une des cibles privilégiée des champs micro-ondes (Phelan et coll., 1994). De plus, les résultats obtenus pour des expositions à 60°C ayant révélé un phénomène particulier au niveau membranaire, il nous a semblé intéressant d'étudier ce paramètre cellulaire.

II.2. Les effets sur la membrane bactérienne

Le suivi de l'intégrité membranaire a été réalisé sur des suspensions bactériennes ajustées à une concentration initiale de 10^6 bactéries.mL⁻¹ exposées à un chauffage traditionnel ou à un chauffage micro-ondes pendant différents temps d'exposition variant de 5 à 15 min.

L'intégrité membranaire des cellules soumises au bain marie à 37°C n'est pas modifiée quel que soit le temps d'exposition. En effet, seules environ 0,5% des cellules ont incorporé l'IP (Figure 27).

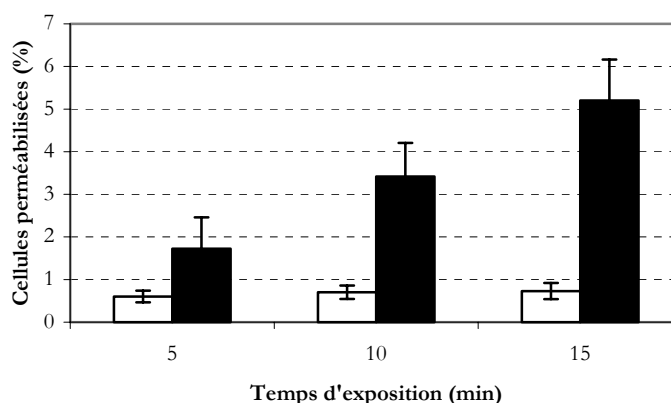


Figure 27 : Intégrité membranaire de suspensions bactériennes soumises aux micro-ondes discontinues appliquées à 37°C (■) ou à un chauffage bain marie à 37°C (□).

Les micro-ondes, quant à elles, induisent une modification de l'intégrité membranaire des bactéries dès 5 minutes d'exposition. De plus, les pourcentages de cellules ayant incorporé l'IP ou le pourcentage de cellules perméabilisées augmentent avec la durée de l'exposition, d'environ 1,8% pour 5 min à environ 5% pour une exposition de 15 min (Figure 27). Ces pourcentages, bien que relativement faibles, sont statistiquement significatifs ($p = 0,001$) par rapport aux résultats obtenus en bain marie. Les micro-ondes ont donc un effet sur la membrane des bactéries. Comme la suspension bactérienne est agitée entre les différentes phases d'exposition du protocole, nous avons regardé si l'agitation était responsable des pourcentages de cellules perméabilisées obtenus après les expositions aux micro-ondes. Cette étude a révélé que pour un protocole sans agitation de la suspension, les pourcentages de cellules ayant incorporé l'IP sont les mêmes que ceux présentés dans la Figure 27. Les 5% de cellules perméabilisées au maximum sont donc bien induits par les micro-ondes.

L'IP est une molécule qui émet de la fluorescence seulement lorsqu'elle s'est intercalée dans l'ADN de la cellule. Ainsi, il faut que la membrane des cellules soit perméabilisée pour qu'il puisse pénétrer. De manière à voir si les pores formés par les micro-ondes induisaient une fuite des constituants cellulaires, nous avons ensuite entrepris d'étudier la fuite des protéines dans le milieu extracellulaire.

Nous avons donc dosé les protéines libérées dans le milieu extracellulaire après les différents traitements (bain marie ou micro-ondes en discontinu). Nous n'avons détecté aucune différence sur la quantité de protéines libérées dans le milieu extracellulaire entre des cellules soumises au bain marie et des cellules soumises aux micro-ondes à 37°C (environ 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Le fait que nous ne détectons pas de différence entre des suspensions bactériennes soumises à un chauffage traditionnel et des suspensions soumises à un chauffage micro-ondes à 37°C peut être attribué au faible pourcentage de cellules perméabilisées obtenu (5% au maximum). Même si ces cellules perméabilisées relarguent des protéines dans le milieu extracellulaire, les concentrations sont probablement trop faibles pour être détectées de façon statistiquement significative.

II.3. Estimation des cellules viables et cultivables

Le degré d'altération des membranes cellulaires peut être différent. En effet, certaines cellules peuvent être en voie de mortalité car les dommages au niveau de la membrane sont trop importants pour être réparés, alors que d'autres peuvent réparer ces dommages. De manière à

savoir si les cellules perméabilisées par le traitement micro-ondes à 37°C étaient viables, nous avons décidé de trier la population cellulaire qui avaient incorporé l'IP, de la collecter et de la remettre en culture sur milieu solide de manière à estimer le nombre de cellules capables de se revivifier.

15 +/- 5 % des cellules ayant incorporé l'IP sont capables de se revivifier après l'exposition aux micro-ondes. Les micro-ondes n'induiraient donc pas systématiquement une mort des cellules dont la membrane est altérée. Cette modification serait réparable pour certaines d'entre elles. Il est tout de même à noter que ce nombre de cellules revivifiables est certainement sous-estimé car l'IP incorporé dans les cellules peut induire une toxicité et donc la mort de la cellule. De plus, le tri effectué par le cytomètre peut induire un stress aux cellules. On peut donc conclure que le pourcentage de cellules dont la membrane est modifiée et apte à se revivifier est probablement supérieur à 15 +/- 5 %.

II.4. Autres paramètres testés

Le contenu en ATP intracellulaire des bactéries a été mesuré après une exposition aux micro-ondes discontinues à 37°C. Les micro-ondes n'induisent ni d'augmentation ni de diminution du contenu des cellules en ATP par rapport à un chauffage traditionnel (Figure 28).

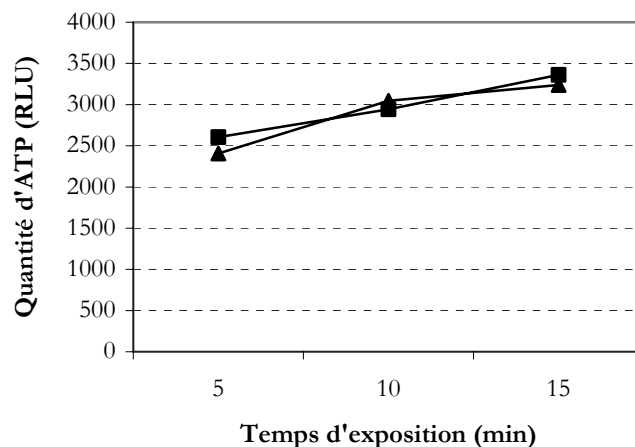


Figure 28 : Contenu en ATP intracellulaire de cellules soumises à un chauffage traditionnel à 37°C pendant 5 minutes (▲) et de cellules soumises à un chauffage micro-ondes discontinu à 37°C (■).

Il n'y a pas de différence mesurable entre les cellules soumises aux micro-ondes et celles soumises au bain marie. On peut toutefois noter que le contenu en ATP intracellulaire augmente légèrement avec le temps. Cette augmentation n'est cependant pas significative.

De manière à voir si les micro-ondes induisaient un effet génotoxique, le test de génotoxicité SOS chromotest a été réalisé. Ce test a révélé que les micro-ondes n'avaient pas ou peu d'effet génotoxique sur les bactéries (Tableau 9) puisque le ratio obtenu est inférieur à 1,2.

On note une légère augmentation du ratio pour les cellules soumises aux micro-ondes mais cet effet n'est pas significatif ($p = 0,2786$). De plus, les écarts types sont relativement élevés.

Tableau 9 : Moyenne et écart type des ratios obtenus par SOS chromotest.

	Ratio	SD
Témoin	0,889125	0,106213
Micro-ondes 37°C	0,9824437	0,484042

II.5. Discussion des résultats

L'étude des interactions entre les micro-ondes appliquées de façon discontinue à 37°C et à la puissance moyenne de 200 W a révélé que les champs micro-ondes n'ont pas d'effet bactéricide sur la bactérie *E. coli*. Ces résultats sont en accord avec la littérature car certains auteurs ont montré que l'effet bactéricide des micro-ondes ne peut avoir lieu qu'à partir d'environ 40°C (Sato et coll., 1996). La phase de croissance n'est pas non plus modifiée par rapport à un chauffage traditionnel. En revanche, nous avons montré qu'une petite partie des bactéries (environ 5% au maximum) soumises à un tel traitement subissent des modifications de perméabilité membranaire et que, parmi ces cellules, une partie est capable de se revivifier. Les micro-ondes induiraient donc des modifications de la membrane cellulaire qui ne seraient pas létales pour celles-ci. L'effet en terme de perméabilité membranaire serait donc réversible. Certains auteurs ont montré que les micro-ondes à basses températures induisaient la formation

de pores sur des liposomes (Orlando et coll., 1994). Nos résultats ne permettent pas de montrer que nos conditions d'exposition induisent la formation de pores dans la membrane de la bactérie *E. coli*, en revanche, nos résultats montrent une modification de la fluidité membranaire induite par les micro-ondes. Nous n'avons cependant pas mis en évidence de fuite de protéines dans le milieu extracellulaire, soit en raison du faible pourcentage de cellules perméabilisées, soit en raison de la capacité des cellules à restaurer leurs dommages membranaires rapidement. D'autre part, nous n'avons pas détecté de modification du contenu en ATP, ni d'effet génotoxique des micro-ondes.

Même si nos conditions d'exposition ont été déterminées pour que la température finale soit globalement égale à 37°C, il se peut que des « points chauds » apparaissent au sein de la suspension bactérienne exposée. Grâce aux simulations de la distribution du SAR (Chapitre A), nous avons déterminé que le SAR moyen était de 0,189 W.g⁻¹ pour 1 W incident. Pour une puissance de 200 W moyenne, il vaut donc 37,8 W.g⁻¹. Comme la puissance moyenne vaut 200 W, que notre exposition dure le 1/10^{ème} du temps (impulsion d'1 ms toutes les 10 ms) et que les impulsions ne sont pas carrées mais plutôt de forme sinusoïdale, la puissance crête vaut environ 1 kW. Dans ce cas, le SAR atteint une valeur de 189 W.g⁻¹ ce qui est très élevé. En considérant seulement le phénomène de chauffage, on peut donc conclure que des points chauds peuvent apparaître au sein de la suspension exposée aux micro-ondes discontinues. Les effets observés sur la membrane cellulaire pour 5% des cellules peuvent être dus à ce phénomène thermique.

La première partie de l'étude a donc montré que les micro-ondes appliquées de façon discontinue à 60°C, dans ce cas avec un signal modulé, n'induisent pas d'effet bactéricide plus important qu'un chauffage traditionnel à 60°C. La mise au point d'un système de pasteurisation avec ces expositions micro-ondes ne peut donc pas être envisagée en tant que telle pour améliorer les performances des systèmes traditionnels. Comme des modifications de la membrane sont induites par les micro-ondes, il pourrait être intéressant d'envisager des couplages de technologies. Les résultats obtenus à la température finale de 37°C semblent montrer que les micro-ondes entraînent une modification de la membrane des bactéries *E. coli*. Sans les résultats de dosimétrie, on aurait pu penser que ces effets étaient induits par un effet non thermique des micro-ondes. La dosimétrie révèle cependant que ces effets sont probablement dus à un phénomène thermique localisé, induit par l'exposition micro-ondes.

CHAPITRE C :

EFFETS DES MICRO-ONDES A 37°C -

GENERATEUR SAIREM (Puissance de 200 à

2000 W)

Avec les résultats obtenus lors de l'étude préliminaire, nous avons décidé d'étudier les effets des micro-ondes appliquées de façon discontinue à la température de 37°C à des puissances supérieures. En effet, avec le premier générateur, les effets semblaient être puissance-dépendants. De plus, le générateur SNEA émettant les micro-ondes de façon impulsionnelle, il nous est apparu intéressant de tester un autre mode d'exposition. Ce chapitre présente et discute les résultats obtenus avec le générateur SAIREM permettant de délivrer des puissances crêtes de 200 à 2000 W.

I. LES EFFETS SUR LA MORTALITE ET LA CROISSANCE CELLULAIRES

Comme dans le cas de l'étude préliminaire, nous avons regardé si les micro-ondes appliquées de façon discontinue à 37°C avec ce générateur avaient un effet bactéricide sur *E. coli*. Nous n'avons pas détecté d'effets mesurables en terme de mortalité cellulaire quelle que soit la puissance appliquée de 200 à 2000 W (taux de survie de l'ordre de 99%). La croissance cellulaire des populations bactériennes soumises à de tels champs n'est pas non plus modifiée : nous n'avons pas mesuré d'allongement de la durée de la phase de latence ni du temps de doublement des bactéries.

II. LES EFFETS SUR LA MEMBRANE CELLULAIRE

L'intégrité membranaire a été étudiée sur des suspensions bactériennes ayant subi différents traitements : chauffage en bain marie à 37°C, chauffage par micro-ondes à 37°C à 200, 400, 800, 1400 et 2000 W et, pendant la phase C uniquement ou pendant des successions de phases C puis R et E (Tableau 5, Chapitre A) de 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes. Le temps de montée en température, de 20 à 37°C, pour les cellules traitées en bain marie a été déterminé par mesure avec la sonde Luxtron comme étant égal à 75 s.

Lorsqu'on compare les cytogrammes obtenus pour des cellules témoin (sham), des cellules chauffées en bain marie à 37°C et des cellules exposées aux micro-ondes discontinues à 37°C, on remarque l'apparition de deux populations marquées à l'IP pour les cellules exposées

aux micro-ondes (Figure 29). La majeure partie des cellules reste non marquée donc intègre (population R3), une partie des cellules est fortement marquée à l'IP (population R1) et une autre petite partie est marquée de façon moins importante que R1 mais supérieure à R3 (population R2). On peut donc en conclure qu'après une exposition micro-ondes deux populations apparaissent : une dont l'intégrité membranaire est fortement modifiée (R1) et une dont l'intégrité membranaire est peu modifiée (R2).

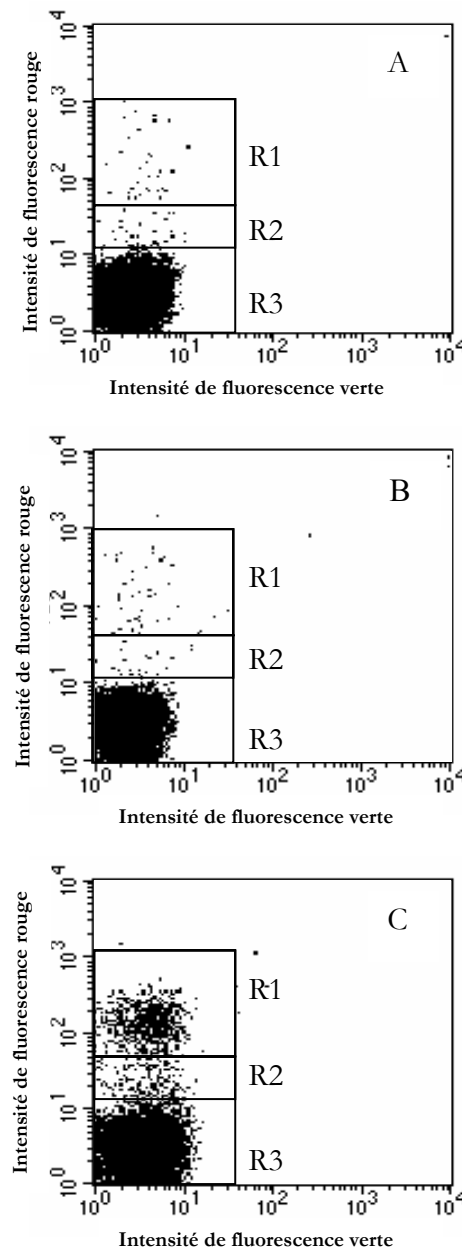


Figure 29 : Exemples de cytogrammes obtenus pour des suspensions bactériennes témoin (A), soumise à un chauffage traditionnel en bain marie à 37°C pendant 5 min (B) et soumise à un champ micro-onde discontinu (400 W) à 37°C pendant 5 min (C).

Nous avons choisi de limiter la représentation des résultats sur l'intégrité membranaire aux pourcentages de cellules fortement marquées à l'IP (population R1) car la proportion de cellules de la population R2 reste identique (de l'ordre de 1 à 2%) quelle que soit la puissance appliquée (de 400 à 2000 W) et la durée de l'exposition.

Les micro-ondes appliquées de façon discontinue à la température de 37°C induisent une modification de l'intégrité membranaire des bactéries pour des puissances allant de 400 à 2000 W (Figure 30). Les résultats montrent qu'un faible pourcentage de cellules perméabilisées (environ 8 %) est obtenu lorsque les bactéries sont soumises à 400 ou à 800 W, et que ce pourcentage diminue légèrement (environ 4 - 5%) lorsque l'on applique des puissances supérieures (1400 ou 2000 W). De plus, il est à noter que le nombre de cellules perméabilisées est équivalent (environ 0,2%) entre une exposition en bain marie et à 200 W quel que soit le temps d'exposition. On peut considérer que l'exposition à 200 W correspond à un témoin négatif de l'effet des micro-ondes sur l'intégrité membranaire. Il est à noter qu'un pourcentage de l'ordre de 0,5 à 1% de cellules perméabilisées est obtenu pour des suspensions témoin ou sham.

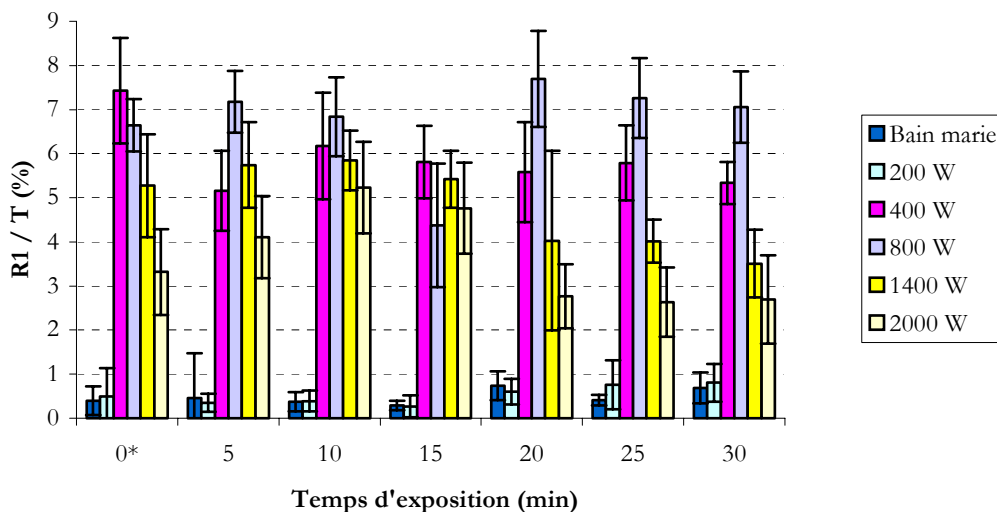


Figure 30 : Effet des micro-ondes sur l'intégrité membranaire des bactéries *E. coli*. R1/T avec R1 : nombre de cellules fortement marquées à l'IP et T : population totale analysée. 0* correspond à l'exposition au temps de montée en température ou phase de chauffage uniquement.

La durée du traitement, quant à elle, n'influence pas le nombre de cellules perméabilisées. En effet, il semble que l'on atteigne un certain effet dès l'exposition à la phase de chauffage et qu'un traitement prolongé n'induit pas d'effets supplémentaires (Figure 30).

Nous avons déterminé la température en bain marie qui pourrait induire le même pourcentage de cellules perméabilisées. Nous avons déterminé qu'un traitement de 10 minutes à 47°C ou de 5 min à 48°C en chauffage traditionnel permet d'obtenir 8% de cellules perméabilisées (Figure 31).

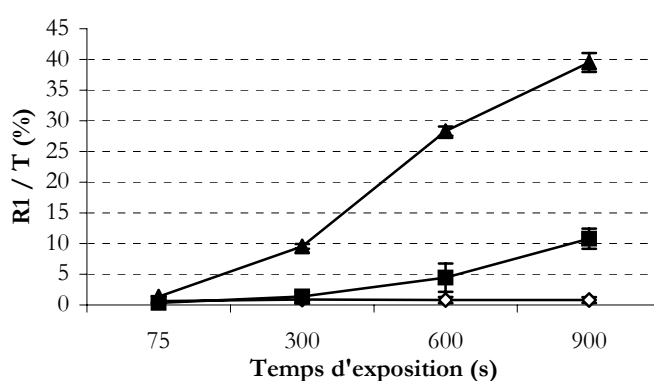


Figure 31 : Effet de la température sur l'intégrité membranaire des bactéries *E. coli* : ◇ moyenne des valeurs de R1/T obtenues pour des traitements à 37, 40, 42, 45 et 46°C (valeurs quasi identiques), ■ traitement à 47°C et ▲ traitement à 48 °C.

Ces premiers résultats indiquent que les micro-ondes à 37°C ont un effet sur la membrane des bactéries et que cet effet serait non thermique puisque le traitement est effectué à une température globale de 37°C. En effet, il faudrait un chauffage traditionnel plus important pour obtenir le même pourcentage de cellules perméabilisées.

La Figure 30 révèle que la phase de chauffage (C) est responsable de la majeure partie des effets sur l'intégrité membranaire des cellules soumises aux micro-ondes. Pour vérifier l'importance de ce temps de montée en température sur l'effet des micro-ondes appliquées de façon discontinue à 37°C, nous avons réalisé plusieurs scénarii d'exposition (Tableau 10). Nous avons comparé le nombre de cellules perméabilisées obtenu après une exposition discontinue classique aux micro-ondes à 37°C (Protocole 1), après une exposition classique au bain marie à 37°C (Protocole 2), après une exposition avec un temps de montée en température en micro-

ondes puis le reste de l'exposition en bain marie (Protocole 3) et après une exposition avec un temps de montée en température en bain marie puis le reste de l'exposition en micro-ondes (Protocole 4).

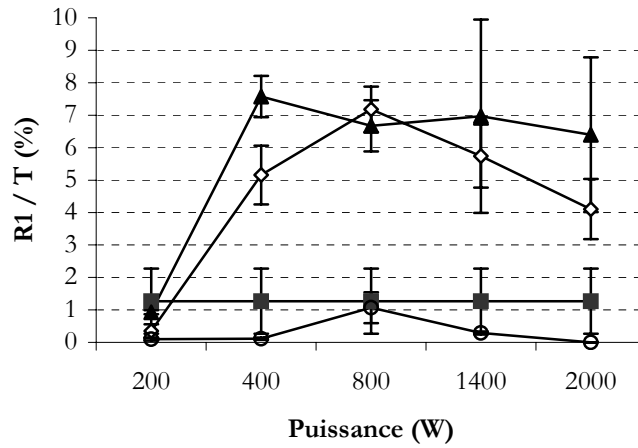
Tableau 10 : Description des quatre protocoles d'exposition pour déterminer l'importance du temps de montée en température micro-ondes.

	Phase C	Phase M
Protocole 1	Micro-ondes	Micro-ondes
Protocole 2	Bain - marie	Bain - marie
Protocole 3	Micro-ondes	Bain - marie
Protocole 4	Bain - marie	Micro-ondes

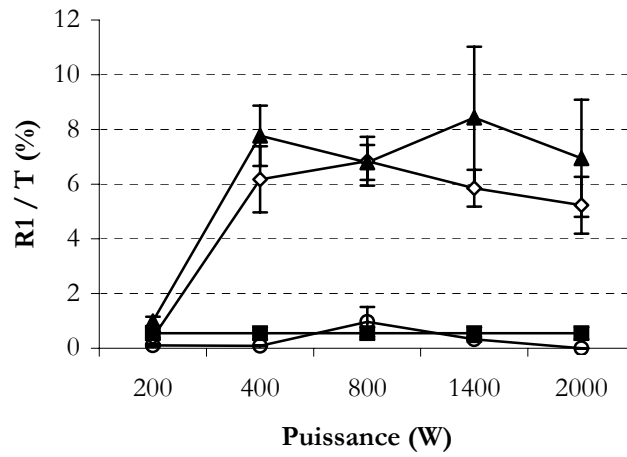
Lorsque les cellules sont traitées avec le protocole 4, on ne retrouve pas les 8% de cellules perméabilisées (Figure 32), que ce soit pour une exposition totale de 5, 10 ou 15 minutes. Or, lorsque les cellules sont exposées avec le protocole 3 à 200, 400, 800, 1400 ou 2000 W, on retrouve ou on augmente le pourcentage de cellules perméabilisées obtenu en exposition micro-ondes classique (Figure 32).

D'une manière générale, on peut donc supposer que le temps de montée en température micro-ondes ou la phase de chauffage est responsable des effets observés sur l'intégrité membranaire. Ces effets peuvent, peut-être, être attribués à la vitesse à laquelle on atteint la température finale de 37°C. En effet, cette phase de chauffage micro-ondes est beaucoup plus courte (de 2,3 s pour 200 W à 0,23 s pour 2000 W) par rapport à celle en bain marie (75 s). La variation rapide de température que subit la suspension bactérienne exposée aux micro-ondes pendant la phase C peut être une hypothèse pour expliquer les effets induits sur la membrane cellulaire. A cause de cette rapidité, il se peut qu'il y ait une répartition non homogène de la température au sein de la suspension bactérienne exposée, entraînant la formation de « points chauds ». Ces « points chauds » pourraient être responsables du faible pourcentage de cellules perméabilisées observé (comme le laisse également supposer l'étude préliminaire).

A



B



C

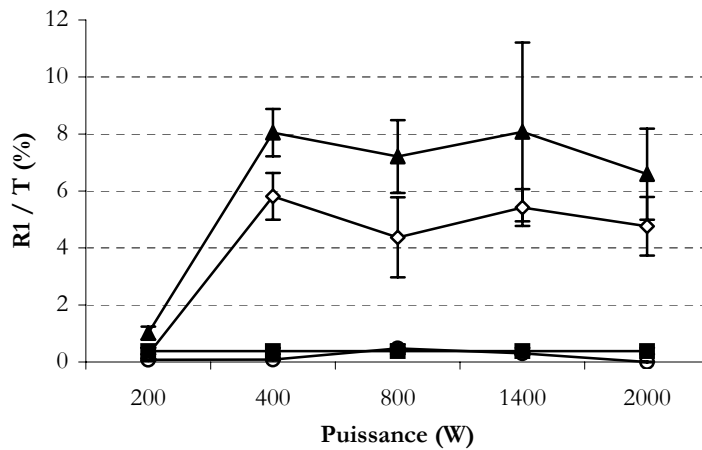


Figure 32 : Effet du temps de montée en température sur l'intégrité membranaire des bactéries *E. coli* avec les protocoles 1 (◇), 2 (■), 3 (▲) ou 4 (○). A : 5 minutes d'exposition, B : 10 minutes d'exposition, C : 15 minutes d'exposition.

Comme dans le cas de l'étude préliminaire, la fuite de protéines dans le milieu extracellulaire a été étudiée avec des cellules soumises à ce générateur de manière à voir si la modification d'intégrité membranaire était liée à une fuite de constituants dans le milieu cellulaire.

Les cellules ont subi différents traitements : chauffage bain marie 37°C, chauffage micro-ondes 37°C à 200, 400, 800, 1400 et 2000 W pendant le temps de montée en température uniquement, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutes.

Les résultats obtenus n'ont pas permis de détecter une fuite de protéines dans le milieu extracellulaire (environ 0,4 - 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La raison est certainement la même que celle évoquée pour les effets biologiques des micro-ondes à 37°C avec le premier générateur. Même si dans ce cas, les pourcentages de cellules perméabilisées sont légèrement supérieurs à ceux obtenus avec le générateur SNEA, il semble qu'ils ne soient pas suffisants pour induire une fuite de protéines dans le milieu ou que les concentrations sont probablement trop faibles pour être détectées. L'hypothèse d'une modification membranaire réversible peut aussi être avancée à ce stade.

Comme pour l'étude préliminaire, nous avons entrepris d'étudier la viabilité des cellules ayant incorporé l'IP après un traitement en bain marie ou en micro-ondes après une exposition pendant la phase de chauffage. Nous avons donc trié, grâce au cytomètre de flux, les populations de cellules marquées à l'IP après une exposition ou non aux micro-ondes discontinues et nous avons évalué le pourcentage de cellules capables de se revivifier (Figure 33). Comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus, deux populations marquées à l'IP apparaissent lorsque l'on expose des cellules bactériennes aux micro-ondes de façon discontinue à 37°C (Figure 26). Nous avons donc collecté ces deux populations : la population R1 correspondant à des cellules ayant fortement incorporé l'IP et la population R2, correspondant à des cellules ayant incorporé l'IP de façon plus faible.

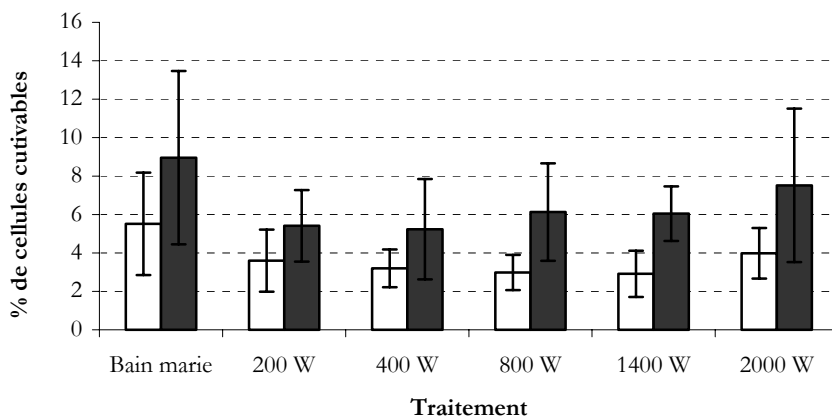


Figure 33 : Aptitude à la revivification de cellules soumises à un chauffage bain marie ou micro-ondes après tri des populations R1 (□) et R2 (■).

D'une façon générale, on peut voir qu'il y a moins de cellules qui se revivifient dans la population R1 que dans la population R2 (Figure 33), ce qui est normal puisque les cellules de la population R1 ont subi des dommages membranaires plus importants que celles de la population R2. Environ 3 à 4% des cellules fortement marquées à l'IP sont capables de se revivifier quelle que soit la puissance appliquée. 6 à 8% des cellules marquées de façon plus faible à l'IP (population R2) sont revivifiables.

On peut aussi noter que le pourcentage de cellules revivifiables est inférieur, quelle que soit la puissance micro-onde appliquée, lorsqu'elles sont exposées à un chauffage micro-ondes que lorsqu'elles sont soumises à un chauffage traditionnel. Il semble donc que, comme dans le cas de l'étude préliminaire, les micro-ondes appliquées de façon discontinue à 37°C induisent une perméabilisation des cellules mais que cet effet soit réversible puisque certaines cellules se revivifient. Ces résultats, comme nous l'avons déjà remarqué précédemment, sont toutefois certainement surestimés à cause de la toxicité de l'IP.

III. EFFET DE LA COMBINAISON NISINE MICRO-ONDES

Comme les analyses concernant l'effet des micro-ondes appliquées de façon discontinue à 37°C ont révélé un effet des micro-ondes sur l'intégrité membranaire d'*E. coli*, nous avons

combiné le traitement micro-ondes avec la nisine. De telles combinaisons de traitements ont déjà été publiées avec par exemple les champs électriques pulsés (CEP) ou les hautes pressions (Calderón - Miranda et coll., 1999 ; Ponce et coll., 1998).

L'association de la nisine avec l'exposition aux micro-ondes peut également nous donner des informations concernant le mécanisme d'action des micro-ondes discontinues sur la membrane bactérienne puisque, pour être efficace sur des bactéries Gram -, la nisine doit pouvoir traverser la membrane, la membrane doit donc être préalablement perméabilisée. L'objectif plus appliqué de cette thèse étant la mise au point d'un système de décontamination basses températures, l'association des deux traitements, si elle donnait des résultats probants en terme d'effet bactéricide, pourrait être d'un grand intérêt.

Nous avons testé différentes concentrations en nisine : 50, 250 et 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ seule ou en combinaison avec les micro-ondes à 200, 400, 800, 1400 et 2000 W. D'autre part, nous avons évalué le nombre de cellules aptes à se revivifier juste après addition de la nisine ($t=0$) et après 2 h de contact ($t=2$). Les résultats étant sensiblement identiques pour $t=0$ et $t=2$ h, nous présentons uniquement les résultats obtenus à $t=0$ (Figure 34).

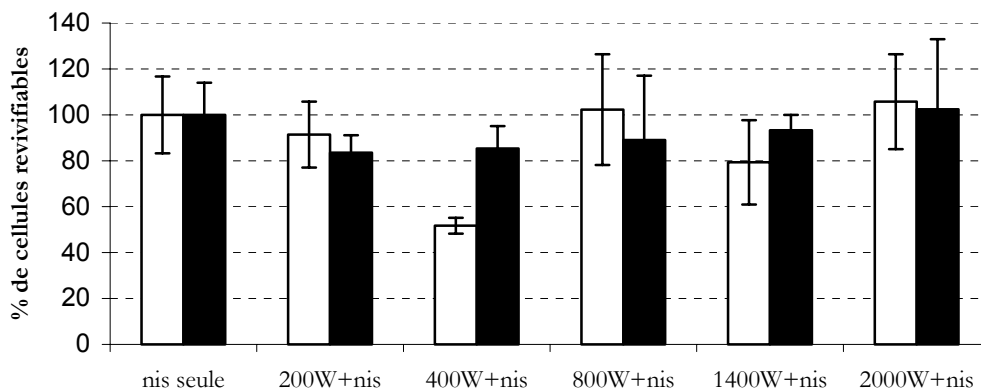


Figure 34 : Aptitude des cellules à se revivifier après un traitement avec de la nisine seule ou après un traitement combiné nisine à 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (□) ou à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (■) et micro-ondes discontinues.

De manière globale, on observe que la combinaison des traitements induit un léger effet bactéricide (Figure 34). Un abattement d'environ 50% est observé pour la combinaison nisine à 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et micro-ondes à 400 W. Pour les autres puissances testées, l'abattement est peu significatif. De plus, une concentration plus importante n'induit pas un effet plus marqué. En effet, que la concentration soit égale à 250 ou à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, les effets sont quasi identiques.

Comme nous l'avons déjà mentionné, les micro-ondes appliquées de façon discontinue à 37°C n'induisent pas de mortalité cellulaire. Le fait que la combinaison avec la nisine entraîne, pour une puissance de 400 W en particulier, un abattement plus important, laisse supposer que les micro-ondes ont un effet réversible sur la membrane bactérienne.

IV. EFFET SUR LA TRANSCRIPTION DE CERTAINS GENES

De manière à vérifier de façon biologique, la présence de points chauds dans la suspension et à avoir plus de renseignements sur les mécanismes d'action des micro-ondes, nous avons décidé d'étudier les niveaux de transcription de différents gènes par la technique de RT PCR semi-quantitative. Nous avons choisi d'étudier ce paramètre sur une suspension d'*E. coli* K12 soumise aux micro-ondes discontinues à 37°C à la puissance de 800 W (condition ayant le plus d'effet). Avant de réaliser ces expériences, nous avons vérifié que cette souche bactérienne réagissait de la même manière que la souche indigène d'*E. coli* en terme de modifications de l'intégrité membranaire. Nous avons observé les mêmes pourcentages de cellules perméabilisées.

Les gènes d'*E. coli* que nous avons choisi d'étudier sont :

- deux gènes de HSP : *mop A*, codant pour la protéine Gro EL (Hsp 60) et *dna K*, codant pour DNA K (Hsp 70),
- deux gènes impliqués dans la réponse SOS : *rec A* et *lex A*,
- deux gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif : *sod A*, gène codant une superoxyde dismutase et *kat G*, codant une catalase.

Des suspensions bactériennes soumises au bain marie à 37°C pendant la phase de chauffage uniquement ont été utilisées comme témoin. Les ratios d'expression des différents gènes pour cette condition valent donc par convention 1. Un gène est surexprimé quand ce ratio est supérieur à 2 et sous-exprimé quand il est inférieur à 0,5.

Les ratios d'expression obtenus montrent que les gènes *dna K*, *mop A*, *rec A* et *lex A* sont fortement exprimés dans les suspensions soumises aux micro-ondes appliquées de façon discontinue à 37°C (Figure 35). Les gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif ont un niveau d'expression proche de celui des suspensions soumises au chauffage en bain marie, soit 1. Leur niveau d'expression n'est donc pas modifié par rapport à notre témoin.

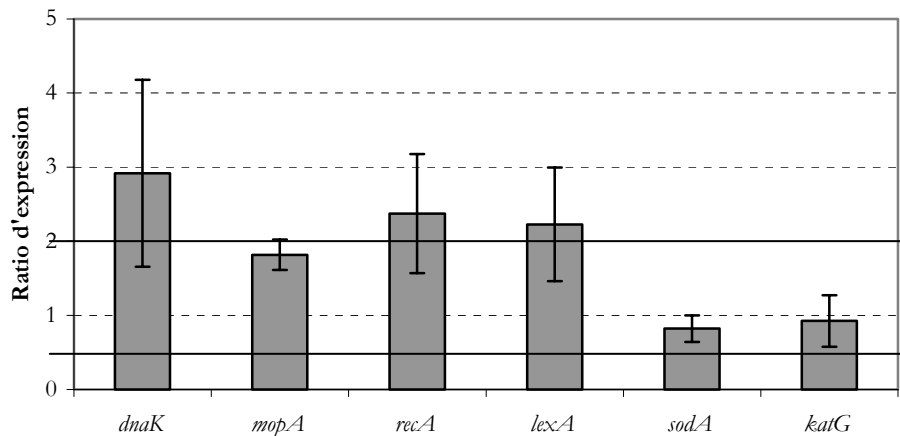


Figure 35 : Ratios d'expression des gènes *dna k*, *mop A*, *rec A*, *lex A*, *sod A* et *kat G* pour une souche d'*Escherichia coli* K12 soumise à une exposition micro-ondes 800 W à 37 °C pendant la phase de chauffage.

Les micro-ondes appliquées dans des conditions de température finale de 37°C induisent donc une augmentation de la transcription des gènes *mop A* et *dna K* codant pour deux protéines du choc thermique, respectivement Gro EL et Dna K. Ces résultats montrent donc que la réponse au choc thermique est induite par les micro-ondes discontinues. D'autre part, les micro-ondes seraient perçues comme un stress par la cellule puisque les deux gènes impliqués dans la réponse SOS sont eux aussi fortement exprimés. Cependant, la réponse SOS est activée lorsque l'ADN est altéré. Ces résultats sont donc *a priori* surprenants puisqu'ils indiqueraient que les micro-ondes induiraient des dommages à l'ADN. On peut toutefois supposer que l'existence de « points chauds » localisés au sein de la suspension exposée serait à même d'induire des dommages à l'ADN et donc d'induire la réponse SOS.

V. CARACTERISATION THERMIQUE

De façon à déterminer si les effets mesurés sur l'intégrité membranaire et si l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au choc thermique et dans la réponse SOS sont liés ou non à des effets thermiques des micro-ondes, nous avons réalisé une caractérisation spatio-temporelle de la température au sein de la suspension bactérienne suite à des expositions pendant la phase de chauffage (C) et ce, aux différentes puissances étudiées. Ces mesures, tous les millimètres dans le volume de la suspension bactérienne, ont été réalisées sous irradiation grâce à une sonde Luxtron. La répartition de la température au sein de la suspension bactérienne pendant l'irradiation reste la même que l'exposition soit réalisée à 200, 400, 800, 1400 ou 2000 W. D'une manière générale, la répartition de la température n'est pas homogène au sein de la suspension bactérienne exposée (Figure 36). Le haut du tube est beaucoup plus « chaud » que le bas. Cependant, la température descend beaucoup plus rapidement en bas du tube qu'en haut de celui-ci. Ce phénomène est probablement dû à la convection. On remarque que la montée en température est très rapide quel que soit l'endroit où se trouve la sonde dans la suspension. Les mesures n'ont néanmoins pas permis de détecter des points ayant une température supérieure à $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

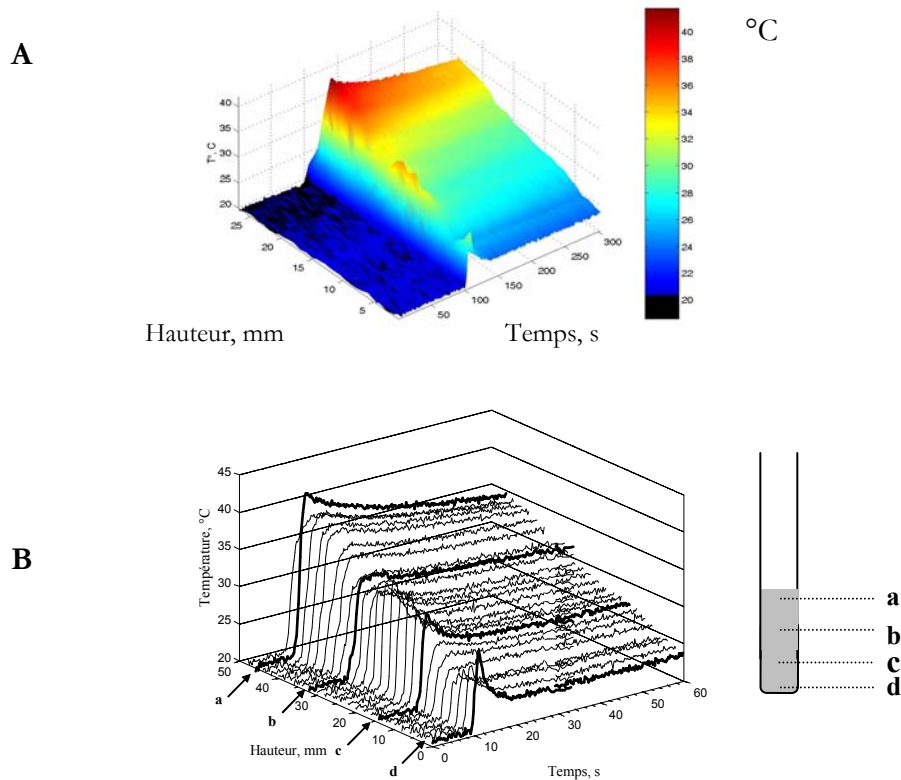


Figure 36 : Distributions spatio-temporelles de la température après une exposition à la phase de chauffage à 400W (1,15 s). A : Représentation surfacique, B : Représentation en lignes.

Compte tenu des distributions spatio-temporelles obtenues, il semble impossible d'attribuer les effets des micro-ondes à un phénomène thermique. Les effets obtenus en terme de perte d'intégrité membranaire seraient donc certainement liés à la montée rapide en température induite par le chauffage micro-ondes. Si on ne considère que l'effet thermique, les températures mesurées au sein de la suspension n'atteignent pas 47°C. Or, comme nous l'avons vu précédemment, un chauffage global en bain marie de la suspension à 47°C pendant 10 minutes ou à 48°C pendant 5 minutes permet d'obtenir 8% de cellules perméabilisées. Même si la caractérisation thermique montre que les températures sont hétérogènes et qu'une partie de la suspension bactérienne exposée voit des températures supérieures à 37°C, ces résultats ne permettent pas d'attribuer les effets obtenus en terme d'intégrité membranaire à un effet thermique des micro-ondes. En revanche, les températures les plus élevées peuvent à elles seules expliquer l'augmentation de l'expression des gènes de HSP.

VI. DISCUSSION DES RESULTATS

Avec le mode d'exposition utilisé dans ce cas, nous avons pu mettre en évidence que les micro-ondes induisaient une modification de l'intégrité membranaire pour une petite partie des cellules exposées (8% au maximum). Ces bactéries perméabilisées ne sont pas toutes en voie de mortalité car une partie d'entre elles est capable de se revivifier. Nous avons observé que l'effet sur l'intégrité membranaire était légèrement plus important à 400 et à 800 W qu'à 1400 et 2000 W. Cependant, les différences de pourcentages obtenues (7 - 8% pour 400 et 800 W et 5 - 6% pour 1400 et 2000 W) ne sont pas statistiquement significatives. L'effet ne semble donc pas puissance - dépendant.

Nous avons pu mettre en évidence l'importance de la phase de chauffage dans les effets observés. La caractérisation thermique lors de l'exposition pendant cette phase n'a pas révélé de points pouvant atteindre des températures nécessaires à l'obtention du même pourcentage de cellules perméabilisées. Ces premiers résultats semblent donc montrer que les micro-ondes ont un effet non thermique sur la membrane cellulaire de la bactérie *E. coli*. L'étude de la transcription de gènes induits lors de la réponse au choc thermique a permis de voir que ce mécanisme était mis en jeu lors de l'exposition aux micro-ondes. Cependant comme la suspension atteint

localement des températures de 45 +/- 1°C, ces conditions sont suffisantes pour induire cette réponse cellulaire.

La combinaison des micro-ondes pendant la phase C à 37°C avec la nisine a montré de faibles abattements cellulaires. L'efficacité de la combinaison des traitements est donc meilleure que les micro-ondes seules mais l'effet bactéricide engendré n'est pas suffisant pour en faire un système de décontamination utilisable dans l'industrie. Ces effets peu importants du couplage nisine – micro-ondes sont liés aux faibles pourcentages de cellules perméabilisées obtenus après une exposition micro-onde.

Les valeurs de SAR obtenues par simulation pour de telles expositions indiquent que globalement la température de l'échantillon est proche de 37°C (Tableau 11). En effet, d'après la formule $SAR = C_p \partial T / \partial t$, la variation de température est égale à environ 20°C et la température initiale est d'environ 20°C.

Tableau 11 : Valeurs de SAR pour chacune des expositions testées d'après les simulations numériques (SAR peak = SAR moyen dans la totalité de la suspension x puissance).

Puissance (W)		200	400	800	1400	2000
	SAR peak (W.g ⁻¹)	38	76	152	304	380
H	Temps d'exposition (s)	2,30	1,15	0,575	0,287	0,230
	SAR moyen (W.g ⁻¹)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
M	Temps d'exposition pour E (s)	0,230	0,115	0,0575	0,0287	0,023

En revanche, si on calcule le SAR peak avec les valeurs maximales de SAR obtenues pour la totalité de la suspension, cette élévation de température peut atteindre des valeurs supérieures à 90°C. Ces résultats montrent donc que des points dont les températures sont très supérieures à 45 +/- 1°C peuvent apparaître dans la suspension exposée. Les effets que nous observons (perméabilité, induction de gènes impliqués dans la réponse au choc thermique et dans la réponse

SOS) sont donc probablement dus à un effet thermique des micro-ondes si on se réfère à ces valeurs de SAR simulées.

Ces résultats confirment encore une fois toute l'importance de la dosimétrie pour l'étude des interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques. En effet, le fait que la caractérisation thermique ne révèle pas de points au delà de $45 \pm 1^\circ\text{C}$, est probablement dû aux limites de la sonde (Nott et Hall, 1999). En effet, même si cette sonde est un des systèmes de mesures de température des plus performants, elle présente des limites en terme de rapidité du temps de réponse et de précision. Ces mesures sont donc probablement sous-estimées. Néanmoins, les températures maximales trouvées à l'aide des simulations numériques sont probablement surestimées car elles ne prennent pas en compte les phénomènes de conduction et de convection. Il est donc nécessaire de réaliser à la fois les mesures expérimentales de température mais aussi des simulations numériques pour essayer d'appréhender au mieux les interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques. En effet, si on se réfère uniquement aux mesures de températures avec la sonde Luxtron, on pourrait affirmer que les effets obtenus en terme de perméabilisation membranaire (8% de cellules perméabilisées au maximum) sont dus à un effet non thermique des micro-ondes. En revanche, si on ne tient compte que des résultats de dosimétrie, la Figure 37 montre qu'une grande majorité des voxels a des valeurs de températures relativement basses (autour de 40°C). Cependant, ces résultats ont permis de déduire qu'environ 30% des voxels atteignent des valeurs supérieures à 47°C .

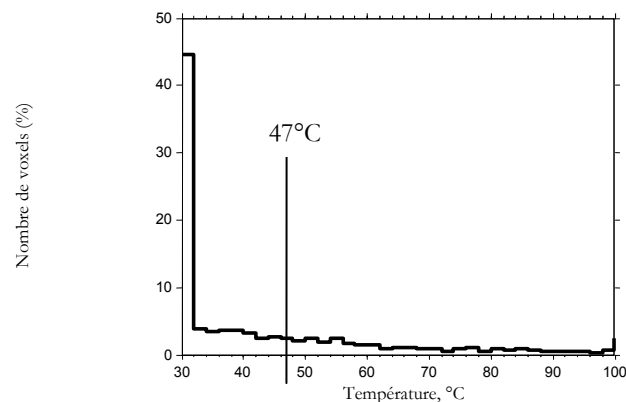


Figure 37 : Pourcentages de voxels en fonction de la température lors d'une exposition aux micro-ondes discontinues 37°C pendant la phase C.

Si on compare les résultats obtenus avec ce mode d'exposition et ceux obtenus avec celui mis au point pour l'étude préliminaire, on remarque que, concernant le nombre de cellules perméabilisées, les effets observés sont du même ordre de grandeur. On peut toutefois noter que dans le cas présenté ci-dessus, deux populations différemment marquées à l'IP sont apparues ce qui n'avait pas été observé dans l'étude préliminaire. Le mode d'exposition a donc une influence sur les effets obtenus.

Concernant les mécanismes mis en jeu lors de l'interaction des micro-ondes avec la membrane cellulaire, une des hypothèses qui est émise concerne le chauffage sélectif des micro-ondes (Khalil et Villota, 1988). Des constituants cellulaires tels que les lipides ou les protéines seraient soumis à un chauffage intense des micro-ondes. Dans notre cas, cette hypothèse peut être avancée puisque compte tenu des faibles effets obtenus en terme d'intégrité membranaire, il se peut que les lipides de la membrane aient été déstabilisés par la température élevée induite par les micro-ondes. Cette déstabilisation, suffisante pour laisser pénétrer l'IP, serait ensuite en partie restaurée et expliquerait la capacité des cellules endommagées à se revivifier.

Une autre hypothèse serait que le milieu environnant resterait à des températures relativement basses alors que les micro-organismes seraient soumis à des températures beaucoup plus élevées (Palanappian, 1996). Dans notre cas, ces deux hypothèses pourraient expliquer nos résultats puisqu'on ne mesure pas de températures capables d'induire des effets sur la membrane alors que les valeurs de SAR tendent à montrer que la suspension serait soumise localement à des températures aptes à générer ces effets.

CHAPITRE D :

EFFETS DES MICRO-ONDES A 50 °C –

GENERATEUR SAIREM (Puissance de 200 a

2000 W)

Ce chapitre présente et discute les résultats obtenus avec le générateur SAIREM dans des conditions où la température finale d'exposition est proche de 50°C.

I. EFFETS SUR LA MORTALITE ET LA CROISSANCE CELLULAIRES

Les études ayant porté sur l'effet des micro-ondes appliquées de façon discontinue à 50°C en terme de mortalité ont donné des résultats peu reproductibles. Ces résultats montrent que les micro-ondes appliquées à de telles températures induisent un léger effet en terme de mortalité (en moyenne 90% de cellules revivifiables). Les différentes puissances micro-ondes n'induisent pas d'allongement de la phase de latence de la croissance des suspensions cellulaires exposées aux micro-ondes par rapport à un chauffage traditionnel à 50°C.

II. EFFETS SUR LA MEMBRANE CELLULAIRE

L'intégrité membranaire a été étudiée pour des suspensions cellulaires ayant subi différents traitements : chauffage en bain marie à 50°C, chauffage par micro-ondes à 50°C à 200, 400 et 800 W et, pendant la phase C uniquement ou pendant des successions de phases C puis R et E (Tableau 5, Chapitre A) de 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes. Le temps de montée en température, de 20 à 50°C, pour les cellules traitées en bain marie a été déterminé par mesure avec la sonde Luxtron comme étant égal à 75 s. On peut noter que ce temps est identique à celui obtenu pour passer de 20 à 37°C.

Les résultats obtenus (Figure 38) sont représentés par le rapport $N = (R1 + R2) / T$ (nombre de cellules ayant incorporé l'IP / population totale analysée).

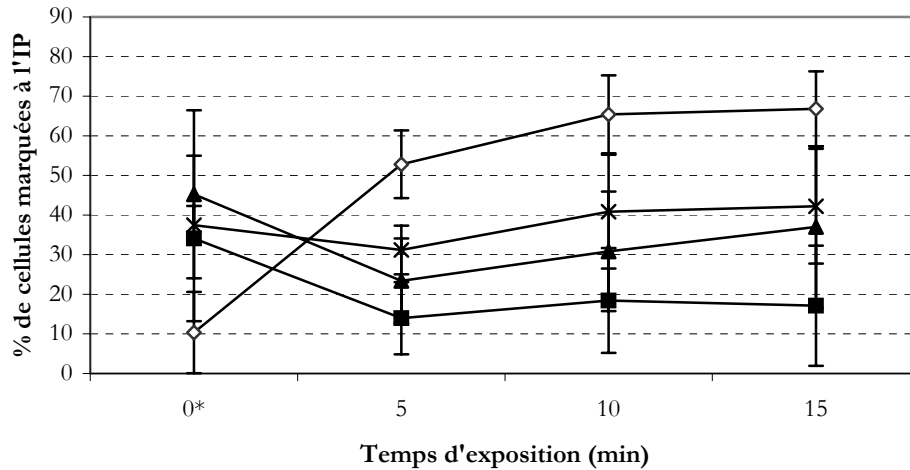


Figure 38 : Effet d'un chauffage bain marie à 50 °C (◇), d'un chauffage micro-ondes à 50°C à 200 (■), à 400 (▲) et à 800 W (x) sur l'intégrité membranaire des bactéries *E. coli*. 0* correspond à l'exposition à la phase de chauffage uniquement.

Mis à part les effets obtenus juste après le temps de montée en température, les résultats montrent que le pourcentage de cellules perméabilisées augmente en fonction du temps d'exposition et de la puissance appliquée. Les effets les plus importants sont obtenus lorsque les bactéries sont soumises à 800 W pendant 15 minutes. Les effets sur l'intégrité membranaire sont donc puissance - dépendants entre 200 et 800 W. De plus, il est à noter que le nombre de cellules perméabilisées est plus important pour une exposition au bain marie que pour une exposition aux micro-ondes dès 5 minutes de traitement. Si on s'intéresse aux pourcentages de cellules perméabilisées obtenus après la phase de chauffage, on peut voir que l'exposition à 400 W entraîne le plus fort taux de perméabilisation. Cependant, ce pourcentage est, dans toutes les conditions de puissances testées, supérieur aux pourcentages obtenus après 5 minutes d'irradiation. Les dommages cellulaires étaient donc probablement réversibles. Il se peut aussi que les cellules aient été fortement altérées et que donc elles aient « explosées ». Dans ce cas, elles seraient sous forme de débris cellulaires et donc ne seraient pas comptabilisées par le cytomètre.

Comme dans le cas des expositions réalisées à 37°C, deux populations différemment marquées à l'IP apparaissent lorsque les suspensions cellulaires sont soumises aux micro-ondes. La proportion de cellules moyennement marquées à l'IP (population R2) est dans ce cas très importante (Tableau 12).

Tableau 12 : Pourcentages de cellules moyennement marquées à l'IP (Population R2) par rapport à la totalité des cellules marquées à l'IP.

	0*	5 min	10 min	15 min
Bain marie	83,9 +/- 9,7	75,6 +/- 50,6	63,9 +/- 6,4	60,1 +/- 8,8
200 W	47,6 +/- 13,5	49,7 +/- 17,4	48,4 +/- 12,4	49,8 +/- 8,8
400 W	32,1 +/- 8,1	33,4 +/- 6,2	31,3 +/- 5,4	26,8 +/- 8,4
800 W	27,6 +/- 4,6	41,6 +/- 19,1	34,4 +/- 8,0	33,5 +/- 6,7

La proportion de cellules de la population R2 est beaucoup plus importante dans le cas d'une exposition en bain marie (de 60 à 80%) que dans le cas des différentes expositions micro-ondes (au maximum 50%). Ceci explique pourquoi les pourcentages de cellules perméabilisées sont plus importants pour un chauffage en bain marie à 50°C que pour des expositions micro-ondes, dès 5 minutes d'exposition (Figure 38). Si on ne s'intéresse qu'à la proportion de cellules fortement marquées à l'IP (population R1), on remarque que ce n'est plus le cas (Figure 39).

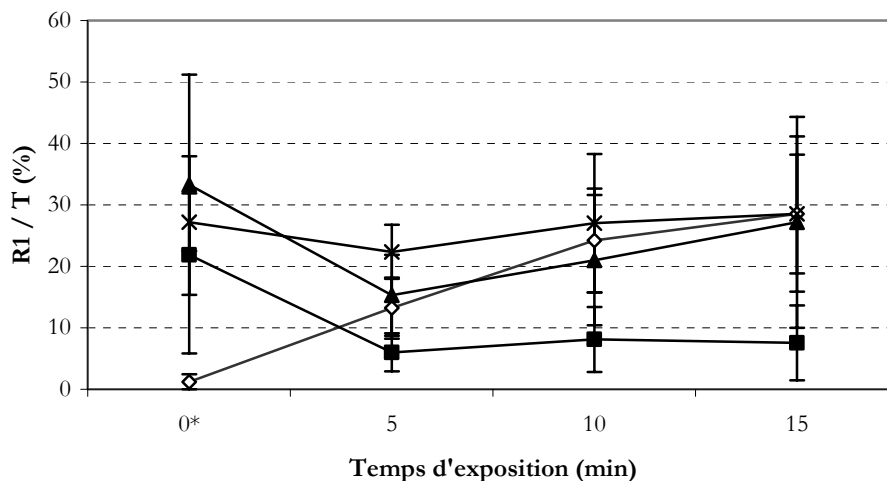


Figure 39 : Pourcentages de cellules fortement marquées à l'IP après exposition à 50°C en bain marie (◇), aux micro-ondes discontinues à 200 (■), 400 (▲) et 800 W (x) en fonction de la durée du traitement. 0* correspond à une exposition à la phase C.

En ne considérant que les cellules de la population R1, on remarque que le traitement micro-ondes et le traitement en bain marie entraînent le même nombre de cellules perméabilisées au bout de 15 minutes. Les bactéries soumises aux micro-ondes à 50°C à la puissance de 200 W présentent un faible pourcentage de cellules perméabilisées (environ 8%) par rapport aux suspensions bactériennes exposées à des puissances plus élevées (jusqu'à environ 30%). Hormis ces quelques différences, les interprétations sont les mêmes que pour la totalité des cellules marquées.

Comme dans le cas des expositions à 37°C, on peut remarquer l'importance de la phase de chauffage. Si on remplace cette phase de chauffage micro-ondes par une phase de chauffage en bain marie, on observe des pourcentages de cellules perméabilisées plus faibles.

Comme dans ce cas le pourcentage de cellules perméabilisées est important, nous avons dosé les protéines relarguées dans le milieu extracellulaire par les cellules ayant subi différents traitements (chauffage bain marie 50°C, chauffage micro-ondes 50°C à 200, 400 et 800 W pendant la phase de chauffage uniquement, 5, 10, 15 minutes).

Les résultats obtenus sont représentés Figure 40.

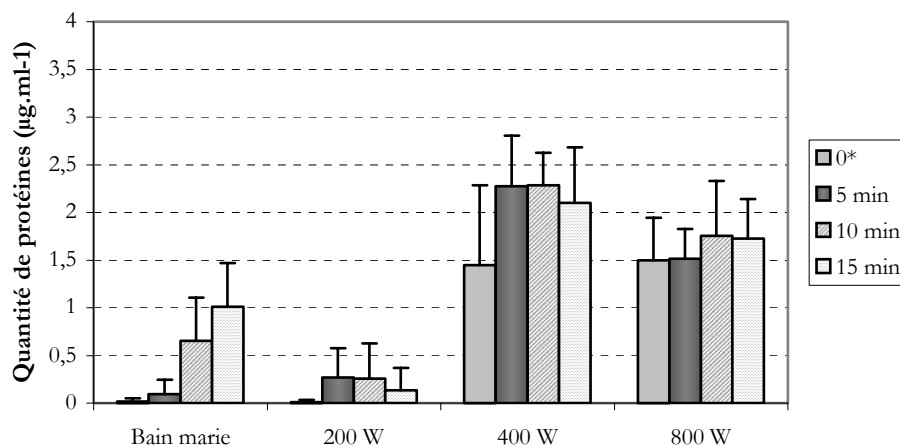


Figure 40 : Effet du chauffage traditionnel et des micro-ondes discontinues sur la fuite de protéines dans le milieu extracellulaire. 0* correspond à l'exposition au temps de montée en température uniquement.

Les résultats montrent que les micro-ondes discontinues appliquées à 50°C ont un effet sur la quantité de protéines relarguées dans le milieu extracellulaire à 400 et à 800 W. Il semble qu'une exposition à 400 W permette une fuite plus importante de protéines qu'une exposition à 800 W mais cette différence n'est pas statistiquement significative. On peut noter une quantité de protéines relarguées plus importante lors d'une exposition bain marie que lors d'une exposition micro-ondes à 200 W. Si on corrèle ces résultats à ceux obtenus en terme d'intégrité membranaire, la quantité de protéines relarguées dans le milieu extracellulaire est proportionnelle au nombre de cellules perméabilisées pour les suspensions bactériennes exposées aux micro-ondes. En revanche, on remarque que la quantité de protéines relarguées est plus faible pour un chauffage bain marie alors qu'en terme de pourcentages, au bout de 15 min, les résultats sont équivalents. Les cellules sont donc vraisemblablement plus altérées dans le cas d'une exposition micro-ondes que dans le cas d'une exposition bain marie.

Nous avons, comme dans les autres cas, entrepris d'étudier la viabilité des cellules ayant incorporé l'IP après un traitement en bain marie ou en micro-ondes après une exposition uniquement à la phase de chauffage et après une exposition de 5 min.

On peut voir que pratiquement aucune bactérie de la population fortement marquée à l'IP n'est apte à se revivifier après un traitement seulement pendant la phase de chauffage, et ce quelle que soit la puissance appliquée (200, 400 ou 800 W) (Figure 41).

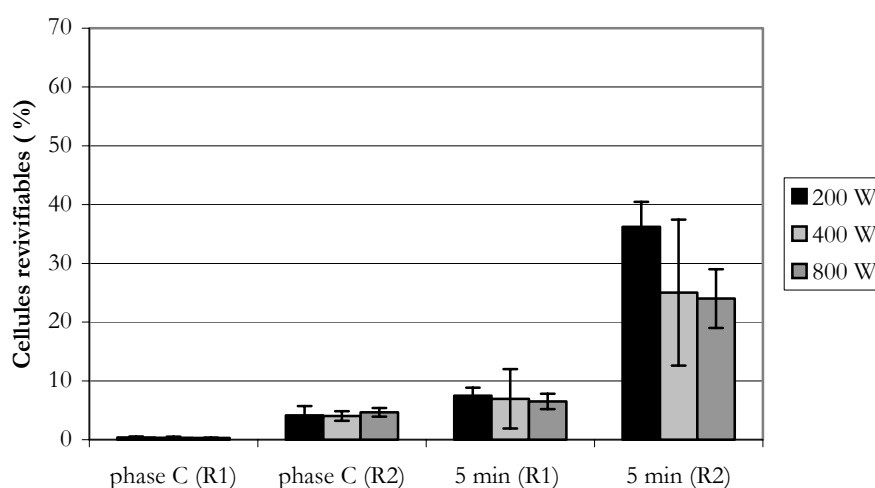


Figure 41 : Aptitude à la revivification de cellules soumises pendant C ou 5 min à un chauffage bain marie ou micro-ondes après tri des populations R1 et R2.

Parmi les cellules ayant moyennement incorporé l'IP (population R2), environ 5% d'entre elles sont aptes à se revivifier quelle que soit la puissance appliquée.

Les taux de survie pour la population R1 comme pour la population R2 sont plus importants lorsque les bactéries sont soumises à un traitement de 5 minutes. Il semblerait donc qu'il y ait effectivement un phénomène de poration transitoire sur une partie des cellules lié au traitement micro-onde.

III. EFFET DE LA COMBINAISON NISINE MICRO-ONDES

Comme dans le cas des expositions micro-ondes à la température finale de 50°C, nous avons obtenu des taux relativement importants de cellules perméabilisées, la combinaison de la nisine avec les micro-ondes a été testée. En effet, même si une grosse partie des cellules soumises aux micro-ondes discontinues sont perméabilisées, nous n'avons pas pu mettre en évidence de mortalité cellulaire importante.

D'une manière générale, on peut voir que la concentration en nisine ne joue pas un effet plus important en terme de mortalité cellulaire (Figure 42).

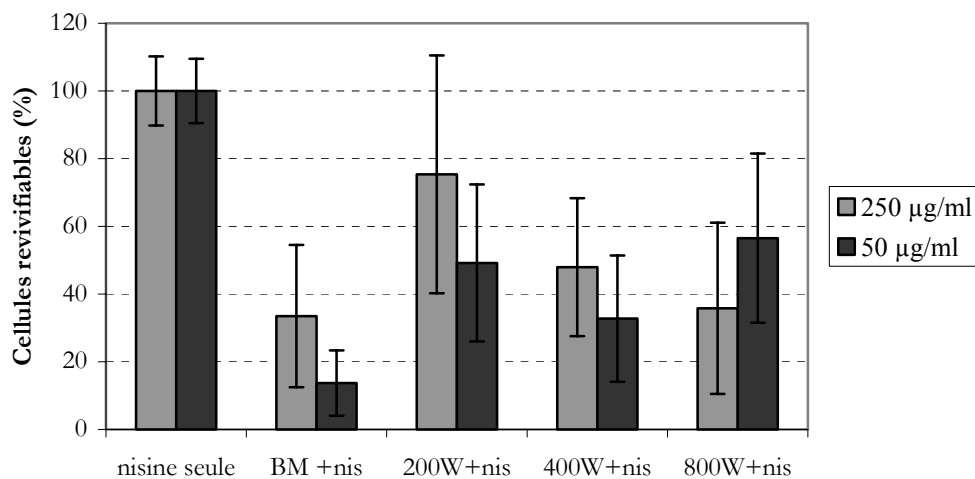


Figure 42 : Aptitude des cellules à se revivifier pour des suspensions bactériennes traitées avec la nisine, traitées par la combinaison nisine et bain marie 50°C, traitées par la combinaison nisine et micro-ondes discontinues 50°C aux différentes puissances.

Les résultats montrent un effet plus marqué pour des suspensions bactériennes traitées par la combinaison nisine bain marie que la combinaison nisine micro-ondes. Le fort pourcentage de cellules faiblement marquées à l'IP est certainement responsable du plus grand effet de la combinaison. On remarque que ce sont les puissances de 400 et 800 W qui montrent le plus d'effet par rapport à 200 W ce qui est en accord avec les résultats précédents.

IV. CARACTERISATION THERMIQUE

Les caractérisations thermiques effectuées sur des suspensions bactériennes soumises à 200, 400 ou 800 W pendant la phase de chauffage permettant d'atteindre 50°C ont montré que l'allure générale des profils de températures n'était pas différente selon les puissances (Figure 43).

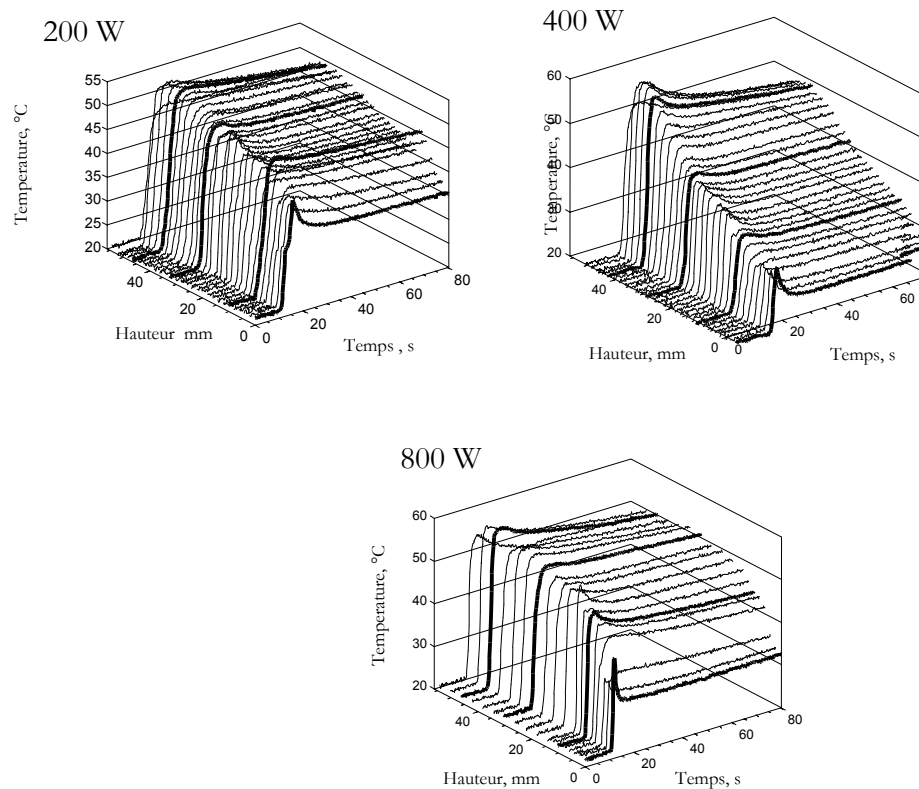


Figure 43 : Distributions spatio temporelles des températures au sein de suspensions exposées aux micro-ondes discontinues à 50°C à 200, 400 et 800W.

D'une manière générale, on remarque que quelle que soit la puissance appliquée, la température n'est pas homogène au sein de la suspension exposée aux micro-ondes discontinues. Le haut du tube atteint dans les trois cas testés des valeurs plus élevées que le bas du tube. La différence entre les trois puissances vient essentiellement du fait qu'à 200 W, la différence de température entre le haut et le bas du tube est beaucoup moins importante (environ 10°C) que pour des expositions de 400 et 800 W (environ 30°C). Cependant, nous n'avons pas mesuré de points au delà de 60 +/- 1°C. Cette moins grande différence de température peut expliquer le faible de relargage de protéines lors d'expositions à 200 W : les altérations membranaires sont probablement moins drastiques que celles obtenues aux puissances supérieures.

De la même façon que pour les expositions à 37°C, le profil de descente en température pendant une minute après le chauffage diffère selon que la sonde se trouve en haut ou en bas du tube. Le phénomène de convection en est probablement responsable.

V. DISCUSSION DES RESULTATS

Les micro-ondes appliquées de façon discontinue à 50°C n'ont pas d'effet bactéricide sur *E. coli*. En revanche, un grand nombre de cellules est perméabilisé par ce traitement. Bien qu'un traitement de 15 minutes en bain marie à 50°C ou en micro-ondes à 400 et 800 W induise environ le même pourcentage de cellules perméabilisées (population R1), on a montré que la fuite de protéines était beaucoup plus importante dans le cas des expositions micro-ondes. Il semble donc que les micro-ondes aient un effet délétère plus marqué que le chauffage traditionnel. Cet effet plus important des micro-ondes par rapport au bain marie réside, probablement, dans le fait qu'avec une exposition micro-ondes il existe une grande hétérogénéité de température au sein de la suspension bactérienne exposée. Cependant, une partie des cellules perméabilisées obtenues après une exposition micro-ondes est capable de se revivifier. Les micro-ondes induiraient donc un phénomène réversible en terme de perméabilité membranaire sur une partie des cellules.

Les caractérisations thermiques ont permis de mettre en évidence que le profil de température n'était pas le même selon les puissances appliquées. La température est plus homogène lors d'une exposition à 200 W que lors d'expositions à 400 et 800 W. Les effets plus importants à ces puissances peuvent provenir de cette plus grande hétérogénéité. En revanche, aucun point n'a été mesuré au delà de 60 +/- 1°C.

En tenant compte des données de simulations numériques et des temps d'exposition relatifs à chacune des phases d'exposition (C et E), on a pu déterminer la variation de température moyenne à l'aide de la formule : $SAR = C_p \partial T / \partial t$. Cette valeur est de l'ordre de 30°C en moyenne (température initiale de 20°C), ce qui correspond bien aux conditions recherchées. En revanche, si on s'intéresse aux valeurs obtenues avec le SAR simulé maximum, on atteint une variation de température très supérieure, de l'ordre de 100°C. Même si ces résultats sont certainement surestimés, la dosimétrie montre l'existence de points au sein de la suspension bactérienne exposée ayant des températures très élevées. En effet, d'après la Figure 44, nous avons pu déduire qu'environ 40% des voxels atteignent des températures supérieures à 60°C après la phase C. De plus, cet histogramme confirme que des températures très élevées (environ 100°C) peuvent être atteintes au sein de la suspension bactérienne exposée.

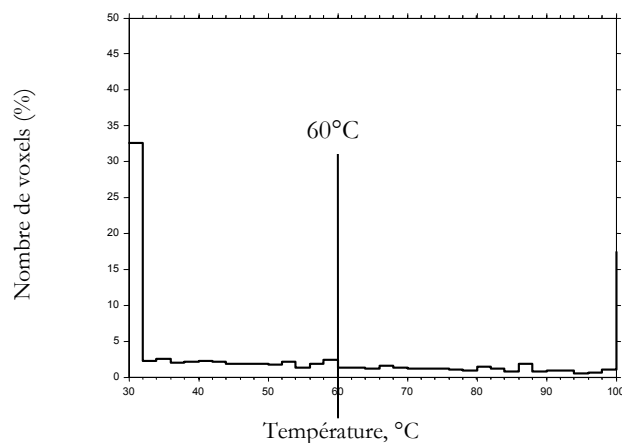


Figure 44 : Pourcentages de voxels en fonction de la température lors d'une exposition aux micro-ondes discontinues 50°C pendant la phase C.

Même si ces résultats ne prennent pas en compte les phénomènes de conduction et convection, on peut supposer que certaines cellules atteignent des températures très supérieures à 50°C qui induisent une destruction de celles-ci et donc un relargage de protéines plus important.

L'étude à la température finale de 50°C nous a donc permis d'avoir des effets amplifiés par rapport aux expositions à 37°C. Comme la température est plus élevée, les résultats obtenus étaient attendus. En revanche, mêmes appliquées à la température finale de 50°C, les micro-ondes discontinues ne peuvent pas être utilisées comme technique de décontamination basses températures à cause du faible abattement qu'elles induisent. La combinaison de ces expositions avec la nisine n'induit pas non plus suffisamment de mortalité. Il est toutefois à noter que la combinaison a été réalisée seulement après une exposition à la phase de chauffage donc après une exposition de quelques secondes aux micro-ondes. Ces temps d'exposition sont donc très courts par rapport aux temps utilisés en pasteurisation classique.

Conclusion

Les travaux présentés dans ce mémoire apportent un certain nombre d'informations quant à l'étude des interactions entre les micro-ondes et les bactéries. Ils permettent d'énoncer les conclusions suivantes :

✓ Les micro-ondes appliquées de façon discontinue à la température finale de 37°C n'induisent pas d'effet bactéricide mais entraînent une modification de la membrane d'une petite partie des cellules bactériennes exposées. Le fait qu'une partie des cellules perméabilisées par les micro-ondes soit capable de se revivifier laisse supposer que les micro-ondes induisent un phénomène réversible en terme de perméabilité membranaire des cellules. Cette hypothèse a été confortée par les essais de combinaison des micro-ondes avec la nisine dont l'activité bactéricide a été amplifiée dans ce cas.

✓ Lorsque les micro-ondes discontinues sont appliquées à 50 et 60°C, l'effet bactéricide mesuré n'est pas plus important qu'un chauffage traditionnel à la même température. En revanche, comme dans le cas des études menées à 37°C, les effets sur la membrane (perméabilité, fuite de protéines, mortalité induite par la combinaison avec la nisine) sont plus importants que ceux obtenus en chauffage traditionnel.

✓ L'application de puissances moyennes (signal modulé) ou crêtes n'induit pas de différences significatives en terme de perméabilité membranaire.

✓ Les effets obtenus apparaissent dès la première phase d'exposition du protocole, c'est-à-dire la phase de chauffage. Pendant cette phase, une hétérogénéité de chauffage de la suspension bactérienne a été révélée par la caractérisation thermique, quelle que soit la température finale appliquée. Ces mesures expérimentales n'indiquent cependant pas de points atteignant des températures capables d'engendrer ces mêmes effets en terme de perméabilité cellulaire. Sans la dosimétrie numérique, nous aurions pu conclure à un effet non thermique des micro-ondes sur la membrane d'*E. coli*. Cependant, les résultats de simulation numérique révèlent que des points « chauds » atteignant de très fortes valeurs de températures (de l'ordre de 100°C) pourraient se former au sein de la suspension bactérienne exposée. Les effets observés seraient donc probablement dus à un effet thermique des micro-ondes. Les études sur la transcription de certains gènes impliqués dans la réponse au choc thermique et dans la réponse SOS semblent conforter cette conclusion. La phase de maintien en température n'induit pas d'effets additionnels à ceux obtenus lors la phase de chauffage. Le SAR moyen durant le maintien en température est pourtant relativement élevé.

Concernant la faisabilité d'un procédé de décontamination, aucun effet bactéricide n'ayant été mesuré, l'utilisation des expositions micro-ondes discontinues dans un système de pasteurisation ne semble pas envisageable en tant que tel. En revanche, un couplage de technologie, soit avec des bactériocines, soit avec d'autres systèmes physiques (UV ou autres) de même que des expositions en continu (les études présentées ici étant réalisées en « batch ») seraient à étudier. Des puissances supérieures devraient aussi être testées pour pouvoir induire des temps d'exposition beaucoup plus courts : un générateur pouvant délivrer des puissances comprises entre 2 et 18 kW est actuellement à l'étude.

D'une manière générale, ces travaux montrent toute la difficulté de détecter des effets non thermiques des micro-ondes, s'ils existent. L'importance de la caractérisation des systèmes ainsi que la combinaison de la dosimétrie expérimentale et numérique dans l'étude des interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques a bien été démontré dans ces travaux. Elle ne répond cependant pas à la question sur l'existence d'effet non thermique des micro-ondes. En effet, même si les résultats présentés ici indiquent que l'effet obtenu est dû à un phénomène thermique, ils n'excluent pas pour autant l'existence d'effets non thermiques des micro-ondes.

Nouveau chapitre de la thèse

I. Place et enjeux de la thèse

« Etude des interactions entre la bactérie *Escherichia coli* et les micro-ondes appliquées de façon discontinue dans des conditions faiblement thermiques »

Les micro-ondes appartiennent à la bande des radiofréquences (de 10 kHz à 300 GHz) qui sont une gamme de fréquences très largement utilisées et exploitées. La prolifération des procédés utilisant cette bande de fréquences, pour des applications domestiques et industrielles, a entraîné des questions relatives aux effets éventuels de ces ondes sur l'Homme. Aujourd'hui, avec l'avènement de la téléphonie mobile, de nombreuses études portent sur les interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques. L'objectif de mon travail de thèse est double. En effet, d'une part, il s'agit de mettre en évidence l'existence ou non d'une interaction non thermique ou thermique entre des champs électromagnétiques micro-ondes (à des températures finales globales de 37, 50 ou 60°C) et la bactérie *Escherichia coli* et, d'autre part, d'étudier la faisabilité de cette technologie comme procédé de décontamination de milieux ou produits thermosensibles ou contenant des micro-organismes pathogènes. En effet, pour ce qui concerne le premier objectif, mon travail de recherche s'inscrit dans la démarche scientifique actuelle qui consiste à étudier les interactions potentielles des micro-ondes avec les cellules. Le deuxième objectif, plus appliqué, permettrait des applications potentielles dans le domaine de la pasteurisation de produits agroalimentaires thermosensibles tels que des jus de fruit par exemple.

Cette thèse a été réalisée au sein d'une équipe « pluridisciplinaire » issue du rapprochement de deux laboratoires de l'Université de Limoges : l'Institut de Recherche en Communications Optiques et Micro-ondes (IRCOM) qui conçoit des systèmes d'exposition adaptés et possède les outils dosimétriques indispensables à leur caractérisation et l'Institut de Biotechnologie, au sein duquel j'ai effectué ma thèse, qui possède les outils biologiques nécessaires à ces études. Ces laboratoires ont débuté leurs activités de « Bioélectromagnétisme » suite à leur intégration, à partir de 1996, dans le plan pluriformation I4M (Interaction Micro-ondes Matières Microscopiques et Macroscopique). Même si les questions relatives aux effets des micro-ondes sur la santé ne sont pas récentes, peu de laboratoires français travaillent dans ce domaine. En revanche, au niveau international, ces équipes sont regroupées au sein de différentes associations, comme par exemple la BEMS (BioElectroMagnetic Society).

L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse collabore avec de nombreux partenaires industriels. Par exemple, mon projet de thèse a été initialisé en collaboration avec EDF, puis a

engendré une collaboration avec la société COVIMAG qui conçoit et construit des générateurs hyperfréquences. Cette société a d'ailleurs conçu un générateur pour réaliser mon projet de thèse.

J'ai choisi de faire ma thèse dans cette équipe pluridisciplinaire suite à un stage réalisé au sein de l'ENSIL (Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges), dans le cadre de ma maîtrise, avec M. LEPRAT, un des dirigeants de cette équipe pluridisciplinaire. Ce stage et de nombreuses discussions avec M. LEPRAT sur les sujets de son équipe ont suscité mon intérêt pour le bioélectromagnétisme. M. LEPRAT m'a donc proposé, dans un premier temps, un sujet de DEA sur l'utilisation de micro-ondes dans des conditions faiblement thermiques pour des applications en agroalimentaire. C'est au cours de cette année de DEA que mon intérêt pour ce type d'étude s'est conforté. En effet, au cours de cette première année, l'organisation du sujet de recherche car peu de choses ont été faites sur le sujet, la recherche de documents, la rencontre avec des thésards dans le domaine et la collaboration avec les physiciens m'ont conduit à continuer ce sujet dans le cadre d'une thèse.

II. Gestion du projet et moyens mis en œuvre

L'évaluation des besoins ainsi qu'une étude bibliographique ont été réalisées avant mon arrivée par les membres de l'équipe. Ensuite, en fonction des premiers résultats, ces besoins ont évidemment évolué. Les financements qui m'ont permis de mener à bien ce projet sont, dans un premier temps, une bourse pour le développement des zones rurales (PDZR) allouée par la Communauté Européenne à la Région Limousin, puis un demi-poste d'ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche) à l'ENSIL. Le matériel a été financé par l'équipe pluridisciplinaire essentiellement sur des fonds privés (contrats avec des industriels comme EDF dans le cadre de mon DEA) mais aussi sur des fonds publics. En plus des partenaires industriels, tels que EDF et COVIMAG, nous avons eu de nombreux partenaires scientifiques tels que :

✓ Les équipes de l'Institut de Biotechnologie pour la conduite du projet et l'utilisation d'appareils, en particulier le Docteur Chantal Jayat pour les tests cytométriques, le Docteur Daniel Petit pour les tests statistiques ainsi que l'ensemble des membres du laboratoire pour les discussions scientifiques,

✓ L'IRCOM, en particulier le Docteur Olivier TANTOT, pour le prêt du banc d'exposition ainsi que le Docteur Philippe LEVEQUE, pour ses explications sur les micro-ondes,

✓ Le laboratoire PIOM (Physique des Interactions Ondes Matières) de l'Université de Bordeaux, pour la conduite du projet et l'échange d'informations, ce laboratoire travaillant lui aussi sur les interactions ondes et matières,

✓ L'Université de Poitiers, avec en particulier le Professeur Yves Cenatiempo, mon co-directeur de thèse pour l'orientation du projet et pour ses connaissances dans le domaine de la décontamination et des bactériocines.

Un brevet a été déposé sur un système de décontamination utilisant les micro-ondes et il couvre les applications potentielles de mon travail de thèse. Nous avons ensuite publié sur ce sujet dans des revues internationales et participé à plusieurs congrès nationaux et internationaux.

Mon sujet de thèse est constitué, comme je l'ai précisé dans la première partie, de deux volets : un volet appliqué et un volet plus fondamental. Les deux volets ont été menés de front, l'étude des interactions entre les micro-ondes et la bactérie (partie fondamentale) donnant des réponses quant à l'application des micro-ondes dans des conditions faiblement thermiques (partie appliquée). La planification du projet a été réalisée de façon plutôt intuitive en fonction des résultats obtenus et des nouvelles données bibliographiques du domaine. En effet, bien que les objectifs aient été définis au départ, nous ne faisons pas de planification à long terme. En fonction des données bibliographiques et des résultats, des réunions provoquées avec mes dirigeants, en plus des réunions régulières de l'équipe qui avaient lieu tous les 15 jours, m'ont permis de tester de nouvelles voies et d'étudier des paramètres différents de ceux établis au départ du sujet. En effet, au fur et à mesure du déroulement de ce travail de doctorat, mon autonomie, quant à la conduite du projet, a grandement évolué. Ainsi, en plus de la provocation de réunion pour des idées de manipulations ou de nouvelles voies d'explorations, lors de la survenue de problèmes, il m'appartenait de les résoudre et donc de chercher les informations auprès des personnes les plus aptes à me donner des solutions.

Cinq personnes sont directement associées au projet : mes deux directeurs de thèse, le Docteur Patrick Leprat et le Professeur Yves Cenatiempo, le Docteur Philippe Lévêque, le Docteur Florianne Leglise et moi-même. De nombreux membres du laboratoire y sont plus ou moins associés (deux professeurs, cinq maîtres de conférences et une secrétaire) ainsi que les partenaires scientifiques cités précédemment. Les permanents de l'ENSIL, qui m'ont aidée dans la mise au point de mes enseignements, font aussi partie des personnes qui ont participé à ce projet. Enfin, sont associés le personnel de la Faculté des Sciences et Techniques et les

enseignants et les responsables de l'Ecole Doctorale (ED 258). Le tableau ci-dessous récapitule les dépenses directement associées à ce travail.

Tableau : Dépenses associées à ce travail de thèse

Ressources humaines	Bourse et salaire	49 000 €
	Encadrants	80 000 €
	Permanents du laboratoire	10 000 €
	Partenaires scientifiques	20 000 €
	Administration	600 €
	Ecole Doctorale	600 €
	Sous-total	160 200 €
Matériels	Consommables	3 000 €
	Equipement IRCOM	30 000 €
Infrastructures	Amortissement des locaux et aménagements	27 000 €
	Frais d'entretien logistique maintenance	5 000 €
Sous-traitance	Cytométrie en flux	2 200 €
Documentation		500 €
Déplacement		1 200 €
TOTAL		229 100 €

Le coût total de ma thèse s'élève à 229 100 €.

III. Compétences développées dans le cadre du projet

Au cours de ces années de thèse, j'ai développé des connaissances scientifiques essentiellement dans le domaine du bioélectromagnétisme. Il a donc fallu que je me familiarise à la fois, avec les problématiques étudiées dans ce domaine, en particulier les effets des ondes sur la santé, mais aussi avec les outils et les méthodes de physique et de biologie nécessaires à ces études. La gestion de mon projet de thèse m'a permis d'acquérir une expérience dans le domaine du travail en équipe, en particulier, avec des personnes de domaines différents de la biologie, ma

formation de départ. En effet, ce travail pluridisciplinaire associant deux sciences très différentes, la physique et la biologie, des problèmes de communications sont apparus. J'ai donc développé des compétences pour pallier à ces incompréhensions mutuelles. De plus, le sujet étant assez particulier, une capacité d'analyse, une grande curiosité, mais aussi de la persévérance ont été nécessaires pour mener à bien ce projet. La présentation de mes travaux lors de congrès scientifiques nationaux m'a permis d'acquérir des facultés de synthèse de mes travaux, des congrès non scientifiques (Séminaire de la Pluridisciplinarité, par exemple) d'acquérir des capacités de vulgarisation de mon travail. La participation à des congrès internationaux m'a permis d'acquérir des compétences linguistiques, les publications dans des revues internationales m'ont permis de renforcer ces capacités linguistiques mais aussi de synthèse du travail. Mon projet de thèse m'a aussi permis de développer des compétences dans les domaines suivants : capacités d'animation de réunion, sens de la négociation et de la persuasion, savoir faire dans la recherche d'information.

Ma participation à des concours de création d'entreprise (Campus Entrepreneur et Concours National Allègre) ainsi qu'à des formations proposées par l'école doctorale m'ont permis d'acquérir des connaissances du monde de l'entreprise, en particulier pour le fonctionnement et la création d'entreprises. Ma participation à l'Association des Docteurs et Doctorants de l'Université de Limoges (ADDEBUL), l'organisation de journées rencontres entre les docteurs et le secteur privé (Journées Biotechno 2001 et 2002) m'ont permis de développer mon sens de l'organisation et mes capacités relationnelles. Mon goût pour le secteur privé est né grâce à toutes ces expériences.

Lors de ma dernière année de doctorat, le demi-poste d'ATER à L'ENSIL m'a donné la possibilité d'acquérir une expérience dans l'encadrement, aussi bien au niveau des cours que des travaux personnels des étudiants.

IV. Evaluation des retombées de la thèse

Les retombées de mes travaux de thèse sont à la fois scientifiques et personnelles. D'une façon générale, ce doctorat m'a donné la possibilité de travailler sur un sujet novateur qui a débouché sur la rédaction d'un brevet, par l'intermédiaire de la participation à des concours de création d'entreprises. D'un point de vue plus fondamental, il m'aura permis d'apporter des informations sur les interactions possibles entre les ondes et les systèmes biologiques et donc de s'intégrer dans les problématiques actuelles d'effets sanitaires des ondes.

Sur le plan personnel, la gestion de ce projet m'a permis d'acquérir des compétences et des connaissances qui me serviront pour mon entrée dans le monde économique. Le paradoxe de la thèse est que l'on est étudiant tout en étant confronté au monde industriel. Dans mon cas, ce paradoxe est d'autant plus vrai que mon sujet est appliqué et qu'il a été réalisé avec différents partenaires industriels. Il m'a donc permis d'être confronté à différents interlocuteurs du secteur privé ainsi qu'à leur mode de fonctionnement. Je considère que mes années de doctorat constitue une expérience professionnelle qu'il faut valoriser aussi bien pour les connaissances scientifiques que j'ai pu acquérir, que pour les aptitudes que j'ai pu développer pour mener à bien ce projet. Dans mon cas, cette expérience dans son intégralité rentre dans le cadre de mon projet professionnel : travailler en Recherche et Développement dans le secteur privé. Dans ce cadre, je rentre comme co-porteur de projet au sein de l'incubateur et ce premier contrat constitue essentiellement un travail de recherche et développement mais il fait aussi appel aux autres compétences acquises lors de ma thèse.

Références bibliographiques

Alekseev S.I. et Ziskin M.C. (1995). Millimeter microwave effect on ion transport across lipid bilayer membranes. *Bioelectromagnetics*. **16** (2) : 124-131.

Aubineau P., Bardou A., Dixsaut G., Golberg M., De Seze R., Veyret B. et Zmirou D. (2001). Les téléphones mobiles, leurs stations de base et la santé. Etat des connaissances et recommandations. Rapport au Directeur Général de la Santé.

Atmaca S., Akdag Z., Dasdag S. et Celik S. (1996). Effect of microwaves on survival of some bacterial strains. *Acta Microbiol Immunol Hung*. **43** (4) : 371-378.

Auvinen A., Hietanen M., Luukkonen R. et Koskela R.S. (2002). Brain tumors and salivary gland cancers among cellular telephone users. *Epidemiology*. **13** (3) :356-359.

Badea M.A., Vasilco R., Sandru D., Paslaru L., Jieanu V. et Comorosan S. (1993). The effect of pulsed electromagnetic field (Diapulse) on cellular systems. *Rom J Physiol*. **30** (1-2) : 65-71.

Baiola C., Girard N. et Seguin N. (2003). Etude thermique pour applications BIOEM : mesures avec sonde Luxtron et développement de système d'acquisition sous Lab View. Rapport DESS de « Communication, Radiofréquences et Optiques », Limoges.

Barnes F.S. et Hu C.J. (1977). Model for some nonthermal effects of radio and microwave fields on biological membranes. *IEEE Trans Microw Theor Tech*. **25** (9) : 742-746.

Belyaev I., Alipov Y.D., Shcheglov V.S. et Lystsov V.N. (1992). Resonance effect of microwaves on the genome conformational state of *E. coli* cells. *Z Naturforsch [C]*. **47** (7-8) : 621-627.

Belyaev I., Shcheglov V.S., Alipov Y.D. et Ushakov V.D. (2000). Nonthermal effects of extremely high-frequency microwaves on chromatin conformation in cells in vitro - Dependence on physical, physiological, and genetic factors. *IEEE Trans Microw Theor Tech*. **48** (11) : 2172-2179.

Bergqvist B., Arvidsson L., Pettersson E., Galt S., Saalman E., Hamnerius Y. et Norden B. (1994). Effect of microwave radiation on permeability of liposomes. Evidence against non-thermal leakage. *Biochim Biophys Acta.* **1201** (1) : 51-4.

Bernard J.P. (1999). La haute fréquence dans l'industrie agro-alimentaire pour la conservation des aliments. Décontamination des produits en bio-industrie, document ADRIA.

Blank M. et Goodman R. (2000). Stimulation of the stress response by low-frequency electromagnetic fields : possibility of direct interaction with DNA. *IEEE Trans Plasm Sci.* **28** (1) : 168-172.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **7** (72) : 248-254.

Calderon-Miranda M.L., Barbosa-Canovas G.V. et Swanson B.G. (1999). Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. *Int J Food Microbiol.* **51** (1) : 7-17.

Cañumir J.A., Celis J.E., de Bruijn J. et Vidal L.V. (2002). Pasteurisation of Apple Juice by Using Microwaves. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie.* **35** (5) : 389-392

Chenuaud A (1996). Synthèse hydrothermale de zircone colloïdale par chauffage micro-ondes. Rapport DEA de « Matériaux céramiques et traitement de surface », Limoges.

Cleary S.F., Cao G., Liu L.M., Egle P.M. et Shelton K. R. (1997). Stress proteins are not induced in mammalian cells exposed to radiofrequency or microwave radiation. *Bioelectromagnetics.* **18** (7) : 499-505.

Cross G.A. et Fung D.Y. (1982). The effect of microwaves on nutrient value of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **16** (4) : 355-381.

de Pomerai D., Daniells C., David H., Allan J., Duce I., Mutwakil M., Thomas D., Sewell P., Tattersall J., Jones D. et Candido P. (2000). Non-thermal heat-shock response to microwaves. *Nature*. **405** (6785) : 417-418.

Diaper J.P., Tither K et Edwards C. (1992). Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. *Applied Microbiol Biotechnology* **38** : 268-272

Dreyer N.A., Loughlin J.E. et Rothman K.J. (1999). Cause-specific mortality in cellular telephone users. *JAMA*. **282** (19) :1814-1816.

Dreyfuss M.S. et Chipley J.R. (1980). Comparison of effects of sublethal microwave radiation and conventional heating on the metabolic activity of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. **39** (1) : 13-16.

Dubreuil D., Jay T. et Edeline J.M. (2002). Does head-only exposure to GSM-900 electromagnetic fields affect the performance of rats in spatial learning tasks? *Behav Brain Res*. **129** (1-2) : 203-210.

Fritze K., Sommer C., Schmitz B., Mies G., Hossmann K.A., Kiessling M. et Wiessner C. (1997). Effect of global system for mobile communication (GSM) microwave exposure on blood-brain barrier permeability in rat. *Acta Neuropathol (Berl)*. **94** (5) : 465-470.

Fujikawa H., Ushioda H. et Kudo Y. (1992). Kinetics of *Escherichia coli* destruction by microwave irradiation. *Appl Environ Microbiol*. **58** (3) : 920-924.

Goldblith S.A. (1966). Basic principles of microwaves and recent developments. *Adv Food Res*. **15** : 277-301.

Goldblith S.A. et Wang D.I.C. (1967). Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology*. **15** (6) : 1371-1375.

Gos P., Eicher B., Kohli J. et Heyer W.D. (1997). Extremely high frequency electromagnetic fields at low power density do not affect the division of exponential *phase Saccharomyces cerevisiae* cells. *Bioelectromagnetics*. **18** (2) :142-155.

Grahl T. et Markl H. (1996). Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl Microbiol Biotechnol.* **45** (1-2) : 148-157.

Grundler W. et Keilmann F. (1978). Nonthermal effects of millimeter microwaves on yeast growth. *Z Naturforsch [C].* **33** (1-2) : 15-22.

Hardell L., Reizenstein J., Johansson B., Gertzen H. et Mild K.H. (1999). Angiosarcoma of the scalp and use of a cordless (portable) telephone. *Epidemiology.* **10** (6) : 785-786.

Hardell L., Nasman A., Pahlson A. et Hallquist A. (2000). Case-control study on radiology work, medical x-ray investigations, and use of cellular telephones as risk factors for brain tumors. *MedGenMed.* E2.

Hardell L., Mild K.H. et Hallquist A. (2001). Radiofrequency exposure and the risk for brain tumors. *Epidemiology.* **12** (1) : 135-136.

Hardell L., Hallquist A., Mild K.H., Carlberg M., Pahlson A. et Lilja A. (2002). Cellular and cordless telephones and the risk for brain tumours. *Eur J Cancer Prev.* **11** (4) : 377-386.

Helander I.M. et Mattila-Sandholm T. (2000). Permeability barrier of the gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *Int J Food Microbiol.* **60** (2-3) : 153-161.

Ho S.Y., Mittal G.S., Cross J.D. et Griffiths M.W. (1995). Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses. *J Food Science.* **60** (6) : 1337-1343.

Ho S.Y. et Mittal G.S. (1996). Electroporation of cell membranes: a review. *Crit Rev Biotechnol.* **16** (4) : 349-362.

Hulsheger H., Potel J. et Niemann E.G. (1981). Killing of bacteria with electric pulses of high field strength. *Radiat Environ Biophys.* **20** (1) : 53-65.

- Inskip P.D.** (2001). Frequent radiation exposures and frequency-dependent effects: the eyes have it. *Epidemiology*. **12** (1) : 1-4.
- Jarayam S., Castle G.S.P. et Margaritis A.** (1992). Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses. *Biotechnology and Bioengineering*. **40** : 1412-1420.
- Jeng D.K., Kaczmarek K.A., Woodworth A.G. et Balasky G.** (1987). Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Appl Environ Microbiol*. **53** (9) : 2133-2137.
- Johansen C., Boice J. Jr, McLaughlin J. et Olsen J.** (2001). Cellular telephones and cancer--a nationwide cohort study in Denmark. *J Natl Cancer Inst*. **93** (3) : 203-207.
- Kakita Y., Kashige N., Murata K., Kuroiwa A., Funatsu M. et Watanabe K.** (1995). Inactivation of *Lactobacillus* bacteriophage PL-1 by microwave irradiation. *Microbiol Immunol*. **39** (8) : 571-576.
- Khalil H. et Villota R.** (1988). Comparative study on injury and recovery of *Staphylococcus aureus* using microwaves and conventional heating. *J Food Prot*. **51** : 181-186.
- Khalil H. et Villota R.** (1989). The effect of microwave sublethal heating on the ribonucleic acids of *Staphylococcus aureus*. *J Food Prot*. **52** (8) : 544-548.
- Kindle G., Busse A., Kampa D., Meyer-Konig U. et Daschner F.D.** (1996). Killing activity of microwaves in milk. *J Hosp Infect*. **33** (4) : 273-278.
- Koivisto M., Haarala C., Krause C.M., Revonsuo A., Laine M. et Hamalainen H.** (2001). GSM phone signal does not produce subjective symptoms. *Bioelectromagnetics*. **22** (3) : 212-215.
- Kozempel M.F., Annous B.A., Cook R.D., Scullen O.J. et Whiting R.C.** (1998). Inactivation of microorganisms with microwaves at reduced temperatures. *J Food Prot*. **61** (5) : 582-585.
- Lai H., Horita A. et Guy A.W.** (1994). Microwave irradiation affects radial-arm maze performance in the rat. *Bioelectromagnetics*. **15** (2) : 95-104.

Latimer J.M. et Matsen J.M. (1977). Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* **6** (4) : 340-342.

Laurence J.A., French P.W., Lindner R.A. et McKenzie D.R. (2000). Biological effects of electromagnetic fields--mechanisms for the effects of pulsed microwave radiation on protein conformation. *J Theor Biol.* **206** (2) : 291-298.

Le Ster F. (1999). Les infrarouges. Décontamination des produits en bio-industrie, document ADRIA.

Leszczynski D., Joenvaara S., Reivinen J. et Kuokka R. (2002). Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation.* **70** (2-3) : 120-129.

Lévêque P. (1994). Diffraction d'ondes électromagnétiques transitoires par des obstacles en présence de milieux diélectriques à pertes. Thèse de Doctorat « Electronique, électrotechnique, optique », Limoges (1994LIM00008).

Levre E. et Valentini P. (1998). Inactivation of Salmonella during microwave cooking. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* **201** (4-5) : 431-436.

Liburdy R.P. et Vanek P.F. Jr. (1985). Microwaves and the cell membrane. II. Temperature, plasma, and oxygen mediate microwave-induced membrane permeability in the erythrocyte. *Radiat Res.* **102** (2) : 190-205.

Liu L.M. et Cleary S.F. (1995). Absorbed energy distribution from radiofrequency electromagnetic radiation in a mammalian cell model: effect of membrane-bound water. *Bioelectromagnetics.* **16** (3) : 160-171.

Lorrain J. L. et Raoul D. (2002). Rapport sur « L'incidence éventuelle de la téléphonie mobile sur la santé », Rapport du Sénat.

Luc J. (2002). Interaction des ondes électromagnétiques avec le vivant. Etude et dosimétrie numérique de systèmes d'exposition aux fréquences micro-ondes. Thèse de Doctorat « Electronique des Hautes fréquences et Optoélectronique », Limoges (2002LIM00042).

Montiel A. et Welté B. (1991). Les procédés de désinfection. La désinfection, rapport d'étude CSHPF. p. 188-202.

Moreau J.M. (1997). Principe et intérêt des champs magnétiques pulsés en agro-alimentaire. Rencontres technologiques - Transformation - Les nouvelles techniques de l'industrie agro-alimentaire.: 71-75.

Muscat J.E., Malkin M.G., Thompson S., Shore R.E., Stellman S.D., McRee D., Neugut A.I. et Wynder E.L. (2000). Handheld cellular telephone use and risk of brain cancer. *JAMA*. **284** (23) : 3001-3007.

Muscat J.E., Malkin M.G., Shore R.E., Thompson S., Neugut A.I., Stellman S.D. et Bruce J. (2002). Handheld cellular telephones and risk of acoustic neuroma. *Neurology*. **58** (8) : 1304-1306.

Nott K.P., Hall L.D., Bows J.R., Hale M. et Patrick M.L. (2000). MRI phase mapping of temperature distributions induced in food by microwave heating. *Magn Reson Imaging*. **18** (1) : 69-79.

Orlando A.R., Mossa G. et D'Inzeo G. (1994). Effect of microwave radiation on the permeability of carbonic anhydrase loaded unilamellar liposomes. *Bioelectromagnetics*. **15** (4) : 303-313.

Pakhomov A.G., Akyel Y., Pakhomova O.N., Stuck B.E. et Murphy M.R. (1998). Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves: a review of the literature. *Bioelectromagnetics*. **19** (7) : 393-413.

Pakhomova O.N., Pakhomov A.G. et Akyel Y. (1997). Effect of millimeter waves on UV-induced recombination and mutagenesis in yeast. *Bioelectrochem Bioenerg*. **43** (2) : 227-232

Perrin A., Bachelet C., Leveque P., Malabiau R. Et Debouzy J.C. (2002). Role of modulation in the effect of 2.45 GHz microwaves on mutagenesis. XXIV annual meeting of BioElectroMagnetism Society, Quebec city, Quebec, Canada.

Phelan A.M., Lange D.G., Kues H.A. et Luty G.A. (1992). Modification of membrane fluidity in melanin-containing cells by low-level microwave radiation. *Bioelectromagnetics*. **13** (2) : 131-146.

Phelan A.M., Neubauer C.F., Timm R., Neirenberg J. et Lange D.G. (1994). Athermal alterations in the structure of the canalicular membrane and ATPase activity induced by thermal levels of microwave radiation. *Radiat Res*. **137** (1) : 52-58.

Pologea-Moraru R., Kovacs E., Iliescu K.R., Calota V. et Sajin G. (2002). The effects of low level microwaves on the fluidity of photoreceptor cell membrane. *Bioelectrochemistry*. **56** (1-2) : 223-225

Ponce E., Pla R., Sendra E., Guamis B. et Mor-Mur M. (1998). Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *Int J Food Microbiol*. **43** (1-2) : 15-19.

Pothakamury U.R., Monsalve-Gonzales A., Barbosa-Canovas G.V. et Swanson B.G. (1995). Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food Research International*. **28** (2) : 167-171.

Pothakamury U.R., Vega H., Zhang Q., Barbosa-Canovas G.V. et Swanson B.G. (1996). Effect of growth stage and processing temperature on the inactivation of *E. coli* by pulsed electric fields. *J Food Prot*. **59** (11) : 1167-1171.

Pothakamury U.R., Barbosa-Canovas G.V., Swanson B.G. et Spence K.D. (1997). Ultrastructural changes in *Staphylococcus aureus* treated with pulsed electric fields. *Food Science and Technology International*. **3** : 113-121.

- Preece A.W., Iwi G., Davies-Smith A., Wesnes K., Butler S., Lim E. et Varey A.** (1999). Effect of a 915-MHz simulated mobile phone signal on cognitive function in man. *Int J Radiat Biol.* **75** (4) : 447-456.
- Qin B.L., Pothakamury U.R., Barbosa-Canovas G.V. et Swanson B.G.** (1996). Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **36** (6) : 603-627.
- Quillardet P. et Hofnung M.** (1993). The SOS Chromotest : a review. *Mutat Res.* **297** (3) : 235-279.
- Radon K., Parera D., Rose D.M., Jung D. et Vollrath L.** (2001). No effects of pulsed radiofrequency electromagnetic fields on melatonin, cortisol, and selected markers of the immune system in man. *Bioelectromagnetics.* **22** (4) : 280-287.
- Repacholi M.H., Basten A., Gebiski V., Noonan D., Finnie J. et Harris A.W.** (1997). Lymphomas in E mu-Pim1 transgenic mice exposed to pulsed 900 MHz electromagnetic fields. *Radiat Res.* **147** (5) : 631-640.
- Rosaspina S., Anzanel D. et Salvatorelli G.** (1993). Microwave sterilization of enterobacteria. *Microbios.* **76** (309) : 263-270.
- Rosaspina S., Salvatorelli G. et Anzanel D.** (1994 a). The bactericidal effect of microwaves on *Mycobacterium bovis* dried on scalpel blades. *J Hosp Infect.* **26** (1) : 45-50.
- Rosaspina S., Salvatorelli G., Anzanel D. et Bovolenta R.** (1994 b). Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. *Microbios.* **78** (314) : 55-59.
- Rothman K.J., Loughlin J.E., Funch D.P. and Dreyer N.A.** (1996). Overall mortality of cellular telephone customers. *Epidemiology.* **7** (3) : 303-305.
- Rowan N.J., MacGregor S.J., Anderson J.G., Fouracre R.A. et Farish O.** (2000). Pulsed electric field inactivation of diarrhoeagenic *Bacillus cereus* through irreversible electroporation. *Lett Appl Microbiol.* **31** (2) : 110-114.

Saalman E., Norden B., Arvidsson L., Hamnerius Y., Hojevik P., Connell K.E. et Kurucsev T. (1991). Effect of 2.45 GHz microwave radiation on permeability of unilamellar liposomes to 5(6)-carboxyfluorescein. Evidence of non-thermal leakage. *Biochim Biophys Acta*. **1064** (1) : 124-130.

Saffer J.D. et Profenno L.A. (1992). Microwave-specific heating affects gene expression. *Bioelectromagnetics*. **13** (1) : 75-78.

Sahin A., Eiley D., Goldfischer E.R., Stravodimos K.G., Zeren S., Isenberg H.D. et Smith A.D. (1998). The *in vitro* bactericidal effect of microwave energy on bacteria that cause prostatitis. *Urology*. **52** (3) : 411-415; discussion 415-416.

Sale A.J. et Hamilton W.A. (1967). Effects of high electric fields on micro-organisms. 1. Killing of bacteria and yeast. *Biochim Biophys Acta*. **148** : 781-788.

Sale A.J. et Hamilton W.A. (1968). Effects of high electric fields on micro-organisms. 3. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochim Biophys Acta*. **163** (1) : 37-43.

Salvatorelli G., Marchetti M.G., Betti V., Rosaspina S. et Finzi G. (1996). Comparison of the effects of microwave radiation and conventional heating on *Bacillus subtilis* spores. *Microbios*. **87** : 169-174.

Sastry S.K. et Palaniappan S. (1991). The temperature difference between a microorganism and a liquid medium during microwave heating. *J Food Processing and Preservation*. **15** : 225-230.

Sato S., Shibata C. et Yazu M. (1996). Nonthermal killing effect of microwave irradiation. *Biotechnology Techniques*. **10** (3) : 145-150.

Selan L., Berlutti F., Passariello C., Thaller M.C. et Renzini G. (1992). Reliability of a bioluminescence ATP assay for detection of bacteria. *J Clin Microbiol*. **30** (7) : 1739-1942.

Shcheglov V.S., Alipov E.D. et Belyaev I.Y. (2002). Cell-to-cell communication in response of *E. coli* cells at different phases of growth to low-intensity microwaves. *Biochim Biophys Acta*. **1572** (1) : 101-106.

Shckorbatov Y.G., Grigoryeva N.N., Shakhbazov V.G., Grabina V.A. et Bogoslavsky A.M. (1998). Microwave irradiation influences on the state of human cell nuclei. *Bioelectromagnetics*. **19** (7) : 414-419.

Shin J.K. et Pyun Y.R. (1997). Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed-microwave irradiation. *J Food Science*. **62** (1) : 163-166.

Taflove A. 1975. *Computational Electrodynamics: The Finite-Difference Time-Domain Method*,. Nordwood, MA : Artech House.

Tajchakavit S., Ramaswamy H.S. et Fustier P. (1998). Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. *Food Research International*. **31** (10) : 713-722

Taylor L.S. (1981). The mechanisms of athermal microwave biological effects. *Bioelectromagnetics*. **2** (3) : 259-267.

Thuery J. (1989 a). Effets biologiques et applications médicales. p 337-338, dans *technique et documentation Lavoisier. Les micro-ondes et leurs effets sur la matière 2ème édition*. France

Thuery (1989 b). Les micro-ondes. p 4-6, dans *technique et documentation Lavoisier. Les micro-ondes et leurs effets sur la matière 2ème édition*. France

Töre F., Dulou P.E., Haro E., Veyret B. et Aubineau P. (2002) Effect of 2 hour GSM-900 microwave exposures at 2.0, 0.5, and 0.12 W/kg on plasma protein extravasation in rat brain and dura mater. XXIV annual meeting of BioElectroMagnetism Society, Quebec city, Quebec, Canada.

Vela G.R. et Wu J.F. (1979). Mechanism of lethal action of 2.450-MHz radiation on microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. **37** (3) : 550-553.

- Vergne M.** (2000). Effets des champs électromagnétiques sur l'activité métabolique de la bactérie *Escherichia coli*. Thèse de Doctorat Biologie Santé, Limoges (2000LIM).
- Verschaeve L. et Maes A.** (1998). Genetic, carcinogenic and teratogenic effects of radiofrequency fields. *Mutat Res.* **410** (2) : 141-165.
- Villamiel M., Lopez-Fandino R., Corzo N., Martinez-Castro I. et Olano A.** (1996). Effects of continuous flow microwave treatment on chemical and microbiological characteristics of milk. *Z Lebensm Unters Forsch.* **202** (1) : 15-18.
- Villamiel M., Lopez-Fandino R. et Olano A.** (1997). Microwave pasteurization of milk in a continuous flow unit. Effects on the cheese-making properties of goat's milk. *Milchwissenschaft.* **52** (1) : 29-32.
- Watanabe K., Kakita Y., Kashige N., Miake F. et Tsukiji T.** (2000). Effect of ionic strength on the inactivation of micro-organisms by microwave irradiation. *Lett Appl Microbiol.* **31** (1) : 52-56.
- Wayland J.R., Brannen J.P. et Morris M.E.** (1977). On the interdependence of thermal and electromagnetic effects in the response of *Bacillus subtilis* spores to microwave exposure. *Radiat Res.* **71** (1) : 251-258.
- Weisbrot D.R., Khorkova O., Lin H., Henderson A.S. et Goodman R.** (1993). The effect of low frequency electric and magnetic fields on gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* **31** (2) : 167-177
- Welch W.J.** (1993). Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **339** (1289) : 327-333.
- Welt B.A., Tong C.H., Rossen J.L. et Lund D.B.** (1994). Effect of microwave radiation on inactivation of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spores. *Appl Environ Microbiol.* **60** (2) : 482-488.

Woo I.S., Rhee I.K. et Park H.D. (2000). Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. *Appl Environ Microbiol.* **66** (5) : 2243-2247.

Wouters P.C., Bos A.P. et Ueckert J. (2001). Membrane permeabilization in relation to inactivation kinetics of *Lactobacillus* species due to pulsed electric fields. *Appl Environ Microbiol.* **67** (7) : 3092-3101.

Wu Q. (1996). Effect of high-power microwave on indicator bacteria for sterilization. *IEEE Trans Biomed Eng.* **43** (7) : 752-754.

Yee K.S. (1966). Numerical solution of steady state electromagnetic scattering problems using the time dependant Maxwell's equations. *IEEE Trans Antenna Propagation.* **23** (8) : 623-630.

Yonemoto Y., Yamashita T., Muraji M., Tatebe W., Ooshima H., Kato J., Kimura A. et Murata K. (1993). Resistance of yeast and bacterial spores to high voltage electric pulses. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **75** : 99-102.

Zhang Q., Monsalve-Gonzales A., Barbosa-Canovas G.V. et Swanson B.G. (1994). Inactivation of *E. coli* and *S. cerevisiae* by pulsed electric fields under controlled temperature conditions. *Transactions of the ASAE.* **37** (2) : 581-587.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Publication 1

EFFECT OF DISCONTINUOUS MICROWAVES (2.45 GHz) ON *ESCHERICHIA COLI* MEMBRANE: INVESTIGATIONS ON THERMAL VERSUS NON THERMAL EFFECTS.

Carole Rougier¹, Philippe Lévêque², Floriane Solano-Serena¹, Chantal Jayat-Vignoles³,
Abderhamann Maftah¹ and Patrick Leprat^{1*}.

¹ EA3176, Institut des Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Limoges, 123, av. Albert Thomas, 87060 LIMOGES CEDEX, FRANCE.

² UMR CNRS 6615, Institut de Recherche en Communications Optiques et Micro-ondes (IRCOM), Université de Limoges, 123, av. Albert Thomas, 87060 LIMOGES CEDEX, FRANCE.

³ Service commun de Cytométrie en flux, Université de Limoges, 123, av. Albert Thomas, 87060 LIMOGES CEDEX, FRANCE.

* Correspondence to : Patrick LEPRAT

Institut des Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Limoges

123, av. Albert Thomas

F-87060 Limoges cedex, FRANCE

E-Mail : leprat@ensil.unilim.fr

Tel: 33 (0)5-55-42-36-50

Fax: 33 (0)5-55-42-36-80

Contract grant sponsor : PDZR program co-financed by the European Community and “Région Limousin”

Running title : 2.45 GHz discontinuous microwave and *E. coli* membrane

ABSTRACT

The influence of 2.45 GHz discontinuous microwave (DW) irradiation (ranging from 200 to 2000 W peak power) has been studied on *Escherichia coli* membrane under exposure conditions leading to an average cell suspension temperature of 37°C, a temperature which corresponds to the optimal metabolic activity of this bacterial strain. DW exposure involved a heating phase of exposure, corresponding to the time to rise to this average temperature from room temperature (20°C), and a phase to maintain the temperature conditions consisting of sequences of exposure and non-exposure phases. No effect was detected when bacteria were exposed to conventional heating (performed as control) or 200 W, whereas cell membrane integrity was slightly altered when cell suspensions were submitted to powers ranging from 400 to 2000 W (from 5 to 8 % of permeabilized cells). The initial phase of exposure (i.e. heating phase) seemed to be responsible for the observed effects on membrane permeability. Such effects on cell membrane permeability might be related to the rapid rise of cell-sample temperature. Regardless of the treatment and the exposure time duration, no measurable leakage of proteins was detected in the liquid culture medium. Specific investigations of bacteria with modified membrane integrity after microwave-exposure suggested that effects were reversible for a part of those cells. Thermal characterizations of the microwave-exposed cell suspension revealed a heterogeneity of temperature distribution during the rise time. The simulated specific absorption rate (SAR) distributions confirmed this heterogeneity. The existence of hot spots (45 +/- 1°C) in the microwave-exposed cell suspension, revealed by experimental temperature measurements, cannot by themselves explain the modification of *E. coli* membrane integrity. However, simulated SAR values indicated that a part of the cell suspension could reach temperatures able to induce the observed effects on cell membrane.

Key Words : discontinuous microwaves, *Escherichia coli*, membrane permeability.

INTRODUCTION

Studies on the effects induced by microwave (MW) radiation on biological systems are of growing interest, because of the proliferation of microwave devices, such as microwave ovens or mobile phones. Identifying and evaluating the biological effects of MW is a complex and controversial process.

With the increasing use of mobile telecommunication in recent years, the bioeffects of low power MW have been studied on various cellular functions including gene expression [Harvey and French, 1999; Ivaschuk *et al.*, 1997], enzyme activity [Litovitz *et al.*, 1997] and cell proliferation [French *et al.*, 1997; Pennequin *et al.*, 2000; Stagg *et al.*, 1997; Velizarov *et al.*, 1999]. It is well known that microwaves induce a rapid temperature rise due to intermolecular friction [Chipley, 1980; Goldblith, 1966], and many of the observed biological effects have been attributed to the heat generation of lower power MWs. However, several authors have shown or suggested the existence of non thermal effects. Nevertheless, no satisfactory mechanism has ever been proposed to explain the existence of such bioeffects.

Numerous studies at powers higher than those involved in mobile communication systems have been also performed, in particular for microbial decontamination processes. Whereas some experiments showed that the bactericidal effects of microwaves were due to thermal mechanisms [Atmaca *et al.*, 1996; Levre and Valentini, 1998; Rosaspina *et al.*, 1993, 1994a, b; Sahin *et al.*, 1998; Salvatorelli *et al.*, 1996; Woo *et al.*, 2000; Wu, 1996], others suggested, non thermal or enhanced thermal effects [Dreyffus and Chipley, 1980; Khalil and Villota, 1988; Kozempel *et al.*, 1998, 2000; Tajchakavit *et al.*, 1998].

One of the main reasons for these conflicting conclusions, either for low or high power MW, is the difficulty in keeping and controlling isothermal conditions during MW irradiation.

In order to understand the mechanisms of interaction between MW and micro-organisms, temperature conditions must be controlled at each point of the overall exposed sample. The

purpose of this study was to investigate the bioeffects of 2.45 GHz – MW under exposure conditions where the average temperature of the cell suspension was maintained at 37°C. The study examined the possible thermal versus non thermal effects of short duration MW exposure on the cell membranes of *Escherichia coli* which have an optimum metabolic activity of 37°C. Microwave irradiation of bacteria was performed with a specific protocol, resulting in a discontinuous MW exposure to maintain the average temperature of the bacterial cell suspensions at 37°C. *E. coli* cells were exposed to 200 – 2000 W discontinuous microwaves (DW) for different periods of time. The effect of DW exposure on cell membrane was investigated using flow cytometry (FCM), with propidium iodide (PI) stained cells. Temperature distributions and FDTD calculations have been carried out on the DW – exposed cell suspension. For each experiment, conventional heating (CH) in a water bath at 37°C was performed as control sample.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and culture conditions.

An indigenous strain of *Escherichia coli*, initially isolated from a municipal wastewater, was obtained from the stock culture of our laboratory.

For flow cytometric analyses, a starter culture of *E. coli* was grown on a rotary shaker (250 rpm) at 37°C for 12 h to late exponential growth phase, in peptone water (DIFCO, Becton Dickinson, MD, USA), containing 10 g/l peptone and 5 g/l sodium chloride. Cell concentration was estimated by measuring the absorbance at 580 nm and adjusted to 10⁶ cells/ml using sterile culture medium. 5 ml of this bacterial suspension was used for conventional heating (CH) and discontinuous microwave (DW) exposure. After exposure, a 300 µl aliquot was analyzed by flow cytometry (FCM) as stated below. When cell sorting was performed, the discriminated populations were collected in 500 µl of Luria Bertani (LB) medium containing 10 g/l bactotryptone (DIFCO, Becton Dickinson, MD, USA), 5 g/l yeast extract (DIFCO, Becton Dickinson, MD, USA) and 10g/l sodium chloride (PROLABO, France). The culturability of each sorted population was tested by plating a 100 µl aliquot on plate count agar (DIFCO, USA) containing 5 g/l pancreatic digest of casein, 2.5 g/l yeast extract, 1 g/l dextrose and 15 g/l agar. After incubation at 37°C for 48 h, colony-forming units (CFU) were evaluated.

For protein assay, a starter culture was grown on a rotary shaker (250 rpm) at 37°C for 12 h in peptone water (MERCK, Germany) containing 10 g/l peptones, 5g/l sodium chloride and 10.5g/l phosphate buffer. Cell concentration was adjusted to 10⁸ cells/ml using phosphate buffered saline pH 7.4 (SIGMA, France). 5 ml of this bacterial suspension was then submitted to CH or DW exposure. Protein content was performed using 1 ml aliquot, as stated below.

Control cells and sham exposed cells were treated like cells submitted to CH or DW exposure for flow cytometric analysis and protein assay.

Microwave exposure.

- **Exposure system**

The discontinuous microwave (DW) exposure system (Fig. 1) consisted of a function generator (Agilent, model 33120 A, CA, USA) (G1), a 2.45 GHz microwave generator (SAIREM, model GMP 20 KE/D, France) (G2) containing an internal cooling system for the magnetron, an isolator (IS) with an another cooling system for dissipating the reflected power and protecting G2, a bi-directional coupler (BC) with two power meters – PM1 which measures incident power (P_i) and PM2 which measures reflected power (P_r) . A metallic cylindrical cavity (A) (Fig. 2) was used to expose the samples. 5 ml of bacterial suspension was irradiated in glass tubes.

Due to the cavity size, a TE₁₁₁ mode is excited. It presents E field maximum values in the center of the cavity when this one is empty. The resonant frequency is adjusted changing the cavity height by screwing two dumbbells. A good isolation is obtained using quarter wavelength transitions (30.5 mm). The cavity is feed by a rectangular waveguide (WR340, size 86 x 43 mm) through a circular aperture. A manual tuner (MT, Fig. 1) (SAIREM, A13SMA 2450/340, France) is used to match the system and reduce the SWR (Standard Wave Ratio).

The test tube is placed inside the cavity through a circular aperture centered in the dumbbell. The cutoff frequency of the waveguide defined by this aperture is higher than the working frequency (2.45 GHz) and the evanescent wave is strongly attenuated because of the dumbbell length.

The function generator (G1) was programmed to deliver repetitive square wave pulses. Sequences for DW exposure have been defined according to the microwave power and the average final temperature desired (37°C). They involved the two following stages : an initial

heating exposure phase (H), to rise from room temperature to 37°C, and a second phase to maintain the average temperature at 37°C (M), corresponding to repetitive trains of exposure (E) and non exposure (NE) phases. A 2.45 GHz CW (Continuous Wave) microwaves was used during H and E phases. For example, Figure 3 shows the protocol used for a 200 W exposure. The cell suspension was gently shaken before and immediately after each exposure phase. Durations of H and E phases were determined for each applied power ranging from 200 to 2000 W (Table 1). DW exposures were performed over different periods of time, up to 30 min. The temperature of the cell culture in the glass test tube was routinely measured with a Teflon coated thermocouple (CTX 1200, AVANTEC, France). Temperature measurements were performed both before exposure and after gentle shaking following the exposure. Control cells and sham exposed cells were maintained at room temperature (20°C) and sequentially gently shaken. Sham exposed cells were placed in the metallic cavity without exposure.

- **Thermal characterization**

Thermal characterization of exposed cell suspension was performed with a fluoroptic thermometer (Luxtron, model 501, CA, USA). Point-to-point thermal measurements were carried out over the 3 dimensions of the tube volume with a 1 or 2 mm spacing along the height of the sample and a 3 mm spacing in the two other dimensions. For each measurement, the bacterial sample was maintained at room temperature (20°C) and the temperature was recorded during the initial exposure phase (H) and for 1 min after the end of H (i.e. during NE phase). The spatio-temporal distributions of temperature was monitored in the cell suspension for exposure of 200, 400, 800, 1400 or 2000 W.

- **Dosimetry**

The Finite Difference Time Domain (FDTD) method [Kunz and Luebbers, 1993; Taflove, 1995] was used to determine the SAR distributions in the tube. The computations were performed on a NEC SX5 vectorized supercomputer with 40 processors and 128 Gbytes of shared memory. The finest resolution used was 1 x 1 x 1 mm, corresponding to a computational domain size of (320 x 123 x 123). The waveguide, matching system, metallic cylindrical cavity and coupling aperture were simulated and resulted in a grid with approximately 4.8 million cells. The excitation was done with a rectangular waveguide. The dielectric parameters used in this study were those of a typical aqueous medium. At 2.45 GHz and 37°C, the biological medium was modeled with a relative permittivity of 75, a conductivity of 2.85 S/m and a density of 1000 kg/m³. The glass material of the tube was modeled as lossless with relative permittivity of 7.5.

Conventional heating.

Conventional heating (CH) was performed in a shaking water bath (LAUDA, model A 120 T, Germany) at 37°C +/- 1°C. As for DW exposure, glass tubes containing 5 ml of bacterial suspensions were used. The temperature of the cell culture in the test tube was routinely measured by a Teflon-coated thermocouple (CTX 1200, AVANTEC, France). The time needed for the cell suspension in the water bath to reach 37°C from room temperature was determined to be 75 s using the fluoroptic probe (Luxtron, model 501, CA, USA). The test tube was regularly gently shaken.

Cell staining and flow cytometric analyses.

- **Propidium iodide (PI) staining.**

Cells were stained using PI (Molecular probes, OR, USA), which is a DNA binding probe. Since it could diffuse into cells only if their membranes are damaged, PI is also considered as

a probe for the evaluation of membrane integrity [Barbesti *et al.*, 2000]. Stock solution of PI was prepared in distilled water at a final concentration of 0.5 mg/ml and was stored in the dark at 4°C. PI was added to bacterial suspension at a final concentration of 25 µg/ml during CH or DW treatment or immediately after exposure. Cell suspensions were incubated with the probe for a total time of 5 min before flow cytometric analyses.

- **Flow cytometric analyses.**

Flow cytometric analyses were performed using a FACS Vantage cell sorter (Becton Dickinson, MD, USA) equipped with a 488 nm argon laser (excitation wavelength of PI). PI red fluorescence was collected with a 600 nm long pass filter and bacteria green autofluorescence was collected with a 530 (30) nm band pass filter. Four parameters were recorded : FSC (Forward Scatter) related to cell size, SSC (Side Scatter) related to cell structure, red fluorescence of PI related to cell membrane integrity and green autofluorescence of bacteria. The results were analyzed with red versus green fluorescence cytograms, since bacteria green autofluorescence enabled a better bacterial population separation from background noise and cellular debris than FSC or SSC. FSC and fluorescences were collected in 4 decades logarithmic scale whereas SSC was collected in linear scale. The photomultiplier voltage was chosen such that control suspension (untreated *E. coli* suspension) had no red fluorescence above the first decade. A minimum of 10 000 cells were analyzed at a flow rate of approximately 500 cells/second.

- **Cell sorting.**

Sterile sorting experiments were performed according to red relative fluorescence intensity of cells (membrane integrity). In the dot plot red versus green autofluorescence, regions of highly (R1) and low (R2) PI-stained cells were defined as sort gates (Fig. 4). For each

experiment, dead bacterial cells (heated at 80°C during 15 min) were sorted and cultured on solid culture media to control for the sterility of the cell sorter. No PI-stained cells (control cells) were also sorted in order to verify that cell sorting had no influence on bacteria growth. For each sample, 10 000 R1- or R2- cells were collected in separate tubes containing LB medium as described above.

Measuring protein leakage.

The amount of protein released from the DW- and CH-treated cells was measured at 595 nm by the Bradford method [Bradford, 1976] using the BIO-RAD protein assay dye reagent (BIO-RAD S.A., Germany). Bovine serum albumin was used as the standard protein. After treatment (CH or DW exposure), an aliquot of 1 ml was centrifuged at 9000 rpm (Biofuge fresco, HERAEUS Instruments, Germany).

Data analysis.

Exposures were compared with simultaneous sham and control cells in both cases.

All the results presented in this study are from a minimum of four independent experiments. Assays on cell properties (culturability, membrane integrity and protein leakage) for control cells, sham exposed cells and CH- or DW- exposed cells were performed on 9 independent experiments with 5 measures per experiment. All data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). For group comparison, an analysis of variance (ANOVA) test was used. Due to the weakness of microwave non thermal effects and experimental facility, a 1% significance level (p) was used. Statistical analyses were carried out using SYSTAT version 7.0.

RESULTS

The effect of DW exposure on *Escherichia coli* membrane was assessed by comparison with CH in a water bath. 5 ml of bacterial suspensions were exposed to DW or CH at 37°C over different periods of time, up to 30 min. DW exposure was carried out at different powers: 200, 400, 800, 1400 and 2000 W. DW exposure consisted of two steps: an initial heating phase (H) to rise from room temperature to the average temperature of 37°C in the cell suspension and a phase to maintain the temperature at 37°C (M) during the treatment up to 30 min. This second step (M) involved repetitive train of exposure (E) and non exposure (NE) phases (Fig. 3). The duration of H, NE and E phases was determined according to the power level and the average final desired temperature (37°C) (Table 1). The average temperature measured by the thermocouple was approximately equal to 37 +/- 1°C at the end of H and E phases and 35.5 +/- 1°C at the end of each NE phases. The SAR distribution was investigated using FDTD simulation in order to characterize the exposure conditions. Simulations of SAR distributions in a DW-exposed cell sample showed a great heterogeneity : simulated SAR could reach 0,89 W/g at the maximum (Table 2). Simulations showed that during the initial phase (H) SAR peak values were very high, ranging from 38 W/g for 200 W incident power, to 380 W/g for 2000W incident power (Table 3). In the M phase, the average values over the time of the simulated SAR reached 0.125 W/g for all incident applied powers (Table 3). Nevertheless, this phase did not induce a temperature rise because the temperature difference between the cell sample (approximately at an average temperature of 37°C) and the surrounding air in the cavity (approximately at room temperature) was important. With 0.125 W/g, thermal effect could occurred. However, M phase consisted of alternative very short time duration of exposure (E) and non exposure (NE) phases that did not induce temperature rise.

For both treatments (CH or DW), the numeration of culturable cells on nutrient solid media after treatment did not show any statistically measurable cell mortality (data not shown). Our

investigations focused afterwards on the effect of DW at the level of the cell membrane. In fact, several reported data showed that electric or electromagnetic fields in non-thermal conditions might generate damage to cell membranes [Phelan *et al.*, 1994]. Cell membrane integrity was assessed using propidium iodide (PI) incorporation, detected by FCM. Red versus green fluorescence intensities showed three cell populations after treatment: a highly PI-stained cell population (R1), a low PI-stained cell population (R2) and a no PI-stained cell population (R3) (Fig. 4). The percentage of fluorescent cells in the R1 population versus total cell population after DW exposure and CH is shown in Figure 5. The time durations of DW exposure reported on the abscises axis (X), corresponded to H + X (NE + E). For example, a time duration noted as 5 corresponded to H + 5 (NE + E) for DW exposure and to 5 minutes for CH. Thus, the real time of microwave exposure was H + 5 E. Cell suspension exposed at 37°C with CH exhibited 0.4 to 0.7 % of R1-permeabilized cells regardless of the exposure duration (Fig. 4B, Fig. 5). In such conditions, no statistically significant differences of membrane integrity were found, compared to results obtained with control and sham exposed cell suspensions maintained at room temperature which exhibited 0.3 to 0.5 % of R1-cells (Fig. 4A). DW exposure induced approximately 8 % of R1-cells at the maximum (Fig. 4C, Fig. 5). Results were statistically significant ($p = 0.001$) from 400 to 2000 W-exposure. For all exposure durations, the percentage of R1-permeabilized cells was slightly greater for bacterial suspensions exposed to 400 or 800 W, than for suspensions exposed to 1400 or 2000 W (Fig. 5). No statistically significant effect on cell permeability was detected for 200 W-DW exposures compared to CH treatment. By adding R1- and R2-cells, 9 - 10 % of cells with modified membrane integrity were found for 400 W-DW exposure, whereas only 0.8 - 1 % was detected for 200 W-DW exposure or CH and 0.5 - 1 % for control and sham exposed cells maintained at 20°C (data not shown). Increasing exposure times (up to 30 min) did not induce an increase in the percentage of permeabilized cells. Thus, the H phase appeared to be

responsible for most of the measured effects on membrane integrity. Moreover, for a cell suspension previously heated at 37°C with CH and submitted to the M phase (up to 15 min) using microwaves, no effect on membrane integrity was detected (data not shown). Because the modifications on membrane integrity after H phase might be related to the existence of localized hot spots in the cell suspensions exposed to DW, the effect of high temperatures on membrane integrity have been studied. Experiments were performed at different temperatures from 37°C to 50°C in order to determine which temperature could induce 8 % of R1-permeabilized cells. Conventional heating at 47°C for 10 min or at 48°C for 5 min was necessary to induce approximately the same effect (Fig. 6).

Another parameter studied was the amount of protein released in the culture medium, since the leakage of cell components in the culture medium could be an indication of a loss of membrane integrity. Exposure to CH in a water bath or to DW induced no statistically significant effects on protein leakage, regardless of the microwave power and the exposure time (data not shown).

Membrane damage could induce cell mortality or damage could be repaired, according to the extent of damage. Consequently, further investigations have been focused on bacterial cells with modified membrane permeability following PI staining. In order to determine the viability of bacterial cells after CH or DW exposure, cell sorting on the different PI-stained cell populations (Fig. 4) was carried out by FCM. Samples were exposed to an average temperature of 37°C with DW (200, 400, 800, 1400 or 2000 W) or in a water bath only during H, since the effect of DW on membrane integrity appeared immediately after this initial phase. Bacterial cells which incorporated PI (R1 and R2 populations) were separately sorted. 10000 cells were collected for each sample and the culturability of the bacterial cell populations on solid media was determined. The average percentage of culturable R1-cells to total R1-cells collected was reported in Figure 7. Approximately 3 - 4% of R1-cell population

were culturable after PW exposure, whatever the power. The culturability of CH-treated R1 cells seemed to be slightly higher than the culturability of DW-exposed R1 cells (Fig. 7), but the difference between the two treatments was not statistically significant. For R2-cells, the percentage of culturable cells was greater (approximately 8%) than that for R1-cells (data not shown). In fact, since R2-cells were less damaged, they had a better culturability than R1-cells.

Because modifications of cell membrane integrity after DW exposure might be attributed to localized thermal effects, further investigations were carried out to search for hot spots in the cell suspension. Temperature measurements were carried out on DW-exposed samples during H and 1 min after exposure. The spatio-temporal temperature distributions were identical for the different power levels (200 - 2000 W). Figure 8 represents the temperature distribution along the central axis of a 400 W-DW exposed sample. The results showed a heterogeneous spatio-temporal distribution of temperature : the top of the cell suspension was hotter than the bottom (Fig. 8). However, the cooling time (during 1 min) was faster at the bottom than at the top of the suspension, probably because of the existence of convection phenomena. A rapid rise of temperature during this H phase was observed in all measured points. Nevertheless, point-to-point measurements over the three dimensions of the sample volume did not show localized spots higher than $45 \pm 1^\circ\text{C}$ after H. The area containing the measured spots higher than 37°C was approximately located between 0 - 8 mm below the meniscus of the cell suspension (Fig. 8). Simulations of SAR distribution in a DW-exposed cell sample confirmed the temperature heterogeneity of the sample detected by thermal measurements (Fig. 9). However, the maximum simulated SAR value could reach approximately 0.89 W/g for 1 W incident power (Table 2). Considering only the H phase, hot spots could reach approximately 97°C at the maximum for 400 W incident power during H (1.15 s) with the formula: $\text{SAR (W/kg)} = C \delta T / \delta t$, where C ($\text{J.K}^{-1}.\text{kg}^{-1}$) is the specific heat of water, T ($^\circ\text{K}$) the temperature

and t (s) the time. This calculation did not include convection and conduction phenomena, so hot spots probably did not reach such a temperature value. Since SAR is related to a rise in temperature, the maximum SAR value and the standard deviation suggested the presence of hot spots in the exposed cell suspension.

DISCUSSION

Despite many studies on low and high power MW effects on biological systems, the mechanism responsible for the observed bioeffects remained uncertain. They are generally attributed to thermal effects of MW exposure.

In this study, we have developed a low temperature process using DW energy to investigate their effects on microorganisms under temperature conditions where average temperature was 37°C.

Our results showed that DW exposure at 37°C did not induce any *Escherichia coli* mortality (culture on solid media), but had effect on membrane integrity (PI staining) of a small part of the bacterial population. We found approximately 8 % of R1-permeabilized cells when bacterial cells were irradiated at 400 or 800 W, while conventional heating at 37°C did not induce any effect on membrane permeability comparatively to untreated (sham and control) cell suspensions. The initial exposure phase (H) was responsible for the detected modification in cell membrane permeability and increasing exposure duration did not induce additional effects. Such observations might be related to the rapid rise in temperature and more precisely to the amplitude of temperature rise which was higher for H (approximately 17°C) than for E (approximately 1.7°C). These effects might also be related to the temperature distribution in the sample after the initial exposure (Fig. 8). In fact, we could suppose that there was hot spot formation in the sample, responsible for the damage on cell membrane integrity. The simulated SAR distributions corroborated this hypothesis (Table 2, Fig. 9). Initially, we showed that a conventional heating at 47°C for 10 min or at 48°C for 5 min (Fig. 6) was necessary to induce the same effects than 400 or 800 W-PW exposure. Moreover, thermal measurements during H (1.15 and 0.575 s for respectively 400 and 800 W) revealed a heterogeneous temperature distribution in the cell suspension but we did not measure spots above 45 +/- 1°C over the three dimensions of the cell suspension volume (Fig. 8). Those

experimental data suggested that the temperature of DW-exposed samples did not reach sufficient values for a sufficient time to explain the measured modification of cell membrane integrity.

However, simulations of SAR distribution indicated a possible hot spot formation in the DW-exposed cell sample. Figure 9C suggested that the part of permeabilized cells detected by FCM after DW exposure corresponded to the part of the voxels that reached strong SAR values. Our results could be then explained by the thermal mechanism of microwave exposure. Nevertheless, other phenomena like conduction and convection occurred during heating treatment and then thermal effects induced by microwaves could mask the other microwave effects, if they exist. The fact that the experimental data did not show any point over 45 ± 1 °C might be due to the limits of the fluoroptic probe. Those limits were the spatio-temporal temperature resolution of the thermometer and the fact that it provides only point measurement [Nott and Hall, 1999].

During M phase, the SAR mean reached 0.125 W/g. Even if this SAR value was higher than SAR value used for normalization (4 W/kg), M phase did not induce additive effect on membrane integrity. However,

In the electroporation theory [Sowers, 1992], cell membrane pore formation generally results in cell material leakage and, sometimes, in cell lysis. The fact that no protein leakage was measured in DW-exposed samples was probably due to the low percentage of permeabilized cells. Moreover, nature and extent of membrane damage might be not sufficient to allow release of cell components. We showed that approximately 3 - 4 % of R1-permeabilized cells (and 8 % of R2-cells) were able to grow on solid media. This percentage was likely underestimated, since it is well known that PI induced cytotoxic effects and consequently inhibited cell growth ability. However, these results suggested that DW exposure at 37°C could induce modification of cell membrane fluidity. Generally, when bacterial cells are

stained using PI, following a treatment inducing modification on cell permeability, PI-stained cells sorted by FCM are unable to grow. Such results were related to irreversible damage to the cell membrane and/or to cytotoxic effects of high PI concentration incorporated within cells. In our case, a fraction of PI-stained cells was culturable after cell sorting; this result meant that the amount of PI incorporated was not sufficient to induce any cytotoxic effect. Moreover, longer incubation of cells with PI after DW exposure did not induce higher PI incorporation. These results demonstrated that the membrane permeability of R1- and R2-cells was slightly modified following DW exposure and we could suppose that the effects are reversible. Such considerations would be in agreement with the absence of protein leakage. Those effects led us to think that DW exposure under our experimental conditions might induce reversible membrane fluidity modification. Such hypothesis could join Orlando *et al.* (1994) study on liposomes, which reported that microwaves could not induce membrane disruption, but could induce pore formation. Consequently, the dielectric cell-membrane rupture theory [Zimmermann *et al.*, 1974] may not be advanced to explain the DW-induced effects on membrane permeability. Finally, by considering only thermal measurements, the effects on membrane permeability could be due to non-thermal mechanism of microwave. Nevertheless, by considering dosimetry data, the modification of membrane fluidity could be explained by the presence of hot spots in the DW-exposed samples, i.e. the thermal mechanism.

CONCLUSION

This study showed that 2.45 GHz-DW exposure at 37°C induced *Escherichia coli* membrane modifications. Even if the overall temperature of the exposed-sample was measured at 37°C, simulation of SAR distributions indicated hot spots formation in the cell suspension during exposure. Those hot spots were potentially able to induce measured effects on membranes even if dosimetry did not include conduction and convection phenomena. However, temperature measurements with a fluoroptic thermometer showed heterogeneous temperature distribution, but no spots higher than 45 +/- 1°C. Those results showed the limits of experimental measurements because simulated hot spots detected with dosimetry were not detectable with temperature measurements. Finally, our study showed that the observed effects of DW exposure on cell membrane were probably due to a DW-induced thermal mechanism. Nevertheless, those DW-induced thermal effects could mask other non-thermal effects of microwaves, if they exist.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Daniel Petit (ISVS, University of Limoges, France) for his help in the statistical analysis.

REFERENCES

Atmaca S, Akdag Z, Dasdag S, Celik S. 1996. Effect of microwaves on survival of some bacterial strains. *Acta Microbiol Immunol Hung* 43(4) : 371-378.

Barbesti S, Citterio S, Labra M, Baroni MD, Neri MG, Sgorbati S. 2000. Two and three-color fluorescence flow cytometric analysis of immunoidentified viable bacteria. *Cytometry* 40 (3) : 214-18.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 7 (72) : 248-54.

Chipley JR. 1980. Effects of microwave irradiation on microorganisms. *Adv Appl Microbiol* 26 : 129-145.

Dreyfuss MS and Chipley JR. 1980. Comparison of effects of sublethal microwave radiation and conventional heating on the metabolic activity of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 39(1) : 13-16.

French PW, Donellan M, McKenzie DR. 1997. Electromagnetic radiation at 835 MHz changes the morphology and inhibits proliferation of a human astrocytoma cell line. 1997. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 43 : 13-18.

Goldblith SA. 1966. Basic principles of microwaves and recent developments. *Advances in Food Research* 15 : 277-301.

Goldblith SA and Wang DIC. 1967. Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol* 15(6) : 1371-1375.

Harvey C and French P. 1999. Effects on protein kinase C and gene expression in a human mast cell line, HMC-1, following microwave exposure. *Cell biology International* 23 : 739-748.

Ivaschuk OI, Jones RA, Ishida-Jones T, Haggren W, Adey R Phillips JL. 1997. Exposure of nerve growth factor-treated PC12 rat pheochromocytoma cells to a modulated radiofrequency field at 836.55 MHz : effects on *c-jun* and *c-fos* expression. *Bioelectromagnetics* 18 : 223-229.

Khalil H and Villota R. 1988. Comparative study on injury and recovery of *Staphylococcus aureus* using microwaves and conventional heating. *J Food Prot* 51 : 181-186.

Kozempel MF, Annous BA, Cook RD, Scullen OJ, Whiting RC. 1998. Inactivation of microorganisms with microwaves at reduced temperatures. *J Food Prot* 61(5) : 582-585.

Kozempel M, Cook RD, Scullen OJ, Annous BA. 2000. Development of a process for detecting nonthermal effects of microwave energy on microorganisms at low temperature. *J Food Process Preserv* 24 : 287-301.

Kunz K, Luebbers R. 1993. *The Finite Difference Time Domain Method for Electromagnetics*, Boca Raton, Florida : CRC Press INC.

Levre E and Valentini P. 1998. Inactivation of Salmonella during microwave cooking. Zentralbl Hyg Umweltmed 201(4-5) : 431-436.

Litovitz TA, Penafiel LM, Farrel JM, Krauso D, Meister R, Mullins JM. 1997. Bioeffects induced by exposure to microwaves are mitigated by superposition of ELF noise. Bioelectromagnetics 18 : 422-430.

Nott KP, Hall LD. 1999. Advances in temperature validation of foods. Trends Food Sci Technol 10 : 366-374.

Orlando AR, Mossa G and D'Inzeo G. 1994. Effect of microwave radiation on the permeability of carbonic anhydrase loaded unilamellar liposomes. Bioelectromagnetics 15 (4) : 303-313.

Pennequin A, Piriou A, Mathieu J, Dabouis V, Sebbah C, Malabiau R, Debouzy JC. 2000. Non-thermal effects of continuous 2.45 GHz microwaves on Fas-induced apoptosis in human Jurkat T-cell line. Bioelectrochemistry 51 : 157-161.

Phelan AM, Neubauer CF, Timm R, Neirenberg J and Lang DG. 1994. Athermal alterations in the structure of the canicular membrane and ATPase activity induced by thermal levels of microwave radiation. Radiat Res. 137 : 52-58.

Rosaspina S, Anzanel D, Salvatorelli G. 1993. Microwave sterilization of enterobacteria. Microbios 76(309): 263-270.

Rosaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D. 1994,a. The bactericidal effect of microwaves on *Mycobacterium bovis* dried on scalpel blades. J Hosp Infect 26(1) : 45-50.

Rosaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D, Bovolenta R. 1994, b. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. Microbios 78(314) : 55-59.

Sahin A, Eiley D, Goldfischer ER, Stravodimos KG, Zeren S, Isenberg HD, Smith AD. 1998. The in-vitro bactericidal effect of microwave energy on bacteria that cause prostatitis. Urology 52(3) : 411-415 ; discussion 415-416.

Salvatorelli G, Marchetti MG, Betti V, Rosaspina S, Finzi G. 1996. Comparison of the effects of microwave radiation and conventional heating on *Bacillus subtilis* spores. Microbios 87 : 169-174.

Sowers AE. 1992. Mechanisms of electroporation and electrofusion. In : Chang DC, Chassy BM, Saunders JA and Sowers AE, editors. Guide of electroporation and electrofusion. Academic press, Inc. p 119-138.

Stagg RS, Thomas WJ, Jones RA, Adey WR. 1997. DNA synthesis and cell proliferation in C₆ glioma and primary glial cells exposed to a 836.55 MHz modulated radiofrequency field. Bioelectromagnetics 18 : 230-236.

Taflove A. 1995. *Computational Electrodynamics: The Finite-Difference Time-Domain Method*,. Nordwood, MA : Artech House.

Tajchakavit S, Ramaswamy HS and Fustier P. 1998. Enhanced destruction of spoilage microorganisms in apple juice during continuous flow microwave heating. *Food Res Int* 31 (10) : 713-722.

Velizarov S, Raskmark P, Kwee S. 1999. The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 48 : 177-180.

Woo IS, Rhee IK, Park HD. 2000. Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. *Appl Environ Microbiol* 66(5) : 2243-2247.

Woo IS, Rhee IK, Park HD. 2000. Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. *Appl Environ Microbiol* 66(5) : 2243-2247.

Wu Q. 1996. Effect of high power microwave indicator bacteria for sterilization. *Microbios* 76 : 263-270.

Zimmermann U, Pilwat G, Riemann F. 1974. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys J* 14 : 881-899.

ROUGIER, Table 1

Table 1: Exposure duration for DW exposure at 37°C, H corresponds to the heating phase, E to exposure and NE to non exposure phases (E+NE corresponding to the M phase which maintains the temperature).

	H (s)	NE (s)	E (s)
200 W	2.3	60	0.2
400W	1.15	60	0.1
800 W	0.575	60	0.05
1400 W	0.328	60	0.028
2000 W	0.23	60	0.02

ROUGIER, Table 2

Table 2: Simulated SAR values in the tube exposed in the metallic cylindrical cavity for 1 W incident power.

	Mean	Standard deviation	Max	Min
SAR, W/g for 1 W	0.189	0.198	0.89	4.10^{-4}
E, V/m for 1W	364	373	790	5.3

ROUGIER, Table 3

Table 3: Simulated SAR values for the heating phase (H) and the phase which maintains temperature (M) according to the exposure time duration.

		Incident power				
		200	400	800	1400	2000
		(W)				
H	SAR peak (W/g)	38	76	152	304	380
	Time duration (s)	2.30	1.15	0.575	0.287	0.23
M	SAR mean (W/g)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
	Time duration of E (s)	0.23	0.115	0.0575	0.0287	0.023

Figure 1 : Schematics of experimental DW exposure system : schematic representation (a), diagram (b). It consists of a function generator (G1), a 2.45 GHz microwave generator (G2), an isolator (IS), a bi-directional coupler (BC), power meters (PM), a matching system (MS) and an applicator (A).

Figure 2 : Schematic of the cylindrical applicator containing the test tube and of the waveguide R26 (86 mm x 43 mm).

Figure 3 : Protocol for 200 W - DW exposure at 37°C with the microwave signal shape (a) and the temperature evolution (b). **H** : heating phase to rise from room temperature to 37°C, **M** : phase to maintain the temperature at 37°C. M phase consisted of **NE** (Non Exposure) and **E** (Exposure) phases. A 2.45 GHz CW (Continuous Wave) microwave was used during H and E phases.

Figure 4 : Cytograms for untreated (A), conventionally heated (B), and DW-treated (400 W) (C) *E. coli* suspensions stained with PI.

Cytogram A corresponds to control cell suspension maintained at room temperature. Cell treatments for B and C were performed at 37 °C during the heating phase (rise from room temperature to 37 °C). Windows R1, R2 and R3 respectively correspond to highly, low and no PI stained cells.

Figure 5 : Effect of CH and DW exposure on membrane permeability ; ■ Conventional heating, □ 200 W, ▣ 400 W, ▤ 800 W, ▥ 1400 W, ▦ 2000 W.

Results are expressed as the ratio of the number of highly stained cells (R1) to the total cell population analysed (T). Exposure durations correspond to those defined in Results.

0* corresponds to the time necessary to rise from room temperature to 37°C. For DW-treated samples, it corresponds to the initial phase of exposure (H) as mentioned in table 1 and for CH-treated samples, this rise time was experimentally determined to be 75 s.

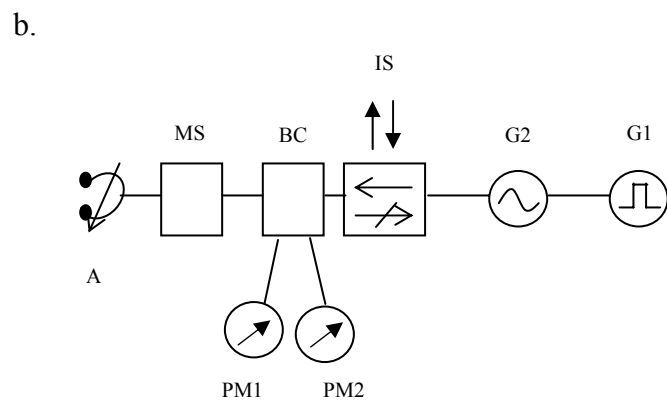
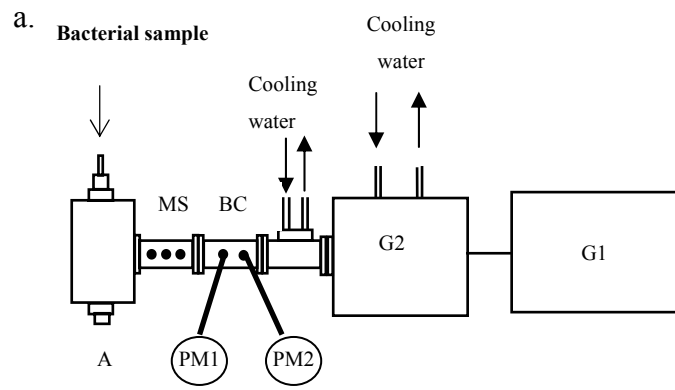
Figure 6 : Effect of conventional heating at different temperatures on membrane permeability. Results are expressed as the ratio of the number of highly stained cells (R1) to total cell population analysed (T).

The curve named “37 to 46 °C” corresponds to the average value of the results obtained from independent experiments at 37, 40, 42, 45 and 46°C, since percentages of highly PI stained cells were similar.

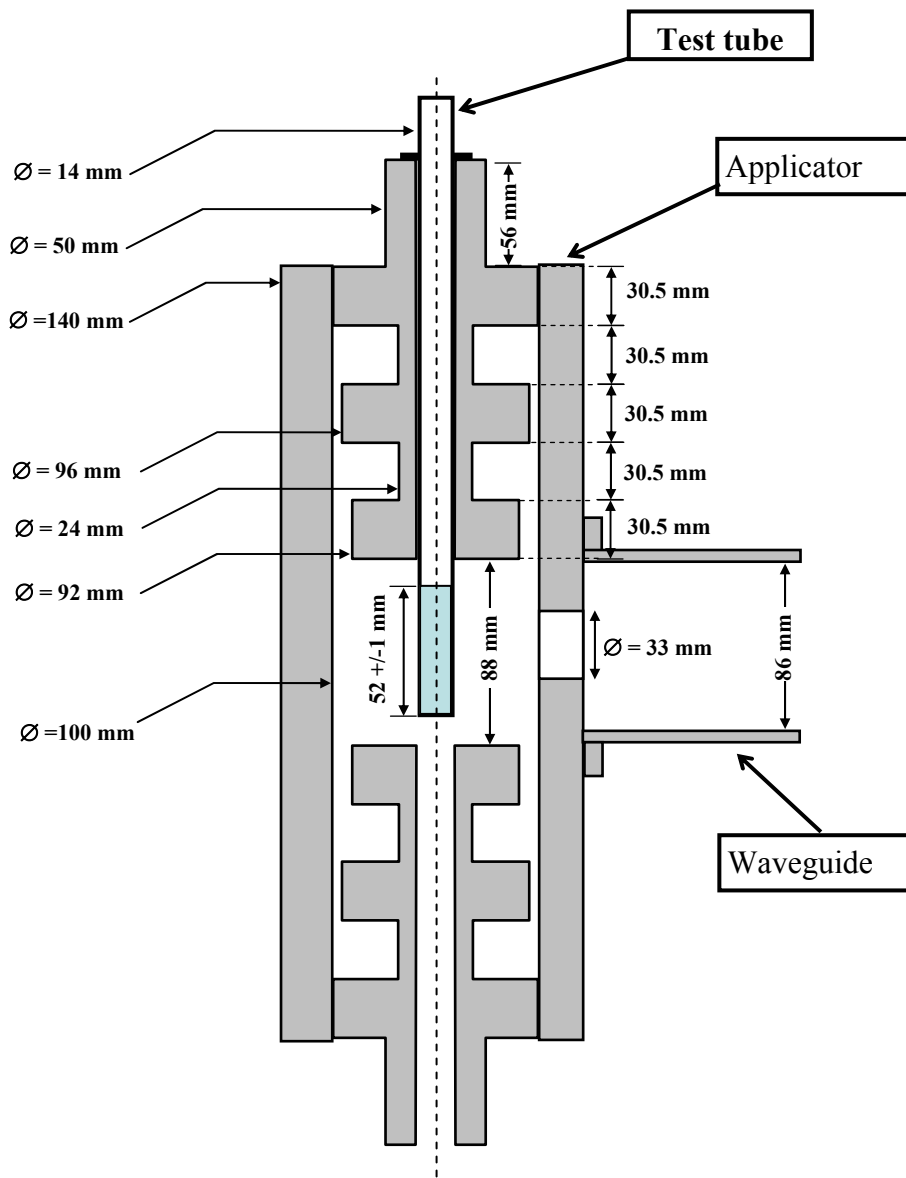
Figure 7 : Culturability of highly PI stained cells (R1 population) after the rise time from room temperature to 37°C for CH and H for DW exposure.

Figure 8 : Spatio-temporal distribution of temperature along the central axis of the test tube after cell suspension exposure at 400W during the heating phase (H) and 1min after.

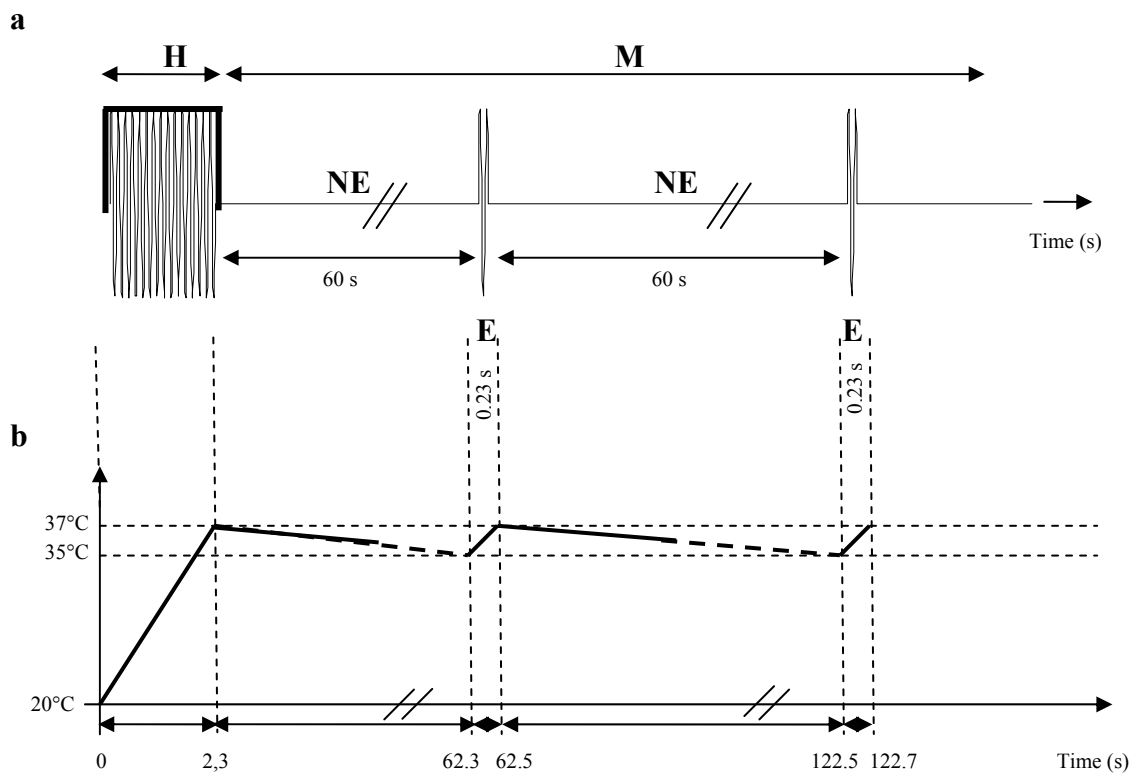
Figure 9 : FDTD calculated SAR for the whole medium exposed to 2.45 GHz fields. A: SAR distribution 3D view, B1: vertical plane, B2: horizontal plane, C: histogram of the voxels



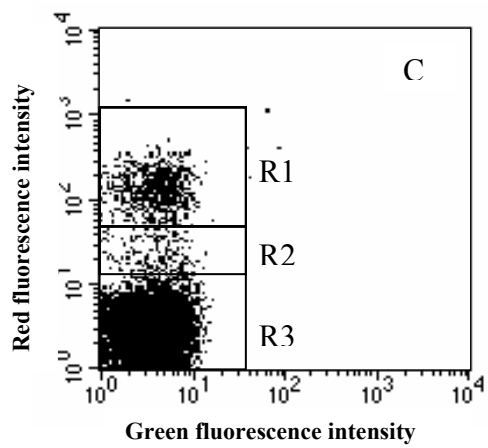
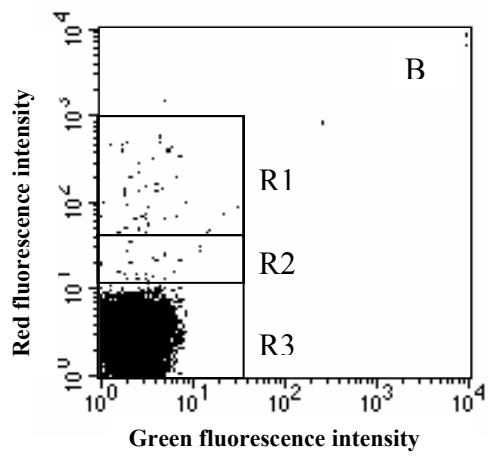
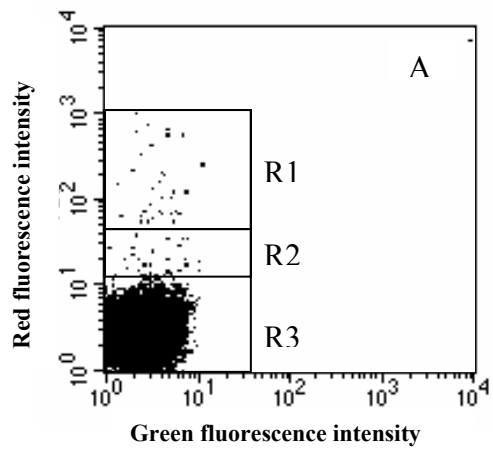
ROUGIER, Figure 1



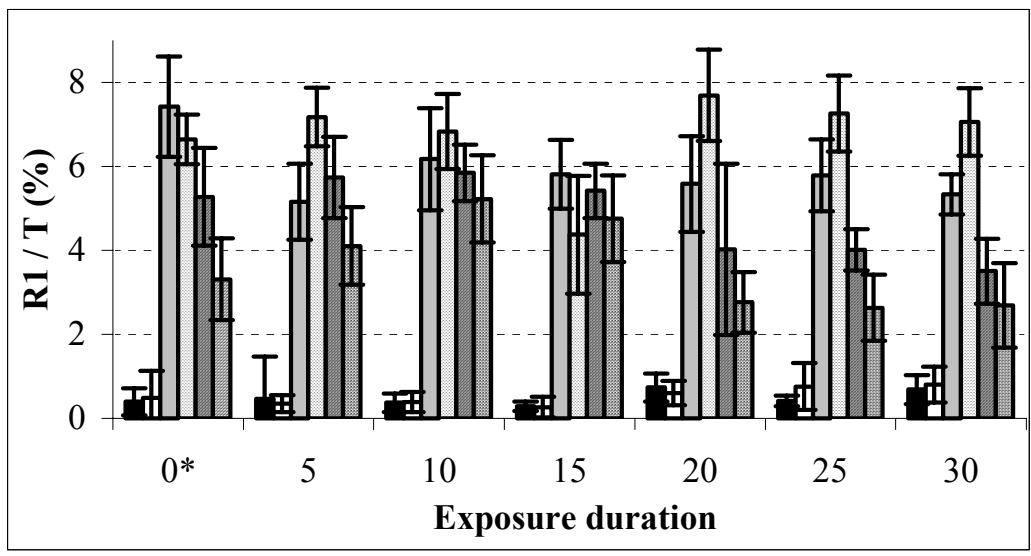
ROUGIER, Figure 2



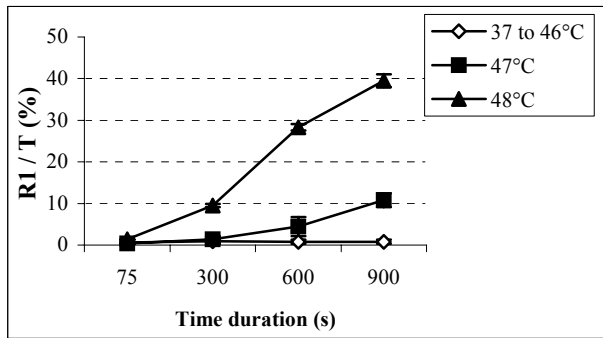
ROUGIER, Figure 3



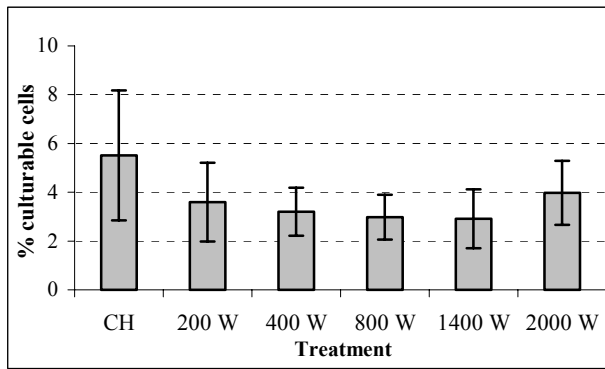
ROUGIER, Figure 4



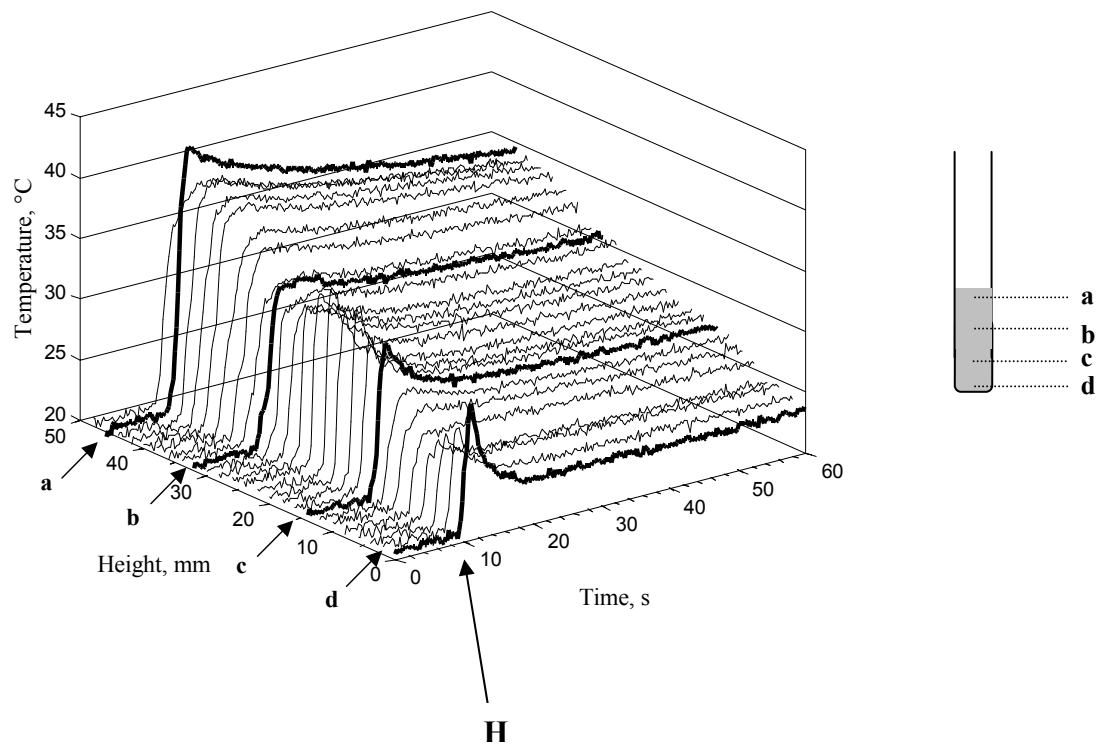
ROUGIER, Figure 5



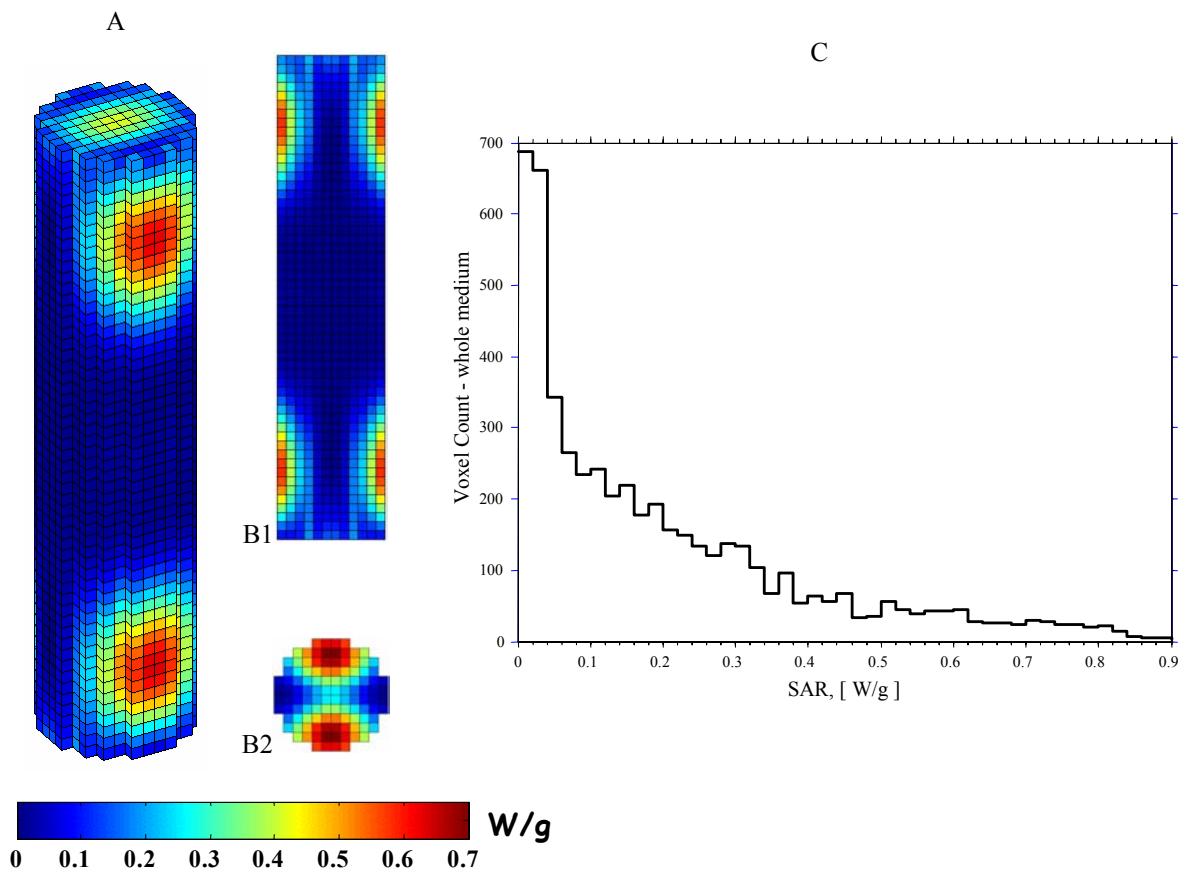
ROUGIER, Figure 6



ROUGIER, Figure 7



ROUGIER, Figure 8



ROUGIER, Figure 9

ANNEXE 2 : Quelques aspects réglementaires

Les normes et recommandations concernant l'exposition des personnes aux champs électromagnétiques sont établies au niveau international. Elles se répartissent en deux catégories distinctes. La première concerne l'évaluation des seuils ou valeurs limites des grandeurs physiques auxquelles les personnes peuvent être soumises sans préjudice pour leur santé.

La seconde porte sur les méthodes d'évaluation de l'exposition réelle des personnes aux équipements de téléphonie mobile et leur conformité aux valeurs limites.

Les limites d'exposition s'appuient sur les résultats des études menées dans le monde entier et publiées dans des revues avec comité de lecture.

L'avis général des comités est que l'effet néfaste trouvé chez l'animal au plus faible niveau d'exposition était une altération du comportement chez les macaques et les rongeurs. Les résultats expérimentaux indiquent qu'il s'agit clairement d'un effet thermique : cette altération se produit lorsque la puissance absorbée dans le corps, à la suite d'une exposition du corps entier, quantifiée par le débit d'absorption spécifique (DAS), atteint ou dépasse un seuil de **4 watts par kilogramme de masse corporelle (4 W.kg^{-1})**.

Par mesure de sécurité et pour tenir compte des incertitudes liées à l'extrapolation d'un modèle animal à l'homme, **la limite d'exposition a été fixée à $0,4 \text{ W.kg}^{-1}$ (DAS corps entier) en milieu professionnel**, ce qui constitue une réduction d'un facteur 10. Ce paramètre, qui conditionne l'existence d'un effet biologique pouvant être jugé comme néfaste pour la santé, constitue dans le langage des recommandations une « *restriction de base* ». Un facteur d'abattement supplémentaire de 5 a été introduit pour la population générale. **Le DAS limite d'exposition corps entier pour le public a donc été fixé à $0,08 \text{ W.kg}^{-1}$** .

Au total, le coefficient de sécurité entre les valeurs seuils pour l'apparition d'effets avérés chez l'animal et la valeur des restrictions de base est donc de 50, ce qui couvre implicitement les effets éventuels à long terme dans la totalité de la gamme de fréquences.

Des considérations dosimétriques et biologiques ont montré que lors d'une exposition à $0,08 \text{ W.kg}^{-1}$ – corps entier – certaines zones restreintes de l'organisme pouvaient absorber localement une puissance supérieure. Toutefois, certains organes, comme l'œil, sont plus

sensibles à un échauffement local de la température. Il a donc été proposé de fixer une valeur limite pour une exposition fortement localisée. Cette limite est exprimée par le Débit local d'absorption spécifique ou « DAS local ». **D'après l'ICNIRP, le DAS local ne doit pas dépasser 2 W.kg⁻¹ pour la tête et le tronc**, dans lesquels se trouvent des organes fonctionnels vitaux (cerveau, cœur, poumon, intestins, etc...), et **4 W.kg⁻¹ pour les tissus plus périphériques** que sont les membres. Cette valeur de DAS local est évaluée pour une masse de 10 g de tissus.

Voir Recommandation du conseil de l'union européenne du 12/07/1999 relative à la limitation de l'exposition du public aux champs électromagnétiques de 0 Hz à 300 GHz (1999/519/CE).

Etude des interactions entre la bactérie *Escherichia coli* et les micro-ondes appliquées en mode discontinu dans des conditions faiblement thermiques

L'objectif de ces travaux consiste d'une part, à étudier les interactions entre les micro-ondes appliquées dans des conditions faiblement thermiques (37, 50 et 60°C) à la fréquence de 2,45 GHz avec la bactérie *Escherichia coli*, et, d'autre part, à étudier la possibilité d'utiliser cette technique pour la décontamination de produits thermosensibles. Différents protocoles et différentes conditions d'exposition ont été testés, et les investigations menées ont montré que les micro-ondes appliquées en mode discontinu dans des conditions faiblement thermiques induisent une modification d'intégrité membranaire des bactéries *E. coli*. Ces travaux montrent la nécessité de combiner dosimétrie expérimentale et dosimétrie numérique pour l'étude des interactions entre les micro-ondes et les systèmes biologiques puisque les résultats de la caractérisation thermique de la suspension semblaient attribuer les effets obtenus à un effet non thermique des micro-ondes, alors que la simulation numérique nous permis de détecter la présence de « points chauds » au sein de la suspension bactérienne exposée. En terme d'application, ces travaux montrent que l'utilisation des micro-ondes discontinues dans des conditions faiblement thermiques ne semble pas envisageable en tant que tel, bien que les temps d'exposition utilisés soient plus courts que ceux utilisés en chauffage traditionnel.

Mots clés : micro-ondes, bactérie, interaction, membrane, dosimétrie, effet thermique et non thermique.

Study of the interactions between the bacteria *Escherichia coli* and microwaves, applied in discontinuous mode, under slightly thermal conditions

The aim of this work was to study the interactions between microwaves, applied under conditions slightly thermal (37, 50 and 60°C) to the frequency of 2,45 GHz with the bacteria *Escherichia coli*, and to study the possibility to use this technique for decontamination of thermosensitive products. Various protocols and various exposure conditions were tested, and the carried out investigations showed that the microwaves applied in discontinuous mode under conditions slightly thermal induce membrane integrity modification of the bacteria *E. coli*. This work shows the need for combining experimental dosimetry and numerical dosimetry for the interactions between the biological systems and microwaves studies, since the results of the thermal characterization of the suspension seemed to allot the effects obtained for a non thermal effect of microwaves, whereas the numerical simulation allowed us to detect the presence of "hot spots" within the exposed bacterial suspension. For process, this work shows that the use of the discontinuous microwaves under conditions slightly thermal does not seem possible as such, although exposure times used are shorter than those used in traditional heating process.

Key words : microwave, bacteria, interaction, membrane, dosimetry, thermal and non thermal effect.