

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE n° 521 – Sciences et Ingénierie pour l'Information, Mathématiques

FACULTE des Sciences et Techniques
XLIM - Département Ondes et Systèmes Associés

Année : 2012

Thèse N° 57-2012

Thèse
pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Electronique des Hautes Fréquences, Photonique et systèmes

Présentée et soutenue par

Thi Dan Thao VU

Le 13 décembre 2012

**Contribution à la modélisation du comportement
électromagnétique de milieux biologiques exposés à des
impulsions de champ électrique nanosecondes**

Thèse dirigée par Philippe LEVEQUE et Liliana-Delia ARNAUD-CORMOS

JURY :

Président du jury:

Mr Joël ANDRIEU

Professeur

Université de Limoges, XLIM, Dépt. « O.S.A. », Brive

Rapporteurs :

Mr François BURET

Professeur

Ecole Centrale de Lyon – Dépt EEA – Lab. Ampère, Ecully

Mr Jean PAILLOL

Professeur

Université de Pau et des Pays de l'Adour, SIAME-IPRA, Pau

Examineurs :

Mme Liliana-Delia ARNAUD-CORMOS **Maître de Conférences**

Université de Limoges, XLIM, Dépt. « O.S.A. », Limoges

Mr Régis GUINVARC'H

Enseignant-Chercheur

SUPELEC – Laboratoire SONDRRA – Gif sur Yvette

Mr Philippe LEVEQUE

Directeur de Recherche C.N.R.S.

Université de Limoges, XLIM, Dépt. « O.S.A. », Limoges

Mr Philippe POULIGUEN

Ingénieur DGA

*DGA/DS, Mission pour la Recherche et l'Innovation Scientifique,
Bagneux*

A mes parents,

« La suprême récompense du travail n'est pas ce qu'il vous permet de gagner mais ce qu'il vous permet de devenir. »

John Ruskin

Remerciements

Le travail décrit dans ce mémoire a été effectué à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Limoges, au sein du laboratoire Xlim. Je tiens à remercier sincèrement son directeur, Monsieur Dominique CROS, Professeur à l'Université de Limoges, pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire ainsi que Monsieur Thierry MONÉDIÈRE, Professeur à l'université de Limoges, pour m'avoir accueilli au sein du département Ondes et Systèmes Associés (OSA) et avoir permis le bon déroulement de ma thèse.

J'exprime ma plus profonde gratitude à la Direction Générale de l'Armement (DGA) pour le financement et le suivi de mes travaux de thèse. Je tiens donc à remercier Monsieur Philippe POULIGUEN, responsable du domaine scientifique "Ondes acoustiques et radioélectriques" au sein de la DGA/DS/MRIS et Monsieur René VEZINET, ingénieur CEA/DAM au centre d'Etude de Gramat.

J'adresse des remerciements particuliers à Monsieur Philippe LEVEQUE, Directeur de recherche CNRS et Madame Delia Liliana ARNAUD-CORMOS, Maître de conférence à l'Université de Limoges, pour avoir encadré mes travaux de thèse.

Je remercie Monsieur Joël ANDRIEU, Professeur à l'Université de Limoges, pour avoir accepté de présider cette soutenance.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Messieurs François BURET, Professeur à l'école centrale de Lyon, et Jean PAILLOL, Professeur à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de rapporter ce manuscrit. Merci pour l'attention qu'ils ont portée à mes travaux.

J'adresse mes profonds remerciements à Messieurs Régis GUINVARC'H, enseignant chercheur à l'école SUPÉLEC- Laboratoire SONDRRA et Philippe POULIGUEN, ingénieur DGA/DS/MRIS, pour avoir examiné et jugé mes travaux.

Un grand merci à Mademoiselle Nadine AYMARD, pour son efficacité et sa perpétuelle bonne humeur. Tu m'as déchargée de bien des angoisses.

Je tiens à remercier tous les doctorants, que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ces trois années et une mention spéciale pour les meilleurs : Mimi, Mary, Saaaad, OmOm, l'As Ticaud, Annali et la Sagesse. Cette expérience aurait été bien différente sans vous et surtout si nous n'avions pas mélangé vie privée et vie privée ;)!!!

Ces derniers remerciements vont aux personnes qui me sont chères. Tout d'abord mes parents et mes frère et soeurs, les valeurs que vous m'avez transmises n'ont pas de prix, je ne serai jamais arrivée jusque là sans vous. Un grand merci à mes amis pour votre soutien sans faille. Et ces dernières lignes sont pour la personne qui a toujours su trouver les bons mots pour me soutenir et m'encourager dans cette voie. C'est à mon tour d'être à la hauteur et de t'apporter autant que ce que tu as pu me donner ! Merci de partager ma vie.

Sommaire

TABLE DES FIGURES.....	17
INTRODUCTION GENERALE	23
CHAPITRE. I : CONTEXTE ET ETAT DE L'ART	29
I INTRODUCTION	31
II NOTIONS BASIQUES SUR LA CELLULE BIOLOGIQUE [1][2]	34
II.1 <i>La membrane plasmique et son potentiel de repos [2]</i>	34
II.2 <i>Les organelles</i>	36
II.3 <i>Conclusion</i>	38
III EFFETS DES CHAMPS ELECTRIQUES PULSEES	38
III.1 <i>Champs électriques pulsés de durées ms-μs</i>	39
III.2 <i>Champs électriques pulsés de durées ns</i>	44
III.3 <i>Vers des applications</i>	48
III.4 <i>Conclusion</i>	48
IV ETUDES EXPERIMENTALES	50
IV.1 <i>Générateurs impulsionnels haute tension</i>	50
IV.2 <i>Système d'exposition</i>	52
IV.3 <i>Mesure des phénomènes</i>	60
V APPORT DE LA DYNAMIQUE MOLECULAIRE	68
VI CONCLUSION.....	70
CHAPITRE. II : OUTILS ET METHODES NUMERIQUES.....	73
I INTRODUCTION	75
II GRANDEURS FONDAMENTALES.....	75
II.1 <i>Modèle simplifié de cellule</i>	75
II.2 <i>Définition des grandeurs électromagnétiques</i>	77
III MODELISATION A L'ECHELLE DE LA CELLULE	84
III.1 <i>Champ électrique et potentiel transmembranaire</i>	84
III.2 <i>Densité de pores</i>	88
III.3 <i>Modélisation 2D - 3D</i>	90
IV METHODE NUMERIQUE.....	96
IV.1 <i>Positionnement du problème - Approximation des régimes quasi-statique</i>	96
IV.2 <i>Méthode des différences finies</i>	97
IV.3 <i>Conclusion</i>	105

V MODELISATION DES MEMBRANES DE CELLULE.....	105
V.1 <i>Modèle d'impédances de surface et de transfert</i>	106
V.2 <i>Formalisme de lame mince</i>	107
V.3 <i>Permittivité et conductivité équivalentes</i>	109
V.4 <i>Modèle de membrane équivalente</i>	110
VI CONCLUSION.....	111
CHAPITRE. III : APPLICATION A UN MODELE 1D	113
I INTRODUCTION	115
II GRANDEURS CARACTERISTIQUES	115
II.1 <i>Grandeur significative : le potentiel transmembranaire (PTM)</i>	116
II.2 <i>Distribution du champ électrique E</i>	116
III ANALYSE DES PARAMETRES CARACTERISTIQUES : 1D.....	116
III.1 <i>Modèle 1-D</i>	116
III.2 <i>Paramètres physiques</i>	117
III.3 <i>Paramètres géométriques</i>	130
III.4 <i>Définition d'une membrane équivalente</i>	134
III.5 <i>Paramètres numériques</i>	136
III.6 <i>Conclusion</i>	138
IV PASSAGE DE L'ECHELLE CELLULAIRE A L'ECHELLE MICRODISPOSITIF	139
IV.1 <i>Modèle avec un champ global appliqué constant</i>	140
IV.2 <i>Modèle basé sur une membrane de plus faible épaisseur et de plus forte permittivité</i>	143
IV.3 <i>Modèle basé sur une membrane de plus forte permittivité</i>	146
IV.4 <i>Conclusion</i>	149
V CONCLUSION	149
CHAPITRE. IV : APPLICATION A DES MODELES 2D ET 3D - REPONSES TEMPORELLES	151
I INTRODUCTION	153
II MODELE 2-D : REPONSE FREQUENTIELLE DES MEMBRANES.....	153
II.1 <i>Plaques 2D équivalentes à un modèle 1D</i>	153
II.2 <i>Cellule circulaire sans organelle</i>	154
II.3 <i>Comparaison de modèles 1D et 2D</i>	155
II.4 <i>Influence de la segmentation et de la discrétisation sur le modèle 2D</i>	157
II.5 <i>Modèle de cellule avec une organelle</i>	162
II.6 <i>Conclusion</i>	173
III REPONSE TEMPORELLE A UNE IMPULSION NSPEF : MODELE 2D.....	173
III.1 <i>Caractérisation des impulsions étudiés</i>	175
III.2 <i>Etude temporelle du modèle 2D</i>	177
IV VERS UN MODELE 3D.....	183
IV.1 <i>Modèle 3D</i>	184
IV.2 <i>Comparaison des modèles 2D et 3D</i>	186

Sommaire

<i>IV.3</i> <i>Membrane de dimension réaliste-définition d'une membrane équivalente plus épaisse.....</i>	<i>188</i>
V CONCLUSION	189
CONCLUSION GENERALE	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	199

Table des figures

Figure I-1 : Interaction des champs électromagnétiques avec les milieux biologiques (a) signaux des télécommunications, (b) champs pulsés.....	32
Figure I-2 : Schéma d'une cellule eucaryote.....	34
Figure I-3 : Image présentant la complexité de la membrane cellulaire.....	35
Figure I-4 : Représentation schématique du réticulum endoplasmique.....	36
Figure I-5 : Représentation schématique d'une mitochondrie.....	37
Figure I-6 : Représentation schématique du noyau d'une cellule.....	38
Figure I-7 : Principe d'application de champs électriques pulsés sur une cellule biologique placé entre deux électrodes.....	39
Figure I-8 : (a) Pore hydrophile, (b) Pore hydrophobe, dans la membrane [2].....	40
Figure I-9 : Applications et caractéristiques des impulsions d'après [18].	41
Figure I-10 : Schéma illustrant les applications exploitant les effets des impulsions classiques sur la membrane plasmique.	42
Figure I-11 : Principe de l'électrochimiothérapie [22].....	43
Figure I-12 : Contexte de la recherche sur l'étude des effets nsPEF.	49
Figure I-13 : Principe de fonctionnement d'un générateur pulsé.....	50
Figure I-14 : Schéma du système de génération d'impulsion haute tension.	51
Figure I-15 : Illustration d'applicateurs basés sur des électrodes planaires et électrodes aiguilles [22].	53
Figure I-16 : Cuvette d'électroporation avec différentes distances inter-électrodes (de gauche à droite 1 mm, 2 mm et 4 mm).....	53
Figure I-17 : Schéma d'un système d'exposition employant une cuvette d'électroporation [54].....	54
Figure I-18 : Comparaison du champ incident et du champ appliqué pour une impulsion rectangulaire de 10 ns(a) dans le domaine temporel (b) dans le domaine fréquentiel [54].....	55
Figure I-19 : Comparaison du champ incident et du champ appliqué pour une impulsion bi-polaire de 2 ns(a) dans le domaine temporel (b) dans le domaine fréquentiel [54].....	56
Figure I-20 : Système d'exposition pour une seule cellule basée sur l'emploi d'électrodes de tungstène séparées par une distance de 310 μm [59].	56
Figure I-21 : Dispositif d'exposition permettant d'atteindre des champs électriques jusqu'à 100 kV/cm [60].	57
Figure I-22 : Microdispositif fluide [63].	58
Figure I-23 : Représentation d'une cellule TEM. (a) vue de profil avec une boîte de Pétri entre le septum et l'un des murs métalliques. (b) vue de dessus avec la boîte de Pétri [64].....	59

Figure I-24 : Comparaison des champs incident en sortie du générateur (« forward pulse »), réfléchi par la cellule TEM (« reflected ») et transmis à la cellule TEM (« input ») (a) impulsion rectangulaire. (b) impulsion bipolaire, de durée 1.2 ns de temps de montée de 800 ps et d'amplitude ~140kV/m [64]..	59
Figure I-25 : Principe de la cytométrie en flux.	61
Figure I-26 : Mesure de Potentiel transmembranaire.	62
Figure I-27 : Cellules de Jurkat avant l'exposition (A) et 25 ns après le début de l'impulsion (B) [26].	63
Figure I-28 : Image obtenue par microscopie confocale de cellules HL-60, avant, 15 min et 30 min après l'exposition à une impulsion de 60 ns et de 26 kV/cm [69].....	64
Figure I-29 : Marquage d'un myélome multiple exposé à un nsPEF (4 ns, 8 MV/m) par deux marqueurs différents, pour chaque image l'anode se trouve en haut et la cathode en bas. Avant l'exposition (a)annexinV-FITC(b) FMI-43. (c) (d) Après 5 sec, pour les deux marqueurs employés une augmentation de la fluorescence est observée du côté de l'anode traduisant l'externalisation de la PS [31].	65
Figure I-30 :(a). Activation des caspases (marquage avec FITC-VAD-FMK) avant l'exposition des lymphoblastes T Jurkat à des nsPEFs (50 x10 ns, 2.5 MV/m) moins de 5% de cellules marquées (b). les mêmes cellules sous une lumière blanche (c). 5 h après l'exposition, plus de 30% de cellules marquées, indiquant la présence de caspases activées (d). les mêmes cellules sous lumière blanche. [42]	66
Figure I-31 : Eosinophiles avant l'exposition à l'impulsion de 60 ns et d'amplitude 50 kV/cm où les granules ne sont pas fluorescents (a) et après exposition où certaines granules sont fortement fluorescents (b) [70].	67
Figure I-32 : Création d'un pore hydrophobe dans une membrane de POPC et d'un pore hydrophile dans la membrane de DOPC, au cours du temps [23].....	70
Figure I-33 : Illustration des différentes échelles d'études des phénomènes biologiques résultants d'une exposition à une impulsion de très forte amplitude et de très courte durée.	71
Figure II-1 : Schéma d'une cellule eucaryote : (a) modèle complet ; (b) modèle simplifié homogène ; (c) modèle avec une organelle	76
Figure II-2 : Représentation des forces qu'exerce la charge électrique au point A sur la charge électrique au pont B et inversement.....	77
Figure II-3 : Comportement fréquentiel de la permittivité et phénomènes de polarisation associés (d'après [77]).....	79
Figure II-4 : Permittivité relative équivalente complexe (parties réelle et imaginaire) Modèle de Debye et conductivité électrique : $\epsilon_s = 81$; $\epsilon_\infty = 1.8$; $\tau = 9.4$ ps ; $\sigma = 1$ S/m	81
Figure II-5 : Modèle de cellule avec deux membranes (la membrane plasmique et la membrane de l'organelle).	82
Figure II-6 : Le temps de charge τ_m en fonction du rayon de la cellule et de la permittivité de la membrane (l'épaisseur de la membrane est de 7 nm, la conductivité intra et extra cellulaire de 1.1 S/m).....	86
Figure II-7 : Circuit électrique équivalent à une cellule en suspension : (a) modèle simple membrane [24]; (b) modèle avec organelle concentrique [51].	87

Figure II-8 : Réseau distribué du modèle de cellule, ainsi que les circuits équivalents aux modèles locaux [98].	91
Figure II-9 : Schéma du modèle utilisé pour le circuit distribué de la cellule, ainsi que la maille élémentaire et ses flux de courant [86].	92
Figure II-10 : Modèles de cellule circulaire avec deux organelles non concentriques (A) Maillage triangulaire; (B) Maillage avec des cellules de voronoï [88].	93
Figure II-11 : Modèles de cellules neuronales obtenus par numérisation d'une image de microscope [78].	95
Figure II-12 : Calcul du potentiel $V(i,j)$ (en rouge) à partir des quatre potentiels qui l'entourent (en vert). Le calcul du champ électrique (en rouge) est obtenu à partir de potentiel. Le champ électrique moyen est évalué au centre de la maille (en bleu).	100
Figure II-13 : Chaque maille est affectée par une permittivité en son centre. $\varepsilon_r(i-1,j-1)$ délimitée par le contour rouge $\varepsilon_r(i-1,j)$ délimitée par le contour bleu la surface hachurée correspond à la permittivité moyenne obtenue à partir de $\varepsilon_r(i-1,j-1)$ et $\varepsilon_r(i-1,j)$.	101
Figure II-14 : Damier, représentant les nœuds auxquels sont calculées les valeurs de potentiel en deux temps.	103
Figure II-15 : Organigramme.	104
Figure II-16 : Principe des impédances de surface et de transfert	106
Figure II-17 : Surface perpendiculaire à une plaque [106]	108
Figure II-18 : Discrétisation spatiale de la membrane – Conductivité électrique : (a) technique classique (b) technique avec valeurs moyennes	109
Figure II-19 : Modélisation d'une membrane de caractéristique $(d_1, \varepsilon_1, \sigma_1)$ par une membrane équivalente d'épaisseur d_2 et de caractéristiques électromagnétiques ε_2, σ_2 .	110
Figure III-1 : Illustration des différentes échelles d'études des phénomènes biologiques résultants d'une exposition à une impulsion de très forte amplitude et de très courte durée.	115
Figure III-2 : Modèle 1-D d'une cellule de type liposome, détermination du PTM et des champs électrique.	117
Figure III-3 : Evolution fréquentielle du champ E_{ext} dans un milieu cellulaire purement diélectrique.	118
Figure III-4 : Evolution fréquentielle du champ E_m dans un milieu cellulaire purement diélectrique.	119
Figure III-5 : Evolution fréquentielle du PTM dans un milieu cellulaire purement diélectrique.	120
Figure III-7 : Valeurs de champs E_m en fonction de la fréquence avec et sans prise en compte de la conductivité du milieu cellulaire.	122
Figure III-8 : Valeurs de PTM en fonction de la fréquence avec et sans prise en compte de la conductivité du milieu cellulaire.	122
Figure III-9 : Evolution fréquentielle du champ E_{ext} pour différentes valeurs de conductivité du milieu cellulaire.	123
Figure III-10 : Evolution fréquentielle du champ E_m pour différentes valeurs de conductivité du milieu cellulaire	124
Figure III-11 : Evolution fréquentielle du PTM pour différentes valeurs de conductivité du milieu cellulaire	124

Figure III-12 : Evolution fréquentielle de E_{ext} pour différentes valeurs de permittivité du milieu cellulaire.	125
Figure III-13 : Evolution fréquentielle de E_m pour différentes valeurs de permittivité du milieu cellulaire.	126
Figure III-14 : Evolution fréquentielle du PTM pour différentes valeurs de permittivité du milieu cellulaire.	126
Figure III-15 : Evolution fréquentielle de E_{ext} pour différentes valeurs de permittivité de la membrane plasmique.	127
Figure III-16 : Evolution fréquentielle de E_m pour différentes valeurs de permittivité de la membrane plasmique.	128
Figure III-17 : Evolution fréquentielle du PTM pour différentes valeurs de permittivité de la membrane plasmique.	129
Figure III-18 : Evolution fréquentielle de E_{ext} pour différentes épaisseurs de la membrane plasmique...	131
Figure III-19 : Evolution fréquentielle de E_m pour différentes épaisseurs de la membrane plasmique....	132
Figure III-20 : Evolution fréquentielle du PTM pour différentes épaisseurs de la membrane plasmique.	133
Figure III-21 : Evolution fréquentielle du PTM pour une cellule de diamètre 5 μm , 10 μm et 20 μm	133
Figure III-22 : Comparaison des valeurs de champ E_{ext} en fonction de la fréquence pour trois épaisseurs de membranes ayant des caractéristiques physiques différentes.	135
Figure III-23 : Comparaison des valeurs de champs E_m en fonction de la fréquence pour trois épaisseurs de membranes ayant des caractéristiques physiques différentes.	135
Figure III-24 : Comparaison des valeurs de PTM en fonction de la fréquence pour trois épaisseurs de membranes ayant des caractéristiques physiques différentes.	136
Figure III-25: Influence de la taille de la maille sur le PTM pour $\Delta x=2, 5, 10, 20$ nm.	137
Figure III-26 : Evolution fréquentielle du PTM pour différents nombres d'itérations.	138
Figure III-27 : Définition d'un modèle d'exposition à l'échelle de la cellule équivalent à un modèle d'exposition à l'échelle d'un applicateur type microdispositif.	140
Figure III-28 : Pour un même champ global, comparaisons des valeurs de champ E_{ext} pour $Delec=96 \mu\text{m}$ et $Delec=24 \mu\text{m}$.	141
Figure III-29 : Pour un même champ global, comparaison des valeurs de champs dans la membrane pour $Delec=96 \mu\text{m}$ et $Delec=24 \mu\text{m}$.	142
Figure III-30 : Pour un même champ global, comparaison des valeurs de PTM pour $Delec=24 \mu\text{m}$ et $Delec=96 \mu\text{m}$.	143
Figure III-31 : Définition d'un modèle équivalent basé sur une membrane deux fois plus fine et de permittivité deux fois plus grande.	144
Figure III-32 : Comparaison des valeurs de champ E_{ext} obtenues dans une configuration de type microdispositif ($Delec=96 \mu\text{m}$) et notre modèle de cellule équivalent basé sur une membrane deux fois plus fine et de permittivité deux fois plus grande.	145
Figure III-33 : Comparaison des valeurs de champ E_m obtenues dans une configuration de type microdispositif ($Delec=96 \mu\text{m}$) et notre modèle cellulaire équivalent ($Delec=24 \mu\text{m}$) pondéré par un facteur quatre.	145

Figure III-34 : Comparaison des valeurs de PTM obtenues dans une configuration de type microdispositif (Delec=96 μm) et notre modèle cellulaire équivalent (Delec=24 μm) pondéré par un facteur quatre.	146
Figure III-35 : Définition d'un modèle équivalent basé sur une membrane de permittivité diélectrique quatre fois plus grande comparée aux cas de référence.	146
Figure III-36 : Comparaison des valeurs de champ E_{ext} obtenues dans une configuration de type microdispositif (Delec=96 μm) et un modèle cellulaire équivalent (Delec=24 μm) basé sur une membrane de permittivité diélectrique quatre fois plus grande.	147
Figure III-37 : Comparaison des valeurs de champ E_{m} obtenues dans une configuration de type microdispositif (Delec=96 μm) et un modèle cellulaire équivalent (Delec=24 μm) basé sur une membrane de permittivité diélectrique quatre fois plus grande.	148
Figure III-38 : Comparaison des valeurs de PTM obtenues dans une configuration de type microdispositif (Delec=96 μm) et un modèle cellulaire équivalent (Delec=24 μm) basé sur une membrane de permittivité diélectrique quatre fois plus grande.	148
Figure IV-1 : Modèle 2D équivalent au modèle 1D d'une cellule composée uniquement d'une membrane plasmique, les membranes sont représentées par des plaques.	154
Figure IV-2 : Modèle 2D d'une cellule de type liposome placée entre deux électrodes.	155
Figure IV-3 : Comparaison des valeurs de E_{ext} obtenues avec le modèle 1D, le modèle 2D plaque, mais également avec le modèle 2D de forme circulaire.	156
Figure IV-4 : Comparaison des valeurs de PTM obtenues avec le modèle 1D, le modèle 2D plaque, mais également avec le modèle 2D de forme circulaire.	157
Figure IV-5 : Modèle 2D pour le traitement de la membrane avec et sans traitement spécifique du « staircase ». Un quart de structure est utilisé pour la représentation des distributions de potentiel (zone non grisée).	158
Figure IV-6 : Distribution spatiale du potentiel et du champ électrique pour deux discrétisations spatiales (1 et 2 nm). Deux méthodes de segmentation sont présentées : (c) et (d) correspondent au « staircase », (e) et (f) correspondent au « smooth » Fréquence : 1 MHz.	159
Figure IV-7 : Distribution spatiale du potentiel et du champ électrique pour deux discrétisations spatiales (1 et 2 nm). Deux méthodes de segmentation sont présentées : (c) et (d) correspondent au « staircase », (e) et (f) correspondent au « smooth » Fréquence : 31 MHz.	160
Figure IV-8 : Distribution spatiale du potentiel et du champ électrique pour deux discrétisations spatiales (1 et 2 nm). Deux méthodes de segmentation sont présentées : (c) et (d) correspondent au « staircase », (e) et (f) correspondent au « smooth » Fréquence : 1 GHz.	161
Figure IV-9 : Modèle 2-D d'une cellule présentant une organelle placée entre deux électrodes.	163
Figure IV-10 : A 1 MHz (a) Distribution du potentiel (b) Lignes de champ E.	164
Figure IV-11 : A 1 GHz (a) Distribution du potentiel (b) Lignes de champ E.	165
Figure IV-12 : Potentiel transmembranaire plasmique et nucléaire en fonction de la fréquence.	165
Figure IV-13 : Comparaison des modèles 2D avec et sans prise en compte d'une organelle.	166
Figure IV-14 : Influence de l'organelle sur les valeurs de champ E_{ext}	167
Figure IV-15 : Influence de l'organelle sur les valeurs de PTM.	168

Figure IV-16 : Evolution fréquentielle du champ E_{ext} pour deux valeurs de conductivité du milieu cellulaire.	169
Figure IV-17 : Potentiel transmembranaire plasmique et de l'organelle en fonction de la fréquence, pour deux valeurs de conductivité du milieu cellulaire.	169
Figure IV-18 : Structure de la cellule avec des trous dans la membrane plasmique	170
Figure IV-19 : 1 MHz (a) Distribution du potentiel, (b) Lignes de champ E.....	171
Figure IV-20 : 1 GHz (a) Distribution du potentiel, (b) Lignes de champ E.....	172
Figure IV-21 : Potentiel transmembranaire plasmique et nucléaire en fonction de la fréquence, avec et sans prise en compte de trous dans la membrane plasmique.	172
Figure IV-22 : Algorithme pour le calcul des réponses transitoires.	175
Figure IV-23 : Profil temporel et spectral d'une impulsion rectangulaire de durée 200 ns et d'amplitude normalisée.	176
Figure IV-24 : Profil temporel (a) et spectral (b) d'une impulsion trapézoïdale de 200 ns	177
Figure IV-25 : Profil temporel (a) et spectral (b) d'une impulsion trapézoïdale de 2 ns	177
Figure IV-26 : Potentiel transmembranaire plasmique et nucléaire en fonction de la fréquence.	178
Figure IV-27 : Evolution temporelle des PTM pour la membrane plasmique et la membrane de l'organelle en réponse à une impulsion trapézoïdale de 200 ns et d'amplitude 1 MV/m.	179
Figure IV-28 : Evolution temporelle des champs dans les membranes plasmique et de l'organelle en réponse à une impulsion trapézoïdale de 200 ns et d'amplitude 1 MV/m.	180
Figure IV-29 : Evolution temporelle de E_{ext} lors de l'exposition à une impulsion trapézoïdale de 200 ns et de 1 MV/m.....	181
Figure IV-30 : Evolution temporelle des PTM pour la membrane plasmique et la membrane de l'organelle en réponse à une impulsion trapézoïdale de 2 ns et d'amplitude 1 MV/m	182
Figure IV-31 : Evolution temporelle des champs dans les membranes plasmique et de l'organelle en réponse à une impulsion trapézoïdale de 2 ns et d'amplitude 1 MV/m.	182
Figure IV-32 : Evolution temporelle de E_{ext} lors de l'exposition à une impulsion trapèze de 2 ns et de 1 MV/m.....	183
Figure IV-33 : Modèle 3D (a) Vue complète - les deux électrodes sont en gris et le milieu extracellulaire en bleu ; (b) En plan coupe –les deux sphères concentriques représentent la cellule et son organelle..	185
Figure IV-34 : Conditions aux limites définies lors des simulations 3D.	185
Figure IV-35 : Maillage de la structure utilisé pour les simulations 3D.....	186
Figure IV-36 : Comparaison de notre modèle 2D avec le modèle 3D obtenu avec un code 3D en réponse à une impulsion de 200 ns et de 1 MV/m.	187
Figure IV-37 : Comparaison de notre modèle 2D avec le modèle 3D obtenu avec un code 3D en réponse à une impulsion de 2 ns et de 1 MV/m.	187
Figure IV-38 : Réponse temporelle des membranes plasmique et de l'organelle d'épaisseurs respectives 10 nm et 30 nm, à une impulsion de 2 ns et d'amplitude 1 MV/m.....	188
Figure IV-39 : Modèle équivalent de la membrane plasmique et nucléaire plus épaisses	189

Introduction

générale

Introduction générale

La présence de phénomènes électriques dans les organismes vivants est connue depuis l'antiquité. Au 18^{ième}, Luigi Galvani a montré qu'il était possible de contracter des cuisses de grenouille après stimulation électrique du nerf sciatique. A la fin des années 1970, il a été montré que l'application d'impulsions de champ électrique pouvait sous certaines conditions modifier la perméabilité de la membrane plasmique des cellules. Les membranes sont des éléments fondamentaux de la cellule. Elles définissent les fonctions de base du métabolisme de la cellule et sont le siège d'échange entre les milieux qu'elles délimitent. La présence de charges électriques de part et d'autre des membranes implique l'existence d'un potentiel électrique. Il s'agit du potentiel transmembranaire qui vaut quelques dizaines de millivolts à quelques centaines de millivolts suivant le type de membrane et de cellule considérés. A ce potentiel est associé un champ électrique dont l'amplitude est proportionnelle au rapport entre la différence de potentiel et l'épaisseur de la membrane (quelques nanomètres).

L'application d'un champ électrique extérieur va faire varier le potentiel transmembranaire et perturber l'édifice membranaire. Ces perturbations peuvent être suffisamment importantes pour modifier les échanges ioniques à travers la membrane. Ce phénomène est connu sous le nom d'électroperméabilisation. Il se produit pour des impulsions de champ électrique ayant des durées comprises entre la milliseconde et microseconde et des amplitudes de l'ordre du kV/m. Ce phénomène est aujourd'hui utilisé dans de nombreuses applications au niveau des cellules ou tissus biologiques. Parmi les applications les plus abouties, on peut citer l'électrochimiothérapie. Elle utilise l'effet des impulsions de champ électrique pour perméabiliser la membrane plasmique et faciliter ainsi la pénétration de molécules anticancéreuses dans la cellule. L'efficacité de l'agent anticancéreux s'en trouve alors augmenter de façon significative. Cette technique est aujourd'hui appliquée sur des patients dans plusieurs centres européens pour le traitement de tumeurs cancéreuses. Cette technique présente cependant quelques limitations dans la mesure où seules les membranes plasmiques sont affectées. En effet, d'un point de vue électromagnétique, la membrane se comporte comme un diélectrique et joue un rôle d'isolant vis à vis du champ électrique. L'intérieur de la cellule ne voit alors pas le champ électrique appliqué.

Depuis une dizaine d'années, des travaux ont été entrepris pour explorer le potentiel d'impulsions plus courtes que celles classiquement employées pour l'électroporation des cellules. Elles ont des durées de l'ordre de quelques dizaines de nanosecondes à quelques nanosecondes et sont connues sous le nom de champ électrique pulsé nanoseconde, avec

l'acronyme anglais nsPEF pour "nanosecond Pulse Electric Field". Les niveaux de champs électriques mis en jeu sont plus élevés d'au moins deux ordres de grandeur comparés à l'électroporation classique, conduisant à des champs appliqués de l'ordre du MV/m. Les effets observés montrent comme avec les pulses longs une modification de la perméabilisation de la membrane plasmique, mais aussi des modifications à l'intérieur de la cellule indiquant que les impulsions nanosecondes peuvent atteindre et impacter des cibles intracellulaires. Pour les effets sur les membranes internes des cellules, ces impulsions laissent présager des applications prometteuses notamment en termes de manipulations intracellulaires.

L'exploration de ce nouveau domaine de recherche nécessite une approche pluridisciplinaire pour être menée dans de bonnes conditions. Ceci est illustré sur la figure suivante, où l'on voit apparaître aussi bien des aspects expérimentaux et de modélisation numérique, qui concernent des disciplines aussi variées que l'électronique, la biologie, la chimie.

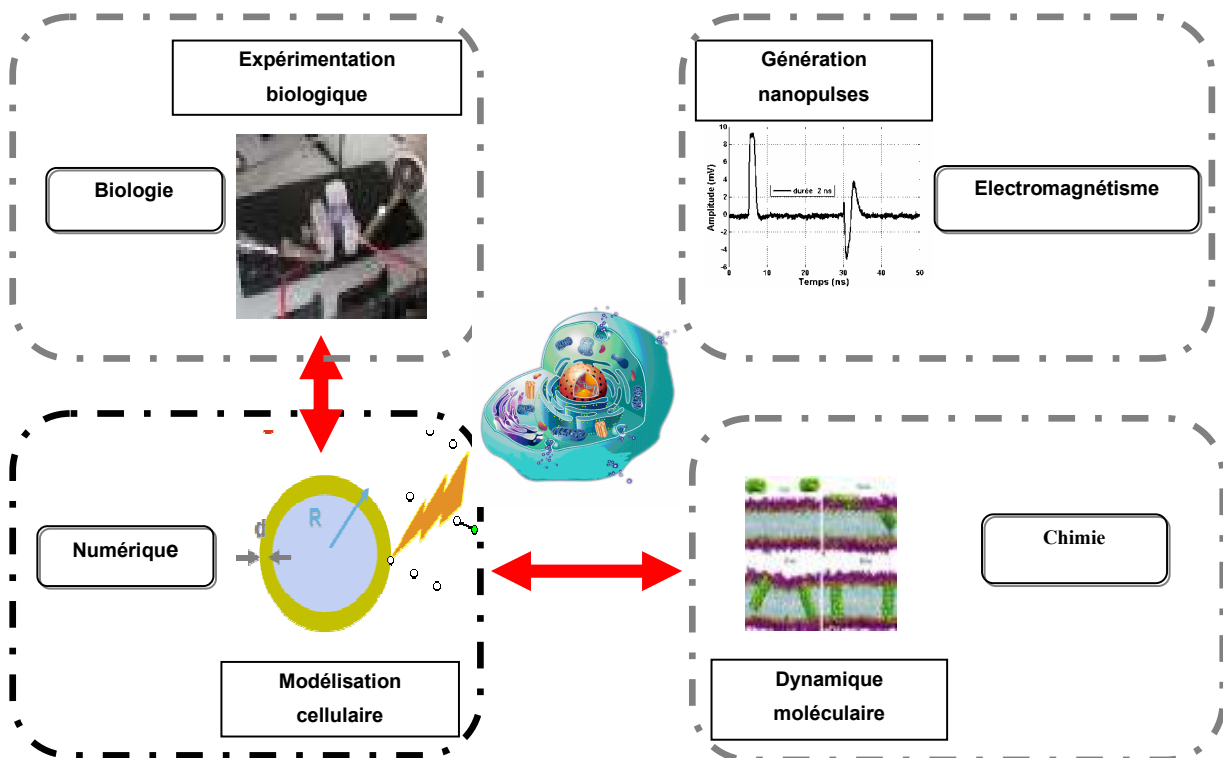


Illustration du contexte pluridisciplinaire des études sur les nanopulses et place des travaux de thèse dans ce contexte

Le travail de cette thèse s'inscrit dans le domaine de l'électronique et plus précisément de l'électromagnétisme et il est centré sur la modélisation numérique. En effet, il est essentiel de faire le lien entre les systèmes d'exposition utilisés pour les expérimentations, les résultats biologiques observés et les grandeurs électriques existant au niveau de la cellule. Cela revient

à faire le passage de l'observation à l'échelle macroscopique à l'échelle microscopique. Il est aussi nécessaire de s'intéresser à un élément essentiel de la cellule, à savoir les membranes. Pour répondre à ces besoins, on s'appuiera dans ce travail sur la modélisation numérique, en définissant et résolvant le problème électromagnétique. Ces travaux sont complémentaires de ceux effectués en dynamique moléculaire à l'échelle de la membrane, où seule une fraction de cette dernière est prise en compte permettant la mise en évidence à l'échelle moléculaire des mécanismes pouvant être à l'origine des phénomènes observés expérimentalement.

Les effets des nanopulses sur les milieux biologiques font l'objet de nombreuses études aussi bien expérimentales que numériques. Cependant, ils restent encore des domaines à explorer et à mieux comprendre, en raison du développement récent de générateurs capables d'atteindre des durées aussi courtes, mais également dû à la grande complexité et diversité de la composition intracellulaire. Pour aider à la compréhension, les approches numériques sont utiles mais elles sont confrontées à plusieurs difficultés, notamment la nécessité de se rapprocher d'une structure réaliste de cellule par la prise en compte des organelles mais également des phénomènes non linéaires (modification de la perméabilité avec l'électroporation) dont les membranes sont le siège. Une autre difficulté réside en l'aspect multi-échelle de la cellule, du fait du ratio épaisseur de membrane - rayon de la cellule qui implique une contrainte sur le choix du pas de discrétisation spatiale dans certaines méthodes.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de thèse. L'objectif est d'effectuer le lien entre les champs impliqués lors des expérimentations à l'échelle macroscopique et le champ électrique existant localement au voisinage de la cellule par la définition d'un modèle numérique de cellule. Ce manuscrit comporte quatre parties.

Le premier chapitre exposera et définira les principaux éléments qui composent une cellule biologique. Ensuite, il sera présenté les principes et phénomènes connus des impulsions de champ électrique dites classiques sur la cellule et les applications qui exploitent leurs effets, comme l'électroporation. Les impulsions nanosecondes seront introduites et nous soulignerons l'intérêt de l'étude des effets de ces impulsions pour d'éventuelles applications exploitant la manipulation intracellulaire. Certains effets de ces champs électriques impulsions nanosecondes ont été mis en évidence mais ils restent encore mal compris. Aussi, nous présenterons les moyens mis en œuvre pour les études expérimentales et numériques, en particulier la dynamique moléculaire, qui puissent être confrontés avec les outils de simulation numérique développés dans cette thèse.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons la nécessité de définir des modèles simplifiés de cellule. Nous introduirons les principes électrostatique et électromagnétique mis

en jeu, mais également les propriétés physiques et géométriques des cellules biologiques. Nous définirons les grandeurs caractéristiques nécessaires à la compréhension des phénomènes telles que la perméabilisation membranaire, les champs induits dans les membranes et les potentiels transmembranaires. Nous ferons un bref état de l'art des méthodes numériques employés pour la modélisation des modèles simplifiés de cellule avant de présenter la méthode numérique que nous employons dans ces travaux, basée sur une approche quasi-statique et les différences finies. Nous présenterons et proposerons des méthodes numériques pour pallier au rapport d'échelle qui existe entre l'épaisseur de membrane et le diamètre de la cellule.

Le chapitre 3 présente sur la base d'une approche 1D, un modèle constitué de plusieurs zones représentatives des milieux intérieur et extérieur d'une cellule et de sa membrane. Cette approche a pour objectif de mettre en évidence l'influence d'un grand nombre de paramètres physiques, géométriques et numériques sur les grandeurs significatives telles que les valeurs du champ locale et le potentiel transmembranaire. Nous introduirons les notions de champ électrique local et global permettant la comparaison d'une modélisation à l'échelle de la cellule et d'un modèle représentatif d'une configuration expérimentale. La membrane de la cellule de part son épaisseur très fine vis à vis des dimensions du problème à traiter, requière une attention particulière. Différentes solutions seront proposées pour limiter les contraintes imposées par la discrétisation spatiale, en particulier une méthode reposant sur une membrane équivalente.

Le chapitre 4 porte sur la modélisation de structures en 2 et 3 dimensions. Il sera mis en évidence l'influence d'une organelle sur le modèle de la cellule. Les approches fréquentielles et temporelles permettront de mettre en évidence les phénomènes basses fréquences et hautes fréquences en fonction du modèle choisi. Les grandeurs caractéristiques, telles que les potentiels transmembranaires seront déterminés pour les membranes plasmiques mais aussi les organelles. L'influence d'ouvertures dans la membrane, représentatives de l'existence de pores, sera également étudiée. Les grandeurs en transitoire permettront de voir l'influence des impulsions de champ électrique appliquées. Deux principaux types de nanopulse seront considérés avec des durées de 200 et 2 ns. Pour finir, une étude sera consacrée à la validation dans une approche 3D du modèle de membrane équivalente qui a été développé dans ce travail de thèse.

Enfin, une conclusion ainsi que quelques perspectives à ce travail seront proposées.

Chapitre. I : Contexte et état de l'art

I Introduction

Les travaux concernant les interactions des champs électromagnétiques avec le vivant ont fait l'objet de nombreuses études depuis plusieurs décennies. Avec l'avènement de la téléphonie mobile et des systèmes de télécommunications sans fil (GSM, UMTS, LTE, Wifi, WiMax,...), les interrogations de la population sur l'innocuité des ondes électromagnétiques sur la santé ont été de plus en plus fortes. Aussi de nombreux programmes de recherche ont vu le jour, avec le soutien, depuis une douzaine d'année de structure de financement indépendante des opérateurs (Fondation Santé et Radiofréquence, ANSES, programme européen). Ces études portent sur les effets sanitaires éventuels des signaux de télécommunications sans fil et concernent aussi bien les études in vitro (cellules en culture), que les études in vivo (animaux, être humain) ainsi que les études épidémiologiques.

Ces signaux utilisés pour ces systèmes de télécommunications sans fil sont généralement dans des bandes de fréquence décimétrique, centimétrique, voire millimétrique, correspondant aux fréquences dites microondes ou hyperfréquences. De nombreuses applications utilisent des fréquences entre de 800 MHz et quelques GHz. Dans ce domaine de fréquence, il existe des interactions bien connues entre les ondes électromagnétiques et la matière, en particulier les milieux biologiques. Il s'agit des effets thermiques. En effet, la nature dipolaire de certaines molécules, la molécule d'eau en particulier, entraîne des pertes par effet Joule conduisant à un échauffement de la matière ou des solutions. C'est l'effet thermique qui est utilisé dans de nombreuses applications, four micro-onde domestique par exemple. Pour se prémunir des effets thermiques lors de l'utilisation des systèmes de télécommunications sans fil, des limites sur les niveaux d'exposition ont été définies qui garantissent l'absence d'échauffement significatif lié aux ondes électromagnétiques. Des questions sur des éventuels effets athermiques restent au centre des recherches en différenciant les effets observés, les mécanismes mis en jeu et les effets sur la santé.

La Figure I-1 illustre l'important intérêt porté aux signaux de télécommunications sans fil et présente un domaine de signaux qui a été moins étudié, il s'agit des signaux pulsés. Ces derniers peuvent utiliser des fréquences microondes avec des niveaux de champs électromagnétiques très forts sur des durées très courtes. Cela signifie qu'en valeur moyenne,

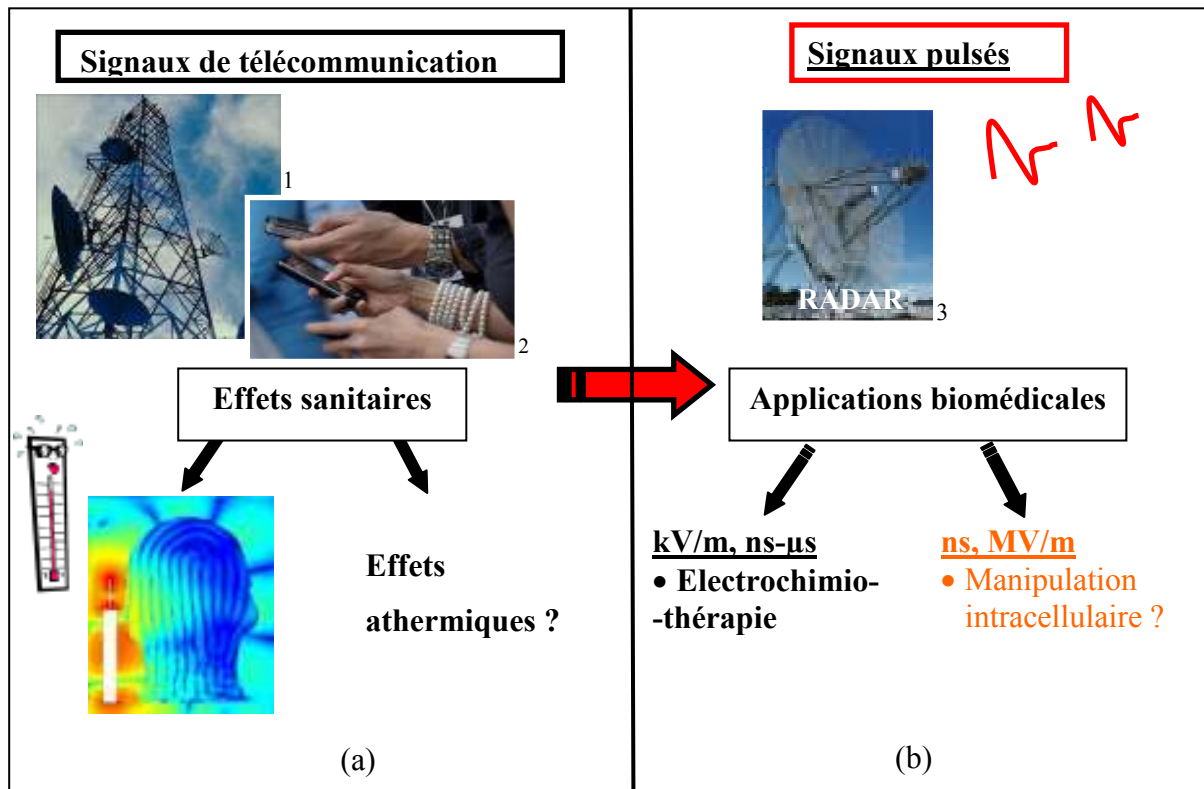


Figure I-1 : Interaction des champs électromagnétiques avec les milieux biologiques (a) signaux des télécommunications¹², (b) champs pulsés³.

les niveaux d'exposition ne vont pas induire d'échauffement significatif, mais il faut aussi se prémunir des effets sanitaires éventuels. Un exemple de tels signaux est utilisé depuis le milieu du 20^{ème} siècle pour les applications RADAR.

Il existe également des applications avec des signaux microondes dans le domaine biomédical. Il s'agit généralement d'utiliser l'effet thermique induit par les champs électromagnétiques pour chauffer une zone particulière du corps humain. Cette technique est connue sous le nom d'hyperthermie microonde, les ondes possédant la propriété de pouvoir pénétrer les tissus et dans les cas les plus favorables de cibler une zone d'intérêt. On s'appuie ici sur des effets thermiques.

Un deuxième type de signaux est utilisé pour des applications biomédicales. Il s'agit de signaux pulsés et ce n'est pas l'effet thermique qui est recherché. Contrairement au RADAR, ces signaux ne possèdent pas de porteuse. De plus, comme il s'agit d'utiliser des

¹[http://3.bp.blogspot.com/_WBmTo4-V8XY/TKGRHDCbowI/AAAAAAAAAAs/wtUn_8Z-](http://3.bp.blogspot.com/_WBmTo4-V8XY/TKGRHDCbowI/AAAAAAAAAAs/wtUn_8Z-YKA/s1600/Telecommunication+in+Nepal.jpg)

[YKA/s1600/Telecommunication+in+Nepal.jpg](http://www.lematin.ma/express/Telecommunications_-Regression-generale-des-prix-/169883.html)

² http://www.lematin.ma/express/Telecommunications_-Regression-generale-des-prix-/169883.html

³ <http://occidentlibre.wordpress.com/2010/07/03/syrie-un-radar-iranien-a-ete-installe-sur-le-sol-syrien/>

ondes ou des champs électromagnétiques à des fins thérapeutiques, on va rechercher des types de signaux qui puissent interagir avec le vivant. Un exemple d'application en pleine expansion aujourd'hui est l'électrochimiothérapie. Il s'agit d'appliquer un champ électrique pulsé de forte amplitude (kV/cm) et de courte durée (μ s-ms) pour faciliter la pénétration de molécules chimiques dans les cellules. Cette technique est utilisée avec succès pour le traitement de cellules cancéreuses à l'aide de la bléomycine qui est un agent anticancéreux. Dans cette application, le champ électrique appliqué va modifier la perméabilité de la membrane plasmique des cellules biologiques, facilitant la pénétration de la bléomycine à l'intérieur de la cellule.

Deux groupes français ont fortement contribué aux avancés et à la compréhension de cette technique. Il s'agit des groupes de Justin Teissié (Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Toulouse) et Lluis Mir (Institut Gustave-Roussy, Villejuif). La durée des impulsions de champ électrique utilisée limite l'action du champ principalement à la membrane plasmique.

Pour obtenir des cibles biologiques à l'intérieur de la cellule, il est nécessaire d'explorer le domaine des impulsions plus courtes, c'est à dire présentant des durées inférieures à la microseconde. C'est dans ce contexte que des travaux ont débuté il y a quelques années, avec pour objectif d'explorer le domaine des champs électriques pulsés nanoseconde (acronyme anglais nsPEF, pour nanosecond Pulsed Electric Field). Il est nécessaire pour mener à bien ces travaux d'associer des physiciens et des biologistes. Les premiers doivent développer et concevoir des générateurs et des systèmes d'exposition, les seconds doivent réaliser les expérimentations biologiques. Des études de ce type ont démarré en France il y a quelques années dans le cadre en particulier de projets soutenus par l'ANR auxquels XLIM a contribué (Cemirbio, Nanopulsebiochip, Intcell).

Au cours de ce chapitre, le contexte de cette étude va être présenté plus en détail, par la définition de quelques notions de base en biologie, des effets connus de ces impulsions ainsi que les moyens mis en jeu pour effectuer les expérimentations.

II Notions basiques sur la cellule biologique [1][2]

Il existe principalement deux types de cellules : les cellules eucaryotes et les cellules procaryotes. Les cellules eucaryotes possèdent un noyau qui contient le matériel génétique contrairement aux cellules procaryotes qui ne possèdent pas de noyau. Les cellules présentent d'un point de vue électromagnétique de très fortes inhomogénéités du fait de leurs compositions complexes.



Figure I-2 : Schéma d'une cellule eucaryote⁴.

La Figure I-2 présente de façon schématique une cellule eucaryote qui peut être décomposée en plusieurs éléments. Tout d'abord, la membrane plasmique qui délimite la cellule et sépare le milieu extracellulaire du cytoplasme. Ce dernier désigne le milieu intracellulaire dans lequel les composantes de la cellule, appelées organelles, sont en suspension (noyau, mitochondries, appareil de Golgi...).

II.1 La membrane plasmique et son potentiel de repos [2]

La membrane plasmique joue un rôle essentiel dans les échanges cellulaires. Elle a pour rôle de séparer et de maintenir un équilibre osmotique entre le milieu extra cellulaire et le cytoplasme. La Figure I-3 présente de façon schématique la composition d'une membrane plasmique.

⁴ <http://www.ccdmd.qc.ca/ri/cellule/>.

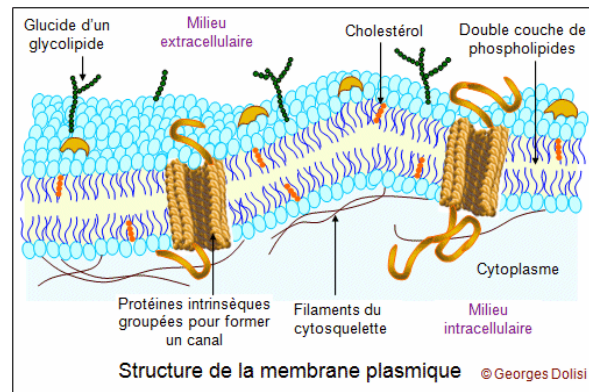


Figure I-3 : Image présentant la complexité de la membrane cellulaire⁵.

La membrane plasmique est une double couche lipidique, composée principalement de phospholipides. Ces derniers sont composés d'une « tête » hydrophile (qui aime l'eau) et d'une double « queue » hydrophobe (qui a peur de l'eau). Le milieu extracellulaire et le cytoplasme, constitués principalement d'eau, expliquent l'agencement des phospholipides dont les têtes constituent les faces de la membrane alors que les queues donnent un caractère hydrophobe à l'intérieur de la membrane. Dans cette double couche lipidique sont insérées des protéines qui confèrent à la membrane des fonctions spécifiques propres à chaque type de cellule. En effet, elles permettent sous la forme de canaux le transport d'éléments entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme. Elles jouent également un rôle essentiel dans la communication de la cellule avec son environnement.

Du fait de la différence de concentration ionique entre le milieu de culture et le cytoplasme, il existe une diffusion passive d'ions entre les deux milieux grâce aux canaux ioniques. Généralement, les ions circulent du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré. C'est le principe des lois de l'osmose. La concentration en ions sodium Na^+ est plus importante dans le milieu extracellulaire que dans le milieu intracellulaire et inversement pour les ions potassium K^+ . Pour maintenir le déséquilibre ionique d'autres canaux dits « actifs » assurent le déplacement des ions dans l'autre sens.

Dû à cette inégale répartition des ions de part et d'autre de la membrane, l'intérieur de la cellule est à un potentiel inférieur à celui de l'extérieur de la cellule. La membrane plasmique est alors caractérisée par son potentiel transmembranaire de repos. Ce dernier va dépendre directement du type de cellule considéré mais typiquement il varie autour de -70 mV.

⁵ <http://www.medicalorama.com/encyclopedie/9274>

II.2 Les organelles

Un grand nombre d'organelles composent le cytoplasme, chacune ayant leur fonction et leur composition propre. Par la suite nous ne présenterons que les principales organelles qui sont : le réticulum endoplasmique, les mitochondries et le noyau.

Le réticulum endoplasmique est de forme très irrégulière. Il est constitué de tubules membranaires dont une partie d'entre eux sont reliés à la membrane nucléaire. Le réticulum endoplasmique se décompose en deux parties : un réticulum endoplasmique rugueux et un réticulum endoplasmique lisse comme illustré sur la Figure I-4. Le réticulum endoplasmique rugueux est le siège de la production de protéines nécessaires aux organites ou au milieu extracellulaire. Il est dit « rugueux » dû à la présence de ribosomes sur sa surface. Ces derniers assemblent les acides aminés, qui composent les protéines, en fonction de l'information contenue dans l'ARNm. Les chaînes protéiques ainsi créées sont ensuite insérées dans le réticulum endoplasmique qui a également pour fonction de transporter les protéines d'une région de la cellule vers une autre. Le réticulum endoplasmique lisse quant à lui est le siège de la formation de vésicules qui vont fusionner avec l'appareil de Golgi, ainsi que le siège de la synthèse de phospholipides et d'hormones stéroïdes. Il a également pour fonction de stocker le calcium (Ca^{2+}).

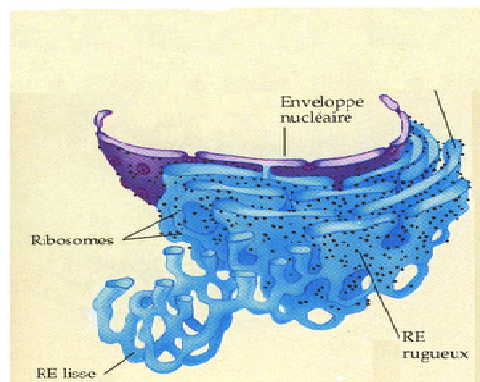


Figure I-4 : Représentation schématique du réticulum endoplasmique⁶.

L'appareil de Golgi permet la modification et l'activation des protéines synthétisées par le réticulum endoplasmique. Il est l'intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Il régule le processus d'exocytose qui consiste en la fusion des vésicules avec la membrane plasmique pour libérer des éléments dans le milieu extracellulaire.

⁶ <http://cours.cegep-st-jerome.qc.ca/101-902-m.f/bio902/cellules/reticulumendoplasmique.htm>

Les mitochondries sont des organites intracellulaires à double membrane comme nous pouvons le voir sur la Figure I-5. Elles interviennent dans la production énergétique de la cellule. Elles sont présentes plus particulièrement dans les tissus ayant une forte activité comme les cellules nerveuses ou musculaires. Les mitochondries possèdent une fonction de stockage des ions Ca^{2+} par la présence intracellulaire de granules. Elles jouent également un rôle dans le contrôle de la concentration de Ca^{2+} du milieu intracellulaire et un rôle déterminant dans la mort cellulaire. Le potentiel de repos des mitochondries possède la particularité de pouvoir atteindre des valeurs de -150 mV .

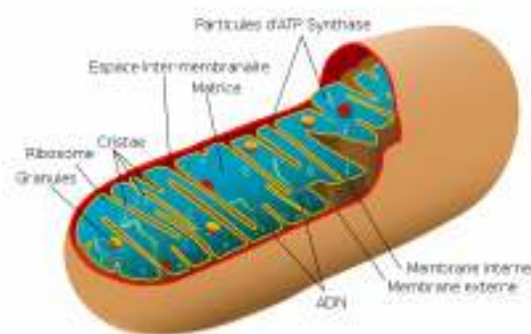


Figure I-5 : Représentation schématique d'une mitochondrie⁷.

Le noyau, représenté par la Figure I-6, renferme par son enveloppe nucléaire le nucléoplasme (équivalent du cytoplasme pour la cellule). Ce dernier est un mélange dense d'enzymes, de nucléotides, de protéines et comprend avant tout le matériel génétique. Il est le siège notamment de la transcription qui consiste en la copie d'une portion de l'ADN en ARNm. La présence de pores dans sa membrane permet des échanges entre le nucléoplasme et le cytoplasme et notamment de l'ARNm nécessaire aux ribosomes pour la synthèse des chaînes protéiques [3].

⁷ http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Animal_mitochondrion_diagram_fr.svg

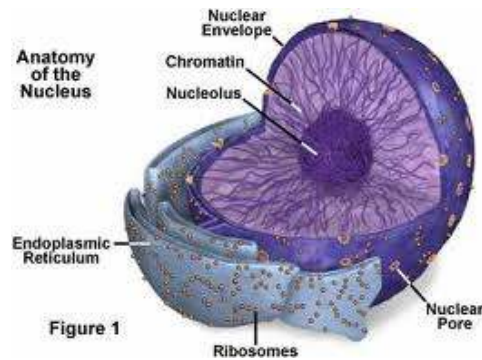


Figure I-6 : Représentation schématique du noyau d'une cellule⁸.

II.3 Conclusion

Dans cette partie nous avons présenté à l'attention des électroniciens de façon non exhaustive la composition d'une cellule eucaryote. Nous pouvons noter que les organelles telles que le noyau, le réticulum endoplasmique et les mitochondries sont caractérisées soit par une double membrane soit par une surface membranaire importante. De plus, ils sont le siège de nombreux mécanismes essentiels à la viabilité de la cellule. Ces constatations sont des éléments qui rendent pertinent l'étude des effets des impulsions de champ électrique introduit dans la partie suivante de ce chapitre. En effet, ces signaux peuvent affecter non seulement la membrane plasmique mais également le domaine intracellulaire.

III Effets des champs électriques pulsés

L'exposition des cellules biologiques aux champs électriques pulsés s'effectue généralement pour les études *in vitro* en plaçant l'échantillon biologique entre deux conducteurs (électrodes) auxquels est appliquée l'impulsion. La Figure I-7 représente un milieu de culture dans lequel baigne une cellule biologique placée entre deux électrodes. Ces dernières sont en contact direct avec le milieu de culture et ce type de dispositif peut être aussi utilisé pour une application *in vivo*, sur des tissus par exemple.

⁸<http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/TexteTD/5TDBioCellL1/1TDCComparProEucar/3Figures/2Organites/1Organites.htm>

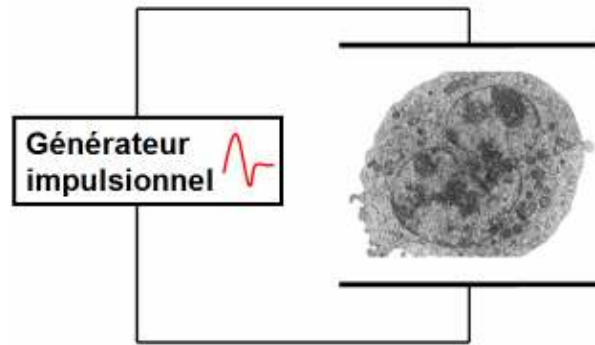


Figure I-7 : Principe d'application de champs électriques pulsés sur une cellule biologique placé entre deux électrodes.

L'objectif de la partie suivante est de présenter les mécanismes biologiques connus de nos jours grâce aux nombreuses études qui ont porté sur l'interaction de champs électriques pulsés dits classiques (kV/m , $\text{ms-}\mu\text{s}$) avec les cellules biologiques. Les éléments qui motivent l'intérêt porté pour les nsPEFs dans la manipulation intracellulaire en tant qu'application biomédicale seront également présentés dans ce sous-chapitre.

III.1 Champs électriques pulsés de durées ms- μs

Il faut savoir que l'intérêt scientifique pour les effets des champs électriques sur les milieux biologiques et plus particulièrement la membrane plasmique, a débuté dès le milieu des années 1960 avec les travaux de Coster [4], A. J. H. Sale et W. A. Hamilton sur les effets des champs électriques forts sur des micro-organismes [5]. Les travaux de Crowley [6], Neumann [7][8] et Zimmermann [9][10], vers la fin des années 1970, ont mis en évidence que les champs électriques induisent une modification de la structure de la membrane augmentant sa perméabilité. Ce phénomène trouve un intérêt dans le domaine industriel [11][12] mais également dans le domaine médical. En effet, différentes équipes scientifiques menées par J. Teissie de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS, Toulouse) [13] [14], Lluís Mir [15] de l'Institut Gustave-Roussy (IGR, Villejuif) et G. Sersa [16] de l'Université de Ljubljana (Slovénie), ont contribué de manière significative à la compréhension du phénomène d'électroporation pour le développement d'une application thérapeutique [17].

III.1.1 Mécanismes de base

Sous l'effet d'un champ électrique appliqué à la cellule, un déplacement de charges s'effectue de part et d'autre de la membrane. L'accumulation de ces charges crée alors un potentiel qui vient se rajouter au potentiel de repos de la membrane cellulaire. Lorsque ce potentiel dépasse un certain seuil (autour de 1 V), la force d'électro-compression qui s'exerce

sur la membrane plasmique entraîne un réarrangement de la structure membranaire engendrant l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique [6]. Ce phénomène est connu sous le nom électropéabilisation ou électroporation. Ce dernier terme laisse sous entendre qu'il y a création de pores dans la membrane. Il existe deux types de pores illustrés par la Figure I-8 : les pores hydrophiles caractérisés par la présence des têtes hydrophiles des phospholipides à l'intérieur de la membrane et les pores hydrophobes.

La réversible ou irréversible du phénomène d'électroporation va dépendre du champ appliqué à la cellule et du potentiel transmembranaire induit. En effet, au dessus d'un potentiel transmembranaire seuil (V_{seuil}), le phénomène d'électroporation réversible peut être observé. Ce potentiel doit être inférieur à un potentiel critique (V_{cr}), au-dessus duquel l'équilibre fonctionnel de la cellule est altéré compromettant alors sa viabilité. Ces valeurs de V_{seuil} et V_{cr} varient d'une cellule à l'autre du fait de leurs différences de fonction, de composition, de structure et de dimension.

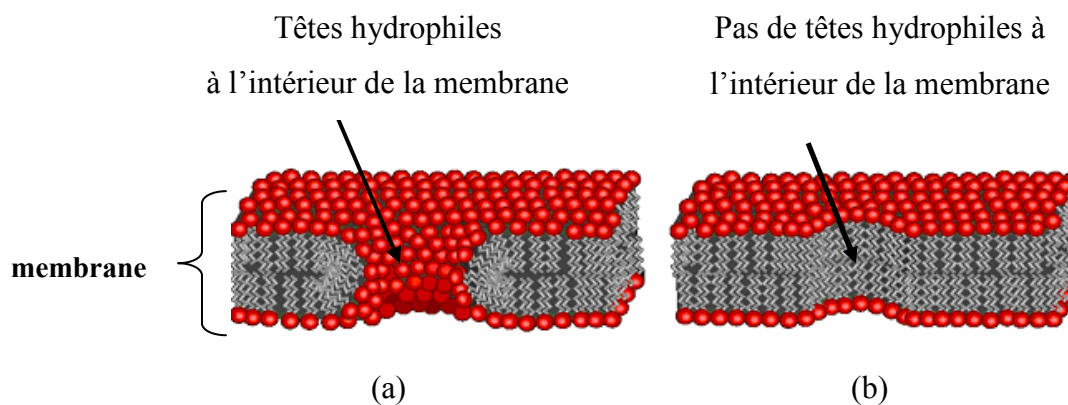


Figure I-8 : (a) Pore hydrophile, (b) Pore hydrophobe, dans la membrane [2].

Il faut souligner que la modification de la perméabilité et la création de ces pores dans la membrane dépendent d'une part de la durée ainsi que de l'amplitude du champ électrique appliqué et d'autre part des caractéristiques de la cellule.

III.1.2 Influence de la durée et de l'amplitude des champs électriques

La modification du PTM et les effets qui en découlent dépendent de la durée et de l'amplitude des champs électriques appliqués comme le synthétise la Figure I-9. La limite inférieure du domaine d'application (V_{cr}) représente le potentiel critique au dessus duquel on observe le phénomène d'électroporation. La limite supérieure (ΔT_{cr}) représente quand à elle la variation de température maximum tolérée avant qu'interviennent les phénomènes

thermiques. Les champs à l'origine de l'électroporation caractérisés par des amplitudes de quelques kV/cm et des durées de l'ordre des microsecondes et millisecondes, trouvent des applications dans le domaine médical mais également dans le domaine industriel (cercles blancs sur la Figure I-9).

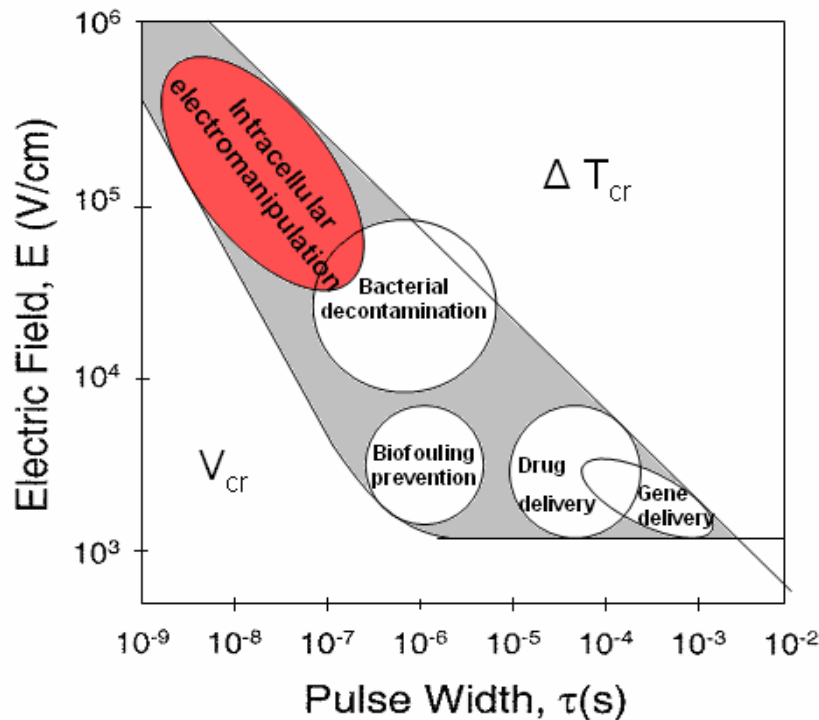


Figure I-9 : Applications et caractéristiques des impulsions d'après [18].

Pour des champs ayant des amplitudes supérieures à 1 MV/m et des durées comprises entre la nanoseconde et quelques centaines de nanosecondes (ellipse rouge sur la Figure I-9), des phénomènes sont observés non seulement sur la membrane plasmique mais aussi au niveau des structures intracellulaires [19]. Avant d'aborder les effets de ces impulsions qui font l'objet de notre étude nous présentons les applications connues des impulsions classiques (ms- μ s, kV/m).

La Figure I-10 illustre les principes sur lesquelles reposent ces applications. Les effets de ces impulsions microsecondes et millisecondes sur la membrane plasmique sont exploitées pour engendrer l'insertion de protéines, de petites et larges molécules, mais également provoquer la fusion ou la destruction de la membrane plasmique et donc la mort cellulaire. Quelques exemples d'applications seront présentés plus en détail dans la partie suivante.

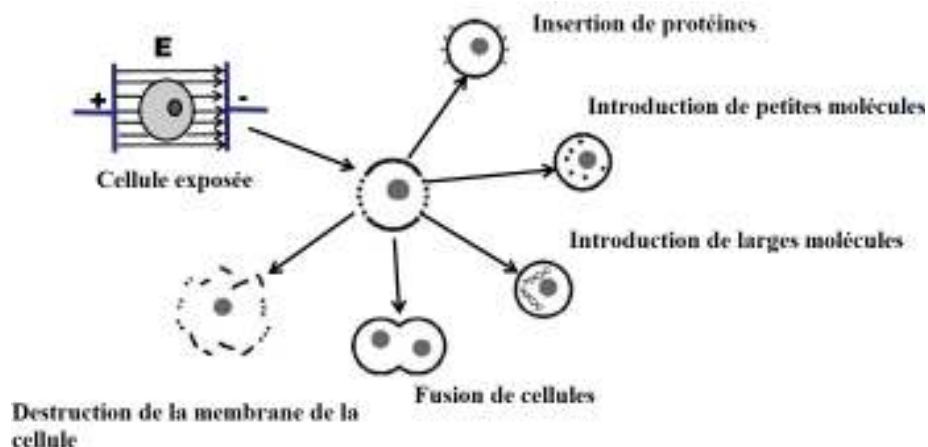


Figure I-10 : Schéma illustrant les applications exploitant les effets des impulsions classiques sur la membrane plasmique.

III.1.3 Quelques applications liées à l'électroporation

L'électroporation dite classique, impliquant des impulsions de durée de l'ordre des millisecondes-microsecondes avec des amplitudes de quelques kV/m, montre son efficacité dans le domaine médical, principalement dans les traitements anti-cancéreux mais également dans la thérapie génique. Ce phénomène est également exploité dans le domaine industriel notamment en tant que technique de décontamination. Ces applications vont être à présent détaillées.

III.1.3.1 Traitement anticancéreux

Les nombreuses études sur les impulsions classiques (ms- μ s, kV/m) ont permis à la fin des années 90 au développement du concept de l'électrochimiothérapie pour les traitements anticancéreux. Le principe de la chimiothérapie anti-tumorale, repose sur l'introduction d'agents chimiques en intraveineuse ou dans la région de la tumeur du patient. Ces composés chimiques ciblent principalement les cellules en division cellulaire et notamment les cellules cancéreuses caractérisées par une prolifération anarchique. La pénétration des agents toxiques se fait dans ce cas de façon spontanée. L'électrochimiothérapie, illustrée sur la Figure I-11, consiste à allier le phénomène d'électroporation à la chimiothérapie. Bien adaptée pour les tumeurs cutanées et sous-cutanées, elle permet d'augmenter l'efficacité des agents toxiques sur les cellules tumorales précédemment électroporées par l'application d'impulsions μ s-ms [17]

Ces impulsions courtes peuvent intervenir également en tant que technique d'ablation de tissus cancéreux, qui repose sur le phénomène d'électroporation irréversible (par opposition à l'électrochimiothérapie) [20]. Cette technique a déjà montré son efficacité lors

d'expériences *in vivo* sur des foies de rat et de porc. Elle présente plusieurs avantages : une application facile par l'emploi d'électrodes aiguilles, et ne nécessite pas l'introduction d'agents chimiques. De plus cette technique possède une action ciblée sur les cellules et épargne les vaisseaux à proximité de la tumeur [21] (par opposition à l'ablation chirurgicale), diminuant ainsi l'écoulement de sang observé avec d'autres techniques d'ablation telles que l'ablation thermique. Elle emploie des champs compris typiquement entre 100 et 3000 V/cm avec des durées allant de 100 μ s à 100 ms.

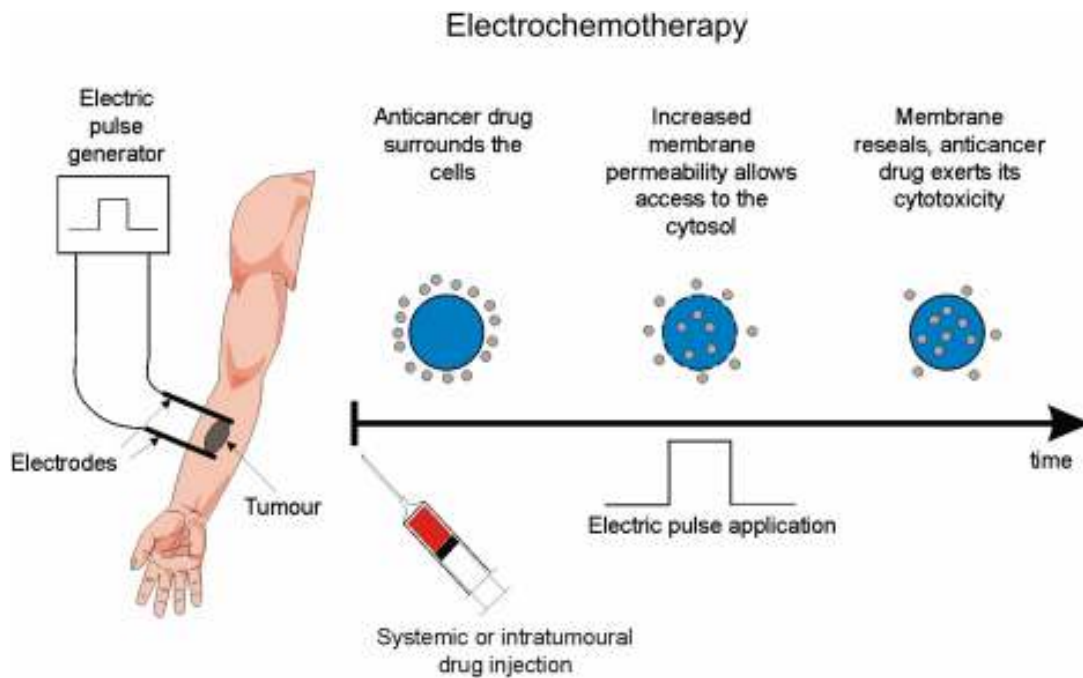


Figure I-11 : Principe de l'électrochimiothérapie [22].

III.1.3.2 Transfection - thérapie génique

La transfection génique consiste en l'introduction d'un matériel génétique du milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Le gène est le support de l'information nécessaire à la synthèse d'une protéine souhaitée. Il est introduit dans la cellule dans le but d'en obtenir un effet thérapeutique.

Dès les années 1980, la transfection génique en utilisant les champs pulsés a montré leurs capacités à en augmenter les effets [8]. De plus, il a été montré [23] que l'emploi combiné de champs électriques pulsés millisecondes et microsecondes de fortes et faibles amplitudes permet d'augmenter de façon conséquente l'efficacité de transfection. En effet, les impulsions courtes de forte amplitude (centaine de μ s, centaine de V/cm), permettent la perméabilisation des membranes alors que les impulsions longues de faible amplitude

(centaine de ms, dizaine de V/cm), ont un rôle électrophorétique, c'est-à-dire qu'ils favorisent le déplacement des plasmides augmentant leur nombre dans le milieu intracellulaire.

III.1.3.3 Applications industrielles

L'emploi des champs pulsés trouvent un intérêt dans le domaine industriel, notamment pour la décontamination bactérienne par l'élimination d'un grand nombre de micro-organismes dans les liquides et dans le domaine agro alimentaire [18] [24] [25]. Cet effet ne repose pas sur un effet thermique mais sur la puissance du champ électrique pulsé, ayant des durées de l'ordre de la dizaine de microsecondes et des amplitudes de plusieurs kV/cm. Les champs électriques pulsés peuvent intervenir en complément de méthodes traditionnelles de vinification en permettant d'intensifier l'extraction des arômes et tanins (impulsion de l'ordre de la μ s, $E=35-50$ kV/cm). Ils sont employés également dans la prévention de l'encrassement biologique des canalisations employant des eaux non traitées (eau de mer, lacs, rivières) qui font l'objet de développement organique empêchant ou diminuant l'écoulement des eaux dans les canalisations. Les champs électriques pulsés employés sont de plusieurs kV/cm pour des durées submicrosecondes.

Dans cette sous-partie, nous avons présenté les effets et les mécanismes cellulaires connus résultant de l'exposition à des champs électriques pulsés ms- μ s, mais également les applications qui exploitent d'ores et déjà ces mécanismes.

Comme nous avons pu l'expliquer, la durée et l'amplitude de l'impulsion déterminent la cible cellulaire. Les champs électriques pulsés de plus courte durée et de plus forte amplitude, présentés par la suite, induisent des champs beaucoup plus importants au niveau des membranes. Les mécanismes alors mis en jeu sont différents et sont encore peu, voire mal connus.

III.2 Champs électriques pulsés de durées ns

Caractérisées par de très faibles durées (< 100 ns) et de très fortes amplitudes (de l'ordre du MV/m), ces impulsions couramment appelées nanosecond Pulsed Electric Fields (nsPEFs) affectent non seulement la membrane plasmique mais également le milieu intracellulaire. Il est nécessaire de différencier l'électroporation que l'on appelle classique de celle obtenue avec des nsPEFs.

Quelques exemples d'effets des nsPEFs décrits dans la littérature sont présentés ci-après. Les premiers sont des effets structurels tels que l'externalisation de la

phosphatidylsérine et la création de pores dans la membrane comme de celles des sous structures cellulaires. Les effets secondaires quand à eux correspondent d'avantage à des phénomènes physiologiques tels que le dégagement intracellulaire de calcium, l'activation des caspases, menant à l'apoptose de la cellule.

III.2.1 Effets primaires liés à l'application de nsPEF

III.2.1.1 *Perméabilisation de la membrane plasmique*

Les impulsions nanosecondes de très fortes amplitudes interagissent dans un premier temps avec la membrane plasmique. Une modification du potentiel de la membrane plasmique au cours de l'exposition est observée avec notamment une distribution non uniforme du potentiel le long du périmètre de la cellule. En effet, la variation du potentiel transmembranaire s'effectue principalement sur les hémisphères qui font faces aux électrodes Figure I-7 [26].

L'augmentation du potentiel transmembranaire ainsi que du champ électrique dans la membrane plasmique, induisent une modification de sa structure et permet notamment le passage de molécules auxquelles elle est imperméable dans son état normal [27][28]. Le mécanisme associé à cette perméabilisation diffère de celui obtenu avec des champs électriques de durées ms- μ s, notamment en terme de délai au bout duquel le phénomène est observable. En effet, les études de [29], sur des cellules Jurkats comparent la rapidité de perméabilisation de la membrane plasmique pour des impulsions classiques (10-100 μ s, 3-6 kV/cm) et des nsPEFs (60-300 ns, 30-60 kV/cm). L'électroporation classique est un phénomène instantané alors que la perméabilisation observée avec les nsPEFs n'apparaît qu'après plusieurs minutes.

III.2.1.2 *Perméabilisation des membranes sous cellulaires*

Les nsPEFs peuvent également affecter les membranes sous cellulaires. En effet, les travaux de l'équipe de K. H. Schoenbach [30] ont considéré des granulocytes éosinophiles (cellules immunitaires sanguines) en suspension dans une cuvette d'électroporation à laquelle ont été appliquées des impulsions de 60 ns avec une amplitude de 5.3 MV/m. Par cette expérience, il a été montré la perméabilisation de granules présentes dans les éosinophiles mais également que l'emploi de ce type d'impulsion préserve l'intégrité de la membrane plasmique. Les travaux présentés dans [19] ont montrés la perméabilisation des membranes mitochondriales de cellules Jurkat. Ces dernières ont été placées sur une lame de microscope entre deux électrodes séparées d'une distance de 100 μ m. La perméabilisation des

mitochondries a été observée suite à l'exposition à plusieurs nsPEF de durée 4 ns avec des amplitudes de 10 MV/m.

III.2.1.3 Externalisation de la phosphatidylserine

La phosphatidylserine est un phospholipide qui constitue la membrane plasmique. Il est localisé sur la face intérieure de la membrane plasmique. L'externalisation de la phosphatidylserine dans l'environnement extracellulaire signale la détresse de la cellule et exprime la nécessité de la phagocyter et donc de l'éliminer de l'organisme. Cette mort programmée de la cellule s'appelle l'apoptose.

Lors de l'exposition à des nsPEF, l'externalisation de la phosphatidylserine peut être un effet observé, il résulte de l'instabilité structurelle de la membrane plasmique induite par le champ impulsionnel [31]. Ce phénomène immédiat est distinct du symptôme qui incombe à l'apoptose. En effet, dans l'étude de P. T. Vernier [32] des lymphocytes T humains Jurkats sont placées sur une lame de microscope entre deux électrodes séparées de 100 μm . L'externalisation de la phosphatidylserine a été observé après exposition à 50 nsPEFs de durée 7 ns et d'amplitude 2.5 MV/m. Ce phénomène est d'autant plus important que l'amplitude et le nombre des nsPEF sont importants comme le montre l'étude [33].

Il faut savoir que l'externalisation de la phosphatidylserine est régulée par une enzyme sensible au calcium. Ceci confère une importance particulière à un autre effet des nsPEFs qui est le dégagement intracellulaire de calcium [34].

III.2.2 Effets secondaires à l'application d'un nsPEF

III.2.2.1 Augmentation du calcium intracellulaire

L'augmentation de la concentration en ions calcium dans le milieu intracellulaire en réponse à des nsPEFs peut s'expliquer par deux phénomènes. Le premier consiste en la pénétration des ions calcium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Le second consiste en la libération de calcium par les organelles présentes dans le milieu intracellulaire.

Les travaux de [35] sur des cellules chromaffines (cellules des glandes surrénales) mettent en évidence qu'une seule nsPEF de durée 4 ns et d'amplitude 8 MV/m peut induire une forte augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, expliqué par la modification du comportement des canaux ioniques spécifiques aux ions calcium. En effet, ces derniers dépendent du voltage et sont affectés par les nsPEFs. Ils permettent alors le passage d'ions calcium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire.

D'autre part l'augmentation des ions calcium dans le milieu intracellulaire peut apparaître au bout de quelques millisecondes, en conséquence du relargage des ions calcium emmagasinés dans le réticulum endoplasmique et les mitochondries [32].

L'étude [36] montre sur des granulocytes neutrophiles (cellules sanguines immunitaires de la moelle osseuse) que la concentration intracellulaire en calcium dépend de l'amplitude des nsPEFs employés (durée variant de 60 ns et 300 ns avec des amplitudes entre 12-60 kV/cm). La même observation a été constatée sur des cellules Jurkats placées entre deux électrodes séparées de 80 μm positionnée sur une lame de microscope. Ce système d'exposition a permis d'exposer les cellules à des impulsions de 60 ns possédant des amplitudes entre 25-100 kV/cm [37].

III.2.2.2 Mort cellulaire : apoptose

L'apoptose est la mort programmée de la cellule. En temps normal, ce phénomène intervient dans des procédés physiologiques et pathologiques. En effet, il joue un rôle important dans le renouvellement de tissus tels que la peau mais il peut être également à l'origine de pathologies telles que les cancers et les maladies neuro-dégénératives. Dans le cas des cancers, les cellules prolifèrent de façon anarchique. Le phénomène d'apoptose est en défaut et ne parvient pas à réguler le développement de ces cellules. Pour les maladies neuro-dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson les cellules neuronales meurent trop rapidement dû à un excès de ce phénomène d'apoptose [38] [39].

Ce phénomène peut intervenir suite à l'exposition à une impulsion nanoseconde de très forte amplitude sous condition que l'impulsion soit suffisamment courte, et que l'amplitude soit supérieure à un seuil défini par le type de cellule exposé [40]. L'apoptose résulte de deux phénomènes, l'un à court terme et l'autre à long terme. La modification de la structure de la membrane plasmique en réponse aux nsPEFs expliquée précédemment avec l'externalisation de la phosphatidylserine est l'effet à court terme. Deuxièmement, le phénomène d'apoptose peut être la conséquence d'un ensemble de réactions physiologiques, internes à la cellule, qui a pour but de programmer la mort cellulaire. En effet, la création de pores dans la membrane des mitochondries va libérer des cytochromes C qui à leur tour vont activer les caspases. Ces dernières jouent un rôle central dans le phénomène d'apoptose. Lorsqu'elles sont activées, des réactions en cascade entraînent la mort programmée de la cellule [41].

La réaction biologique diffère d'une cellule à l'autre comme a pu le montrer les travaux de P. T. Vernier en comparant des cellules Jurkat T avec les cellules C6 gliomales de rat [42].

III.3 Vers des applications

L'étude du phénomène d'apoptose sur les lignées cellulaires de type cancéreuse montre que l'emploi des nsPEFs peut être une alternative au traitement anti-cancéreux.

Des études menées par R. Nuccitelli ont montré l'intérêt des impulsions nanosecondes dans la destruction de mélanomes [43] mais également dans l'inhibition du développement des tumeurs [44].

Les résultats d'expérimentation obtenus par l'équipe de M. Stacey en 2003 mettent en évidence l'influence du nombre d'impulsion sur la survie de différents types de lignées cellulaires à ces agressions. Et montre la capacité des nsPEFs d'endommager l'ADN présent dans le noyau [45].

Alors que l'étude [46] montre que l'emploi des nsPEFs peut induire la mort de bactéries telles que l'*Escherichia coli* et par conséquent que ce type d'impulsion peut trouver une application dans la décontamination des aliments.

III.4 Conclusion

Pour résumer, nous avons montré les mécanismes et phénomènes connus observés après l'exposition à des champs électriques classiques (ms- μ s, quelques kV/cm), notamment leurs effets localisés principalement à la membrane plasmique. Alors que les nsPEFs ont la possibilité d'affecter la membrane plasmique mais aussi le milieu sous cellulaire. La perméabilisation observée avec ces impulsions courtes de très fortes amplitudes n'est pas comparable à l'électroporation classique. En effet, les mécanismes impliqués sont différents et la perméabilisation n'est alors plus un phénomène instantané mais retardé.

Il faut savoir que les phénomènes tels que la perméabilisation de la membrane, le dégagement intracellulaire ainsi que l'ensemble des mécanismes qui conduisent à la mort de la cellule, restent encore peu voire mal connus du fait du nombre et de la complexité des mécanismes biologiques qui sont impliqués. La compréhension et la maîtrise des mécanismes sont nécessaires pour développer d'éventuelles applications médicales (traitement anti-cancéreux) ou industrielles (décontamination bactérienne).

Pour ce faire, il est primordial d'associer les compétences des biologistes et des médecins pour la mise en place de moyens d'expérimentations.

La Figure I-12 présente les différents axes de recherche qui sont impliqués dans l'étude des effets de nsPEF sur les cellules biologiques. La première étape consiste en le développement de générateurs capables de fournir des impulsions courtes et également en la définition d'applicateurs adaptés qui permettent de supporter des impulsions de très forte amplitude. Ces derniers doivent aussi prendre en compte les contraintes biologiques.

Les méthodes d'investigations peuvent se diviser en deux catégories : les études expérimentales et les études numériques. Ces méthodes d'investigation se complètent et permettent la validation des effets biologiques observés.

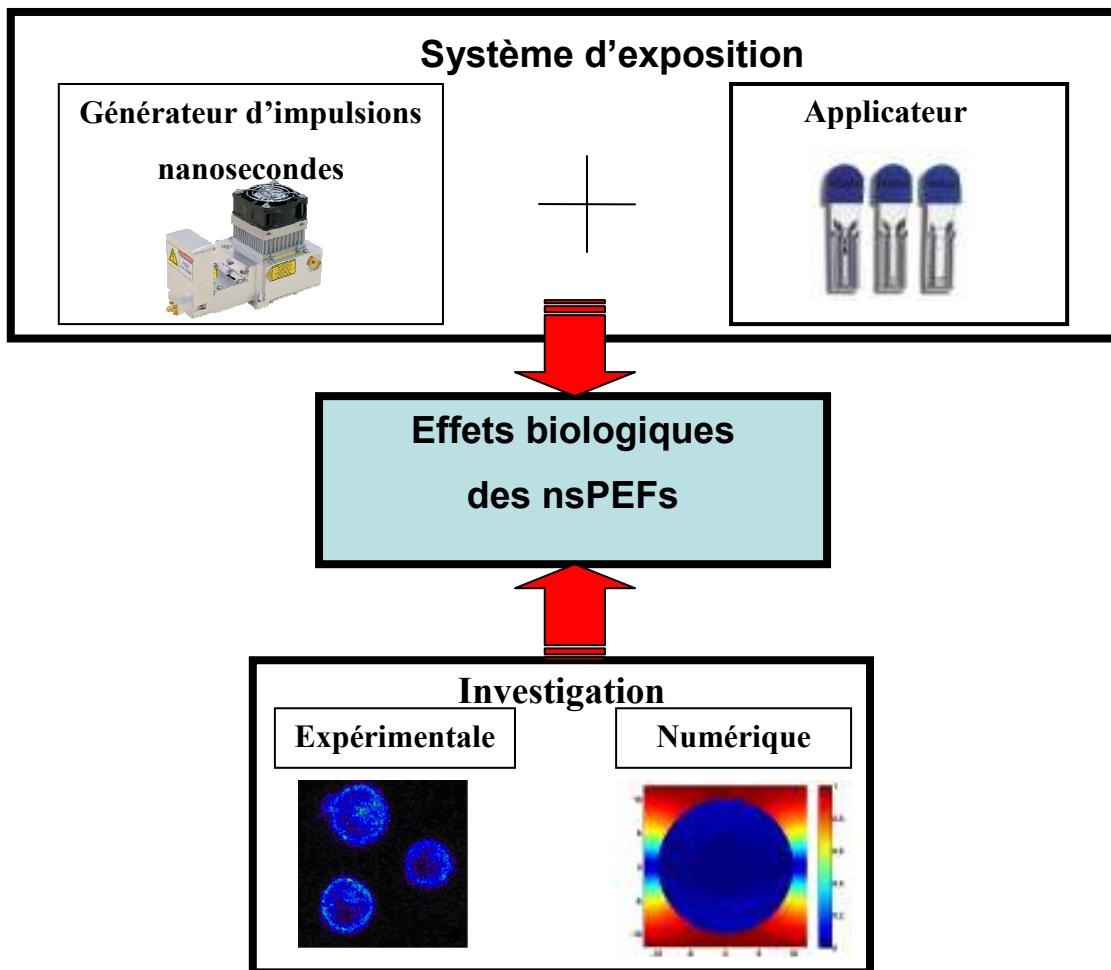


Figure I-12 : Contexte de la recherche sur l'étude des effets nsPEF.

Nous allons dans la partie suivante présenter succinctement la mise en œuvre expérimentale nécessaire à l'étude des effets des nsPEFs sur les milieux biologiques qui comprend le système d'exposition (générateur, applicateur, milieu biologique) et les moyens employés pour étudier les effets biologiques.

IV Etudes expérimentales

IV.1 Générateurs impulsionnels haute tension

Les générateurs nécessaires à l'étude doivent à partir d'une énergie continue être capables de générer un champ impulsionnel de très courte durée et de très forte amplitude. Comme nous avons pu le mentionner auparavant, l'interaction des champs impulsionnels avec les cellules dépend de la durée, de l'amplitude, de la forme, mais également du nombre d'impulsions. Il est donc nécessaire que les générateurs soient capables de générer des impulsions dont la forme et la durée sont reconfigurables et reproductibles.

La Figure I-13 présente le principe de fonctionnement d'un générateur impulsionnel à stockage capacitif. La première étape consiste en la charge d'un composant de stockage, ici un condensateur. Lorsque le commutateur se ferme le condensateur se décharge créant ainsi une impulsion aux bornes de la charge. Ce type de générateur est limité par la tenue en tension des commutateurs.

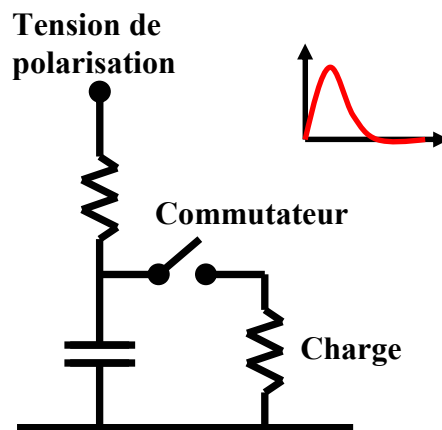


Figure I-13 : Principe de fonctionnement d'un générateur pulsé.

Une autre technique de génération d'impulsions, basée sur le même principe, consiste à utiliser un réseau (plusieurs éléments de stockage et plusieurs commutateurs). L'emploi des réseaux permet dans un premier temps de répartir les hautes tensions continues sur l'ensemble des commutateurs mais également d'augmenter la tension de sortie. C'est sur ce principe que repose le générateur de Marx [47][48].

Une autre technique de génération consiste à employer des lignes de transmission c'est le cas du générateur Blumlein [49] et des transformateurs à ligne de transmission (TLT)[50].

La Figure I-14 présente les éléments qui permettent la génération des impulsions.

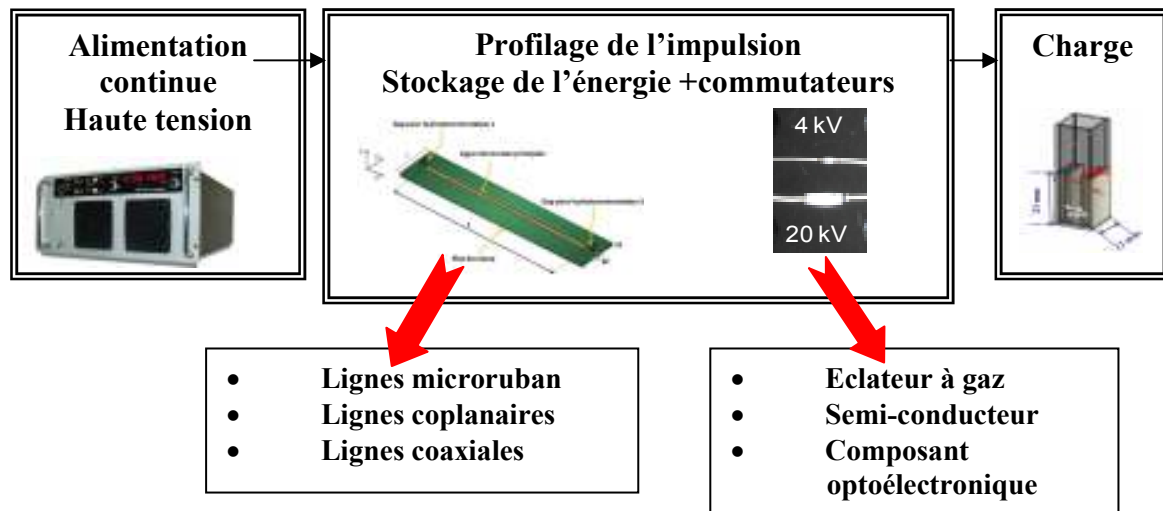


Figure I-14 : Schéma du système de génération d'impulsion haute tension.

Le stockage de l'énergie et la mise en forme de l'impulsion s'effectuent par des lignes de transmission qui peuvent être réalisées par différentes technologies (lignes microrubans, lignes coaxiales, lignes coplanaires).

La décharge de l'impulsion s'effectue après fermeture rapide du commutateur (libération de l'énergie emmagasinée au cours d'une très courte durée). Les techniques de commutation les plus fréquemment employées sont celles qui reposent sur les commutateurs à base de semi-conducteur par exemple les MOSFET [51], les éclateurs à gaz [52], ou les composants optoélectroniques [53] (technique émergente). Leurs vitesses de commutation influent directement sur les temps de montée et de descente des impulsions générées.

Deux exemples de générateur impulsionnel haute tension sont donnés ici. Le générateur FPG 10-1SM10, FID Technology permet de produire une impulsion de durée 10 ns et dont le temps de montée est de 1 ns. L'amplitude des impulsions est réglable entre 4.5 et 10 kV. Ce générateur a été employé dans la caractérisation de la cuvette biologique en tant qu'applicateur d'impulsion nanoseconde, constituant les travaux de thèse de M. Kenaan [54][55].

Des générateurs impulsionnels développés au sein de Xlim reposent sur le principe des générateurs à ondes gelées [56] [57]. L'emploi de commutateurs optoélectroniques présente comme avantage de pouvoir générer des impulsions avec des temps de montée très courts. Ces générateurs sont capables de délivrer des impulsions avec des profils, durées et amplitudes variables. Ils utilisent des lignes de transmission en technologie microruban ou câbles coaxiaux. Globalement, ils permettent de générer des impulsions rectangulaires, et

bipolaires entre 100 ps et 50 ns avec des amplitudes pouvant atteindre 20 kV avec des temps de montée variant de 70 ps à quelques nanosecondes (travaux de thèse de S. KOHLER). Ils sont aussi couplés à des outils d'analyse de la réponse des cellules (travaux de thèse de A. De Angelis)

IV.2 Système d'exposition

Une fois générée l'impulsion est transmise jusqu'à l'applicateur qui permet d'exposer le milieu biologique à l'impulsion ns. L'exposition d'un milieu biologique à une impulsion électromagnétique (EM) se fait principalement par conduction (emploi d'électrodes). Pour les impulsions les plus courtes, les dispositifs d'exposition par rayonnement (emploi d'une antenne) sont en cours de développement. Nous nous concentrerons principalement sur les dispositifs constitués d'électrodes en contact avec le milieu biologique.

Il est important de savoir exactement à quel champ est exposé le milieu biologique et le volume qui peut être affecté. La géométrie de l'applicateur a une influence directe sur la distribution du champ et la forme des impulsions délivrées à la cellule.

Les niveaux de champ que nous souhaitons atteindre pour l'étude des effets sous structuraux des impulsions nanosecondes atteignent des valeurs de l'ordre de la dizaine de MV/m. Pour cela, puisque les générateurs qui existent à ce jour atteignent des amplitudes de plusieurs kV, les électrodes sur lesquelles reposent les applicateurs doivent être séparées d'une très faible distance afin d'en augmenter le champ électrique. Le champ appliqué au milieu biologique est régi par l'équation suivante :

$$E = \frac{\Delta V}{D_{elec}} \quad (V / m) \quad \text{I-1}$$

Le champ électrique inter-électrode dépend de la différence de potentiel qui existe entre les électrodes notée ΔV et de la distance inter-électrode D_{elec} .

Le choix de l'applicateur joue un rôle primordial dans l'étude des effets des impulsions ultracourtes et de très forte amplitude puisque la valeur du champ et la durée de l'impulsion détermine les effets et la cible.

IV.2.1 Applicateurs pour l'électroporation ms- μ s

Les premiers applicateurs *in vivo* ont été développés avec la création du CLINIPORATOR qui fut le premier dispositif industriel permettant d'exposer des impulsions ms- μ s pour l'électrochimiothérapie. Ils résultent de projets européens portés par Lluís Mir qui débute dès la fin des années 90 [17] [58].

Il existe deux catégories d'applicateurs comme l'illustre la Figure I-15:

- les applicateurs planaires
- les applicateurs de type aiguille.

Ils sont adaptés pour des tumeurs cutanées ou sous cutanées localisées et en combinaison avec un agent cytotoxique ils permettent de cibler les effets de ces composants chimiques sur les cellules perméabilisés par l'applicateur. Les impulsions employées avec ce type d'applicateur sont caractérisées par des durées de l'ordre des ms- μ s avec des amplitudes de quelques kV/m.



Figure I-15 : Illustration d'applicateurs basés sur des électrodes planaires et électrodes aiguilles [22].

Un autre applicateur très couramment employé pour l'électroporation *in vitro* est la cuvette biologique. Les cuvettes biologiques pour l'électroporation diffèrent des cuvettes classiques par la présence d'électrodes métalliques qui remplacent deux faces opposées de cette dernière. La cuvette biologique permet l'exposition d'un grand nombre de cellules en suspension. Elle est très fréquemment employée pour l'électroporation classique.



Figure I-16 : Cuvette d'électroporation avec différentes distances inter-électrodes⁹ (de gauche à droite 1 mm, 2 mm et 4 mm).

⁹ <http://www.dutscher.fr/data/pdf/page1181.pdf>

IV.2.2 Appicateurs pour l'électroporation ns

Dans cette partie, nous présenterons de façon non exhaustive les systèmes d'exposition et applicateurs adaptés pour l'étude in vitro des nsPEFs.

IV.2.2.1 Cuvette biologique

L'emploi de la cuvette d'électroporation pour l'étude des effets des nsPEFs présente un inconvénient du fait de la relativement grande distance inter électrode. En effet, le générateur employé doit alors être capable de générer des impulsions de l'ordre de la dizaine de kV et des durées d'impulsion dans le domaine des nanosecondes. Afin d'augmenter l'amplitude du nsPEF, une alternative consiste à diminuer la distance qui sépare les électrodes dans la cuvette.

Elle peut varier entre 4 mm à 1 mm, permettant ainsi d'augmenter le champ à l'intérieur de la cuvette par quatre. La Figure I-17 présente un montage typique qui est constitué d'un générateur impulsionnel relié par l'intermédiaire d'une ligne de transmission à une cuvette. Le Tap off, présent entre le générateur et la cuvette d'électroporation, permet d'extraire une partie du signal incident et ainsi de vérifier et caractériser l'impulsion à la sortie du générateur. Une sonde haute tension permet de mesurer l'impulsion reçue par l'applicateur. Le montage d'exposition est présenté en détails dans le travaux de thèse de M. Kenaan [54] [55].

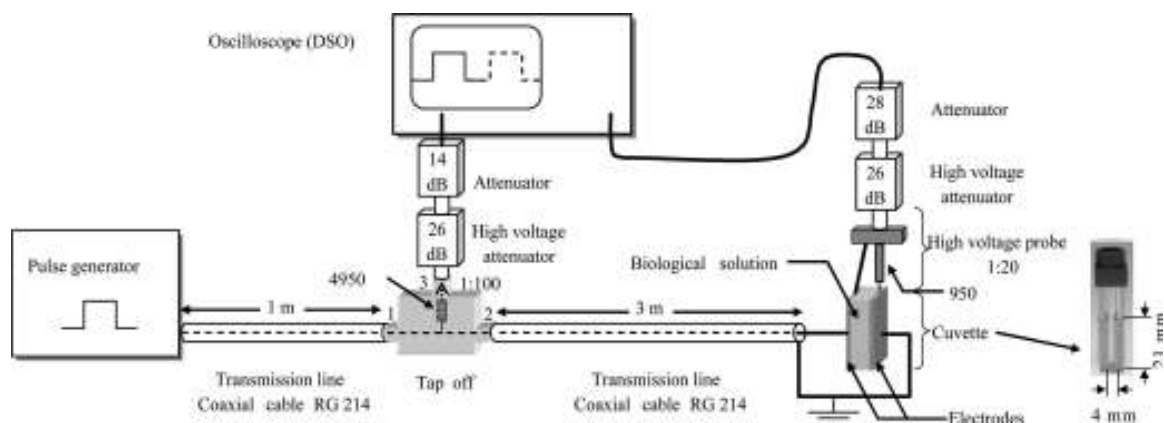


Figure I-17 : Schéma d'un système d'exposition employant une cuvette d'électroporation [54].

Les travaux de [54] ont considérés des signaux de deux générateurs impulsionnels, l'un capable de générer des impulsions de 10 ns avec des amplitude entre 4.5 kV et 10 kV avec des temps de montée proches de la ns et le second permettant d'étudier des impulsions de 3 ns avec des amplitudes allant jusqu'à 3 kV avec des temps de montée de 800 ps. Les

champs alors induits dans la cuvette, caractérisée par une distance inter-électrode de 4 mm, peuvent atteindre 0.750 MV/m et 2.5 MV/m avec ces types d'impulsion. La Figure I-18 présente la comparaison temporelle et spectrale de l'impulsion incidente de 10 ns et d'amplitude 4.5 kV délivrée par le générateur et celle mesurée aux bornes de la cuvette. On peut remarquer sur la Figure I-18(a) que le temps de montée de l'impulsion au niveau de la cuvette d'électroporation est plus long que celui de l'impulsion incidente. Cette différence peut s'expliquer à l'aide la Figure I-18(b) qui nous permet de constater que le spectre de l'impulsion incidente diffère de celui de l'impulsion mesurée aux bornes de la cuvette au-delà de 150 MHz. De la même façon, les Figure I-19 (a) et (b) comparent l'impulsion incidente bipolaire de 2 ns avec celle mesurée aux bornes de la cuvette. Le même phénomène de dégradation des fronts de montée de l'impulsion est observé Figure I-19 (a). La comparaison des spectres (Figure I-19 (b)) met également en évidence que la cuvette est adaptée jusqu'à environ 150 MHz. Ces résultats montrent que l'emploi de la cuvette pour l'étude des nsPEFs est adapté pour des impulsions d'une durée au moins égale à 10 ns et dont le temps de montée est supérieur à la ns.

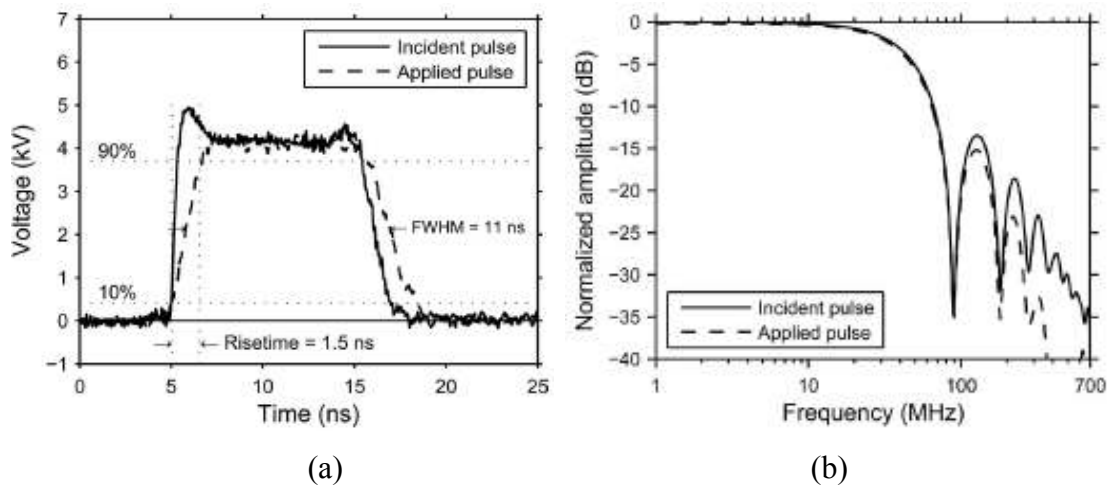


Figure I-18 : Comparaison du champ incident et du champ appliqué pour une impulsion rectangulaire de 10 ns(a) dans le domaine temporel (b) dans le domaine fréquentiel [54].

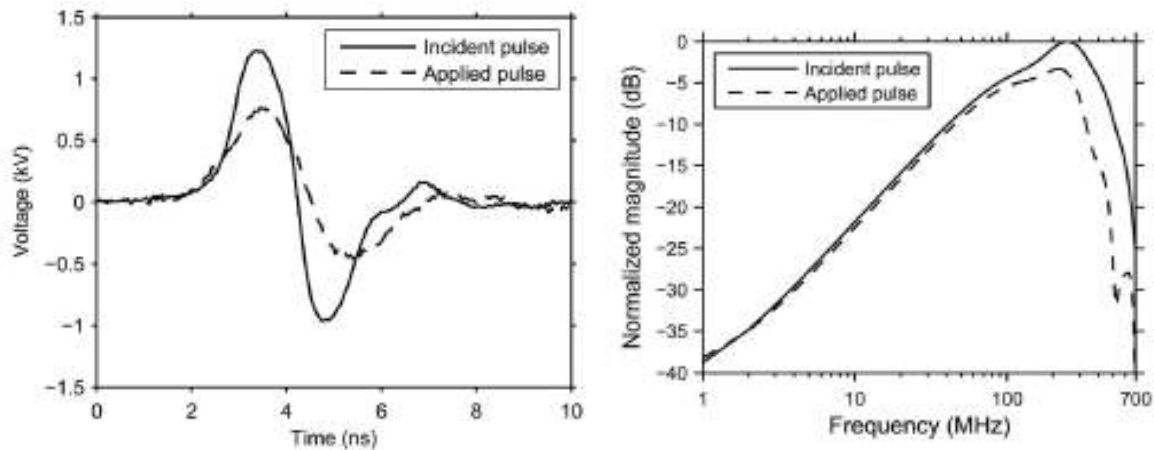


Figure I-19 : Comparaison du champ incident et du champ appliqué pour une impulsion bi-polaire de 2 ns(a) dans le domaine temporel (b) dans le domaine fréquentiel [54]

IV.2.2.2 *Electrodes aiguilles - électrodes filaires*

Le système d'exposition présenté par la Figure I-20 est un système spécialement conçu sur une lame de microscope pour l'exposition de cellules individuelles et pour des études dites « Patch-Clamp ». La méthode « patch-clamp » permet de mesurer grâce à une pipette en contact avec la cellule sélectionnée de déterminer le potentiel de repos, mais aussi suivre l'évolution de la résistance et la capacité de la membrane au court du temps. Dans les travaux présentés dans [59], les électrodes en tungstène d'un diamètre de 125 μm et séparées de 310 μm , permettent de délivrer l'impulsion ns à la cellule sélectionnée. L'amplitude des impulsions appliquées varie de 540 V à 580 V, induisant un champ au niveau de la cellule autour de 12 kV/cm.

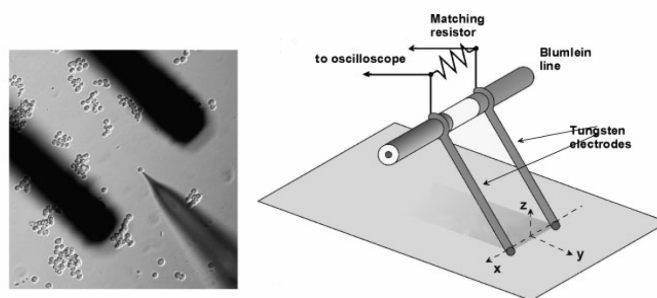


Figure I-20 : Système d'exposition pour une seule cellule basée sur l'emploi d'électrodes de tungstène séparées par une distance de 310 μm [59].

IV.2.2.3 *Micro dispositif*

Les microdispositifs s'inscrivent dans la problématique d'étudier des impulsions toujours plus courtes et de plus fortes amplitudes. Les électrodes entre lesquelles se trouvent

les cellules biologiques, sont séparées d'une distance faible (centaine de micromètre) dans le but d'atteindre de fortes valeurs de champ électrique.

Les différents applicateurs présentés dans cette partie possèdent un design leur permettant non seulement d'exposer les milieux biologiques mais également d'observer en temps réel la réponse des cellules biologiques. En effet, le support en verre sur lequel est développé l'applicateur permet de positionner la totalité du dispositif en dessous de l'objectif d'un microscope. Ce système complet permet alors d'observer avant, pendant et après la réponse de la cellule à une excitation de type nsPEF.

La Figure I-21, présente un applicateur combiné à un générateur de type Blumlein, réalisé avec des câbles BNC et un commutateur basé sur la technologie MOSFET développé par [60]. Les électrodes de l'applicateur sont séparées d'une distance de 100 μm . L'impédance présentée par la charge, qui est composé des électrodes et de la solution, est fixée de façon à ce qu'elle égale la valeur de l'impédance caractéristique des câbles coaxiaux. Ce dispositif permet l'exposition à des impulsions de 10 ns de durée avec des amplitudes atteignant le kV et des temps de montée de 1-2 ns. Les champs électriques obtenus avec cet applicateur peuvent atteindre des amplitudes de l'ordre de 100 kV/m.

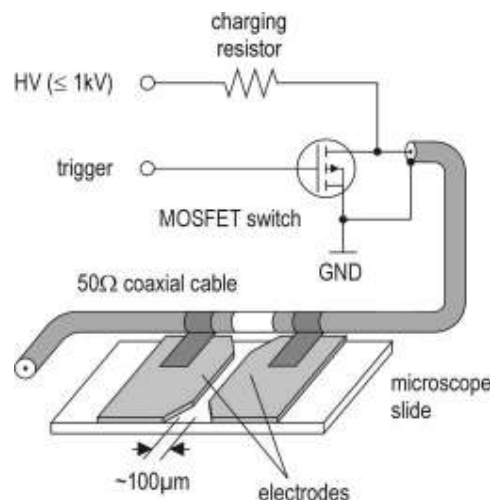


Figure I-21 : Dispositif d'exposition permettant d'atteindre des champs électriques jusqu'à 100 kV/cm [60].

D'autres applicateurs pour l'étude des effets des nsPEFs sur les cellules vivantes prévoient la circulation des cellules entre les électrodes en plus du suivi temporel des réponses cellulaires rendu possible grâce à l'emploi d'une lame de microscope comme support du dispositif [61–63]. Ces biopuces microfluidiques sont développées sur le principe des lignes coplanaires comme nous pouvons le voir sur Figure I-22. Le champ est généré entre la ligne

centrale et les lignes situées de part et d'autre de la ligne centrale. Ces lignes coplanaires sont séparées d'un espace de $100\ \mu\text{m}$, qui constitue les canaux dans lesquels circulent les cellules. Les électrodes sont réalisées avec un matériau type or pour sa forte biocompatibilité mais également pour sa très bonne conductivité. Ces applicateurs ont permis d'étudier l'effet de trains d'impulsions de durée $10\ \text{ns}$ et des amplitudes comprises entre $3.5\ \text{MV/m}$ et $4.5\ \text{MV/m}$.

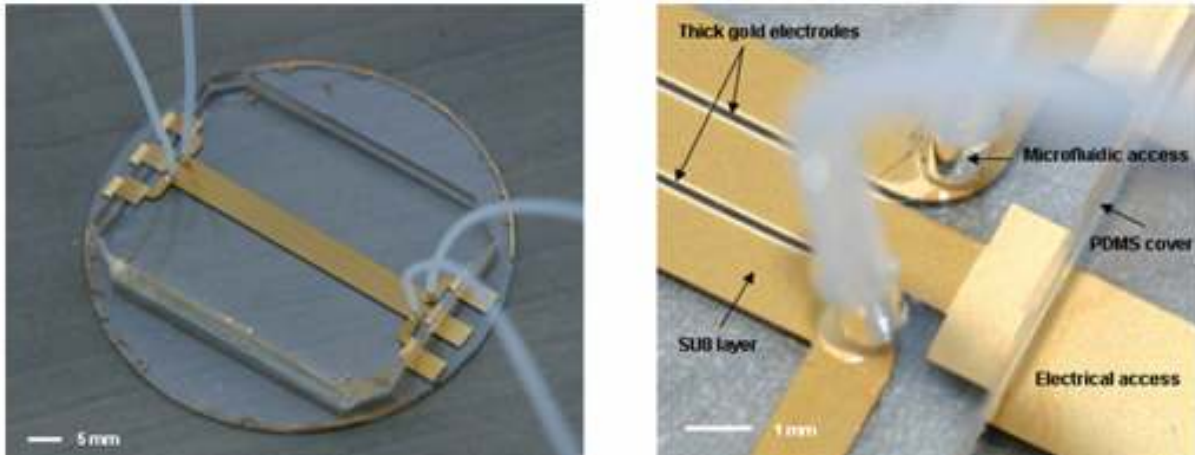


Figure I-22 : Microdispositif fluide [63].

IV.2.2.4 Système avec électrodes sans contact avec le milieu biologique - Cellule TEM ouverte

La cellule TEM ouverte est une ligne de transmission rectangulaire composée d'un conducteur central appelé le septum et de deux plaques métalliques placées de part et d'autre (Figure I-23). L'avantage de ce dispositif est sa capacité à générer un champ électrique et magnétique uniforme (mode TEM). Le positionnement d'une boîte de Pétri entre le septum et l'un des murs métalliques permet d'exploiter cette uniformité de champ pour l'étude des nsPEFs [64]. Cette structure présente deux originalités. Dans un premier temps, elle permet d'exposer des milieux biologiques à des champs impulsionnels sans qu'il y ait contact direct entre les électrodes et le milieu biologique. La boîte de Pétri permet ainsi d'éviter d'éventuels réactions électrochimiques dont les électrodes sont le siège. La seconde originalité de ces travaux réside en la définition d'un dispositif permettant l'étude des effets d'impulsions nanosecondes et inférieures à la nanoseconde.

La Figure I-24 (a) et (b) comparent l'impulsion incidente (en sortie du générateur), réfléchiée par la cellule TEM et transmise à la cellule TEM pour des impulsions rectangulaire et bipolaire de durée $1.2\ \text{ns}$, de temps de montée de $800\ \text{ps}$ et des amplitudes de champ électrique atteignant $\sim 140\ \text{kV/m}$. Pour les deux impulsions, le signal réfléchi par la cellule

TEM est très faible montrant que ce dispositif est adapté pour l'étude des nsPEFs de l'ordre de la nanoseconde.

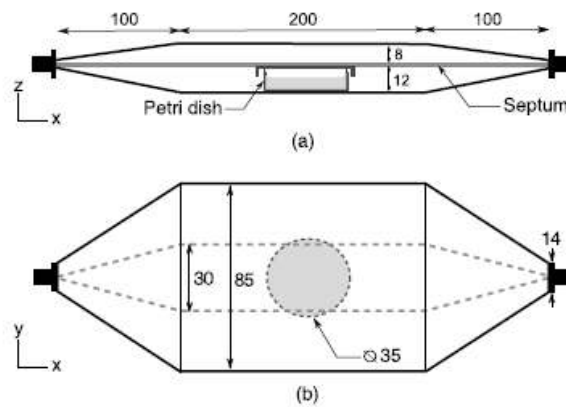


Figure I-23 : Représentation d'une cellule TEM. (a) vue de profil avec une boîte de Pétri entre le septum et l'un des murs métalliques. (b) vue de dessus avec la boîte de Pétri [64].

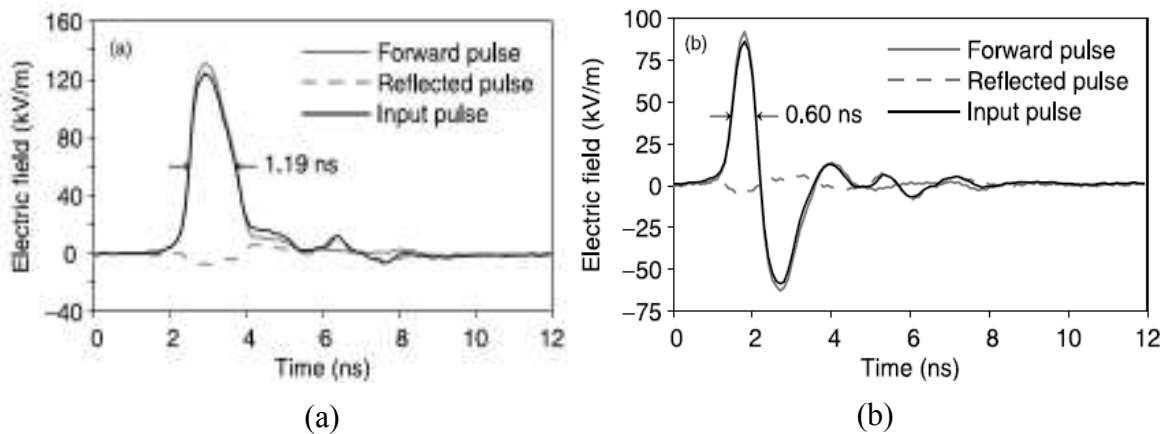


Figure I-24 : Comparaison des champs incident en sortie du générateur (« forward pulse »), réfléchi par la cellule TEM (« reflected ») et transmis à la cellule TEM (« input ») (a) impulsion rectangulaire. (b) impulsion bipolaire, de durée 1.2 ns de temps de montée de 800 ps et d'amplitude ~ 140 kV/m [64].

IV.2.3 Conclusion

Dans cette partie, nous avons présenté les applicateurs pour l'étude de l'électroporation classique mais également ceux employés pour l'étude des effets des nsPEFs. De la cuvette d'électroporation en passant par les microdispositifs et la cellule TEM, ces systèmes d'exposition présentent l'avantage de pouvoir exposer le milieu biologique à des champs uniformes de fortes amplitudes et de très courtes durées. Les microdispositifs possèdent l'avantage de permettre l'observation de la réponse des cellules de manière

instantanée grâce à leur développement sur une lame de microscope. Ceci nous permet d'avoir accès aux profils des impulsions réellement appliqués aux cellules. Nous allons à présent introduire les méthodes expérimentales employées pour observer et analyser ces phénomènes d'un point de vue biologique.

IV.3 Mesure des phénomènes

L'étude expérimentale des effets des nsPEFs étant au stade exploratoire nécessite l'emploi de cellules dites stables permettant la reproductibilité des expériences. C'est la raison pour laquelle nous allons présenter les lignées cellulaires les plus fréquemment employées lors des études expérimentales.

Nous introduirons ensuite la cytométrie en flux qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une population de cellules (taille, intensité de fluorescence...). Nous définirons les méthodes permettant d'évaluer le potentiel transmembranaire induit par les nsPEFs ainsi que les marqueurs fluorochromes qui permettent de traduire et de suivre au cours du temps la réponse de la cellule.

Une approche numérique à l'échelle de la membrane basée sur la dynamique moléculaire sera introduite à la fin de cette sous partie.

IV.3.1 Lignées cellulaires

La mesure des phénomènes biologiques induits par les champs électriques pulsés s'effectue généralement sur quelques lignées cellulaires bien particulières. Ces lignées de cellules sont obtenues par culture à l'extérieur de leur organisme et possèdent la particularité d'être immortelles. En effet, ces lignées cellulaires obtenues par mitoses successives sont soit des cellules cancéreuses soit des cellules qui sont rendues immortelles par contamination par un virus ou par introduction d'un gène codant pour l'immortalité.

Ce tableau présente de façon non exhaustive ces différentes lignées avec leur nom complet, l'espèce à laquelle elles appartiennent et le tissu d'origine [65] [66].

Lignées cellulaires	Nom complet	Espèce	Tissu d'origine
HeLa	Henrietta Lacks	Humaine	Cancer du col utérin
CHO	Chines hamster ovary	Hamster	Epithélium ovarien
Jurkat		Humaine	Lymphome de lymphocyte T
HL-60	Human Leukemia	Humaine	myélome

Tableau 1 : Lignées cellulaires les plus fréquemment employées.

IV.3.2 Cytométrie en flux

La mesure des phénomènes sur une grande population de cellules s'effectue par cytométrie en flux. Elle permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques telles que la taille de la cellule et l'intensité relative de fluorescence.

La Figure I-25 présente le principe de la cytométrie en flux. Cette technique analyse les cellules en solution grâce à un mécanisme fluidique. Une source optique vient exciter et récupérer la réponse de chacune des cellules de la solution. Cette réponse est ensuite convertie en une réponse électronique et numérisée. Les cellules passent une à une devant la focal du laser. Un capteur placé dans le prolongement du laser mesure la diffraction et détermine alors la taille de la cellule exposée au laser.

Lorsque des fluorochromes sont employés, on parle plutôt de cytofluorométrie en flux. Les capteurs, placés à 90° du faisceau laser, permettent de mesurer la fluorescence des fluorochromes présents à la surface ou à l'intérieur des cellules. Les différents capteurs de fluorescence vont mesurer les différentes longueurs d'onde d'émission des cellules marquées.

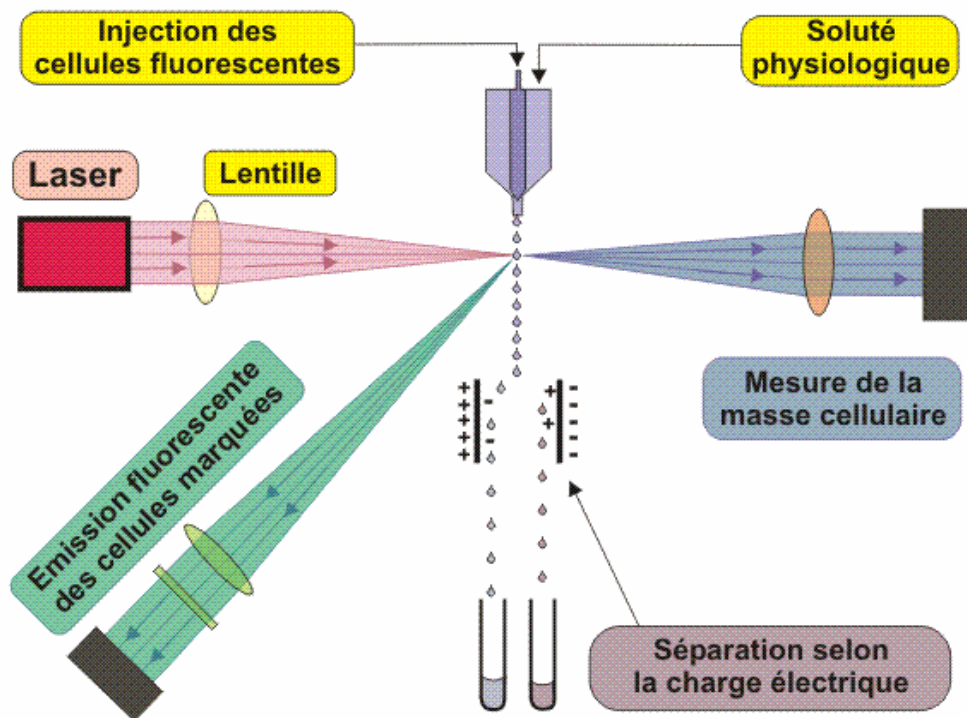


Figure I-25 : Principe de la cytométrie en flux¹⁰.

¹⁰ http://www.oncoprof.net/Generale2000/g04_Diagnostic/Histologie/Technique-image/dg_histo_tech_43.html

A chacune de ces longueurs d'onde va correspondre un élément marqué de la cellule. Ensuite s'effectue le tri cellulaire en fonction des caractéristiques des cellules (dimensions, fluorescence,...). Cette technique est largement employée dans l'étude des réponses cellulaires aux impulsions électriques classiques [67] comme pour les nsPEFs [44] [68].

Différents phénomènes biologiques sont observés après exposition à des nsPEFs. Le premier phénomène est l'augmentation du potentiel transmembranaire.

IV.3.3 Potentiel transmembranaire

La Figure I-26 illustre un dispositif de mesure du potentiel transmembranaire et les deux phases qui composent sa mesure. Elle s'effectue grâce à une électrode qui pénètre la cellule. Cette électrode de diamètre très réduit est obtenue par étirement à chaud d'une pipette de verre qui est ensuite remplie d'un électrolyte dans lequel plonge le fil du conducteur relié au voltmètre.

La première étape de la mesure consiste à vérifier qu'il n'existe pas de différence de potentiel entre les deux électrodes plongées dans le milieu de culture. La seconde étape consiste à faire pénétrer l'électrode dans la cellule. Ceci permet d'observer ensuite une différence de potentiel négative, typiquement autour de -75 mV, qui représente le potentiel de repos de la cellule.

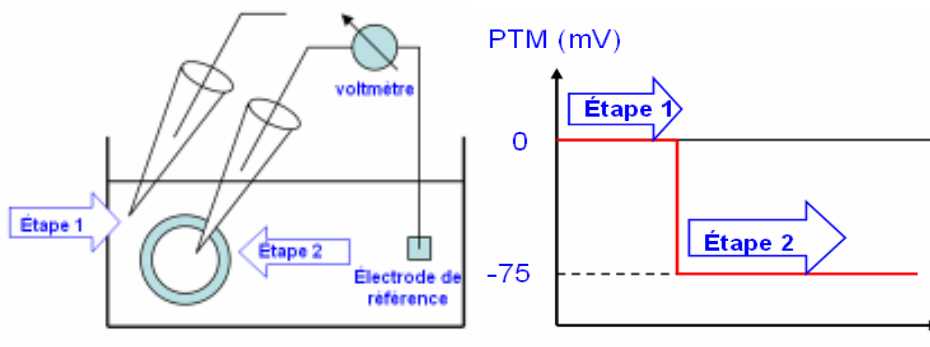


Figure I-26 : Mesure de Potentiel transmembranaire¹¹.

Une autre méthode de mesure et d'évaluation de la variation du potentiel transmembranaire est basée sur l'emploi d'un marqueur fluorochrome.

La Figure I-27 présente la décroissance de fluorescence traduisant la forte augmentation du potentiel transmembranaire dans des cellules Jurkats après exposition à un

¹¹ http://schwann.free.fr/neurobiologie_cellulaire03.html.

nsPEF de durée 60 ns et d'amplitude ~ 100 kV/cm. Afin d'étudier la charge de la membrane plasmique qui est de l'ordre de 75 ns, il est donc essentiel que la résolution temporelle du fluorochrome soit de plus courte durée. Les cellules sont marquées avec l'ANNINE-6 qui est un marqueur sensible au voltage et qui possède une réponse temporelle subnanoseconde. C'est la raison pour laquelle il a été employé pour étudier le potentiel transmembranaire de la membrane plasmique lors de l'exposition à l'impulsion ns.

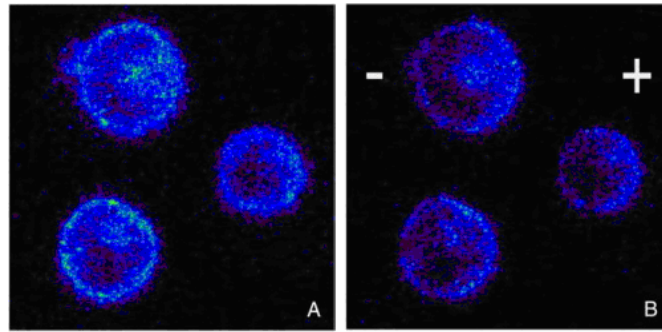


Figure I-27 : Cellules de Jurkat avant l'exposition (A) et 25 ns après le début de l'impulsion (B) [26].

L'échantillon présenté Figure I-27 est à plusieurs reprises illuminé par une impulsion laser de 5 ns. Nous pouvons voir qu'avant l'impulsion électrique la distribution de la fluorescence est uniforme tout le long du périmètre des cellules Jurkat de la Figure I-27 (A) représentatif du potentiel de repos de la cellule. Sur la Figure I-25 (B), un déséquilibre de la distribution de la fluorescence est observé pendant l'exposition. Il résulte de la forte diminution de la fluorescence de la membrane plasmique du côté de l'anode qui indique une forte diminution du potentiel transmembranaire.

Il faut savoir que les marqueurs sont très couramment employés pour étudier les effets des nsPEFs sur les cellules. Les plus utilisés seront présentés dans la partie suivante.

IV.3.4 Les marqueurs

La perméabilisation de la membrane plasmique, l'externalisation de la phosphatidylsérine, l'augmentation du calcium intracellulaire, l'endommagement de l'ADN et l'apoptose sont autant de phénomènes qui peuvent être suivi par l'emploi de marqueurs fluorochromes.

IV.3.4.1 *Marqueurs pour mesurer l'intégrité de la membrane plasmique*

La création de pores dans la membrane en réponse à une impulsion longue comme pour une impulsion courte peut être suivie par l'introduction dans le milieu de culture de marqueurs fluorescents tels que l'iodure de propidium (ID). Ce dernier est utilisé par exemple pour étudier l'intégrité de la membrane plasmique pour des cellules telles que HL-60.

Dans des conditions normales, ces marqueurs n'ont pas la capacité de pénétrer dans les cellules et sont donc exclus du milieu intracellulaire. Leur présence lors de l'observation post exposition dans le milieu intracellulaire prouve que la membrane plasmique a permis leur transfert et donc qu'il y a eu perméabilisation [42] [51].

A titre d'illustration, lors de l'exposition de cellules HL-60 à un seul nsPEF de 60 ns et de 26 kV/cm, il est possible d'observer après 15 à 30 min la pénétration de l'iodure de propidium dans les cellules (Figure I-28, en rouge sur les figures de gauche) [69].

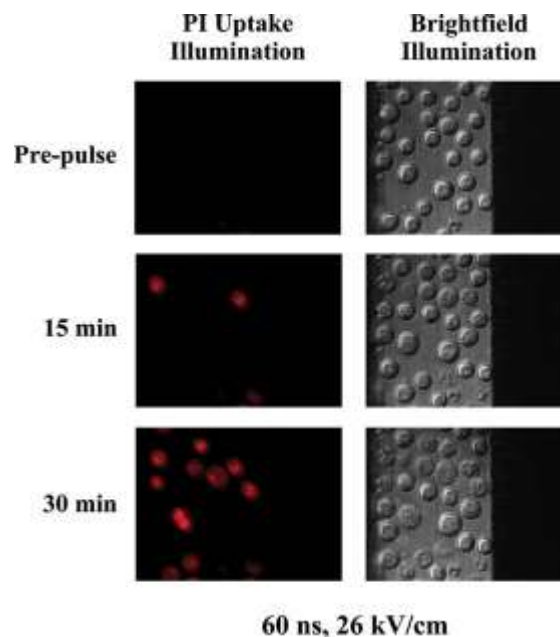


Figure I-28 : Image obtenue par microscopie confocale de cellules HL-60, avant, 15 min et 30 min après l'exposition à une impulsion de 60 ns et de 26 kV/cm [69].

IV.3.4.2 *Marqueurs pour quantifier l'apoptose*

L'étude de ce phénomène est possible grâce au marquage de deux éléments indicateurs de l'apoptose : la présence de la phosphatidylsérine (PS) sur la face extérieure de la membrane plasmique et l'activation des caspases.

L'étude de l'externalisation de la PS peut s'effectuer avec deux types de marqueurs : l'Annexine V-FITC et le FMI-43. Nous présentons ici deux résultats du groupe de P. Vernier

obtenus avec ces marqueurs. La Figure I-29 présente le marquage de l'externalisation de la PS par l'emploi de l'Annexine V-FITC (Figure I-29(a)(c)) et le FMI-43 (Figure I-29(b)(d)), sur un myélome multiple auquel est appliqué un nsPEF de 4 ns et d'amplitude 8 MV/m. Les Figure I-29(c) et (d), montrent une augmentation de la fluorescence de la membrane du côté de l'anode pour les deux marqueurs après 5 sec traduisant l'externalisation de la PS.

Le suivi de l'activité des caspases s'effectue quant à lui par l'emploi du FITC-VAD-FMK qui est un marqueur perméable à la membrane plasmique et qui devient fluorescent en présence de caspases activés [42]. La Figure I-30 met en évidence l'activité des caspases dans des lymphoblastes T Jurkat exposé à 50 nsPEF de 10 ns et d'amplitude 2.5 MV/m [42]. Les Figure I-30(a) et (b), présentent sous deux éclairages les cellules avant l'exposition, 5% des cellules sont alors marquées. Les Figure I-30 (c) et (d) présentent les mêmes cellules 5 h après l'exposition. A ce stade plus de 30 % des lymphoblastes présentent une fluorescence, traduisant l'activité des caspases en leurs intérieurs.

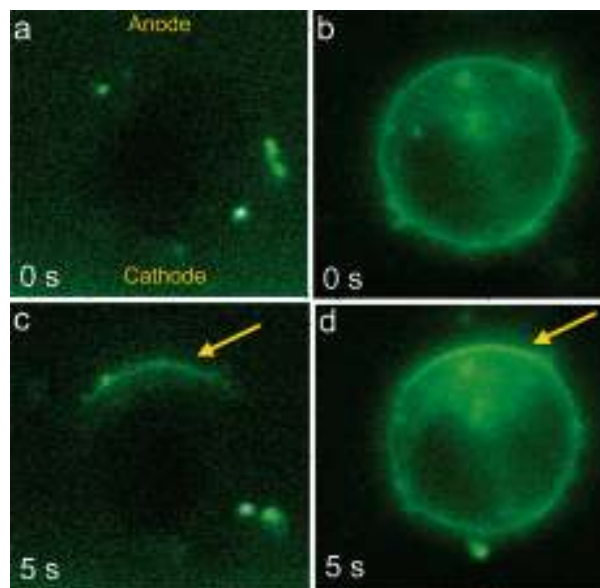


Figure I-29 : Marquage d'un myélome multiple exposé à un nsPEF (4 ns, 8 MV/m) par deux marqueurs différents, pour chaque image l'anode se trouve en haut et la cathode en bas. Avant l'exposition (a)annexinV-FITC(b) FMI-43. (c) (d) Après 5 sec, pour les deux marqueurs employés une augmentation de la fluorescence est observée du côté de l'anode traduisant l'externalisation de la PS [31].

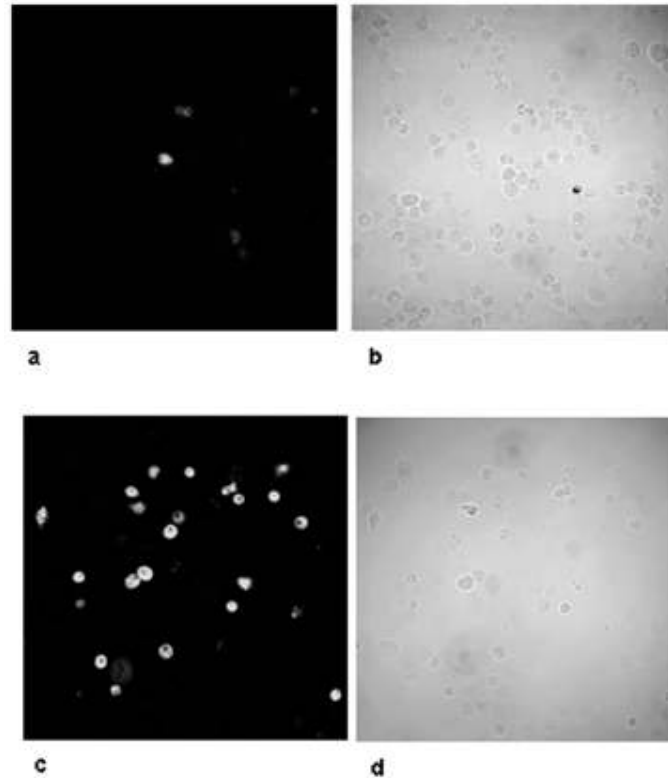
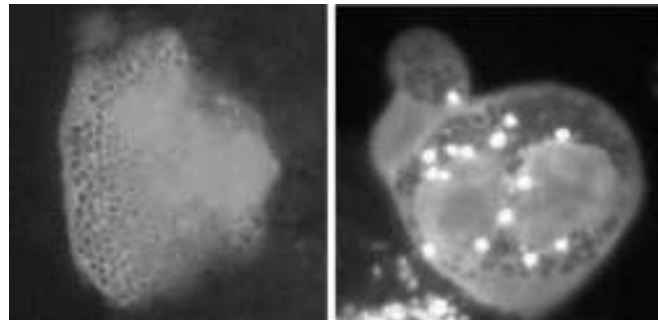


Figure I-30 : (a). Activation des caspases (marquage avec FITC-VAD-FMK) avant l'exposition des lymphoblastes T Jurkat à des nsPEFs (50 x10 ns, 2.5 MV/m) moins de 5% de cellules marquées (b). les mêmes cellules sous une lumière blanche (c). 5 h après l'exposition, plus de 30% de cellules marquées, indiquant la présence de caspases activées (d). les mêmes cellules sous lumière blanche. [42]

IV.3.4.3 Marqueurs pour mesurer la concentration Ca^{2+}

Le suivi de la concentration intracellulaire de calcium peut s'effectuer également par fluorescence. L'acétoxyméthyl ester de calcéine (calcéine-AM) est un composé perméable aux membranes et non fluorescent. Une fois dans la cellule, des enzymes viennent cliver l'acétoxyméthyle ester pour créer la calcéine fortement fluorescente et imperméable aux membranes. Les travaux de l'équipe de K. H. Schoenbach [30] [70] ont considéré des granulocytes éosinophiles dont le marquage du calcium après exposition à un nsPEF a permis de confirmer les effets des nsPEFs sur le milieu intracellulaire, et plus particulièrement sur les granules présentes dans les éosinophiles. La Figure I-31 présente un éosinophile avant l'exposition à l'impulsion de 60 ns et de 50 kV/cm (a) où les granules ne sont pas marquées par la calcéine et après l'exposition (b) où nous pouvons observer la forte fluorescence de la calcéine dans les granules traduisant la perméabilisation de la membrane des granules. De plus, la présence de fluorescence et donc de calcium uniquement dans le milieu intracellulaire prouve l'intégrité de la membrane plasmique.



(a)

(b)

Figure I-31 : Eosinophiles avant l'exposition à l'impulsion de 60 ns et d'amplitude 50 kV/cm où les granules ne sont pas fluorescentes (a) et après exposition où certaines granules sont fortement fluorescentes (b) [70].

IV.3.4.4 *Marqueur pour étudier l'endommagement de l'ADN*

L'acridine orange est un marqueur fluorescent permettant de suivre l'activité du noyau cellulaire. Possédant la capacité naturelle de pénétrer la membrane plasmique ainsi que la membrane nucléaire et d'autres organelles, il a un rôle important dans l'étude des effets des impulsions ultra-courtes sur le noyau cellulaire. Ce marqueur a la capacité de réagir avec l'ADN et l'ARN induisant une fluorescence dans le vert et le rouge, respectivement. Au cours des expériences menées sur des HL-60 avec des impulsions de 10 ns 65 kV/cm, 60 ns 26 kV/cm [51][70], il a été observé une forte décroissance de ce marqueur au bout de plusieurs minutes. Ceci traduit l'endommagement de l'ADN et de l'ARN en réponse à l'impulsion ultra courte.

IV.3.4.5 *Conclusion*

Pour résumer, nous avons présenté dans cette sous-section de façon non exhaustive, les marqueurs employés lors des expérimentations pour comprendre et suivre l'évolution de phénomènes résultant de l'exposition à des nsPEFs.

L'étude microdosimétrique, qui consiste à déterminer la distribution des champs et potentiels induits dans la cellule, contribue à la compréhension des phénomènes biologiques induits par les champs électriques impulsionnels. De façon générale, les membranes constituent la première cible des champs impulsionnels, les phénomènes impliqués à cette échelle restent encore peu voire mal connus. Une approche numérique consiste à modéliser l'ensemble des molécules qui constitue une portion de membrane et d'en étudier leurs comportement sous l'effet du champ [71] [72].

V Apport de la dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire (DM) permet d'étudier le comportement du grand nombre d'éléments qui composent la membrane. Par l'étude des forces auxquelles elles sont soumises il est déterminé leurs trajectoires respectives.

L'étude du phénomène d'électroporation par la dynamique moléculaire permet d'avoir des précisions sur le comportement des molécules d'eau et des têtes lipidiques aux interfaces eau/membrane plasmique et membrane plasmique/cytoplasme. Ce type de modélisation aide à comprendre le phénomène d'initiation du pore dans la membrane en réponse à des champs électriques impulsionnels.

L'alignement des têtes lipidiques avec les molécules d'eau s'effectue avec des temps autour de la nanoseconde [73]. L'énergie nécessaire à la formation des pores diffère du type de pore considéré et vont dépendre du rayon r du pore formé [74].

Pour des pores hydrophobes l'énergie nécessaire vérifie I-2

$$E(r) = 2\pi hr\sigma(\infty) \frac{I_1(r/r_0)}{I_0(r/r_0)} - \pi a_p V^2 r^2 \quad \text{I-2}$$

Pour des pores Hydrophiles l'énergie nécessaire vérifie I-3

$$E(r) = 2\pi\gamma r - \int_0^r 2\pi\Gamma(r^*) \cdot r^* \cdot dr^* + \left(\frac{C}{r}\right)^4 - \pi a_p V^2 r^2 \quad \text{I-3}$$

I_1 et I_0 sont les fonctions de Bessel d'ordre 0 et d'ordre 1

h : épaisseur de la membrane

$\sigma(\infty)$: constante de l'ordre de $5 \cdot 10^{-2} \text{ N m}^{-1}$

r_0 : longueur caractéristique

$(C/r)^4$: intervient dans la répulsion stérique des têtes lipidiques

γ : énergie par unité de longueur du périmètre du pore

Γ : énergie par unité de surface de la membrane intacte

V : PTM

a_p : propriété de la membrane ainsi que du milieu aqueux

L'initiation du pore s'effectue à partir de la modification de la structure de l'interface eau/ membrane qui favorise l'intrusion de molécules d'eau dans la membrane. Ce phénomène est d'autant plus probable que le champ appliqué est fort. Ces molécules d'eau se trouvant dans un milieu de faible permittivité s'orientent alors dans la direction du champ électrique.

Les têtes dipolaires du défaut s'orientent également dans la direction du champ E. Ce mouvement des molécules d'eau et des têtes lipidiques font que le défaut se transforme en une colonne d'eau : le pore hydrophobe. De la même façon le pore hydrophile se crée à partir du mouvement des lipides et des molécules d'eau. Dans ce cas il y a migration des têtes lipidiques dans la membrane et tout autour du cône d'eau. La taille du pore augmente tant qu'il existe le champ extérieur. Si la valeur du champ est réduite de moitié sa taille reste constante.

Les travaux de M. J. Ziegler et de P. T. Vernier [75] ont montré que la composition des membranes plasmiques a son importance dans la valeur de champ nécessaire à l'initiation et à la création des pores. Pour une membrane composée de 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) le champ nécessaire pour obtenir son électroporation est de 320 mV/nm alors que pour une membrane composée de 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) un champ de 380 mV/nm est nécessaire. La Figure I-32 présente le type de résultats obtenus par simulation de dynamique moléculaire. Ces captures représentent les différentes étapes de création d'un pore dans une membrane lipidique de POPC et dans une membrane de DOPC (dont les queues des phospholipides ne sont pas représentées). A l'instant $t=0.0$ ns, les deux membranes sont à l'équilibre. Au cours du temps pour le POPC, on remarque que l'initiation du pore (agrégation des têtes lipidiques) s'effectue du côté de l'anode. Elle est suivit par la pénétration de molécules d'eau (rouge et blanc) dans la membrane à l'instant $t=23.9$ ns traduisant la création d'un pore hydrophobe. Par contre pour le DOPC l'initiation s'effectue du côté de la cathode et en plus des molécules d'eau des têtes lipidiques (jaune) s'infiltrèrent dans la membrane, c'est un pore hydrophile.

L'étude du phénomène d'électroporation par la dynamique moléculaire, grace à la composition moléculaire des membranes, permet de comprendre les phénomènes d'initiation, de formation des pores mais également de déterminer les valeurs de champ nécessaires à leurs formations. Cependant, les valeurs de champs définis dans ces simulations de dynamique moléculaire ne correspondent pas à celles définies lors des expérimentations (différence de potentiel des électrodes/distance inter-électrode). C'est la raison pour laquelle il est nécessaire d'effectuer le lien entre les études à l'échelle macroscopique (expérimentation) et à l'échelle nanométrique.

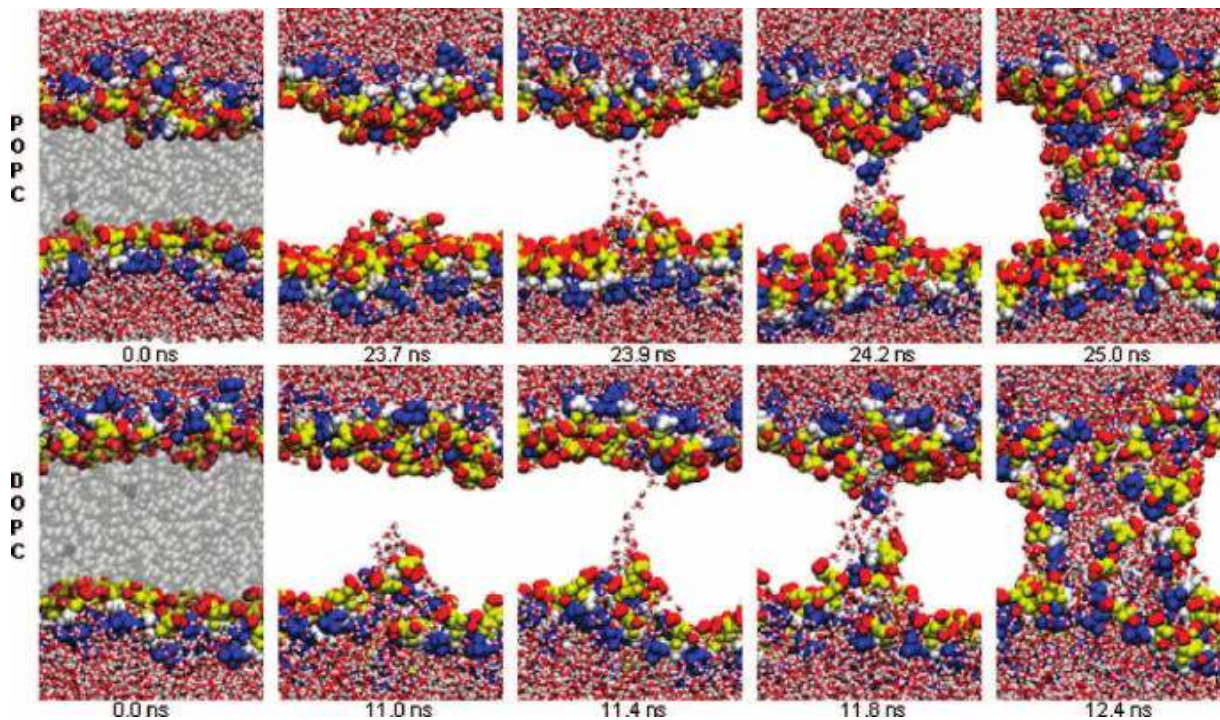


Figure I-32 : Création d'un pore hydrophobe dans une membrane de POPC et d'un pore hydrophile dans la membrane de DOPC, au cours du temps [23].

VI Conclusion

Par ce premier chapitre, nous avons rappelé l'intérêt croissant qui est suscité pour l'interaction des champs EM avec les milieux biologiques et notamment avec le développement des signaux sans fil. Ces signaux emploient des fréquences microondes (800 Hz –quelques GHz) dont la principale interaction avec les milieux biologiques repose sur un effet thermique. C'est la raison pour laquelle des niveaux d'exposition ont été définies pour se protéger des effets thermiques lors de l'utilisation des systèmes de télécommunication. Cependant, ces signaux microondes peuvent être employés dans le domaine biomédical pour leurs effets thermiques à l'échelle des tissus, notamment dans l'hyperthermie microonde.

Une application en pleine expansion, exploite les effets athermiques de signaux particuliers : les impulsions électriques. Caractérisées par des amplitudes de quelques kV/m et des durées de l'ordre des milliseconde-microsecondes ces impulsions ont une action ciblée sur la membrane plasmique de la cellule et permettent notamment d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie, c'est électrochimiothérapie.

Ces travaux de thèse ont pour but d'étudier les effets intracellulaires des champs électriques pulsés caractérisés par de très fortes amplitudes (MV/m) et de très courtes durées (ns). Pour cela nous avons présenté la composition complexe de la cellule et défini la fonction

de ses principaux constituants, à savoir la membrane cellulaire, le noyau et ses organelles. Ceux-ci sont le siège de nombreux mécanismes essentiels à la viabilité de la cellule.

Ensuite, nous avons présenté les effets biologiques connus des impulsions milliseconde-microseconde, notamment l'électroporation de la membrane plasmique. Ces impulsions sont employées aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine industriel (décontamination bactérienne).

Les impulsions ultracourtes et de très fortes amplitudes (MV/m, ns) présentent l'avantage d'être de plus forte intensité et de plus faible énergie. Ces impulsions ne sont plus limitées à un effet sur la membrane plasmique mais sont aussi capables d'affecter le milieu intracellulaire. Cependant les phénomènes biologiques ainsi que les mécanismes sous-jacents sont peu, voire mal compris. L'étude de ces phénomènes est possible grâce à une collaboration entre les biologistes et les physiciens qui mettent en œuvre les moyens expérimentaux (système d'exposition, cytométrie en flux, marqueurs...) nécessaires à l'observation de ces phénomènes, mais également grâce au rôle de l'approche numérique à l'échelle de la membrane pour comprendre les phénomènes d'électroporation.

L'étude des effets des champs impulsionnels nanosecondes, de très forte amplitudes est de l'ordre de différentes échelles comme l'illustre la Figure I-33.

Ces travaux consistent à effectuer le lien entre l'étude macroscopique (expérimentale) et nanométrique (à l'échelle de la membrane) en passant par l'étude micrométrique à l'échelle de la cellule.

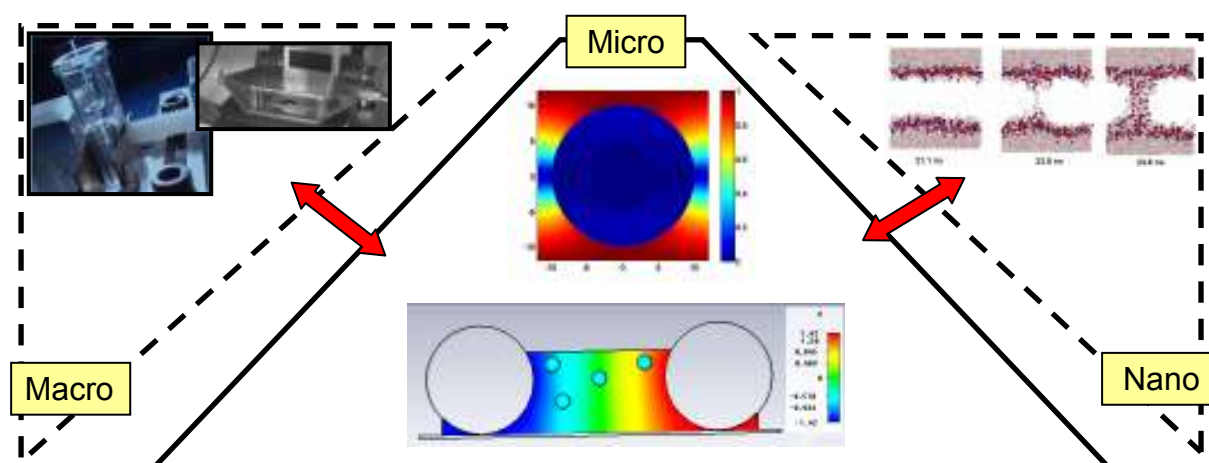


Figure I-33 : Illustration des différentes échelles d'études des phénomènes biologiques résultant d'une exposition à une impulsion de très forte amplitude et de très courte durée.

Il existe un besoin important en modélisation, de maîtriser les interactions des nanopulses avec le vivant. Les études développées au sein du laboratoire ont portées sur la

modélisation à l'échelle des microdispositifs d'exposition. A cette échelle, les cellules ne sont pas prises en compte, seul le milieu dans lequel elles baignent est modélisé. Pour connaître plus précisément les modifications de certaines grandeurs, comme les potentiels transmembranaires, l'apport de la modélisation numérique est complémentaire des données expérimentales. Dans ce travail, nous nous concentrerons sur un modèle de cellule très simple, avec pour objectif à terme de modéliser des tissus ou des cellules complexes. Ce problème de modélisation n'est pas un travail trivial et les outils développés doivent être le plus compatible possible avec ceux existant (par exemple thermique).

Dans le prochain chapitre intitulé « Outils et modèles numériques », nous présenterons les modèles simplifiés de cellule, nous effectuerons un bref état de l'étude numérique des effets des nsPEFs sur les milieux biologiques. Nous définirons la méthode numérique sur laquelle reposent ces travaux.

Chapitre. II : Outils et méthodes numériques

I Introduction

La modélisation des effets des nsPEFs sur des milieux biologiques et plus particulièrement à l'échelle de la cellule nécessite une caractérisation des grandeurs électromagnétiques (champ et potentiels électriques) mais également des propriétés physiques (permittivité, conductivité, géométries...) de la cellule.

Par sa structure fortement inhomogène, le premier besoin est de définir une structure simplifiée permettant d'approcher son comportement en réponse à un nsPEF.

La première partie de ce chapitre sera dédiée à la définition des grandeurs fondamentales liées à la modélisation de la cellule.

Nous présenterons ensuite différentes approches (analytique, électrique) permettant de modéliser le comportement de la cellule notamment en termes de potentiel transmembranaire.

Nous décrirons ensuite la méthode numérique proposée dans ces travaux, basée sur une approche quasistatique et la méthode des différences finies.

Nous terminerons le chapitre par proposer des approches numériques permettant de modéliser les membranes de la cellule.

II Grandeurs fondamentales

II.1 Modèle simplifié de cellule.

Les cellules biologiques sont des systèmes d'une extrême complexité. On se limite dans notre approche aux aspects électromagnétiques ou électriques de la cellule. Il n'en reste pas moins un système d'une grande complexité avec la présence de molécules polaires et de charges électriques constituant les cellules biologiques et leurs environnements. Une représentation schématique d'une cellule eucaryote illustre la présence de nombreuses organelles intra cellulaires Figure II-1(a). Pour analyser les effets des champs électromagnétiques à l'échelle de la cellule, un modèle simplifié à l'extrême de cette dernière est défini. Le plus basic de ces modèles est celui d'une sphère Figure II-1(b). La surface de cette dernière représente la membrane plasmique de la cellule. Elle possède une épaisseur de quelques nanomètres et elle délimite la région interne et externe de la cellule. Le diamètre est de l'ordre de la dizaine de micromètre pour une cellule classique. Les milieux sont considérés homogènes.

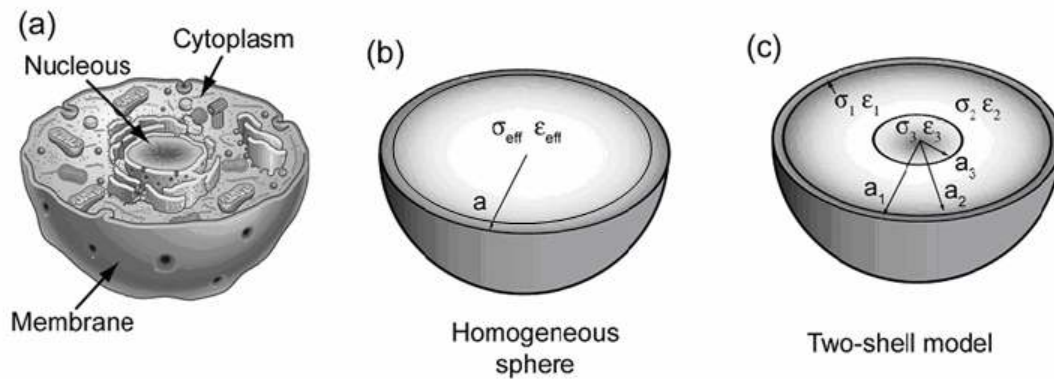


Figure II-1 : Schéma d'une cellule eucaryote : (a) modèle complet ; (b) modèle simplifié homogène ; (c) modèle avec une organelle¹²

Un modèle plus évolué intègre une organelle à l'intérieur de la cellule. Cette organelle peut être elle aussi sphérique et concentrique pour les modèles les plus simples Figure II-1(c).

Le modèle de cellule le plus couramment employé avec les études d'impulsions μ s-ms sont des modèles de cellules composées uniquement d'une membrane plasmique et un cytoplasme homogène possédant les caractéristiques physiques moyens en termes de caractéristiques électromagnétiques. Pour notre part, ce premier modèle va nous permettre d'effectuer l'étude de l'influence des paramètres électromagnétiques et géométriques (épaisseur de membrane, diamètre de la cellule) sur le comportement électromagnétique à l'échelle de la cellule et de sa membrane.

Les modèles employés pour étudier les effets des impulsions plus courtes sont généralement plus complexes. En effet, la plupart des modèles considèrent en plus de la membrane plasmique, une à plusieurs organelles avec leurs membranes plasmiques respectives. Dans notre cas, un modèle comportant une seule organelle sphérique concentrique sera considéré dans un premier temps.

La taille des cellules et le ratio épaisseur de membrane – diamètre de la cellule montrent la difficulté de modélisation de telles structures. Il existe cependant une structure présentant des similitudes avec les cellules de diamètre plus petit, qui conduit à un ratio plus favorable. Il s'agit de vésicules qui sont des structures réelles et qui s'approchent des modèles proposés pour les cellules. Certains travaux d'intérêts ont été faits sur une telle structure [76].

Cette rapide présentation des structures à modéliser met en avant la taille réduite des objets à modéliser par rapport aux longueurs d'onde contenues dans les impulsions ainsi que le caractère multi-échelle du problème à traiter. Les grandeurs électromagnétiques d'intérêt pour cette étude vont être maintenant définies.

¹² www.oup.co.uk/oxed/children/oise/pictures/nature/animalcell

II.2 Définition des grandeurs électromagnétiques

II.2.1 Champ et potentiel électrique

Si nous considérons deux charges électriques positionnées aux points A et B, la force qu'exerce la charge au point A sur celle située au point B est définie par l'équation II-1

$$F_{AB} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_A q_B}{r_{AB}^2} \quad \text{II-1}$$

où ϵ_0 est la permittivité du vide, q_A et q_B quantifient les charges, r_{AB} est la distance qui les sépare. La force qu'exerce B sur A est égale et opposée à celle de A sur B, comme illustré sur la Figure II-2.

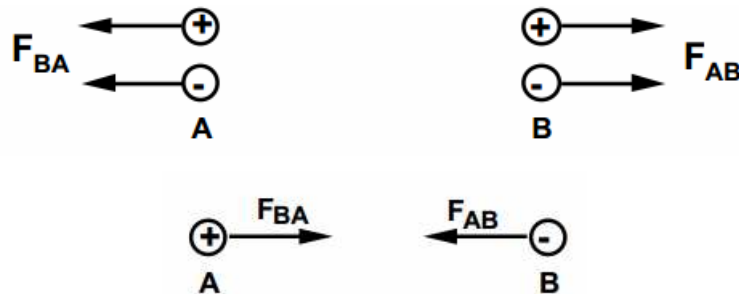


Figure II-2 : Représentation des forces qu'exerce la charge électrique au point A sur la charge électrique au point B et inversement.

Dans un problème statique, c'est-à-dire sans déplacement de charges, si nous considérons un ensemble de charges électriques, il est possible de définir en un point M de l'espace, un champ électrique induit par l'ensemble des charges. Le champ électrique est alors défini par l'équation II-2 et s'exprime en V/m.

$$\vec{F}(M) = q\vec{E}(M) \quad \text{II-2}$$

Il est alors possible d'exprimer le champ électrique sous la forme d'un gradient de potentiel électrique V définie par la relation II-3

$$\vec{E} = -\text{grad } V \quad \text{II-3}$$

Le potentiel et le champ électrique sont deux grandeurs qui seront au centre des modélisations des systèmes biologiques que l'on soit à l'échelle macroscopique ou microscopique.

II.2.2 Champs électromagnétiques

Dans un problème général dépendant du temps, ce sont les équations de Maxwell qui régissent les phénomènes électromagnétiques. Elles couplent entre autre le vecteur champ électrique \vec{E} avec un vecteur d'induction magnétique \vec{B} (en Tesla). Les équations II-4, II-5, II-6, II-7 correspondent à la forme locale des équations de Maxwell exprimées dans le vide.

$$\text{Equation de Maxwell-Faraday} \quad \text{rot } \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad \text{II-4}$$

$$\text{Equation de Maxwell-Ampère} \quad \text{rot } \vec{H} = \vec{j} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad \text{II-5}$$

$$\text{Equation de Maxwell-Gauss} \quad \text{div } \vec{D} = \rho \quad \text{II-6}$$

$$\text{Equation de conservation du flux} \quad \text{div } \vec{B} = 0 \quad \text{II-7}$$

avec \vec{j} : vecteur densité de courant de conduction (A.m^{-2})

\vec{H} : vecteur champ magnétique (A.m^{-1})

\vec{B} : vecteur induction magnétique (Tesla)

\vec{E} : vecteur champ électrique (V.m^{-1})

\vec{D} : vecteur densité de flux électrique (C.m^{-2})

ρ : densité de charge électrique en C.m^{-3} .

Il est également possible de relier les grandeurs électrique et magnétique entre elles dans le vide mais aussi dans la matière pour des milieux linéaires, homogènes et isotropes. Ceci est fait avec les relations constitutives de la matière (II-8, II-9, II-10), qui s'expriment sous la forme suivante :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \vec{E} \quad \text{II-8}$$

$$\vec{B} = \mu_0 \mu_r \vec{H} \quad \text{II-9}$$

$$\vec{j} = \sigma \vec{E} \quad \text{II-10}$$

avec $\varepsilon_0 = 8.854 \cdot 10^{-12}$ F/m, permittivité diélectrique du vide

ε_r , permittivité diélectrique relative du milieu

$\mu_0 = 4 \pi \cdot 10^{-7}$ H/m, perméabilité magnétique du vide

μ_r , perméabilité magnétique relative du milieu

σ , conductivité électrique du milieu (S/m)

Les milieux biologiques sont caractérisés par des grandeurs caractéristiques telles que la conductivité électrique, la permittivité diélectrique et la perméabilité électromagnétique. Ces grandeurs sont définies à l'échelle macroscopique, c'est à dire lorsque l'on peut considérer des valeurs moyennes des champs électromagnétiques sur un volume élémentaire.

II.2.3 Comportement diélectrique de milieu biologique

La permittivité diélectrique est une grandeur macroscopique régit par des phénomènes à l'échelle microscopique. Sous l'application d'un champ électrique, plusieurs mécanismes de polarisation peuvent exister au sein même d'un diélectrique. Ces mécanismes résultent de la force appliquée sur les dipôles électriques présents dans la matière. Il en résulte que la permittivité relative ϵ_r est une grandeur complexe qui dépend de la fréquence. Elle peut se décomposer en une partie réelle et une partie imaginaire (équation II-11), la partie imaginaire traduisant les pertes diélectriques du matériau.

$$\epsilon_r(\omega) = \epsilon_r'(\omega) - j \epsilon_r''(\omega) \quad \text{II-11}$$

Chacun des mécanismes de polarisation influe sur le comportement diélectrique des milieux, traduisant une accumulation ou une dissipation d'énergie. La Figure II-3 présente une évolution typique de la permittivité relative d'un milieu biologique en fonction de la fréquence. Elle illustre la contribution de différents mécanismes de polarisations au sein d'un même diélectrique, excité par un champ de fréquence variable.

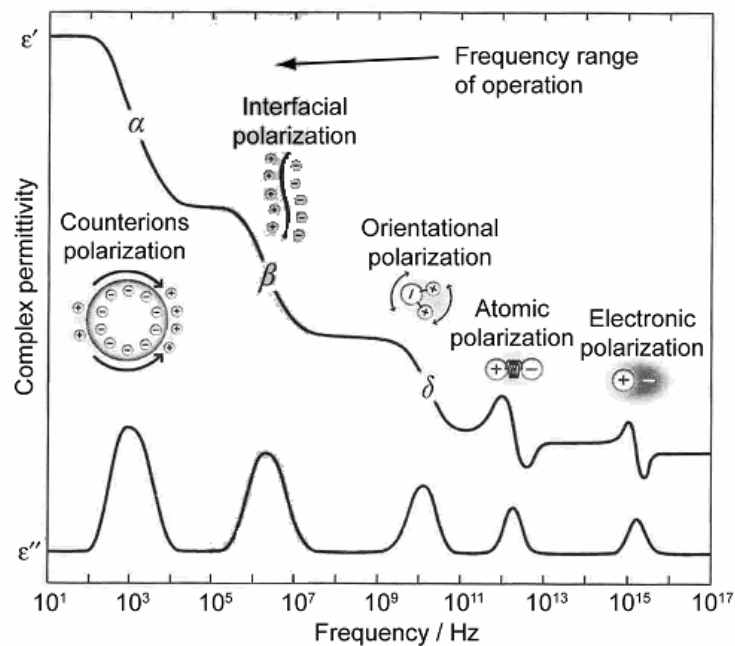


Figure II-3 : Comportement fréquentiel de la permittivité et phénomènes de polarisation associés (d'après [77]).

La dispersion α apparaît entre 0.1 et 10 MHz et résulte de la structure cellulaire des tissus et de la polarisation des ions au voisinage des membranes des cellules. La forte valeur de la permittivité s'explique par le piégeage des charges sur l'interface interne. La dispersion β est un phénomène qui intervient pour des fréquences autour du MHz. Elle est due à la polarisation interfaciale de la membrane cellulaire. La membrane agit comme une barrière au transport passif des ions entre le milieu de culture et le cytoplasme. Elle est la conséquence de l'accumulation de charges au niveau des interfaces. La dispersion δ correspond à la polarisation dipolaire ou polarisation par orientation qui consiste en l'orientation des dipôles dans le sens du champ électrique à des fréquences inférieures ou supérieures au GHz. Elle est à l'origine de l'échauffement par pertes diélectriques dû à la polarisation des molécules d'eau. La polarisation ionique quant à elle, se traduit par le déplacement des anions par rapport aux cations pour des fréquences autour du THz. Enfin, il y a la polarisation électronique qui se manifeste par le léger déplacement du nuage électronique par rapport au noyau, induisant la création d'un dipôle. Cette polarisation intervient pour des fréquences de l'ordre de 10^{15} Hz.

II.2.4 Permittivité et conductivité complexe

Les milieux biologiques ne sont pas des milieux purement diélectriques. Ils possèdent une certaine conductivité liée à la présence de charges, en particulier des ions. Ces derniers jouent un rôle important d'un point de vue biologique et sont pris en compte dans la modélisation électromagnétique sous forme d'une conductivité électrique, dont les valeurs sont de l'ordre du Siemens par mètre. Elle est considérée constante en fonction de la fréquence.

La permittivité diélectrique est une grandeur qui va dépendre de la fréquence. En effet les molécules d'eau et les têtes polaires des phospholipides pour ne citer que celles-ci, présentent un fort caractère dipolaire lié à la polarisation par orientation. Un modèle simple mais réaliste pour traduire cette dépendance repose sur le modèle de DEBYE. Ce dernier permet d'exprimer dans le domaine fréquentiel la permittivité relative sous la forme (équation II-12) :

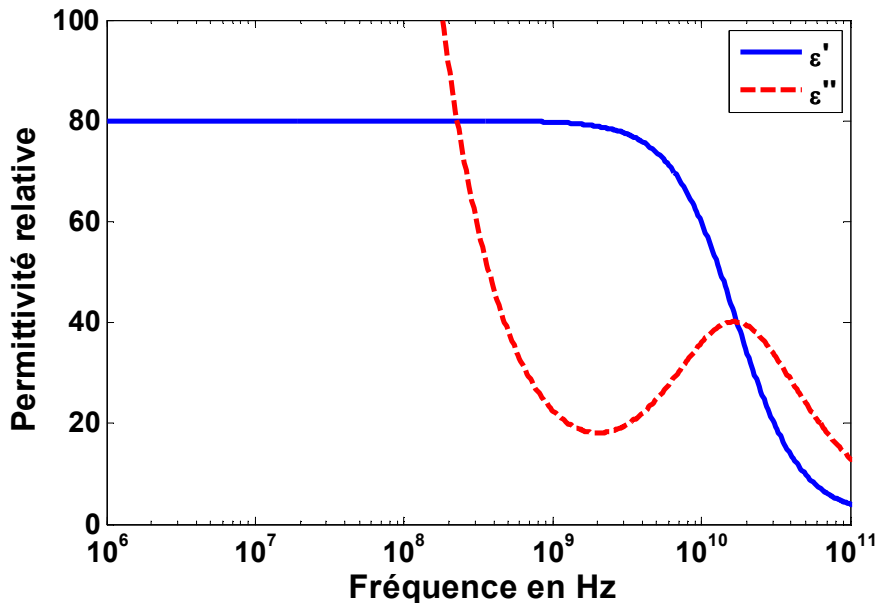
$$\varepsilon_r(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad \text{II-12}$$

avec ε_s , la permittivité relative aux basses fréquences,
 ε_∞ , la permittivité relative aux hautes fréquences
 τ , le temps de relaxation

τ définit le temps au bout duquel le milieu se remet en état d'équilibre lorsque qu'il est soumis à une variation de champ électromagnétique. A partir de cette grandeur, il est également possible de définir la fréquence de relaxation qui traduit la fréquence à partir de laquelle les dipôles présents dans le milieu ne parviennent plus à suivre les oscillations du champ auquel ils sont exposés. Pour l'eau libre, c'est-à-dire suffisamment loin de la membrane, sa valeur est de 17 GHz à température ambiante.

Une permittivité diélectrique équivalente peut être définie pour tenir compte, avec une seule grandeur complexe, le caractère diélectrique et conducteur du milieu considéré. Il est alors possible d'exprimer cette permittivité équivalente sous la forme (équation II-13) :

$$\varepsilon_r(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} + \frac{\sigma}{j\omega\varepsilon_0} \quad \text{II-13}$$



**Figure II-4 : Permittivité relative équivalente complexe (parties réelle et imaginaire)
Modèle de Debye et conductivité électrique : $\varepsilon_s = 81$; $\varepsilon_\infty = 1.8$; $\tau = 9.4$ ps ; $\sigma = 1$ S/m**

Il est possible de représenter la partie réelle et imaginaire de cette permittivité relative équivalente (Figure II-4). Les pertes dans le milieu sont associées à la partie imaginaire de cette grandeur. Deux phénomènes distincts apparaissent. Le premier est lié à la conductivité électrique du milieu et intervient sur la partie basse fréquence avec une variation en $1/\omega$. Le second est lié aux pertes diélectriques, c'est-à-dire à la dispersion représentée par le modèle de Debye, et passe par un maximum à une fréquence supérieure à 10 GHz. Ce phénomène commence à être significatif à des fréquences inférieures aux GHz. Cela signifie que dans la

partie basse du spectre, c'est le comportement conducteur du milieu biologique qui prédomine, alors qu'en haute fréquence, le comportement est principalement diélectrique.

Après avoir étudié les grandeurs physiques caractéristiques des milieux biologiques nous allons à présent définir les modèles numériques dont nous nous sommes servis dans notre étude.

II.2.5 Ordre de grandeur des dimensions et propriétés électromagnétiques des milieux considérés

La cellule possède des dimensions variables du fait de la diversité des cellules qui composent l'organisme. Son diamètre peut varier entre plusieurs μm à $100 \mu\text{m}$ pour les cellules eucaryotes. Sa membrane plasmique possède une épaisseur autour de 7.5 nm . Le noyau quand à lui possède un diamètre de l'ordre de 5 à $7 \mu\text{m}$. C'est l'organelle la plus grosse du cytoplasme. L'enveloppe nucléaire a une épaisseur autour de 35 nm .

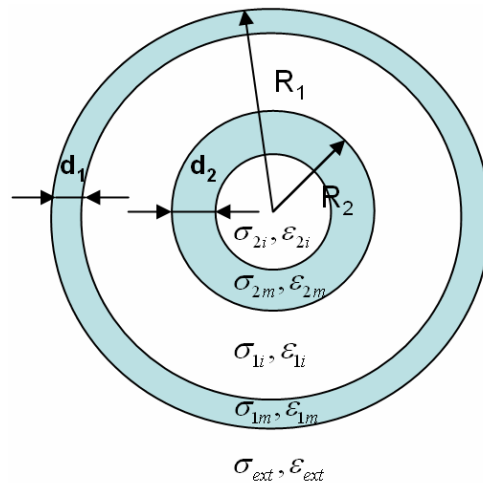


Figure II-5 : Modèle de cellule avec deux membranes (la membrane plasmique et la membrane de l'organelle).

A partir du modèle simplifié de la cellule avec la membrane plasmique et une organelle correspondant au noyau (Figure II-5), il est possible de trouver dans la littérature un ordre de grandeur des valeurs des propriétés électromagnétiques et géométriques des cellules. Le Tableau 2 fait une synthèse non exhaustive des données disponibles dans les références [80-89]. Il est évident que la caractérisation de la permittivité diélectrique de la membrane d'une cellule n'est pas immédiate, en particulier sur un large spectre. Le caractère inhomogène et les dimensions géométriques nécessitent des approches particulières comme dans [78] [79].

	Rayon ou épaisseur (μm)	Permittivités relatives	Conductivité électrique (S/m)
Milieu extracellulaire		67-80 [80–86]	0.14 [80]-1.2[81–83], [87], [88]
Membrane plasmique	0.005-0.007[81–83], [87], [88]	2-12 [80–83], [87]	0-10 ⁻⁵
Cellule	3-10[81–84], [87]	60-80 [80–84], [87], [89]	0.13-1.2
Membrane organelle	0.005-0.040[84–86]	5-22.8	10 ⁻⁹ -10 ⁻²
Organelle	0.5-5	80-120	0.18-2

Tableau 2 : Caractéristiques des cellules biologiques.

On peut distinguer principalement deux types de milieu, à savoir des milieux diélectriques à pertes qui contiennent une quantité importante de molécules d'eau et des milieux diélectriques à très faibles pertes. Dans ce dernier cas, il s'agit des membranes des cellules ou des organelles, constituées d'une ou plusieurs couches lipidiques. La perméabilité des membranes va permettre l'échange de molécules entre les milieux intra et extra cellulaires ce qui va se traduire d'un point de vue électromagnétique par une très faible conductivité. Le caractère polaire des molécules induit des permittivités importantes pour les milieux contenant beaucoup de molécules d'eau, mais également au niveau des membranes des cellules et des organelles. Pour une caractérisation rigoureuse des milieux sur une large bande de fréquences, il est nécessaire de prendre en compte le caractère dispersif des milieux aussi bien au niveau des molécules d'eau qu'au niveau des lipides constituant les membranes cellulaires. Les molécules d'eau à proximité des membranes ou celles présentes dans la membrane ont des propriétés diélectriques différentes des molécules d'eau dites « libre ». Suivant les configurations étudiées, il sera nécessaire de prendre en compte des modèles plus ou moins complets.

Concernant les caractères dispersifs des diélectriques (eau ou lipide), des paramètres ont été définis pour traduire le comportement des milieux en fonction de la fréquence. Ces modèles sont basés sur le modèle de Debye, présenté précédemment, ou sur une combinaison de modèle de Debye [82] et des modèles légèrement plus complexes, comme les modèles de Cole-Cole [90] qui s'exprime sous la forme (équation II-14) :

$$\varepsilon_{\text{Cole-Cole}} = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad \text{II-14}$$

Avec : α , prend une valeur entre 0 et 1

ε_s , la permittivité relative aux basses fréquences,

ε_{∞} , la permittivité relative aux hautes fréquences

τ , le temps de relaxation

III Modélisation à l'échelle de la cellule

La connaissance des niveaux de champ électrique et de potentiel transmembranaire doit permettre une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors de l'interaction des champs électromagnétiques avec le vivant. Cette approche a d'ors et déjà suscitée de nombreux travaux pour l'électroporation dans le domaine des millisecondes et microsecondes. Pour ce type d'impulsion, la membrane joue un rôle capacitif très fort, limitant la présence de champ électrique induit à l'intérieur de la cellule. La grandeur physique qui rend compte du phénomène est alors le potentiel transmembranaire induit par la présence du champ électrique appliquée.

La première difficulté, à laquelle la modélisation est confrontée, est liée au facteur d'échelle entre la membrane plasmique (taille comprise entre 5-7 nm) et la cellule dont les rayons sont de l'ordre de la dizaine de micromètre. Pour déterminer les valeurs des potentiels transmembranaires, il existe plusieurs approches qui vont être présentées maintenant. A ce stade, le détail des méthodes ne sera pas présenté, des informations complémentaires étant disponible dans les articles référencés.

III.1 Champ électrique et potentiel transmembranaire

III.1.1 Approche analytique

Dans le but d'étudier l'évolution spatiale et temporelle du potentiel transmembranaire, des modèles analytiques ont été développés et ont joué un rôle important dans la compréhension des effets des impulsions électromagnétiques sur la cellule. Le modèle de Schwan [91] permet d'estimer le potentiel transmembranaire Ψ pour une cellule sphérique, induit par un champ E. Il est valide pour des cellules sphériques exposées à des impulsions de

durées supérieures à plusieurs centaines de μs ou continues et s'exprime sous la forme (équation II-15).

$$\Delta \Psi_m = f E R \cos \theta \quad \text{II-15}$$

avec E , l'amplitude du champ électrique

R , le rayon de la cellule

θ , l'angle formé par le champ et le rayon qui passe par le point dont on souhaite déterminer le potentiel transmembranaire

f , le facteur qui tient en compte des dimensions et des propriétés électriques de la cellule telles que la permittivité et la conductivité du milieu extra σ_e , et intra cellulaire σ_i , et la conductivité de la membrane plasmique σ_m [92]. Ce facteur s'exprime sous la forme (équation II-16) :

$$f = \frac{3\sigma_e [3dR^2\sigma_i + (3d^2R - d^3)(\sigma_m - \sigma_i)]}{2R^3(\sigma_m + 2\sigma_e)(\sigma_m + \sigma_i/2) - 2(R-d)^3(\sigma_e - \sigma_m)(\sigma_i - \sigma_m)} \quad \text{II-16}$$

Lorsque la conductivité de la membrane ne peut être négligée, la valeur du facteur f est alors inférieure à 1.5 et lorsqu'elle est très inférieure à celle du milieu extra cellulaire et du cytoplasme alors la valeur du facteur f tend vers 1.5. Le potentiel s'exprime alors sous la forme (équation II-17) :

$$\Delta \Psi_m = 1.5 E R \cos \theta \quad \text{II-17}$$

D'après cette expression le potentiel induit est égal à 0.75 V pour une cellule de rayon $5 \mu\text{m}$ et un champ électrique appliqué de 1 kV/cm.

Le rapport entre les conductivités des membranes et des milieux extra et intra cellulaires font que la membrane peut être vue comme une capacité. La variation temporelle du potentiel transmembranaire peut être exprimé par analogie au comportement d'une capacité sous la forme (II-18) :

$$\Delta \Psi_m = 1.5 E R \cos \theta (1 - e^{-t/\tau_m}) \quad \text{II-18}$$

Le temps de charge (τ_m) de la membrane plasmique est défini par l'équation :

$$\tau_m = \frac{Rc_m}{\frac{2\sigma_i\sigma_e}{2\sigma_e + \sigma_i} + \frac{R}{d}\sigma_m} \text{ ou } \tau_m = \frac{R\varepsilon_m}{2d \frac{\sigma_i\sigma_e}{2\sigma_e + \sigma_i} + R\sigma_m} \quad \text{II-19}$$

Avec R , le rayon de la cellule

d , l'épaisseur de la membrane

σ_m , σ_i , σ_e et ε_m , les propriétés électromagnétiques des différents milieux (m la membrane, i le milieu intra cellulaire et e le milieu extra cellulaire)

Le temps de charge τ_m est une grandeur qui dépend de l'angle et des paramètres géométriques et électromagnétiques de la cellule dans son environnement. Pour une cellule de $5 \mu\text{m}$ de rayon, de conductivité extra et intra cellulaire de 1.1 S/m , une membrane de 5 nm d'épaisseur et de permittivité relative égale à 6 , le temps de charge de la membrane est de 72 ns .

Le temps de charge de la membrane plasmique est déterminé en fonction du rayon de la cellule et de la permittivité relative de sa membrane (Figure II-6). L'épaisseur de la membrane est choisie constante et à une valeur de 7 nm . De même pour la conductivité intra et extra cellulaire dont les valeurs sont prises égales à 1.1 S/m , alors que la conductivité de la membrane est considérée négligeable. On constate dans cette configuration que les temps de charge sont globalement compris entre 10 ns et 250 ns . Ainsi pour des cellules de rayons importants, typiquement supérieur à $5 \mu\text{m}$ et pour des permittivités voisines de 5 pour la membrane, les temps de charge sont supérieurs à 40 ns . D'après cette formulation, pour des cellules ou des vésicules de petites dimensions, il semble que le temps de charge peut être de l'ordre de la dizaine de nanosecondes ou inférieur. Cela demanderait à être confronté avec des données et résultats expérimentaux si tenté qu'il soit possible de différencier le rôle des charges d'espace par rapport à la polarisation diélectrique des têtes polaires en particulier.

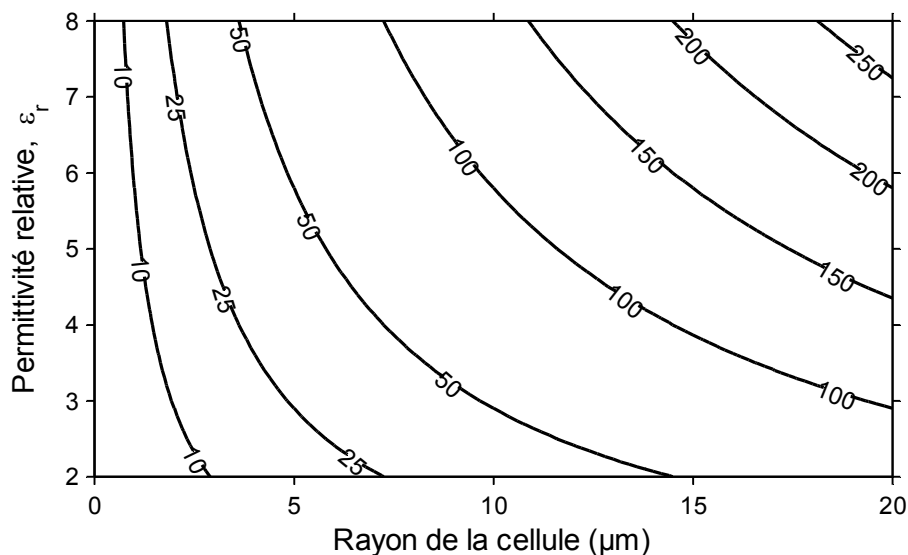


Figure II-6 : Le temps de charge τ_m en fonction du rayon de la cellule et de la permittivité de la membrane (l'épaisseur de la membrane est de 7 nm , la conductivité intra et extra cellulaire de 1.1 S/m).

III.1.2 Approche circuit électrique

Comme décrit précédemment, une analogie peut être faite entre une capacité électrique et la membrane plasmique de la cellule séparant deux milieux conducteurs, correspondant au cytoplasme et au milieu de culture. Considérer la cellule comme un circuit électrique permet une étude quantitative du potentiel transmembranaire, en particulier lorsque la cellule (son modèle électrique) est soumise à des impulsions. De nombreux modèles se basent donc sur cette analogie pour définir un circuit électrique équivalent d'une cellule sphérique dans le but de déterminer le potentiel transmembranaire induit par l'application d'un champ électrique [93].

Deux modèles de circuit électrique équivalent à une cellule en suspension sont représentés sur la Figure II-7. La suspension est le milieu qui contient les cellules à exposer dans lequel deux électrodes sont plongées permettant d'appliquer un champ électrique. Dans le premier modèle, Figure II-7(a), issu de travaux du groupe de K. Schoenbach, la suspension est représentée par une capacité C_s et une résistance R_s mises en parallèle. La capacité caractérise le condensateur constitué des deux électrodes et la suspension, et la résistance est liée à la présence des ions dans la solution. De façon analogue, le cytoplasme est caractérisé par une résistance R_c , alors que la membrane est représentée par une capacité C_m . La membrane est aussi le siège d'échange via des canaux ioniques qui sont définis par des admittances en parallèle dont les valeurs vont dépendre respectivement de potentiel V_1 , V_2 , ..., V_i .

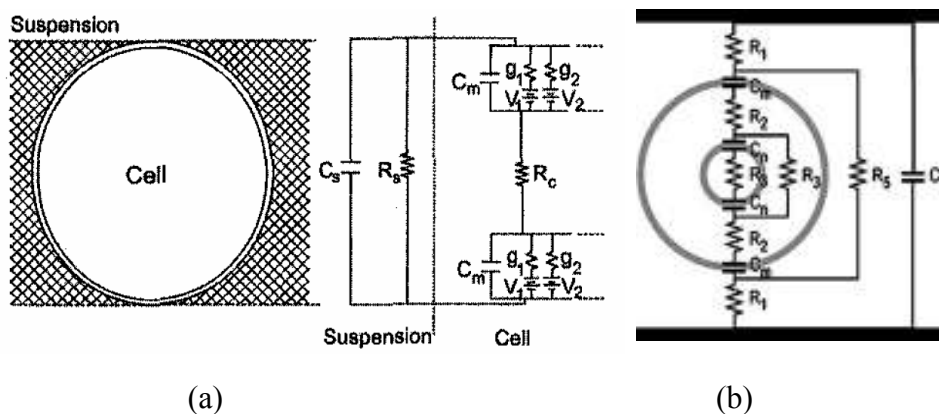


Figure II-7 : Circuit électrique équivalent à une cellule en suspension : (a) modèle simple membrane [24]; (b) modèle avec organelle concentrique [51].

Sur le deuxième modèle, une organelle concentrique est ajoutée au modèle de cellule. Comme sur le modèle précédent, les milieux sont représentés par des résistances et les membranes par des capacités. Dans ce dernier modèle, les canaux ioniques ne sont pas pris en

compte. Les membranes, aussi bien plasmique que nucléaire, sont ainsi considérées comme purement diélectrique ($\sigma=0$).

Le type d'impulsion appliqué va orienter le choix du modèle. Pour les impulsions longues, typiquement de durée μs et ms , le modèle simple membrane (Figure II-7 (a)), représentatif d'un liposome (vésicule artificielle composée d'une double couche lipidique) peut être retenu. Pour les impulsions courtes, typiquement les nanopulses, la membrane n'a pas le temps de se charger complètement et le champ électrique peut franchir la membrane plasmique et modifier le potentiel transmembranaire des organelles. Il est alors nécessaire d'utiliser un modèle de cellule non plus de type liposome mais des cellules présentant une organelle (Figure II-7(b)) [84] [94].

Contrairement au modèle analytique présenté précédemment, le modèle circuit contient une information fréquentielle [95] [96]. Il permet ainsi de déterminer le comportement fréquentiel et temporel du potentiel transmembranaire plasmique et nucléaire, à partir de la réponse fréquentielle du circuit électrique équivalent à la cellule avec son organelle. Avec ce type de modèle, il apparaît que la membrane plasmique se comporte comme un filtre passe bas du second ordre [97] alors que la membrane nucléaire est plutôt du type filtre passe bande de premier ordre [84].

La membrane est une structure qui se modifie au cours du temps, en particulier sous l'action du champ électrique et de la variation du potentiel transmembranaire. Ceci peut se traduire par un changement de perméabilité de la membrane, c'est à dire une modification des conditions d'échange entre les milieux intra et extra cellulaires. Une représentation de ces échanges peut se faire via une densité de pores, qui va être dépendante du potentiel transmembranaire, comme cela va être décrit maintenant.

III.2 Densité de pores

La modification du potentiel transmembranaire des cellules peut entraîner une électroporation ou électroperméabilisation des membranes. Pour quantifier de façon théorique ces phénomènes, de création de pores ou perméabilisation, une approche consiste à définir une densité de pore. Cette dernière doit être dépendante de la variable temps et du potentiel transmembranaire. Cette première technique est basée sur une approche analytique avec un modèle connu sous le nom d'équation de Smoluchowski.

III.2.1 Equation de Smoluchowski

La modélisation du phénomène d'électroporation doit traduire une phase de formation et d'expansion des pores, ainsi qu'une phase de réduction des pores, suivant les cas. L'équation de Smoluchowski est une équation différentielle qui permet de déterminer la fonction densité de distribution de pores notée $n(r,t)$, où r est le rayon du pore. Cette grandeur correspond au nombre de pores présent par unité de surface de membrane. Il prend en compte aussi bien le grossissement que la contraction des pores.

Elle s'exprime sous la forme (II-20) :

$$\frac{dn(r,t)}{dt} = D_p \frac{d}{dr} \left(\frac{dn(r,t)}{dr} + \frac{n(r,t)}{kT} \frac{dE(r)}{dr} \right) + S(r,t) \quad \text{II-20}$$

avec r : rayon du pore

D_p : coefficient de diffusion

kT : énergie thermique

$S(r,t)$: terme de création de pores.

$E(r)$: énergie de formation du pore hydrophile qui s'exprime par l'équation II-21

Ce modèle met en jeu différentes grandeurs dont un terme de source $S(r,t)$ qui traduit la création de pores. L'énergie nécessaire à la création des pores $E(r)$ définit par :

$$E(r) = 2\pi\gamma r - \int_0^r 2\pi\Gamma(r^*) \cdot r^* \cdot dr^* + \left(\frac{C}{r} \right)^4 - \pi a_p V^2 r^2 \quad \text{II-21}$$

avec $(C/r)^4$: intervient dans la répulsion stérique des têtes lipidiques

γ : énergie par unité de longueur du périmètre du pore

Γ : énergie par unité de surface de la membrane intacte

V : PTM en V

a_p : propriété de la membrane ainsi que du milieu aqueux

L'équation II-20 peut être simplifiée en imposant certaines conditions.

III.2.2 Modèle asymptotique de l'équation de Smoluchowski

Si l'on considère que le rayon moyen des pores créés est d'environ 0.8 nm, que la présence de pores avec des rayons supérieurs est négligeable en raison de l'arrêt du phénomène d'expansion et enfin que la fermeture des pores est indépendante du potentiel transmembranaire, alors l'équation de Smoluchowski (équation II-20) peut être simplifiée. Le

modèle asymptotique de l'équation de Smoluchowski s'exprime sous la forme de l'équation de (II-22) :

$$\frac{dn(t)}{dt} = A_0 e^{-\frac{\delta_c}{kT}} \left(e^{-\frac{B}{kT} TMP^2(t)} - \frac{n(t)}{N_0} \right) \quad \text{II-22}$$

avec $A_0 e^{-\frac{\delta_c}{kT}}$: densité de création de pores

kT : énergie thermique

B : paramètre d'électroporation

N_0 : densité de pores lorsque potentiel transmembranaire est nul

Les travaux de K.C. Smith [88] mettent en évidence la nécessité de prendre en compte la perméabilisation des membranes lors de l'étude numérique des champs pulsés, par la comparaison de deux modèles numériques. L'un avec la prise en compte de l'équation de Smoluchowski et l'autre sans. Les modèles numériques employés dans son étude sont basés sur des circuits électriques distribués fréquemment employé pour des modèles 2D et 3D de cellule. En effet, la variation de la densité de pores au cours du temps va entraîner une variation locale des propriétés électromagnétiques de la membrane, en particulier la conductivité électrique. Il est alors intéressant de développer des modèles où il est possible de considérer une distribution spatiale de potentiel et des champs électriques. Ceci est possible avec les méthodes qui vont être présentées maintenant.

III.3 Modélisation 2D - 3D

Afin de pouvoir prendre en compte des géométries complexes et la localisation des phénomènes linéaires ou non linéaires, il est nécessaire de procéder à une segmentation ou discrétisation de l'espace à considérer. Il peut s'agir d'une surface ou d'un volume suivant la complexité du problème à traiter. Concernant les problèmes électromagnétiques, différentes méthodes ont été utilisées pour traiter des problèmes nombreux et variés. Concernant la modélisation à l'échelle de la cellule biologique, certaines de ces méthodes ont été appliquées à ce problème et vont être présentées succinctement.

III.3.1 Circuit électrique distribué

La méthode des réseaux distribués (Transport Lattice Method ou TLM, en anglais), repose sur un réseau cartésien et sur la définition de circuits électriques équivalents qui sont

distribués spatialement sur le réseau, comme illustré sur la Figure II-8, d'après D. A. Stewart [98]. Dans cet article, les auteurs ont considéré un plan de coupe d'une cellule représenté par la Figure II-8 (a) où nous pouvons distinguer en gris un quart de cercle délimitant le milieu intracellulaire du milieu externe. Ce plan est décomposé en segments et à chacun de ces segments est associé un modèle local de circuit électrique. Ainsi, trois modèles locaux ont été définis suivant le milieu qu'il représente. Les modèles locaux équivalents aux milieux intracellulaire, extracellulaire et membranaire sont définis par M_i , M_e et M_m , respectivement (Figure II-8 (b)). Les modèles M_i et M_e sont composés par une capacité et d'une résistance mis en parallèle. Alors que le modèle M_m plus complexe prend en compte le potentiel et les canaux ioniques par la définition d'une source de tension (V_{ip}) et une source de courant ($I_m(t)$).

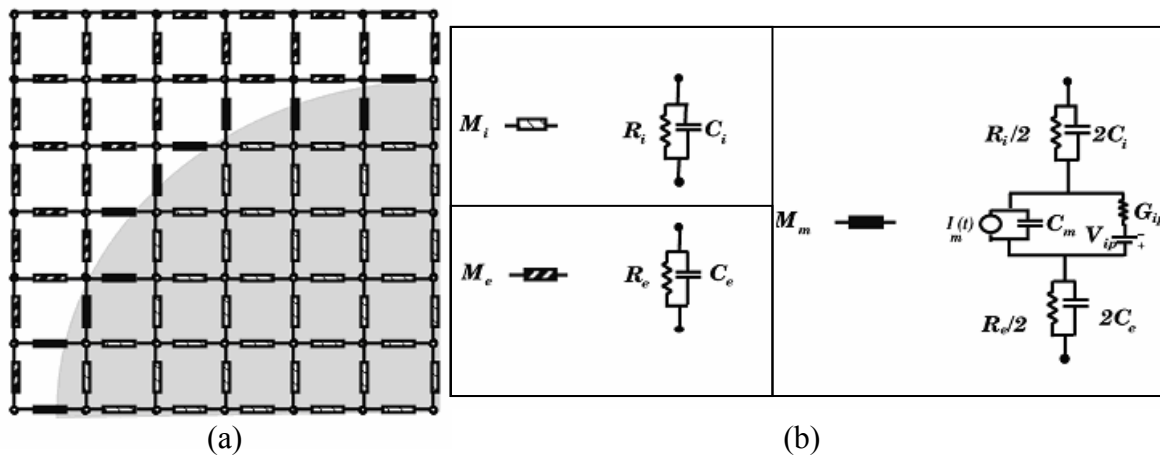


Figure II-8 : Réseau distribué du modèle de cellule, ainsi que les circuits équivalents aux modèles locaux [98].

Par l'application des lois de Kirchhoff il est alors possible d'extraire les courants et les potentiels dans l'ensemble du réseau, à chaque nœud du réseau. Ce modèle électrique peut alors être couplé au modèle asymptotique d'électroporation permettant ainsi d'étudier l'évolution de la densité de pores dans la membrane. L'avantage de cette méthode est sa capacité à intégrer des modèles non linéaires, tels que la prise en compte de canaux ioniques ou encore le phénomène d'électroporation.

Les travaux de T. R. Gowrishankar, en 2006, emploient également cette méthode pour étudier l'électroporation classique et celle dû à des nsPEFs d'un modèle de cellule plus complexe, comportant plusieurs mitochondries, un réticulum endoplasmique et un noyau [99]. R. P. Joshi [86] quant à lui a utilisé un maillage cylindrique, qui apparaît nettement mieux adapté pour les modèles de cellules sphériques (Figure II-9).

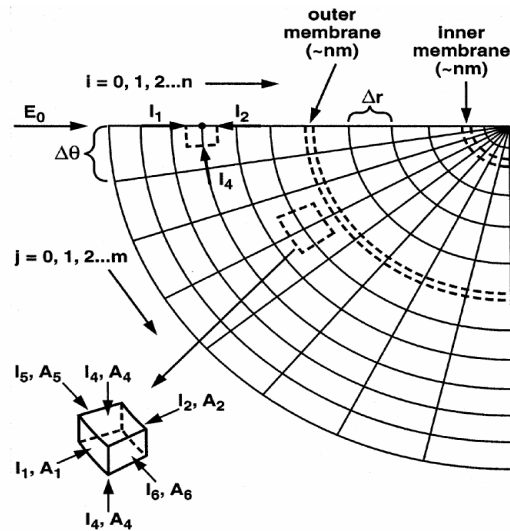


Figure II-9 : Schéma du modèle utilisé pour le circuit distribué de la cellule, ainsi que la maille élémentaire et ses flux de courant [86]

Ce modèle de cellule est composé d'une membrane plasmique, du cytoplasme et d'un noyau avec sa membrane. La structure de la cellule est concentrique. Le modèle 3-D est réduit à un modèle 2-D représenté par le quart de la cellule grâce à la symétrie du modèle (Figure II-9). Ce dernier permet l'étude du potentiel transmembranaire plasmique et nucléaire au cours du temps. De plus, la réponse obtenue prend en compte la variation temporelle de la conductivité effective des membranes résultant de la perméabilisation des membranes par l'emploi de l'équation de Smoluchowski. Ce modèle a permis l'obtention d'un potentiel supérieur à 1.5 V pour la membrane plasmique, en réponse à une impulsion trapézoïdale de 280 ns et d'amplitude 5 kV/cm. La création d'un potentiel du même ordre de grandeur est apparue au niveau de la membrane du noyau pour une impulsion plus courte que précédemment de 11 ns et de 25 kV/cm.

Dans le but de se rapprocher d'une modélisation plus réaliste de la cellule, un modèle toujours basé sur la même méthode des réseaux distribués (TLM) a été développé pour pallier au problème de maillage non adapté aux courbes des cellules. Ce modèle intitulé en anglais "Meshed Transport Network" possède un maillage qui s'adapte à la géométrie de la structure, permettant ainsi de préserver le contour de la cellule (Figure II-10).

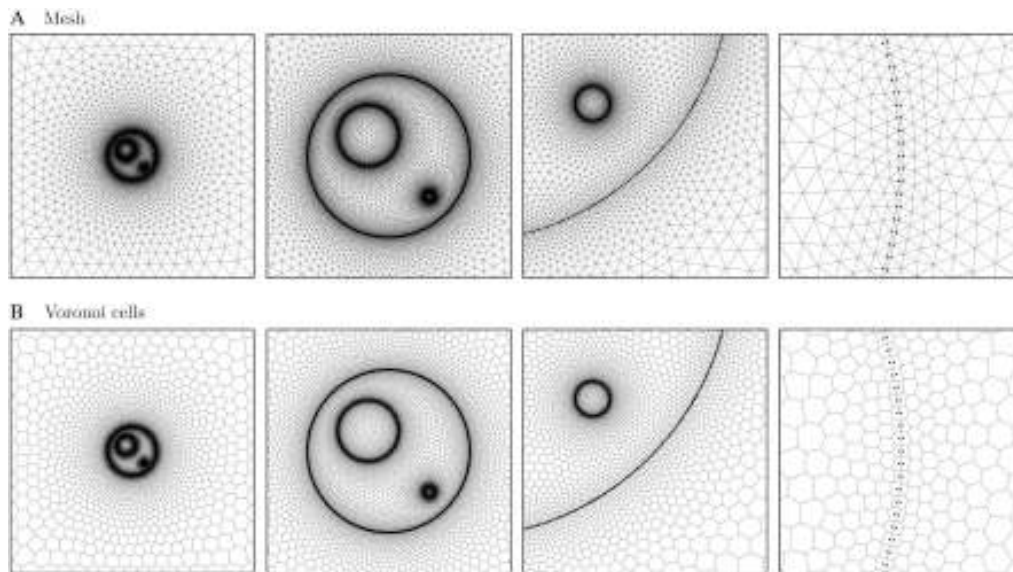


Figure II-10 : Modèles de cellule circulaire avec deux organelles non concentriques (A) Maillage triangulaire; (B) Maillage avec des cellules de voronoï [88].

Le modèle de cellule proposé par K.C. Smith dans ses travaux [81] [88], par comparaison au modèle précédent de R.P. Joshi, prend en compte la présence non plus d'une organelle mais de deux organelles non concentriques, placées de façon asymétrique dans le cytoplasme et de dimensions différentes. Son couplage avec le modèle d'électroporation ainsi que la prise en compte de l'équation qui régit la conductance des pores permettent d'étudier l'évolution du potentiel de la membrane ainsi que des organelles pendant et après l'exposition à l'impulsion.

Les premières études numériques menées sur les effets des impulsions ultracourtes ont été effectuées sur des modèles de cellules de forme sphérique. Une première étape dans l'évolution des modèles pour se rapprocher d'une modélisation plus réaliste a été la prise en compte de forme sphéroïdale. Avec un tel modèle, Kotnik a montré l'influence de la forme de la cellule sur les valeurs du potentiel transmembranaire [100]. Il en ressort que l'épaisseur de la membrane ne joue pas un rôle essentiel dans la valeur du potentiel, dans le cas où la membrane est purement diélectrique pour une géométrie de la cellule symétrique à un plan perpendiculaire au champ électrique.

D'autres méthodes présentées ci-après ont été aussi envisagées pour résoudre ces problèmes à partir d'un formalisme différent de celui des réseaux électriques distribués.

III.3.2 Equations de Laplace et Poisson

En effet, il a été aussi fait appel à des méthodes de résolution des équations différentielles utilisées classiquement dans de nombreux problèmes de la physique, de la mécanique, de l'électromagnétisme, Il s'agit des éléments finis et des différences finies pour ne citer que celles-ci. Dans notre cas, elles vont être appliquées aux équations de Laplace ou Poisson, ou à une forme généralisée de ces équations. Elles sont aussi grandement utilisées pour la résolution des équations de Maxwell qui prennent en compte la notion de propagation contrairement aux équations de Laplace, Poisson et leurs formes généralisées.

Les travaux de Hu [101], basés sur le couplage de l'équation de Laplace avec l'équation de Smoluchowski ont considéré un sphéroïde comme modèle de la cellule. Il a été mis en avant par ce modèle que les valeurs de potentiel transmembranaire sont plus élevées lorsque le grand axe du sphéroïde est perpendiculaire à la direction du champ que lorsqu'il lui est parallèle. Le fait d'aplatir d'avantage le sphéroïde augmente également les valeurs de champ dans la membrane.

Toujours dans le but d'avoir des modèles de plus en plus fidèle à la réalité, plusieurs équipes de recherche dont celles de D. Miklavcic et G. d'Inzeo, ont développés des modèles de cellule de formes irrégulières, à partir de l'imagerie microscopique. L'avantage de l'imagerie microscopique est de pouvoir modéliser une cellule de forme complexe à partir d'une image réelle de cellule par la numérisation de son image et ainsi de pouvoir confronter les résultats obtenus par modélisation avec les résultats obtenus expérimentalement avec cette même cellule de forme complexe. Ainsi les travaux de G. Pucihar [102] provenant de l'équipe de D. Miklavcic ont porté sur une cellule de CHO (Chines Hamster Ovary) dont la membrane a été remplacée par une condition aux limites. Les études de [78], de l'équipe de G. d'Inzeo ont porté quant à elles sur l'influence de la géométrie de deux types de neurones sur les valeurs de champ dans la membrane. La Figure II-11 présente le maillage de deux modèles de neurones pris en compte dans cette étude.

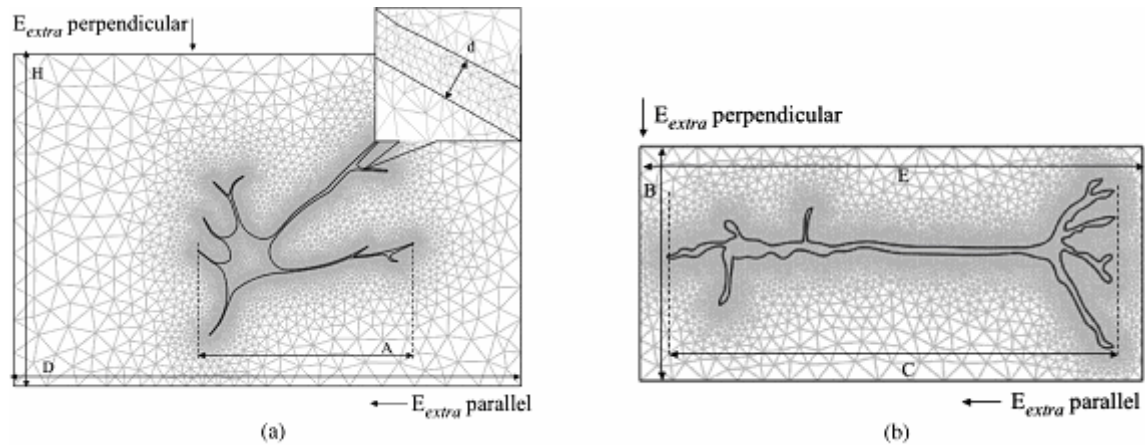


Figure II-11 : Modèles de cellules neuronales obtenus par numérisation d'une image de microscope [78].

III.3.3 Conclusion

Le but de la modélisation est de se rapprocher au plus près d'un système réaliste de cellule de part sa forme et de la prise en compte de ses organelles. De plus, il doit également intégrer les modèles qui permettent d'approcher leurs réponses structurelle, physiologique et biochimique. Dans cette partie, nous avons dans un premier temps défini une méthode analytique qui permet une étude qualitative des effets des impulsions sur la cellule en terme de potentiel transmembranaire. La définition de modèles numériques est nécessaire pour l'étude quantitative des champs et potentiels dans la cellule.

Ces modèles de cellules, allant d'un modèle basique de type liposome vers des modèles plus complexes, prenant en compte un à plusieurs organelles, ont tous pour objectif d'approcher au plus près la structure fortement inhomogène de la cellule. Une grande partie de ces modèles repose sur un modèle de circuit distribué équivalent auquel est rajouté le modèle d'électroporation basé sur l'équation de Smoluchowski. Ces modèles permettent le calcul des valeurs de champs et potentiels dans la membrane au cours du temps. Ces mêmes données peuvent servir de valeurs d'entrées à un modèle de membrane en dynamique moléculaire et ainsi de prendre en compte la variation du potentiel transmembranaire au cours du temps et d'étudier son influence sur l'électroporation de la membrane.

Les modèles développés dans les travaux antérieurs concernaient pour une grande majorité l'électroporation liée aux impulsions ms- μ s. Pour traiter les impulsions les plus courtes, en particulier inférieures à la dizaine de nanoseconde ou sub-nanoseconde, il est nécessaire d'avoir des modèles qui intègrent le comportement fréquentiel des milieux considérés, la complexité des géométries ainsi que le comportement non linéaire des phénomènes.

Nous avons une expertise importante au laboratoire sur les méthodes de résolution des équations différentielles, en particulier la méthode des différences finies dans le domaine temporel au sein du département OSA, dans lequel ces travaux ont été menés. Nous avons donc cherché à résoudre l'équation de Laplace à l'aide de la méthode des différences finies. Différentes pistes ont été explorées vis à vis des contraintes du problème à traiter, en particulier l'aspect multi échelle. De plus, une telle approche est totalement compatible avec le modèle de résolution de l'équation de la chaleur qui a été développé lors de la thèse de Marylène Cueille [103] [104].

La méthode de résolution retenue va être présentée maintenant.

IV Méthode numérique

La résolution analytique n'étant possible que dans des configurations bien précises, il est nécessaire de faire appel à des outils d'analyse numérique performant afin d'approcher au mieux la réponse du milieu biologique dans son ensemble, mais aussi localement. En effet, la géométrie des systèmes d'exposition employés lors des expérimentations mais aussi l'inhomogénéité des solutions biologiques entraînent des modifications des distributions à l'échelle de la cellule. La méthode employée dans notre étude est la méthode des différences finies. Cette méthode a fait ses preuves pour résoudre des problèmes fortement inhomogènes, comme par exemple lors de la modélisation d'un corps humain, avec une résolution spatiale pouvant descendre au millimètre. L'autre force de cette méthode est son formalisme simple qui ne nécessite pas de développement important d'un point de vue programmation. Ses points faibles reposent pour le formalisme de base sur une segmentation à base de parallélépipèdes qui limitent le suivi précis des contours et sur la nécessité d'avoir une puissance de calcul importante.

IV.1 Positionnement du problème -

Approximation des régimes quasi-statique

La modélisation à l'échelle de la cellule implique certaines contraintes. Il a été mis en avant les dimensions petites des grandeurs à prendre en compte. Le diamètre des cellules est de l'ordre de la dizaine de micromètres en première approximation. Il peut atteindre quelques dizaines de micromètres. A l'inverse, un modèle biophysique simplifié du comportement électrique d'une membrane d'une cellule, peut être obtenu en considérant une vésicule. Cette dernière présente l'avantage d'une maîtrise plus importante des milieux intra et extra

cellulaires et de la constitution de la membrane et des canaux et éléments qui la composent. Ces liposomes possèdent généralement des rayons inférieurs à ceux des cellules, de l'ordre du dixième de micron. La seconde contrainte est liée à l'épaisseur de la membrane. Comme cela a été décrit précédemment, on se trouve en présence d'une structure de quelques nanomètres, mettant en avant le caractère multi-échelle de cette modélisation.

Concernant les échelles de temps et les longueurs d'ondes, les ordres de grandeurs sont les suivants. En considérant une impulsion de l'ordre de la nanoseconde, son spectre s'étend jusqu'à des fréquences de l'ordre du GHz. Ceci donne des longueurs d'onde de l'ordre de 30 cm dans l'air et quelques centimètres dans un milieu à forte permittivité. Il n'est pas nécessaire d'être plus précis pour se rendre compte que les longueurs d'onde mises en jeu sont très grandes vis à vis des dimensions des structures à considérer. Ceci va limiter l'utilisation des codes de calcul résolvant les équations de Maxwell, par exemple ceux basés sur la méthode des différences finies dans le domaine temporel, développés au sein du département. Il apparaît que les effets de propagation des ondes peuvent être négligés à l'échelle de la cellule et le problème peut être considéré dans une approche quasi-statique. Cela ne signifie pas que l'on doit résoudre le problème avec une méthode purement électrostatique, mais qu'il est possible de découpler les variations spatiales des variations temporelles, négligeant ainsi les phénomènes de propagation.

IV.2 Méthode des différences finies

Les modèles que nous allons proposer dans la prochaine partie sont des modèles basés sur une cellule, en suspension aqueuse, placée entre deux électrodes auxquelles sont appliquées des impulsions nanosecondes. A ce stade, l'hypothèse sur laquelle est basée notre étude, est l'approximation des régimes quasi-stationnaires. Du fait des petites dimensions de la cellule par rapport aux longueurs d'onde associées aux fréquences qui nous intéressent, cette approximation est valable jusqu'à des fréquences de 150 GHz, donc bien au-delà des spectres des impulsions considérées qui ne vont atteindre que quelques GHz.

Nous allons maintenant nous intéresser aux grandeurs à déterminer et aux équations différentielles utilisées pour calculer ces grandeurs. La méthode utilisée pour résoudre ces équations est basée sur les différences finies.

IV.2.1 Equation du potentiel scalaire du champ électrique

Dans la mesure où les phénomènes de propagation peuvent être négligés, on ne traite pas le problème avec les équations de Maxwell-Faraday (II-4) et Maxwell-Ampère (II-5). Par

contre, on va utiliser l'équation de Maxwell-Gauss (II-6). A partir de la relation constitutive de la matière (II-8), on peut exprimer dans un milieu linéaire, homogène et isotrope, l'équation de Maxwell-Gauss sous la forme (II-23) :

$$\operatorname{div} \varepsilon_0 \varepsilon_r \vec{E} = \rho \quad \text{II-23}$$

Sachant que le champ électrique peut s'exprime comme le gradient d'un potentiel (II-3), on obtient l'équation II-24

$$\operatorname{div} \varepsilon_0 \varepsilon_r (-\operatorname{grad} V) = \rho \quad \text{II-24}$$

Dans le vide, il est alors possible d'en déduire une relation locale entre la distribution de charge et le potentiel qui est connu sous le nom de l'équation de Poisson II-25. Dans une configuration sans charge d'espace, on obtient l'équation de Laplace II-26. Ces équations ne peuvent être résolues de façon analytique que pour des cas simples. Il est alors nécessaire d'employer une méthode numérique, la plus fréquemment employée est la méthode des différences finies.

$$\Delta V = -\frac{\rho}{\varepsilon_0} \quad \text{II-25}$$

$$\Delta V = 0 \quad \text{II-26}$$

Il est possible d'obtenir une forme générale de l'équation de Laplace. Partant de l'équation de Maxwell-Ampère (II-5) et en utilisant le fait qu'un champ rotationnel est à divergence nulle (II-27), on obtient l'équation II-28.

$$\operatorname{div} (\operatorname{rot} \vec{H}) = 0 \quad \text{II-27}$$

$$\operatorname{div} \left(\vec{j} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \right) = 0 \quad \text{II-28}$$

En introduisant les relations II-3, II-8 et II-10, dans l'équation II-28, on obtient l'équation II-29 qui s'exprime sous la forme :

$$-\operatorname{div} \left(\frac{\partial}{\partial t} (\varepsilon_0 \varepsilon_r \operatorname{grad} V) \right) - \operatorname{div} (\sigma \operatorname{grad} V) = 0 \quad \text{II-29}$$

Cette équation permet de prendre en compte un milieu de conductivité et permittivité électrique, en intégrant une notion temporelle et par conséquent fréquentielle. C'est l'équation de base qui va servir à déterminer le potentiel à partir de son expression locale.

Les grandes lignes de la méthode de résolution de cette équation au sens des différences finies vont être maintenant présentées. Il s'agit essentiellement de discrétiser cette équation dans un

milieu homogène, linéaire et isotrope, et de prendre en compte les conditions aux limites que ce soit entre les différents milieux ou bien aux frontières du volume de calcul.

IV.2.2 Discrétisation des équations

IV.2.2.1 Potentiels électriques

Dans un esprit de lisibilité, la méthode mise en place va être présentée sur une configuration 2-D, c'est à dire que l'on considère le problème invariant suivant la troisième dimension de l'espace. La résolution est présentée en prenant un repère en coordonnées cartésiennes, mais cette méthode peut être aisément transposée en coordonnées cylindriques par exemple.

Si l'on considère l'équation de Laplace, dans sa formulation la plus simple, la discrétisation de l'équation II-26 dans le plan xOy donne l'équation II-30.

$$\frac{\partial^2 V(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V(x, y)}{\partial y^2} = 0 \quad \text{II-30}$$

Le laplacien du potentiel scalaire correspond à la somme des dérivées secondes de ce même potentiel suivant chacune des dimensions de l'espace considéré. Un développement en série de Taylor nous permet d'exprimer la dérivée du premier et du second ordre de la fonction potentiel électrique $V(x,y)$, sous la forme:

$$\left. \frac{\partial V(x, y)}{\partial x} \right|_{x=x_0} = \frac{V(x_0 + \Delta x/2, y) - V(x_0 - \Delta x/2, y)}{\Delta x} + \delta(\Delta^2) \quad \text{II-31}$$

Donc la dérivée de la fonction $V(x,y)$ au point x_0 s'exprime en fonction des valeurs de la fonction situées de part et d'autre du point x_0 . De la même façon, il est possible d'exprimer la dérivée seconde sous la forme :

$$\left. \frac{\partial^2 V(x, y)}{\partial x^2} \right|_{x=x_0} = \frac{V(x_0 + \Delta x, y) - 2V(x_0, y) + V(x_0 - \Delta x, y)}{\Delta x^2} + \delta(\Delta^2) \quad \text{II-32}$$

Sur la base d'une discrétisation spatiale à pas constant suivant x et y ($\Delta x = \Delta y$) et en utilisant les indices (i, j) pour désigner les cellules suivant l'axe x et y, respectivement, on peut exprimer le potentiel $V(i,j)$ sous la forme

$$V(i, j) \approx \frac{V(i-1, j-1) + V(i+1, j) + V(i, j-1) + V(i, j+1)}{4} \quad \text{II-33}$$

Les potentiels sont évalués aux intersections du maillage (trait plein), comme illustré sur la Figure II-12. Le maillage en trait pointillé permet de déterminer la cellule/maille centrée

sur le potentiel. Cette cellule/maille correspond à la surface sur laquelle est calculé un potentiel V moyen Figure II-12.

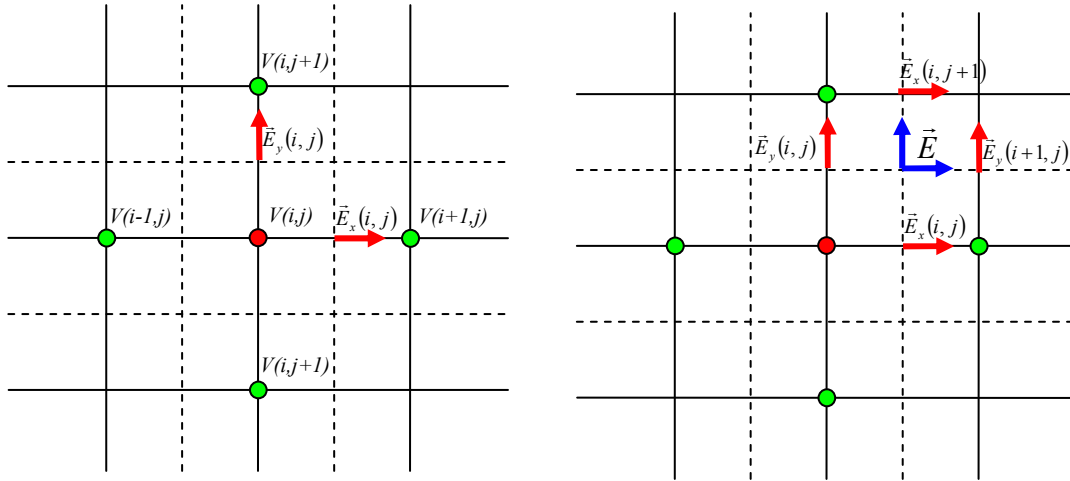


Figure II-12 : Calcul du potentiel $V(i,j)$ (en rouge) à partir des quatre potentiels qui l'entourent (en vert). Le calcul du champ électrique (en rouge) est obtenu à partir de potentiel. Le champ électrique moyen est évalué au centre de la maille (en bleu).

IV.2.2.2 Champs électriques

Les positions des champs électriques sont décalées par rapport aux potentiels, ceci est lié aux équations II-34 et II-35, qui permettent de les définir.

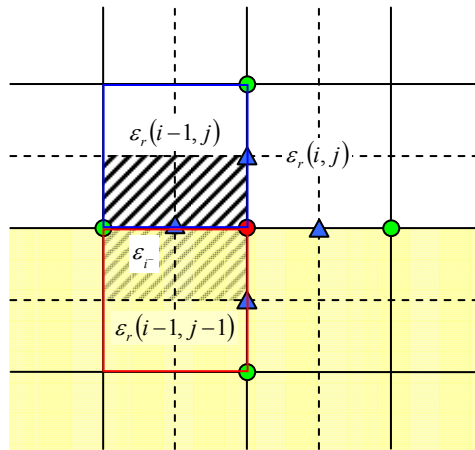
$$E_x(i, j) = \frac{V(i+1, j) - V(i, j)}{\Delta x} \quad \text{II-34}$$

$$E_y(i, j) = \frac{V(i, j+1) - V(i, j)}{\Delta y} \quad \text{II-35}$$

La position des champs électriques dans une cellule est représentée sur la Figure II-12. Du fait de la position des composantes, on peut noter que le nombre de vecteurs ne sera pas identique entre le potentiel (dimension $[nx, ny]$) et les composantes de champ électrique (dimension $[nx-1, ny]$ et $[nx, ny-1]$ pour E_x et E_y respectivement). Les composantes de champ électrique ainsi positionnées peuvent être moyennées spatialement afin de se situer au centre de chaque maille. En effet, comme illustré sur la Figure II-12, les composantes E_x et E_y ne sont pas calculées aux mêmes points sur le maillage. Il peut être utile de les calculer au même point avec une simple moyenne spatiale qui ramène les composantes au centre de la maille, c'est à dire à l'intersection des traits pointillés, comme illustré sur la Figure II-12.

IV.2.2.3 Interface

Jusqu'à présent, les milieux dans lesquels ont été calculés les potentiels et les champs ont été supposés homogènes. Nous allons à présent prendre en compte la variation de la permittivité d'une maille à l'autre. Dans le schéma initial que nous avons retenu, il est affecté une permittivité et conductivité électrique à chaque maille, celles définies par le maillage en trait plein sur la Figure II-13. Considérons maintenant une configuration avec deux milieux, comme illustrée sur la Figure II-13.



**Figure II-13 : Chaque maille est affectée par une permittivité en son centre.
 $\epsilon_r(i-1, j-1)$ délimitée par le contour rouge
 $\epsilon_r(i-1, j)$ délimitée par le contour bleu
 la surface hachurée correspond à la permittivité moyenne
 obtenue à partir de $\epsilon_r(i-1, j-1)$ et $\epsilon_r(i-1, j)$.**

Si l'on reprend l'équation II-24 en l'absence de charge d'espace (II-36), la permittivité ne peut pas être sortie du terme divergence car elle n'est pas constante.

$$\text{div } \epsilon_0 \epsilon_r (-\text{grad } V) = 0 \quad \text{II-36}$$

Le calcul va donc être décomposé. Une première étape consiste à calculer le gradient du potentiel en des points situés entre les potentiels, correspondant aux marqueurs en triangle sur la Figure II-13. Dans une deuxième phase, le calcul de la divergence va être effectué en considérant une permittivité moyenne affectée à chacun des gradients définis précédemment. Une des surfaces à prendre en compte pour ces permittivités moyennes est représentée en hachuré sur la Figure II-13. La permittivité de la zone hachurée vaut

$$\epsilon_{\bar{i}} = \frac{\epsilon_0 [\epsilon_r(i-1, j-1) + \epsilon_r(i-1, j)]}{2} \quad \text{II-37}$$

Les indices \bar{i} traduisent le fait qu'il s'agit de la permittivité associée à la composante du gradient suivant l'axe x et à gauche de potentiel $V(i, j)$ (point rouge). Il est alors possible

d'exprimer le potentiel $V(i,j)$ à partir des valeurs adjacentes de potentiels et des permittivités (et conductivité si nécessaire) associé aux différents potentiels. Finalement, on obtient :

$$V(i,j) = \frac{1}{4} \frac{\varepsilon_{i^-} V(i-1,j) + \varepsilon_{i^+} V(i+1,j) + \varepsilon_{j^-} V(i,j-1) + \varepsilon_{j^+} V(i,j+1)}{\varepsilon_{i,j}} \quad \text{II-38}$$

Deux autres approches arrivent à cette même expression. L'une est basée sur les conditions aux limites entre deux milieux (continuité des flux), l'autre sur l'utilisation de la forme intégrale de l'équation II-36. Elles ne seront pas détaillées ici.

Cette décomposition est générale et elle s'applique aussi bien au milieu homogène qu'au milieu inhomogène. Cela permet d'avoir un seul et même algorithme autorisant le traitement de milieu fortement inhomogène. Ce sont les dimensions de la cellule élémentaire qui donnent la finesse de la résolution spatiale des milieux. Ceci pourra s'avérer être un atout comparé à d'autres méthodes qui requièrent un nombre limité de milieux présentant des propriétés différentes.

IV.2.2.4 Conditions aux limites

Les conditions aux limites du volume de calcul sont soit des conditions de périodicité, soit des valeurs de potentiel constantes qui correspondent aux termes sources du problème. Dans ce dernier cas, il est généralement choisi un potentiel $+V_0$ et un autre $-V_0$.

IV.2.2.5 Résolution dans le domaine fréquentiel

L'équation II-29, peut s'écrire en l'absence de dispersion, sous une forme compacte suivante (II-39)

$$-div \left[\left(\sigma + \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\partial}{\partial t} \right) \text{grad } V \right] = 0 \quad \text{II-39}$$

Il est alors possible à une fréquence ou pulsation donnée d'exprimer le terme dérivé temporel de l'équation (II-39) sous la forme classique $j\omega$. Ceci conduit à l'équation II-40, à partir de laquelle il est possible d'exprimer une conductivité équivalente II-41 ou une permittivité complexe équivalente II-42

$$-div \left[(\sigma + j \omega \varepsilon_0 \varepsilon_r) \text{grad } V \right] = 0 \quad \text{II-40}$$

$$\sigma_{eq}(\omega) = \sigma + j \omega \varepsilon_0 \varepsilon_r(\omega) \quad \text{II-41}$$

$$\varepsilon_{req}(\omega) = \varepsilon_0 \varepsilon_r(\omega) - j \frac{\sigma}{\omega} \quad \text{II-42}$$

Le calcul dans le domaine temporel ou fréquentiel se fait par itération successive jusqu'à converger vers la solution. Pour accélérer la convergence une technique de sur-relaxation est appliquée.

IV.2.3 Méthode de surrelaxation

La détermination des valeurs de potentiel dans le domaine considéré, pour une tension appliquée à une fréquence donnée s'effectue en résolvant l'équation de Laplace. Une technique de sur relaxation, connue également sous le nom de "Red-Black" permet d'accélérer la vitesse de convergence de l'algorithme et ainsi de diminuer le temps de calcul. Cette technique consiste à ne pas calculer tous les potentiels lors d'une même itération.

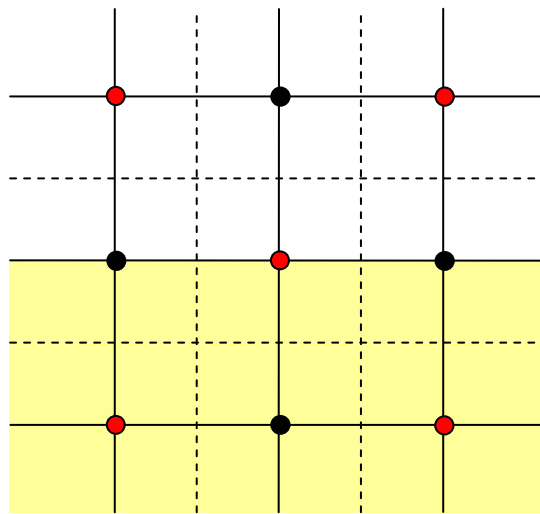


Figure II-14 : Damier, représentant les nœuds auxquels sont calculées les valeurs de potentiel en deux temps.

En effet, comme le calcul du potentiel ne fait intervenir que ces proches voisins, il est judicieux de décomposer le calcul en deux groupes, comme illustré sur la Figure II-14. Dans un premier temps, les potentiels situés au niveau des points noirs sont calculés à partir de ceux situés aux points rouges, et inversement dans un second temps. La technique de sur-relaxation proprement dite revient à prendre en compte dans le calcul du potentiel à l'itération $n+1$, le potentiel à l'instant n , en plus des potentiels voisins. Un coefficient α est alors ajouté et doit être ajusté pour optimiser la convergence. A partir de l'équation II-38, cela donne

$$V_{noir}^{n+1} = (1 - \alpha)V_{noir}^n + \alpha \frac{\varepsilon_{i-}V(i-1, j) + \varepsilon_{i+}V(i+1, j) + \varepsilon_{j-}V(i, j-1) + \varepsilon_{j+}V(i, j+1)}{4 \varepsilon_{i,j}} \quad \text{II-43}$$

Ce coefficient, appelé facteur de sur-relaxation, doit être compris en 1 et 2.

Une attention particulière doit être apportée à la programmation de cette technique. En effet, il est indispensable de traiter les deux groupes (noir et rouge) avec le plus grand soin au

risque de ne tirer aucun bénéfice de la méthode ($\alpha=1$, pour converger). L'autre point lors d'une programmation sous forme matricielle, il faut bien prendre soin là aussi à séparer les deux groupes. Cela peut s'effectuer utilisant les indices de la matrice (indices pairs et impairs).

IV.2.4 Détermination de la réponse transitoire à partir de la réponse fréquentielle

Il ne faut pas perdre de vue que nous souhaitons étudier la réponse temporelle de la cellule lorsqu'elle est soumise à une impulsion ultracourte et de très forte amplitude. L'algorithme employé est défini avec la Figure II-15.

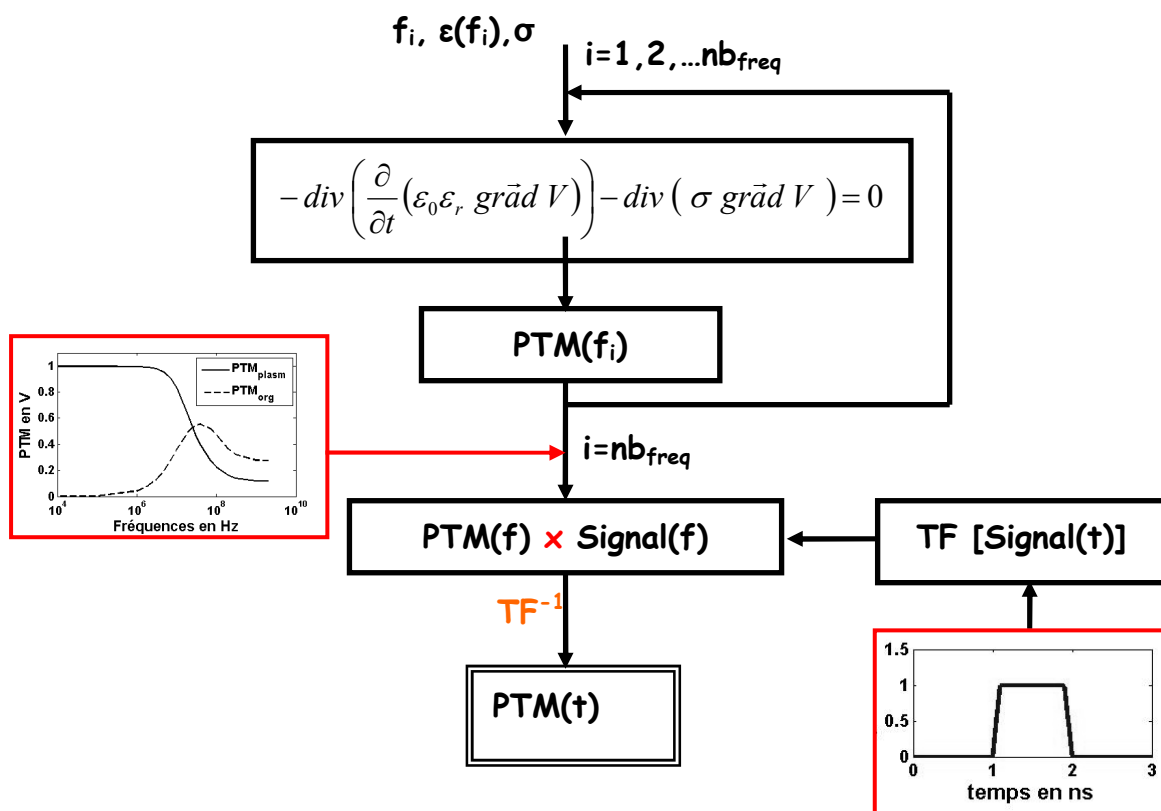


Figure II-15 : Organigramme.

La première étape consiste en la détermination de la réponse fréquentielle du potentiel au niveau de la cellule sur une bande de fréquence par la résolution de l'équation de Laplace. Ensuite, cette réponse fréquentielle $PTM(f)$ est utilisée comme fonction transfert qui va être multipliée au spectre de l'impulsion $Signal(f)$ à laquelle la cellule sera exposée. A partir de ce produit, il est alors possible de recomposer la réponse temporelle du potentiel transmembranaire à partir de la transformée de Fourier Inverse du produit.

IV.3 Conclusion

L'étude des nsPEFs sur le milieu biologique réduit à la cellule unique nous permet d'effectuer l'approximation des régimes quasistationnaires (ARQS). Du fait des dimensions très petites de la cellule par rapport aux longueurs d'ondes contenu dans le spectre des nsPEFs, nous pouvons donc supposer que la propagation du champ est négligeable à l'échelle de la cellule. Par une approche quasi-statique, basée sur la méthode des différences finies, nous modélisons notre modèle de cellule en suspension entre deux électrodes. Cette méthode prend en compte la variation fréquentielle des propriétés physiques du milieu biologique (permittivité diélectrique, conductivité). Ainsi, nous déterminons le comportement fréquentiel de notre modèle de cellule, nécessaire à la reconstitution de la réponse temporelle de notre modèle à un nsPEF. Cette méthode numérique présente l'avantage d'être robuste mais possède également l'avantage d'être adaptable à nos codes thermiques basés sur les différences finies.

Comme nous avons pu le faire remarquer le rapport de dimension entre la membrane et la cellule constitue une grande difficulté pour l'étude numérique qui nécessite alors des temps de simulation importants. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de définir des membranes équivalentes permettant de réduire le temps de calcul. Les méthodes proposées pour la définition de telles membranes seront présentées dans la partie suivante.

V Modélisation des membranes de cellule

Comme nous l'avons mis en évidence précédemment, le problème de la modélisation des cellules biologiques est multi-échelle. Il existe un facteur d'échelle de 2 à 3 ordres de grandeur entre l'épaisseur de la membrane et la taille des cellules biologiques. Cette membrane est le siège de phénomène non linéaire important avec la modification de sa perméabilité et la création de pores. De plus, ces phénomènes sont dépendants de l'endroit où l'on se trouve dans la cellule et varient au cours du temps. Cela signifie qu'il est nécessaire de prendre en compte la membrane lors de la modélisation à l'échelle cellulaire. L'aspect multi-échelle nous a amené à explorer et développer des techniques permettant un traitement efficace de la prise en compte la membrane.

Quelques solutions pour traiter un tel problème vont être présentées. L'objectif de cette partie est de faire un bilan des différents modèles numériques qui permettent de simuler les structures petites devant les dimensions du problème global, comme notre membrane cellulaire vis-à-vis de la cellule, dans un code aux différences finies. Une première technique

repose sur la définition d'impédance de surface et de transfert. Une deuxième technique est basée sur la définition d'un modèle de membrane équivalente permettant de relâcher les contraintes sur le pas de discrétisation spatial.

V.1 Modèle d'impédances de surface et de transfert.

Cette technique d'impédance de surface et de transfert a été développée à l'origine pour répondre à des problèmes de modélisation de matériaux à fortes pertes. En effet dans ce cas, il y a une très forte atténuation spatiale du champ électromagnétique dans l'épaisseur du matériau. Ceci impose une discrétisation fine de la zone si l'on souhaite obtenir par exemple le champ électromagnétique qui traverse un tel matériau. Il a été développé une technique reposant sur la définition d'une impédance de surface et de transfert, évitant de discrétiser le matériau.

Cette technique repose sur le remplacement d'un matériau, généralement une lame d'épaisseur d , par une interface caractérisée par des impédances surfaciques. La Figure II-16 présente le principe de la méthode des impédances surfacique et de transfert. Dans l'épaisseur du matériau illuminé par une onde électromagnétique, se crée une densité de courant. A la surface du matériau, il est possible de définir une densité surfacique de courant qui soit représentative de la densité de courant dans le matériau. Ceci s'obtient en intégrant les densités de courant présentes dans le matériau sur l'épaisseur de ce dernier et conduit à une densité surfacique d'une couche équivalente infiniment mince.

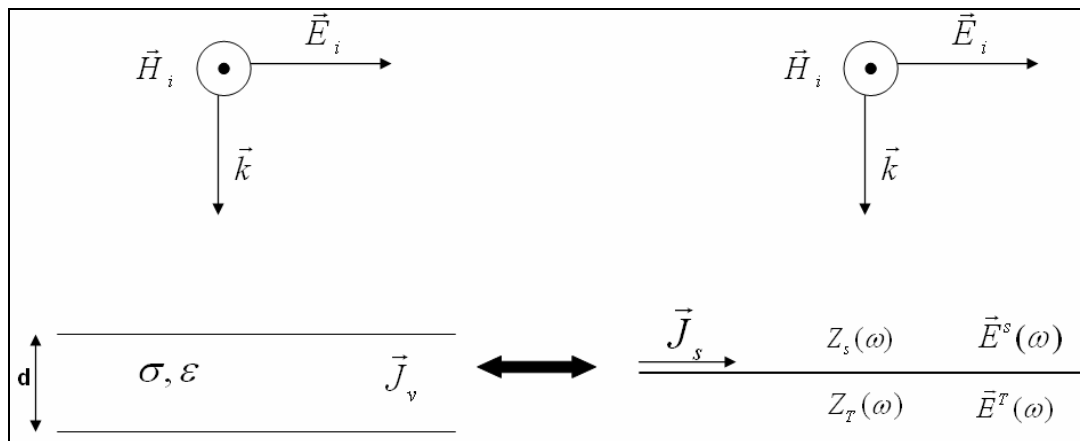


Figure II-16 : Principe des impédances de surface et de transfert

Il est alors possible de relier la densité de courant surfacique J_s aux champs tangents de part et d'autre à la couche par les relations II-45 et II-46 à l'aide les coefficients Z_s et Z_t . Ces

derniers sont homogènes à une impédance et sont appelés respectivement impédance de surface et de transfert.

$$\vec{E}^s(\omega) = Z_s(\omega) \vec{J}_s(\omega) \quad \text{II-44}$$

$$\vec{E}^T(\omega) = Z_T(\omega) \vec{J}_s(\omega) \quad \text{II-45}$$

Un modèle développé par Perala [105] permet de définir les impédances de surface et de transfert quelque soit l'angle d'incidence de l'onde électromagnétique, uniquement sous certaines conditions, en particulier le fait que le milieu soit un très bon conducteur ($\sigma \gg \omega \epsilon$),

L'hypothèse « très bon conducteur » fait que cette méthode ne répond pas à nos contraintes et resterait délicate à implanter vis-à-vis des géométries à traiter. Les conductivités électriques des membranes sont très faibles, ce qui signifie que seules les fréquences les plus basses pourraient être prises en compte par un tel modèle.

V.2 Formalisme de lame mince

Ce modèle, développé par J.P. Bérenger [106] est employé pour l'étude de plaques diélectrique ou conductrice. Ce modèle est généralement employé pour des milieux faiblement conducteurs, contrairement au modèle d'impédance de surface et de transfert. Ce modèle impose une condition sur l'épaisseur de la plaque à considérer qui doit être bien inférieure à la longueur d'onde (dans le cas où c'est un diélectrique) et très inférieure à l'épaisseur de peau (II-46) (dans le cas où c'est un conducteur).

$$e < \delta \quad \text{avec} \quad \delta = \frac{1}{\sqrt{\pi \mu_0 \sigma f}} \quad \text{II-46}$$

Avec e : épaisseur de la plaque (en m)

δ : l'épaisseur de peau (en m)

σ : la conductivité électrique (en S/m)

μ_0 : la permittivité du vide (en H/m)

La Figure II-17 présente la plaque mince (partie grise sur le schéma) localisée dans le maillage, ainsi qu'une surface rectangulaire ABCD perpendiculaire à la lame notée (S). Les dimensions de cette dernière doivent être inférieure à la longueur d'onde et on considère que les composantes du champ électrique varient très peu sur cette surface. Dans ce modèle, la lame mince est prise en compte en définissant une conductivité et une permittivité diélectrique équivalentes sur la surface (S).

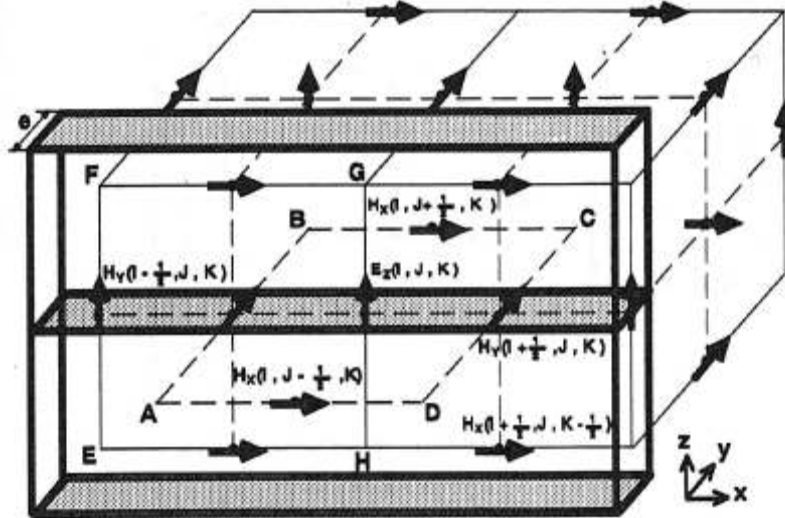


Figure II-17 : Localisation d'une plaque dans le maillage [106]

La définition de la permittivité diélectrique ϵ_{equ} et de la conductivité électrique σ_{equ} équivalente est obtenue par intégration de l'équation de Maxwell-Faraday sous sa forme intégrale qui lie la circulation du champ magnétique sur le contour (C) et les courants qui traversent la surface (S) (II-47).

$$\oint_C \vec{H} \cdot d\vec{l} = \iint_S \epsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \cdot d\vec{S} + \iint_S \sigma \vec{E} \cdot d\vec{S} \quad \text{II-47}$$

L'équation de Maxwell-Faraday est intégrée sur le contour (C) ou la surface (S) qui possède les dimensions d'une maille élémentaire (Δx , Δy). Si l'on considère les valeurs moyennes de permittivité et conductivité, ϵ_{equ} et σ_{equ} , il est possible de sortir ces grandeurs des intégrales de surface. Ces valeurs moyennes sont définies par les équations II-48 et II-49 en fonction des dimensions de la maille contenant la lame de matériau d'épaisseur e , de permittivité $\epsilon_0 \epsilon_r$ et de conductivité σ .

$$\epsilon_{equ} = \frac{1}{\Delta x \Delta y} \iint_S \epsilon \, dS \quad \text{soit} \quad \epsilon_{equ} = \epsilon_0 \left[1 + (\epsilon_r - 1) \frac{e}{\Delta y} \right] \quad \text{II-48}$$

$$\sigma_{equ} = \frac{1}{\Delta x \Delta y} \iint_S \sigma \, dS \quad \text{soit} \quad \sigma_{equ} = \sigma \frac{e}{\Delta y} \quad \text{II-49}$$

Cette technique de calcul de permittivité et conductivité équivalente sur la cellule va être utilisée dans un contexte légèrement différent. En effet dans notre configuration, il peut exister des variations importantes du champ électriques au niveau de la membrane. Donc

l'hypothèse de faible variation du champ électrique au niveau de la surface (S) définie précédemment n'est pas toujours vérifiée limitant l'utilisation d'un tel modèle.

L'idée de valeur moyenne de la permittivité va être reprise pour limiter les effets de la discrétisation spatiale.

V.3 Permittivité et conductivité équivalentes

La formulation retenue est basée sur une segmentation de l'espace à l'aide de mailles parallélépipédiques. Ceci présente l'avantage d'une relative simplicité pour discrétiser les structures, mais aussi l'inconvénient de ne pas pouvoir suivre des contours courbes avec une grande précision. Ceci est connu sous le nom de « staircasing », c'est-à-dire de discrétisation en marche d'escalier. Pour atténuer l'effet de cette segmentation, comme illustré sur la Figure II-18, il a été choisi d'attribuer des propriétés électromagnétiques moyennes sur la maille considérée. Ainsi, si la maille est complètement comprise dans un milieu, elle se verra attribuer les propriétés électromagnétiques du milieu. Par contre, si elle est à l'interface entre deux milieux, un traitement spécifique est appliqué. Initialement, la technique consiste à affecter à la maille les propriétés d'un des deux milieux (celui ou la maille occupe le plus de surface ou volume).

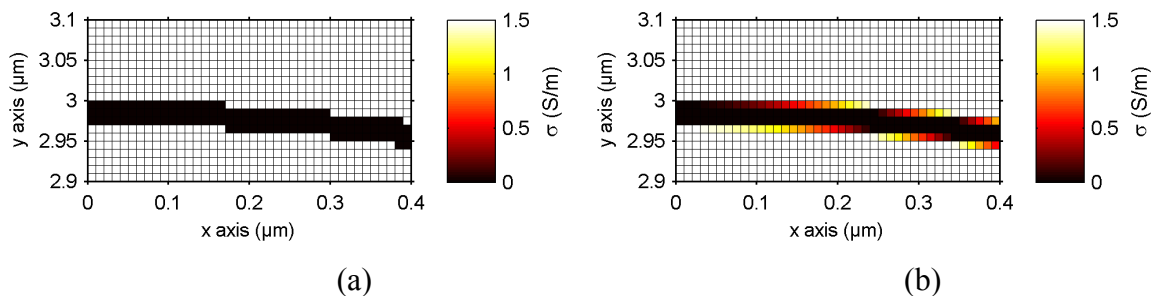


Figure II-18 : Discretisation spatiale de la membrane – Conductivité électrique : (a) technique classique (b) technique avec valeurs moyennes

Pour atténuer cet effet de discrétisation, des valeurs moyennes de conductivité et permittivité électrique peuvent être attribuées aux cellules, sur la même base du calcul présentée précédemment (II-48, II-49). On observe sur le Figure II-18, le passage progressif des valeurs de conductivité aux niveaux des interfaces.

Cette méthode permettant de limiter les effets de la discrétisation spatiale permet de relâcher le maillage spatial, mais nécessite tout de même une segmentation de l'épaisseur de la membrane. Nous allons maintenant présenter une méthode pour relâcher encore davantage la discrétisation spatiale.

V.4 Modèle de membrane équivalente

Il s'agit ici de ne pas considérer l'épaisseur réelle de la membrane mais de considérer une membrane d'épaisseur plus importante et d'en modifier les propriétés électromagnétiques pour obtenir un comportement similaire à la membrane réelle (Figure II-19). Le choix de ce type de modèle permet de réduire les contraintes sur le maillage.

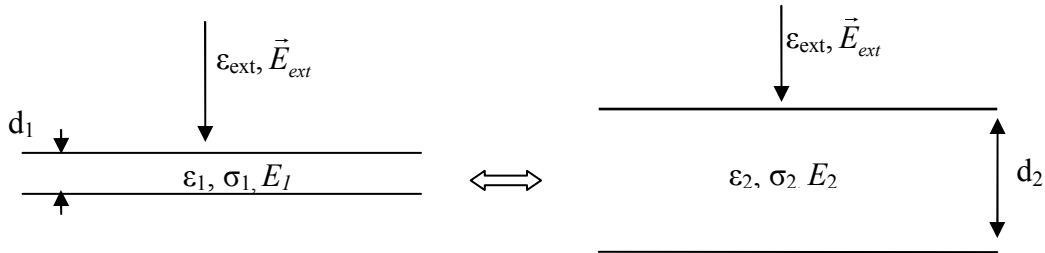


Figure II-19 : Modélisation d'une membrane de caractéristique $(d_1, \epsilon_1, \sigma_1)$ par une membrane équivalente d'épaisseur d_2 et de caractéristiques électromagnétiques ϵ_2, σ_2 .

Cette modélisation d'une membrane ayant une épaisseur plus importante repose sur le choix des caractéristiques physiques, comme la permittivité et la conductivité, pour obtenir la même réponse qu'une cellule possédant une membrane de dimension réaliste, en termes de potentiel transmembranaire et de champ électrique local.

En effet, lorsque nous nous plaçons dans la configuration d'un champ incident normale à la membrane, la relation de continuité de la composante normale de D nous permet d'écrire les relations (II-50) et (II-51):

$$\epsilon_{ext} E_{ext} = \epsilon_1 E_1 \quad \text{II-50}$$

$$\epsilon_{ext} E_{ext} = \epsilon_2 E_2 \quad \text{II-51}$$

Pour un même champ extérieur E_{ext} nous avons alors l'équation II-52:

$$\epsilon_1 E_1 = \epsilon_2 E_2 \quad \text{II-52}$$

L'une des grandeurs significatives qui doit être conservée par la définition d'un modèle équivalent de membrane est la différence de potentiel entre ses deux faces. Cette dernière intervient dans la définition du champ induit dans la membrane. En effet, le champ dans la membrane est défini par le rapport du potentiel transmembranaire sur l'épaisseur de la membrane. Ainsi, nous obtenons la relation suivante (II-53) qui montre que la définition d'une membrane plus épaisse nécessite l'augmentation de sa permittivité.

$$\frac{\varepsilon_1}{d_1} = \frac{\varepsilon_2}{d_2}$$

VI Conclusion

En première partie de ce chapitre nous avons défini l'ensemble des grandeurs fondamentales nécessaires à l'étude électrique des effets des nsPEFs à l'échelle de la cellule, à savoir les propriétés physiques des milieux biologiques (permittivité et conductivité complexes), mais également les champs et potentiels électriques.

Du fait de la composition complexe et très diversifiée de la cellule, la définition d'un modèle très simplifié s'est imposée. Pour l'étude des effets intracellulaires des nsPEF, les modèles les plus couramment employés décrivent la cellule par une membrane plasmique et une organelle. La modélisation numérique de ce type de structure n'en reste pas moins complexe. Le ratio épaisseur de membrane- diamètre de la cellule constitue la première difficulté de la modélisation.

L'étude des potentiels et des champs à l'échelle de la cellule permettent une meilleure compréhension des mécanismes et phénomènes mis en jeu lors de l'exposition à des nsPEFs. Ainsi, nous avons présenté deux approches, l'une analytique basé sur l'équation de Schwan et l'autre basée sur une approche électrique. Cette dernière repose principalement sur l'analogie faite entre la membrane et une capacité.

La prise en compte de la modification structurelle de la membrane est également une grandeur significative, qui se quantifie par la définition d'une densité de pores (Equation de Smoluchowski). Le développement de modèles 2D et 3D permettent notamment de prendre en compte la géométrie et la localisation de ce type de phénomène, différentes méthodes ont ainsi été présentées notamment la méthode basée sur les circuits distribués et celle basée sur la résolution de l'équation de Laplace.

La méthode que nous employons par la suite repose sur une approche quasistatique basée sur les différences finies. En effet, les dimensions de la cellule étant bien inférieures aux longueurs d'onde induites par les nsPEFs, nous permet de nous placer dans l'approximation des régimes quasi-stationnaires (ARQS). La méthode de résolution bien que négligeant l'aspect propagatif de l'impulsion, permet de déterminer la variation temporelle des champs et potentiels dans la cellule.

Pour pallier au problème du rapport d'échelle entre la membrane et le diamètre de la cellule, différentes méthodes numériques ont été présentées en fin de ce chapitre dont celle qui repose sur la définition d'une membrane équivalente plus épaisse.

Le chapitre suivant présente les résultats fréquentiels, obtenus avec notre méthode numérique basée sur une approche quasistatique aux différences finies, pour des modèles 1D et des modèles de membrane équivalente que nous caractériserons.

Chapitre. III : Application à un modèle 1D

I Introduction

Dans le but d'effectuer le lien entre les phénomènes macroscopiques, observés lors des expérimentations biologiques et ceux observés à l'échelle de la membrane, il est nécessaire d'étudier le milieu biologique comme le regroupement de plusieurs cellules. A partir de cette description, il est pertinent d'étudier le milieu de façon élémentaire et d'étudier la réponse d'une cellule unique à une impulsion EM ultra courte et de très forte amplitude. La Figure III-1 illustre les liens que nous souhaitons établir avec différentes échelles d'étude par l'exploitation des résultats obtenus avec les modèles numériques décrits dans le chapitre précédent. Par cette étude numérique nous cherchons à définir des grandeurs caractéristiques communes entre les études expérimentales à l'échelle macroscopique et les valeurs de champs à l'échelle microscopique voire nanométrique (à l'échelle de la membrane).

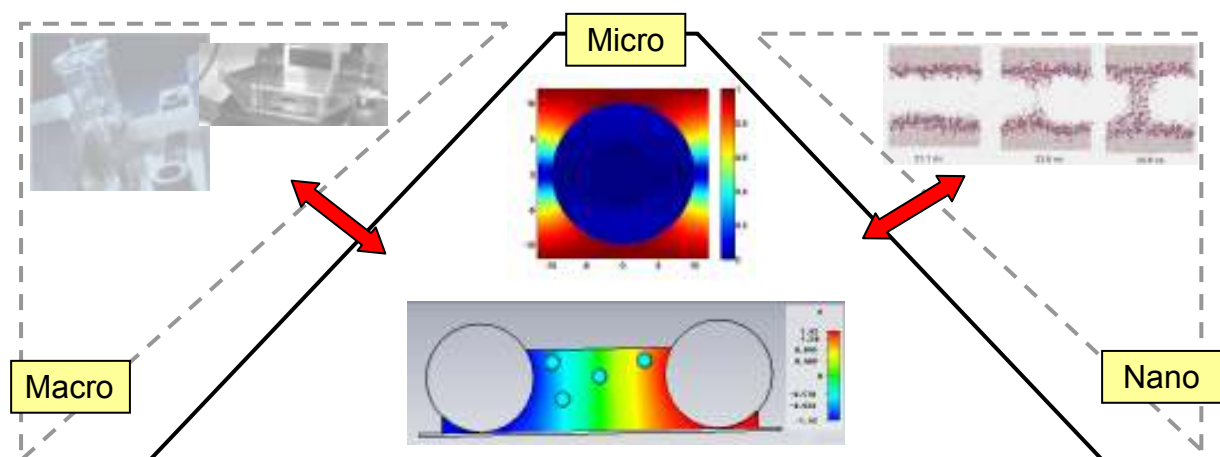


Figure III-1 : Illustration des différentes échelles d'études des phénomènes biologiques résultants d'une exposition à une impulsion de très forte amplitude et de très courte durée.

II Grandeurs caractéristiques

Nous allons pour cela définir ces grandeurs caractéristiques qui jouent un rôle essentiel dans la création de pores dans la membrane aussi bien plasmique que celle de l'organelle.

II.1 Grandeur significative : le potentiel transmembranaire (PTM)

La réponse de la cellule lors d'une exposition à un champ nanoseconde de très forte amplitude se traduit dans un premier temps par l'augmentation du PTM (de la membrane plasmique et/ou des membranes internes). Ce PTM induit par l'impulsion EM se rajoute au potentiel de repos de la membrane et au-delà d'un certain seuil ce PTM total peut entraîner le phénomène de perméabilisation.

II.2 Distribution du champ électrique E

Les fortes valeurs de champ électrique dans la membrane sont à l'origine du mouvement des dipôles qui composent le milieu biologique (molécules d'eau, tête lipidique, ...). L'étude des valeurs de champs permet également de comparer l'amplitude du champ à l'extérieur de la cellule avec celui dans la membrane et celui dans le cytoplasme.

Dans notre étude, nous supposons que les milieux extracellulaires et intracellulaires sont identiques, provoquant ainsi l'obtention de champs électriques similaires pour le milieu extra et intracellulaire. Par la suite, nous présenterons donc les champs E du milieu extracellulaire noté E_{ext} et les champs dans la membrane notés E_m .

III Analyse des paramètres caractéristiques : 1D

Dans ce sous-chapitre, nous allons étudier l'influence des paramètres physiques associés à une cellule biologique tels que la permittivité diélectrique et la conductivité électrique, sur les champs électriques dans le milieu cellulaire (E_{ext}), dans la membrane (E_m) et sur le PTM. Nous étudierons également l'influence des paramètres géométriques (épaisseur de la membrane, rayon) ainsi que des paramètres numériques (discrétisation spatiale, nombre d'itérations).

III.1 Modèle 1-D

Le premier modèle étudié est un modèle 1-D d'une cellule de type liposome, constituée uniquement d'une membrane plasmique et d'un cytoplasme homogène comme l'illustre la Figure III-2(a). Le modèle 1D (Figure III-2 (b)) définit les deux électrodes par

deux points séparés par une distance appelée D_{elec} de $24 \mu\text{m}$. Une différence de potentiel de 2 V (V^+, V^-) est imposée aux électrodes, générant ainsi un champ électrique de $\sim 83 \text{ kV/m}$. Le diamètre intérieur de la cellule est de $10 \mu\text{m}$. Les milieux extra et intracellulaire sont supposés identiques et définis par une permittivité diélectrique exprimé par le modèle de Debye pour l'eau avec une conductivité de 1 S/m . Les membranes sont d'une épaisseur e_m de 40 nm et sont définies comme des milieux purement diélectriques avec une permittivité ϵ_m de 1.5 .

Ce modèle très simplifié va nous permettre d'étudier l'influence de chacun des paramètres, telles que la permittivité diélectrique, la conductivité électrique mais également l'épaisseur des membranes sur les grandeurs caractéristiques de l'étude telles que le PTM et les valeurs de champs au voisinage de la cellule. Le PTM est défini par la différence des potentiels de part et d'autre de la membrane ($PTM = V_1 - V_2$), et les valeurs de champ par le gradient de potentiel comme l'illustre la Figure III-2 (c).

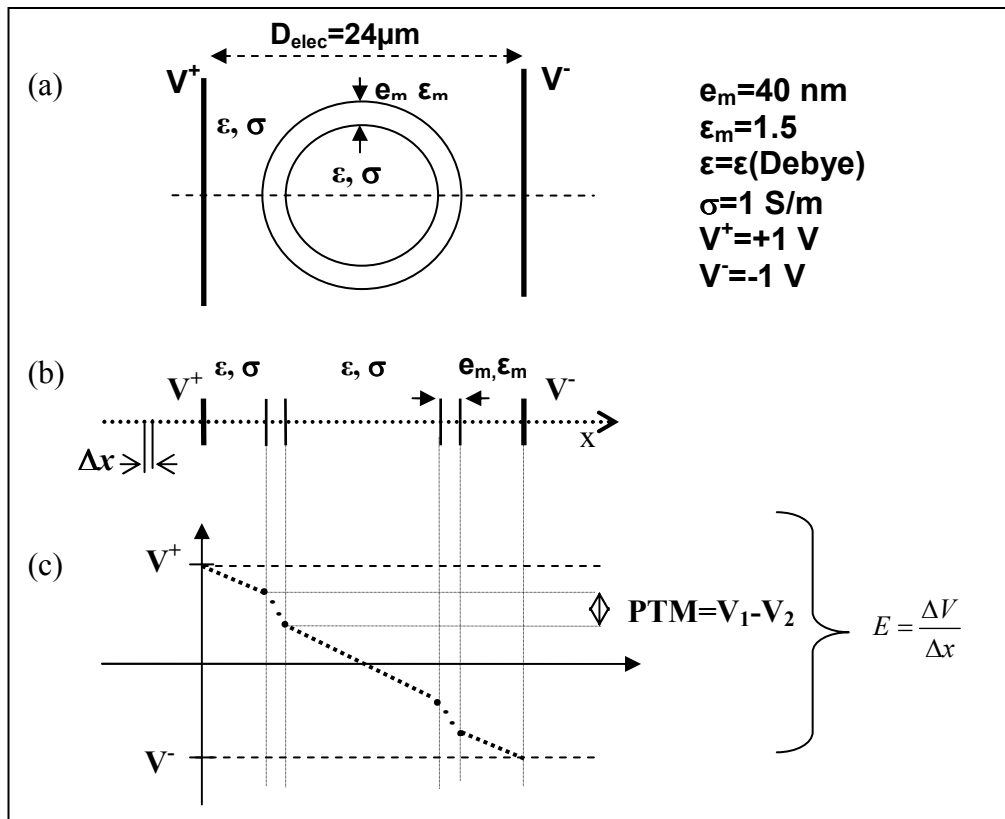


Figure III-2 : Modèle 1-D d'une cellule de type liposome, détermination du PTM et des champs électrique.

III.2 Paramètres physiques

Cette partie se compose d'une étude sur la prise en compte de la conductivité dans la modélisation du milieu cellulaire, suivie d'une étude paramétrique sur l'influence des valeurs

de la conductivité et de la permittivité. A noter que les valeurs obtenues sont de l'ordre du kV/m pour le champ E_{ext} , du MV/m pour le champ E_m et du mV pour le PTM. Pour des raisons d'harmonisation les résultats seront présentés dans les figures en V/m ou V.

III.2.1 Milieu cellulaire purement diélectrique

La Figure III-3 présente l'évolution fréquentielle du champ E_{ext} de la cellule, dont le modèle a été introduit précédemment, pour un milieu cellulaire purement diélectrique (conductivité nulle).

Le champ E_{ext} possède globalement trois comportements :

- en basse fréquence (BF), jusqu'à environ 1 GHz le champ est constant et a pour valeur 71 kV/m.
- en haute fréquence (HF), au-delà d'environ 100 GHz, le champ est constant et se rapproche de la valeur du champ global (83 kV/m obtenu pour une différence de potentiel de 2 V appliquée au niveau des électrodes séparés de 24 μm).
- entre les deux domaines de fréquences (1 GHz et 100 GHz), le champ augmente avec la fréquence (il varie de 71 kV/m à 83 kV/m).

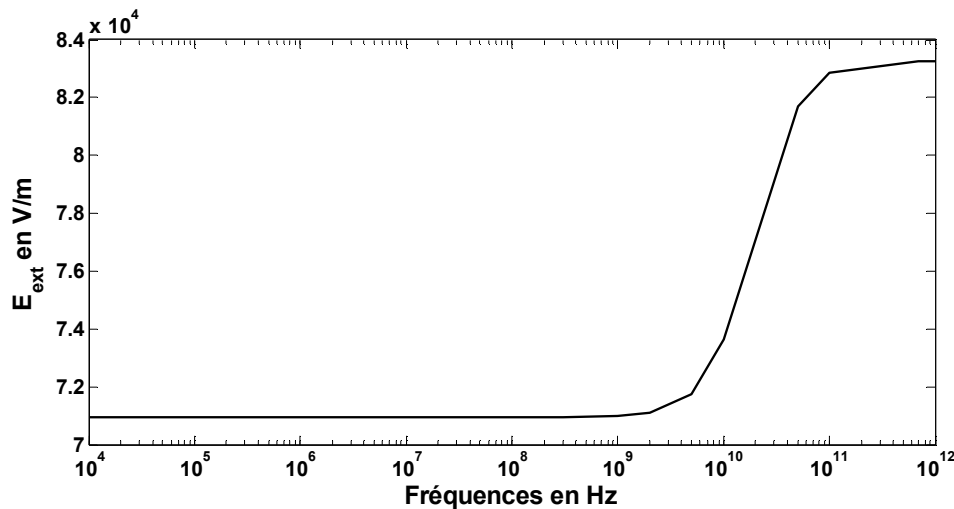


Figure III-3 : Evolution fréquentielle du champ E_{ext} dans un milieu cellulaire purement diélectrique.

Ces comportements s'expliquent par le phénomène de relaxation du milieu cellulaire (eau) pris en compte par le modèle de Debye qui se traduit par la variation de la permittivité en fonction de la fréquence. En effet, la valeur de permittivité en BF est proche de 80 alors que pour des fréquences au-delà du GHz, elle diminue rapidement, passant de 80 à 1.8 (pour 100 GHz). En HF, la permittivité du milieu cellulaire se rapproche ainsi de celle de la

membrane (1.5) et la membrane forme ainsi un milieu homogène avec le milieu cellulaire. Le champ E_{ext} tend alors vers des valeurs proches du champ global attendu.

La Figure III-4 présente l'évolution fréquentielle du champ E_m . Nous remarquons également trois comportements différents en fonction de la fréquence.

- en BF, jusqu'à environ 1 GHz le champ est constant et a pour valeur 3.78 MV/m.
- en HF (au-delà d'environ 100 GHz), le champ diminue et tend vers le champ E_{ext} global (83 kV/m). En effet, la valeur de champ est définie comme le rapport de la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane (Figure III-4) sur l'épaisseur de la membrane. Cette différence de potentiel est très faible du fait que le milieu est homogène en HF (permittivités milieu cellulaire/membrane comparables).
- entre les deux domaines de fréquences (1 GHz et 100 GHz), le champ diminue avec la fréquence (il varie de 3.78 MV/m à 0.08 MV/m).

A partir du comportement fréquentiel du champ E_m , il nous est possible d'en déduire le comportement fréquentiel du PTM, et réciproquement. Illustré par la Figure III-5, le PTM présente les mêmes comportements fréquentiels que pour E_m . En BF, le PTM prend la valeur de 150 mV correspondant bien au produit de E_m avec l'épaisseur de 40 nm de la membrane plasmique. Le même comportement transitoire est observé entre 1 GHz et 100 GHz, faisant tendre le PTM en HF vers 0. En effet, en HF la faible variation spatiale de champ dans la membrane implique une différence de potentiel très faible entre les parois de la membrane.

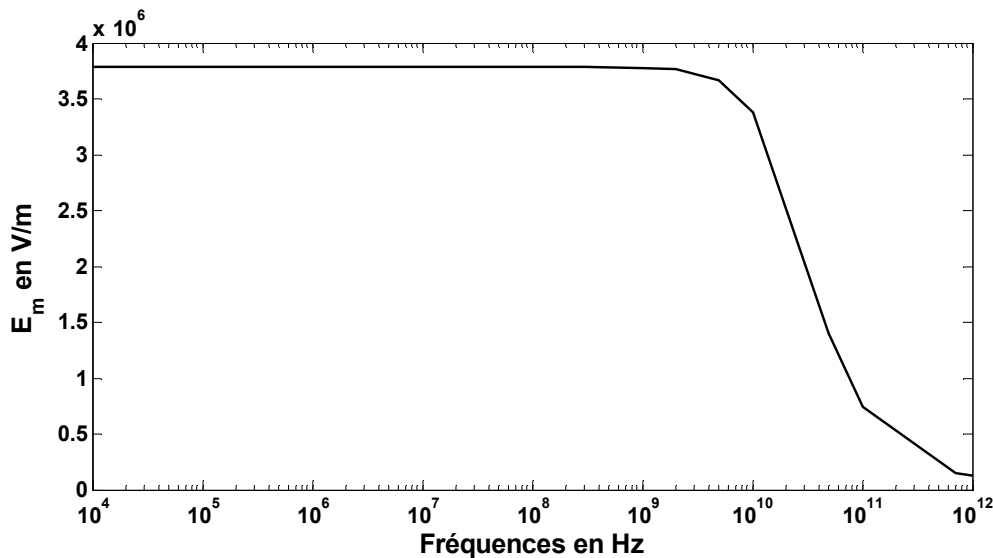


Figure III-4 : Evolution fréquentielle du champ E_m dans un milieu cellulaire purement diélectrique.

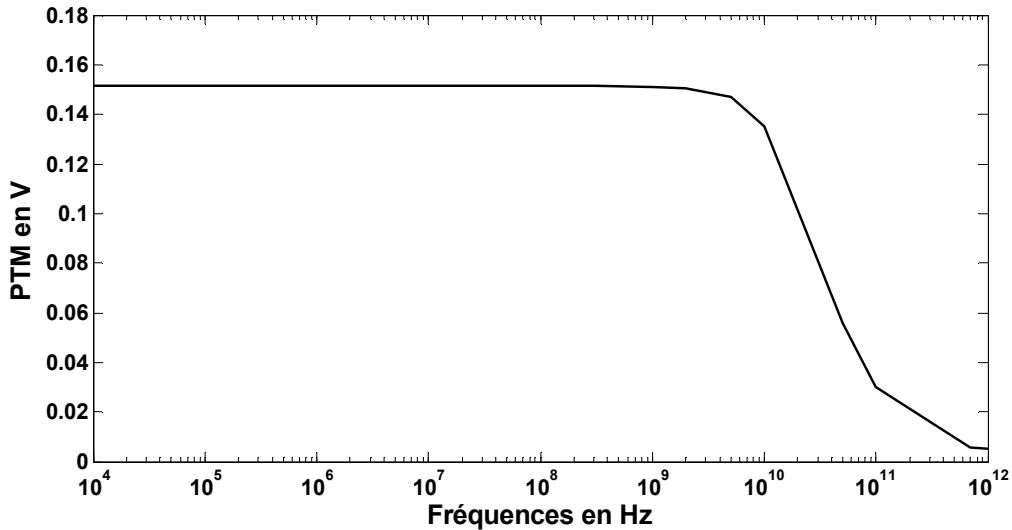


Figure III-5 : Evolution fréquentielle du PTM dans un milieu cellulaire purement diélectrique.

Cette étude montre d'ores et déjà l'importance du domaine fréquentiel d'étude sur la réponse que peut avoir la cellule en termes de champs E_{ext} , E_m et de PTM. Cependant, pour des fréquences inférieures au GHz (contenu spectral associé à un signal de durée sub-nanoseconde), un comportement constant est mis en évidence avec ce modèle. Dans cette configuration, le champ E_{ext} est de 71 kV/m, le champ E_m est 3.8 MV/m et le PTM est de 151 mV.

La considération du milieu cellulaire comme un milieu purement diélectrique ne traduit pas de façon fidèle la composition des milieux biologiques utilisés lors des expérimentations. En effet, les ions présents dans les milieux biologiques apportent une conductivité au milieu cellulaire. L'objectif de l'étude suivante est d'analyser la prise en compte de cette conductivité dans la modélisation.

III.2.2 Milieu cellulaire avec prise en compte de la conductivité

Une valeur de conductivité électrique de 1 S/m représentative d'un milieu cellulaire réaliste est introduite dans le modèle. Son impacte sur les valeurs des champs E_{ext} , E_m ainsi que du PTM par comparaison avec un milieu cellulaire purement diélectrique est étudié.

La Figure III-6 montre l'évolution fréquentielle du champ E_{ext} avec et sans prise en compte de la conductivité. En BF, le comportement conducteur du milieu est prédominant, ce qui explique les valeurs de champ E_{ext} plus faibles lorsque la conductivité est prise en compte. Dans les deux cas, le champ E_{ext} suit la même évolution au-delà de 300 MHz traduisant le comportement purement diélectrique du modèle étudié en HF. Ce comportement fréquentiel

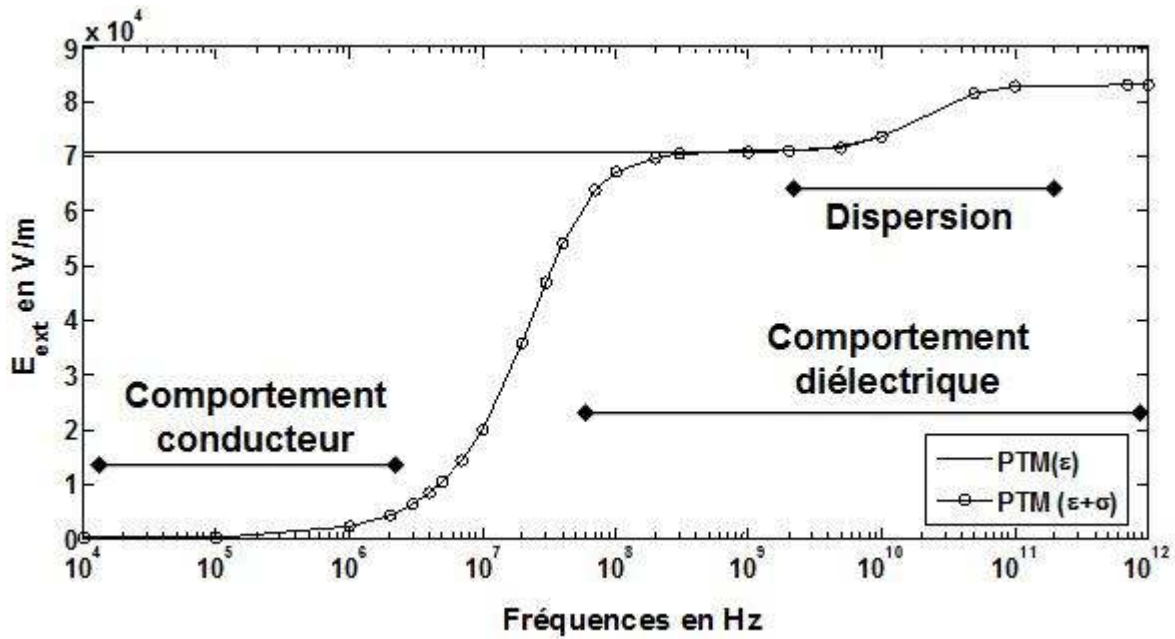


Figure III-6 : Valeurs de champs E_{ext} en fonction de la fréquence avec et sans prise en compte de la conductivité du milieu cellulaire.

traduit dans un premier temps le passage d'un milieu conducteur à un milieu diélectrique, puis on observe un phénomène qui est lié à la dispersion diélectrique.

En revanche, nous observons une tendance inverse sur l'évolution fréquentielle du champ E_m présentée sur la Figure III-7. En effet, la prise en compte du comportement conducteur du milieu cellulaire se traduit en BF par des valeurs de E_m plus importantes (de l'ordre de 6.5) que dans l'hypothèse du milieu purement diélectrique. Au-delà de 1 GHz, les réponses des deux configurations se confondent et la conductivité n'influe plus sur les valeurs de E_m .

Nous pouvons observer le même phénomène sur la Figure III-8, qui compare les valeurs de PTM dans les deux cas. En BF, les valeurs de PTM en prenant en compte la conductivité sont plus importantes que dans le cas d'un milieu cellulaire purement diélectrique, prenant la valeur de 1 V jusqu'à ≈ 3 MHz. Cette valeur de PTM correspond bien au produit du champ E_m de 25 MV/m et de l'épaisseur de la membrane. La zone de transition, entre 3 MHz et 1 GHz, traduit la diminution progressive de l'influence de la conductivité sur les valeurs de PTM. Pour des fréquences supérieures à 1 GHz, la contribution de la conductivité du milieu cellulaire ne transparaît pas sur les valeurs de PTM. Ces dernières sont alors similaires à celles d'un milieu cellulaire purement diélectrique.

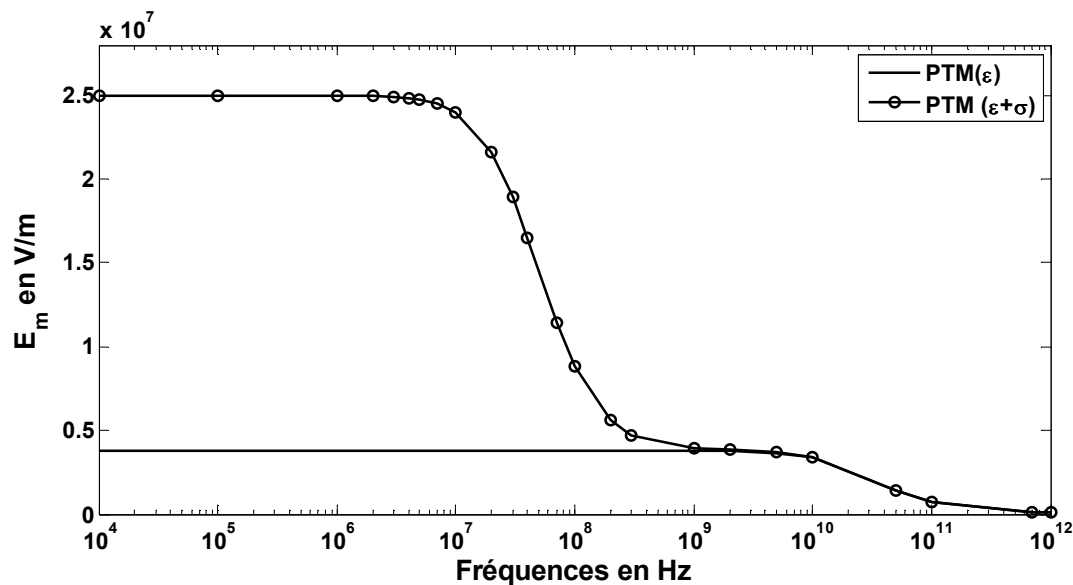


Figure III-7 : Valeurs de champs E_m en fonction de la fréquence avec et sans prise en compte de la conductivité du milieu cellulaire.

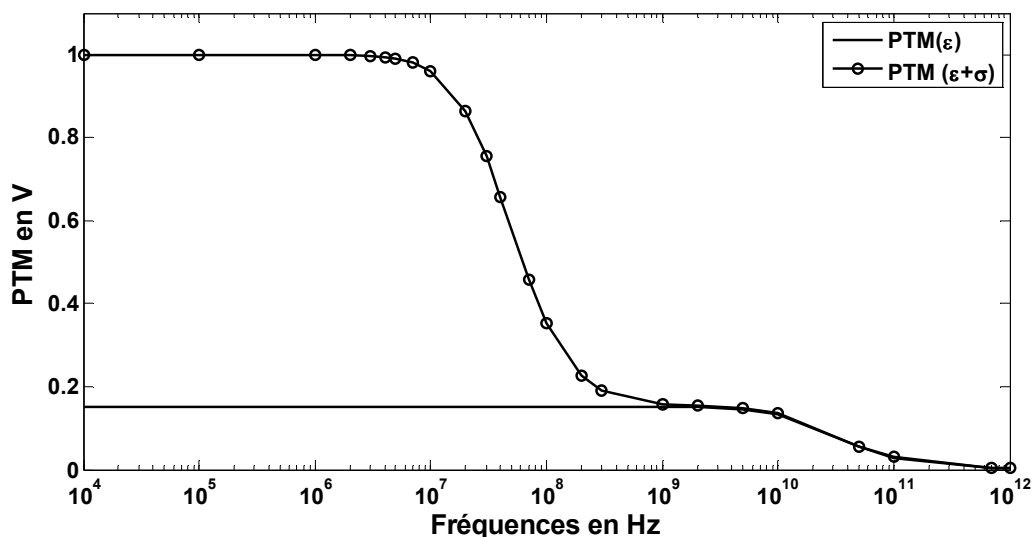


Figure III-8 : Valeurs de PTM en fonction de la fréquence avec et sans prise en compte de la conductivité du milieu cellulaire.

Cette étude souligne l'importance de la prise en compte de la conductivité du milieu cellulaire en particulier pour des fréquences inférieures à 1 GHz où le comportement conducteur est prédominant. Par comparaison avec le cas purement diélectrique, la présence de la conductivité provoque une diminution du champ E_{ext} (quasi nul) et une augmentation du champ E_m (25 MV/m) et du PTM (1 V).

Les valeurs de conductivité des milieux biologiques pouvant varier d'un organisme à l'autre, nous allons étudier par la suite l'influence de la valeur de la conductivité du milieu cellulaire sur les valeurs de champ et de PTM.

III.2.3 Influence de la valeur de la conductivité du milieu cellulaire

La Figure III-9 compare les valeurs de champs E_{ext} pour trois valeurs de conductivité du milieu cellulaire (0.5 S/m, 1 S/m et 1.5 S/m). Au dessous de 100 kHz et au-delà de 300 MHz, la variation de la conductivité ne modifie que très faiblement le champ E_{ext} . En revanche, entre 100 kHz et 300 MHz et à fréquence constante, nous remarquons que les valeurs de champ E_{ext} sont d'autant plus faibles que la conductivité est grande. De plus, nous remarquons que plus la valeur de la conductivité électrique est grande plus la transition entre le comportement conducteur (BF) et le comportement diélectrique (HF) du milieu cellulaire est décalé vers les hautes fréquences.

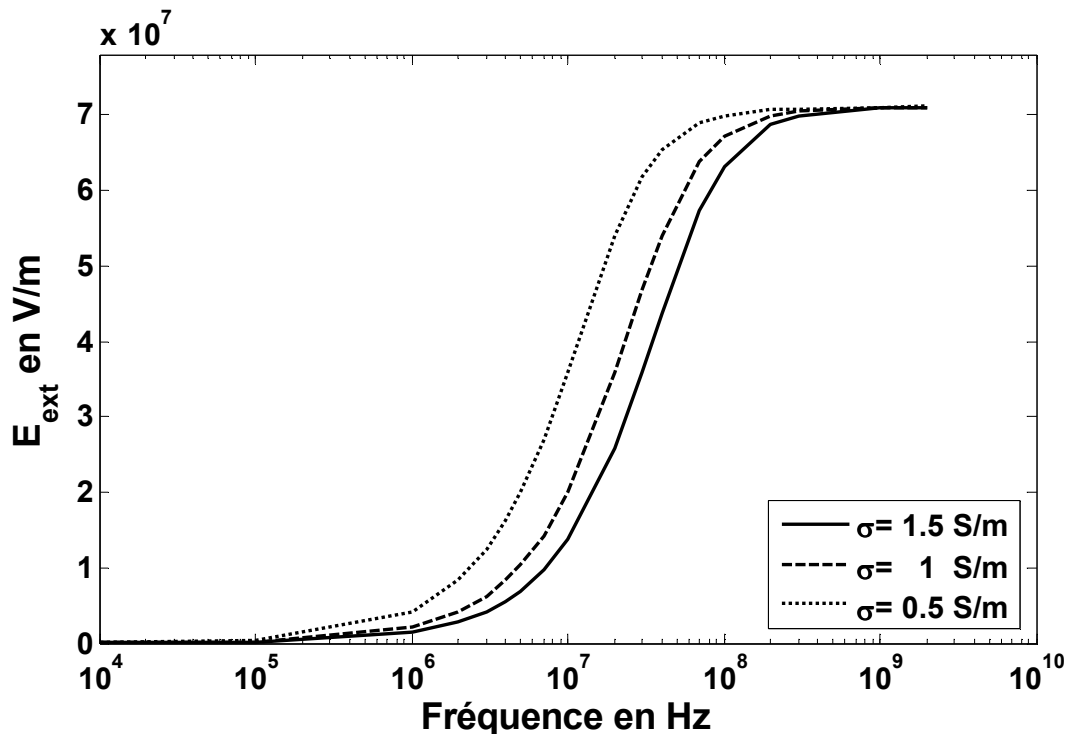


Figure III-9 : Evolution fréquentielle du champ E_{ext} pour différentes valeurs de conductivité du milieu cellulaire.

Ce décalage vers les hautes fréquences lorsque la conductivité augmente se remarque également dans la bande 2 MHz – 1 GHz sur l'évolution fréquentielle du champ E_m (Figure III-10). Si nous considérons une conductivité de 0.5 S/m, la transition s'effectue dès 2 MHz et s'achève à 200 MHz, alors que pour une conductivité de 1.5 S/m la transition débute à 10 MHz et se termine à 1 GHz. Dans la zone de transition et à fréquence constante, l'augmentation de la valeur de la conductivité induit une augmentation des valeurs du champ

E_m . En effet, si nous nous positionnons à 40 MHz, lorsque la conductivité augmente de 0.5 S/m à 1.5 S/m, le champ E_m augmente de 10.4 MV/m à 19.8 MV/m, respectivement.

Le même type d'observations peut être effectué sur l'évolution fréquentielle du PTM en fonction de la conductivité du milieu cellulaire (Figure III-11).

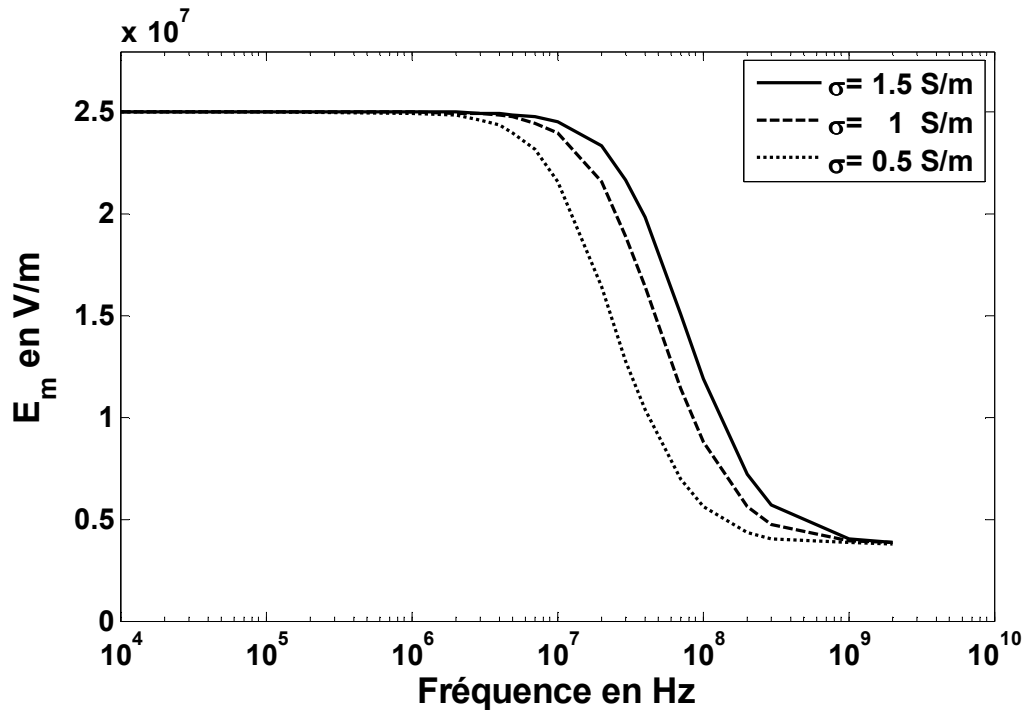


Figure III-10 : Evolution fréquentielle du champ E_m pour différentes valeurs de conductivité du milieu cellulaire

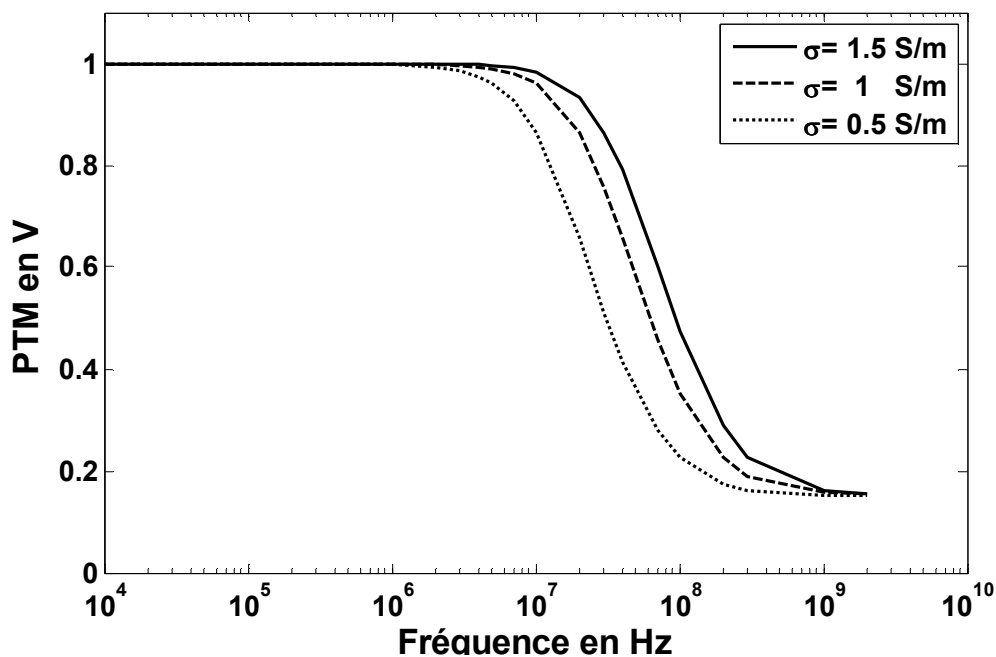


Figure III-11 : Evolution fréquentielle du PTM pour différentes valeurs de conductivité du milieu cellulaire

L'influence de la valeur de la conductivité du milieu cellulaire sur le comportement fréquentiel des champs E_{ext} , E_m et le PTM a été évaluée. Il en ressort que plus la valeur de la conductivité électrique est grande, plus la transition entre le comportement conducteur (BF) et le comportement diélectrique (HF) est décalé vers les hautes fréquences.

De manière similaire, nous allons étudier par la suite l'influence de la valeur de la permittivité diélectrique sur les valeurs de champ et de PTM.

III.2.4 Influence de la valeur de la permittivité diélectrique

Dans cette partie, nous allons considérer différentes valeurs de permittivité pour le milieu cellulaire et pour la membrane plasmique.

III.2.4.1 Milieu cellulaire

Le modèle de Debye, définissant la variation fréquentielle de la permittivité du milieu cellulaire, ne sera pas employé dans cette étude afin d'étudier uniquement l'influence de la valeur constante de la permittivité. Nous considérons pour le milieu cellulaire trois valeurs de permittivité (60, 70 et 80), constantes sur toute la bande de fréquences considérées. La Figure III-12 présente l'évolution fréquentielle du champ E_{ext} en fonction de la permittivité. Pour ces trois configurations, nous remarquons que les valeurs de E_{ext} sont similaires jusqu'à 50 MHz et qu'au-delà de cette fréquence les valeurs de E_{ext} augmentent très faiblement avec la diminution de la permittivité du milieu cellulaire. Nous retrouvons bien ainsi le comportement diélectrique prédominant en hautes fréquences.

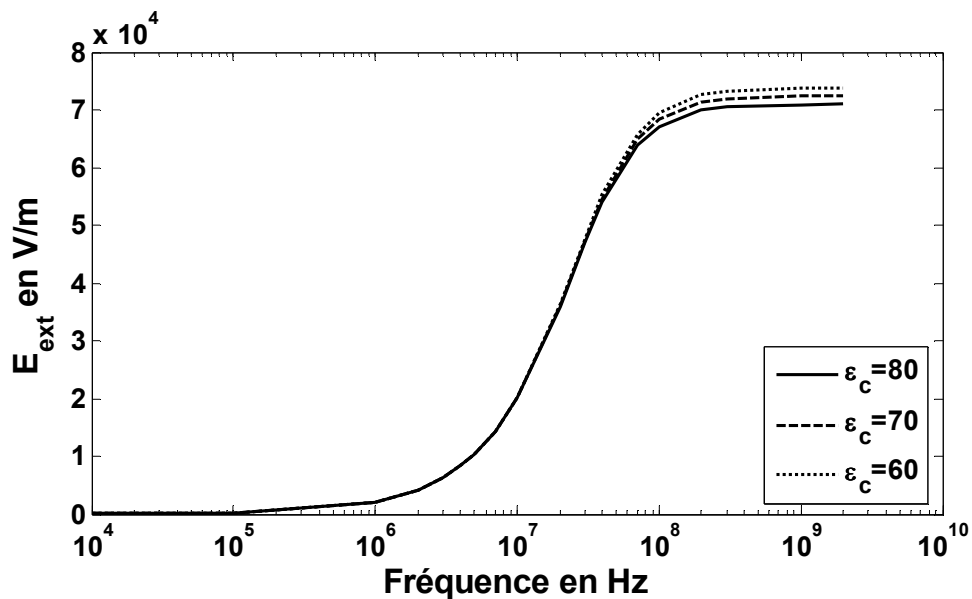


Figure III-12 : Evolution fréquentielle de E_{ext} pour différentes valeurs de permittivité du milieu cellulaire.

Aussi bien pour le champ E_m (Figure III-13) que pour le PTM (Figure III-14), la modification de la permittivité du milieu cellulaire n'affecte que les valeurs au-delà de 100 MHz. Sur ce domaine lorsque la permittivité augmente les valeurs de E_m et le PTM augmente.

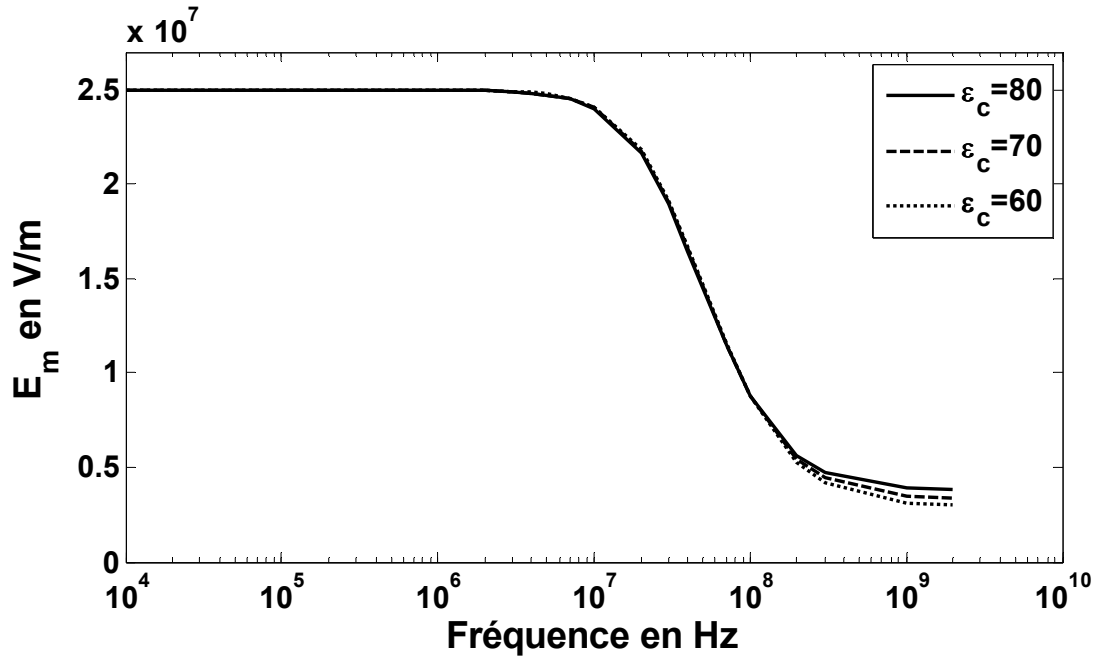


Figure III-13 : Evolution fréquentielle de E_m pour différentes valeurs de permittivité du milieu cellulaire.

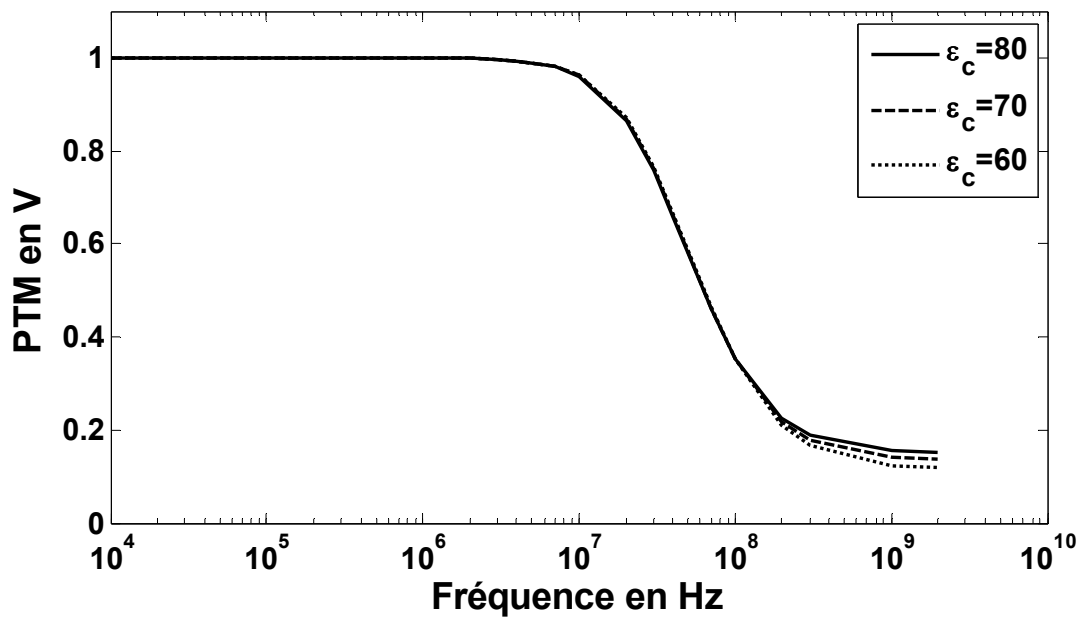


Figure III-14 : Evolution fréquentielle du PTM pour différentes valeurs de permittivité du milieu cellulaire.

III.2.4.2 Membrane plasmique

Dans cette partie, nous utiliserons le modèle de Debye pour l'évolution fréquentielle de la permittivité du milieu cellulaire. Nous considérons trois valeurs de permittivité de la membrane plasmique ϵ_m (1, 3 et 5). La Figure III-15 montre l'évolution fréquentielle du champ E_{ext} pour les différentes valeurs de permittivité de la membrane plasmique. Pour des fréquences en dessous de 100 kHz, les valeurs de E_{ext} sont faibles et elles sont similaires pour les trois cas. Au-delà de cette fréquence, les valeurs de champ E_{ext} augmentent avant d'atteindre des valeurs constantes en hautes fréquences. Plus la permittivité diélectrique de la membrane est grande et se rapproche de celle du milieu cellulaire, plus les valeurs de champs E_{ext} sont grandes et tendent vers la valeur du champ global (Tableau III-1). De plus la transition vers les valeurs constantes est décalée vers les basses fréquences lorsque la permittivité augmente (Figure III-15).

ϵ_m	E_{ext} en kV/m	
	$f = 10$ MHz	$f = 1$ GHz
1	13.6	65.9
3	36.6	76.8
5	52.3	79.4

Tableau III-1 : Valeurs de champ E_{ext} , à 10 MHz et à 1 GHz pour trois valeurs de ϵ_m .

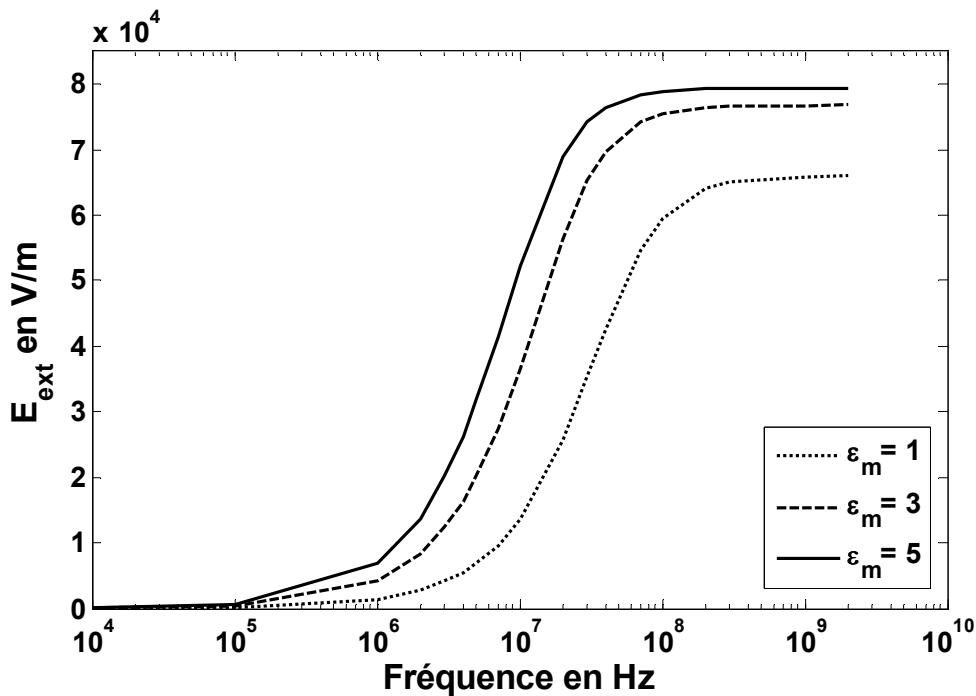


Figure III-15 : Evolution fréquentielle de E_{ext} pour différentes valeurs de permittivité de la membrane plasmique.

L'évolution des champs E_m pour cette étude est présentée sur la Figure III-16. Nous remarquons que jusqu'à 1 MHz, les valeurs de E_m sont similaires pour les trois cas. Pour des fréquences plus grandes, contrairement à l'évolution observée pour le champ E_{ext} , le champ E_m prend des valeurs plus faibles lorsque la permittivité de la membrane augmente. Cet effet est également illustré par le Tableau III-2 qui présente les valeurs de champ obtenues pour les trois valeurs de permittivité ϵ_m à 10 MHz, 40 MHz et 1 GHz.

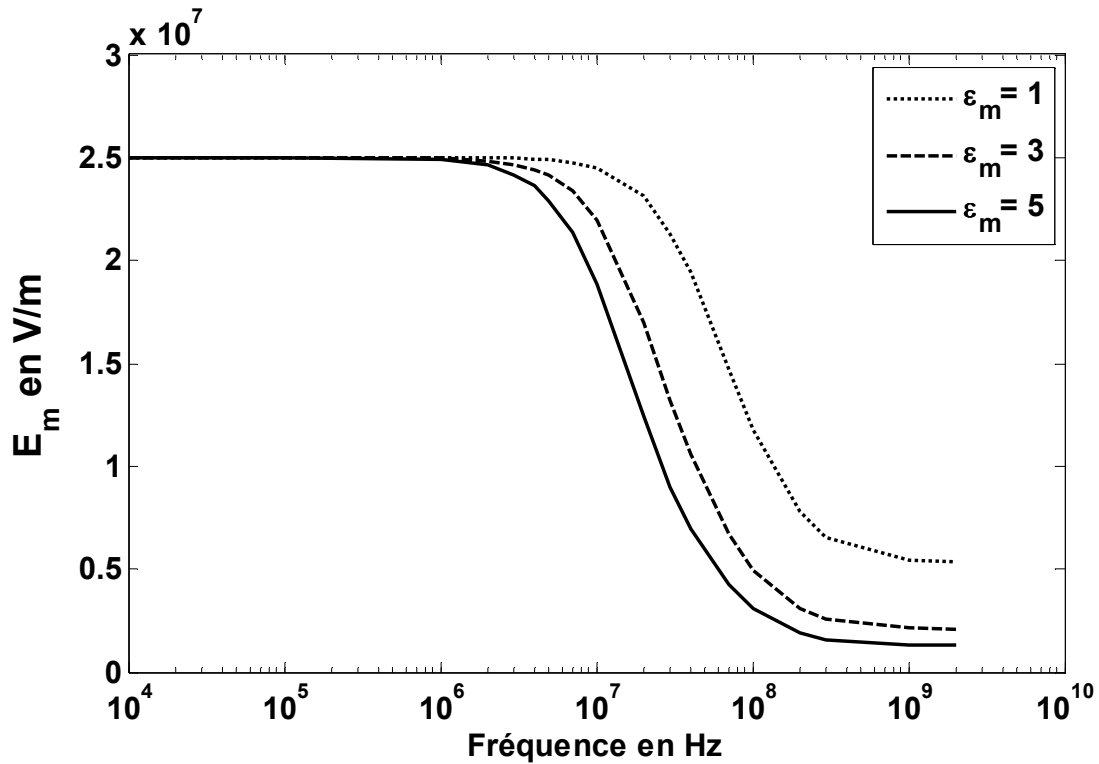


Figure III-16 : Evolution fréquentielle de E_m pour différentes valeurs de permittivité de la membrane plasmique.

ϵ_m	E_m en MV/m		
	$f = 10$ MHz	$f = 40$ MHz	$f = 1$ GHz
1	24.5	19.4	54.6
3	22.0	10.6	21.2
5	18.9	7.0	13.2

Tableau III-2 : Valeurs de champ E_m à 10 MHz, 40 MHz et 1 GHz pour trois valeurs de ϵ_m .

La Figure III-17 montre le comportement fréquentiel du PTM en fonction des valeurs de permittivité de la membrane. Nous observons les mêmes effets sur l'évolution du PTM que

sur le champ E_m (les deux quantités étant reliées par définition). Le Tableau III-2 présente les valeurs de PTM obtenues pour les trois valeurs de permittivité à 10 MHz, 40 MHz et 1 GHz.

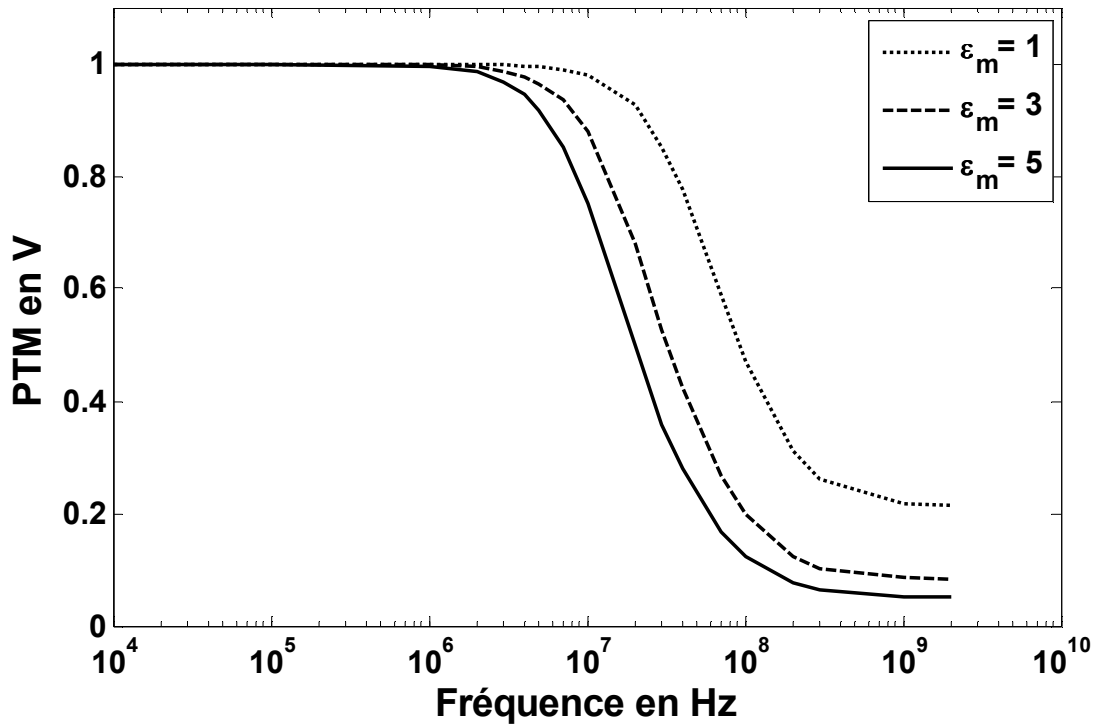


Figure III-17 : Evolution fréquentielle du PTM pour différentes valeurs de permittivité de la membrane plasmique.

ϵ_m	PTM mV		
	f = 10 MHz	f = 40 MHz	f = 1 GHz
1	990	777	218
3	935	425	85
5	853	279	53

Tableau III-3 : Valeurs de PTM à 10 MHz, 40 MHz et 1 GHz pour trois valeurs de ϵ_m .

De manière générale, nous remarquons une différence entre les valeurs de champs et PTM obtenues pour des permittivités égales à 1 et 3 plus importante que pour 3 et 5 indiquant une plus forte influence des faibles valeurs de permittivité de la membrane. En effet l'influence de la membrane sur le milieu cellulaire est d'autant plus importante que sa permittivité est différente du milieu cellulaire.

Nous avons montré dans cette étude l'influence de la permittivité du milieu cellulaire et de la membrane plasmique sur les valeurs des champs et PTM. La variation de la permittivité cellulaire modifie le comportement HF de la cellule (fréquences supérieures à quelques dizaines de MHz), alors que la variation de la permittivité membranaire induit des variations de champ et PTM dans la partie du domaine fréquentiel d'étude (1 MHz-1 GHz).

III.2.5 Conclusion

Au cours de cette étude sur l'influence de paramètres physiques, nous avons montré l'importance de la prise en compte de la conductivité du milieu cellulaire, lors du calcul des champs E_{ext} , E_m et le PTM. Nous avons ainsi établi le comportement fréquentiel du milieu biologique qui se traduit par :

- un comportement conducteur aux BF
- un comportement diélectrique aux HF
- une bande de fréquence de transition entre les deux comportements.

La variation de la conductivité du milieu cellulaire a montré une modification des valeurs de champs et de PTM principalement dans la bande de fréquence de transition entre le comportement conducteur (BF) et le comportement purement diélectrique (HF).

L'augmentation de la permittivité de la membrane cellulaire induit une variation des grandeurs caractéristiques sur l'ensemble de domaine fréquentiel étudié à l'exception des BF (<1 MHz).

A présent nous allons analyser le rôle que joue la géométrie de la cellule sur les valeurs de champ et le PTM.

III.3 Paramètres géométriques

Cette partie a pour but d'évaluer l'influence de paramètres tels que les dimensions de la cellule sur les valeurs de champ et de PTM. Nous présenterons l'influence de l'épaisseur de la membrane et du diamètre de la cellule.

III.3.1 Influence de l'épaisseur de la membrane

Pour cette étude, nous avons considéré quatre épaisseurs différentes de la membrane cellulaire à savoir : 10 nm, 20 nm, 30 nm et 40 nm.

La Figure III-18 montre l'influence de l'épaisseur de la membrane sur la valeur du champ E_{ext} . La variation fréquentielle de E_{ext} pour chacune de ces épaisseurs possède la même évolution : transition de faibles valeurs de champ en BF vers de valeurs constantes proches du champ global (83 kV/m) en HF. Nous remarquons que les valeurs de champ induites dans le milieu cellulaire sont d'autant plus importantes que la membrane est fine. Ceci peut s'expliquer en termes de milieu homogène équivalent. En effet, plus l'épaisseur de la membrane est fine, plus le milieu cellulaire se rapproche d'un milieu homogène, et plus le champ E_{ext} tend vers les 83 kV/m.

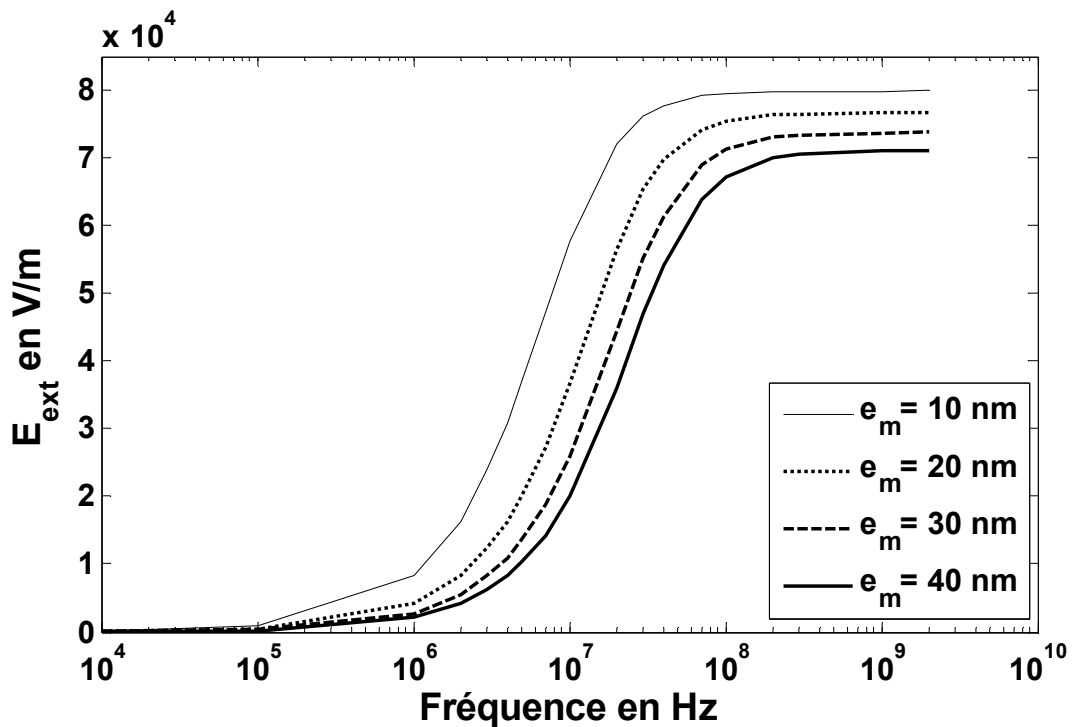


Figure III-18 : Evolution fréquentielle de E_{ext} pour différentes épaisseurs de la membrane plasmique.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure III-19, le champ E_m , pour chacune des épaisseurs, est constant en basse fréquence (< 10 MHz). Ce dernier est inversement proportionnel à l'épaisseur. En effet, plus la membrane est fine, plus le champ E_m est fort (25 MV/m et 100 MV/m lorsque l'épaisseur est de 40 nm et 10 nm, respectivement). Lorsque la fréquence augmente, le champ E_m diminue atteignant des valeurs autour de 4 MV/m au-delà de 100 MHz quelque soit l'épaisseur. En HF, la valeur de l'épaisseur n'a plus une influence significative sur les valeurs de E_m .

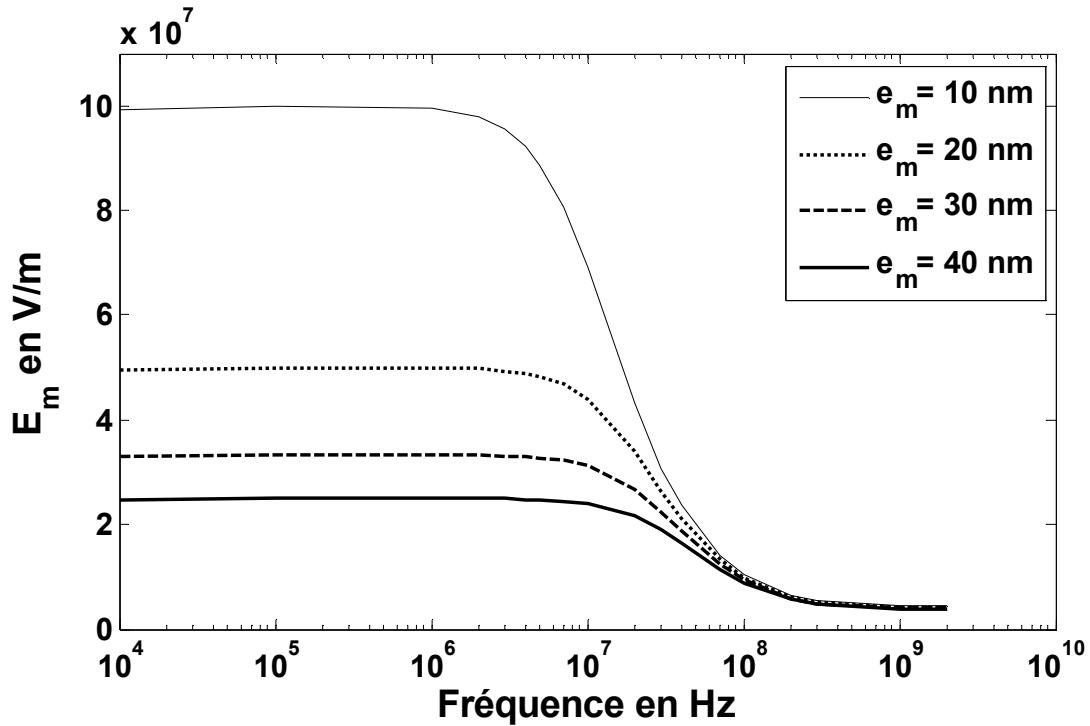


Figure III-19 : Evolution fréquentielle de E_m pour différentes épaisseurs de la membrane plasmique.

La Figure III-20 présente quant à elle l'évolution fréquentielle du PTM. En BF, l'ensemble des épaisseurs induit un PTM de 1 V. Entre 1 MHz et 1 GHz, les valeurs prises par le PTM diminuent avec la fréquence. A partir de 1 GHz, le PTM atteint des valeurs constantes (43 mV et 153 mV pour 10 nm et 40 nm, respectivement).

De manière générale, nous remarquons sur l'évolution des champs et du PTM que plus la membrane est fine, plus la transition entre les comportements BF/HF se décale vers les BF. Par exemple, pour le champ E_m cette transition commence à 2 MHz et à 20 MHz pour 10 nm et 40 nm, respectivement.

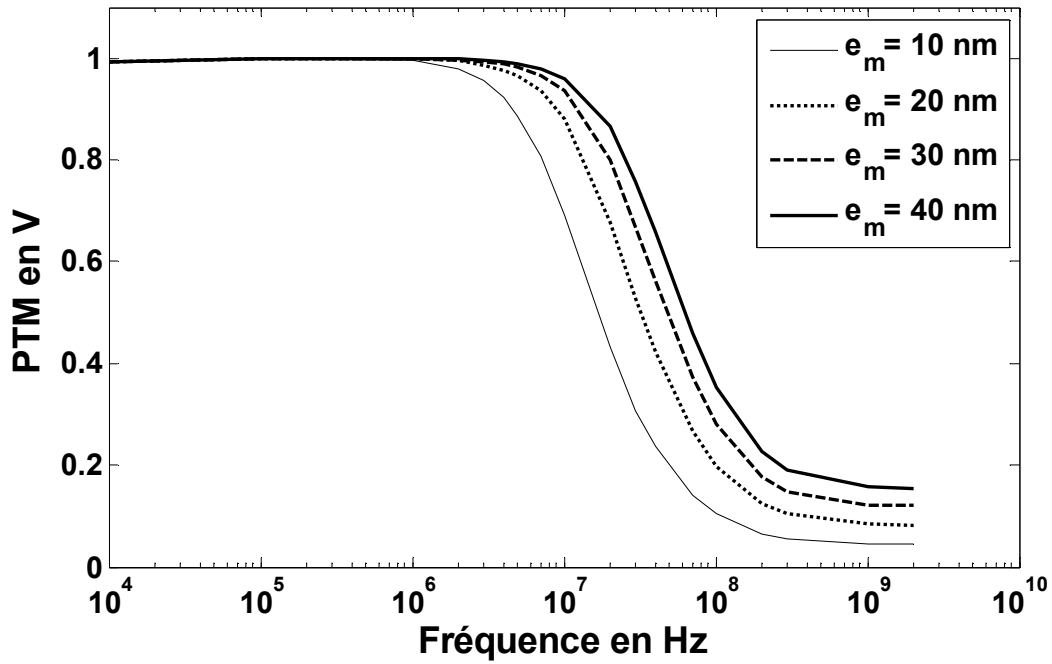


Figure III-20 : Evolution fréquentielle du PTM pour différentes épaisseurs de la membrane plasmique.

III.3.2 Influence du diamètre de la cellule

La Figure III-21 compare les PTM de notre modèle de cellule caractérisé par un diamètre de 5 μm , 10 μm et 20 μm . L'évolution fréquentielle du PTM pour ces configuration est strictement identique et il en est de même pour le champ E_{ext} et E_m (les résultats ne sont pas montrés ici).

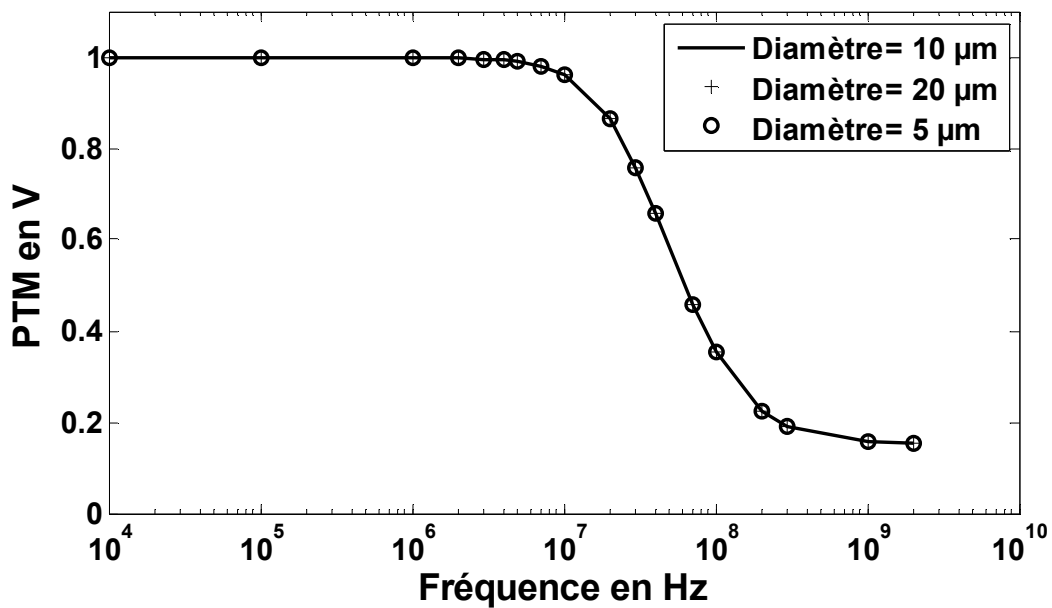


Figure III-21 : Evolution fréquentielle du PTM pour une cellule de diamètre 5 μm , 10 μm et 20 μm .

III.3.3 Conclusion

Nous avons montré dans cette étude que l'influence de l'épaisseur de la membrane sur les grandeurs telles que E_{ext} , E_m et le PTM, dépend de la bande de fréquence d'étude. Nous avons constaté notamment que cette variation affecte d'avantage E_{ext} et le PTM pour des hautes fréquences alors que la modification de l'épaisseur de la membrane induit une modification de E_m principalement en BF. Nous avons ensuite observé que le diamètre de la cellule n'influence donc pas les grandeurs caractéristiques tel que définies dans ce modèle, ceci étant liée à la modélisation 1D.

III.4 Définition d'une membrane équivalente

Dans cette partie nous définissons des membranes équivalentes à notre membrane de référence, caractérisée par une épaisseur e_m de 40 nm et une permittivité 1.5. Comme nous avons pu le voir dans les études précédentes de ce sous-chapitre, l'augmentation de l'épaisseur de la membrane entraîne une augmentation du PTM et à l'opposé lorsque la permittivité de la membrane augmente le PTM diminue. Ce sont sur ces principes que nous avons défini deux membranes équivalentes à notre modèle de base plus épaisses l'une de 80 nm et l'autre de 160 nm possédant respectivement une permittivité de 3.2 et 6.4.

La Figure III-22, la Figure III-23 et la Figure III-24 comparent les valeurs des champs E_{ext} , E_m et de PTM pour trois épaisseurs de membranes ayant des caractéristiques physiques différentes. Le champ E_m obtenu dans la membrane est différent d'une membrane à l'autre. Comme nous avons pu le remarquer dans l'étude sur l'épaisseur de la membrane, E_m est inversement proportionnel à l'épaisseur de la membrane, c'est ce qui explique la grande variation de E_m d'un modèle sur l'autre, en basse fréquence. La modification de la permittivité de la membrane, en plus de l'épaisseur, modifie quant à elle les valeurs de E_m en HF. Ainsi E_m diminue lorsque la permittivité augmente. Bien que ces modèles de membrane équivalente, définis par un couple épaisseur/permittivité, ne possèdent pas les mêmes valeurs de E_m , ils permettent cependant d'obtenir, des valeurs très proches de champ E_{ext} et de PTM. Les modèles ainsi définis permettent l'obtention des mêmes valeurs de PTM qu'une membrane de 40 nm d'épaisseur et de ϵ_m de 1.5.

Les rapports entre les champs électriques dans la membrane suivent les rapports entre les épaisseurs avec les valeurs de permittivités considérées dans ces cas. Il est alors possible d'appliquer un facteur d'échelle pour obtenir une valeur de champ E_m comparable. Ce comportement peut être intéressant car le choix d'une membrane plus épaisse permet de mailler le domaine avec des mailles plus grandes et donc diminuer les temps de calcul.

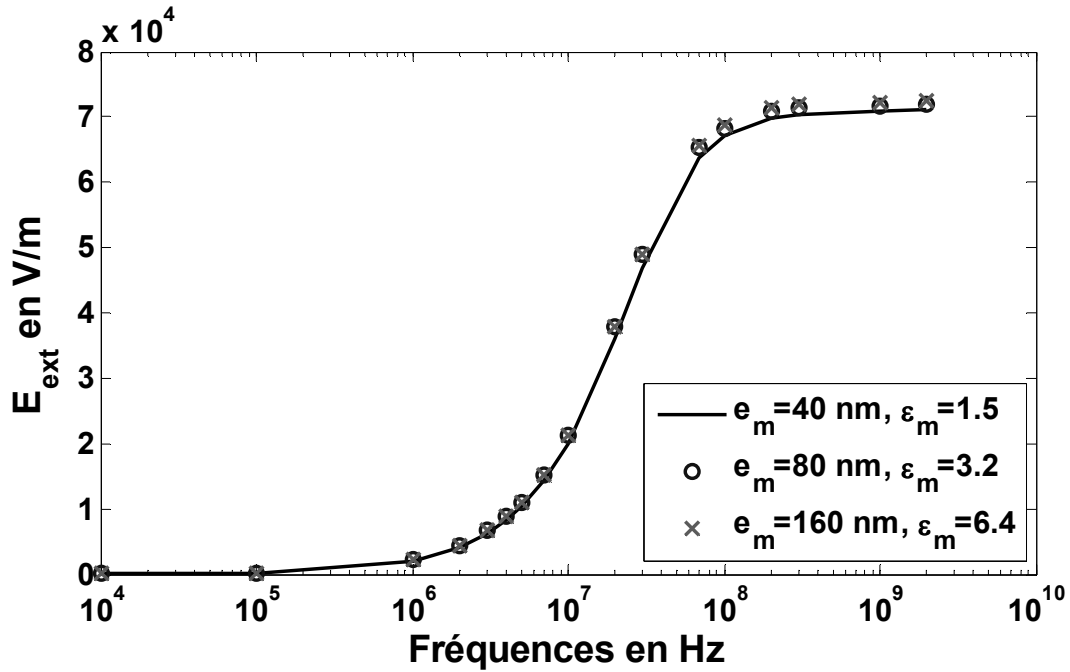


Figure III-22 : Comparaison des valeurs de champ E_{ext} en fonction de la fréquence pour trois épaisseurs de membranes ayant des caractéristiques physiques différentes.

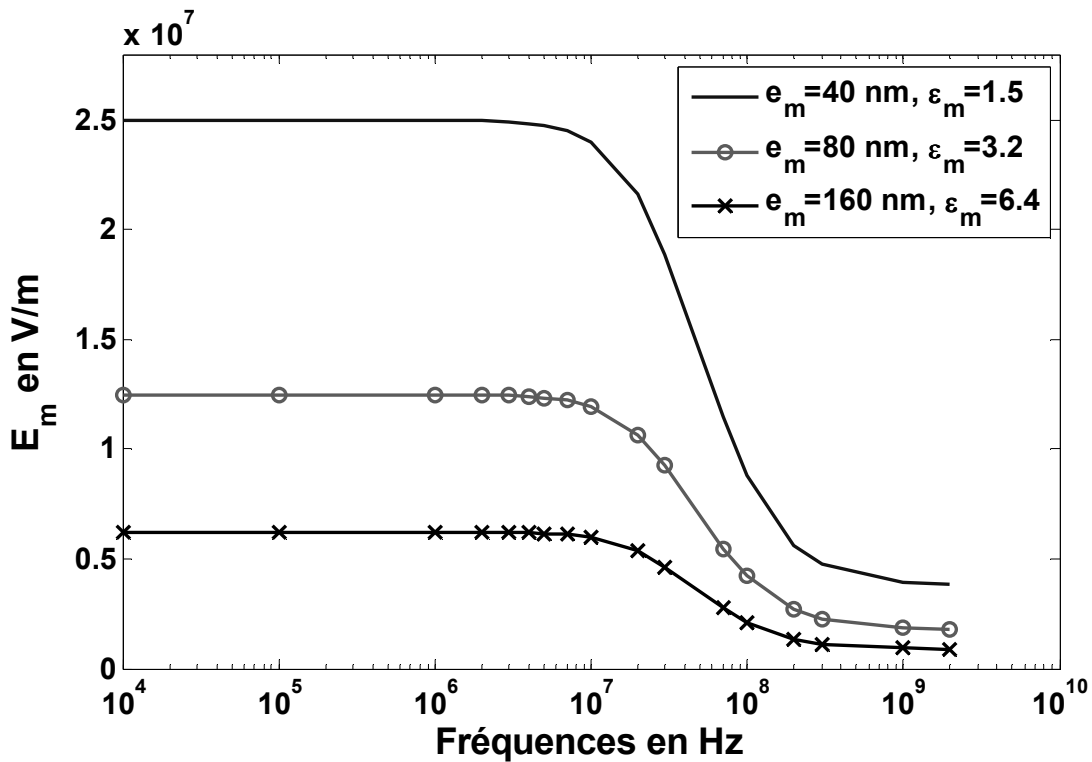


Figure III-23 : Comparaison des valeurs de champs E_m en fonction de la fréquence pour trois épaisseurs de membranes ayant des caractéristiques physiques différentes.

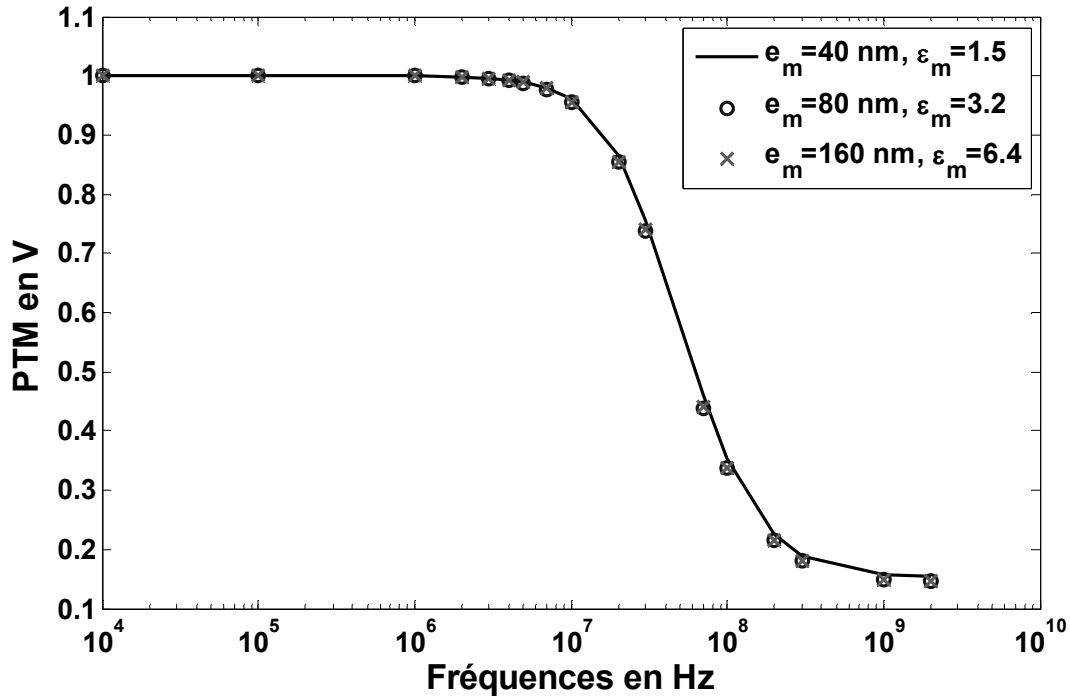


Figure III-24 : Comparaison des valeurs de PTM en fonction de la fréquence pour trois épaisseurs de membranes ayant des caractéristiques physiques différentes.

III.5 Paramètres numériques

Dans cette partie, nous allons étudier l'influence des paramètres numériques tels que la taille du maillage et le nombre d'itérations sur la réponse de notre modèle en termes des champs et de PTM.

III.5.1 Influence de la taille de la maille

Pour cette étude, nous avons considéré quatre pas spatiaux différents pour le maillage qui sont : $\Delta x = 2$ nm, $\Delta x = 5$ nm, $\Delta x = 10$ nm et $\Delta x = 20$ nm. L'épaisseur de la membrane est égale à 40 nm.

L'évolution fréquentielle des valeurs de PTM en fonction de la taille de la maille sont montrés sur la Figure III-25. Nous remarquons que les valeurs de PTM varient très faiblement avec la diminution de la taille de la maille spatiale. Par cette courte étude nous avons également déterminé le nombre minimal de maille que doit comporter la membrane afin d'obtenir des valeurs correctes de PTM et de champs dans la membrane. Par la suite la membrane ne sera maillée qu'avec deux mailles. Il nous est donc possible de choisir la taille de maille spatiale la plus grande qui est 20 nm pour discrétiser notre modèle tout en obtenant des valeurs fiables et en diminuant le temps de calcul. En effet, plus la taille de la maille est

faible, plus le nombre d'itérations nécessaires pour la convergence du modèle numérique est grand. Par exemple, 20 000 itérations sont nécessaires pour une discrétisation à 2 nm (membrane maillée avec 20 mailles). Ce nombre diminue à 1000 itérations pour une discrétisation à 20 nm (membrane maillée avec 2 mailles). Les temps de calculs sont de 19 s et 55 min pour 1000 et 20 000 itérations, respectivement.

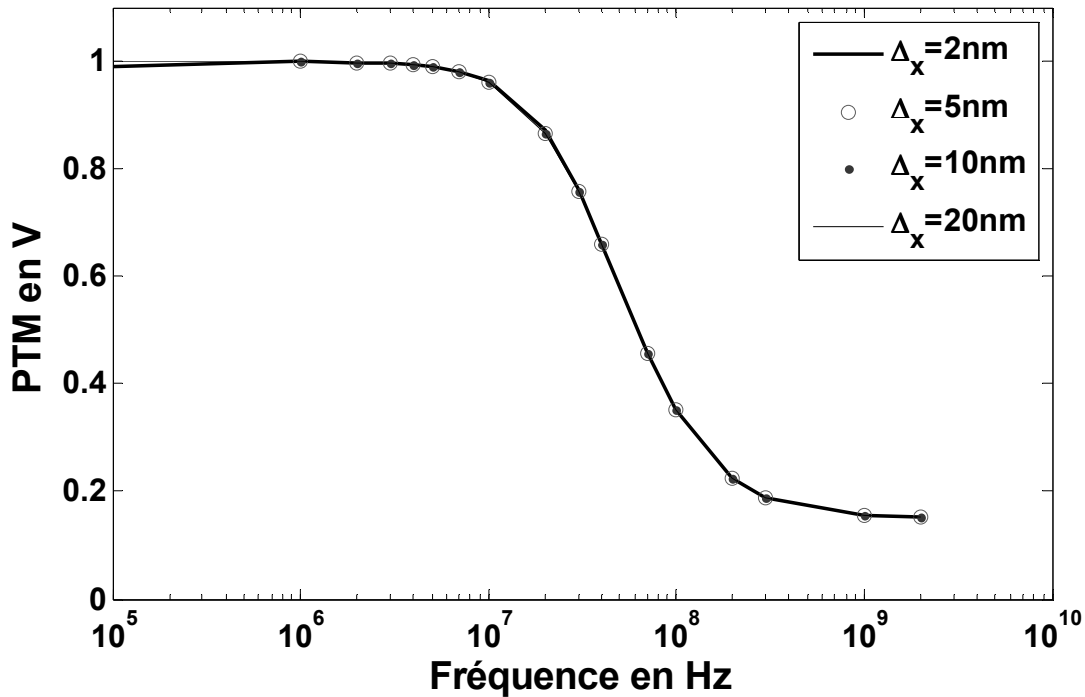


Figure III-25: Influence de la taille de la maille sur le PTM pour $\Delta x=2, 5, 10, 20$ nm.

III.5.2 Influence du nombre d'itérations

La convergence du modèle numérique en fonction du nombre d'itérations est étudiée dans cette partie. La Figure III-26 présente l'évolution fréquentielle du PTM pour notre modèle, obtenu pour un nombre d'itérations (nb_{it}) égale à 1000, 2000, 5000, 10 000 et 20 000. Le pas de discrétisation spatiale est de 10 nm (membrane maillée avec 4 mailles). Nous considérons que le modèle converge lorsque les valeurs du PTM sont invariantes avec le nombre d'itérations. Nous remarquons que pour un nombre d'itérations trop faible le modèle ne converge pas en particulier sur la partie basse du spectre fréquentiel. Le PTM calculé avec 5000 itérations est similaire aux valeurs de PTM calculées avec 20 000 itérations. Ainsi, en fonction du pas de discrétisation, un nombre d'itérations minimal doit être respecté afin d'obtenir de valeurs correctes. De manière générale, si le temps de calcul le permet il vaut mieux préférer un nombre d'itérations grand.

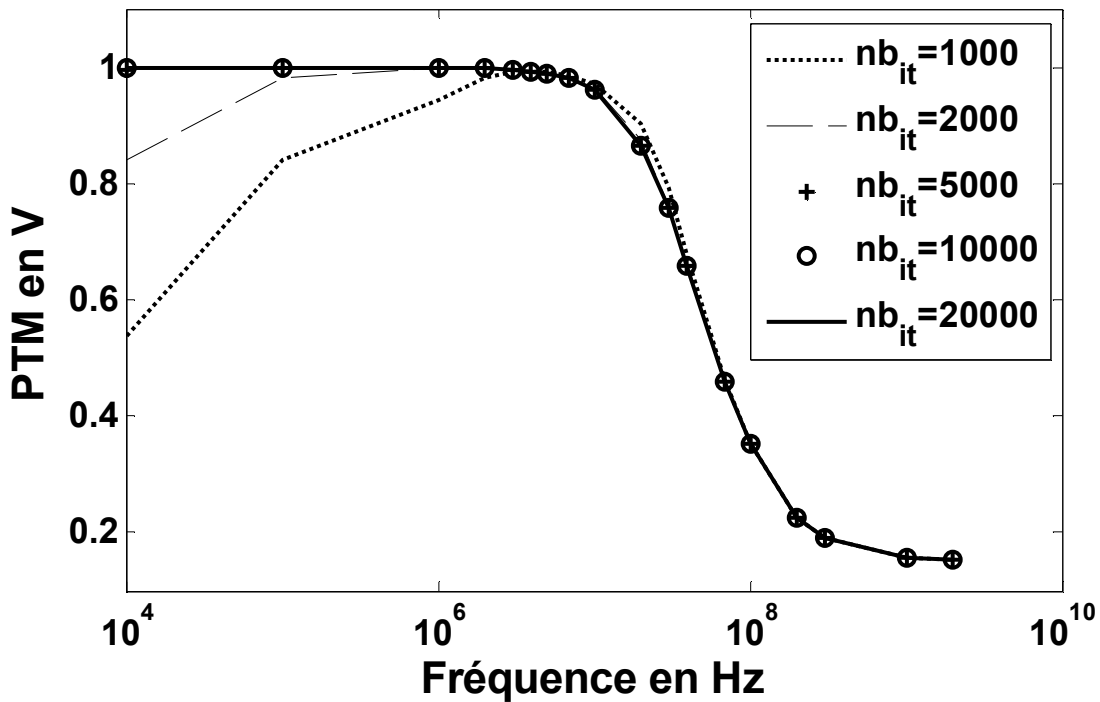


Figure III-26 : Evolution fréquentielle du PTM pour différents nombres d'itérations.

III.6 Conclusion

Dans ce sous-chapitre, nous avons étudié l'influence de différents paramètres (physiques, géométrique et numérique) sur les grandeurs caractéristiques telles que les champs E_{ext} , E_m et le PTM de notre modèle.

Nous avons évalué la contribution de la permittivité et la conductivité sur la réponse de notre modèle de cellule. Il en est ressorti que le comportement fréquentiel du milieu cellulaire peut observer deux comportements principaux : un comportement conducteur en BF et un comportement diélectrique en HF. Par conséquent le spectre à son importance sur la réponse du modèle.

Nous avons ensuite analysé l'influence des valeurs prises par la permittivité et la conductivité du milieu cellulaire ainsi que celle de la membrane sur les valeurs de champ et de PTM. Pour le milieu cellulaire, nous avons montré que la variation de la permittivité modifie principalement le comportement HF de notre modèle ; la variation de la conductivité modifie le comportement du modèle principalement la transition fréquentielle entre le comportement conducteur et diélectrique.

La modification de la permittivité de la membrane a montré que les champs E_{ext} , E_m et le PTM sont modifiés au dessus de 1 MHz et que cette modification est d'autant plus importante que la valeur de permittivité est différente du milieu cellulaire. Nous avons

également mis en évidence le rôle important qu'un paramètre géométrique, telle que l'épaisseur de la membrane plasmique, peut avoir sur les réponses du modèle. Ainsi, nous avons introduit, l'intérêt du couple épaisseur/permittivité de la membrane dans la définition d'une membrane équivalente plus épaisse. Le facteur d'échelle qui existe entre l'épaisseur de la membrane et le rayon de la cellule pourra ainsi être diminué.

Des paramètres numériques ont également été étudiés, soulignant l'influence du choix du pas de discrétisation spatial et du nombre d'itérations nécessaire pour la convergence des valeurs de champ et potentiel calculées. Le choix d'un pas de discrétisation le plus grand possible, permet de diminuer le nombre d'itérations et ainsi le temps de calcul. Dans notre cas le pas de discrétisation est fixé à 20 nm et le nombre d'itération nécessaire à 1000.

En s'appuyant sur les résultats de ce sous-chapitre, la partie qui suit a pour but d'établir le lien entre notre modèle à l'échelle de la cellule (distance inter-électrodes de quelques micromètres) et un modèle plus réaliste proche d'une configuration de type microdispositif (distances inter-électrodes typiques autour de la centaine de micromètres).

IV Passage de l'échelle cellulaire à l'échelle microdispositif

Les principaux applicateurs d'ores et déjà employés pour l'étude des effets des impulsions ns sont caractérisés par des distances inter-électrodes de quelques mm à une centaine de μm . Dans le but d'approcher au plus près de la réponse des cellules (PTM et champs) deux éléments sont à déterminer : le champ auquel est réellement exposé la cellule et l'influence que sa réponse peut avoir sur l'environnement qui l'entoure.

Le champ dit global est défini par la différence de potentiel entre les électrodes et la distance qui les sépare. Dans ce sous-chapitre, nous allons chercher à effectuer le lien entre ce champ global et le champ au voisinage des cellules présentes dans l'applicateur.

Pour cela, nous allons dans un premier temps comparer les réponses d'une cellule placée dans deux configurations : la première est définie par une distance inter-électrode d'une centaine de μm et la seconde d'une vingtaine de μm . Nous allons ensuite définir deux modèles se limitant à l'environnement proche de la cellule permettant d'approcher le comportement de notre modèle de cellule placé dans un applicateur.

IV.1 Modèle avec un champ global appliqué constant

constant

Nous souhaitons obtenir la réponse de la cellule dans une configuration proche d'une exposition avec un microdispositif tout en définissant un modèle qui permet de réduire le domaine de calcul à l'environnement proche de la cellule.

Pour cela nous considérons notre modèle simple de cellule composée uniquement d'une membrane, caractérisée par une épaisseur de 40 nm et de permittivité $\epsilon_m=1.5$. Le milieu cellulaire et le milieu intracellulaire sont définis comme identiques et sont caractérisés par une conductivité égale à 1 S/m et une permittivité diélectrique dont le comportement fréquentiel est approché par le modèle de Debye.

Nous allons comparer la réponse du modèle de cellule défini précédemment placée entre deux électrodes à deux distances D_{elec} différentes comme l'illustre la Figure III-27. Les électrodes sont séparées par une distance D_{elec} égale à 96 μm et à 24 μm et nous imposons une différence de potentiel de 8 V(+4, -4) et 2 V(+1, -1), respectivement. Nous avons fait le choix de conserver un rapport de 4 pour la distance inter-électrode D_{elec} et pour la différence de potentiel entre les deux configurations. Les champs globaux ainsi définis pour les deux modèles sont égaux à 83 kV/m. Tous les autres paramètres restent communs aux deux configurations.

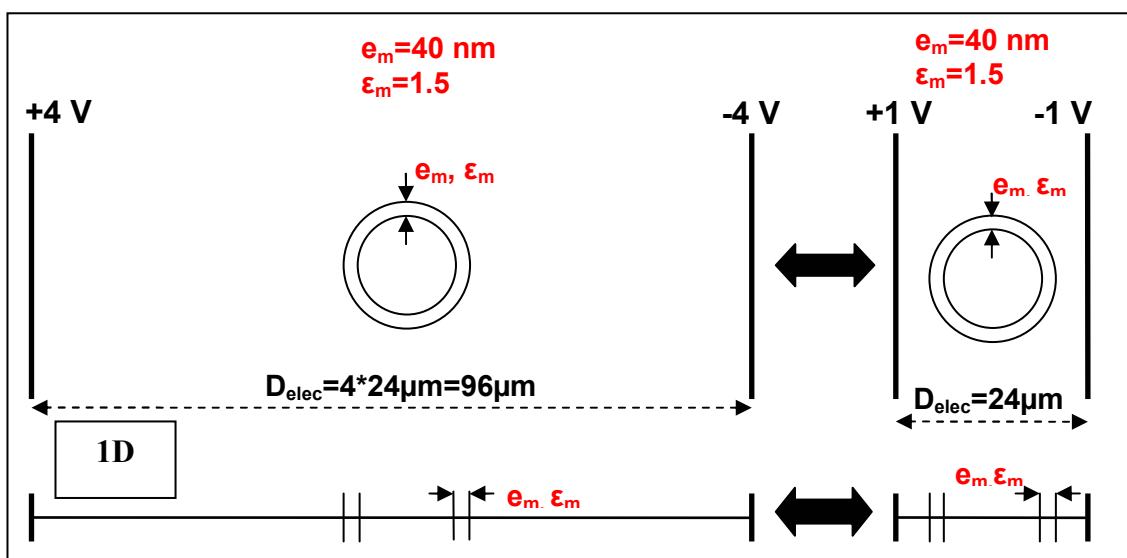


Figure III-27 : Définition d'un modèle d'exposition à l'échelle de la cellule équivalent à un modèle d'exposition à l'échelle d'un applicateur type microdispositif.

Pour l'étude de ces deux configurations, le pas de discrétisation a été fixé à 20 nm. Le domaine de calcul étant plus important pour la configuration de type microdispositif le nombre d'itérations nécessaires à la convergence du code en devient alors plus important, passant de 1000 itérations ($D_{elec}=24 \mu\text{m}$) à 40 000 ($D_{elec}=96 \mu\text{m}$).

La Figure III-28 compare les valeurs de champ E_{ext} obtenues pour les deux configurations. Nous pouvons observer trois comportements similaires du champ en fonction de la fréquence (comme nous avons pu constater pour le modèle présenté dans le sous-chapitre précédent) caractérisé par :

- des valeurs très faibles en BF.
- des valeurs fortes en HF (> à 100 MHz).
- un comportement transitoire correspondant au passage du comportement conducteur au comportement diélectrique du milieu cellulaire.

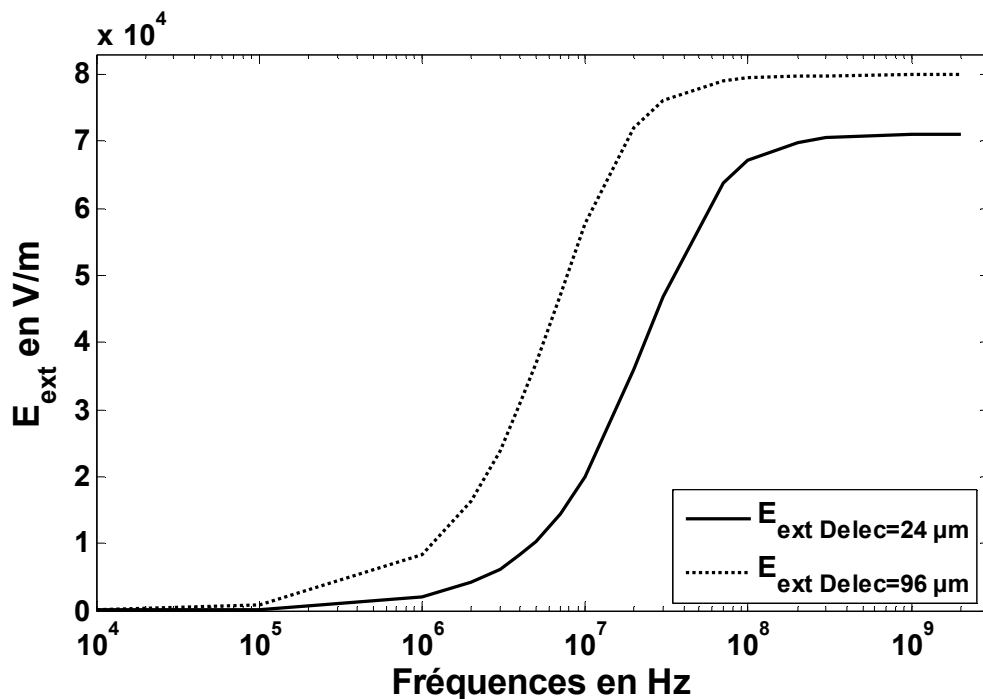


Figure III-28 : Pour un même champ global, comparaisons des valeurs de champ E_{ext} pour $D_{elec}=96 \mu\text{m}$ et $D_{elec}=24 \mu\text{m}$.

En revanche, bien que ces deux configurations exposent la même cellule à un même champ global ($\sim 83 \text{ kV/m}$), les valeurs de champ sont différentes d'une configuration à l'autre. En effet, nous pouvons observer des valeurs de E_{ext} pour le modèle niveau microdispositif (D_{elec} égale à $96 \mu\text{m}$) plus grandes que notre modèle niveau cellulaire avec (D_{elec} égale à $24 \mu\text{m}$). En HF, E_{ext} pour le modèle niveau microdispositif est égale à environ 80 kV/m

(valeur proche du champ global) alors que E_{ext} pour le modèle niveau cellulaire est égale à environ 71 kV/m. Ceci s'explique par l'influence que la cellule a sur le milieu cellulaire. En effet, plus la distance inter-électrode est grande devant les dimensions de la cellule, plus son influence sur le milieu est faible. Dans ce cas, le milieu inter-électrodes est équivalent à un milieu cellulaire homogène et le champ entre les électrodes tend vers le champ global.

La Figure III-29 et la Figure III-30 comparent respectivement les valeurs de champ dans la membrane (E_m) et le PTM, obtenues pour les deux cas et un cas obtenu en multipliant par 4 le modèle niveau cellulaire. Ce facteur 4 est lié à celui imposé à la fois à la distance inter-électrode et à la différence de potentiel entre les deux modèles.

En dessous de 1 MHz, nous pouvons observer un facteur 4 entre les valeurs obtenues avec notre modèle niveau cellulaire et celui niveau microdispositif, aussi bien en termes de E_m que de PTM. En effet, le modèle niveau microdispositif, induit des champs E_m de 100 MV/m et un PTM égal à 4 V alors que le modèle niveau cellulaire crée des champs E_m de 25 MV/m et un PTM de 1 V. Au-delà de 1 MHz, le facteur 4 n'est plus observé entre les deux modèles, les deux modèles se rapprochent jusqu'à la superposition des valeurs à partir de 100 MHz.

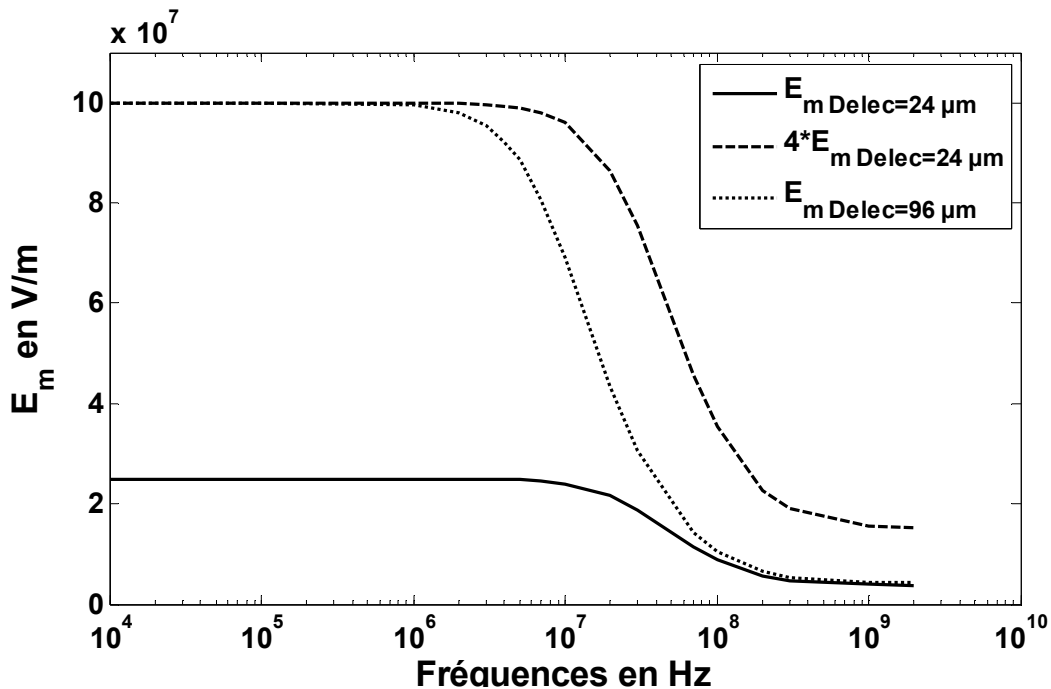


Figure III-29 : Pour un même champ global, comparaison des valeurs de champs dans la membrane pour Delec=96 μm et Delec=24 μm .

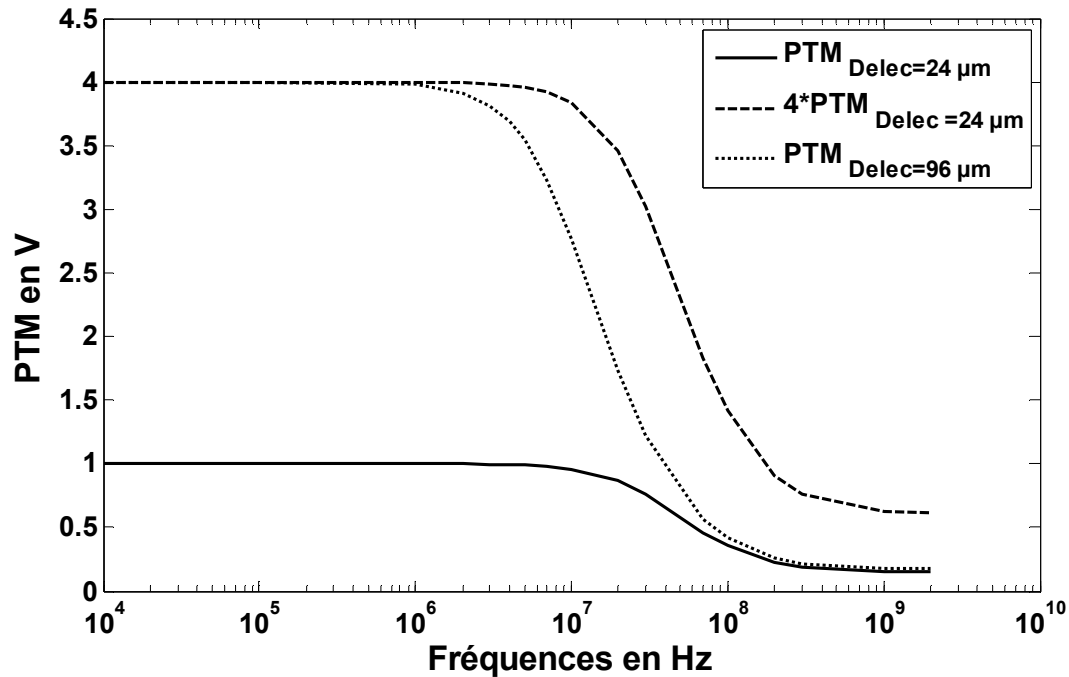


Figure III-30 : Pour un même champ global, comparaison des valeurs de PTM pour Delec=24 μm et Delec=96 μm .

Par cette étude nous avons montré que pour une cellule placée dans deux configurations différentes mais dont le champ global reste identique, la réponse de la cellule diffère d'une configuration sur l'autre en termes de champ et de PTM.

Nous soulignons ainsi l'impacte que la cellule peut avoir sur l'environnement qui l'entoure en fonction de la distance inter-électrode. En effet, nous montrons que le champ dans le milieu cellulaire diffère du champ global d'autant plus que les dimensions de la cellule ne sont pas négligeables par rapport à la distance inter-électrode.

A partir de ces constatations nous allons chercher à définir un modèle équivalent de cellule comprenant son environnement proche qui permettrait d'approcher la réponse de notre cellule dans une configuration de type microdispositif. Nous présentons ci-après deux approches. Comparé à notre modèle de référence, l'une sera basée sur une membrane avec une épaisseur deux fois plus fine et une permittivité deux fois plus grande ; l'autre sera basée sur une membrane dont la permittivité est quatre fois plus grande.

IV.2 Modèle basé sur une membrane de plus faible épaisseur et de plus forte permittivité

Nous rappelons que le modèle de la cellule placée dans une configuration de type microdispositif est caractérisé par une distance inter-électrode de 96 μm , une cellule de 20 μm

de diamètre qui possède une membrane d'épaisseur e_m égale à 40 nm et une permittivité diélectrique ϵ_m égale à 1.5. Dans cette partie nous définissons un modèle de cellule comprenant son environnement proche (distance inter-électrodes D_{elec} égale à 24 μm), caractérisé par une épaisseur de membrane de 20 nm et une permittivité de 3 (Figure III-31).

L'évolution fréquentielle des valeurs de champ E_{ext} , obtenues par les deux configurations, est illustrée sur la Figure III-32. Les valeurs de champs E_{ext} , notamment en HF, pour la configuration microdispositif sont plus importantes ($\sim 80 \text{ kV/m}$) que celles obtenues avec le modèle cellulaire basé sur une membrane plus fine/permittivité plus grande (40 kV/m).

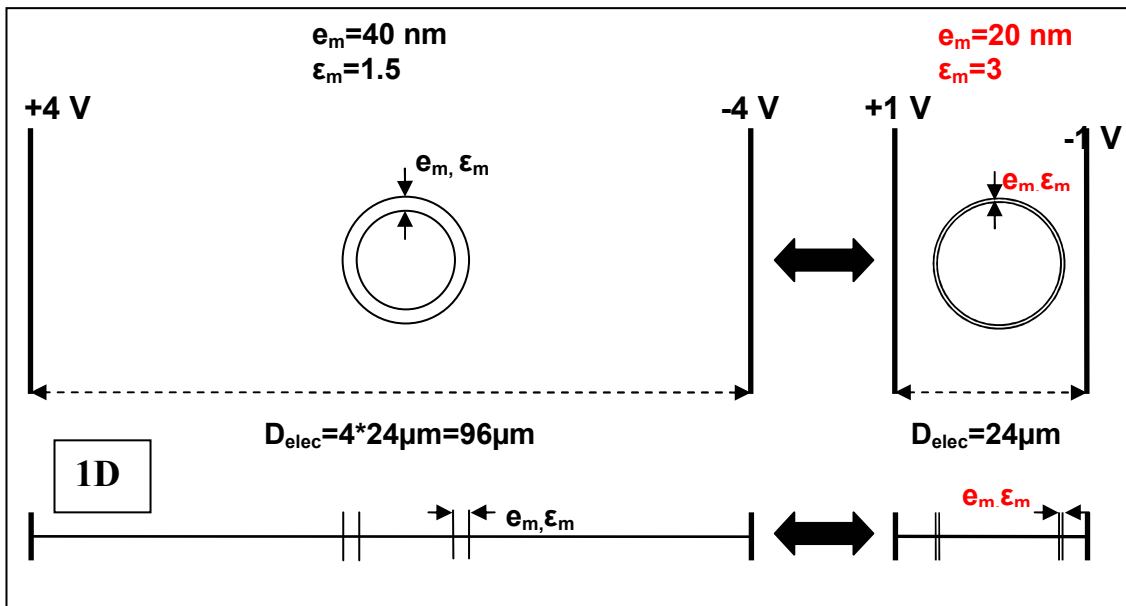


Figure III-31 : Définition d'un modèle équivalent basé sur une membrane deux fois plus fine et de permittivité deux fois plus grande.

Nous montrons cependant que ce modèle équivalent permet d'approcher les valeurs de E_m et de PTM comme l'illustrent la Figure III-33 et la Figure III-34. Nous rappelons qu'un facteur 4 existe entre les distances inter-électrode et les différences de potentiel des deux modèles étudiés. Par conséquent, un facteur 4 a été appliqué aux valeurs de E_m et de PTM obtenues avec notre modèle équivalent. Nous obtenons ainsi des résultats similaires ce qui nous permet de faire un lien intéressant pour nos études entre un modèle niveau microdispositif et un modèle niveau cellulaire.

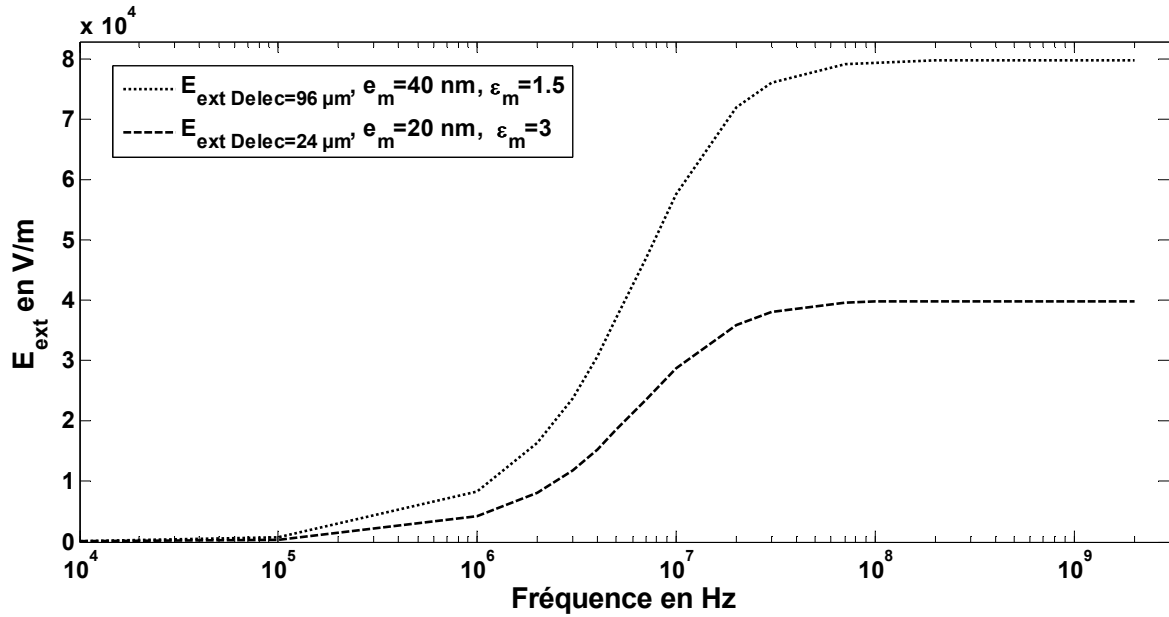


Figure III-32 : Comparaison des valeurs de champ E_{ext} obtenues dans une configuration de type microdispositif (Delec=96 μm) et notre modèle de cellule équivalent basé sur une membrane deux fois plus fine et de permittivité deux fois plus grande.

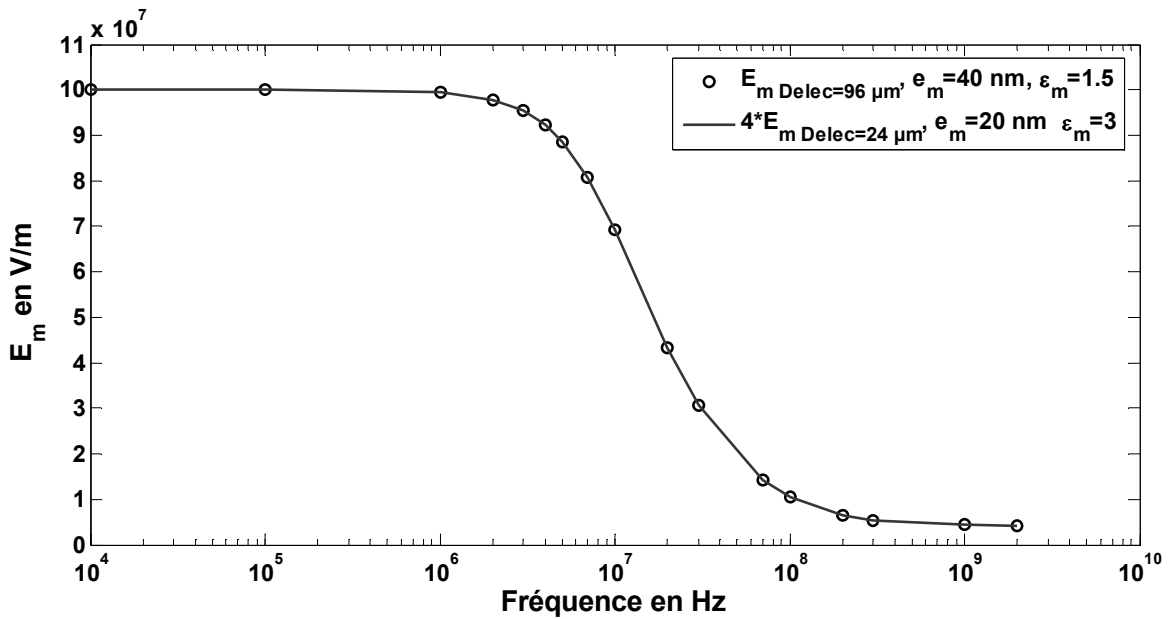


Figure III-33 : Comparaison des valeurs de champ E_m obtenues dans une configuration de type microdispositif (Delec=96 μm) et notre modèle cellulaire équivalent (Delec=24 μm) pondéré par un facteur quatre.

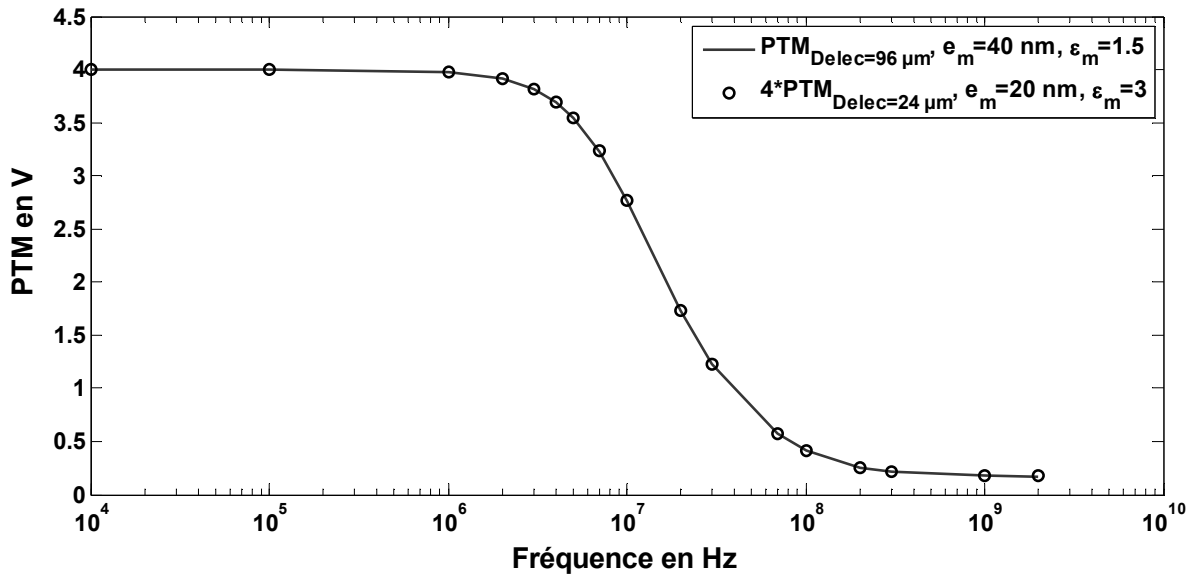


Figure III-34 : Comparaison des valeurs de PTM obtenues dans une configuration de type microdispositif (Delec=96 μm) et notre modèle cellulaire équivalent (Delec=24 μm) pondéré par un facteur quatre.

IV.3 Modèle basé sur une membrane de plus forte permittivité

En s’inspirant de l’étude précédente, nous avons cherché et étudié un second modèle équivalent basé sur une membrane de permittivité diélectrique ϵ_m égale à 6 soit quatre fois plus grande comparée aux cas de référence.

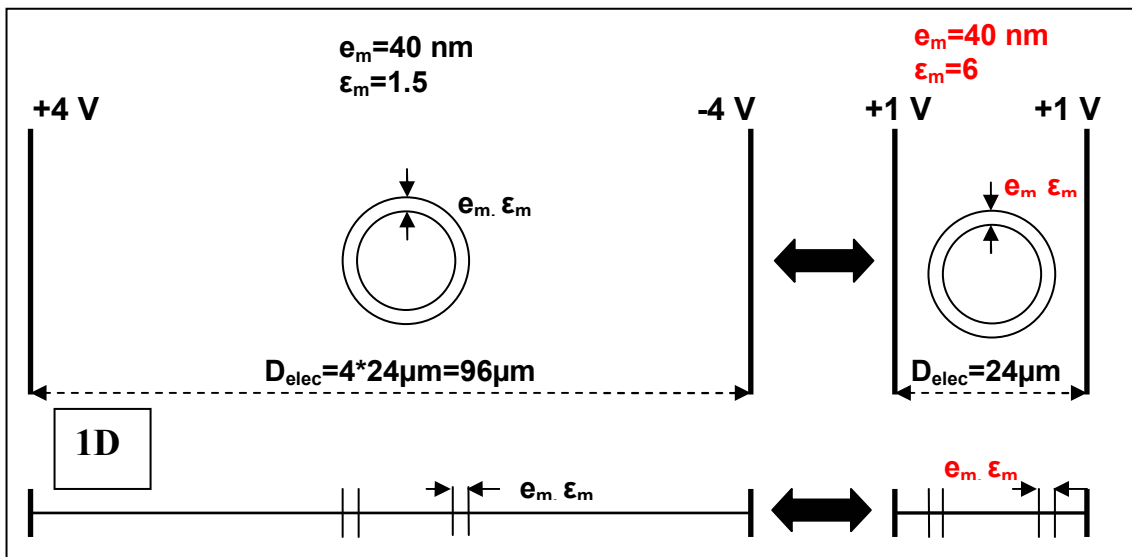


Figure III-35 : Définition d’un modèle équivalent basé sur une membrane de permittivité diélectrique quatre fois plus grande comparée aux cas de référence.

De la même façon que le modèle équivalent précédent, ce modèle basée sur une membrane de plus forte permittivité ne permet pas non plus d'obtenir le même champ E_{ext} que dans la configuration de type microdispositif (Figure III-36). En effet, ce modèle induit des champs E_{ext} très importants, d'une valeur de 320 kV/m en HF, en comparaison avec les 80 kV/m de la configuration de type microdispositif.

Ce modèle permet néanmoins d'obtenir les mêmes valeurs de E_m (Figure III-37) et de PTM (Figure III-38) en appliquant une pondération d'un facteur 4.

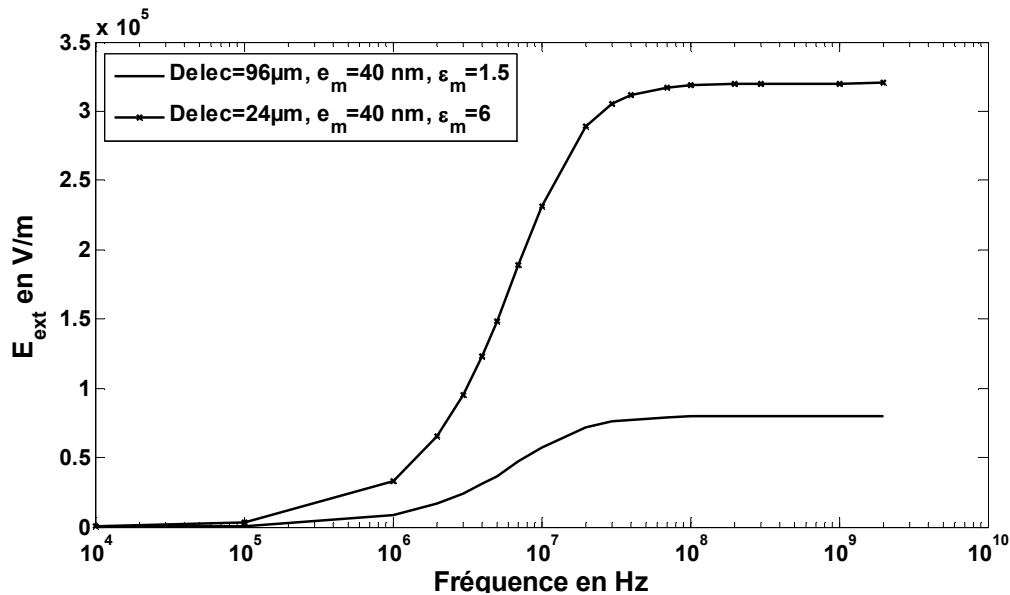


Figure III-36 : Comparaison des valeurs de champ E_{ext} obtenues dans une configuration de type microdispositif (Delec=96 μm) et un modèle cellulaire équivalent (Delec=24 μm) basé sur une membrane de permittivité diélectrique quatre fois plus grande.

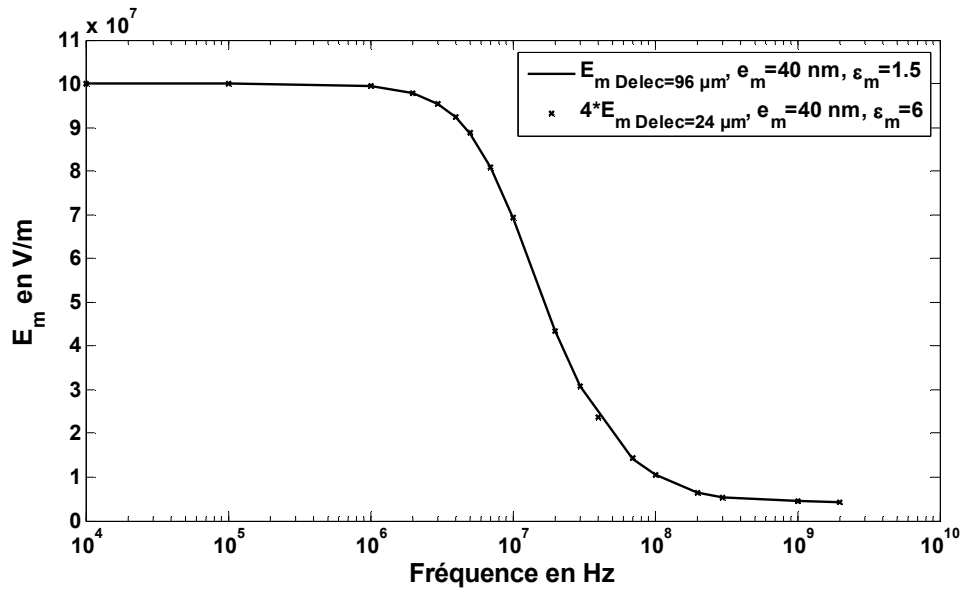


Figure III-37 : Comparaison des valeurs de champ E_m obtenues dans une configuration de type microdispositif (Delec=96 μm) et un modèle cellulaire équivalent (Delec=24 μm) basé sur une membrane de permittivité diélectrique quatre fois plus grande.

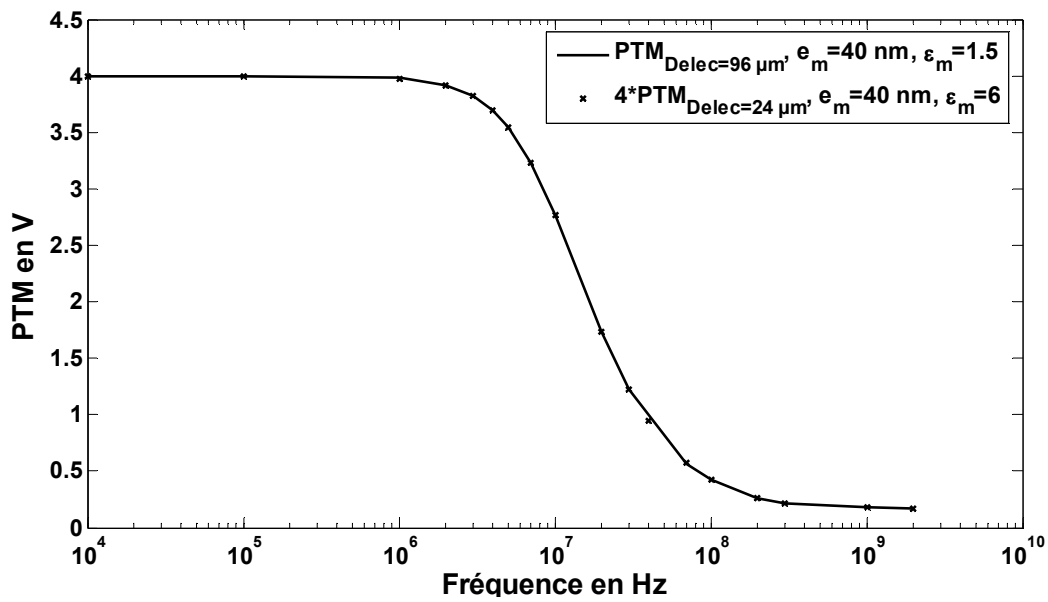


Figure III-38 : Comparaison des valeurs de PTM obtenues dans une configuration de type microdispositif (Delec=96 μm) et un modèle cellulaire équivalent (Delec=24 μm) basé sur une membrane de permittivité diélectrique quatre fois plus grande.

IV.4 Conclusion

Cette partie a montré que la distance inter-électrode modifie les valeurs de champ au voisinage de la cellule, malgré un champ global identique. Nous avons pris en compte cette influence notamment sur une configuration réduite à l'environnement proche de la cellule.

Nous avons ainsi pu déterminer deux modèles cellulaires équivalents (distance inter-électrodes de 24 μm) possédant la même réponse en termes de E_m et de PTM que la cellule placée dans un environnement type applicateur microdispositif (distance inter-électrodes de 96 μm).

V Conclusion

Dans ce chapitre nous avons dans un premier temps présenté les grandeurs significatives, telles que le PTM et le champ électrique, pour l'étude et la compréhension des effets des nsPEFs sur les milieux biologiques.

Nous avons effectué une première modélisation, de l'interaction d'une onde avec une cellule biologique par l'emploi d'un modèle 1D d'une cellule sans organelle, placée entre deux électrodes, séparées par une distance d'une vingtaine de micromètres. Nous en avons effectué l'étude paramétrique à savoir l'influence de paramètres physiques, géométriques sur les valeurs de champ et de PTM. De façon générale ces grandeurs vont dépendre de la fréquence d'étude. Trois comportements ressortent de cette étude : un comportement conducteur en BF, un comportement diélectrique en HF et une zone de transition entre les deux comportements. L'étude de paramètres numériques ont permis de mettre en évidence l'intérêt du choix du pas de discrétisation et du nombre d'itérations pour diminuer le temps de calcul et obtenir des valeurs fiables de champ et PTM.

Nous avons ensuite montré l'intérêt d'effectuer le lien entre le champ global, imposé par le couple applicateur-impulsion, et le champ local au voisinage de la cellule. Nous avons comparé la réponse d'un même modèle de cellule à un même champ global mais avec des distances inter électrodes d'une vingtaine de micromètres dans un cas et d'une centaine de micromètres dans l'autre. Les réponses de la cellule et de l'environnement se sont avérées différentes d'une configuration à l'autre. Par conséquent lors des expérimentations biologiques, bien que maîtrisant l'impulsion électrique apportée à l'applicateur, les valeurs de champ au voisinage de la cellule ne sont pas connues.

Nous avons ensuite défini des modèles, composés de la cellule et son environnement proche ($D_{elec}=24 \mu\text{m}$), basés sur des membranes équivalentes, de façon à obtenir les mêmes réponses (de champ environnant et de PTM) qu'une cellule placée dans un microdispositif.

Ce travail original nous a permis de déterminer les paramètres pertinents de la modélisation à l'échelle de la cellule avec la méthode proposée (différences finies). De plus la possibilité de relâcher les contraintes de maillage au niveau des membranes permet d'envisager la modélisation de structure plus complexe.

Ainsi dans le chapitre suivant, des modèles 2D et 3D de cellule plus complexe prenant en compte une organelle, seront présentés. Une étude temporelle permettra de mettre en évidence le comportement des champs et des valeurs de PTM en réponse à des impulsions nanosecondes.

Chapitre. IV : Application à des modèles 2D et 3D - Réponses temporelles

I Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps un modèle 2D strictement similaire au modèle 1D de type liposome du chapitre précédent. Nous en comparerons la réponse avec un modèle 2D de cellule de forme circulaire. Nous considérerons ensuite une modèle 2D de cellule plus complexe qui prend en compte une organelle. Nous en étudierons son comportement fréquentiel. Nous étudierons également l'influence de la segmentation et de la discrétisation sur les valeurs de potentiel et de champ. Afin d'étudier l'influence du phénomène d'électroporation sur les valeurs de champ et de potentiel, nous définirons un modèle de cellule présentant des trous physiques dans la membrane plasmique.

A partir des réponses fréquentielles du modèle 2D de cellule avec organelle nous déterminerons le comportement temporel des grandeurs caractéristiques du modèle pour deux impulsions de 1 MV/m, de durées 200 ns et 2 ns.

La dernière partie de ce chapitre présentera une approche 3D permettant de tester la validité de notre modèle de membrane équivalente plus épaisse.

II Modèle 2-D : Réponse fréquentielle des membranes

Dans ce sous-chapitre, nous allons dans un premier temps introduire un modèle 2D équivalent au modèle 1D étudié dans le chapitre précédent. Ensuite il sera présenté un modèle 2D de cellule circulaire uniquement composé d'une membrane plasmique. Ce modèle sera complété par la modélisation d'une organelle concentrique dans la cellule. Nous étudierons l'influence de l'organelle sur la réponse du modèle en termes de champ et de PTM. Une partie de ce sous chapitre portera sur l'influence de la conductivité du milieu cellulaire sur la réponse de notre cellule comportant une organelle. Nous aborderons en fin de ce sous chapitre l'influence de trous dans la membrane plasmique sur la réponse de notre modèle de cellule.

II.1 Plaques 2D équivalentes à un modèle 1D

Notre première approche de modèle 2D, présenté par la Figure IV-1, consiste à définir un modèle strictement similaire à notre modèle 1D jusqu'à présent considéré. Une différence de potentiel de 2 V (+/- 1 V) est imposée aux électrodes qui sont séparées par une distance

D_{elec} de $24 \mu\text{m}$. Dans ce modèle 2D, la membrane plasmique est représentée par deux plaques d'épaisseur e_m de 40 nm . Une permittivité diélectrique relative ϵ_m égale à 1.5 représentative de la permittivité de la membrane plasmique est affectée à ces plaques. Elles sont séparées d'une distance d de $20 \mu\text{m}$ représentative du diamètre de la cellule. Les milieux de part et d'autre de la membrane sont définis par les mêmes valeurs de permittivité $\epsilon(\omega)$ (modèle de Debye pour l'eau) et de conductivité σ (1 S/m).

Ce modèle 2D nous permet de comparer avec notre modèle 1D, le potentiel le long d'une ligne représentée en pointillé sur la Figure IV-1.

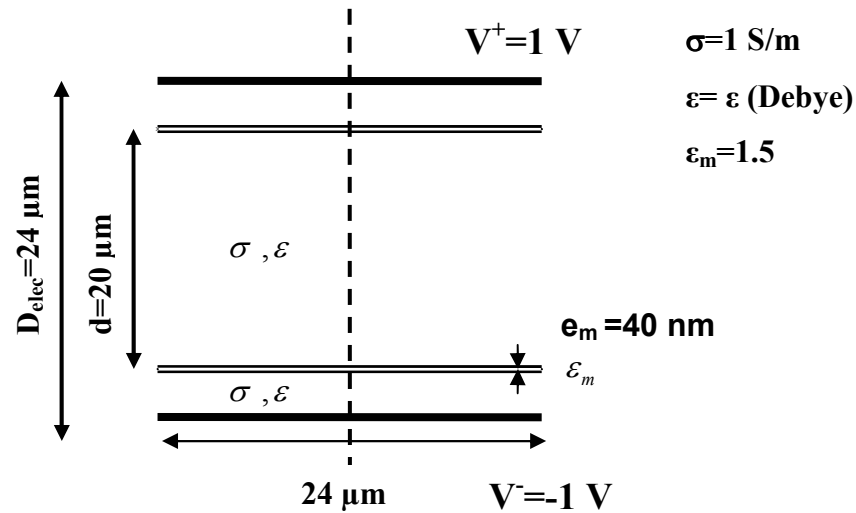


Figure IV-1 : Modèle 2D équivalent au modèle 1D d'une cellule composée uniquement d'une membrane plasmique, les membranes sont représentées par des plaques.

Il s'agit ici d'une étape intermédiaire mais dont les dimensions sont représentatives des configurations étudiées par la suite. La présence de condition de symétrie de part et d'autre de la structure fait que cette géométrie est en tout point identique à une configuration 1D, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de variation transverse du potentiel.

II.2 Cellule circulaire sans organelle

Ce second modèle 2D prend en compte la forme circulaire de la cellule (Figure IV-2). La cellule modélisée est caractérisée par un diamètre d de $20 \mu\text{m}$, l'épaisseur de la membrane e_m est maintenue à 40 nm avec une permittivité ϵ_m égale à 1.5 . De la même façon que le modèle 2D précédent, les valeurs de permittivité $\epsilon(\omega)$ (modèle de Debye pour de l'eau) et de conductivité σ (1 S/m) du milieu extra et intracellulaire sont considérées comme identiques.

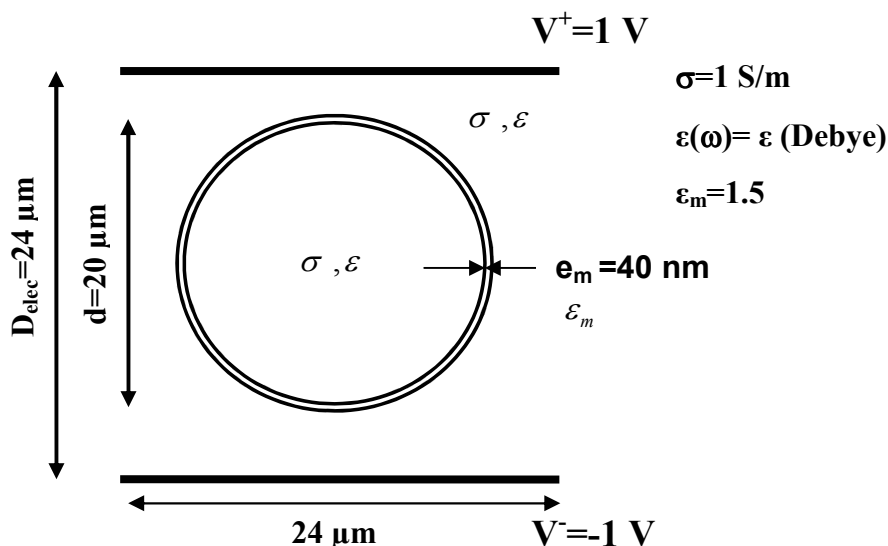


Figure IV-2 : Modèle 2D d'une cellule de type liposome placée entre deux électrodes.

Cette configuration constitue un modèle de base dans notre étude. Il va nous permettre de mettre en évidence le comportement de ce modèle de cellule en fonction de différents paramètres, (aspects numériques, paramètres du modèle).

Avant d'étudier la réponse du modèle de cellule comportant une organelle, il va être comparé la réponse de notre modèle 1D avec ces deux modèles 2D.

II.3 Comparaison de modèles 1D et 2D

La validation de notre modèle 2D de cellule de forme circulaire s'est effectuée entre autre par comparaison des modèles 1D et 2D, avec pour ce dernier les membranes plasmiques représentées par des surfaces planes. Nous pouvons voir sur la Figure IV-3 la comparaison fréquentielle du champ E_{ext} obtenu avec chacun de ces modèles. Comme attendu, nous remarquons une parfaite superposition des champs E_{ext} pour le modèle 1D et « le modèle 2D plaque ».

Le modèle 2D, prenant en compte la forme circulaire de la cellule, permet d'obtenir des valeurs de champs E_{ext} proche du modèle 1D, notamment avec de faibles valeurs de champ en BF jusqu'à tendre vers les 83 kV/m (champ global) en HF.

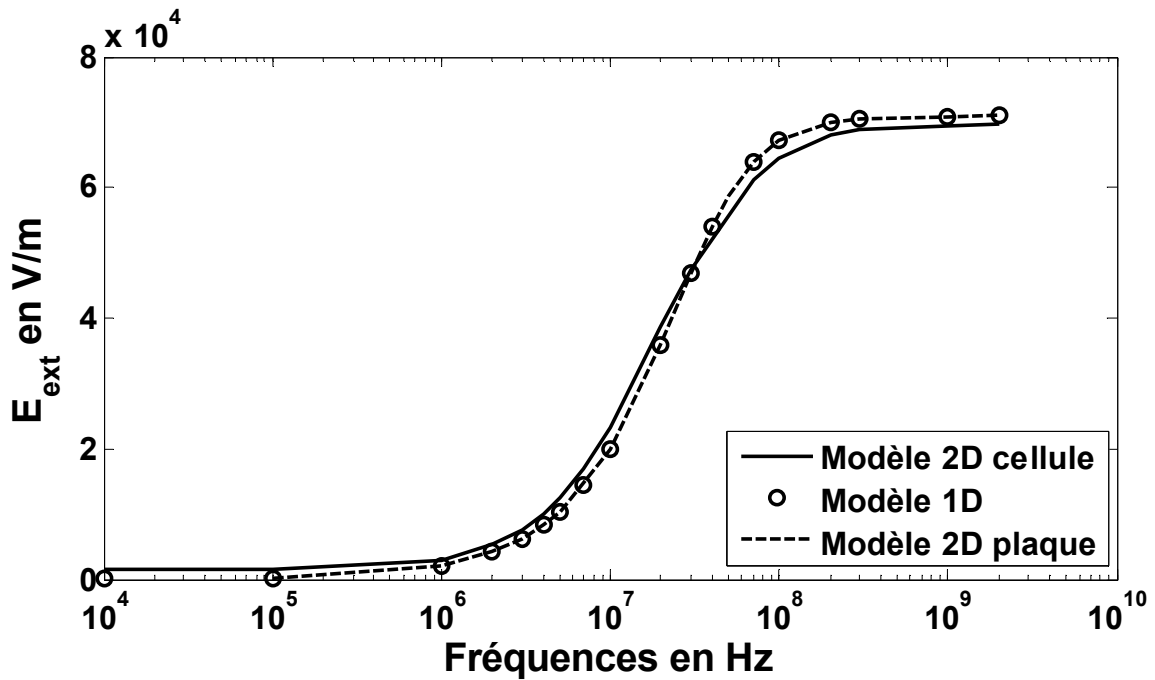


Figure IV-3 : Comparaison des valeurs de E_{ext} obtenues avec le modèle 1D, le modèle 2D plaque, mais également avec le modèle 2D de forme circulaire.

La Figure IV-4 présente la comparaison des valeurs de PTM pour les différents modèles 1D et 2D, décrits précédemment. Nous remarquons, comme pour le champ E_{ext} que les valeurs de PTM obtenues avec les modèles 1D et le modèle 2D qui modélise les membranes par des plaques se confondent. Ces valeurs restent supérieures aux valeurs de PTM calculés à partir du modèle 2D de la cellule. Nous avons évalué cette diminution du PTM du modèle 1D vers les modèles 2D circulaire, en appliquant la relation suivante :

$$\frac{PTM_{1D} - PTM_{2D}}{PTM_{1D}}$$

La différence entre les deux modèles est égale à 4% à 10 MHz, 14,7% à 30 MHz et 9.9% à 2 GHz. Cette configuration conduit à des différences relativement faibles.

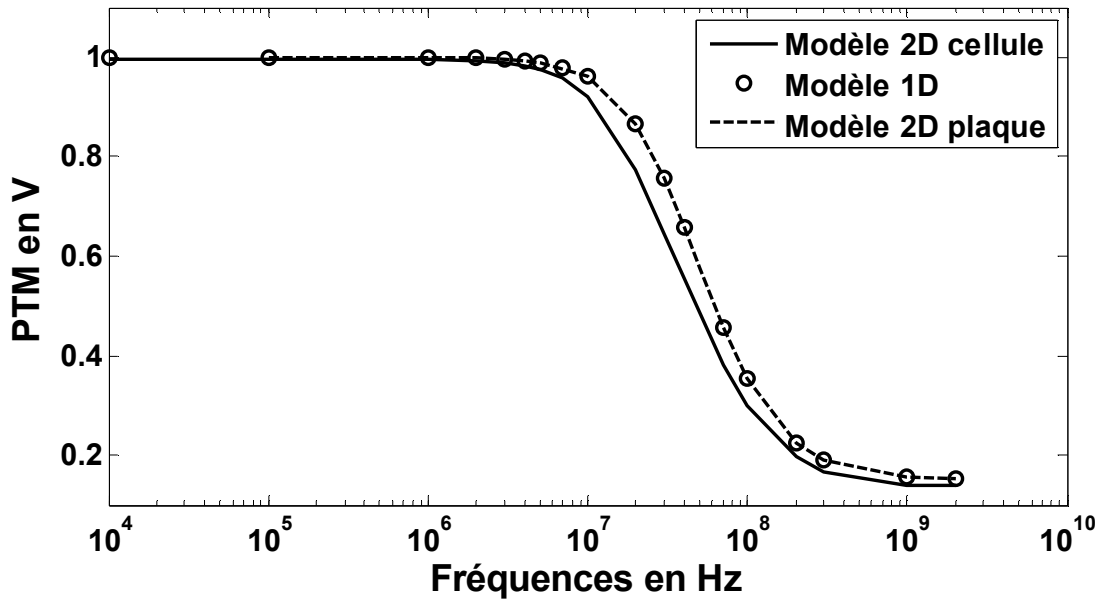


Figure IV-4 : Comparaison des valeurs de PTM obtenues avec le modèle 1D, le modèle 2D plaque, mais également avec le modèle 2D de forme circulaire.

La comparaison des valeurs de E_{ext} et des PTM pour les différents modèles présentés montre des comportements similaires sur les grandeurs observées. Le modèle circulaire diffère légèrement du modèle « plaque » de part sa géométrie. Le diamètre important de la cellule vis-à-vis de la distance inter-électrodes tend à se rapprocher de la configuration planaire. Ce modèle va être maintenant complété.

II.4 Influence de la segmentation et de la discrétisation sur le modèle 2D

L'influence de la segmentation de la membrane va être analysée dans cette partie. Deux configurations vont être comparées, l'une qui segmente de façon binaire la structure avec trois milieux différents, l'autre où des propriétés électromagnétiques moyennes sont utilisées pour traiter les interfaces entre deux milieux.

La configuration est choisie pour avoir des dimensions plus petites en termes de rayon que précédemment. Le diamètre de la structure est ici de $0.5 \mu\text{m}$ et l'épaisseur de la membrane est prise égale à 6 nm . Afin de voir l'influence de la technique proposée, deux discrétisations spatiales différentes sont étudiées. Elles sont respectivement de 2 nm et 1 nm . Dans ces conditions, l'épaisseur de la membrane représente 3 et 6 mailles élémentaires. Trois fréquences sont choisies pour comparer les deux modèles. Le potentiel appliqué est là encore de $\pm 1 \text{ V}$. On donnera les noms suivant aux deux approches : « staircase » pour la

segmentation binaire et « smooth » pour la segmentation lisse. Le volume de calcul considéré est de $1 \times 0.8 \mu\text{m}$ sans prendre en compte les symétries.

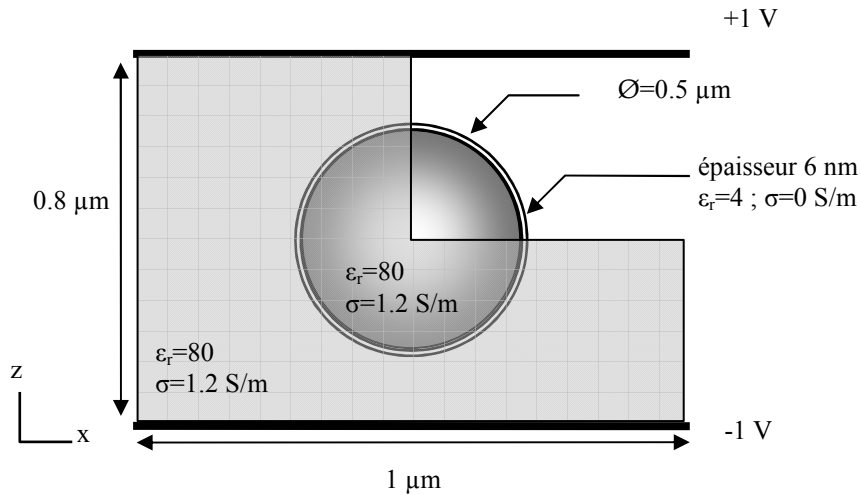


Figure IV-5 : Modèle 2D pour le traitement de la membrane avec et sans traitement spécifique du « staircase ». Un quart de structure est utilisé pour la représentation des distributions de potentiel (zone non grisée).

Différents résultats vont être représentés. Tout d'abord la distribution spatiale du potentiel en ne considérant qu'un quart de structure, la partie en haut à droite, comme illustré sur la Figure IV-5. A partir de cette distribution spatiale du potentiel, le champ électrique est calculé et un zoom est effectué au niveau de la membrane, sur environ $0.1 \times 0.1 \mu\text{m}$. L'objectif est de mettre en évidence les variations de champs électriques en fonction de la discrétisation et de la technique utilisée pour le maillage.

Sur la Figure IV-6, la Figure IV-7, et la Figure IV-8 sont représentés les potentiels et les champs électriques pour les deux configurations. Pour les trois fréquences, les échelles de couleurs correspondant aux amplitudes du champ électrique sont identiques pour comparer plus aisément les niveaux relatifs. Dans les différentes configurations, on observe une augmentation du champ électrique dans la membrane. Ce champ est d'autant plus élevé que la fréquence est basse. Les figures notées (c) et (d) correspondent au maillage dit « staircase », alors que les figures (e) et (f) correspondent au maillage dit « smooth ».

Sur le potentiel, il n'apparaît pas de variation significative entre les deux discrétisations, quelque soit la fréquence. Par contre pour le champ électrique dans la membrane, les effets de la discrétisation avec 3 ou 6 cellules dans l'épaisseur de la membrane est assez significatif. Cela ne modifie pas globalement les valeurs de champs, mais il existe un renforcement du champ électrique au niveau des marches d'escalier pour la discrétisation la plus faible.

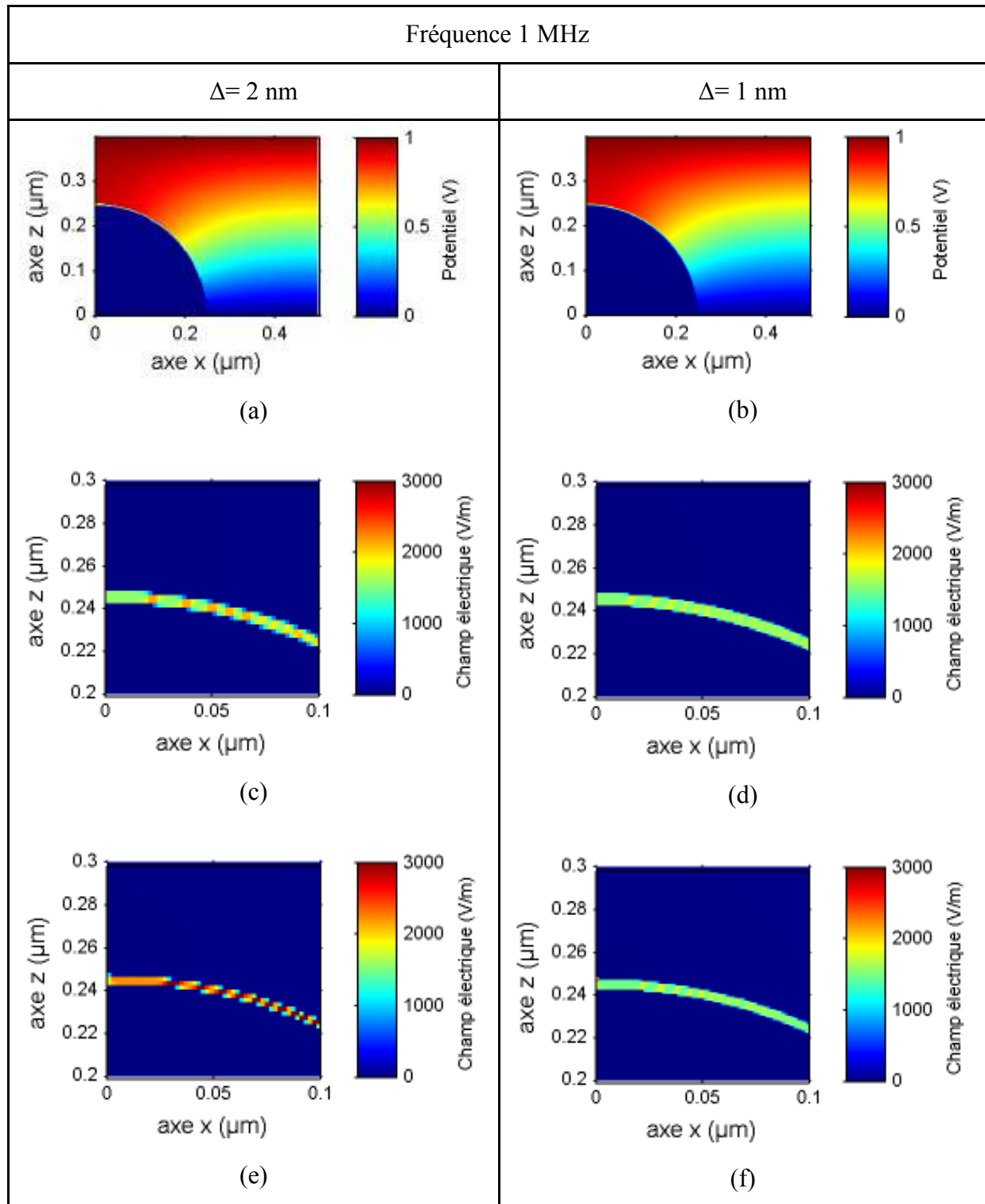
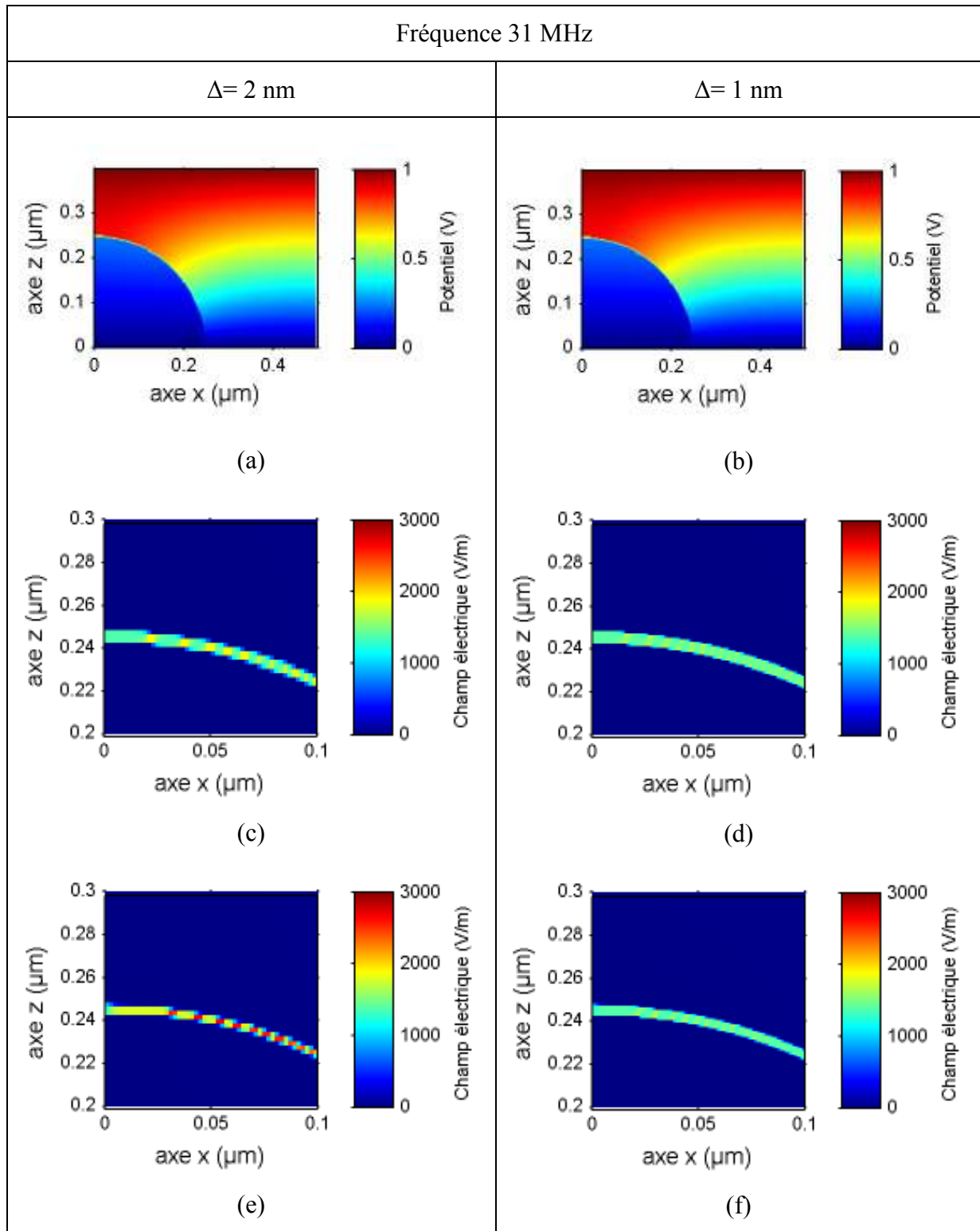
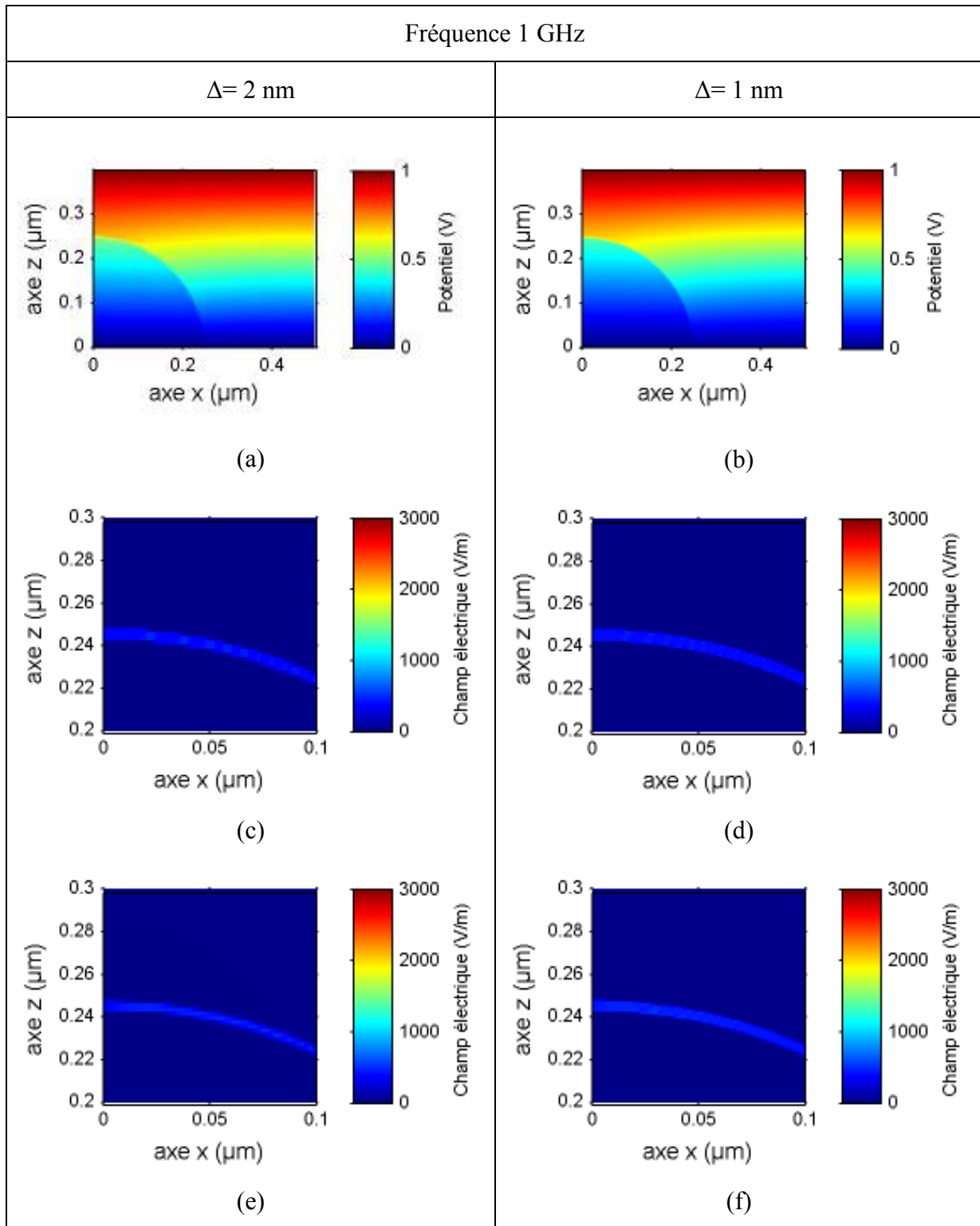


Figure IV-6 : Distribution spatiale du potentiel et du champ électrique pour deux discrétisations spatiales (1 et 2 nm). Deux méthodes de segmentation sont présentées : (c) et (d) correspondent au « staircase », (e) et (f) correspondent au « smooth »
Fréquence : 1 MHz.



**Figure IV-7 : Distribution spatiale du potentiel et du champ électrique pour deux discrétisations spatiales (1 et 2 nm). Deux méthodes de segmentation sont présentées : (c) et (d) correspondent au « staircase », (e) et (f) correspondent au « smooth »
Fréquence : 31 MHz.**



**Figure IV-8 : Distribution spatiale du potentiel et du champ électrique pour deux discrétisations spatiales (1 et 2 nm). Deux méthodes de segmentation sont présentées : (c) et (d) correspondent au « staircase », (e) et (f) correspondent au « smooth »
Fréquence : 1 GHz.**

Le modèle proposé pour diminuer les effets de la discrétisation en marche d'escalier ne semble pas améliorer la segmentation de la membrane. Pour la résolution spatiale la plus fine, il n'y a pas de modification sensible, alors que pour la discrétisation la plus grande, c'est-à-dire 3 cellules dans l'épaisseur de la membrane, on observe un renforcement de l'effet aux discontinuités. Ceci est très sensible pour la fréquence la plus basse, même la valeur du champ dans la membrane est affectée. Il n'a pas été identifié de raison autre que celle liée au fait que l'on doit calculer des dérivées d'ordre 2 et que de trop fortes discontinuités à l'échelle de la cellule élémentaire ne sont pas favorables à la convergence de l'algorithme. Pour aller dans ce sens, il a été nécessaire avec la segmentation « smooth » de réduire le facteur de sur-relaxation, passage de 1.99 à 1.8, pour assurer la convergence.

Cette méthode ne semble pas apporter d'amélioration par rapport au schéma classiquement utilisé, elle ne sera pas utilisée dans la suite de l'étude. A ce stade, il ressort que l'augmentation du nombre de cellule dans l'épaisseur de la membrane soit la voie la plus sûre. Il ne faut pas perdre de vue que l'objectif à terme est de prendre en compte un nombre élevé de milieux différents dans la cellule. Il faudra veiller à ce que les différents organelles et autres constituants internes à la cellule soient discrétisés avec quelques mailles. Une première étape est de considérer une organelle à l'intérieur du modèle de cellule.

II.5 Modèle de cellule avec une organelle

Le modèle présenté dans cette étude est strictement similaire au modèle précédent en termes de dimension et de paramètres physiques, à l'exception qu'il prend en compte la présence d'une organelle concentrique comme illustré sur Figure IV-9. Cette organelle est caractérisée par un diamètre d_o de 10 μm , et d'une membrane e_{mO} d'épaisseur 120 nm et dont la permittivité est semblable à la membrane plasmique ϵ_m . Le milieu intra-organelle est défini comme possédant les mêmes caractéristiques que le milieu extracellulaire. Dorénavant ce modèle constituera notre modèle de référence 2D dont les caractéristiques définies précédemment seront les valeurs par défaut.

Ce modèle bien que simpliste a été aussi utilisé dans la littérature car il permet une décomposition claire des phénomènes observés et représente un passage obligé pour analyser le comportement des structures cellulaires. Il présente aussi l'avantage d'être facilement discrétisé et de pouvoir utiliser des symétries.

Comme nous avons pu le souligner depuis le début de ce chapitre, la réponse aussi bien en termes de champ que de potentiel dépend de la fréquence d'étude. Pour ce modèle de

cellule présentant une organelle, nous pouvons décomposer sa réponse fréquentielle en deux comportements principaux : un comportement BF et un comportement HF.

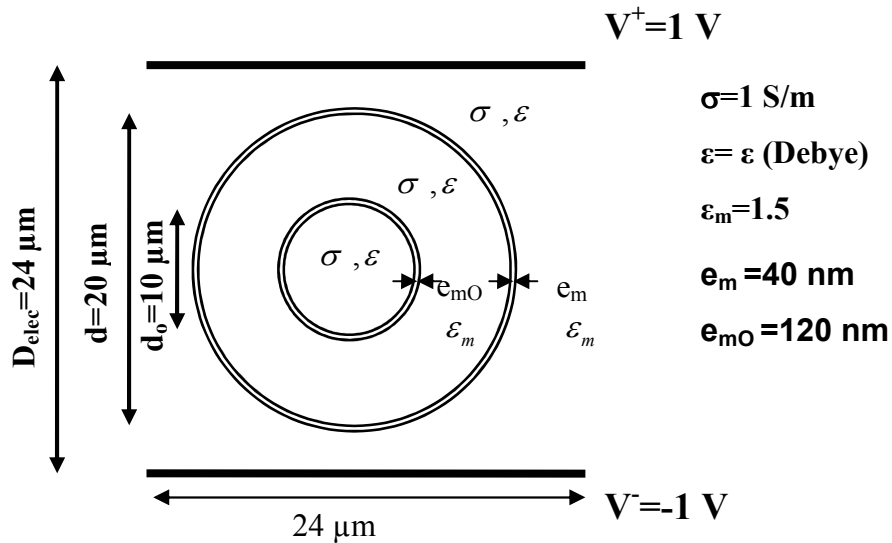


Figure IV-9 : Modèle 2-D d'une cellule présentant une organelle placée entre deux électrodes.

II.5.1 Étude du comportement en basses fréquences

Les résultats présentés sur la Figure IV-10 (a) et (b) sont déterminés à la fréquence de 1 MHz. La Figure IV-10 (a) présente la distribution spatiale du potentiel électrique de notre modèle 2D. On distingue trois zones différentes, à savoir le milieu extracellulaire et les deux milieux constituant la cellule. Nous pouvons remarquer que les valeurs de potentiels varient très faiblement dans la cellule. Ceci implique que les valeurs de champs sont faibles dans le milieu intracellulaire mais également que le PTM de l'organelle est très faible. Une forte différence de potentiel de part et d'autre de la membrane plasmique, et plus particulièrement lorsque le champ E est parallèle à la normale de la membrane, indique que le PTM est fort.

La Figure IV-10(b) quant à elle présente le comportement des lignes de champ lorsque la cellule est placée dans le champ uniforme généré par les électrodes, toujours à 1 MHz.

Nous remarquons que les lignes de champ correspondant aux fortes valeurs de potentiel contournent la première interface correspondant à la membrane plasmique. Il en va de même à l'intérieur de la cellule. Certes, les valeurs de potentiel sont faibles, mais les lignes de champ électrique associées ont-elles aussi tendance à contourner l'organelle.

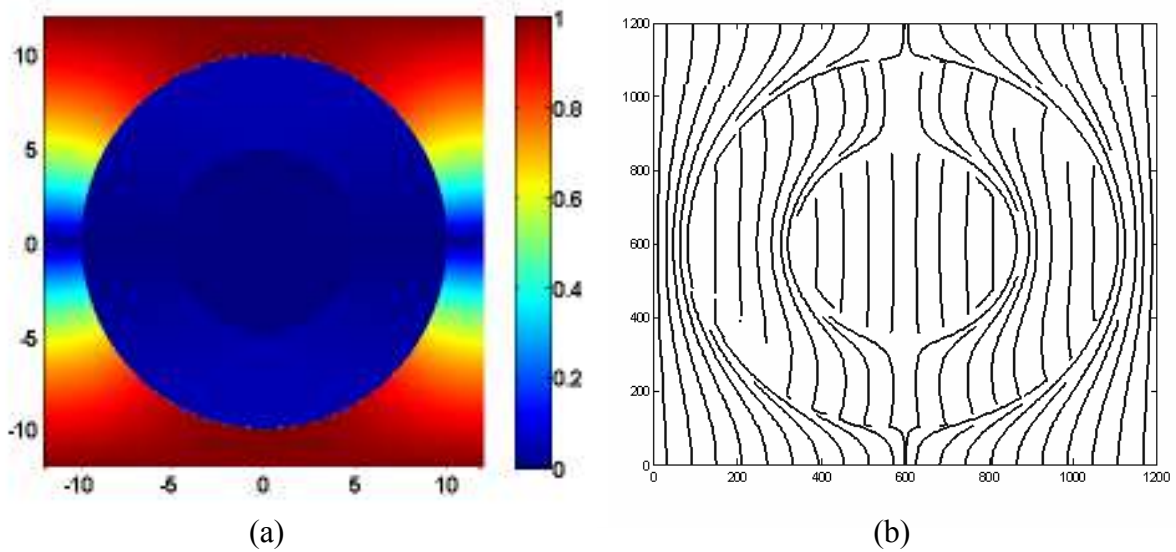


Figure IV-10 : A 1 MHz (a) Distribution du potentiel (b) Lignes de champ E.

II.5.2 Étude du comportement en hautes fréquences

De la même façon la Figure IV-11 (a) et (b) présentent respectivement la distribution du potentiel électrique et des lignes de champ à 1 GHz. Contrairement au cas précédent à 1 MHz, les champs HF pénètrent dans la cellule comme le montre la variation plus importante des potentiels dans le milieu intracellulaire (Figure IV-11 (a)). Ce phénomène est également visible sur les lignes de champ qui ne contournent plus la membrane plasmique mais traversent la membrane plasmique quasiment sans déformation (Figure IV-11 (b)). Ces observations illustrent le fait que les impulsions nsPEFs pénètrent d'avantage la cellule que des impulsions μ s-ms du fait de leur composition spectrale HF. A cette fréquence, on observe une plus forte différence de potentiel de part et d'autre de la membrane de l'organelle que de part et d'autre de la membrane plasmique en HF.

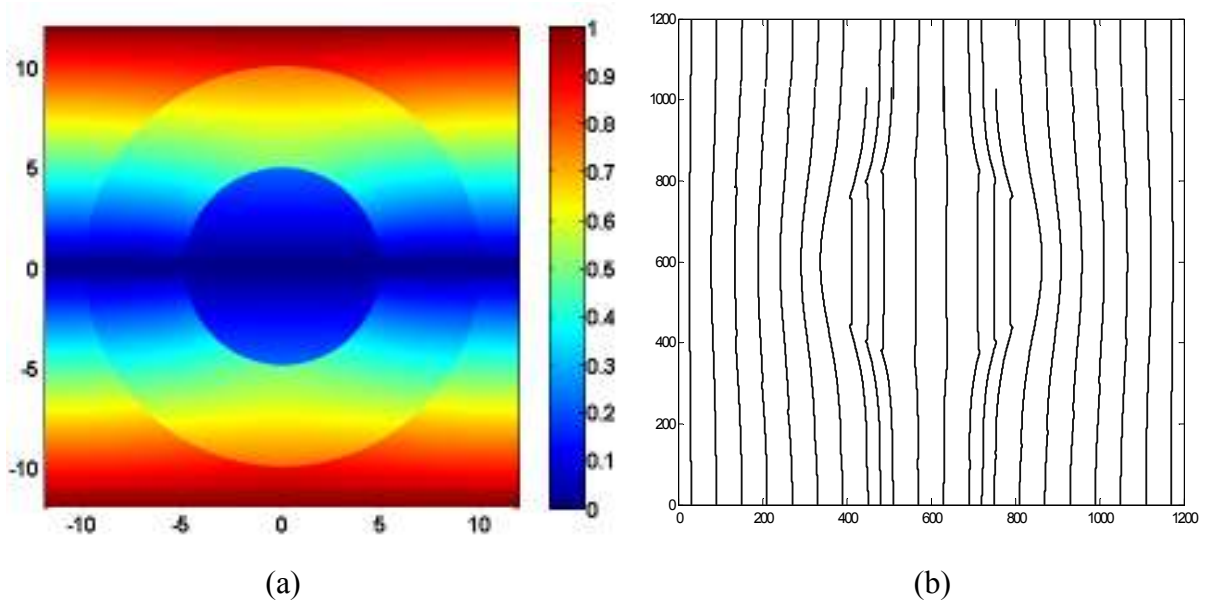


Figure IV-11 : A 1 GHz (a) Distribution du potentiel (b) Lignes de champ E

La Figure IV-12 présente le comportement fréquentiel du potentiel transmembranaire de la membrane plasmique (PTM_{plasm}) et de la membrane de l'organelle (PTM_{org}). Ces PTM sont calculés aux positions où la normale de la membrane est parallèle à la direction du champ. Pour des fréquences en dessous de 1 MHz, le PTM_{plasm} est maximal et a pour valeur 1 V alors que le PTM_{org} est très faible, ce qui traduit l'absence de pénétration du champ dans la cellule.

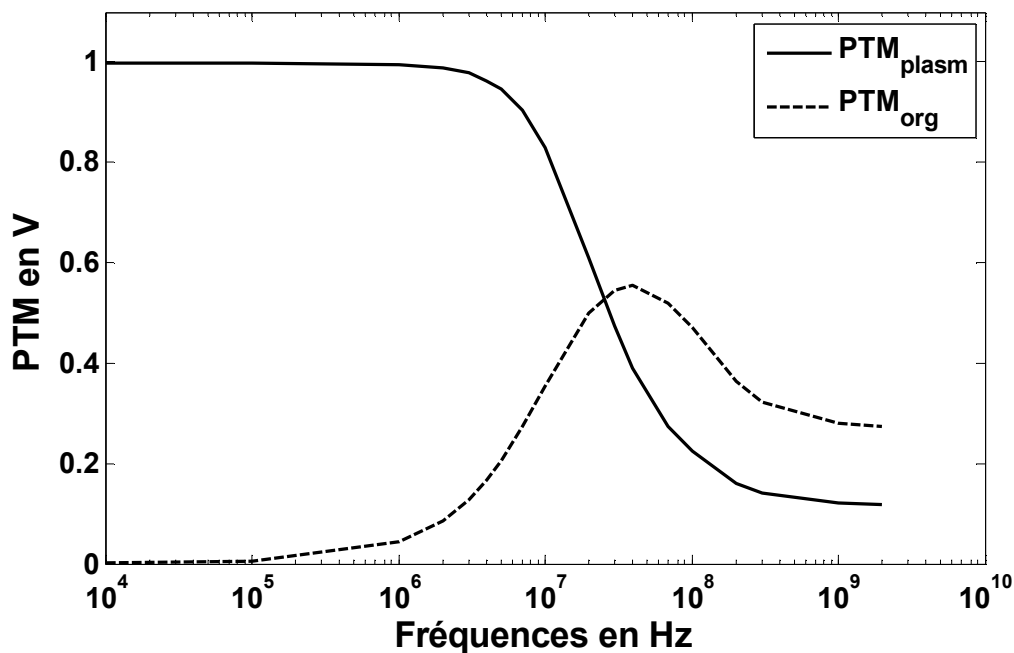


Figure IV-12 : Potentiel transmembranaire plasmique et nucléaire en fonction de la fréquence.

Au-delà de 1 MHz, le PTM_{plasm} décroît en faveur du PTM_{org} . Celui-ci atteint sa valeur maximale autour de 50 MHz, une fois cette fréquence dépassée, le PTM_{org} décroît à son tour avec le PTM_{plasm} et les valeurs ainsi prises par le PTM_{org} sont plus importantes que celle de la membrane plasmique.

La membrane plasmique se comporte comme un filtre. En basse fréquence (<1 MHz), la membrane empêche le champ de pénétrer à l'intérieur de la cellule, induisant de fortes valeurs de PTM_{plasm} . A mesure que la fréquence augmente le champ pénètre d'avantage dans la cellule, le PTM_{plasm} en est alors diminué et au contraire le PTM_{org} augmente. La membrane de l'organelle présente quand à elle un comportement passe bande. Au-delà de 30 MHz le PTM_{org} prend des valeurs supérieures au PTM_{plasm} et atteint sa valeur maximale de 555 mV à 40 MHz pour ensuite diminuer jusqu'à 275 mV à 2 GHz, alors que le PTM_{plasm} tend vers 140 mV.

Nous allons à présent étudier plus précisément l'influence de l'organelle en comparant deux modèles avec et sans organelle.

II.5.3 Influence de l'organelle sur les grandeurs caractéristiques

Cette étude a pour but de comparer la réponse de nos deux modèles de cellule rappelée par la Figure IV-13.

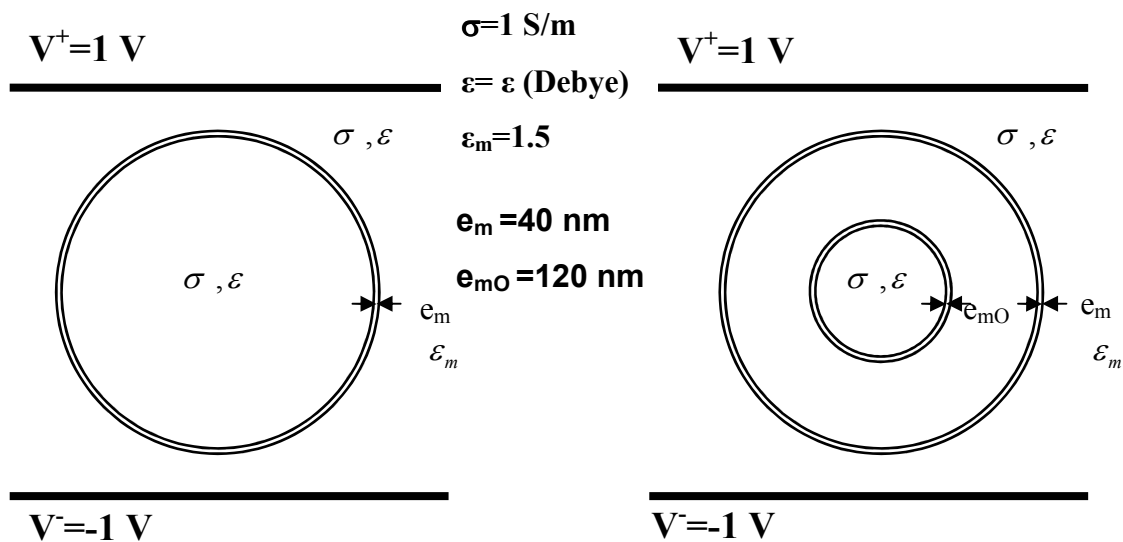


Figure IV-13 : Comparaison des modèles 2D avec et sans prise en compte d'une organelle.

La prise en compte d'une organelle dans notre modèle de cellule, modifie dans un premier temps le champ E_{ext} (Figure IV-14). En effet, au-delà de 10 MHz, les valeurs de E_{ext} , pour le modèle présentant une organelle, sont moins fortes que lorsque l'organelle n'est pas prise en compte. La présence de l'organelle de la cellule modifie les caractéristiques physiques du milieu intracellulaire. Par conséquent, E_{ext} en HF diffère davantage du champ global (83 kV/m) que le modèle composé uniquement d'une membrane.

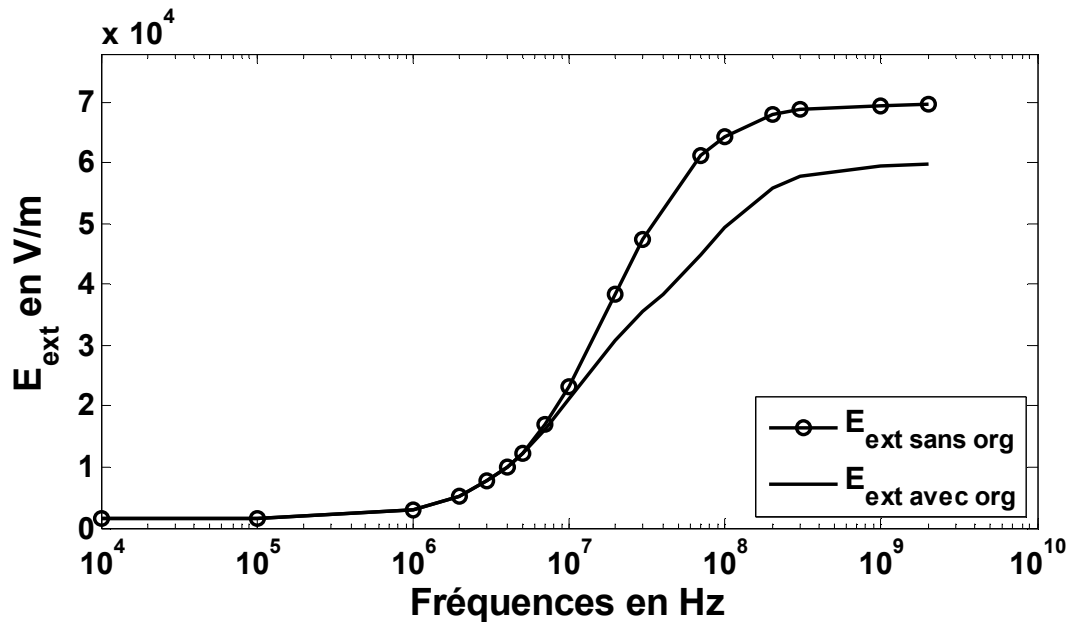


Figure IV-14 : Influence de l'organelle sur les valeurs de champ E_{ext} .

La Figure IV-15 présente l'évolution fréquentielle des PTM de chacun des modèles. Nous remarquons que notre modèle de cellule avec organelle induit des valeurs de PTM plasmique plus faibles que notre modèle composé uniquement d'une membrane plasmique. Nous calculons la différence entre les deux réponses en utilisant la relation suivante :

$$\frac{PTM_{plasm\ sans\ org} - PTM_{plasm\ avec\ org}}{PTM_{plasm\ sans\ org}}$$

Lorsque nous comparons la différence des PTM plasmiques à 30 MHz nous observons une diminution de 28,3% alors qu'à 2 GHz cette diminution n'est plus que de 15,3%.

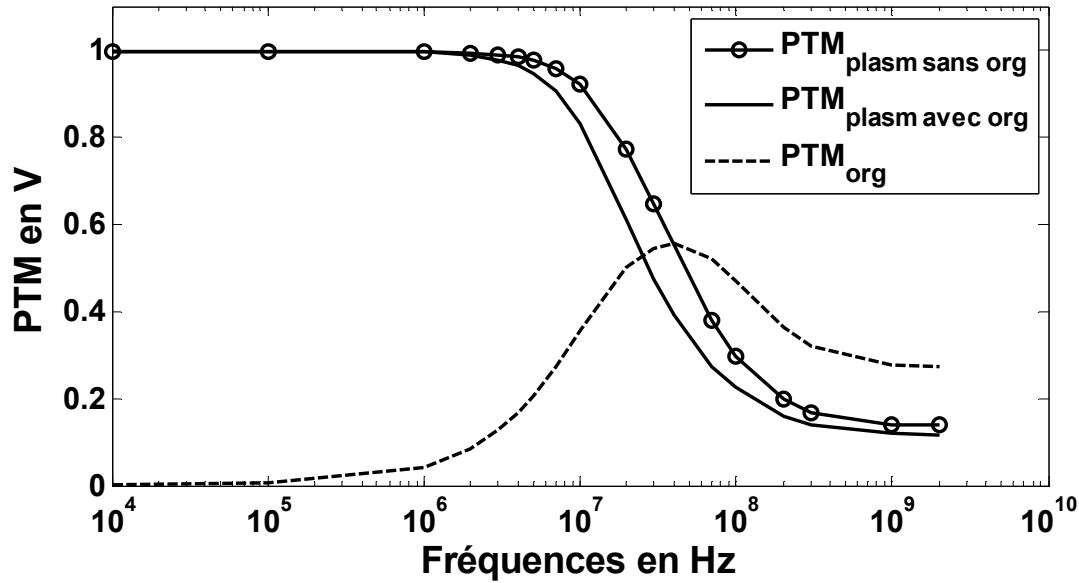


Figure IV-15 : Influence de l'organelle sur les valeurs de PTM.

La présence d'une organelle dans le milieu intracellulaire, induit une modification des propriétés physiques du milieu. Ceci explique la modification du champ E_{ext} et également du PTM plasmique. Par cette étude, nous soulignons l'importance de la modélisation la plus réaliste possible de l'intérieur de la cellule. En effet, la modélisation du milieu intracellulaire comme un milieu homogène induit des différences sur les valeurs de PTM_{plasm} mais également sur le champ environnant.

Nous allons à présent étudier l'influence de la valeur de la conductivité du milieu cellulaire sur les valeurs de champ E_{ext} et sur le PTM de notre modèle de cellule comportant une organelle.

II.5.4 Influence de la conductivité du milieu cellulaire

Comme nous avons pu le remarquer lors de notre étude 1D, la modification de la conductivité du milieu cellulaire induit une modification des valeurs de E_{ext} . En effet, lorsque la conductivité du milieu cellulaire prend la valeur de 0.3 S/m au lieu de 1 S/m (valeur prise par défaut), les valeurs du champ E_{ext} sont alors supérieures à celles de notre cas de référence entre 100 kHz et 1 GHz (Figure IV-16). Ceci est dû au décalage vers les basses fréquences de la transition comportement conducteur - comportement diélectrique lorsque la conductivité diminue.

Les PTM sont également affectés comme le montre la Figure IV-17 et le même décalage fréquentiel est observé avec la diminution de la conductivité, induisant des valeurs

de PTM_{plasm} plus faibles entre 100 kHz et 1 GHz. Le PTM_{org} quand à lui atteint non plus sa valeur maximale à 40 MHz mais à 10 MHz lorsque la conductivité est de 0.3 S/m.

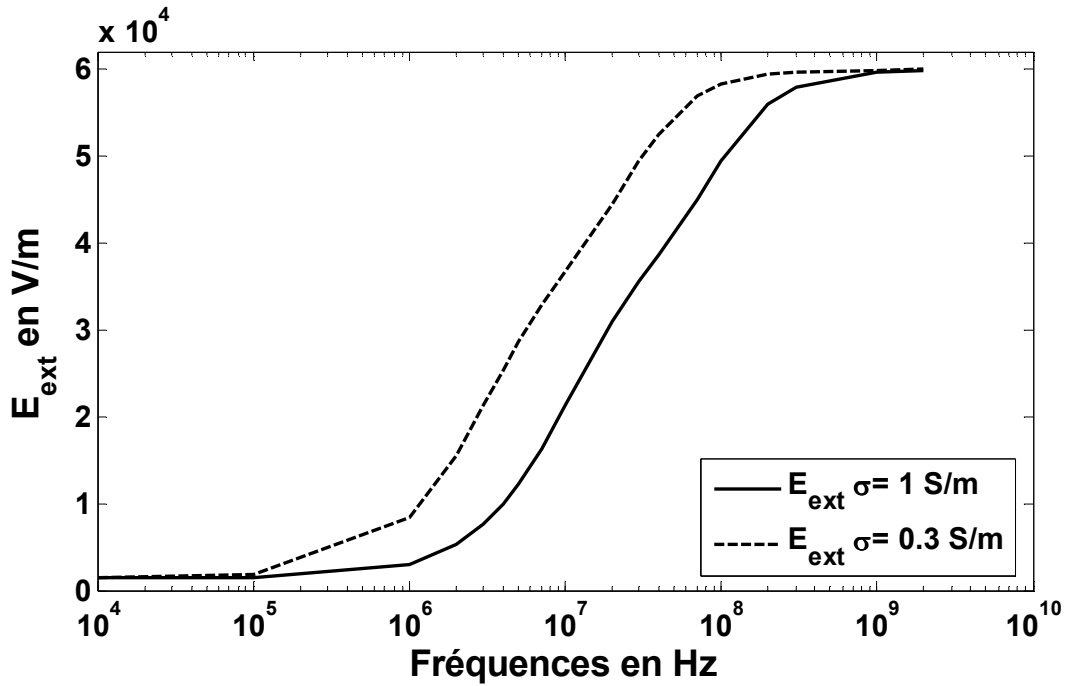


Figure IV-16 : Evolution fréquentielle du champ E_{ext} pour deux valeurs de conductivité du milieu cellulaire.

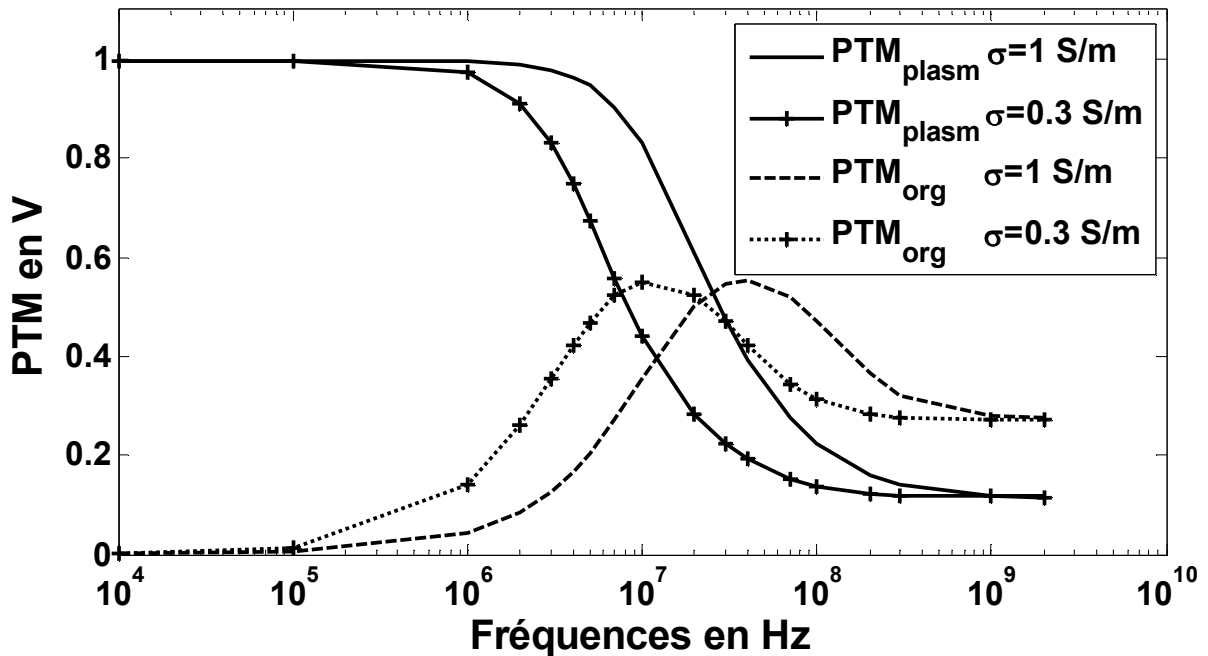


Figure IV-17 : Potentiel transmembranaire plasmique et de l'organelle en fonction de la fréquence, pour deux valeurs de conductivité du milieu cellulaire.

La variation de la conductivité du milieu cellulaire peut se produire au niveau de la réponse de tissus ou bien de cellules lorsqu'ils sont soumis à une impulsion nsPEF. En effet, la présence de pore peut engendrer un échange ionique plus important qu'à la normale. Cependant, pour l'intégrité de la cellule, ces modifications doivent rester relativement faibles pour ne pas engendrer de modification irréversible dans la cellule. Par conséquent cette étude montre l'importance de la prise en compte de la variation de la conductivité dans les modèles numériques lors de l'étude des effets des nsPEFs. Un modèle dynamique du phénomène d'électroporation devrait pouvoir intégrer cette modification locale de la conductivité. Il reste à déterminer si celle-ci joue un rôle important dans le processus général.

Comme nous venons de l'évoquer, une autre réponse connue de la cellule à ce type d'impulsion est l'augmentation de la perméabilité de la membrane qui peut se traduire par la création de pores dans la membrane plasmique comme cellule de l'organelle. Dans la partie suivante nous illustrons l'influence de ces pores sur les valeurs de potentiel et de champ, par la représentation de trous physiques dans la membrane plasmique.

II.5.5 Influence de trous physiques dans la membrane

Les pores ou trous considérés dans cette étude sont de l'ordre de l'épaisseur de la membrane, c'est-à-dire 40 nm. Afin d'illustrer la structure de la cellule, la Figure IV-18 présente le modèle de cellule avec des trous de taille beaucoup plus importante que les 40 nm qui sont considérés lors des simulations. Ils ont été pris en compte en imposant au niveau des trous, la permittivité du milieu intra ou extra cellulaire sur quelques mailles de la membrane plasmique.

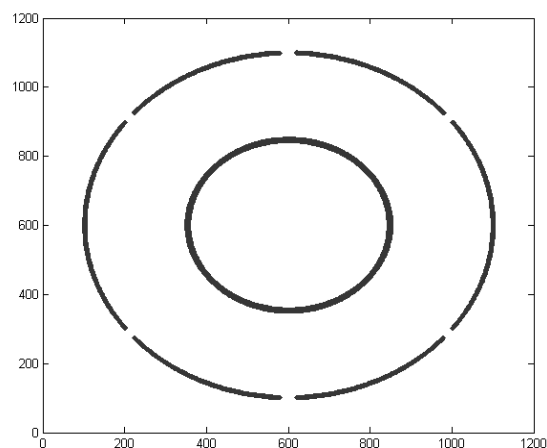


Figure IV-18 : Structure de la cellule avec des trous dans la membrane plasmique

Si l'on regarde leur taille, ils ne sont pas représentatifs de la réalité (inférieurs à la dizaine de nm de diamètre), mais peuvent traduire la présence d'une densité de pore dans une région donnée.

Cette étude permet d'illustrer l'impact de ces pores ou trous sur la distribution des potentiels et sur les lignes de champ en fonction de la fréquence. Les résultats sont présentés à 1 MHz (Figure IV-19 (a), (b)) et à 1GHz (Figure IV-20 (a), (b)).

Ainsi à 1 MHz, les valeurs de potentiel dans le milieu intracellulaire (Figure IV-19 (a)) atteignent des valeurs plus importantes en présence de trous qu'en leur absence (Figure IV-10 (a)). La différence de potentiel entre les deux faces de la membrane de l'organelle est elle aussi plus grande. Les lignes de champ (Figure IV-19 (b)) pénètrent dans la cellule par les ouvertures créées dans la membrane, augmentant ainsi le champ intracellulaire. En revanche à 1 GHz la distribution des potentiels électriques aussi bien que la distribution des champs (Figure IV-20 (a) et (b)) ne semblent pas avoir varié avec la création des trous, en comparaison avec les Figure IV-10 (a) et (b).

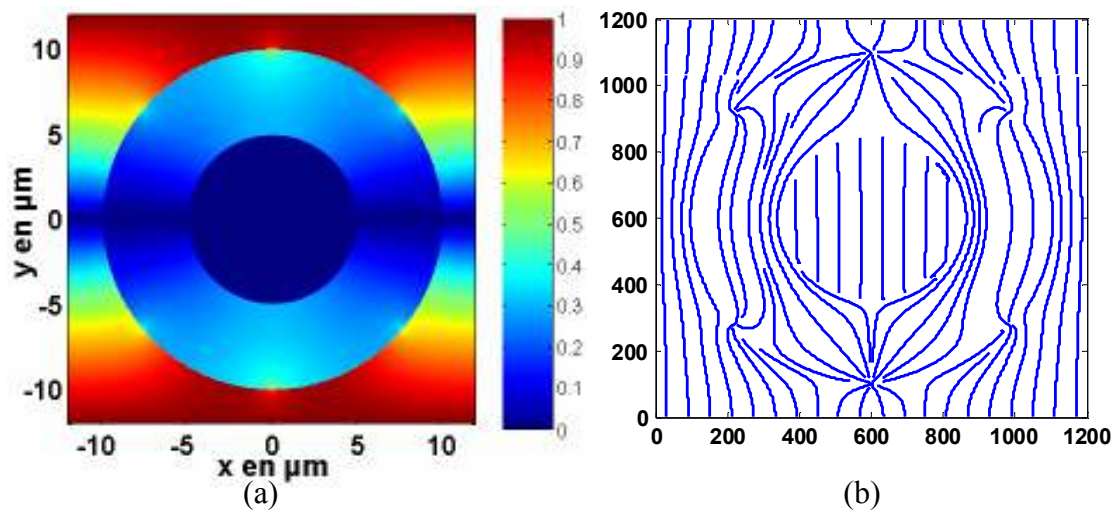


Figure IV-19 : 1 MHz (a) Distribution du potentiel, (b) Lignes de champ E.

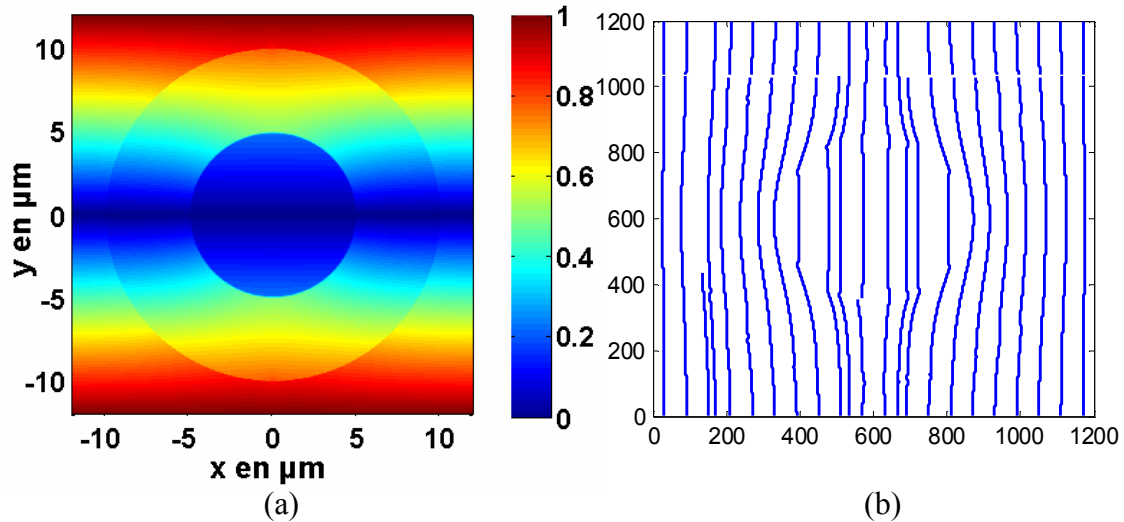


Figure IV-20 : 1 GHz (a) Distribution du potentiel, (b) Lignes de champ E.

La Figure IV-21 présente l'évolution fréquentielle des valeurs de PTM de l'organelle, en présence et en l'absence de trous dans la membrane plasmique. Ainsi pour des fréquences en dessous de 10 MHz les valeurs de PTMorg induites en présence de trous sont de 0.35 V, alors qu'elles sont presque nulles pour le modèle qui n'en comporte pas. En revanche, au-delà de 10 MHz, la présence des trous dans la membrane n'influence que très peu les valeurs de PTMorg, confortant l'hypothèse que les membranes plasmiques sont transparentes pour les champs HF.

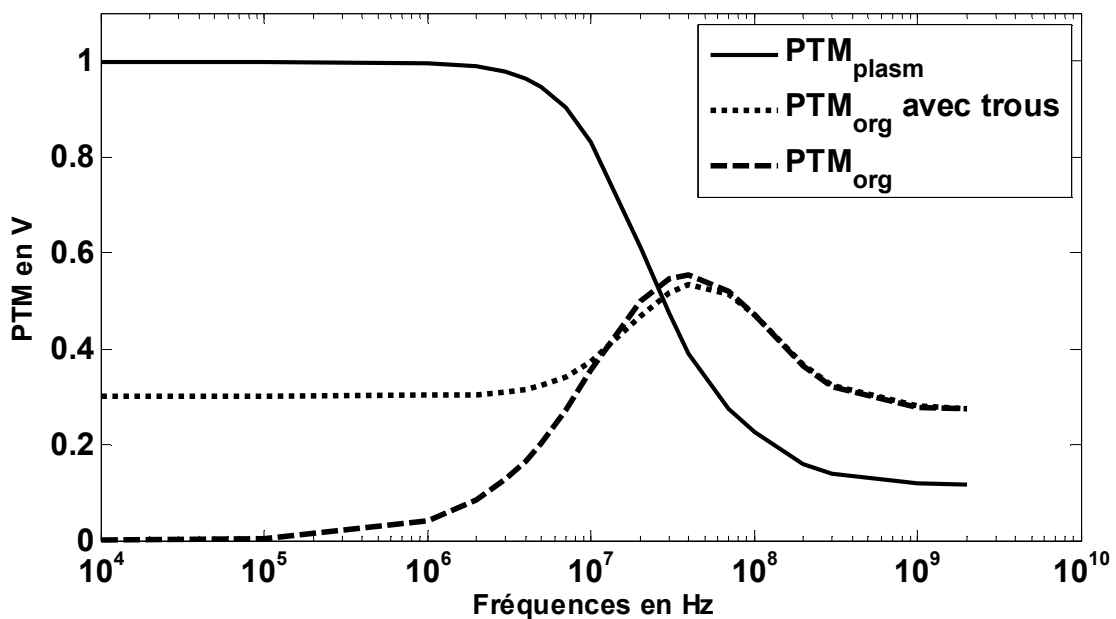


Figure IV-21 : Potentiel transmembranaire plasmique et nucléaire en fonction de la fréquence, avec et sans prise en compte de trous dans la membrane plasmique.

Ces résultats montrent également que pour atteindre de fortes valeurs de potentiel transmembranaire sur les organelles, la présence de pores dans la membrane plasmique est importante pour que les impulsions longues puissent atteindre les organelles. A contrario, il y a peu de modification du potentiel transmembranaire des organelles pour la partie haute du spectre, signifiant qu'il n'y a pas dans une telle configuration d'effet cumulatif entre le franchissement de la membrane plasmique et la présence de pores.

Il existe donc deux façons d'atteindre les organelles des cellules avec les impulsions de champ électriques, soit après électroporation de la membrane plasmique, soit à l'aide de pulse très court.

II.6 Conclusion

L'étude du modèle 2D de cellule avec organelle s'est décomposée en deux phases, la première consistait en la validation du modèle 2D de cellule sans organelle par la comparaison des valeurs de champs et PTM induites avec celles du modèle 1D. La seconde étape résidait en la définition de deux comportements principaux de la cellule en fonction de la fréquence. Les champs électriques contournent la cellule en BF induisant de fortes valeurs de PTM_{plasm} et des valeurs nulles de PTM_{org} . Alors que pour des fréquences HF, les champs électriques pénètrent la cellule, le PTM_{plasm} est alors de faible valeur en comparaison avec le PTM_{org} .

Enfin nous avons mis en évidence l'impacte non négligeable de trous physiques dans la membrane plasmique sur la distribution du champ et des potentiels électriques. De cette façon nous avons montré que les valeurs de PTM de l'organelle sont affectées par la modification structurelle de la membrane plasmique, pour des fréquences inférieures à 10 MHz. Ainsi les organelles peuvent être affectées par les impulsions de champ électrique soit par perméabilisation préalable de la membrane plasmique soit par l'emploi d'impulsions nanosecondes.

III Réponse temporelle à une impulsion nsPEF : modèle 2D

L'approche fréquentielle utilisée précédemment permet d'une part d'analyser et de comprendre le comportement d'une structure telle que la cellule biologique. Mais elle permet aussi d'obtenir des fonctions de transfert complexes à partir desquelles il est possible de déterminer les réponses à des impulsions. Ceci est important pour obtenir la réponse la plus

réaliste possible des potentiels transmembranaires par exemple, et de connaître les niveaux seuil à partir desquels le processus d'électroporation peut exister. Ces résultats sont à mettre en regard des expérimentations biologiques.

L'évolution temporelle des PTM de notre modèle 2D de cellule au cours de l'exposition à des nsPEFs est déterminée par la méthode qui a été présentée dans le chapitre II, et dont l'algorithme est rappelé sur la Figure IV-22. Ainsi l'évolution fréquentielle des PTM obtenus dans la partie précédente est utilisée comme fonction de transfert. L'évolution temporelle du PTM est alors obtenue par transformée de Fourier inverse du produit du spectre de l'impulsion incidente par la fonction transfert.

La réponse de la cellule à une impulsion EM va dépendre de plusieurs paramètres propres au signal d'excitation tels que la durée, la forme et l'amplitude de l'impulsion, mais également aux grandeurs caractéristiques de la cellule, telles que ses dimensions et ses propriétés physiques (permittivité diélectrique et conductivité électrique).

Le modèle employé dans ce sous chapitre est celui correspondant à notre modèle 2D avec une organelle décrite dans la partie précédente caractérisé par des épaisseurs de membrane de 40 nm et 120 nm, pour respectivement la cellule et l'organelle, et avec une permittivité relative ϵ_m égale à 1.5 pour les membranes.

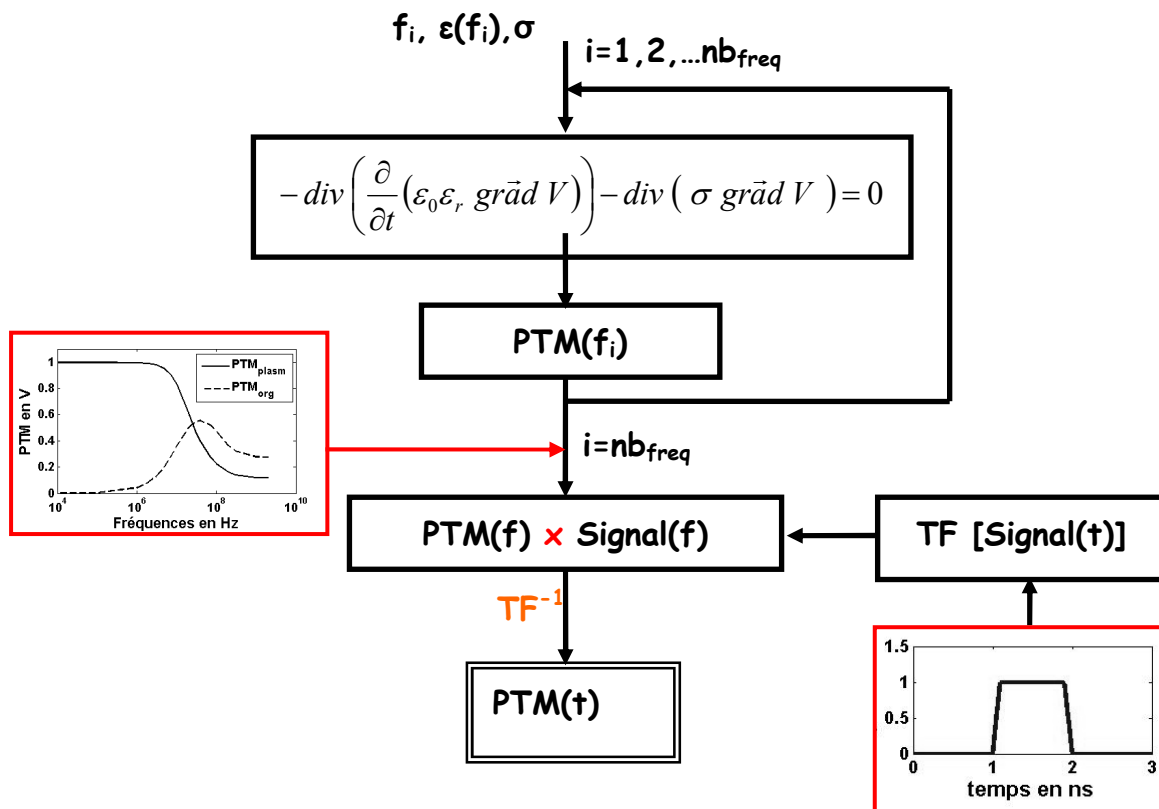


Figure IV-22 : Algorithme pour le calcul des réponses transitoires.

Pour illustrer le comportement transitoire du modèle de cellule, différentes longueurs d’impulsion vont être analysées. Ils sont globalement représentatifs de ce qui est utilisé ou envisagé pour les expérimentations biologiques. Les durées sont choisies égales à 200 ns, et 2 ns.

Dans cette sous partie nous décrivons les impulsions que nous considérons et en seconde partie nous analysons les réponses temporelles de notre modèle en termes de champ et de PTM.

III.1 Caractérisation des impulsions étudiés

Dans le cas idéal d’une impulsion rectangle de durée égale à 200 ns où les fronts de montée sont infinis (Figure IV-23 (a)), le contenu spectral est représenté par la fonction sinus cardinal (Sinc). La Figure IV-23 (b) présente le module du spectre en fonction de la fréquence. L’amplitude maximale correspond à la durée en seconde de l’impulsion rectangle soit $2 \cdot 10^{-7}$. Le lobe principal de la fonction sinus cardinal est délimité par le premier zéro de la fonction définit à la fréquence de 5 MHz égale à l’inverse de la durée de l’impulsion. Ce lobe comprend une part importante du contenu spectral de l’impulsion. Au-delà de la fréquence du

premier zéro le spectre décroît rapidement, au-delà de 100 MHz le contenu spectral est très faible.

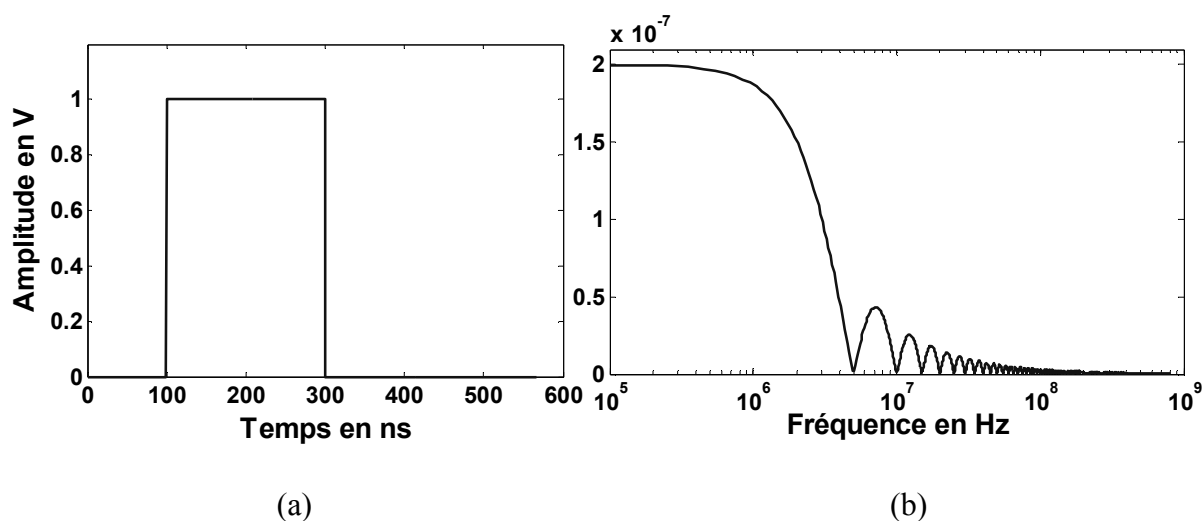


Figure IV-23 : Profil temporel et spectral d'une impulsion rectangulaire de durée 200 ns et d'amplitude normalisée.

En expérimentation, les impulsions créées par les générateurs de nsPEFs présentent des temps de montée qui vont dépendre de la technologie utilisée pour la commutation, mais dans tous les cas ils ne sont pas infiniment raides. Par conséquent dans le but de se rapprocher d'une configuration réaliste, des formes trapézoïdales sont considérées pour deux durées d'impulsion différentes, à savoir 200 ns et 2 ns. Le choix de ces durées d'impulsion s'est avéré justifié par le comportement global de notre modèle, que nous décrirons dans la sous partie suivante.

L'impulsion de 200 ns est définie par un temps de montée et de descente de 20 ns et d'une amplitude de 1 V. La Figure IV-24 présente le profil temporel de l'impulsion ainsi que son spectre. La considération des temps de montée et de descente de l'impulsion, par rapport à l'impulsion idéale rectangulaire de même durée, induit non plus une amplitude maximale de $2 \cdot 10^{-7}$ mais de $1,8 \cdot 10^{-7}$. Le premier zéro du spectre est défini quant à lui à 5,5 MHz proche des 5 MHz du cas idéal. De plus, nous pouvons remarquer que le contenu spectral est moins étendu que pour l'impulsion rectangle, il est nul au-delà de 50 MHz.

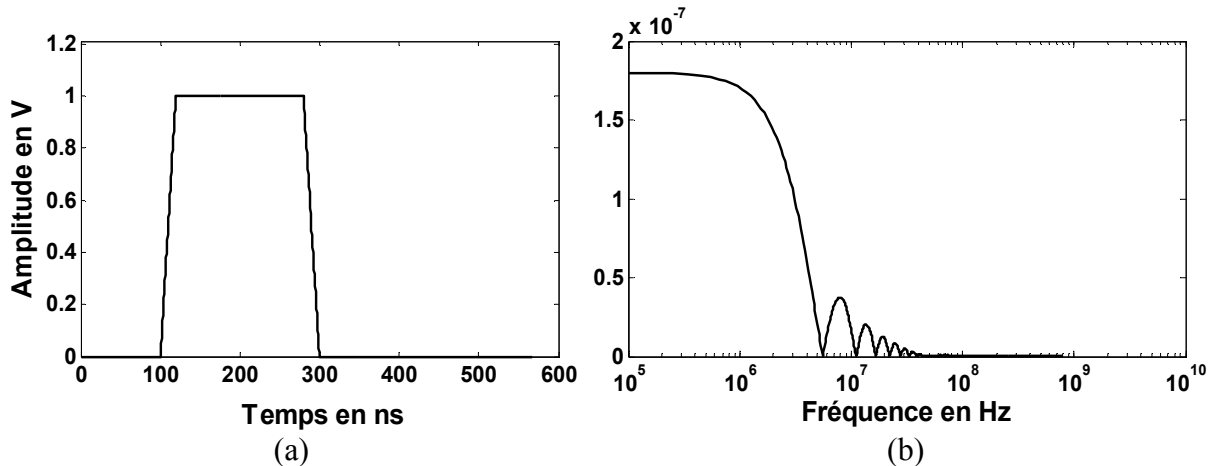


Figure IV-24 : Profil temporel (a) et spectral (b) d'une impulsion trapézoïdale de 200 ns

Pour une durée d'impulsion 100 fois plus petite, la Figure IV-25 présente une impulsion de 2 ns avec des temps de montée et de descente de 200 ps. Le premier lobe est défini jusqu'à 555 MHz. Le contenu spectral s'étend jusqu'à environ 4 GHz.

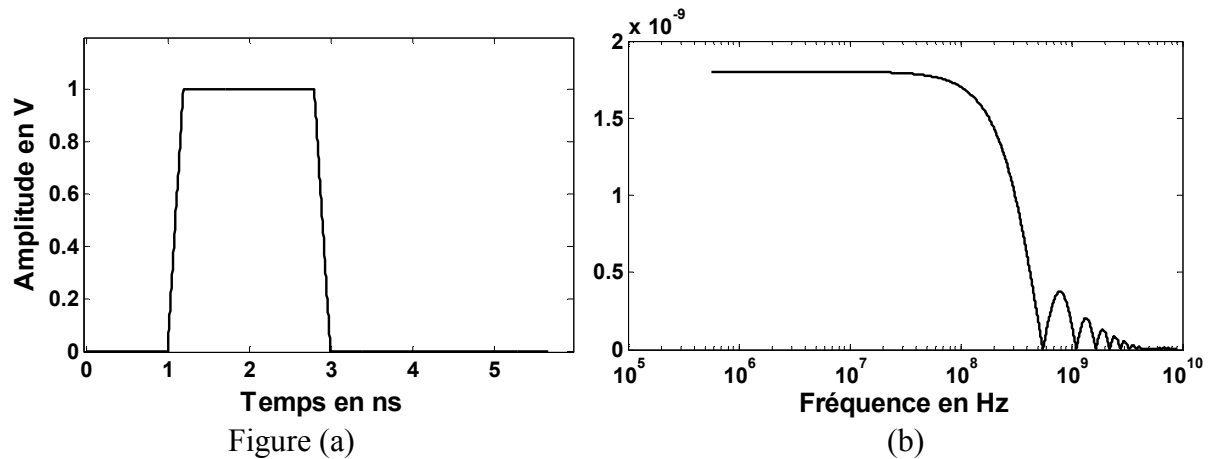


Figure IV-25 : Profil temporel (a) et spectral (b) d'une impulsion trapézoïdale de 2 ns

Les deux impulsions trapézoïdales, décrites dans ce paragraphe, ont montré des contenus spectraux différents du fait des durées et des temps de montée distincts. Ainsi, il est ressorti que les fronts de montée rapides possèdent un contenu spectral haute fréquence et que le spectre de l'impulsion (lobe principal) est d'autant plus large que la durée de l'impulsion est faible.

Le choix de ce type d'impulsion se justifie aussi dans la mesure où ce sont des formes d'impulsion qui ont été utilisées assez largement dans la littérature.

III.2 Etude temporelle du modèle 2D

Nous rappelons par la Figure IV-26 l'évolution fréquentielle du module du potentiel transmembranaire qui nous sert de fonction transfert.

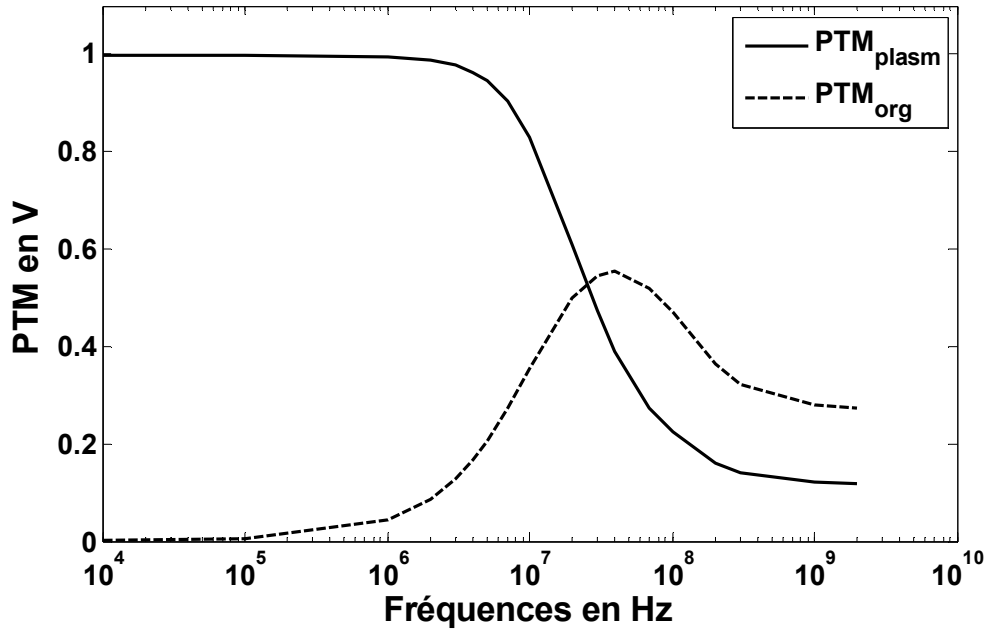


Figure IV-26 : Potentiel transmembranaire plasmique et nucléaire en fonction de la fréquence.

Cette fonction transfert montre bien qu'il existe des fréquences préférentielles, selon la membrane, qui permettent d'obtenir des valeurs de PTM plus importantes. Ainsi, la réponse de notre modèle de cellule, comportant une organelle, est directement liée au contenu spectral de l'impulsion.

Les produits de la fonction transfert avec les impulsions d'amplitude normalisée décrites dans le paragraphe précédent nous permettent d'obtenir par transformée de Fourier inverse les valeurs temporelles de PTM. L'amplitude des impulsions est choisie égale à 83 kV/m ce qui correspond au champ global imposé par la configuration de notre modèle. Pour obtenir la réponse de notre modèle à une impulsion de plus fort champs, nous appliquons un facteur à la fonction transfert. Ainsi, pour un champ souhaité de 1 MV/m nous appliquons un facteur 12.

III.2.1 Impulsion de durée 200 ns

La Figure IV-27 présente les valeurs de PTM induites dans chacune des membranes au cours du temps, lorsque notre modèle est exposé à notre impulsion trapézoïdale de 200 ns et de 1 MV/m.

Dans un premier temps, nous pouvons remarquer que le profil temporel du PTM_{plasm} est très proche de celui de l'impulsion trapézoïdale, à l'exception des temps de montée et de descente qui sont dégradés. Nous constatons également que les valeurs de PTM_{org} sont

induites par les fronts de montée et de descente de l'impulsion, correspondant aux composantes hautes fréquences de l'impulsion.

Pour cette durée d'impulsion, les valeurs maximales de PTM_{plasm} restent plus importantes que celle du PTM_{org} , prenant la valeur maximale de 12 V et 3.4 V, respectivement. En plus de cette différence sur les amplitudes, le PTM_{plasm} reste proche de sa valeur maximale, ce qui peut induire des phénomènes au niveau de la membrane, contrairement à ce qui se passe au niveau de l'organelle.

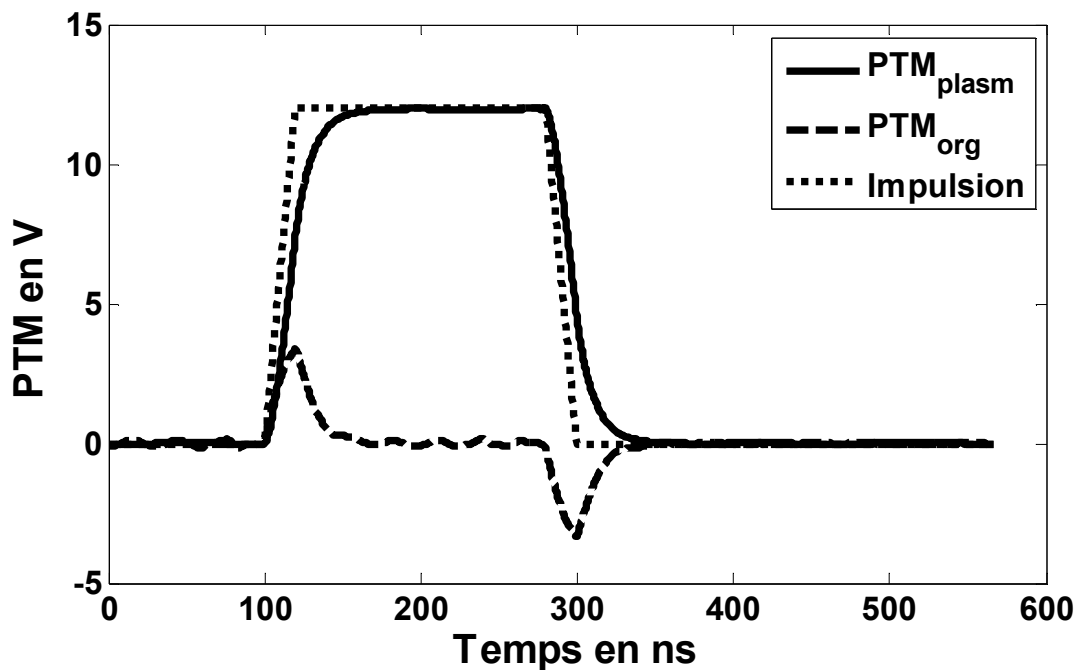


Figure IV-27 : Evolution temporelle des PTM pour la membrane plasmique et la membrane de l'organelle en réponse à une impulsion trapézoïdale de 200 ns et d'amplitude 1 MV/m.

Les valeurs de champs électriques dans les membranes E_m sont présentées sur la Figure IV-28. Par définition, les champs induits dans les membranes sont obtenus en divisant les PTM par l'épaisseur des membranes. Ils suivent donc logiquement les profils des potentiels transmembranaires. Les champs induits dans les membranes peuvent atteindre 300 MV/m et 28 MV/m pour la membrane plasmique et celle de l'organelle, respectivement.

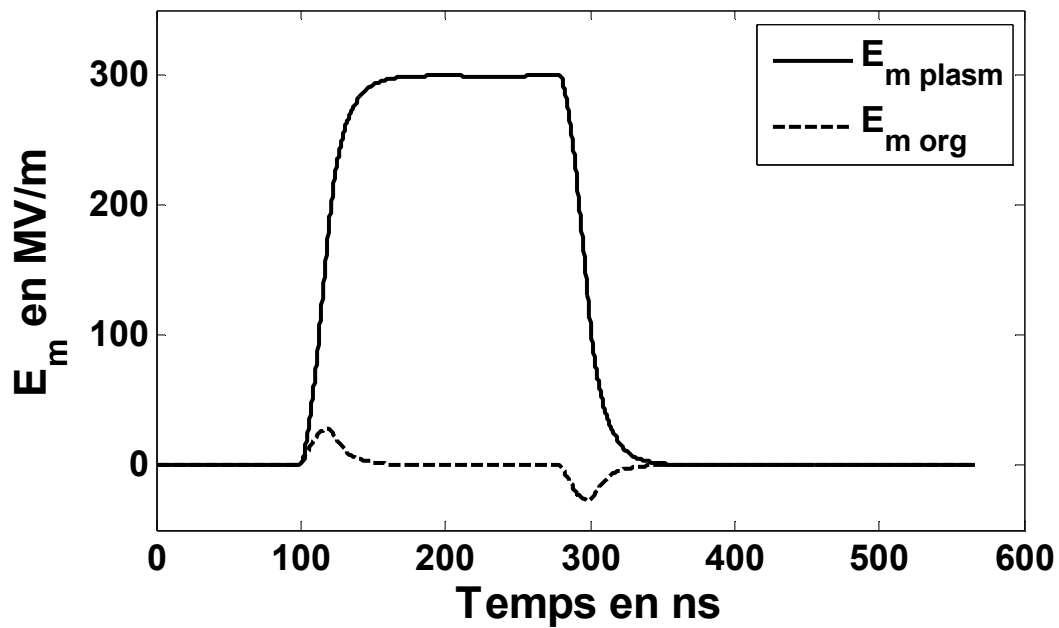


Figure IV-28 : Evolution temporelle des champs dans les membranes plasmique et de l'organelle en réponse à une impulsion trapézoïdale de 200 ns et d'amplitude 1 MV/m.

L'évolution temporelle du champ à l'extérieur de la cellule E_{ext} est déterminée en employant la même méthode numérique que pour le PTM à l'exception de la fonction transfert qui est remplacé par le comportement fréquentiel de E_{ext} . Le profil temporel de E_{ext} (Figure IV-29) est proche de l'impulsion incidente à l'exception des temps de montée et de descente qui sont plus longs. Les champs induits autour de la cellule, sont de l'ordre de 12 V/m en valeur maximale.

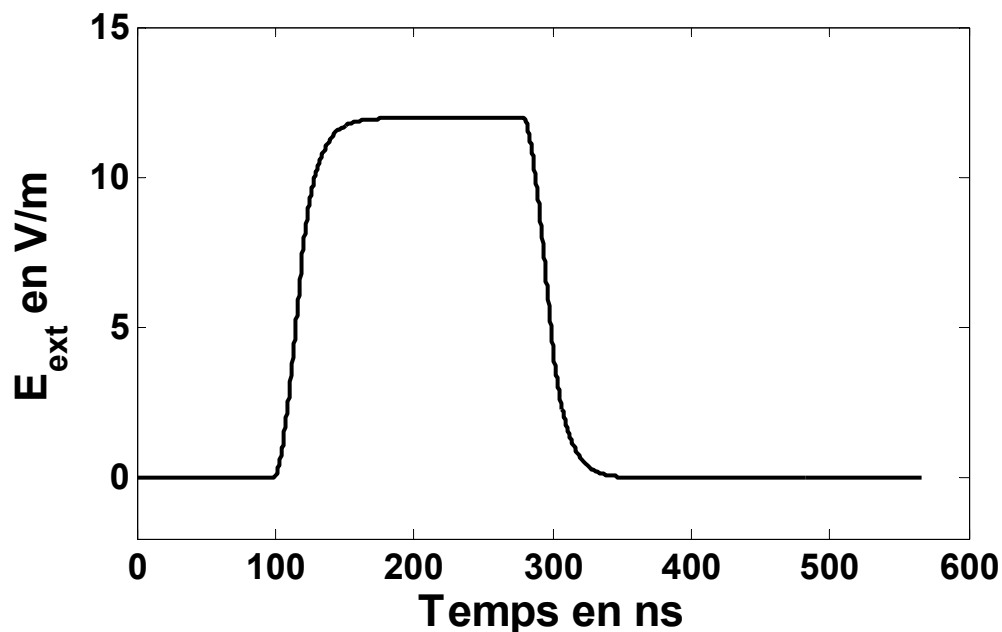


Figure IV-29 : Evolution temporelle de E_{ext} lors de l'exposition à une impulsion trapézoïdale de 200 ns et de 1 MV/m

III.2.2 Impulsion de durée 2 ns

La Figure IV-30 présente la réponse temporelle de notre modèle, en terme de PTM, à l'impulsion de 2 ns et de 1 MV/m. Nous pouvons dans un premier temps remarquer que les profils des PTM ne sont plus comparables à l'impulsion trapézoïdale. Contrairement à la configuration précédente (impulsion de 200 ns) les PTM des membranes ne sont pas nuls au bout de la durée de l'impulsion, montrant que les membranes se déchargent progressivement après l'impulsion. Comme nous avons pu le dire précédemment, le domaine fréquentiel de l'impulsion est d'autant plus important que la durée et les temps de montée de l'impulsion sont courts. Le spectre de l'impulsion étant plus large que la fonction transfert, les composantes HF de l'impulsion ont été perdues, induisant des temps de montée plus longs et un temps de décharge des membranes plus important.

Nous pouvons ensuite remarquer que les valeurs de PTM_{org} sont plus importantes que celle de la membrane plasmique PTM_{plasm} . Par conséquent, les impulsions très courtes peuvent induire des phénomènes intracellulaires importants. Ce résultat illustre le phénomène que nous cherchons à exploiter.

Pour ce qui est du champ dans les membranes, le phénomène inverse est observé, avec des valeurs de champ atteignant 82 MV/m et 40 MV/m pour la membrane plasmique et celle de l'organelle, respectivement (Figure IV-31). Ceci s'explique par la forte différence d'épaisseur entre les deux membranes. Le champ extérieur induit par l'impulsion de 2 ns est présenté par la Figure IV-32, il prend des valeurs très faibles autour de quelques V/m.

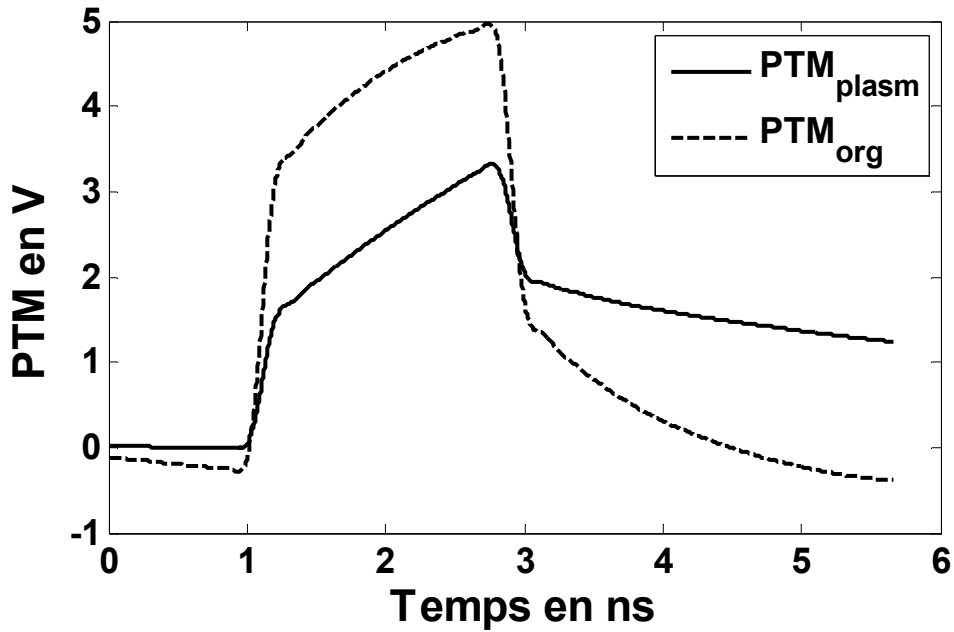


Figure IV-30: Evolution temporelle des PTM pour la membrane plasmique et la membrane de l'organelle en réponse à une impulsion trapézoïdale de 2 ns et d'amplitude 1 MV/m

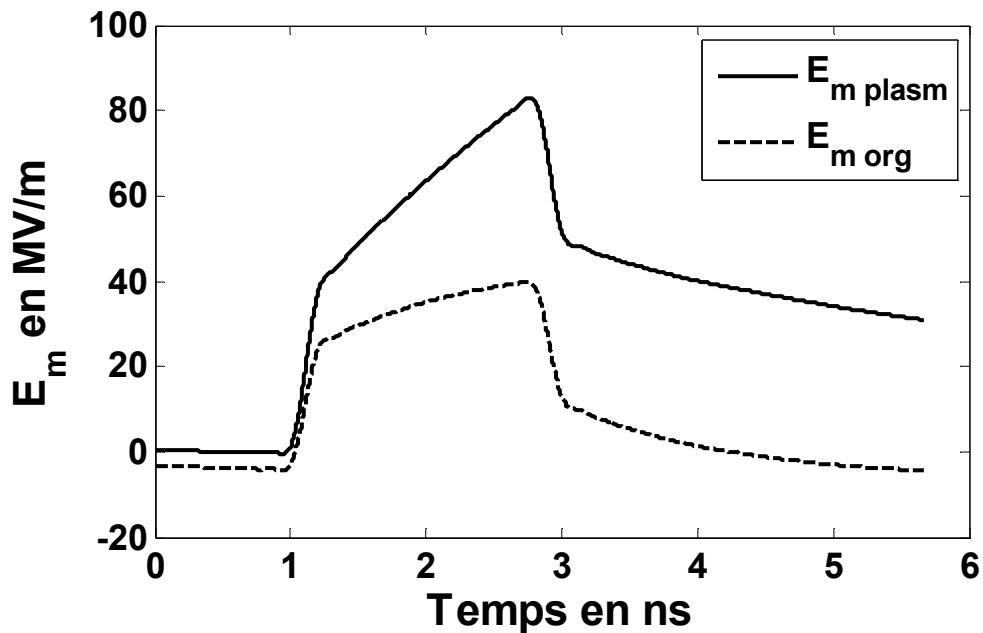


Figure IV-31 : Evolution temporelle des champs dans les membranes plasmique et de l'organelle en réponse à une impulsion trapézoïdale de 2 ns et d'amplitude 1 MV/m.

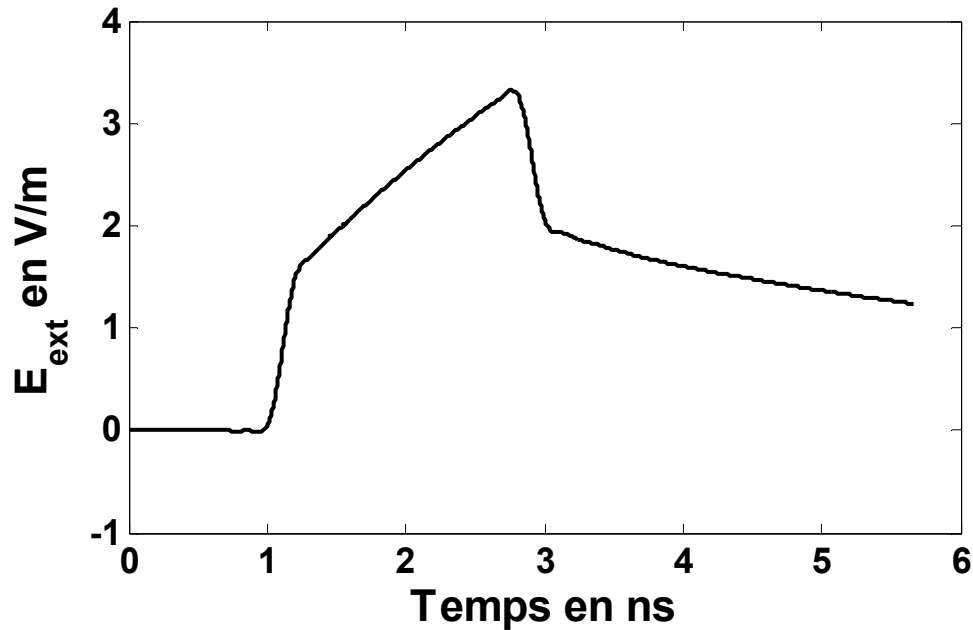


Figure IV-32 : Evolution temporelle de E_{ext} lors de l'exposition à une impulsion trapèze de 2 ns et de 1 MV/m

Les valeurs de PTM et de champ obtenues avec nos modèles pour des impulsions de 200 ns et 2 ns avec une amplitude de 1 MV/m, nous permettent d'appréhender les phénomènes impliqués pour des membranes d'épaisseur réaliste.

III.2.3 Conclusion

De cette étude ressort qu'une impulsion longue de 200 ns et avec des temps de montée de 20 ns induit un PTM plus important sur la membrane plasmique que sur la membrane de l'organelle, alors que le phénomène inverse est observé avec une impulsion de durée 2 ns avec des temps de montée et de descente de 200 ps.

Le modèle de cellule que nous avons considéré, présente des membranes plus épaisses que dans la réalité (plusieurs dizaines de nm pour la membrane plasmique et d'une centaine de nm pour la membrane de l'organelle, alors que les membranes réelles sont de l'ordre de 5-7 nm et 30-40 nm d'épaisseur, respectivement. Ceci explique le fait que nos valeurs de PTM dépassent de façon importante la valeur seuil caractéristique de 1V, qui correspond au PTM au-delà duquel le phénomène d'électroporation est observé en expérimentation.

IV Vers un modèle 3D

Cette étude a pour objectif de valider le modèle de membrane équivalente plus épaisse par une approche 3D. Cette dernière est basée sur un logiciel de simulation du commerce, en

l'occurrence CST (Computer Simulation Technologie) EM Studio basé sur la méthode des intégrales finies. Cette méthode de résolution permet un maillage conforme des structures ce qui est particulièrement intéressant pour le type de géométrie que nous étudions. Cette approche permet aussi de tester les possibilités et les performances d'un code 3D.

Nous présenterons dans un premier temps le modèle retenu et nous définirons les principaux paramètres nécessaires à la modélisation. Ensuite, une étude sera consacrée à la comparaison du modèle 2D avec celui obtenu en 3D. Enfin, nous chercherons à modéliser des membranes de tailles réalistes pour ensuite en approcher la réponse avec le principe des membranes équivalentes plus épaisses et de libérer les contraintes du rapport d'échelle entre l'épaisseur de la membrane et le rayon de la cellule.

IV.1 Modèle 3D

Nous avons cherché à définir un modèle 3D se rapprochant le plus possible de notre configuration 2D de référence caractérisée par une cellule avec une organelle en suspension entre deux électrodes auxquelles est imposée une différence de potentiel. Ainsi nous avons définies les électrodes par deux plaques parallélépipédiques de $0.1 \times 48 \times 48 \mu\text{m}$. Le choix de ces dimensions s'est imposé pour l'uniformité du champ dans le milieu biologique (effet de bord des électrodes). Les électrodes sont définies comme étant des conducteurs parfaits. Le milieu biologique est quant à lui défini par un parallélépipède de dimension $24 \mu\text{m}$ (Figure IV-33(a)) dans lequel est inséré une cellule de $20 \mu\text{m}$ de diamètre contenant une organelle (Figure IV-33(b)). La cellule ainsi modélisée est définie par une membrane plasmique d'épaisseur 40 nm et de permittivité relative de 1.5 , tandis que l'organelle possède un diamètre de $10 \mu\text{m}$, une membrane de 120 nm d'épaisseur et de permittivité relative 1.5 . Le milieu extracellulaire, le milieu intracellulaire ainsi que celui contenu dans l'organelle sont supposés identiques et caractérisés par une permittivité diélectrique pour de l'eau (modèle de Debye) et une conductivité égale à 1 S/m .

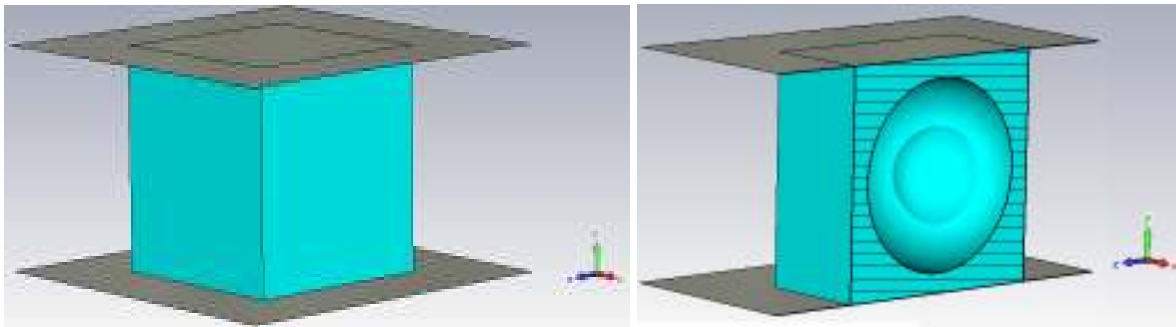


Figure IV-33 : Modèle 3D (a) Vue complète - les deux électrodes sont en gris et le milieu extracellulaire en bleu ; (b) En plan coupe –les deux sphères concentriques représentent la cellule et son organelle.

IV.1.1 Condition aux limites

Des conditions de périodicité n'ont pas pu être positionnées directement sur les faces latérales du modèle vu les dimensions des électrodes. Les conditions aux limites du domaine de calcul sont des murs magnétiques parfaits, ce qui revient à imposer des conditions de symétrie. Les électrodes sont des conducteurs électriques parfaits avec un champ tangentiel à ses surfaces nul. La Figure IV-34 est une capture d'écran présentant le paramétrage des conditions aux limites.

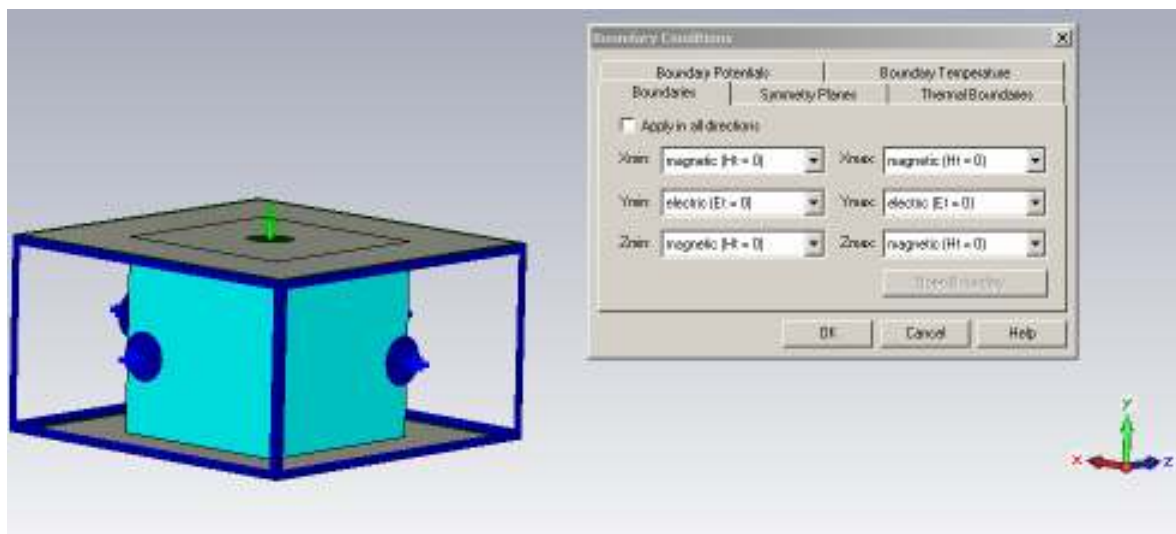


Figure IV-34 : Conditions aux limites définies lors des simulations 3D.

IV.1.2 Maillage et solveur

La définition de potentiel fixe à chacune des électrodes (+1 V, -1 V) et la prise en compte fréquentielle des valeurs de permittivité et de conductivité imposent le choix d'un solveur électro-quasi-statique fréquentiel (« LF Frequency Domain solver »). Le maillage de l'ensemble du modèle s'effectue de façon automatique avec un maillage tétraédrique comme l'illustre la Figure IV-35(vue en coupe).

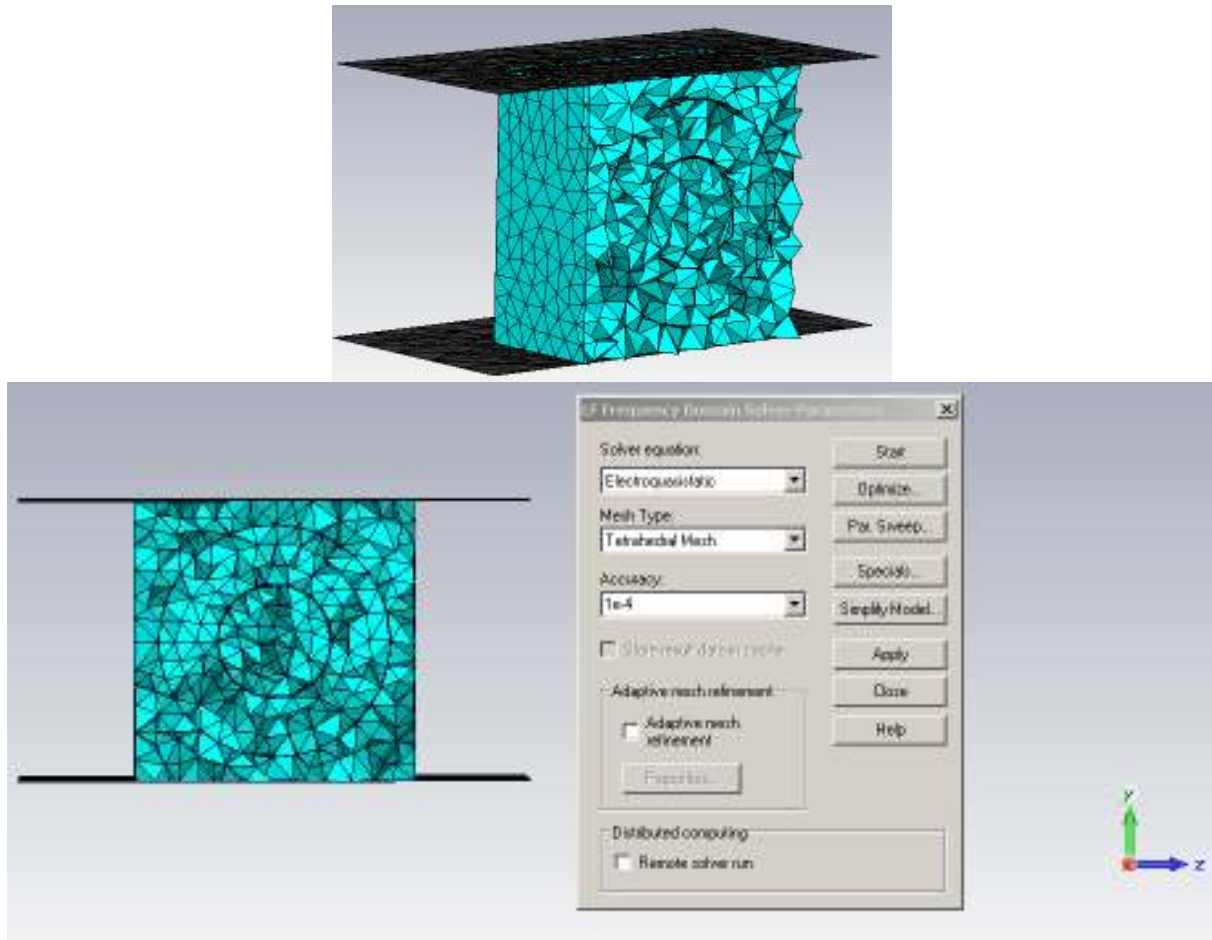


Figure IV-35 : Maillage de la structure utilisé pour les simulations 3D.

IV.2 Comparaison des modèles 2D et 3D

Dans cette partie nous comparons deux réponses : l'une obtenue avec le modèle 2D présenté en début de chapitre et l'autre avec le modèle 3D. La Figure IV-36 présente les profils temporels des PTM de chacun des modèles en réponse à une impulsion de 200 ns et d'amplitude de 1 MV/m. Les profils temporels des deux modèles sont comparables, aussi bien pour la membrane plasmique que pour celle de l'organelle.

Nous remarquons en comparant les PTM plasmiques de chacun des modèles que les fronts de montée de l'impulsion sont moins dégradés par le modèle 3D que le modèle 2D. De plus, les valeurs de PTM plasmique pour le modèle 2D (PTM_{plasm}) peuvent atteindre la valeur maximale de 12 V alors que la valeur maximale du PTM plasmique du modèle 3D (PTM_{plasm} 3D) est de 11.6 V, soit une différence de 3.3%.

De la même façon, les valeurs de PTM pour la membrane de l'organelle sont plus importantes pour le modèle 2D que pour le modèle 3D, les valeurs maximales étant de l'ordre de 3.4 V et 1.7 V respectivement, soit une différence de 50%.

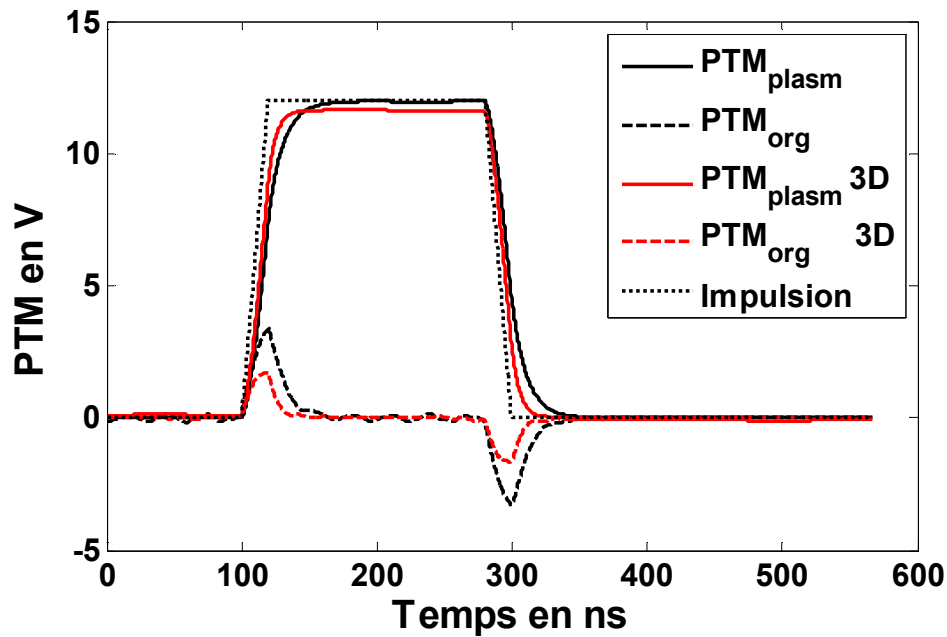


Figure IV-36 : Comparaison de notre modèle 2D avec le modèle 3D obtenu avec un code 3D en réponse à une impulsion de 200 ns et de 1 MV/m.

La Figure IV-37 présente quant à elle la réponse des PTM des deux modèles à une impulsion de même amplitude mais de durée 2 ns. Nous pouvons remarquer dans un premier temps que le PTM de l'organelle est plus important que celui induit dans la membrane plasmique pour les deux modèles. Nous pouvons constater dans un second temps que le PTMplasm 3D est plus important que celui du modèle 2D et inversement le PTMorg 3D est plus faible que celui du modèle 2D.

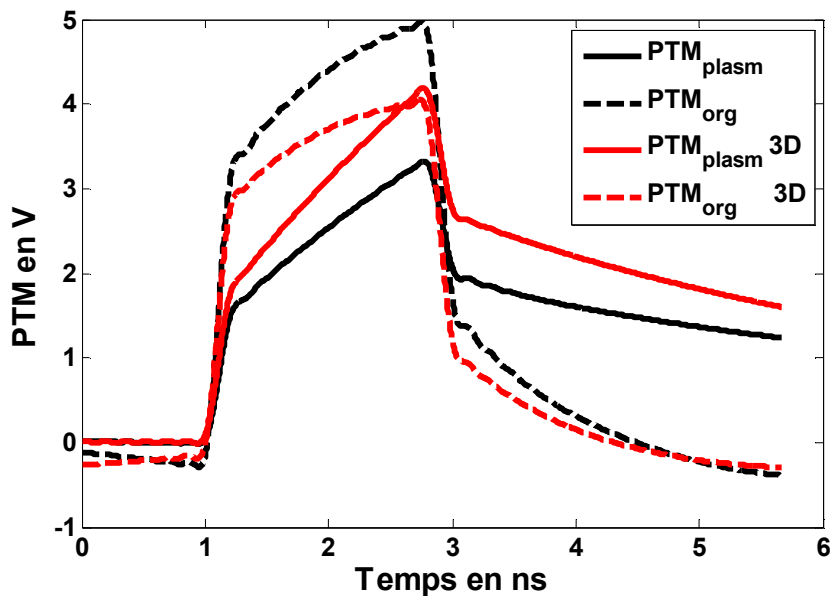


Figure IV-37 : Comparaison de notre modèle 2D avec le modèle 3D obtenu avec un code 3D en réponse à une impulsion de 2 ns et de 1 MV/m.

Dans ce paragraphe nous avons comparé la réponse d'une cellule avec organelle à deux durées d'impulsion, dans une configuration 2D et 3D. Nous avons montré que le modèle 2D permet d'approcher le comportement global du modèle 3D en terme de valeur de PTM, c'est-à-dire, un profil d'impulsion préservé par le PTM_{plasm} , (à l'exception des fronts de monté) et un PTM_{org} peu important en réponse à l'impulsion de 200 ns et de 1 MV/m. Pour l'impulsion de 2 ns et d'amplitude 1 MV/m, un PTM_{org} plus important que le PTM_{plasm} a été observé.

IV.3 Membrane de dimension réaliste-définition d'une membrane équivalente plus épaisse

Jusqu'à présent les membranes qui composent notre modèle sont caractérisées par des épaisseurs de 40 nm et 120 nm avec une permittivité relative égale à 1.5. Dans cette étude nous considérons des épaisseurs de membrane plus réalistes, de 10 nm pour la membrane plasmique et de 30 nm pour celle de l'organelle. Les autres paramètres du modèle restent inchangés.

Ainsi la Figure IV-38, présente les valeurs de PTM induites dans les deux membranes pour l'impulsion de 2 ns et d'amplitude 1 MV/m. Les valeurs de PTM_{org} sont supérieures à celles du PTM_{plasm} , prenant pour valeurs maximales 2.86 V et 1.40 V respectivement.

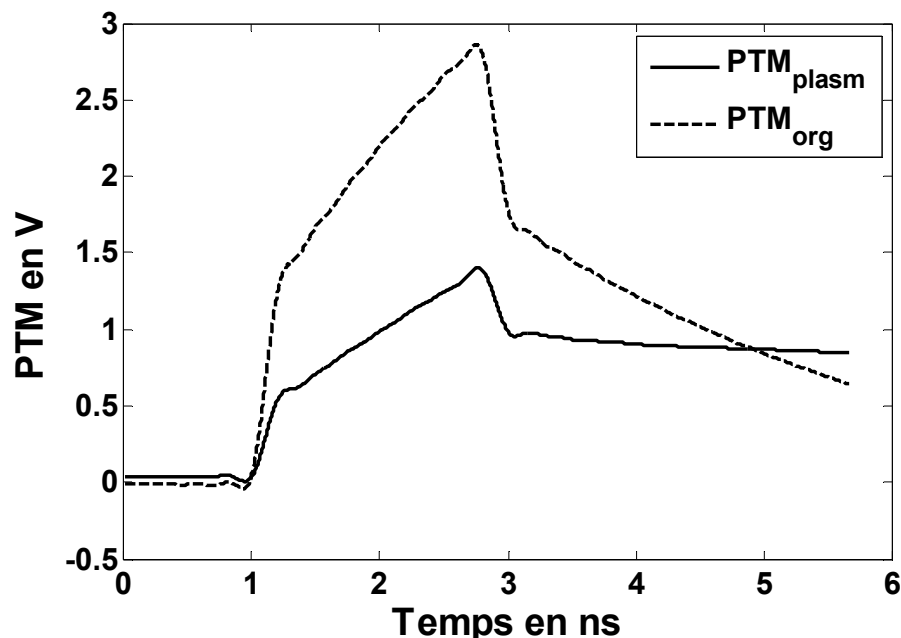


Figure IV-38 : Réponse temporelle des membranes plasmique et de l'organelle d'épaisseurs respectives 10 nm et 30 nm, à une impulsion de 2 ns et d'amplitude 1 MV/m.

Comme nous l'avons présenté dans le Chapitre 2, il est possible de définir une membrane équivalente plus épaisse à partir de la modification de paramètres tels que la permittivité de la membrane.

Nous approchons alors le comportement d'une membrane plasmique fine de 10 nm en modélisant une membrane plus épaisse de 20 nm avec des valeurs de permittivité diélectrique plus grande. Nous avons ainsi déterminé une membrane de 20 nm caractérisée par une permittivité relative égale à 3.2. Elle possède la même réponse qu'une membrane d'épaisseur 10 nm et de permittivité relative de 1.5.

Nous avons effectué la même démarche pour définir une membrane équivalente plus épaisse de la membrane de l'organelle dont l'épaisseur est de 30 nm et la permittivité égale à 1.5. Ainsi, la membrane de l'organelle qui possède une épaisseur de 60 nm et une permittivité de 3.2 constitue un modèle fiable pour approcher le comportement de la membrane d'une organelle ayant une épaisseur de 30 nm et une permittivité de 1.5 comme le montre la Figure IV-39.

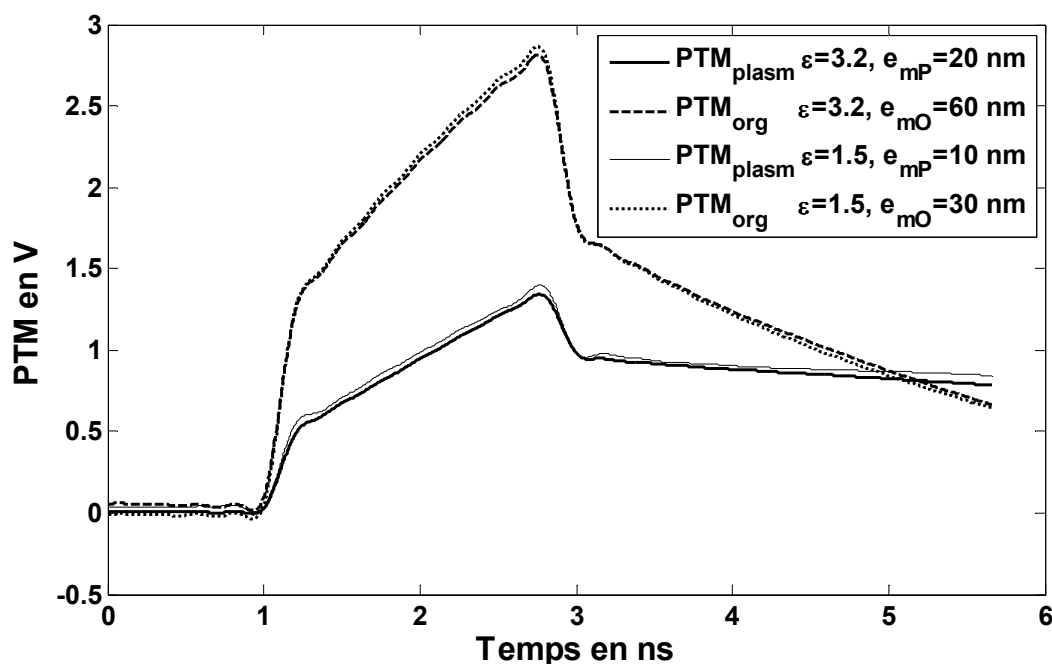


Figure IV-39 : Modèle équivalent de la membrane plasmique et nucléaire plus épaisses

V Conclusion

L'étude fréquentielle de notre modèle 2D avec organelle a permis de mettre en évidence deux comportements fréquentiels. En BF, le champ électrique contourne la cellule, induisant de forte valeur de PTM_{plasm} . Les valeurs de champ étant faibles dans le milieu

intracellulaire, le PTM_{org} est alors nul. En HF, le champ électrique pénètre la cellule et induit un PTM_{plasm} faible par rapport au PTM_{org} . Comme nous le savons l'augmentation des PTM peut s'accompagner du phénomène d'électroporation, afin d'illustrer l'influence de ces pores dans la membrane plasmique nous avons définis un modèle de cellule présentant des trous physiques dans la membrane. Ainsi nous avons montré que les champs dans la cellule et le PTM_{org} sont alors plus importants en BF. En revanche les comportements HF de ces grandeurs ne sont pas modifiés.

Le comportement fréquentielle du modèle 2D de référence nous a permis d'étudier la réponse temporelle de notre modèle à des impulsions de type trapézoïdale. Il en est ressorti que la durée de l'impulsion ainsi que les fronts des impulsions ont un rôle primordial dans les valeurs de PTM induites dans les membranes qui constituent notre modèle. Ainsi plus les durées des impulsions et des temps de montée sont court, plus les champs et PTM induits à la membrane de l'organelle sont importants.

L'approche 3D, nous a permis d'évaluer l'influence de la troisième dimension du modèle sur les valeurs de PTM temporelles en réponse à une impulsion de 200 ns et de 2 ns d'amplitude 1 MV/m. Ainsi, le modèle 2D permet d'approcher le comportement global de la cellule à des impulsions de 200 ns et 2 ns, notamment des valeurs de PTM_{plasm} supérieure au PTM_{org} pour des impulsions longues et le phénomène inverse pour des impulsions courtes. Un modèle 3D nous a permis également d'étudier le comportement temporel de notre modèle de cellule avec organelle mais dont les épaisseurs de membranes ont été fixées à 10 nm et 30 nm pour la membrane plasmique et celle de l'organelle respectivement. De cette façon nous avons pu définir des membranes équivalentes basées sur des membranes plus épaisses, d'épaisseur 20 nm et 60 nm pour la membrane plasmique et celle de l'organelle, toutes deux caractérisées par une permittivité de 3.2. Le modèle ainsi défini possède la même réponse temporelle à l'impulsion de 2 ns que le modèle de cellule de dimensions réalistes. Nous avons ainsi validé notre méthode pour relâcher les contraintes imposées par le ratio épaisseur de membrane/rayon de la cellule.

Conclusion générale

Conclusion générale

Un vif intérêt pour les champs électriques pulsés nanosecondes de très fortes amplitudes (MV/m) s'est développé ces dernières années, avec comme perspectives des applications biomédicales prometteuses. Ce type de signal est appliqué à des milieux biologiques et il possède la propriété de pouvoir affecter le milieu intracellulaire des cellules. Il présente la particularité de pouvoir induire par exemple une perméabilisation des membranes sous-cellulaires, contrairement aux impulsions (ms- μ s, kV/m) utilisées jusqu'alors. Ces dernières affectent principalement la membrane plasmique et interviennent d'ores et déjà dans des protocoles de traitement anticancéreux, connus sous le nom d'électrochimiothérapie.

Cependant les phénomènes et mécanismes mis en jeu lors de l'augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires (électroporation, nanoporation) restent encore mal compris. Ils requièrent des études complémentaires, en particulier au niveau de la modélisation numérique. C'est dans ce contexte que se sont déroulés ces travaux de thèses.

L'étude de ces phénomènes s'effectue à différentes échelles et avec différentes grandeurs significatives. La modélisation des dispositifs expérimentaux repose sur une approche à l'échelle macroscopique. Ces dispositifs généralement constitués d'électrodes permettent d'appliquer des champs électriques à des solutions contenant des cellules biologiques. Le champ appliqué est caractérisé par la différence de potentiel appliquée aux électrodes séparées par une distance d'une centaine de μ m à quelques millimètres.

L'objectif de ce travail de recherche était d'effectuer le lien entre le champ appliqué et celui à l'échelle de la cellule, de sa membrane plasmique et de ses organelles.

Dans un premier chapitre, nous avons positionné l'objet de notre étude. Les effets des impulsions longues (ms- μ s, kV/m) ont été présentés ainsi que le principe à la base des phénomènes observés, à savoir l'électroporation dite « classique » de la membrane plasmique, dont une des principales applications biomédicales est l'électrochimiothérapie.

Concernant les impulsions nanosecondes, une revue de la littérature scientifique montre que leurs effets peuvent être classés en deux catégories, à savoir les effets primaires et secondaires. Concernant les premiers, il a été mis en évidence :

- une perméabilisation de la membrane plasmique qui diffère de l'électroporation classique, notamment par les mécanismes mis en jeu et par la taille des pores,
- une perméabilisation des membranes sous-cellulaire,
- une externalisation immédiate de la phosphatidylserine.

Les effets secondaires concernent par exemple l'augmentation du calcium intracellulaire et l'apoptose. Des premières études ont d'ores et déjà montré l'intérêt des impulsions nanosecondes dans les traitements anticancéreux (destruction des mélanomes, inhibition du développement des tumeurs) mais également dans la décontamination de bactéries telles que l'*Escherichia Coli*.

Nous nous sommes intéressés aux moyens expérimentaux mis en œuvre pour générer les impulsions nanosecondes et pour exposer des milieux biologiques à ces impulsions. Le fonctionnement des générateurs impulsionsnelles hautes tensions et les systèmes d'exposition ont été présentés, en particulier ceux développés à XLIM. Il est possible de générer des impulsions de quelques nanosecondes ainsi que subnanoseconde, avec des tensions de quelques kV à une vingtaine de kV. La forme de ces impulsions nanosecondes peut être modifiée et elles peuvent être synchronisées avec un système d'analyse. Les dispositifs d'exposition reposent sur des électrodes en contact avec le milieu à exposer pour la plupart d'entre eux.

Quelques moyens d'analyse des interactions des impulsions nanosecondes ont été présentés comme la cytométrie en flux et l'emploi de marqueurs variés pour traduire des phénomènes biologiques. Une autre approche est basée sur la dynamique moléculaire qui a permis de mettre en évidence la dynamique de formation des pores, qui d'après la littérature est autour de quelques nanosecondes pour des tailles de pores de quelques nanomètres.

Dans un deuxième chapitre, nous avons exposé la nécessité de définir un modèle de cellule simplifié pour l'étude numérique des champs et potentiels induits à l'échelle de la cellule par une impulsion nanoseconde. Les principaux modèles considérés sont définis par une cellule de forme sphérique possédant une organelle. Les méthodes numériques utilisées jusqu'à présent ont été présentées. Elles reposent par exemple sur des modèles de circuit distribué ou sur la résolution de l'équation de Laplace. De plus, il existe un modèle qui permet d'évaluer la densité de pores engendrée par l'application de champs électriques. Il s'agit de l'équation de Smoluchowski et de sa forme asymptotique.

Nous avons fait le choix d'étudier un modèle de cellule avec organelle par la résolution de l'équation de Laplace avec les différences finies. La méthode développée

est présentée et elle est appliquée à des milieux hétérogènes. Elle présente l'avantage d'être basée sur un algorithme relativement simple et facile à mettre en place. Divers paramètres ont été testés pour en définir et augmenter les performances. Le choix de cette méthode de résolution est justifié par une compatibilité avec nos outils existants au sein du laboratoire, comme par exemple pour la résolution de l'équation de chaleur. La contrainte de l'aspect multi échelle de cette étude peut être surmontée par différentes méthodes dont celle de la définition d'une membrane équivalente plus épaisse.

Dans un troisième chapitre, nous avons analysé l'influence de différents paramètres (physiques, géométriques, et numériques) sur les valeurs de champ dans le milieu extracellulaire, dans la membrane plasmique et sur le potentiel transmembranaire. Le modèle considéré dans cette étude paramétrique est un modèle 1D. De l'évolution fréquentielle de ces grandeurs caractéristiques, il s'est dégagé trois comportements : conducteur en basse fréquence, diélectrique en haute fréquence, et une zone de transition entre les deux comportements principaux.

Deux paramètres se sont détachés lors de cette étude par leur importante influence sur les grandeurs caractéristiques : la permittivité diélectrique de la membrane et l'épaisseur de la membrane. Ce couple épaisseur/permittivité de la membrane a permis de relâcher les contraintes sur la discrétisation spatiale, par la définition d'une membrane équivalente plus épaisse de permittivité plus importante.

La comparaison de ce modèle de cellule (distance inter-électrode peu différent du diamètre de la cellule) avec un modèle représentatif d'un système d'exposition de type microdispositif (distance inter-électrode d'une centaine de μm) a montré pour un même champ appliqué que la réponse de la cellule en termes de champ dans la membrane et de potentiel transmembranaire diffère de la réponse du modèle réduit à l'environnement proche de la cellule. Ainsi il a été mis en évidence l'influence des électrodes sur la réponse de la cellule.

Dans un dernier chapitre, l'analyse du comportement fréquentiel des champs et potentiel d'un modèle de cellule 2D avec une organelle, a permis de mettre en évidence et de confirmer les effets intracellulaires des impulsions nanosecondes. En BF, les champs électriques contournent la cellule et ne pénètrent pas dans la membrane plasmique. Les valeurs de potentiel transmembranaire plasmique sont alors très importantes alors que le potentiel transmembranaire de l'organelle est nul. En HF, le champ électrique atteint le milieu intracellulaire, le potentiel transmembranaire plasmique induit est bien moins

important qu'en BF. A l'inverse, le potentiel transmembranaire de l'organelle augmente pour atteindre des valeurs significatives pouvant engendrer des effets biologiques.

L'étude fréquentielle a été complétée par une étude temporelle de ce modèle. La réponse à deux impulsions trapézoïdales de durées différentes, 200 ns et 2 ns, ont permis de montrer que le potentiel transmembranaire induit à l'organelle est plus important que celui induit à la membrane plasmique pour l'impulsion la plus courte.

Une approche 3D a été introduite pour valider le formalisme d'épaisseur équivalente de la membrane. L'épaisseur de cette dernière a été fixée à 10 nm pour la cellule et à 30 nm pour l'organelle. Après avoir déterminé l'évolution temporelle des potentiels transmembranaires de chacune des membranes en réponse à une impulsion trapézoïdale de 2 ns et d'amplitude 1 MV/m, nous avons défini un modèle avec des membranes deux fois plus épaisses et de permittivité 3.2. La comparaison de la réponse temporelle de ce modèle à la même impulsion de 2 ns et d'amplitude 1 MV/m a permis la validation de notre modèle de membrane plus épaisse. Un article est en cours de rédaction pour valoriser la méthode et ses originalités apportées pour traiter le problème de la cellule biologique.

Une perspective très intéressante de ce travail est la confrontation des modélisations à l'échelle de la cellule avec les expérimentations, en particulier en complétant ce modèle avec la prise en compte de la densité de pore. Des travaux orientés vers de la microdosimétrie ont été initiés dans ce sens au laboratoire. Les premiers résultats expérimentaux montrent la possibilité de quantifier l'élévation de température à l'échelle de la cellule par une technique de microfluorométrie lors de l'exposition à des champs électriques ou électromagnétique. Un article a été soumis très récemment sur ce sujet.

Ce travail de thèse a permis de mettre en place et de valider les outils pour la modélisation à l'échelle de la cellule. Ces outils nous permettent d'une part de définir les impulsions de champ électrique au niveau de la cellule et d'autre part les potentiels transmembranaires. Ces outils sont indispensables pour l'étude des impulsions nanosecondes et plus encore pour les impulsions subnanosecondes permettant d'accéder à la microdosimétrie.

Publications et communications

Revues

T. D. T. Vu, S. Kohler, R. P. O'Connor, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, "Numerical microdosimetry tools for biological cells exposed to Nanosecond Pulsed Electric Fields(nsPEFs)", en cours de soumission.

S. Kohler, **T. D. T. Vu**, R.P. O'Connor, P. Leveque, D. Arnaud-Cormos, "Experimental Microdosimetry Techniques for Biological Cells Exposed to Nanosecond Pulsed Electric Fields Using Microfluorimetry", 15 Oct. 2012, submitted Microwave Theory and Techniques, IEEE Trans. on

Communications internationales

T. D. T. Vu, S. Kohler, D. Arnaud-Cormos, and P. Leveque, "FDTD-based Microdosimetry for high-intensity Nanosecond Pulsed Electric Fields (nsPEFs) application," in Microwave Symposium Digest (MTT), 2012 IEEE MTT-S International, Montréal, Canada, 2012.

S. Kohler, **T. D. T. Vu**, P. T. Vernier, D. Arnaud-Cormos, and P. Leveque, "Characterization of a TEM cell-based setup for the exposure of biological cell suspensions to high-intensity nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs)," in Microwave Symposium Digest (MTT), 2012 IEEE MTT-S International, Montréal, Canada, 2012.

S. Kohler, **T. D. T. Vu**, P. T. Vernier, D. Arnaud-Cormos, and P. Leveque, "Open transverse electromagnetic (tem) cell as applicator of high-intensity nsPEFs and electro-optic measurements," in Power Modulator and High Voltage Conference (IPMHVC), 2012 IEEE International, San Diego, CA USA, 2012.

S. Kohler, **T. D. T. Vu**, D. Arnaud-Cormos and P. Leveque, "Experimental setup for exposure of targets to ultrashort high-intensity pulsed electric fields and simultaneous dosimetric measurements", in 2012 European *Electromagnetics* International Symposium (*EUROEM 2012*), Toulouse, France, 2-6 July 2012

T. D. T. Vu, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, “Modélisation du comportement de milieux biologiques à des nanopulses”, PLUMEE 2011, Deuxième colloque francophone PLUridisciplinaire sur les Matériaux, l’Environnement et l’Electronique, Limoges, 2011.

Communications nationales

T. D. T. Vu, D. Arnaud-Cormos, and P. Leveque, “Modélisation multiphysique d’un milieu dispersif soumis à une onde RF”, CEM2010, 15ième Colloque international et Exposition sur la Compatibilité Electromagnétique, Limoges, France, 2010, pp. C3-2.

Workshop national

T. D. T. Vu, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, “Modélisation du comportement de milieux biologiques à des nanopulses”, workshop étudiant Xlim, Limoges, 2011.

T. D. T. Vu, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, “Modélisation du comportement de milieux biologiques à des nanopulses – état d’avancement”, Journée des doctorants DGA, Mai 2012, Gramat.

T. D. T. Vu, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, “Modélisation du comportement de milieux biologiques à des nanopulses– état d’avancement ”, Journée des doctorants DGA, Mai 2011, Gramat.

T. D. T. Vu, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, “Modélisation du comportement de milieux biologiques à des nanopulses– état d’avancement ”, Journée des doctorants DGA, Mai 2010, Gramat.

Références

Bibliographiques

- [1] « Biologie cellulaire organe cellule procaryote eucaryote Enseignement et recherche Biochimie Université Angers Emmanuel Jaspard ». [Online]. Available: <http://ead.univ-angers.fr/~jaspard/Page2/TexteTD/5TDBioCellL1/1TDComparProEucar/3Figures/2Organites/1Organites.htm>.
- [2] « La cellule, ses organites et leurs fonctions : un cours en ligne complet et illustré de biologie cellulaire pour l'enseignement universitaire ». [Online]. Available: http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/index.htm#item01.
- [3] « Transcription chez les Eucaryotes ». [Online]. Available: <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/transcription/transcription.htm>.
- [4] H. G. L. Coster, « A Quantitative Analysis of the Voltage-Current Relationships of Fixed Charge Membranes and the Associated Property of "Punch-Through" », *Biophys J*, vol. 5, n^o. 5, p. 669-686, sept. 1965.
- [5] W. A. Hamilton et A. J. H. Sale, « Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism of action of the lethal effect », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 148, n^o. 3, p. 789-800, déc. 1967.
- [6] J. M. Crowley, « Electrical Breakdown of Bimolecular Lipid Membranes as an Electromechanical Instability », *Biophysical Journal*, vol. 13, n^o. 7, p. 711-724, juill. 1973.
- [7] Neumann et K. Rosenheck, « Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. », *The Journal of membrane biology*, vol. 10, n^o. 3, p. 279-290, 1972.
- [8] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, et P. H. Hofschneider, « Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. », *EMBO J*, vol. 1, n^o. 7, p. 841-845, 1982.
- [9] P. Scheurich, U. Zimmermann, M. Mischel, et I. Lamprecht, « Membrane fusion and deformation of red blood cells by electric fields », *Z. Naturforsch., C, Biosci.*, vol. 35, n^o. 11-12, p. 1081-1085, déc. 1980.
- [10] U. Zimmermann, « Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 694, n^o. 3, p. 227-277, nov. 1982.
- [11] Q. Zhang, G. V. Barbosa-Cánovas, et B. G. Swanson, « Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization », *Journal of Food Engineering*, vol. 25, n^o. 2, p. 261-281, 1995.

- [12] S. Jeyamkondan, D. S. Jayas, et R. A. Holley, « Pulsed electric field processing of foods: a review », *J. Food Prot.*, vol. 62, n^o. 9, p. 1088-1096, sept. 1999.
- [13] J. Teissie et M. P. Rols, « Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electroporation », *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 140, n^o. 1, p. 258-266.
- [14] M. P. Rols et J. Teissie, « Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. », *Biophys J*, vol. 58, n^o. 5, p. 1089-1098, nov. 1990.
- [15] L. M. Mir, S. Orłowski, J. Belehradek Jr, et C. Paoletti, « Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses », *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, vol. 27, n^o. 1, p. 68-72, 1991.
- [16] G. Serša, M. Čemažar, D. Miklavčič, et L. M. Mir, « Electrochemotherapy: variable anti-tumor effect on different tumor models », *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 35, n^o. 1-2, p. 23-27, nov. 1994.
- [17] L. M. Mir, L. F. Glass, G. Sersa, J. Teissié, C. Domenge, D. Miklavcic, M. J. Jaroszeski, S. Orłowski, D. S. Reintgen, Z. Rudolf, M. Belehradek, R. Gilbert, M. P. Rols, J. Belehradek, J. M. Bachaud, R. DeConti, B. Stabuc, M. Cemazar, P. Coninx, et R. Heller, « Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. », *Br J Cancer*, vol. 77, n^o. 12, p. 2336-2342, juin 1998.
- [18] K. H. Schoenbach, S. Katsuki, R. H. Stark, E. S. Buescher, et S. J. Beebe, « Bioelectrics-new applications for pulsed power technology », *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 30, n^o. 1, p. 293 -300, févr. 2002.
- [19] Y.-H. W. Tina Batista Napotnik, « Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells. », *Bioelectromagnetics*, vol. 33, n^o. 3, p. 257-64, 2012.
- [20] R. Davalos, L. Mir, et B. Rubinsky, « Tissue ablation with irreversible electroporation », *Annals of biomedical engineering*, vol. 33, n^o. 2, p. 223–231, 2005.
- [21] E. Maor, A. Ivorra, et B. Rubinsky, « The Effect of Irreversible Electroporation on Blood Vessels », *Technology in Cancer Research and Treatment*, vol. 6, n^o. 4, p. 307-312, août 2007.
- [22] G. Sersa, D. Miklavcic, M. Cemazar, Z. Rudolf, G. Pucihar, et M. Snoj, « Electrochemotherapy in treatment of tumours », *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, vol. 34, n^o. 2, p. 232-240, févr. 2008.

- [23] F. M. André, J. Gehl, V. Sersa, et V. Prétat, « Efficiency of high- and low voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. », n°. 19, p. 1261-1271, nov. 2008.
- [24] K. Schoenbach, R. Joshi, R. Stark, F. Dobbs, et S. Beebe, « Bacterial decontamination of liquids with pulsed electric fields », *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 7, n°. 5, p. 637–645, 2000.
- [25] S. Katsuki, K. Moreira, F. Dobbs, R. P. Joshi, et K. H. Schoenbach, « Bacterial decontamination with nanosecond pulsed electric fields », in *Power Modulator Symposium, 2002 and 2002 High-Voltage Workshop. Conference Record of the Twenty-Fifth International*, 2002, p. 648- 651.
- [26] W. Frey, J. White, R. Price, P. Blackmore, R. Joshi, R. Nuccitelli, S. Beebe, K. Schoenbach, et J. Kolb, « Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure », *Biophysical journal*, vol. 90, n°. 10, p. 3608–3615, 2006.
- [27] B. L. Ibey, S. Xiao, K. H. Schoenbach, M. R. Murphy, et A. G. Pakhomov, « Plasma membrane permeabilization by 60 - and 600 - ns electric pulses is determined by the absorbed dose », *Bioelectromagnetics*, vol. 30, n°. 2, p. 92-99, févr. 2009.
- [28] A. G. Pakhomov, R. Shevin, J. A. White, J. F. Kolb, O. N. Pakhomova, R. P. Joshi, et K. H. Schoenbach, « Membrane permeabilization and cell damage by ultrashort electric field shocks », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 465, n°. 1, p. 109-118, sept. 2007.
- [29] J. Deng, K. H. Schoenbach, E. Stephen Buescher, P. S. Hair, P. M. Fox, et S. J. Beebe, « The effects of intense submicrosecond electrical pulses on cells », *Biophysical journal*, vol. 84, n°. 4, p. 2709–2714, 2003.
- [30] K. H. Schoenbach, S. J. Beebe, et E. S. Buescher, « Intracellular effect of ultrashort electrical pulses », *Bioelectromagnetics*, vol. 22, n°. 6, p. 440-448, sept. 2001.
- [31] P. T. Vernier, M. J. Ziegler, Y. Sun, W. V. Chang, M. A. Gundersen, et D. P. Tieleman, « Nanopore Formation and Phosphatidylserine Externalization in a Phospholipid Bilayer at High Transmembrane Potential », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, n°. 19, p. 6288-6289, mai 2006.
- [32] P. T. Vernier, Y. Sun, L. Marcu, S. Salemi, C. M. Craft, et M. A. Gundersen, « Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses », *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 310, n°. 2, p. 286–295, 2003.
- [33] P. T. Vernier, Y. Sun, L. Marcu, C. M. Craft, et M. A. Gundersen, « Nanosecond pulsed electric fields perturb membrane phospholipids in T lymphoblasts », *FEBS letters*, vol. 572, n°. 1-3, p. 103–108, 2004.

- [34] Q. Zhou, J. Zhao, J. G. Stout, R. A. Luhm, T. Wiedmer, et P. J. Sims, « Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 29, p. 18240-18244, juill. 1997.
- [35] P. T. Vernier, Y. Sun, M.-T. Chen, M. A. Gundersen, et G. L. Craviso, « Nanosecond electric pulse-induced calcium entry into chromaffin cells », *Bioelectrochemistry*, vol. 73, n° 1, p. 1-4, juin 2008.
- [36] E. S. Buescher, R. R. Smith, et K. H. Schoenbach, « Submicrosecond intense pulsed electric field effects on intracellular free calcium: mechanisms and effects », *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 32, n° 4, p. 1563- 1572, août 2004.
- [37] S. S. Scarlett, J. A. White, P. F. Blackmore, K. H. Schoenbach, et J. F. Kolb, « Regulation of intracellular calcium concentration by nanosecond pulsed electric fields », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1788, n° 5, p. 1168-1175, mai 2009.
- [38] F. BERGER, « L'apoptose ou mort programmée ». [Online]. Available: http://www.uvp5.univ-paris5.fr/wikinu/docvideos/Grenoble_1011/berger_francois/berger_francois_p01/berger_francois_p01.pdf.
- [39] « Apoptose ». [Online]. Available: <http://facmed.univ-rennes1.fr/resped//s/biochimie/moleculaire/Apoptose2005-1.pdf>.
- [40] E. H. Hall, K. H. Schoenbach, et S. J. Beebe, « Nanosecond pulsed electric fields induce apoptosis in p53-wildtype and p53-null HCT116 colon carcinoma cells », *Apoptosis*, vol. 12, n° 9, p. 1721-1731, sept. 2007.
- [41] S. J. Beebe, P. M. Fox, L. J. Rec, E. L. K. Willis, et K. H. Schoenbach, « Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells », *FASEB J*, vol. 17, n° 11, p. 1493-1495, janv. 2003.
- [42] P. T. Vernier, A. Li, L. Marcu, C. M. Craft, et M. A. Gundersen, « Ultrashort pulsed electric fields induce membrane phospholipid translocation and caspase activation: differential sensitivities of Jurkat T lymphoblasts and rat glioma C6 cells », *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 10, n° 5, p. 795–809, 2003.
- [43] R. Nuccitelli, U. Pliquett, X. Chen, W. Ford, R. James Swanson, S. J. Beebe, J. F. Kolb, et K. H. Schoenbach, « Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 343, n° 2, p. 351-360, mai 2006.

- [44] S. J. Beebe, P. Fox, L. Rec, K. Somers, R. H. Stark, et K. H. Schoenbach, « Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition », *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 30, n^o. 1, p. 286–292, 2002.
- [45] M. Stacey, J. Stickley, P. Fox, V. Statler, K. Schoenbach, S. . Beebe, et S. Buescher, « Differential effects in cells exposed to ultra-short, high intensity electric fields: cell survival, DNA damage, and cell cycle analysis », *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 542, n^o. 1-2, p. 65-75, déc. 2003.
- [46] S. Perni, P. R. Chalise, G. Shama, et M. G. Kong, « Bacterial cells exposed to nanosecond pulsed electric fields show lethal and sublethal effects », *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 120, n^o. 3, p. 311-314, déc. 2007.
- [47] M. Weiner, A. H. Kim, et L. J. Bovino, « Asynchronous marx generator utilizing photoconductive semiconductor switches », U.S. Patent 490094713-févr-1990.
- [48] H. Heo, S. S. Park, S. C. Kim, J. H. Seo, S. H. Kim, O. R. Choi, S. H. Nam, D. W. Choi, J. Y. Kim, W. S. Lee, J. H. So, et W. Jang, « Compact Marx generator for repetitive applications », in *Pulsed Power Conference, 2007 16th IEEE International*, 2007, vol. 1, p. 874 -876.
- [49] M. Rebersek, M. Kranjc, D. Pavliha, T. Batista-Napotnik, D. Vrtacnik, S. Amon, et D. Miklavcic, « Blumlein configuration for high-repetition-rate pulse generation of variable duration and polarity using synchronized switch control », *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 56, n^o. 11, p. 2642-2648, nov. 2009.
- [50] J. Sevick, « A simplified analysis of the broadband transmission line transformer », *High Frequency Electronics*, vol. 3, n^o. 2, p. 48–53, 2004.
- [51] K. H. Schoenbach, R. P. Joshi, J. F. Kolb, N. Chen, M. Stacey, P. F. Blackmore, E. S. Buescher, et S. J. Beebe, « Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells », *Proceedings of the IEEE*, vol. 92, n^o. 7, p. 1122–1137, 2004.
- [52] M. Behrend, A. Kuthi, X. Gu, P. T. Vernier, L. Marcu, C. M. Craft, et M. A. Gundersen, « Pulse generators for pulsed electric field exposure of biological cells and tissues », *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 10, n^o. 5, p. 820 - 825, oct. 2003.
- [53] S. El Amari, A. De Angelis, D. Arnaud-Cormos, V. Couderc, et P. Leveque, « Characterization of a Linear Photoconductive Switch Used in Nanosecond Pulsed Electric Field Generator », *IEEE Photonics Technology Letters*, vol. 23, n^o. 11, p. 673 - 675, juin 2011.

- [54] M. Kenaan, « Characterization of a 50- Ω exposure setup for high-voltage nanosecond pulsed electric field bioexperiments », 2011.
- [55] M. Kenaan, « Développement d'applicateurs pour étudier le comportement des cellules biologiques soumises à des impulsions électromagnétiques ultracourtes », Thèse de doctorat, [s.n.], [S.I.], 2010.
- [56] S. El Amari, M. Kenaan, C. Merla, B. Vergne, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, et V. Couderc, « Kilovolt, Nanosecond, and Picosecond Electric Pulse Shaping by Using Optoelectronic Switching », *IEEE Photonics Technology Letters*, vol. 22, n^o. 21, p. 1577-1579, nov. 2010.
- [57] S. EL AMARI, « Développement et caractérisation de générateur optoélectronique d'impulsions de champ électrique nanoseconde et subnanoseconde de forte intensité : application au domaine biomédical », thesis, Université de Limoges.
- [58] « L'historique de l'électrochimiothérapie ». [Online]. Available: http://www.igr.fr/service.php?p_m=download&p_file=institut/pdf/annexe_hist_electrochimiotherapie.pdf.
- [59] A. G. Pakhomov, J. F. Kolb, J. A. White, R. P. Joshi, S. Xiao, et K. H. Schoenbach, « Long - lasting plasma membrane permeabilization in mammalian cells by nanosecond pulsed electric field (nsPEF) », *Bioelectromagnetics*, vol. 28, n^o. 8, p. 655-663, déc. 2007.
- [60] J. F. Kolb, S. Kono, et K. H. Schoenbach, « Nanosecond pulsed electric field generators for the study of subcellular effects », *Bioelectromagnetics*, vol. 27, n^o. 3, p. 172-187, 2006.
- [61] J. Villemejeane, G. Mottet, O. Français, B. Le Pioufle, J.-P. Lefèvre, M. Woytasik, E. Dufour-Gergam, et L. M. Mir, « Nanomanipulation of Living Cells on a Chip Using Electric Field: General Concepts and Microdevices », in *Proceedings of the 2010 Fifth IEEE International Symposium on Electronic Design, Test & Applications*, Washington, DC, USA, 2010, p. 229-232.
- [62] Claire Dalmay, Julien Villemejeane, Vanessa Joubert, Olivier Français, Lluís M. Mir, et Bruno Le Pioufle, « Design and realization of a microfluidic device devoted to the application of ultra-short pulses of electrical field to living cells », *Sens Actuators B Chem*, vol. 160, n^o. 1, p. 1573-1580, déc. 2011.
- [63] C. Dalmay, J. Villemejeane, V. Joubert, A. Silve, D. Arnaud-Cormos, O. Français, L. M. Mir, P. Leveque, et B. Le Pioufle, « A microfluidic biochip for the nanoporation of living cells », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, n^o. 12, p. 4649-4655, août 2011.

- [64] S. Kohler, T. D. T. Vu, P. T. Vernier, P. Leveque, et D. Arnaud-Cormos, « Characterization of a TEM cell-based setup for the exposure of biological cell suspensions to high-intensity nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) », in *Microwave Symposium Digest (MTT), 2012 IEEE MTT-S International*, 2012, p. 1 -3.
- [65] [Online]. Available: http://www.crcjussieu.fr/doku/doku.php?id=fr:bioressources:lignes_cellulaires.
- [66] J. P. Mather et P. E. Roberts, *Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique*. Springer, 1998.
- [67] W. Zhao, R. Yang, H. Q. Zhang, W. Zhang, X. Hua, et Y. Tang, « Quantitative and real time detection of pulsed electric field induced damage on Escherichia coli cells and sublethally injured microbial cells using flow cytometry in combination with fluorescent techniques », *Food Control*, vol. 22, n°. 3-4, p. 566-573, mars 2011.
- [68] S. J. Beebe, P. Fox, L. Rec, L. Willis, et K. Schoenbach, « Nanosecond pulsed electric field effects on human cells », p. 652-656.
- [69] N. Chen, K. H. Schoenbach, J. F. Kolb, R. James Swanson, A. L. Garner, J. Yang, R. P. Joshi, et S. J. Beebe, « Leukemic cell intracellular responses to nanosecond electric fields », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 317, n°. 2, p. 421-427, avr. 2004.
- [70] K. H. Schoenbach, R. Joshi, J. Kolb, S. Buescher, et S. Beebe, « Subcellular effects of nanosecond electrical pulses », *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, vol. 7, p. 5447-5450, 2004.
- [71] M. Tarek, « Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation », *Biophysical journal*, vol. 88, n°. 6, p. 4045-4053, 2005.
- [72] U. Pliquet, R. P. Joshi, V. Sridhara, et K. H. Schoenbach, « High electrical field effects on cell membranes », *Bioelectrochemistry*, vol. 70, n°. 2, p. 275-282, mai 2007.
- [73] P. T. Vernier et M. J. Ziegler, « Nanosecond Field Alignment of Head Group and Water Dipoles in Electroporating Phospholipid Bilayers », *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, n°. 45, p. 12993-12996, 2007.
- [74] R. Joshi et K. Schoenbach, « Electroporation dynamics in biological cells subjected to ultrafast electrical pulses: A numerical simulation study », *Physical review E*, vol. 62, n°. 1, p. 1025, 2000.
- [75] M. J. Ziegler et P. T. Vernier, « Interface Water Dynamics and Porating Electric Fields for Phospholipid Bilayers », *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, n°. 43, p. 13588-13596, 2008.

- [76] M. Breton, L. Delemotte, A. Silve, L. M. Mir, et M. Tarek, « Transport of siRNA through Lipid Membranes Driven by Nanosecond Electric Pulses: An Experimental and Computational Study », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n^o. 34, p. 13938-13941, août 2012.
- [77] N. Demierre, « Continuous-flow separation of cells in a lab-on-a-chip using “liquid electrodes” and multiple-frequency dielectrophoresis ».
- [78] M. Liberti, F. Apollonio, C. Merla, et G. d’ Inzeo, « Microdosimetry in the Microwave Range: A Quantitative Assessment at Single Cell Level », *IEEE Antennas and Wireless Propagation Letters*, vol. 8, p. 865-868, 2009.
- [79] C. Merla, M. Liberti, F. Apollonio, et G. d’ Inzeo, « Quantitative assessment of dielectric parameters for membrane lipid bi-layers from RF permittivity measurements », *Bioelectromagnetics*, vol. 30, n^o. 4, p. 286-298, mai 2009.
- [80] E. Salimi, G. E. Bridges, et D. J. Thomson, « The effect of dielectric relaxation in nanosecond pulse electroporation of biological cells », in *2010 14th International Symposium on Antenna Technology and Applied Electromagnetics & the American Electromagnetics Conference (ANTEM-AMEREM)*, 2010, p. 1-4.
- [81] K. C. Smith, T. R. Gowrishankar, A. T. Esser, D. A. Stewart, et J. C. Weaver, « The Spatially Distributed Dynamic Transmembrane Voltage of Cells and Organelles due to 10 ns Pulses: Meshed Transport Networks », *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 34, n^o. 4, p. 1394-1404, août 2006.
- [82] T. Kotnik et D. Miklavcic, « Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields », *Biophysical journal*, vol. 90, n^o. 2, p. 480–491, 2006.
- [83] Z. Vasilkoski, A. T. Esser, T. Gowrishankar, et J. C. Weaver, « Membrane electroporation: The absolute rate equation and nanosecond time scale pore creation », *Physical Review E*, vol. 74, n^o. 2, p. 021904, 2006.
- [84] Chenguo Yao, Yan Mi, Chengxiang Li, Xiaoqian Hu, Xin Chen, et Caixin Sun, « Study of Transmembrane Potentials on Cellular Inner and Outer Membrane—Frequency Response Model and Its Filter Characteristic Simulation », *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 55, n^o. 7, p. 1792-1799, juill. 2008.
- [85] Q. Hu, S. Viswanadham, R. P. Joshi, K. H. Schoenbach, S. J. Beebe, et P. F. Blackmore, « Simulations of transient membrane behavior in cells subjected to a high-intensity ultrashort electric pulse », *Phys. Rev. E*, vol. 71, n^o. 3, p. 031914, mars 2005.

- [86] R. P. Joshi, Q. Hu, et K. H. Schoenbach, « Modeling studies of cell response to ultrashort, high-intensity electric fields-Implications for intracellular manipulation », *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 32, n^o. 4, p. 1677–1686, 2004.
- [87] T. R. Gowrishankar et J. C. Weaver, « An approach to electrical modeling of single and multiple cells », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, n^o. 6, p. 3203 -3208, mars 2003.
- [88] K. C. Smith et J. C. Weaver, « Active Mechanisms Are Needed to Describe Cell Responses to Submicrosecond, Megavolt-per-Meter Pulses: Cell Models for Ultrashort Pulses », *Biophysical Journal*, vol. 95, n^o. 4, p. 1547-1563, août 2008.
- [89] R. P. Joshi, Q. Hu, K. H. Schoenbach, et V. K. Lakdawala, « Modeling studies of cellular response to ultrashort, high-intensity electric fields », in *Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena, 2003*, 2003, p. 357- 360.
- [90] K. S. Cole et R. H. Cole, « Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics », *The Journal of Chemical Physics*, vol. 9, n^o. 4, p. 341-351, avr. 1941.
- [91] H. Schwan, « Biological effects of non-ionizing radiations: Cellular properties and interactions », *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 16, n^o. 3, p. 245-263, 1988.
- [92] T. Kotnik, « Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields—a method for theoretical analysis and its application », *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 45, p. 3-16, mars 1998.
- [93] P. Ellappan et R. Sundararajan, « A simulation study of the electrical model of a biological cell », *Journal of Electrostatics*, vol. 63, n^o. 3-4, p. 297-307, mars 2005.
- [94] Yafang Tan, Minghe Wu, Hongchun Yang, et Jun Xu, « The impact of pulse duration on cell membranes and equivalent circuit », in *2010 International Conference on Microwave and Millimeter Wave Technology (ICMMT)*, 2010, p. 1856-1858.
- [95] H. L. Gerber, R. P. Joshi, et C. C. Tseng, « Using Bode Plots to Access Intracellular Coupling », *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 36, n^o. 4, p. 1659-1664, août 2008.
- [96] H. L. Gerber, A. Bassi, et C. C. Tseng, « Determining a Pulse Coupling to Subcellular Components With a Frequency-Domain Transfer Function », *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 34, n^o. 4, p. 1425-1430, août 2006.
- [97] T. Kotnik et D. Miklavcic, « Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields », *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 47, p. 1074-1081, août 2000.

- [98] D. A. Stewart, T. R. Gowrishankar, et J. C. Weaver, « Transport Lattice Approach to Describing Cell Electroporation: Use of a Local Asymptotic Model », *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. VOL. 32, n°. NO. 4,, p. 1696-1708, août 2004.
- [99] T. R. Gowrishankar, A. T. Esser, Z. Vasilkoski, K. C. Smith, et J. C. Weaver, « Microdosimetry for conventional and supra-electroporation in cells with organelles », *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, p. 1266–1276, 2006.
- [100] T. Kotnik et D. Miklavčič, « Analytical Description of Transmembrane Voltage Induced by Electric Fields on Spheroidal Cells », *Biophysical Journal*, vol. 79, n°. 2, p. 670-679, août 2000.
- [101] Q. Hu et R. P. Joshi, « Transmembrane voltage analyses in spheroidal cells in response to an intense ultrashort electrical pulse », *Phys. Rev. E*, vol. 79, n°. 1, p. 011901, janv. 2009.
- [102] G. Pucihar, T. Kotnik, B. Valic, et D. Miklavcic, « Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells », *Ann Biomed Eng*, vol. 34, n°. 4, p. 642-652, avr. 2006.
- [103] M. CUEILLE, « Contribution à la modélisation multiphysique, électromagnétique, thermique et hydrodynamique, appliquée à la dosimétrie des systèmes d'exposition aux rayonnements électromagnétiques non ionisants. », Université de Limoges, 2007.
- [104] M. Cueille, A. Collin, C. Pivain, et P. Leveque, « Development of a numerical model connecting electromagnetism, thermal and hydrodynamics to analyse in vitro exposure system », *annals of telecommunications - annales des télécommunications*, vol. 63, n°. 1-2, p. 17-28, janv. 2008.
- [105] D. Asfaux, « Contribution à l'étude de la modélisation de structures composites. Application à la pénétration d'une impulsion électromagnétique dans une structure composite représentative des technologies de matériaux aéronautiques », Thèse de doctorat, Université de Limoges, 1993.
- [106] J. P. Berenger, « Plaques minces aux différences finies ». 6ième colloque international et exposition sur la compatibilité électromagnétique, juin-1992.



Titre : «Contribution à la modélisation du comportement électromagnétique de milieux biologiques exposés à des impulsions de champ électrique nanosecondes ».

Résumé : Ces dernières années l'intérêt des scientifiques pour les effets des champs pulsés sur les milieux biologiques se dirige vers des impulsions de très courtes durées (ns) et de très fortes amplitudes (MV/m). Ces impulsions affectent d'avantage le milieu intracellulaire que la membrane plasmique, par opposition aux impulsions ms- μ s d'amplitude plusieurs kV/m qui sont employées dans des traitements anticancéreux pour leurs effets sur la membrane plasmique.

Ce travail de thèse a permis de mettre en place et de valider les outils pour la modélisation à l'échelle de la cellule. Ces outils nous permettent d'une part de définir les impulsions de champ électrique au niveau de la cellule et d'autre part les potentiels transmembranaires. Un modèle numérique qui repose sur une approche quasi-statique avec une résolution en différences finies a été définie. Cette approche a permis de mettre en évidence l'influence de la distance inter électrode des systèmes d'exposition (microdispositif) sur le champ local (au voisinage de la cellule). La définition d'un modèle de membrane équivalent d'épaisseur plus importante a permis de pallier à la contrainte qu'impose le rapport d'échelle épaisseur de membrane-diamètre de la cellule sur le pas de discrétisation. Ces outils sont indispensables pour l'étude des impulsions nanosecondes et plus encore pour les impulsions subnanosecondes permettant d'accéder à la microdosimétrie.

Mots-clés : Bioélectromagnétisme, champ électrique pulsé nanoseconde, différences finies, multi-échelle, potentiel transmembranaire, membrane équivalente, champ électrique local.

Title: «Contribution to the modeling of the electromagnetic behavior of biological systems exposed to nanosecond electric field pulses»

Abstract: In the last few years, the interest of the scientists focus on the nanosecond pulsed electric field effect on biological media, characterized by short duration in the nanosecond range and megavolt per meter amplitude. Contrary to classical pulses in the millisecond range of several kV/m, which are used in tumor treatments for their effects on the plasmic membrane, nsPEFs allow targeting intracellular structures rather than the plasmic membrane.

This thesis has set up and validates tools for modeling at cell scale. These tools provide on the one hand to define the electric field pulses at the cell level and on the other hand the transmembrane potentials. A numerical model based on a quasi-static approach with a finite differences method resolution has been defined. This approach stresses the influence of the exposure systems electrodes gap on the local field (in the vicinity of the cell). The definition of an equivalent membrane model of greater thickness permitted to overcome the constraint imposed by the scale ratio membrane thickness-diameter of the cell on the model mesh. These tools are necessary for the nanosecond and also subnanosecond pulses microdosimetric study.

Keywords: Bioelectromagnetism, nsPEF, numerical method, finite difference method, multi-scale, Transmembrane Potential (TMP), equivalent membrane, local field.

