

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

ÉCOLE DOCTORALE N° 521 - Sciences et Ingénierie pour l'Information,
Mathématiques

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

Année : 2013

Thèse N° 43-2013

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Électronique des Hautes Fréquences, Photonique et Systèmes

présentée et soutenue par

Sophie KOHLER

le 15 novembre 2013

**Contribution au développement et à la dosimétrie
multi-échelles de dispositifs pour l'exposition de
cellules biologiques à des impulsions électriques
nanosecondes et subnanosecondes de haute intensité**

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

JURY :

Président :

M. Bernard VEYRET

Directeur de recherche CNRS

Laboratoire IMS CNRS /EPHE - Université Bordeaux 1, Bordeaux

Rapporteurs :

M. Jean PAILLOL

Professeur des universités

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

M. Ronan SAULEAU

Professeur des universités

Laboratoire IETR UMR CNRS 6164 - Université de Rennes 1, Rennes

Examineurs :

M. Dominique BAILLARGEAT

Professeur des universités

XLIM CNRS - Université de Limoges, Limoges

M. Aurélien BANCAUD

Chargé de recherche CNRS

Laboratoire UPR8001/CNRS/LAAS, Toulouse

M. Ronny BRANDENBURG

Research Program Manager

Leibniz Institute for Plasma Science and Technology, Greifswald (Allemagne)

Encadrants :

Mme Delia ARNAUD-CORMOS

Maître de conférence

XLIM CNRS - Université de Limoges, Limoges

M. Philippe LEVEQUE

Directeur de recherche CNRS

XLIM CNRS - Université de Limoges, Limoges

École doctorale Sciences et Ingénierie pour l'Information, Mathématiques
33, rue François Mitterrand
87032 Limoges

XLIM UMR CNRS n°7252
123, avenue Albert Thomas
87060 Limoges cedex

« *Ce qui embellit le désert, dit le petit prince, c'est qu'il
cache un puits quelque part...* »
— Antoine de Saint-Exupéry, *Le Petit Prince*, 1943

À Jeanne, Claude, Caroline et Florian

Remerciements

Dans le cadre de mes trois années de thèse, je souhaiterais tout d'abord remercier M. Philippe Lévêque et Mme Delia Arnaud-Cormos, respectivement directeur de recherche au CNRS et maître de conférence, pour m'avoir accueillie au sein leur équipe « Bioélectrophotonique » de l'institut de recherche XLIM. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée ainsi que votre encadrement scientifique. J'ai véritablement apprécié l'opportunité offerte de m'investir sur une thématique aussi innovante que passionnante, et recouvrant un tel spectre de l'électronique.

J'adresse également mes sincères remerciements à MM. Jean Paillol et Ronan Sauleau, respectivement professeur des universités à l'université de Pau et des Pays de l'Adour et professeur des universités à l'université de Rennes 1, pour avoir accepté d'être rapporteur de mes travaux.

Mes sincères remerciements à M. Bernard Veyret, directeur de recherche au laboratoire IMS CNRS/EPHE (Bordeaux), pour m'avoir fait l'honneur de sa présence en tant que président du jury (et ce malgré les difficultés de transport de dernière minute). Pareillement, je remercie chaleureusement M. Aurélien Bancaud, chargé de recherche au laboratoire UPR8001/CNRS/LAAS (Toulouse), M. Ronny Brandenburg, chercheur au Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (Greifswald, Allemagne) et M. Dominique Baillargeat, professeur des universités à l'université de Limoges et nouveau directeur de XLIM, pour leur participation au jury en tant qu'examinateur.

Je tiens également à remercier les personnes extérieures à XLIM avec lesquelles j'ai eu le plaisir de collaborer durant la thèse : Pierre Jarrige, alors doctorant au sein du laboratoire IMEP-LAHC et de la société Kapteos (Bourget-du-Lac) ainsi que son directeur de thèse M. Lionel Duvillaret ; Mme Mihaela G. Moiescu et M. Tudor Savopol, de l'université de médecine et de pharmacie Carol Davila (Bucarest, Roumanie) ; Zack Levine et Ming-Chak Ho, alors doctorants à l'université de Californie du Sud (Los Angeles, USA) et M. P. Thomas Vernier, actuellement chercheur à l'université Old Dominion (Norfolk, USA).

De retour à XLIM, j'exprime ma profonde gratitude à Rodney O'Connor, chaire d'excellence biophysique et santé au sein du LABEX Σ -Lim-XLIM, pour ses réponses aux questions de la novice en biologie que je suis. Merci à Ludovic Martin, alors post-doctorant, et Marie-Laure Perrin, experte en culture cellulaire, pour leur bonne humeur et pour avoir permis les toutes premières expositions de cellules au sein de notre salle de manip' (!). Merci également aux derniers arrivants – Malak, Sylvia et Sergii – pour leur sympathie et grande motivation. J'ai hâte de voir où nos travaux d'équipe vont nous mener !

Mille merci à Nadine Aymard pour sa grande gentillesse et son efficacité face aux (abondantes) tâches administratives. C'est un bonheur de travailler avec toi!

Et bien sûr, *grazie mille* à mes ex-collègues d'équipe : Nico, Thao, Annali, Saâd, Momo et Cate. ★ Vous êtes géniaux ★ !!

Un grand merci également aux amis de longue date, pour leur soutien (malgré les centaines++ de kilomètres qui nous séparent) et pour tous les souvenirs qu'on a construits ensemble. Je sais que vous vous reconnaitrez ;)

Pour finir, un grand GRAND merci à la famille! Merci à mes parents de m'avoir toujours laissé le choix, et donné l'opportunité, de suivre la voie que je souhaitais. Merci aussi pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises :). *Mārsi vielmols!* Et je ne terminerais pas sans un clin d'oeil tout spécial à ma sœur – qui entame sa troisième année de thèse, et à mon p'tit frère – qui débute sa vie d'étudiant : bon couraaage les frangins! ♡

Table des matières

Table des figures	11
Liste des tableaux	17
Avant-propos	19
Chapitre 1 Les impulsions électriques comme manipulateurs de cellules biologiques	25
1.1 Interaction champ électrique-matière : notions fondamentales	27
1.1.1 Le champ électrique : généralités	27
1.1.1.1 Les équations de Maxwell	27
1.1.1.2 Les champs électriques statiques	28
1.1.1.3 Les champs électromagnétiques	30
1.1.1.4 Les champs électriques pulsés	32
1.1.2 Milieu conducteur soumis à un champ électrostatique	34
1.1.3 Milieu diélectrique soumis à un champ électrostatique	34
1.1.3.1 Cas des milieux diélectriques polaires	34
1.1.3.2 Cas des milieux diélectriques apolaires	36
1.1.3.3 Notion de permittivité	36
1.1.4 Milieu diélectrique soumis à un champ électrique à variation sinusoïdale	36
1.1.5 Milieu conducteur et diélectrique soumis à un champ électrique à variation sinusoïdale	37
1.1.5.1 Permittivité et conductivité complexes	37
1.1.5.2 Mécanismes de polarisation	38
1.1.6 Conclusion	39
1.2 Les cellules biologiques : notions introductives	40
1.2.1 Les cellules biologiques dans les conditions physiologiques	40
1.2.1.1 Organisation et structure	40
1.2.1.2 Fonctionnement général	41
1.2.1.3 Rôle de la membrane plasmique	41
1.2.1.4 Le cancer : une anomalie de fonctionnement	43
1.2.2 La cellule face à un champ électrique : grandeurs caractéristiques	43
1.3 Les effets biologiques des impulsions électriques en expérimentation	45
1.3.1 Méthodes expérimentales	45
1.3.1.1 Modèles (cibles) biologiques exposés	45
1.3.1.2 Système d'exposition	46
1.3.1.3 Techniques d'observation des effets	47
1.3.2 Effets biologiques des impulsions électriques dites longues (durée ms- μ s, intensité \approx kV/cm)	49

1.3.2.1	L'« électroporation »	49
1.3.2.2	Applications de l'électroporation réversible	50
1.3.2.3	Applications de l'électroporation irréversible	52
1.3.3	Effets biologiques des impulsions électriques nanosecondes (durée 3-600 ns, intensité \gg kV/cm)	54
1.3.3.1	L'existence d'effets intracellulaires	54
1.3.3.2	Influence des paramètres des impulsions	56
1.3.3.3	Applications	59
1.3.3.4	Conclusion	60
1.3.4	Vers l'étude des effets biologiques des impulsions électriques de durée < 3 ns	62
1.3.4.1	Espoir pour la thérapie génique	62
1.3.4.2	Résultats des premières études exploratoires	62
1.4	L'apport des modèles numériques	64
1.4.1	Modèles électriques de cellules	64
1.4.2	Influence des paramètres des impulsions sur les potentiels induits	64
1.4.3	Modélisation de l'électroporation	67
1.5	Conclusion	69
Chapitre 2 Systèmes d'exposition : générateurs et applicateurs		71
2.1	Objectifs en termes de développement	74
2.1.1	Objectifs pour les générateurs d'impulsions	74
2.1.2	Objectifs pour les applicateurs d'impulsions	76
2.2	Les générateurs d'impulsions haute tension nano- et subnanosecondes à XLIM	76
2.2.1	Les choix technologiques	77
2.2.1.1	Principe de génération	77
2.2.1.2	Mise en forme des impulsions	78
2.2.1.3	La technologie microruban	80
2.2.2	Démonstration d'un générateur en technologie coaxiale	82
2.2.2.1	Description du générateur	82
2.2.2.2	Caractérisation des structures coaxiales dans le domaine fréquentiel	84
2.2.2.3	Caractérisation des photocommutateurs	86
2.2.2.4	Génération d'impulsions haute tension nanosecondes à profil variable	90
2.2.2.5	Génération d'impulsions haute tension subnanosecondes	91
2.2.2.6	Contrôle du nombre d'impulsions générées	91
2.2.3	Conclusion	92
2.3	Les applicateurs <i>in vitro</i> dans la littérature	94
2.3.1	La problématique impulsion courte – impulsion ultracourte	94
2.3.2	Les applicateurs avec contact électrodes/échantillon	96
2.3.2.1	Applicateurs pour exposer un grand nombre de cellules	96
2.3.2.2	Applicateurs pour exposer un petit nombre de cellules : les microsystèmes	100
2.3.3	Les applicateurs sans contact électrodes/échantillon	103
2.3.3.1	Vers un applicateur rayonnant : l'antenne ultra-large bande	103
2.3.3.2	Vers un applicateur propagatif : introduction à la cellule TEM	106

2.4	Potentialités de la cellule TEM comme applicateur isolé d'impulsions ultracourtes	111
2.4.1	Géométrie de la cellule TEM étudiée	111
2.4.2	Étude fréquentielle	111
2.4.3	Étude des capacités de la cellule TEM à transmettre des impulsions électriques haute tension de durée < 3 ns	116
2.4.3.1	Matériel et méthodes	116
2.4.3.2	Résultats et discussions	118
2.4.4	Cellules TEM miniaturisées	122
2.4.4.1	Géométrie	122
2.4.4.2	Études fréquentielle et temporelle	124
2.4.5	Synthèse	126
2.5	Conclusion et discussion	126
Chapitre 3 Techniques de dosimétrie expérimentale		129
3.1	La dosimétrie : une étude multi-physiques et multi-échelles	131
3.2	Les sondes de champ électrique induit à l'échelle macroscopique	133
3.2.1	Notion de DAS	133
3.2.2	Les limites des sondes métalliques	135
3.2.3	Les sondes électro-optiques (EO)	136
3.3	La sonde électro-optique étudiée	140
3.3.1	Description et fonctionnement	140
3.3.2	Réponse à des champs électromagnétiques de type CW	142
3.4	Caractérisation de la sonde EO dans la cuvette d'électroporation soumise à d'intenses nsPEFs.	145
3.4.1	Matériel et méthodes	145
3.4.2	Résultats des mesures du champ électrique	148
3.4.3	Quantification des variations de température	151
3.4.4	Simulations numériques	153
3.5	Caractérisation de la sonde EO dans les cellules TEM vides soumises à d'intenses nsPEFs	155
3.5.1	Matériel et méthodes	155
3.5.2	Résultats expérimentaux	156
3.6	Application à la mesure du champ électrique induit dans les échantillons exposés via la cellule TEM	159
3.6.1	Matériel et méthodes	159
3.6.2	Résultats expérimentaux	161
3.6.3	Simulation spatio-temporelle 3D	163
3.6.4	Conclusion	164
3.7	Vers la dosimétrie expérimentale à l'échelle microscopique	166
3.7.1	Littérature	166
3.7.1.1	Technique de microfluorimétrie pour sonder le potentiel transmembranaire	166
3.7.1.2	Technique de microfluorimétrie pour sonder la température cellulaire et intracellulaire	167
3.7.2	Un système d'exposition basé sur la cellule TEM pour la calibration en température des fluorochromes thermosensibles	169
3.7.2.1	Principe et description	169
3.7.2.2	Résultats de la calibration en régime CW	171

3.7.2.3	Application à la mesure de la température dans les cellules biologiques exposées à des nsPEFs	171
3.8	Conclusion	175
Chapitre 4	Technique de nanodosimétrie numérique	177
4.1	Introduction aux intérêts de la nanodosimétrie	179
4.2	Les simulations de dynamique moléculaire	182
4.2.1	Les principes à la base de la dynamique moléculaire	182
4.2.2	Un système de dynamique moléculaire à étudier avec l'outil de nanodosimétrie	185
4.3	À propos des mécanismes moléculaires de formation d'un pore en dynamique moléculaire	187
4.3.1	Les études antérieures	187
4.3.2	Les questions en suspens	188
4.4	L'outil développé	189
4.4.1	Principe et mise en équation du problème	189
4.4.2	Résolution numérique de l'équation de Poisson dans un système d'atomes	192
4.4.2.1	Les limites des outils existants	192
4.4.2.2	La méthode implémentée	192
4.5	Résultats	194
4.5.1	Configurations analysées	194
4.5.2	Profil des densités volumiques de charge	196
4.5.3	Profil des potentiels	196
4.5.4	Profil des champs électriques	199
4.5.4.1	Profil 3D	199
4.5.4.2	Profil 1D	200
4.5.5	Profil des gradients de champ électrique	204
4.6	Conclusion	205
Conclusion générale		207
Annexe A	Applicateurs pour exposition <i>in vivo</i>	211
A.1	Applicateurs standard pour l'électrochimiothérapie (ECT)	211
A.2	Applicateurs d'impulsions électriques haute tension nanosecondes (> 10 ns)	212
Annexe B	Méthode de dimensionnement d'une cellule TEM	215
Annexe C	Méthode de résolution numérique de l'équation de Poisson en 3D	219
Bibliographie		225
Liste des publications et communications		253
A	Revue internationale à comité de lecture	253
B	Communications Internationales (CICL) avec actes de colloque à comité de lecture - par ordre chronologique	254
C	Séminaires - Workshop	256

Table des figures

1	Conceptualisation imagée d'une cellule subissant un choc électrique. D'après [1].	20
1.1	Interaction électrostatique entre deux charges ponctuelles de même signe opposé (a), et deux charges ponctuelles de signe opposé (b).	29
1.2	Représentation en deux dimensions des lignes de champ électrique générées autour d'une ou deux charges statiques.	29
1.3	Lignes de champ électrique et champ électromagnétique générés autour d'une charge électrique oscillant selon un mouvement sinusoïdal dans le vide.	31
1.4	Spectre électromagnétique : bande de fréquences et applications. D'après [9].	32
1.5	Description temporelle d'un champ électrique pulsé en un point de l'espace. Définition de la durée T , des temps de montée t_r et de descente t_f , et de l'intensité E de l'enveloppe.	33
1.6	Trois impulsions électriques dans le domaine temporel (a) et leur spectre respectif (b). La durée des impulsions en trait plein est identique.	33
1.7	Illustration du moment dipolaire de la molécule H ₂ O (a) et CO ₂ (b).	35
1.8	Diélectrique polaire en l'absence (a) et en présence (b) d'un champ électrique appliqué.	35
1.9	Illustration d'un déphasage entre un champ électrique sinusoïdal et la polarisation induite.	37
1.10	Mécanismes de polarisation dans un milieu : cas général	38
1.11	Représentation schématique d'une cellule eucaryote. Adaptée de [12].	40
1.12	Représentation schématique de la membrane. Adaptée de [13].	41
1.13	Topologie du lipide 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC). Adaptée de [17, 18].	42
1.14	Illustration du potentiel transmembranaire (PTM) d'une cellule au repos.	43
1.15	Aperçu général des constantes de temps des phénomènes de polarisation d'une cellule lorsque cette dernière est soumise à une impulsion électrique de durée grande devant les échelles de temps données.	44
1.16	Représentation schématique d'un système d'exposition <i>in vitro</i>	46
1.17	Image d'une cellule (fibroblaste) obtenue par la technique de microscopie à fluorescence. Source : http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/galleries/cells/index.html	47
1.18	Illustration imagée de l'électroporation. Membrane soumise à une impulsion électrique à l'état initial (a) et membrane électroporée suite l'application de l'impulsion électrique (b). Adaptée de [35].	49
1.19	Procédure opérationnelle standard de l'électrochimiothérapie.	51

1.20	À droite : comparaison des résultats de l'extraction du jus sucré de betteraves par électroporation irréversible et par la technique d'extraction traditionnelle. À gauche : l'installation industrielle utilisée pour le traitement des betteraves par électroporation. D'après [56].	53
1.21	Aperçu des applications de l'électroporation réversible et irréversible. Adaptée de [57].	53
1.22	Un modèle proposé dans [62] pour déterminer les effets biologiques des impulsions électriques nanosecondes. Les deux arcs de cercle délimitent la membrane plasmique, la partie inférieure de la figure étant le milieu intracellulaire et la partie supérieure le milieu extracellulaire.	55
1.23	Observation de la fluorescence de cellules Jurkat marquées au FM1-43 et exposées à $t = 0$ à 4 impulsions électriques de 30 ns, 3.5 MV/m et de fréquence de répétition 4 Hz. D'après [75].	56
1.24	Fluorescence des molécules YO-PRO-1 en fonction du nombre d'impulsions électriques appliquées (4 ns, 10 MV/m, 1 kHz). Une augmentation de fluorescence indique un nombre croissant de molécules YO-PRO-1 entrées dans la cellule. Ces molécules étaient initialement dans le milieu extracellulaire. D'après [71].	58
1.25	Mise en évidence de la toxicité accrue des expositions fractionnées ($T = 300$ ns). D'après [99].	59
1.26	Aperçu des applications liées aux effets non thermiques des impulsions électriques de durée milliseconde à nanoseconde, en fonction de l'intensité des impulsions. Dans la partie blanche inférieure à la zone grisée, aucun effet n'est observé. Dans la partie supérieure blanche, l'énergie des impulsions est telle que les effets deviennent thermiques. D'après [46].	61
1.27	Élévation macroscopique de température due à l'application de 1.2, 1.4 et 1.8 millions d'impulsions de durée 200 ps et d'intensité 25 kV/cm. D'après [112].	63
1.28	Modèle numérique d'une cellule très simplifiée avec une organelle.	65
1.29	Valeur absolue des potentiels dans la cellule et son environnement proche lorsqu'un champ électrique de 80 kV/m est appliqué dans le sens des y décroissants (1 V appliqué en $y = y_{max}$ et -1 V en $y = y_{min}$) pour une fréquence de 100 MHz (a) et une fréquence de 1 GHz (b). D'après [118].	65
1.30	Potentiel transmembranaire à la membrane plasmique ($\Delta\Psi_{cell}$) et la membrane de l'organelle ($\Delta\Psi_{org}$) en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué.	66
1.31	Rendu visuel d'une portion de membrane simulée en dynamique moléculaire. D'après [125].	68
1.32	Rendu visuel d'une portion de membrane électroporée en dynamique moléculaire. Les queues des lipides ne sont pas représentées. D'après [125].	68
1.33	Schéma de la formation d'un pore à l'échelle atomique. Membrane à l'état initial (a), formation d'un pore hydrophobe (b) et évolution en pore hydrophile (c).	68
2.1	Illustration de la partie génération et application d'un système d'exposition <i>in vitro</i>	73
2.2	Illustration de l'efficacité, en termes de surface électroperméabilisée, des impulsions bipolaires par rapport aux impulsions monopolaires.	75

2.3	Schéma du principe de fonctionnement de base des générateurs à ondes gelées de XLIM.	77
2.4	Principe de mise en forme des impulsions à partir du principe de génération à ondes gelées.	79
2.5	Exemples de générateurs à ondes gelées avec une ligne de transmission de type microruban.	81
2.6	Principe d'une ligne microruban.	81
2.7	Principe d'une ligne coaxiale cylindrique.	83
2.8	Structure de mise en forme des impulsions du générateur en technologie coaxiale.	83
2.9	Schéma du montage expérimental pour la caractérisation fréquentielle de la structure coaxiale.	85
2.10	Paramètres S (a) et impédance équivalente (b) de la structure coaxiale à 3 axes connectée à l'analyseur de réseau vectoriel en entrée et sortie.	86
2.11	Dimensions en pouce (en millimètre en parenthèse) des photocommutateurs employés. D'après [153].	87
2.12	Schéma du montage expérimental pour la caractérisation du photocommutateur.	88
2.13	(a) Résistance équivalente et efficacité du commutateur en fonction de l'énergie incidente pour une tension de polarisation de 8 kV. (b) Résistance équivalente et efficacité du commutateur en fonction de la tension de la polarisation pour une énergie optique de 500 μ J.	89
2.14	Impulsions électriques générées avec des impulsions optiques de 2.5 ns, une tension de polarisation de 8 kV et une énergie optique totale de 6 mJ. Résultats dans le domaine temporel (a) et le domaine fréquentiel (b).	90
2.15	Impulsion électrique générée avec une impulsion optique de 35 ps, une tension de polarisation de 10 kV et une énergie optique totale de 1.05 mJ. Résultat dans le domaine temporel (a) et le domaine fréquentiel (b). La durée de l'impulsion électrique et son temps de montée s'élèvent respectivement à 745 ps et 125 ps.	91
2.16	Face-avant du programme LabVIEW développé pour le contrôle du nombre d'impulsions délivrées à l'échantillon.	92
2.17	Méthode de base pour exposer des cellules à un champ électrique pulsé. ϵ désigne la permittivité du milieu exposée et σ sa conductivité électrique.	94
2.18	(a) Une cuvette d'électroporation de largeur de distance inter-électrodes de 4 mm (Sigma-Aldrich [®] electroporation cuvette, Sigma-Aldrich Co. LLC., MO, USA). (b) Système d'électrodes pour connecter la cuvette à un générateur d'impulsions de sortie coaxiale (connecteur coaxial de type N). (c) Schématisation des lignes de champ électrique dans le volume exposé.	97
2.19	Impédance équivalente, en fonction de la fréquence, de la cuvette d'électroporation de distance inter-électrodes de 4 mm. Résultats analytiques et numériques pour un volume exposé de conductivité électrique $\sigma = 0.31$ S/m et de permittivité $\epsilon \approx 80 \times \epsilon_0$. D'après [158].	97
2.20	Cuvette d'électroporation personnalisée avec électrodes en acier inoxydable. D'après [162].	98
2.21	Applicateur coaxial, à une aiguille et cinq aiguilles. D'après [164].	99
2.22	Microsystème pour l'exposition d'une cellule. D'après [90].	101
2.23	Microsystème filaire avec électrodes parallèles. D'après [165].	101
2.24	Exemples de microchambre. D'après [116, 139, 166].	102

2.25	Système microfluidique. D'après [168, 169].	103
2.26	Antenne psIRA à réflecteur. D'après [176].	104
2.27	Champ électrique émis par l'antenne IRA à réflecteur au second point focal. À noter que l'échelle des intensités est en V/m. D'après [176].	105
2.28	Schéma d'une cellule TEM fermée avec fenêtre d'accès (a) et d'une cellule TEM ouverte (b). Toutes les parois sont métalliques.	106
2.29	Coupes longitudinale (a) et transversale (b) de la cellule TEM.	107
2.30	Cellule GTEM. Schéma d'une coupe longitudinale (a) et photographie d'un modèle commercial (b).	108
2.31	Dispositif expérimental pour les tests d'émission d'un circuit intégré à l'aide d'une cellule TEM. « EUT » désigne l'élément sous test. D'après [187].	109
2.32	Illustration d'un rat exposé à des champs électromagnétiques radiofréquences dans une cellule TEM. La cellule a été rendue partiellement transparente pour des raisons de clarté.	110
2.33	Photographie de la grande cellule TEM. La cellule TEM contenant une boîte de Petri (a), vue longitudinale avec dimensions (b) et dimensions transversales (c).	112
2.34	Principe de la mesure de la permittivité et de la conductivité électrique d'une solution tampon.	113
2.35	Propriétés électriques d'une solution tampon PBS en fonction de la fréquence. Permittivité relative (a) et conductivité électrique équivalente (b).	113
2.36	Module des paramètres S_{11} et S_{21} de la grande cellule TEM sans et avec boîte de Petri.	114
2.37	Partie réelle et partie imaginaire de l'impédance dans le plan d'entrée de la cellule TEM connectée à l'analyseur de réseau aux deux extrémités.	115
2.38	Puissance transmise normalisée par rapport à la puissance incidente dans la cellule TEM sans et avec boîte de Petri.	115
2.39	Évolution de la phase du paramètre S_{21} en fonction de la fréquence : en vert la phase entre $-\pi$ et π radians et en bleu la phase « déroulée » (sauts de phase de π radians supprimés).	115
2.40	Montage expérimental pour étudier la capacité de la cellule TEM à transmettre des impulsions électriques ultracourtes.	116
2.41	Photographie du tap-off (245-NMFFP-100, Barth Electronics Technology, USA) avec annotation de la ligne directe et indirecte.	117
2.42	Résultats de l'étude de la capacité de la cellule TEM à transmettre des impulsions haute tension ultracourtes.	119
2.43	Définition des paramètres pour l'expression des équations de continuité du champ électrique. n_1 , n_2 , t_1 et t_2 sont des vecteurs. ϵ désigne une permittivité, σ une conductivité et ρ_s la densité de charges à l'interface.	121
2.44	Photographie des modèles de cellules TEM avec « la grande cellule TEM » (a), la « moyenne cellule TEM » (b) et la « petite cellule TEM » (c).	123
2.45	Définition des variables pour le dimensionnement des cellules TEM. (a) Vue latérale et (b) vue de haut.	123
2.46	Contenants pour l'exposition des cellules : une Fluorodish (Fluorodish cell culture dish FD3510, WPI, USA) (a), une lame de microscope (b) et la boîte de Petri miniature maison adaptée pour la petite cellule TEM (c).	124

2.47	Impulsions de tension mesurées à l’oscilloscope au travers du tap-off lorsque l’applicateur est la moyenne cellule TEM (trait plein rouge) ou la petite cellule TEM (traits pointillés). Les impulsions monopolaires ont une durée totale de 1.2 ns et une amplitude de 1.9 kV.	125
2.48	Vue latérale du microscope inversée (a), vue plongeante sur la cellule TEM posée sur la platine du microscope (b) et un exemple d’observation de cellules au travers d’un filtre rouge. Les cellules étaient contenues dans la boîte de Petri miniature posée au centre de la cellule TEM.	125
3.1	La place de la dosimétrie dans un système d’exposition.	131
3.2	Définition des échelles macroscopique, microscopique et nanoscopique.	132
3.3	Banc de test pour la quantification du SAR local engendré par un téléphone mobile collé à l’oreille de l’utilisateur.	135
3.4	Exemples de capteur métallique : (a) d’après [201] et (b) d’après [202].	135
3.5	Exemples de sonde électro-optique. D’après [203–205].	137
3.6	Schéma d’un capteur optique fibré fonctionnant en réflexion.	138
3.7	Illustration de la modulation de l’état de polarisation d’un faisceau due à l’introduction d’un déphasage $\Delta\Phi$ entre ses composantes dans l’espace cartésien.	139
3.8	Photographie du système électro-optique de mesure macroscopique du champ électrique et de la température.	141
3.9	Schéma illustrant la position de la lame quart d’onde et de la lentille GRIN dans la sonde électro-optique. D’après [217].	141
3.10	Schéma du montage expérimental pour caractériser la réponse de la sonde électro-optique à des champs électromagnétiques de fréquence $f = 1800$ MHz	143
3.11	Résultats des mesures de sélectivité avec la sonde positionnée dans la cellule TEM vide. La puissance en sortie de la sonde qui a été tracée est normalisée par rapport au maximum de puissance mesurée.	143
3.12	Montage expérimental pour tester les performances de la sonde électro-optique dans la cuvette d’électroporation.	146
3.13	Résultats des mesures de la sonde EO dans la cuvette d’électroporation remplie d’eau salée ($\epsilon_r = 78$).	149
3.14	Superposition du spectre des impulsions incidente et appliquée ainsi que de l’impulsion mesurée par la sonde EO, pour une impulsion incidente délivrée par le générateur coaxial (a), le générateur FID (b) et le générateur Horus (c).	150
3.15	Résultats des mesures des variations de température et modèle numérique associé.	152
3.16	Structure modélisée pour les calculs électrostatiques à deux dimensions.	153
3.17	Résultats des simulations électrostatiques 2D dans la cuvette d’électroporation de distance inter-électrodes de 4 mm.	154
3.18	Résultats des simulations électrostatiques 2D dans une cuvette d’électroporation de distance inter-électrodes de 8 mm.	154
3.19	Calibration de la sonde EO dans l’air ($\epsilon_r = 1$) : représentation schématique du positionnement de la sonde à l’intérieur de la cellule TEM. (a) Vue latérale et (b) vue de haut, les plaques étant rendues transparentes.	156
3.20	Superposition temporelle de l’impulsion transmise calculée à partir des mesures de tension via le tap-off et de l’impulsion mesurée par la sonde EO dans la zone centrale de la grande cellule TEM.	157

3.21	Exemples de superposition temporelle de l'impulsion calculée à partir des mesures de tension et de l'impulsion mesurée par la sonde EO dans la zone inférieure de la grande cellule TEM (a–b), de la moyenne cellule TEM (c–d) et de la petite cellule TEM (e–f).	158
3.22	Impulsion de tension réfléchie par la cellule TEM qui revient vers celle-ci après réflexion à la sortie du générateur en circuit ouvert.	159
3.23	Positionnement de la sonde électro-optique à l'intérieur de l'échantillon dans la boîte de Petri.	160
3.24	Résultats des mesures des impulsions électriques induites dans les échantillons exposés dans la grande cellule TEM.	162
3.25	Cellule TEM modélisée et simulée via la méthode FDTD. La sonde EO est positionnée tel qu'en expérimentation. La plaque supérieure et le septum sont rendus transparents afin de rendre visible la position de la boîte de Petri.	163
3.26	Impulsion électrique obtenue dans l'échantillon via la méthode FDTD (trait pointillé) superposée à l'impulsion électrique mesurée par la sonde EO (trait plein), pour une même impulsion incidente.	164
3.27	Exemple d'un montage expérimental pour le contrôle du potentiel transmembranaire induit par l'exposition des cellules à des nsPEFs.	167
3.28	Formule topologique de la rhodamine B (formule brute : $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$).	169
3.29	Schéma du montage expérimental pour la calibration de la sonde fluorescente thermosensible dans la cellule TEM.	170
3.30	Résultats de calibration de la rhodamine B dans la grande cellule TEM exposée à des champs électromagnétiques de fréquence 900 MHz et de puissance 50 W.	172
3.31	Résultats des variations de la fluorescence de la rhodamine B en fonction de la température.	172
3.32	Microscope confocal à XLIM et exemple d'une image obtenue de cellules marquées avec la rhodamine B.	174
4.1	Rappel des objets et dimensions spatiales d'intérêt pour la macro-, micro- et nanodosimétrie.	179
4.2	Un modèle de membrane simulée en dynamique moléculaire et électroporée pendant l'application d'un champ électrique de 500 MV/m. Le champ électrique était appliqué à partir de $t = 0$ ns.	180
4.3	Illustration des interactions liées (à gauche) et non-liées (à droite) en dynamique moléculaire.	183
4.4	Système d'atomes étudié à USC par les méthodes de la dynamique moléculaire. Représentation graphique générée avec Visual Molecular Dynamics (VMD) [263].	185
4.5	Solvant modélisé de manière explicite (à gauche) et de manière implicite (à droite). Le soluté est schématisé comme une simple sphère.	186
4.6	Électroporation du modèle de membrane obtenue en dynamique moléculaire lorsque le système était soumis à un champ électrique de 350 MV/m à partir de $t = 0$.	187
4.7	Énergie totale de l'organisation planaire (I) et verticale (II) des dipôles en fonction de l'intensité du champ électrique appliqué.	189
4.8	Schéma de la méthode suivie pour déterminer la distribution spatio-temporelle de V , \vec{E} et $\vec{\nabla}E$ aux échelles subnanométrique/subnanoseconde.	191
4.9	Définition des volumes pour la discrétisation spatiale du volume étudié.	193

4.10	Organisation des atomes dans le système étudié à $t = 4.0$ ns (a), $t = 6.0$ ns (b) et $t = 6.5$ ns (d). Les queues des lipides ne sont pas représentées. Les rendus (d–f) ne montrent que les molécules d’eau.	195
4.11	Densité volumique de charge en eV/nm^3 à l’état initial (a,c,d) et à l’état poré (b).	197
4.12	Potentiel électrostatique à l’état initial (a) et à l’état poré (b).	198
4.13	Clarification de la méthode d’illustration des potentiels avec des surfaces rectangulaires à 2 dimensions.	198
4.14	Vecteur champ électrique à l’état initial (a) et à l’état poré (b).	199
4.15	Définition d’une couche xyz	200
4.16	Définition des surfaces de moyennage pour le calcul de E_z à 1 dimension.	201
4.17	E_z moyenné suivant les surfaces définies Figure 4.16 pour l’état 1 (a), l’état 2 (b) et l’état 3 (c).	202
4.18	$E_{z1D}(z)$ à l’état 2 à partir des potentiels électrostatiques calculés par : la méthode des différences finies (a), PMEPot (b) et Volmap (c).	203
4.19	Visualisation de l’intensité de $\vec{\nabla}E$ projeté selon \vec{z} dans toutes les mailles du plan $z = -1.8$ nm à l’état 1.	205
A.1	Applicateur pour l’électrochimiothérapie.	211
A.2	Différentes configurations d’électrodes. La différence de potentiel est appliquée entre les électrodes bleues et rouges. D’après [98].	212
B.1	Illustration des effets de bord entre deux conducteurs électriques (rectangle gris) de largeur différente. Les lignes bleues représentent les lignes de champ électrique.	217
C.1	Volume de calcul et discrétisation associée.	220
C.2	Maillage rectangulaire à 2 dimensions suivant la méthode rouge-noir.	221
C.3	Position de calcul des composantes E_{xx} , E_{yy} et E_{zz} par rapport au maillage défini pour le calcul des potentiels.	222

Liste des tableaux

1.1	Fréquence du premier zéro du spectre d’impulsions rectangulaires de durée milliseconde à picoseconde.	33
2.1	Modèle et caractéristique de la source haute tension.	84
2.2	Modèle et caractéristiques des lasers utilisés.	84
2.3	Dimensions de la moyenne et de la petite cellule TEM (en mm).	123
3.1	Dimensions et propriétés électriques du modèle de cellule étudié par Song et co-auteurs dans [239].	168
4.1	Fenêtre temporelle de moyennage pour les trois états étudiés.	196

Avant-propos

NOUS sommes constamment plongés dans un océan de champs électromagnétiques qui s'est vu fortement densifié ces quinze dernières années. La densification spécifique des ondes radioélectriques, liée notamment à la téléphonie mobile, s'est accompagnée d'interrogations prégnantes quant à l'innocuité de ces signaux. Les craintes soulevées, et largement relayées par les médias, ont été et restent sujettes à nombreux débats politiques et scientifiques.

Le domaine scientifique s'attachant à l'étude des interactions entre les champs électromagnétiques et le vivant est connu sous le nom de bioélectromagnétisme. Les études d'évaluation des risques sanitaires sont conduites soit en laboratoire soit à l'échelle des populations. En laboratoire, elles sont réalisées soit sur des modèles *in vitro* (par exemple des cultures de cellules animales) soit sur des modèles *in vivo* (typiquement des souris).

En France, les normes d'exposition du public aux fréquences de la gamme 0–300 GHz sont imposées par décret depuis 2002 et suivent les recommandations de la Commission internationale pour la protection contre les rayonnements non ionisants (ICNIRP). Les valeurs limites d'exposition fixées ont pour seul but de limiter l'échauffement des tissus exposés, c'est-à-dire les effets thermiques. À ce jour, les études d'évaluation des risques validées par la communauté scientifique n'ont pas révélé d'autres modes d'interaction pouvant conduire à des risques sanitaires (c'est-à-dire à des effets potentiellement dangereux pour la santé). Dans le cas d'une exposition à une antenne-relais, le niveau de référence assurant le respect des restrictions de base est exprimé en termes d'intensité du champ électrique dans la zone considérée. Pour les antennes-relais de téléphonie mobile 3G-UMTS¹, la valeur limite d'exposition du public est fixée à 0.61 V/cm.

Imaginons à présent un laboratoire disposant d'un système capable de générer un champ électrique des dizaines voire des centaines de milliers de fois plus intense, mais sur une durée très brève, à savoir très inférieure au millionième de seconde ($\ll 10^{-6}$ s). Puis, se trouve en ce lieu un expérimentateur appliquant ces impulsions électriques à une

1. Téléphonie mobile de troisième génération (3G) utilisant la technologie Universal Mobile Telecommunications System (UMTS)



Figure 1 – *Conceptualisation imagée d'une cellule subissant un choc électrique. D'après [1].*

cellule animale : « mais à quel(s) effet(s) s'attend-il ? ». Avec un champ électrique d'une telle intensité et d'une durée aussi courte, les sentiers battus du bioélectromagnétisme sont bien loin. Aucun appareil de la vie quotidienne n'émet de pareils signaux électriques.

Si nous nous représentons l'expérience décrite à la manière de la Figure 1, c'est-à-dire comme un éclair foudroyant la cellule, alors le premier effet biologique suggéré est assurément la brûlure de la cellule aux points d'impact. Suivant les paramètres des impulsions électriques appliquées, à savoir leur durée, intensité, nombre et fréquence de répétition, cette analogie s'avère – avantageusement – inexacte. Appliquée à des cellules en suspension, une impulsion électrique de durée nanoseconde et d'intensité de quelques dizaines de kV/cm dépose une densité d'énergie typiquement suffisamment faible pour s'affranchir de tout échauffement excessif des cellules. La puissance délivrée par une telle impulsion est certes très élevée mais l'énergie électrique appliquée est faible en raison de la durée ultra-courte de l'impulsion. Pour donner un ordre d'idée des grandeurs mises en jeu, la durée que représente 1 ns est des millions de fois plus courte qu'un clignement d'œil. En 1 ns, la lumière visible parcourt à peine 30 cm dans le vide. Quant au niveau de puissance, une impulsion électrique de forme rectangulaire, de durée 1 ns et d'intensité 100 kV/cm, délivre 200 MW si appliquée sur 1 cm dans un système d'impédance 50Ω ; son énergie est pour sa part inférieure au joule.

Par ailleurs, notons que les champs électriques pulsés nanosecondes, d'abréviation courante « nsPEFs », ne sont pas ionisants. Contrairement aux rayonnements gamma et X par exemple, la quantité d'énergie transportée par chaque photon (ou « grain d'énergie ») associé aux nsPEFs n'est pas suffisante pour rompre les liaisons chimiques et ioniser les atomes. Autre remarque, un champ électrique d'environ 30 kV/cm peut engendrer un arc électrique dans l'air. En pratique, les cellules sont toujours manipulées dans leur milieu de culture qui est un liquide aqueux. Toutes précautions prises, il est donc possible de leur appliquer des impulsions électriques bien plus intenses que 30 kV/cm, sans rupture diélectrique dans l'environnement des cellules. Ceci est d'autant plus vrai que la durée des impulsions est courte.

L'absence d'effet thermique des nsPEFs n'exclut pas que des effets biologiques puissent être déclenchés. De tels effets sont dits « non thermiques », c'est-à-dire indépendants d'un échauffement. Des chercheurs ayant mis en pratique l'expérience décrite précédemment ont précisément trouvé que d'intenses champs électriques pulsés nanosecondes (3–300 ns, 5–400 kV/cm) sont capables d'induire une variété d'effets biologiques non thermiques. En particulier, ils ont montré que les nsPEFs peuvent aussi bien modifier la structure que le fonctionnement des cellules ciblées. Les mécanismes physiques à l'origine de ces effets ne sont toutefois pas encore élucidés et nombre d'effets biologiques restent sans aucun doute à découvrir.

L'effet biologique des nsPEFs qui suscite actuellement la plus vive attention est l'induction de l'apoptose. Ce phénomène s'apparente de manière imagée à un suicide des cellules exposées. L'intérêt de cet effet pour le traitement de tumeurs cancéreuses sera plus amplement expliqué au cours du Chapitre 1 du présent manuscrit. L'application d'impulsions électriques sur le vivant à des fins thérapeutiques n'est pas nouvelle. Déjà à l'Antiquité, vers l'an 45 ap. J.-C., un médecin connu sous le nom de Scribonius Largus utilisait les décharges électriques produites par certains poissons comme thérapie des maux de têtes et de la goutte. L'origine des décharges électriques et les mécanismes par lesquels celles-ci soulageaient le patient n'étaient à l'évidence pas connus. De nos jours, les défibrillateurs cardiaques sont un exemple d'utilisation thérapeutique des impulsions électriques. Le choc électrique envoyé au cœur de la victime est moins intense ($\ll 1$ kV/cm) et bien plus long ($> \text{ms}$) que les impulsions au centre de ce manuscrit. L'électrochimiothérapie est un autre exemple d'application biomédicale des impulsions électriques. Ce traitement anti-tumoral standard associe l'injection d'un médicament anticancéreux à l'application locale d'impulsions électriques au niveau de la tumeur. Une fois encore, les champs électriques pulsés délivrés sont d'intensité moindre (≈ 1 kV/cm) et de durée supérieure ($\approx 100 \mu\text{s}$) à celles des impulsions d'intérêt dans notre travail. Nous verrons de manière plus détaillée au Chapitre 1 en quoi les mécanismes d'action des impulsions électriques microsecondes, nanosecondes et subnanosecondes diffèrent lorsque celles-ci sont appliquées sur la matière vivante.

Il existe une conférence annuelle, « International Bioelectrics Symposium », dédiée exclusivement aux interactions des champs électriques pulsés et des plasmas avec les cellules et les tissus. Le terme « bioelectrics » est aujourd'hui admis pour désigner ce nouveau domaine interdisciplinaire de la recherche scientifique qui regroupe aussi bien des physiciens que des biologistes et des médecins. Les hautes puissances pulsées étaient jusque-là davantage employées pour des applications militaires et des applications dans le domaine de la défense (par exemple pour les systèmes de radiodétection dits RADAR).

Les principaux centres de recherche travaillant actuellement sur les effets des nsPEFs sur le vivant sont situés aux États-Unis², au Japon³ et en Europe (essentiellement en Slovénie⁴, France⁵, Allemagne⁶ et Italie⁷). Tous laboratoires confondus, les recherches couvrent d'une part l'exploration expérimentale et par des modélisations des effets biologiques induits par les nsPEFs, et d'autre part le développement des bancs expérimentaux permettant d'exposer les cibles souhaitées.

L'équipe « bioélectrophotonique » de l'Institut de recherche XLIM, dans laquelle s'est déroulée cette thèse, s'est lancée dans l'aventure en 2006. Une première thèse soutenue à l'automne 2010 était dédiée à l'étude de systèmes d'exposition pour l'application *in vitro* de nsPEFs à des cellules [2]. Une seconde thèse défendue en 2011 était centrée sur le développement de générateurs d'impulsions électriques de haute tension [3]. Deux autres thèses ont été soutenues en 2012. La première d'entre elles avait pour objectif le développement d'un système de microspectroscopie pour sonder les cellules exposées à l'échelle moléculaire [4]. La seconde traitait de la modélisation électromagnétique à l'échelle microscopique des cellules soumises à des nsPEFs [5]. Récemment, des travaux de recherche ont également été lancés sur les effets biologiques des nsPEFs, grâce à l'arrivée de chercheurs biologistes au sein même de l'équipe bioélectrophotonique.

Pour en venir au projet présenté dans ce manuscrit, son objectif était multiple. Il s'agissait à la fois d'étudier de nouveaux systèmes d'exposition *in vitro* et de proposer des méthodes de dosimétrie aussi bien expérimentales que numériques. Par dosimétrie, nous entendons la quantification des doses absorbées par l'échantillon aux différentes échelles spatio-temporelles d'interaction. La particularité de la phase expérimentale du projet a

2. États-Unis :

- Frank Reidy Research Center for Bioelectrics, Old Dominion University, Norfolk, VA, États-Unis
- Ming Hsieh Department of Electrical Engineering, Viterbi School of Engineering, University of Southern California, Los Angeles, CA, États-Unis
- Harvard-M.I.T. Division of Health Sciences and Technology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, États-Unis
- Air Force Research Laboratory, Brooks City-Base, San Antonio, TX, États-Unis

3. Japon :

- Bioelectrics Research Center, Kumamoto University, Kurokami Kumamoto, Japon

4. Slovénie :

- Faculty of Electrical Engineering, Department for Biomed. Eng., University of Ljubljana, Ljubljana, Slovénie

5. France :

- Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) UMR CNRS 5089, Toulouse, France
- Institut Gustave Roussy UMR CNRS 8203, Villejuif, France
- Équipe Bioélectrophonique, département Ondes et Systèmes Associés, XLIM UMR CNRS 7252, Limoges, France
- Équipe de Chimie et Biochimie Théoriques UMR CNRS 7565, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

6. Allemagne :

- Institute for Pulsed Power and Microwave Technology (IHM), Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe Institute of Technology, Eggenstein-Leopoldshafen, Allemagne

7. Italie :

- Department of Electronic Engineering, University of Rome La Sapienza, Rome, Italie
- CNR-Institute for Electromagnetic Sensing of Environment, Naples, Italie

consisté en ceci que les impulsions électriques à délivrer devaient être aussi courtes que quelques nanosecondes voire être de durée subnanoseconde. Les raisons qui ont motivé ce choix et les implications pratiques seront clarifiées dans le manuscrit.

L'exposé est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre sert d'introduction au sujet. Il commence par poser les notions de base permettant d'appréhender les phénomènes physiques associés à l'interaction des champs électriques avec le vivant. Il récapitule ensuite les effets biologiques connus des impulsions électriques de durée milliseconde et microseconde puis ceux des impulsions électriques de durée nanoseconde. Un aperçu des applications de ces impulsions dans le domaine biomédical ainsi que dans les domaines de l'agro-alimentaire et de l'environnement est également donné.

Le deuxième chapitre aborde les travaux réalisés sur un générateur d'impulsions haute tension de durée nanoseconde et subnanoseconde ainsi que sur un applicateur capable de délivrer ces impulsions à des cellules. Une fois les objectifs et l'état de l'art détaillés, les systèmes développés sont décrits, de même que les méthodes suivies pour les études expérimentales et numériques. Les résultats obtenus dans les domaines fréquentiel et temporel sont ensuite exposés et analysés.

Le troisième chapitre traite de la dosimétrie expérimentale à l'échelle macroscopique. Il évoque plus particulièrement la mesure du champ électrique au sein même des échantillons exposés. Les études de modélisation réalisées en complément des expérimentations sont également décrites. Le chapitre s'achève avec des résultats de dosimétrie expérimentale à l'échelle microscopique.

De son côté, le quatrième et dernier chapitre propose un nouvel outil numérique pour le calcul et la visualisation spatio-temporelle des grandeurs électriques (densité de charge, potentiel, champ électrique et gradient de champ électrique) à l'échelle moléculaire des échantillons exposés. Le système étudié est un modèle très simplifié de membrane cellulaire exposée via des simulations de dynamique moléculaire à une impulsion électrique nanoseconde de très forte intensité. Des exemples de cartographies obtenues sont montrés.

Pour finir, une dernière partie récapitule l'ensemble des résultats obtenus puis expose les perspectives envisagées. La liste des publications et communications scientifiques associées à ces travaux sera trouvée à la fin du manuscrit.

Le projet de cette thèse a fait l'objet de collaborations à l'échelle nationale et internationale. Ces dernières seront précisées en temps voulu.

CHAPITRE 1

Les impulsions électriques comme manipulateurs de cellules biologiques

Contenu

1.1	Interaction champ électrique-matière : notions fondamentales	27
1.2	Les cellules biologiques : notions introductives	40
1.3	Les effets biologiques des impulsions électriques en expérimentation	45
1.4	L'apport des modèles numériques	64
1.5	Conclusion	69

L'objectif de ce premier chapitre est d'expliquer plus largement le contexte et les motivations du projet de la thèse. En particulier, nous chercherons à justifier *a priori* l'intérêt d'exposer des cellules biologiques à d'intenses champs électriques pulsés de durée aussi courte que quelques nanosecondes voire de durée subnanoseconde.

Dans ce but, le chapitre commence par exposer les notions fondamentales relatives à l'interaction des champs électriques avec la matière. Pour appréhender le cas particulier des interactions entre champs électriques pulsés et cellules biologiques, nous donnerons ensuite quelques bases générales sur la structure et le fonctionnement des cellules. Nous poursuivrons par un aperçu des effets biologiques que peut engendrer l'interaction des champs électriques pulsés avec les cellules. Pour des raisons qui seront éclaircies au cours de l'exposé, nous traiterons tout d'abord le cas des champs électriques pulsés de durée milliseconde et microseconde puis celui des champs électriques pulsés de durée 3–300 ns et enfin celui des champs électriques pulsés de durée < 3 ns. Dans une partie suivante, nous évoquerons les modèles numériques qui ont été développés afin d'aider à la compréhension des mécanismes physiques à l'origine des effets observés en expérimentation. Pour finir, nous résumerons les points clés du chapitre puis exposerons les enjeux de notre travail.

1.1 Interaction champ électrique-matière : notions fondamentales

Comme suggéré par le terme « interaction », si les champs électriques agissent sur la matière, la matière peut réciproquement modifier le champ électrique auquel elle est soumise. De manière générale, les processus d'interaction dépendent non seulement des caractéristiques du champ électrique mais également et fortement des propriétés électriques du milieu exposé.

Dans la suite, nous commençons par décrire les propriétés fondamentales des champs électriques. Nous détaillerons ensuite les mécanismes physiques d'interaction dans trois types de milieux : les milieux conducteurs (au sens électrique), les milieux diélectriques (également appelés isolants) et les milieux présentant à la fois des caractéristiques de conducteur et d'isolant.

1.1.1 Le champ électrique : généralités

1.1.1.1 Les équations de Maxwell

Le champ électrique est une grandeur vectorielle dont l'intensité s'exprime en newton par coulomb (N/C) ou plus communément, et de manière équivalente, en volt par mètre (V/m). Les possibles sources ou causes d'un champ électrique \vec{E} , ainsi que son comportement dans le temps et l'espace, sont décrits de manière complète à l'échelle macroscopique par les équations de Maxwell (James Clerk Maxwell 1831-1879). Ces équations relient les grandeurs caractéristiques de l'électromagnétisme à savoir :

\vec{E} le vecteur champ électrique (V/m),
 \vec{H} le vecteur champ magnétique (ampère par mètre : A/m),
 \vec{D} le vecteur densité de flux ou déplacement (C/m²),
 \vec{B} le vecteur densité de flux magnétique ou induction (Tesla),
 \vec{J}_C le vecteur densité de courant de conduction (A/m²) et
 ρ la densité volumique de charge électrique libre (C/m³).

Sous leur forme différentielle, les équations de Maxwell s'expriment de la manière suivante [6] :

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho \quad (\text{loi de Gauss}) \quad (1.1)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (\text{loi de Gauss pour le magnétisme}) \quad (1.2)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (\text{loi de Maxwell-Faraday}) \quad (1.3)$$

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{J}_C + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (\text{loi de Maxwell-Ampère}), \quad (1.4)$$

où $\nabla \cdot$ dénote l'opérateur différentiel « divergence » et $\nabla \times$ l'opérateur différentiel « rotationnel ». Les dérivées sont partielles car les grandeurs peuvent être fonction de l'espace (x, y, z) et du temps (t) . \vec{D} est habituellement exprimé en termes de \vec{E} , et \vec{B} en termes de \vec{H} , de sorte que le nombre d'inconnues ne surpasse pas le nombre d'équations. Dans le vide de permittivité diélectrique notée ϵ_0 et de perméabilité magnétique μ_0 , ces expressions sont :

$$\vec{D} = \epsilon_0 \cdot \vec{E} \quad (1.5)$$

$$\vec{B} = \mu_0 \cdot \vec{H}. \quad (1.6)$$

Des équations de Maxwell, il ressort deux types de champs électriques : les champs électriques statiques produits par des charges fixes (loi de Gauss) et les champs électriques induits par un champ magnétique variable dans le temps (loi de Maxwell-Faraday).

1.1.1.2 Les champs électriques statiques

Supposons deux charges électriques ponctuelles Q_1 et Q_2 de charge respectivement q_1 et q_2 (C), immobiles dans le référentiel d'étude, plongées dans le vide et distantes de r . D'après la loi de Coulomb, Q_1 exerce sur Q_2 une force d'interaction $\vec{F}_{1 \rightarrow 2}$ (N), dite force électrostatique, définie par :

$$\begin{aligned} \vec{F}_{1 \rightarrow 2} &= \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 \cdot q_2}{r^2} \cdot \vec{u} \\ &= -\vec{F}_{2 \rightarrow 1}, \end{aligned} \quad (1.7)$$

où ϵ_0 est la permittivité du vide (8.854×10^{-12} farad par mètre (F/m)) et \vec{u} est un vecteur unitaire pointant de Q_1 vers Q_2 . Deux charges de signe opposé s'attirent tandis que deux charges de même signe se repoussent (voir l'illustration de la Figure 1.1).

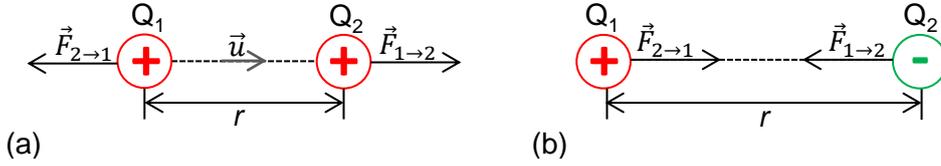


Figure 1.1 – Interaction électrostatique entre deux charges ponctuelles de même signe opposé (a), et deux charges ponctuelles de signe opposé (b).

Toute charge électrique génère autour d'elle un champ électrique \vec{E} . Si la charge électrique est au repos, ce champ électrique est stationnaire, c'est-à-dire invariant dans le temps. Les lignes de champ électrique générées autour d'une ou deux charges immobiles dans le vide sont montrées Figure 1.2. Une particule test de charge q , immobile en un point de l'espace où règne un champ électrique \vec{E} constant, est soumise à une force électrique \vec{F} d'expression :

$$\vec{F} = q \cdot \vec{E}. \quad (1.8)$$

En combinant les équations (1.7) et (1.8), l'intensité $|\vec{E}|$ (V/m) de \vec{E} généré à une distance r (m) d'une charge électrique fixe dans le vide est :

$$|\vec{E}| = \frac{q}{4\pi\epsilon_0 r^2}. \quad (1.9)$$

L'intensité du champ électrique diminue donc proportionnellement au carré de la distance à la charge.

Pour déterminer le vecteur champ électrique résultant d'un ensemble de plusieurs charges ponctuelles, le principe de superposition s'applique, à savoir que \vec{E} en un point

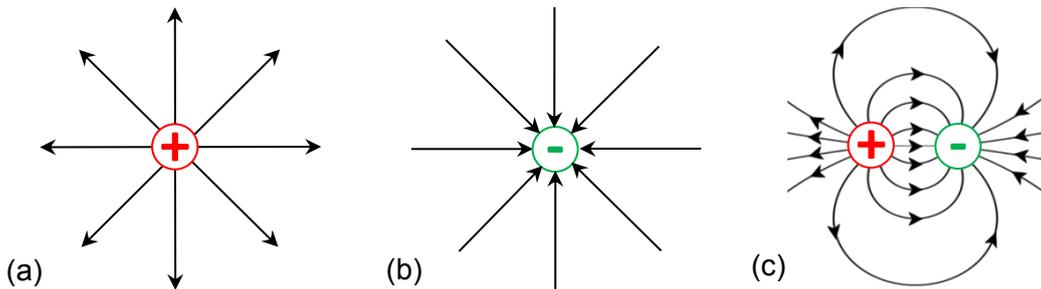


Figure 1.2 – Représentation en deux dimensions des lignes de champ électrique générées autour d'une charge ponctuelle positive (a), d'une charge ponctuelle négative (b), et entre deux charges de signe opposé (c). La direction du champ électrique en un point est donnée par la tangente à la ligne de champ passant en ce point. Dans les faits, les lignes de champ électrique sont générées dans toutes les directions de l'espace. À souligner que les lignes de champ électrique ne donnent pas d'indication sur la norme du champ électrique.

de l'espace est la somme vectorielle des vecteurs champs électriques produits par chaque charge en ce point.

À partir du champ électrique statique, on définit le potentiel électrostatique V (ou plus simplement potentiel), d'unité le volt, selon :

$$\vec{E} = -\nabla V. \quad (1.10)$$

où ∇ dénote l'opérateur différentiel « gradient ». Cette relation est vraie quelle que soit l'échelle spatiale considérée et ne dépend pas du système de coordonnées choisi. Elle est donc locale et intrinsèque. Un champ électrique statique est toujours dirigé dans le sens des potentiels électriques décroissants.

Les champs électriques statiques et les champs magnétiques statiques (induits par un courant continu ou un aimant) ne sont pas couplés, les uns peuvent exister sans les autres.

1.1.1.3 Les champs électromagnétiques

Supposons désormais une charge ponctuelle q en mouvement non uniforme. D'après la loi de Maxwell-Ampère, cette charge engendre un champ magnétique variable dans le temps, et selon la loi de Maxwell-Faraday, ce champ magnétique génère un champ électrique. Pour différencier un champ électrique généré par une charge statique d'un champ électrique causé par un champ magnétique, on dit que ce dernier est un « champ électrique induit ».

En l'absence de charge libre ($\rho = 0$ et $\vec{J}_c = 0$), les équations de Maxwell impliquent qu'un champ magnétique à variation temporelle sinusoïdale induit un champ électrique à variation temporelle sinusoïdale de même fréquence f (Hz) et vice versa. Les champs magnétique et électrique sont alors couplés, l'un ne peut exister sans l'autre. L'association des deux champs est appelée « champ électromagnétique ».

Pour illustrer la formation d'un champ électromagnétique à évolution temporelle sinusoïdale, supposons une charge électrique dans le vide oscillant autour d'une position moyenne telle que montrée Figure 1.3a. La relation entre le champ magnétique et le champ électrique en un point de l'espace diffère selon la distance à la charge en mouvement. On distingue notamment deux zones, à savoir la zone de « champ proche » à proximité de la source (la charge oscillante) et la zone de « champ lointain » éloignée de la source. En champ proche, la relation entre le champ électrique et le champ magnétique dépend du point de l'espace considéré. En champ lointain, le rapport Z_0 (Ω) de l'intensité du champ électrique sur celle du champ magnétique est indépendant de la distance à la source et s'exprime selon :

$$Z_0 = \left(\frac{\mu_0}{\epsilon_0} \right)^{\frac{1}{2}}. \quad (1.11)$$

Des équations de Maxwell, on montre également que les champs électriques et magnétiques en champ lointain sont perpendiculaires entre eux et varient perpendiculairement à la

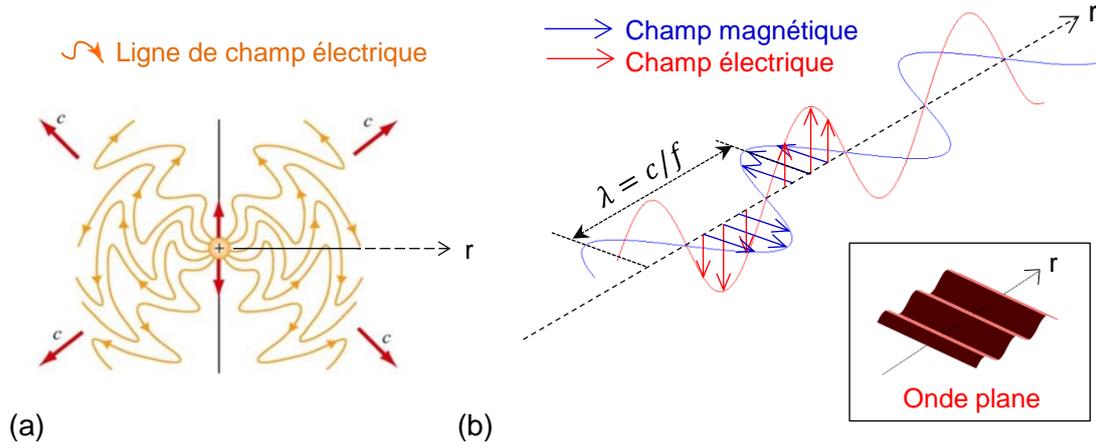


Figure 1.3 – Ligne de champ électrique et champ électromagnétique générés autour d’une charge électrique oscillant selon un mouvement sinusoïdal dans le vide. (a) Représentation 2D à un instant donné des lignes de champ électrique à proximité de la charge. La direction du champ électrique dépend du point de l’espace considéré. D’après [7]. (b) Champ électrique et champ magnétique dans le champ lointain de la charge. c (mètre par seconde : m/s) dénote la vitesse de propagation de l’onde, f (Hz) sa fréquence d’oscillation et λ (m) sa longueur d’onde. En tout point, les vecteurs champ électrique et champ magnétique sont perpendiculaires entre eux et perpendiculaires à la direction de propagation. Dans l’encadré, une représentation 3D d’un champ électrique se propageant à la manière d’une onde plane.

direction de propagation. On parle d’onde transverse électromagnétique (TEM) ; une illustration est donnée Figure 1.3b. Cette onde se propage dans l’espace sans support matériel ; elle est rayonnée. Elle est une solution des équations de Maxwell dans le vide. Très loin de la source, la direction de propagation de l’onde devient la même dans tout l’espace. Par ailleurs, l’amplitude du champ électrique à un instant donné n’y dépend plus que d’une variable spatiale (en coordonnées cartésiennes) ; l’onde est dite « plane ». Un exemple est montré dans l’encadré de la Figure 1.3b.

Plaçons à présent une particule test de charge q dans le champ électromagnétique. Selon la loi de Lorentz, le champ électromagnétique exerce sur la particule une force électromagnétique \vec{F} décrite par :

$$\vec{F} = q \cdot (\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}), \quad (1.12)$$

où \vec{v} est la vitesse de déplacement de la charge dans le référentiel d’étude. Si la charge est en mouvement, une force magnétique vient s’ajouter à la force électrique.

La force d’interaction électromagnétique ou plus simplement l’interaction électromagnétique est l’une des quatre forces fondamentales gouvernant les lois de la physique au même titre que l’interaction gravitationnelle, l’interaction faible et l’interaction forte. L’interaction électromagnétique est à la base de la cohésion des atomes, en liant les électrons au noyau atomique.

Pour décrire le champ électrique ou le champ magnétique en un point de l’espace,

les physiciens font soit appel à des représentations temporelles (amplitude du champ en fonction du temps), soit à des représentations fréquentielles (en illustrant la puissance des fréquences composant le signal, avec la puissance en ordonnée et les fréquences en abscisse).

L'ensemble continu des fréquences possibles (théoriquement de 0 Hz à l'infini) constitue le spectre électromagnétique. Le spectre est départagé en bandes de fréquences auxquelles sont associés des noms spécifiques. Comme mis en évidence Figure 1.4, les domaines d'application des champs électromagnétiques varient en fonction des bandes de fréquence et concernent aussi bien le domaine industriel que scientifique, médical ou encore celui des télécommunications. De manière générale, les champs électromagnétiques servent soit de support pour le transport d'informations soit de vecteur énergétique [8].

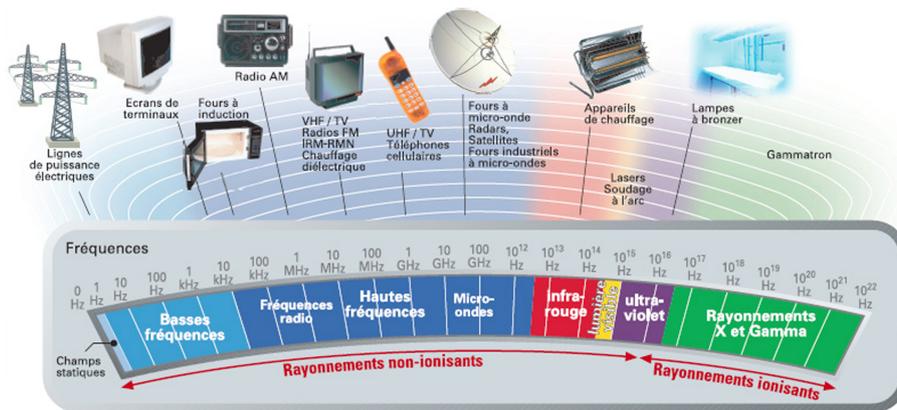


Figure 1.4 – Spectre électromagnétique : bande de fréquences et applications. D'après [9].

1.1.1.4 Les champs électriques pulsés

L'exemple de l'évolution temporelle d'un champ électrique pulsé en un point de l'espace est montré Figure 1.5. Un champ électrique pulsé est caractérisé par son enveloppe. Celle-ci est définie par sa durée T et son amplitude E . Lorsque l'enveloppe présente une allure temporelle similaire à un rectangle, on spécifie également ses temps de montée t_r et de descente t_f .

Dans le domaine fréquentiel, un champ électrique pulsé (aussi dit impulsion électrique) se caractérise par tout un spectre de composantes fréquentielles. La Figure 1.6b compare les spectres de trois impulsions électriques dont la forme temporelle est donnée Figure 1.6a. Cette illustration met en évidence qu'un raccourcissement des temps de montée et de descente et/ou de la durée de l'impulsion correspond à une augmentation du contenu haute fréquence de l'impulsion.

La largeur spectrale d'une impulsion dont la forme temporelle s'approche d'un rectangle est globalement inversement proportionnelle à la durée de l'impulsion. Pour une impulsion rectangulaire (temps de montée et de descente supposés infinis), la fréquence du premier zéro du spectre (c'est-à-dire le premier minimum local) est donnée par $1/T$. Le

Tableau 1.1 donne la fréquence du premier zéro du spectre d'impulsions rectangulaires de durée milliseconde à picoseconde. Il est bon de garder ces ordres de grandeur à l'esprit. En effet, nous verrons dans les paragraphes à suivre que les mécanismes physiques d'interaction entre les champs électriques et la matière dépendent des fréquences mises en jeu. Avant de préciser l'origine de cette dépendance fréquentielle, nous commençons par traiter les mécanismes d'interaction intervenant dans un matériau soumis à un champ électrostatique.

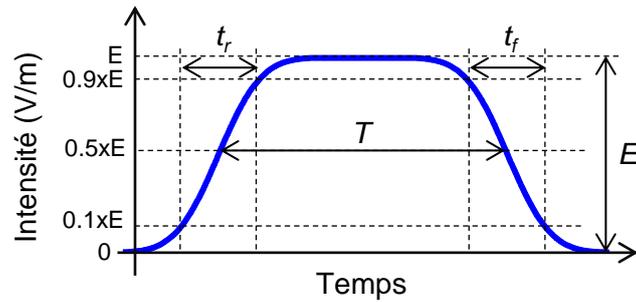


Figure 1.5 – Description temporelle d'un champ électrique pulsé en un point de l'espace. Définition de la durée T , des temps de montée t_r et de descente t_f , et de l'intensité E de l'enveloppe.

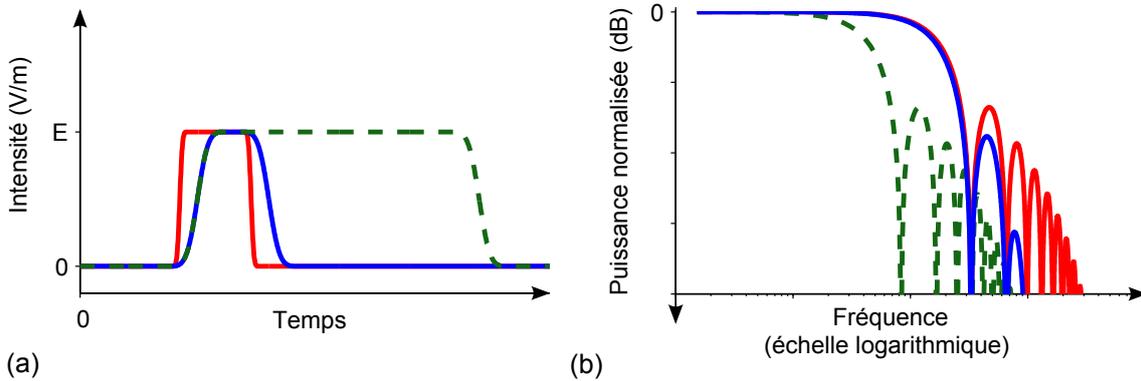


Figure 1.6 – Trois impulsions électriques dans le domaine temporel (a) et leur spectre respectif (b). La durée des impulsions en trait plein est identique.

Durée	1 ms	1 μ s	100 ns	1 ns	100 ps
Fréquence du premier zéro du spectre	1 kHz	1 MHz	10 MHz	1 GHz	10 GHz

Tableau 1.1 – Fréquence du premier zéro du spectre d'impulsions rectangulaires de durée milliseconde à picoseconde.

1.1.2 Milieu conducteur soumis à un champ électrostatique

Par définition, un milieu conducteur contient des porteurs de charge électrique libres de se mouvoir et susceptibles de se déplacer à l'échelle macroscopique. Les électrons libres et les ions comptent parmi ces porteurs de charge. Les métaux, les électrolytes (solutions ioniques) et les plasmas (gaz ionisés) sont des milieux conducteurs. Dans un conducteur qui n'est pas soumis à un champ électrique extérieur, le mouvement des charges est aléatoire.

Supposons à présent un conducteur placé dans un champ électrostatique noté \vec{E}_e . Sous l'action de la force électrique associée à ce champ (voir l'équation (1.8)), les charges se déplacent et induisent un champ électrique \vec{E}_r qui s'oppose au champ électrique appliqué. Le déplacement d'ensemble des charges conduit à une densité de courant à l'échelle macroscopique. Cette densité de courant, appelée densité de courant de conduction \vec{J}_c (A/m²), est liée au champ électrique total \vec{E}_t dans le matériau selon :

$$\vec{J}_c = \sigma \cdot \vec{E}_t \quad (\text{A/m}^2), \quad (1.13)$$

où σ (S/m) est la conductivité électrique du milieu conducteur et $\vec{E}_t = \vec{E}_e + \vec{E}_r$. L'équation (1.13) est connue sous le nom de « loi d'Ohm locale ». Lorsque l'état d'équilibre est atteint dans le conducteur, \vec{E}_t y est nul.

1.1.3 Milieu diélectrique soumis à un champ électrostatique

Un milieu diélectrique ne contient pas de porteurs de charge électrique libres mais des porteurs de charge fortement liés aux atomes. Sous l'action d'un champ électrostatique, ces porteurs de charge tendent à se réorienter, mais n'étant pas libres, ils ne peuvent qu'effectuer de petits déplacements par rapport aux dimensions atomiques. Le déplacement de ces charges liées, même faible, fait apparaître une densité de courant appelée densité de courant de déplacement, notée \vec{J}_D , et définie par :

$$\vec{J}_D = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t}, \quad (1.14)$$

où

$$\vec{D} = \epsilon_0 \cdot \vec{E} + \vec{P}. \quad (1.15)$$

\vec{D} est appelé le vecteur déplacement et \vec{P} le vecteur de polarisation. La signification physique de \vec{P} est expliquée au paragraphe suivant pour les deux types de diélectriques existants, à savoir les diélectriques polaires et les diélectriques apolaires.

1.1.3.1 Cas des milieux diélectriques polaires

Un diélectrique polaire est caractérisé par la présence de molécules polaires. Un exemple d'une telle molécule (la molécule H₂O) est montré Figure 1.7a. Ces molécules, tout en étant

globalement neutres, sont assimilables à des dipôles électriques. Elles présentent en effet deux pôles, l'un positif et l'autre négatif, car le barycentre des charges positives diffère de celui des charges négatives. La molécule possède ainsi un moment dipolaire permanent noté \vec{p} . Pour deux charges $+q$ et $-q$ placées respectivement aux points M_1 et N_1 , le moment dipolaire est défini comme le vecteur $\vec{p} = q \cdot \vec{M_1N_1}$.

En l'absence d'un champ électrique extérieur, les dipôles permanents d'un diélectrique polaire sont orientés de manière aléatoire (voir Figure 1.8a). Le moment dipolaire moyen par unité de volume est nul. C'est précisément cette grandeur qui est représentée par le vecteur de polarisation \vec{P} . Si, en revanche, un champ électrique \vec{E} est appliqué, le vecteur de polarisation devient non nul. En effet, les dipôles permanents tendent alors à s'aligner avec le champ électrique (voir Figure 1.8b). Notons qu'en raison de l'agitation thermique, les dipôles ne sont dans les faits jamais tous alignés au champ électrique.

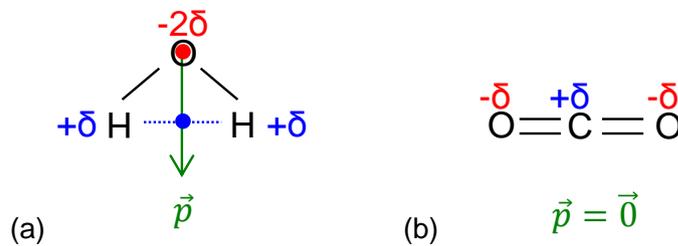


Figure 1.7 – Illustration du moment dipolaire de la molécule H₂O (a) et CO₂ (b). $+\delta$ (respectivement $-\delta$) représente une charge partielle positive (respectivement négative). Le point rouge (resp. bleu) correspond au centre géométrique des charges partielles négatives (resp. positives).

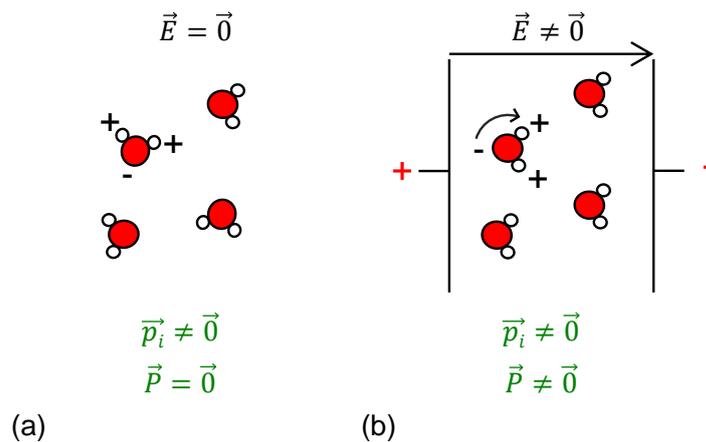


Figure 1.8 – Diélectrique polaire en l'absence (a) et en présence (b) d'un champ électrique \vec{E} . \vec{p}_i dénote le moment dipolaire de chaque molécule et \vec{P} la polarisation du milieu. En réalité, les molécules ne sont pas statiques du fait de l'agitation thermique.

1.1.3.2 Cas des milieux diélectriques apolaires

Un diélectrique apolaire est quant à lui dépourvu de molécules polaires; il contient uniquement des molécules apolaires telles que la molécule CO_2 . Dans ces molécules, le centre de gravité des pôles positifs et celui des pôles négatifs sont confondus (voir Figure 1.7b). Malgré tout, les pôles sont susceptibles de se réorienter sous l'influence d'un champ électrique et un moment dipolaire dit induit peut apparaître. Comme pour les diélectriques polaires, on dit que le milieu se polarise en la présence d'un champ électrique.

1.1.3.3 Notion de permittivité

Pour caractériser la capacité d'un diélectrique à se polariser, on emploie la notion de permittivité. Cette grandeur, notée ϵ (F/m), est définie par :

$$\vec{D} = \epsilon \cdot \vec{E}. \quad (1.16)$$

Lorsque la polarisation et le champ électrique sont colinéaires, ϵ est réel. Dans ce cas, on utilise davantage la permittivité relative ϵ_r pour caractériser le diélectrique. La permittivité relative d'un diélectrique, ou de manière équivalente sa constante diélectrique, est définie comme le rapport de sa permittivité sur celle du vide (soit $\epsilon_r = \epsilon/\epsilon_0$).

1.1.4 Milieu diélectrique soumis à un champ électrique à variation sinusoïdale

Supposons désormais que le milieu diélectrique est plongé dans un champ électrique qui varie de manière sinusoïdale dans le temps. Si la permittivité du milieu diélectrique est réelle, alors la polarisation \vec{P} est constamment alignée avec \vec{E} ; les dipôles permanents et induits présentent un mouvement oscillatoire en phase avec celui du champ électrique.

En réalité, la rotation des dipôles est limitée par leur inertie [10]. Cette inertie se manifeste par un retard d'orientation de \vec{P} sur \vec{E} . Si le retard est négligeable lorsque la variation du champ électrique est lente, il devient significatif à très haute fréquence. La polarisation et le champ électrique sont alors déphasés. Une illustration du déphasage est montrée Figure 1.9. De manière analytique, le déphasage est pris en compte en attribuant une permittivité ϵ^* complexe au milieu diélectrique :

$$\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon'', \quad (1.17)$$

où ϵ' et ϵ'' sont des réels. Physiquement, la partie réelle de ϵ reflète la capacité du matériau à se polariser tandis que la partie imaginaire (ϵ''), appelée facteur de pertes, traduit les pertes diélectriques. La capacité d'un matériau à transformer l'énergie électrique en énergie thermique (c'est-à-dire le caractère dissipatif du matériau) augmente avec ϵ'' .

Les variations possibles de la permittivité en fonction de la fréquence seront abordées de manière plus large ultérieurement.

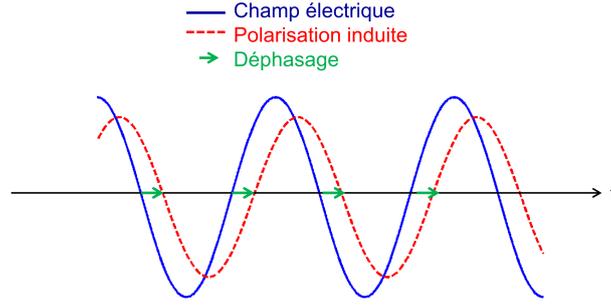


Figure 1.9 – Illustration d'un déphasage entre un champ électrique sinusoïdal et la polarisation induite.

1.1.5 Milieu conducteur et diélectrique soumis à un champ électrique à variation sinusoïdale

1.1.5.1 Permittivité et conductivité complexes

La plupart des matériaux possèdent à la fois des caractéristiques de diélectrique à pertes et de conducteur. La densité de courant totale \vec{J}_{tot} apparaissant dans un tel matériau soumis à un champ électrique extérieur est la somme de la densité de courant de conduction \vec{J}_C et de la densité de courant de déplacement \vec{J}_D :

$$\vec{J}_{tot} = \vec{J}_C + \vec{J}_D. \quad (1.18)$$

En combinant les expressions (1.13), (1.14) et (1.18) dans le domaine fréquentiel, \vec{J}_{tot} devient :

$$\vec{J}_{tot} = \sigma \vec{E} + j\omega \epsilon^* \vec{E} \quad (\text{A/m}^2), \quad (1.19)$$

où ω est la pulsation électrique (rad/s). Cette expression peut s'écrire sous la forme :

$$\vec{J}_{tot} = \sigma^* \vec{E}, \quad (1.20)$$

où σ^* est appelée conductivité complexe. En posant $\sigma^* = \sigma' - j\sigma''$, avec σ' et σ'' des réels, nous obtenons par identification :

$$\sigma' = \sigma + \omega \cdot \epsilon'' \quad (1.21)$$

$$\sigma'' = -\omega \cdot \epsilon'. \quad (1.22)$$

En combinant les équations (1.19), (1.20) puis à partir des expressions de σ' et σ'' , on montre ensuite que :

$$\epsilon^* = \epsilon' - j \frac{\sigma'}{\omega}. \quad (1.23)$$

La partie réelle de ϵ^* traduit la capacité du matériau à se polariser tandis que σ'/ω traduit à la fois les pertes par conduction (dues à l'effet Joule) et les pertes diélectriques. L'importance relative de ϵ' par rapport à ϵ'' ($= \sigma'/\omega$) dépend du caractère plutôt bon conducteur ou bon diélectrique du matériau et de la fréquence considérée.

Le paragraphe à suivre traite de la dépendance de ϵ' et ϵ'' à la fréquence de variation du champ électrique appliqué.

1.1.5.2 Mécanismes de polarisation

Suivant la plage de fréquences considérées, différents mécanismes de polarisation peuvent intervenir dans la réponse du milieu à une excitation électrique. La polarisation du milieu est toujours liée à une séparation spatiale des charges, mais celle-ci peut se manifester à des échelles spatiales différentes, soit sous forme de relaxation (traduisant un déphasage) soit sous forme de résonance. Divers modèles analytiques tels que les modèles de Debye (1929), de Cole-Cole (1941) ou encore de Cole-Davidson (1951) permettent d'approcher les phénomènes de relaxation de la permittivité. Le modèle d'oscillateur de Lorentz permet quant à lui de décrire les phénomènes de résonance [10]. La Figure 1.10 donne les variations de ϵ' et ϵ'' en fonction de la fréquence pour un cas général [11].

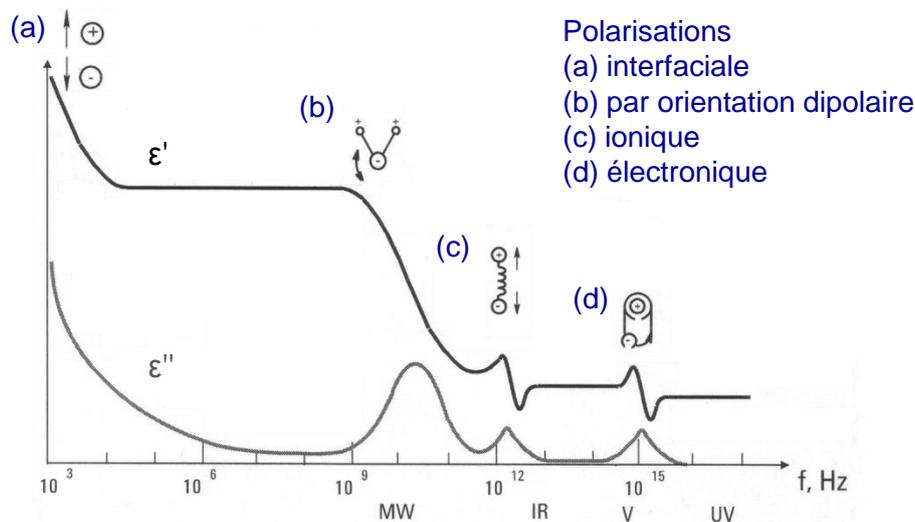


Figure 1.10 – Mécanismes de polarisation dans un milieu : cas général. ϵ' et ϵ'' sont respectivement la partie réelle et la partie imaginaire de la permittivité équivalente du milieu. Adaptée de [11].

Aux basses fréquences domine la polarisation interfaciale (partiellement représentée sur la Figure 1.10). Elle est liée aux porteurs libres qui, sous l'action du champ électrique, se déplacent et s'accumulent aux obstacles ou interfaces du matériau. Lorsque la fréquence du champ électrique augmente, les charges se déplacent sur des distances toujours plus courtes. À partir de la gamme des micro-ondes (à titre indicatif), les charges libres ne sont plus capables de se déplacer. C'est alors la polarisation par orientation dipolaire qui

contribue principalement à la polarisation du milieu.

La polarisation par orientation dipolaire est liée à la rotation des dipôles permanents et induits. Il s'agit de la polarisation illustrée précédemment Figure 1.8. Comme pour la polarisation interfaciale, elle se manifeste sous forme de relaxation. C'est elle qui est mise à profit dans les fours à micro-ondes domestiques pour chauffer les aliments (grâce aux pertes).

Lorsque la polarisation par orientation disparaît dans la gamme des infrarouges, la polarisation ionique (aussi appelée atomique) devient dominante. Elle résulte de la séparation des ions positifs et négatifs dans les cristaux ioniques soumis au champ électrique. Les déplacements des ions sont faibles car le réseau tend à s'y opposer. Comme mis en évidence Figure 1.10, la polarisation ionique se manifeste sous forme d'une résonance.

Enfin, aux fréquences du domaine visible et de l'ultraviolet, lorsque la polarisation ionique s'efface à son tour, il reste la polarisation électronique. Cette polarisation, qui apparaît également sous forme de résonance, est due au déplacement du nuage électronique chargé négativement relativement au noyau atomique chargé positivement.

1.1.6 Conclusion

Pour conclure sur cette première partie, nous avons vu les propriétés des champs électriques en général puis nous avons abordé plus en détails le cas des champs électriques statiques, des champs électromagnétiques et des champs électriques pulsés. Ces champs électriques se distinguent par leur évolution temporelle et donc leur contenu fréquentiel.

Nous avons ensuite traité les mécanismes physiques par lesquels un matériau peut répondre à l'application d'un champ électrique. Nous avons mis en évidence que ces mécanismes dépendent d'une part des propriétés de conducteur et/ou de diélectrique du matériau et d'autre part du contenu fréquentiel du champ électrique appliqué. Pour décrire les mécanismes physiques d'interaction, nous avons introduit la notion de polarisation en tant que phénomène de séparation spatiale des charges. De manière générale, nous avons montré que la polarisation d'un matériau, en réponse à l'application d'un champ électrique, se produit à des échelles spatiales d'autant plus grandes que la fréquence considérée est faible.

À présent, la question est de savoir ce que tout cela peut nous apprendre sur les phénomènes d'interaction dans le cas spécifique qui nous intéresse : à savoir celui de l'interaction entre un champ électrique pulsé et une cellule. Pour appréhender les défis posés par cette question, il est nécessaire de comprendre tout d'abord ce qui définit les cellules biologiques et les rend si particulières. Nous commençons donc par une description générale des cellules, lorsqu'elles ne sont soumises à aucun champ électrique « artificiel ».

1.2 Les cellules biologiques : notions introductives

1.2.1 Les cellules biologiques dans les conditions physiologiques

1.2.1.1 Organisation et structure

La cellule est l'unité fondamentale du vivant, dans le sens où elle représente le plus petit niveau d'organisation biologique capable de réaliser l'ensemble des activités propres à la vie. Elle naît, croît, se multiplie, remplit une certaine fonction et finit par mourir.

Un organisme peut être unicellulaire, c'est-à-dire composé d'une seule cellule (ex. les bactéries et les levures) ou pluricellulaire, c'est-à-dire composé de plusieurs cellules (ex. les animaux et les végétaux).

Les cellules sont classées suivant deux types fondamentaux : les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes. Les cellules procaryotes, telles que les cellules bactériennes, ne contiennent pas de noyau tandis que les cellules eucaryotes (ex. les cellules animales et végétales) contiennent un noyau ainsi que différents compartiments appelés organites ou organelles. Le noyau ainsi que les organelles, telles que les mitochondries, les ribosomes ou l'appareil de Golgi, baignent dans un milieu aqueux semi-fluide appelé le cytosol. Le cytosol et l'ensemble des structures s'y trouvant sont regroupés sous le nom de cytoplasme. Les organelles, au même titre que la cellule, sont délimitées par une membrane. La membrane de la cellule est spécifiquement désignée par le terme « membrane plasmique ». Une représentation schématique et simplifiée d'une cellule eucaryote est montrée Figure 1.11.

Chaque cellule assume une ou plusieurs fonctions spécifiques au sein de l'organisme dans lequel elle se trouve. Les cellules se présentent sous des formes spatiales et des tailles variées, celles-ci étant optimisées pour le fonctionnement de la cellule. Elles sont le plus souvent de forme sphérique ou cylindrique ; certaines sont allongées (ex. les cellules musculaires), d'autres très étirées (ex. les cellules nerveuses). Leur dimension varie typiquement entre 1 et 100 μm .

Les cellules de même type et concourant à une fonction commune forment un tissu (ex. le tissu hépatique). Différents tissus dont les activités sont complémentaires peuvent

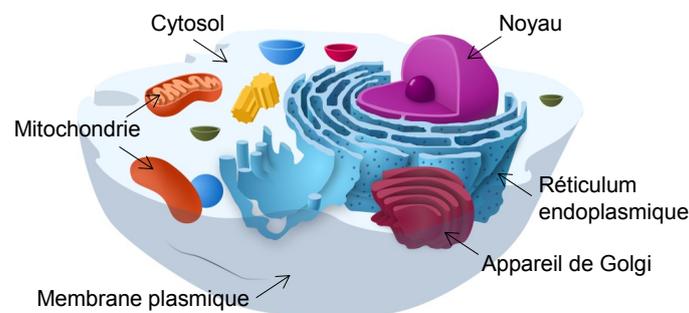


Figure 1.11 – Représentation schématique d'une cellule eucaryote. Adaptée de [12].

se rassembler pour former des organes (ex. le foie) qui peuvent à leur tour s'associer pour former un appareil ou système (ex. le système digestif). L'association de ces appareils forment l'organisme (ex. un être humain).

1.2.1.2 Fonctionnement général

Le fonctionnement de la cellule est dynamique. Elle échange en permanence de la matière avec son milieu environnant, d'une part pour assurer sa survie et d'autre part pour répondre aux sollicitations de l'organisme. La cellule fabrique et renouvelle ses constituants moléculaires par l'intermédiaire d'incessantes réactions biochimiques se produisant au sein même de la cellule. Toutes les organelles de la cellule possèdent une fonction bien déterminée, avec le noyau comme centre de contrôle de l'ensemble de l'activité cellulaire. Ce dernier renferme les informations déterminant le développement et le fonctionnement de la cellule et *a fortiori* la vie de l'organisme. Ces informations sont contenues sous forme codée dans la molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique).

1.2.1.3 Rôle de la membrane plasmique

Le paragraphe suivant s'appuie sur le schéma de la Figure 1.12.

La membrane plasmique joue le rôle indispensable de barrière entre l'intérieur de la cellule et son milieu environnant, et régule les entrées et sorties des molécules nécessaires à la vie de la cellule. Elle possède une perméabilité très sélective et se présente sous la forme d'une double couche d'une épaisseur totale de 5 à 8 nm principalement composée de lipides et de protéines [14]. La structure en double couche est directement liée au caractère amphiphile des molécules lipidiques. Ces dernières possèdent en effet une partie hydrophile, « la tête », associée à une partie hydrophobe constituée de deux chaînes d'acides gras appelées « queues ». Les milieux intracellulaire et extracellulaire étant principalement aqueux, les lipides s'y organisent spontanément en cette double couche. En raison de son cœur hydrophobe, la bicouche est relativement imperméable à la plupart

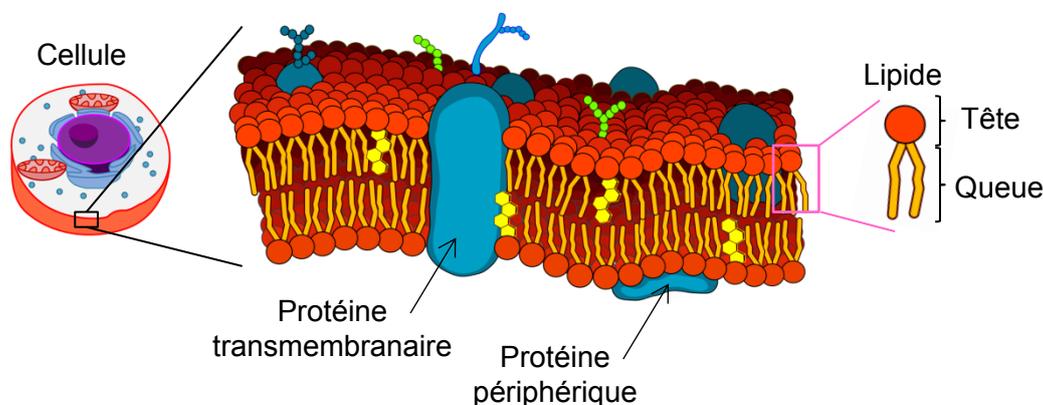


Figure 1.12 – Représentation schématique de la membrane. Adaptée de [13].

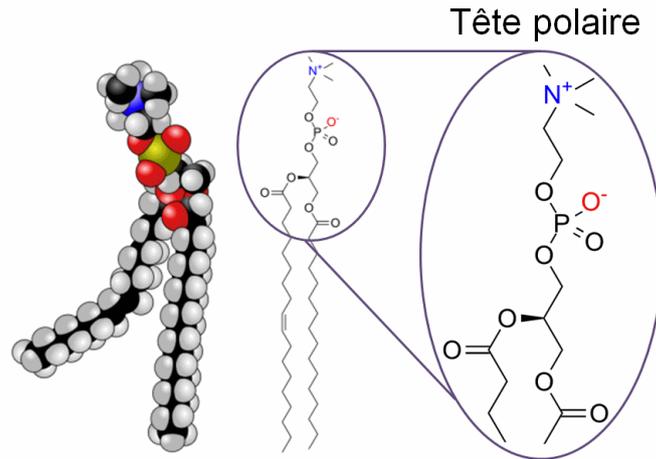


Figure 1.13 – Topologie du lipide 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC). Adaptée de [17, 18].

des molécules hydrophiles. Les échanges d'ions et de molécules ne pouvant pas pénétrer dans la bicouche sont assurés par des protéines insérées dans la membrane et la traversant de part en part. Ces protéines, appelées protéines transmembranaires (ou intrinsèques), permettent à la fois l'approvisionnement de la cellule en nutriments et l'élimination des déchets métaboliques. Sur les versants interne et externe de la membrane se trouvent également d'autres protéines, les protéines périphériques (ou extrinsèques).

D'un point de vue mécanique, la membrane est une mosaïque fluide capable de se mouvoir sans se déchirer [15]. D'un point de vue électrique, la grande majorité des membranes contiennent un certain pourcentage de lipides avec des groupements chargés [16]. La Figure 1.13 montre l'exemple du lipide 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC) dont la tête présente un groupement phosphate chargé négativement et un groupement nitrogéné chargé positivement. Du fait de la présence de ces deux pôles, la tête est appelée « tête polaire ». Dans leur ensemble, la membrane et les milieux intra/extracellulaire sont électriquement neutres. On observe toutefois un léger déficit d'ions potassium au niveau de la face intérieure de la membrane (la face cytoplasmique). Ce déficit donne naissance à une différence de potentiel, de part et d'autre de la membrane, appelée potentiel transmembranaire (PTM) (voir Figure 1.14). Le PTM au repos, c'est-à-dire sans excitation électrique externe, est relativement stable dans le temps et se situe entre -40 mV à -90 mV selon le type de cellule et son stade de développement. Le PTM au repos ($\Delta\Psi_m$) est par définition négatif puisqu'il est égal à la différence de potentiel entre la face intérieure (Ψ_{int}) et la face extérieure (Ψ_{ext}) de la membrane :

$$\Delta\Psi_m = \Psi_{int} - \Psi_{ext}. \quad (1.24)$$

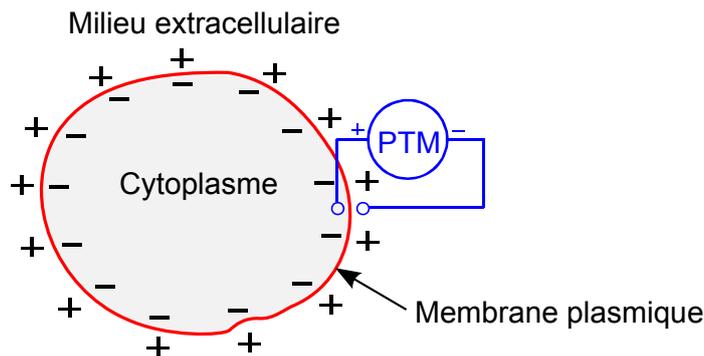


Figure 1.14 – Illustration du potentiel transmembranaire (PTM) d'une cellule au repos.

1.2.1.4 Le cancer : une anomalie de fonctionnement

Des anomalies de fonctionnement peuvent être observées dans les cellules. Un exemple est une prolifération anarchique et anormalement rapide de ces dernières. Dans un tel cas, on parle de cancer et les cellules sont qualifiées de cellules cancéreuses. Leur prolifération anormale conduit à la formation d'une ou de plusieurs masses appelées tumeur.

Les principales techniques de traitement du cancer sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie [19]. La chirurgie consiste à extraire la tumeur, la radiothérapie vise à rendre les cellules malades incapables de se diviser tandis que la chimiothérapie a pour but de les tuer [20]. Le cancer en tant que pathologie est la première cause de mortalité précoce en France [21].

1.2.2 La cellule face à un champ électrique : grandeurs caractéristiques

D'un point de vue électrique, les cellules se comportent à la fois comme des conducteurs (dû à la présence d'ions) et comme des diélectriques à pertes (dû à la présence de dipôles). En raison de la forte hétérogénéité du contenu des cellules observées à l'échelle moléculaire, l'étude des mécanismes de polarisation d'une cellule soumise à un champ électrique est complexe.

D'un point de vue magnétique, les cellules sont considérées comme amagnétiques sachant que leur perméabilité magnétique μ est égale à celle du vide (μ_0). Ainsi, même lorsque le champ électrique est couplé à un champ magnétique, seuls les champs électriques et courants électriques induits à l'intérieur de l'échantillon sont d'intérêt. Le champ magnétique induit est le même que le champ magnétique appliqué.

L'objectif du paragraphe à suivre est de donner une idée générale des constantes de temps des phénomènes de polarisation dominants lorsqu'une cellule est soumise à une impulsion électrique de forme rectangulaire. Dans ce manuscrit, les impulsions

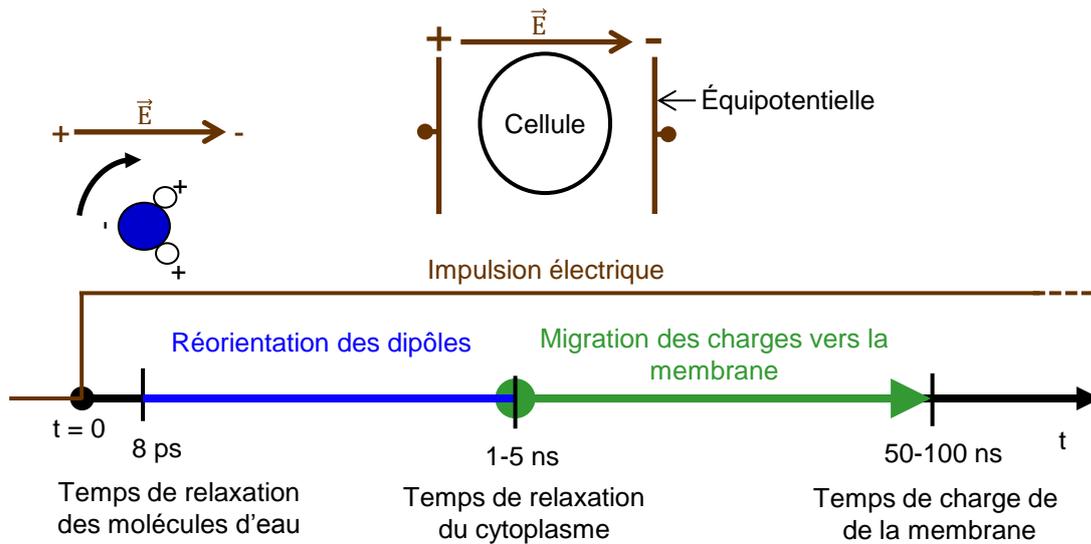


Figure 1.15 – Aperçu général des constantes de temps des phénomènes de polarisation d'une cellule lorsque cette dernière est soumise à une impulsion électrique de durée grande devant les échelles de temps données.

électriques qui nous intéressent ont une largeur spectrale d'au plus quelques gigahertz. En conséquence, nous ne considérons que les polarisations interfaciales et par orientation dipolaire. Les explications à suivre s'appuient sur le schéma de la Figure 1.15.

Lorsqu'un champ électrique est appliqué à une cellule, le premier événement notable est l'alignement des molécules d'eau avec le champ électrique. Leur temps de relaxation diélectrique est d'environ 8 ps [22]. Le temps nécessaire pour l'alignement de l'ensemble des dipôles est estimé à quelques nanosecondes. Les ions présents dans le cytosol et le milieu extracellulaire se déplacent pour leur part jusqu'à typiquement 50 à 100 ns après le début de l'exposition (pour des cellules de mammifères) [5]. Ce temps correspond au temps nécessaire à l'accumulation des ions aux bornes de la membrane plasmique : il s'agit du temps de charge de la membrane. La membrane plasmique agit alors comme un isolant et les milieux intracellulaire et extracellulaire comme des conducteurs [23].

Pour une impulsion électrique appliquée dont la durée et le temps de montée sont très supérieurs au temps de charge de la membrane plasmique, le champ électrique sera donc nul dans le cytoplasme. De plus, du fait de l'accumulation des charges aux bornes de la membrane, il apparaît théoriquement un potentiel transmembranaire dit « induit ». Ce PTM induit se superpose au potentiel transmembranaire de repos.

Si le temps d'établissement et la durée de l'impulsion électrique appliquée sont inférieurs au temps de charge de la membrane plasmique, tous les ions intracellulaires n'auront pas le temps nécessaire pour se déplacer jusqu'à la membrane. Et si la durée de l'impulsion appliquée se rapproche de la nanoseconde voire atteint le régime subnanoseconde, alors même certains dipôles ne disposeront plus du temps suffisant pour

s'aligner avec le champ électrique appliqué.

Ainsi, l'étude des interactions des champs électriques pulsés avec les cellules biologiques est généralement séparée en trois cas : le cas où les impulsions sont de durée microseconde et plus, le cas où les impulsions sont de durée nanoseconde (supérieure à quelques nanosecondes et jusqu'à quelques centaines de nanosecondes) et enfin celui où les impulsions sont de quelques nanosecondes à subnanosecondes.

Pour comprendre les raisons pour lesquelles nous portons tant d'intérêt à l'étude des mécanismes physiques d'interaction entre ces types d'impulsions électriques et les cellules, nous proposons dans la suite un aperçu des observations expérimentales des effets biologiques que peuvent engendrer ces impulsions. De plus, la partie à suivre permettra de mieux appréhender pourquoi les biologistes sont intéressés par les effets d'impulsions de durée toujours plus courte. Nous mettrons également en évidence le rôle majeur joué par l'intensité des impulsions, en plus de leur durée, sur les effets biologiques induits.

1.3 Les effets biologiques des impulsions électriques en expérimentation

Par définition, les effets biologiques regroupent les changements d'ordre physiologique, biochimique ou comportemental induits dans un organisme, un tissu ou une cellule en réponse à une stimulation extérieure [24].

De manière générale, on distingue les effets biologiques qui résultent d'une hyperthermie des cellules — les effets thermiques, de ceux qui sont la conséquence d'un quelconque autre processus biophysique — les effets non thermiques [25, 26].

1.3.1 Méthodes expérimentales

1.3.1.1 Modèles (cibles) biologiques exposés

En laboratoire, les effets biologiques pouvant être induits sur le vivant par l'application d'impulsions électriques sont étudiés soit *in vitro* (sur des cellules en dehors de leur environnement naturel) soit *in vivo* (par exemple sur des souris). Les expérimentations sur les modèles *in vitro* sont destinées à l'étude des effets au niveau cellulaire et subcellulaire, les résolutions spatiale et temporelle dépendant des techniques d'imagerie utilisées. Les modèles *in vitro* étant très simplifiés devant la complexité d'un organisme vivant, l'observation d'effets biologiques sur ces modèles n'implique pas nécessairement le déclenchement de ces mêmes effets *in vivo*. Les études *in vitro* et *in vivo* sont donc complémentaires [27]. Dans le cas où les effets obtenus présentent des potentialités thérapeutiques et s'ils sont pertinents, sans danger et ont été observés à la fois *in vitro* et *in vivo*, alors des essais cliniques sur l'Homme peuvent être autorisés. Ces essais cliniques

ont pour but d'établir d'une part si l'exposition apporte un bénéfice établi avec fiabilité et d'autre part si le bénéfice est cliniquement pertinent pour l'utiliser en pratique [28].

1.3.1.2 Système d'exposition

L'étude des effets biologiques des impulsions électriques requiert tout un panel de technologies. Dans ce manuscrit, nous appellerons « système d'exposition » l'ensemble des outils permettant d'exposer la cible de manière contrôlée ainsi que de qualifier et quantifier les effets induits.

La Figure 1.16 présente le schéma typique d'un système d'exposition *in vitro*. Nous y trouvons en premier lieu le générateur d'impulsions de tension, dont la sortie est connectée à ce que nous désignons « l'applicateur ». L'applicateur est la partie du système d'exposition qui transforme les impulsions de tension générées en champs électriques pulsés dans l'échantillon. Afin d'observer le comportement de l'échantillon idéalement avant, pendant et après l'exposition, le système d'exposition comprend également un système d'imagerie. Enfin, pour assurer la reproductibilité des effets obtenus et minimiser les méprises d'interprétation, le contrôle du champ électrique et de la température est essentiel dans l'échantillon. Par exemple, la connaissance des variations de température potentiellement induites permet de définir si les effets biologiques observés sont thermiques ou non thermiques. Les techniques de quantification des grandeurs électriques et des variations de température induites sont regroupées sous le terme de « dosimétrie ». Les objectifs et limites de ces techniques seront abordés plus largement dans les chapitres suivants. Pour ce chapitre, nous nous contenterons (provisoirement) de plus amples détails sur les techniques expérimentales d'observation des effets biologiques induits.

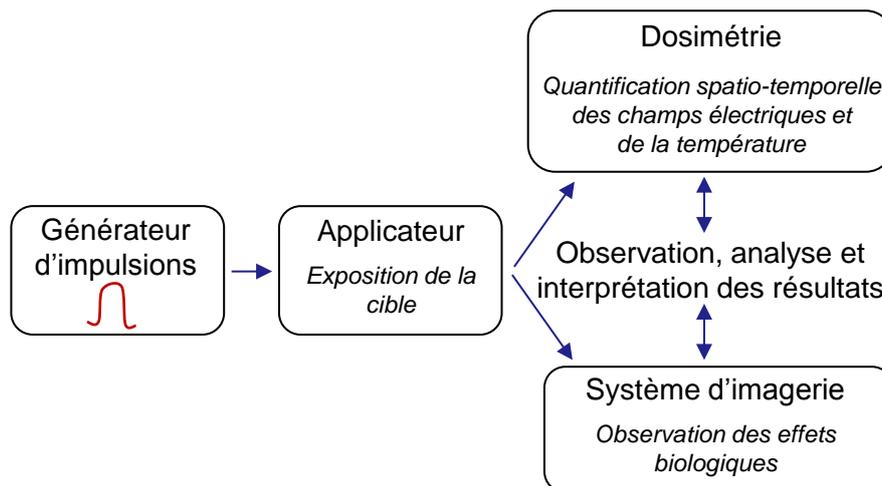


Figure 1.16 – Représentation schématique d'un système d'exposition *in vitro*.

1.3.1.3 Techniques d'observation des effets

Comme nous le constaterons dans la suite, la microscopie à fluorescence est la technique d'imagerie la plus populaire parmi les biologistes. Un exemple d'image d'une cellule obtenue via cette technique est montré Figure 1.17.

Le processus de fluorescence est un processus par lequel une molécule excitée à une longueur donnée (habituellement dans l'ultraviolet ou le visible) émet un rayonnement de longueur d'onde typiquement supérieure. Les molécules fluorescentes (appelées fluorochromes ou fluorophores) ont des spectres d'excitation et d'émission qui leur sont propres. De plus, ces spectres peuvent fortement dépendre de l'environnement local des molécules (par exemple de la température, du pH ou encore de la présence d'autres molécules) [29]. La dynamique temporelle de la fluorescence est typiquement de l'ordre de la nanoseconde voire plus. Le principe général de la microscopie à fluorescence consiste à exciter l'échantillon puis à détecter le rayonnement émis à l'aide d'une caméra. La résolution spatiale de l'image acquise est au mieux la limite de diffraction, soit environ 200 nm.

La microscopie à fluorescence permet de localiser et d'étudier dans le temps les constituants cellulaires fluorescents. La fluorescence naturelle des cellules étant généralement faible, et pour augmenter la spécificité des composants intracellulaires imagés, les biologistes utilisent la technique du marquage. La marquage de l'échantillon consiste à lui injecter des fluorochromes qui se lient préférentiellement à certains constituants de la cellule, ou dont la fluorescence varie fortement en fonction du paramètre que l'on souhaite étudier (par exemple la température). Les principaux avantages de la microscopie à fluorescence sont d'être simples d'utilisation, non toxiques pour la matière vivante, de présenter un bon rapport signal à bruit et de donner accès à des informations spécifiques.

D'autres techniques d'imagerie sont actuellement à l'étude pour observer les cellules exposées avec une résolution temporelle potentiellement bien meilleure que celle de

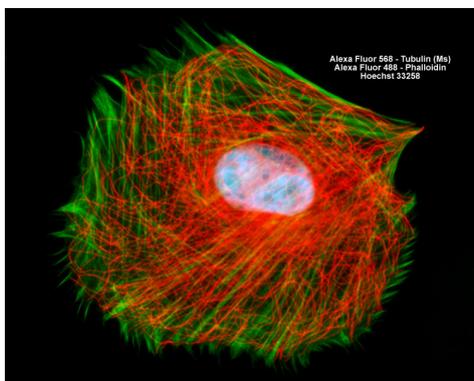


Figure 1.17 – Image d'une cellule (fibroblaste) obtenue par la technique de microscopie à fluorescence. Source : <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/galleries/cells/index.html>.

la microscopie à fluorescence. À XLIM, un système de microspectroscopie DRASC multiplex est en cours de développement [30]. Le DRASC (acronyme de Diffusion Raman Anti-Stokes Cohérente) est un processus optique d'interaction non linéaire de la lumière avec la matière. Cette technique d'imagerie ne nécessite pas de fluorochrome et permet de sonder les effets des impulsions à l'échelle moléculaire. De plus, elle permet d'analyser la réponse de l'échantillon sur tout un spectre de fréquences grâce à une excitation polychromatique. Un microscope DRASC, basé cette fois sur une excitation monochromatique, est également développé à l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) [31].

Dans la suite, nous abordons les effets biologiques qui ont été observés par les biologistes lorsque les cellules étaient exposées à des impulsions électriques de forte intensité. Sauf mention contraire, les effets biologiques cités sont non thermiques. Les impulsions électriques que nous considérerons sont certes de forte puissance mais de courte durée, de sorte que l'énergie appliquée n'induit pas d'échauffement excessif de la matière exposée.

Nous commencerons par traiter les effets biologiques induits par des impulsions électriques de durée microseconde ou milliseconde et d'intensité de l'ordre du kilovolt par centimètre (kV/cm). Nous poursuivrons par le cas des impulsions de durée de 3 à 600 ns et d'intensité très supérieure au kV/cm puis nous finirons avec les impulsions de durée inférieure à 3 ns (la limite de 3 ns étant indicative). Cet ordre suit la chronologie selon laquelle les observations ont été réalisées. Historiquement, ce sont en effet les effets biologiques des impulsions électriques millisecondes et microsecondes qui ont été les premiers étudiés. Les bénéfices de ces impulsions pour le domaine de l'agro-alimentaire sont apparus dès le début des années 1960 [32] et ceux pour le domaine biomédical à partir des années 1980 [33]. Les premiers travaux *in vitro* montrant les intérêts des impulsions électriques nanosecondes ne sont pour leur part apparus qu'à la fin des années 1990 [34]. Quant aux études des effets biologiques des impulsions de durée inférieure à quelques nanosecondes, elles sont toujours limitées par le manque de systèmes d'exposition adaptés. De manière générale, les intensités nécessaires au déclenchement d'effets biologiques détectables augmentent quand la durée des impulsions diminue. Les systèmes électroniques permettant la génération et le transport d'impulsions électriques se complexifient lorsque l'intensité des impulsions électriques augmente et leur durée diminue, c'est le rythme de développement de ces systèmes qui a principalement dicté, et dicte encore, les formes d'impulsions qui sont disponibles en expérimentation. Ceci explique la diminution progressive au fil des années de la durée des impulsions étudiées.

1.3.2 Effets biologiques des impulsions électriques dites longues (durée ms- μ s, intensité \approx kV/cm)

Dans cette section, nous traitons des effets biologiques et des applications des impulsions électriques de durée milliseconde à microseconde. En particulier, nous aborderons un nouveau phénomène : l'électroporation. Par souci de simplification, nous pourrions faire référence à l'ensemble des impulsions électriques de durée milliseconde et microseconde par le terme d'impulsions électriques longues.

1.3.2.1 L'« électroporation »

Le terme « électroporation » a été employé pour la première fois par Neumann et son équipe au début des années 1980 [33]. Ce terme servait alors à désigner une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique des cellules, liée à leur exposition à des impulsions électriques. Par augmentation de la perméabilité, on entend que le passage de certaines molécules au travers de la membrane est facilité, voire même que la traversée de la membrane devient possible pour certaines molécules qui ne le peuvent pas d'ordinaire. Le terme « électroporation » a été choisi car la perméabilisation était interprétée par la formation de pores au travers de la membrane. La Figure 1.18 en présente une illustration imagée.

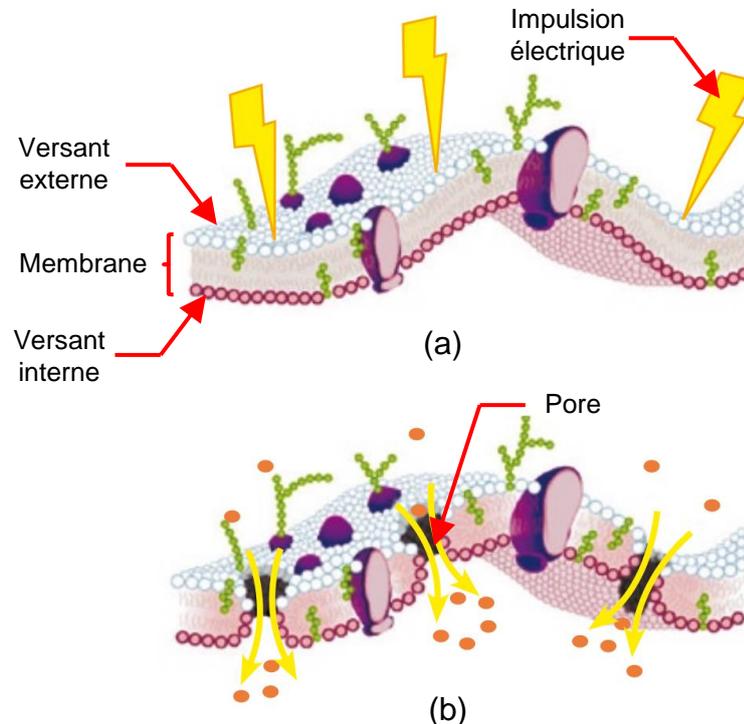


Figure 1.18 – Illustration imagée de l'électroporation. Membrane soumise à une impulsion électrique à l'état initial (a) et membrane électroporée suite l'application de l'impulsion électrique (b). Adaptée de [35].

Lorsque que la perméabilisation induite est temporaire et ne modifie pas la viabilité de la cellule, on parle communément d'« électroporation réversible ». L'électroporation réversible est typiquement obtenue avec des impulsions électriques d'une centaine de microsecondes à quelques millisecondes et d'intensité de l'ordre du kV/cm [36]. Le temps d'apparition de l'électroperméabilisation est estimé à quelques microsecondes après l'application de ces impulsions électriques tandis que le temps nécessaire à la cellule pour retrouver son intégrité (« resealing » en anglais) peut s'élever à quelques minutes.

Lorsque les paramètres des impulsions électriques longues sont critiques (par exemple une très forte intensité combinée à une longue durée et/ou un grand nombre d'impulsions appliquées), la perméabilisation de la membrane peut devenir irréversible. Il s'en suit alors une rupture de la membrane et la mort de la cellule. Ce phénomène est plus couramment désigné par le terme d'« électroporation irréversible ».

Alors même que les mécanismes de l'électroperméabilisation étaient peu connus, ces modifications possibles de la membrane plasmique ont conduit à des applications innovantes et prometteuses, dans des domaines aussi divers que le domaine biomédical, le domaine de l'agro-alimentaire ou encore celui de l'environnement.

Dans la suite, nous dissocierons les applications de l'électroporation réversible de celles de l'électroporation irréversible.

1.3.2.2 Applications de l'électroporation réversible

En 1982, Neumann et co-auteurs publient les premiers travaux tirant profit de la période d'électroperméabilisation de la membrane plasmique pour transférer à des cellules de souris des gènes d'ordinaire non perméables [33]. L'électroporation réversible remporte dès lors un vif succès auprès des biologistes pour rendre possible ou faciliter l'introduction de petites et grandes molécules dans les cellules. Les grandes molécules ayant plus de difficulté à traverser la membrane, leur introduction nécessite d'appliquer des impulsions électriques microsecondes intenses (un ou plusieurs kV/cm), ou alors, si les impulsions électriques sont d'intensité moindre (une centaine de V/m), la durée des impulsions doit être augmentée à une dizaine de millisecondes. Une troisième possibilité consiste à combiner l'application d'impulsions électriques d'une centaine de microsecondes et d'intensité de l'ordre du kV/cm, à des impulsions d'une dizaine à plusieurs centaines de millisecondes et d'intensité de l'ordre de la centaine de V/cm. Ces protocoles sont utilisés pour le transfert de gènes dans les cellules. L'efficacité des transferts reste cependant limitée et les mécanismes impliqués ne sont pas complètement maîtrisés [37].

L'électroporation réversible est également mise à profit pour le transfert de médicaments dans les cellules, avec possibilité de causer la mort des cellules en introduisant des médicaments cytotoxiques. La bléomécine est un exemple de molécule fortement toxique pour les cellules lorsque celle-ci se trouve dans leur cytosol, mais qui traverse difficilement la membrane plasmique dans les conditions ordinaires [38]. Grâce à

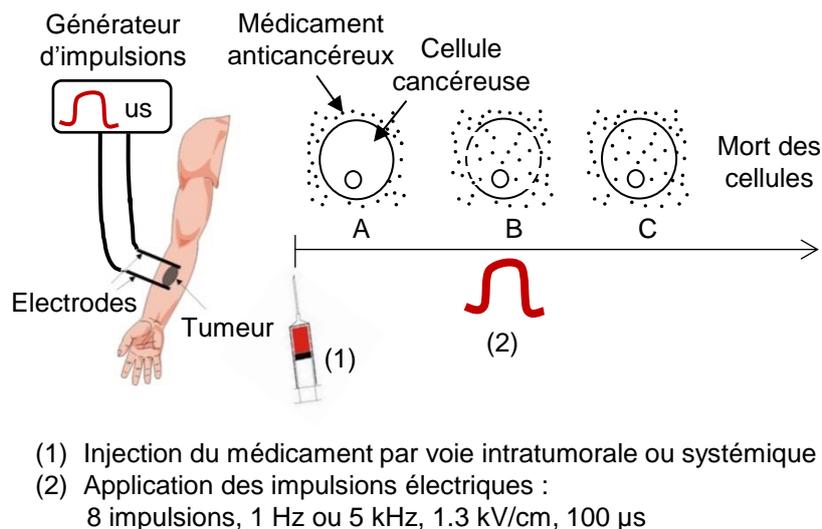


Figure 1.19 – Procédure opérationnelle standard de l'électrochimiothérapie. A : Injection du médicament cytotoxique, le médicament encercle les cellules. B : Application des impulsions électriques, perméabilisation de la membrane, entrée des médicaments dans la cellule. C : Membrane à nouveau intègre et action du médicament puis mort de la cellule. Inspirée de [42].

l'électroporation, son action peut être potentialisée en facilitant son entrée dans les cellules ciblées.

Ainsi, l'électroporation a ouvert la voie à un nouveau traitement anticancéreux, l'électrochimiothérapie (ECT). À la suite d'expériences concluantes *in vitro* et *in vivo*, Lluís M. Mir et son équipe, de l'Institut Gustave Roussy, ont porté le traitement en clinique au début des années 1990. Suite à une étude européenne conduite entre 2003 et 2005, l'efficacité de l'ECT a été prouvée pour le traitement des métastases cutanées et sous-cutanées [39]. L'ECT est aujourd'hui standardisée et proposée dans une centaine de pays en Europe. La procédure opérationnelle standard de l'ECT est schématisée Figure 1.19. Elle associe l'injection par voie intratumorale ou systémique (voie générale) des médicaments cytotoxiques (bléomycine ou cisplatine) à l'application locale de huit impulsions électriques de durée 100 μ s et d'intensité 1.3 kV/cm. Les impulsions électriques sont délivrées par l'intermédiaire d'un système standard, le CliniporatorTM. Comparée à un traitement par chimiothérapie uniquement, l'ECT requiert une dose de médicaments notablement inférieure pour une même efficacité du traitement [40]. De plus, l'ECT tue sélectivement les cellules en division, et donc les cellules tumorales, respectant ainsi les cellules saines avoisinant la tumeur. Les débris cellulaires sont éliminés par les structures vasculaires. Il résulte que les effets secondaires liés au traitement sont quasi-inexistants voire inexistantes. De plus amples détails sur les aspects cliniques de l'électroporation sont donnés dans [41].

Dans le domaine de la biologie, l'électroporation réversible permet également de faciliter la fusion cellulaire via la membrane [43]; on parle d'électrofusion.

Dans le domaine des sciences environnementales, des impulsions de durée microseconde peuvent aider à lutter contre le biofouling, c'est-à-dire la colonisation de surface en milieu aqueux par des organismes vivants [44]. Sur la surface affectée, l'application répétitive d'impulsions microsecondes de haute tension permet de choquer les organismes et d'éviter ainsi qu'ils ne se fixent [45, 46].

1.3.2.3 Applications de l'électroporation irréversible

Nous rappelons que l'électroporation irréversible conduit à la mort des cellules en raison de la rupture irréversible de la membrane plasmique. Dans [47], Boris Rubinsky (professeur à l'université de Californie, Berkeley, USA) raconte l'histoire de ce phénomène qui pourrait avoir été observé dès le milieu du XVIII^e siècle.

Une application potentielle de l'électroporation irréversible est l'ablation de tumeurs cancéreuses sans médicament. Cependant, la méthode n'est pas sélective dans le sens où toutes les cellules exposées au champ électrique critique sont tuées, qu'elles soient tumorales ou non.

Fin 2007, Al-Sakere et co-auteurs ont publié les premiers traitements réussis par électroporation irréversible (en anglais « N-IRE » pour « nonthermal irreversible electroporation ») de tumeurs cutanées implantées dans des souris [48]. Le protocole consistait en l'application de 80 impulsions de 100 microsecondes, d'intensité 2.5 kV/cm et de fréquence de répétition 0.3 Hz. En 2011, Garcia et co-auteurs ont eux observé la rémission complète de la tumeur d'un patient canin atteint d'un cancer du cerveau inopérable [49]. Ces résultats ont été obtenus grâce à un traitement par électroporation irréversible suivi de radiothérapie. Les impulsions électriques étaient appliquées à l'aide du système NanoKnife® (Angio Dynamics, Queensbury, NY, USA). À ce jour, ce système est approuvé aux États-Unis par la FDA (Food and Drug Administration) pour l'ablation de tissus souples mais est toujours en attente d'une standardisation pour l'ablation de tumeurs. Davantage d'études cliniques seront certainement nécessaires avant un potentiel établissement d'une procédure standard de traitement anti-cancéreux par électroporation irréversible.

Dans le domaine de l'environnement, l'électroporation irréversible peut être utilisée pour la décontamination des eaux usées car elle détruit les bactéries exposées.

L'électroporation irréversible est également attractive auprès des industriels de l'agro-alimentaire. En effet, ces derniers sont toujours à la recherche de méthodes de conservation de leurs produits alimentaires ne présentant pas les inconvénients majeurs des techniques thermiques actuellement employées. Ces inconvénients sont notamment la dégradation des qualités sensorielles et nutritionnelles des produits [50]. L'efficacité de l'électroporation irréversible pour l'inactivation des micro-organismes (et donc la conservation) des denrées



Figure 1.20 – À droite : comparaison des résultats de l'extraction du jus sucré de betteraves par électroporation irréversible et par la technique d'extraction traditionnelle. À gauche : l'installation industrielle utilisée pour le traitement des betteraves par électroporation. D'après [56].

alimentaires liquides est au centre de diverses publications [51–53]. Les résultats montrent que les impulsions électriques n'altèrent pas la qualité sensorielle des aliments.

L'efficacité de l'électroporation irréversible a de plus été démontrée pour l'extraction solide-liquide de matières végétales (par ex. pour l'extraction du jus sucré de la betterave ou l'extraction des composés phénoliques du raisin) [54, 55]. La Figure 1.20 montre une comparaison de résultats obtenus lors de l'extraction du jus sucré de betteraves par électroporation irréversible et par la technique d'extraction traditionnelle [56]. Elle montre également l'installation industrielle utilisée pour le traitement des betteraves par électroporation. À souligner que l'électroporation irréversible présente l'avantage appréciable d'être moins coûteuse en énergie que les techniques thermiques.

Pour terminer cette partie sur les impulsions électrique longues, la Figure 1.21 propose un récapitulatif des applications de l'électroporation réversible et irréversible qui ont été abordées. Dans la partie à suivre, nous verrons en quoi les effets des impulsions électriques de durée nanoseconde se distinguent de ceux des impulsions électriques longues.

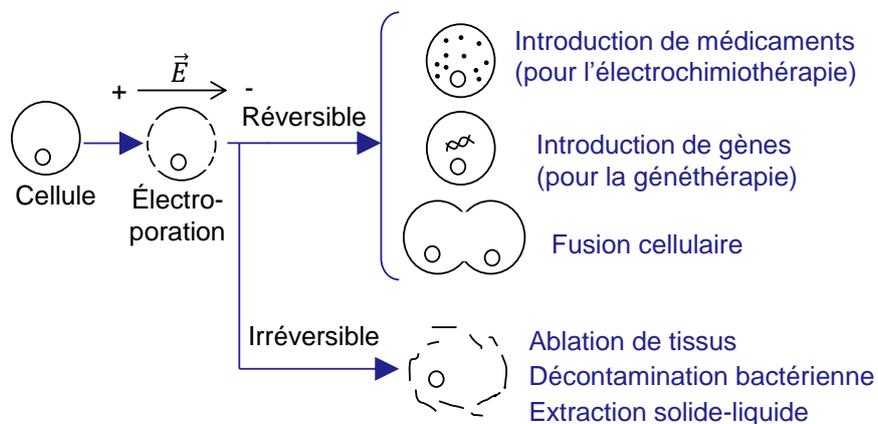


Figure 1.21 – Aperçu des applications de l'électroporation réversible et irréversible. Adaptée de [57].

1.3.3 Effets biologiques des impulsions électriques nanosecondes (durée 3-600 ns, intensité \gg kV/cm)

Nous pourrions faire référence aux impulsions électriques nanosecondes par l'acronyme nsPEFs (pour nanosecond Pulsed Electric Fields).

1.3.3.1 L'existence d'effets intracellulaires

L'effet biologique des impulsions électriques nanosecondes qui passionne tout particulièrement les biologistes est l'induction de l'apoptose.

L'apoptose ou mort cellulaire programmée a été décrite pour la première fois en 1972 par Kerr et co-auteurs dans [58] (hors du contexte d'études bioélectromagnétiques). Il s'agit d'un processus physiologique par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction suite à une cascade de signaux intracellulaires [59]. Ce processus est indispensable à la survie des organismes multicellulaires car il permet de réguler les populations de cellules. On oppose souvent l'apoptose à la nécrose qui peut correspondre à une mort pathologique (accidentelle) des cellules [60]. Lors de la nécrose, la cellule se rompt et verse son contenu dans le tissu environnant, conduisant à une inflammation locale. Dans le cas de l'apoptose, il n'y a pas libération du contenu cellulaire dans le milieu avoisinant car la cellule se scinde en corps apoptotiques délimités individuellement par une enveloppe intacte. Ces corps sont absorbés et éliminés par les cellules adjacentes ou les macrophages. Il n'y a donc de réaction inflammatoire.

À notre connaissance, la possibilité d'induire l'apoptose des cellules en les exposant à d'intenses nsPEFs a été mise en évidence pour la première fois en 2002 par Beebe et co-auteurs [61]. Les auteurs avaient alors exposé *in vitro* des cellules de mammifères à des impulsions électriques de durée 300, 60 ou 10 ns et d'intensité respective de 36 kV/cm, 60 kV/cm et 150 kV/cm. Depuis, de nombreuses études se sont concentrées sur l'identification des voies d'activation de l'apoptose contrôlées par les nsPEFs. Différents facteurs connus pour être pro-apoptotiques ont été mis en évidence. Dans une publication de cette année [62], Beebe et co-auteurs ont proposé une hypothèse de modèle pour déterminer les effets biologiques des nsPEFs et les voies d'activation de l'apoptose. La Figure 1.22 montre une illustration du modèle proposé. Au vu de la complexité du modèle, nous ne reviendrons ici que sur le point clé, à savoir que les modifications induites par les nsPEFs se situent aussi bien au niveau de la membrane plasmique qu'à l'intérieur de la cellule. Des observations microscopiques via la microscopie à fluorescence ont en effet montré que d'intenses impulsions électriques nanosecondes sont capables d'induire des effets intracellulaires [59, 63–71]. À notre connaissance, ce sont Karl Schoenbach, Stephen Beebe et Stephen Buescher qui, en 2001, ont les premiers mis en évidence l'existence d'effets à l'intérieur des cellules exposées [72]. Après exposition des cellules *in vitro* à 5 impulsions de 60 ns et d'intensité de 53 kV/cm, ils ont démontré l'augmentation de la perméabilité des membranes intracellulaires et ceci sans modification permanente de la membrane plasmique. En 2011, Napotnik et co-auteurs ont eux mis en évidence l'augmentation de

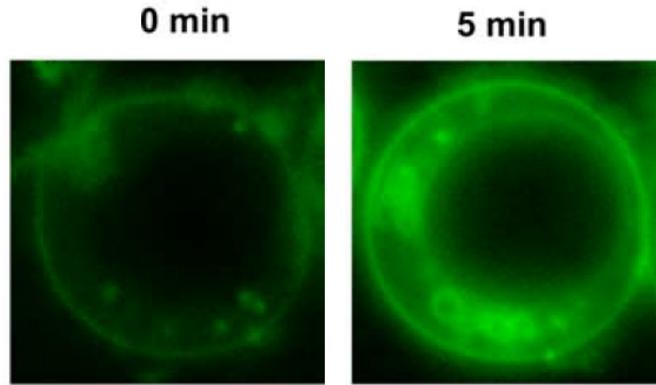


Figure 1.23 – Observation de la fluorescence de cellules Jurkat marquées au FM1-43 et exposées à $t = 0$ min à 4 impulsions électriques de 30 ns, 3.5 MV/m avec une fréquence de répétition de 4 Hz. L'augmentation de la fluorescence indique la translocation de la phosphatidylsérine vers le feuillet externe de la membrane plasmique. D'après [75].

impulsion de 10 ns et d'intensité 40 kV/cm, Silve et co-auteurs ont eux réussi à faire pénétrer de la bléomycine dans les cellules [80]. En exposant des cellules, toujours *in vitro*, à des impulsions électriques de 600 ns et de quelques kV/cm, et en réalisant simultanément des mesures de courant et de tension au niveau de la membrane plasmique, Pakhomov et co-auteurs ont montré que les pores sont voltage-dépendants et rectifiants entrants [78]. Ceci signifie que le comportement des pores dépend du potentiel transmembranaire et que les pores bloquent les courants sortants. Les pores formés ne sont donc pas simplement des trous dans la membrane. Les mesures de courant et de tension ont été obtenues via la méthode patch-clamp respectivement en mode voltage-clamp et current-clamp. Cette méthode consiste à mettre en contact une micropipette de verre, remplie d'un milieu conducteur, avec la membrane. La micropipette est connectée à un circuit électrique qui permet d'imposer des potentiels et de mesurer les courants (méthode voltage-clamp) ou bien d'imposer des courants et de recueillir les tensions (méthode current-clamp) [81, 82]).

Des études citées jusque-là, nous observons que les paramètres des impulsions appliquées varient significativement d'une expérimentation à l'autre. Dans la section à suivre, nous proposons un récapitulatif des études portant sur l'analyse de l'influence des paramètres des impulsions sur les effets biologiques induits. Par paramètres des impulsions nous entendons leur durée, forme temporelle, intensité, nombre appliqué et fréquence de répétition.

1.3.3.2 Influence des paramètres des impulsions

Pour évaluer l'intensité attendue S d'un effet biologique en fonction des paramètres des impulsions électriques appliquées, Schoenbach et co-auteurs ont proposé la loi d'échelle empirique suivante [83] :

$$S = S(E \cdot T \cdot N^{\frac{1}{2}}), \quad (1.25)$$

où E (V/m) est l'intensité du champ électrique appliqué (supposé d'allure temporelle rectangulaire), T (s) sa durée et N le nombre d'impulsions. Cette loi est supposée vraie sous certaines hypothèses, à savoir que les effets sont directement liés à la perméabilisation de la membrane, la durée de l'impulsion est comprise entre la moitié du temps de charge de la membrane et le temps de relaxation diélectrique du cytoplasme, et le délai d'attente entre l'application de chaque impulsion est supérieur au temps de « récupération » de la membrane.

Ibey et co-auteurs ont étudié plus particulièrement le taux de viabilité des cellules (S_1 en %) après exposition à des nsPEFs. Ils ont trouvé que S_1 est lié à la dose énergétique appliquée D (J/g) selon :

$$S_1 = \alpha D^{-K}, \quad (1.26)$$

où le coefficient K est similaire pour toutes les lignées cellulaires étudiées tandis que α varie selon la durée des impulsions appliquées et le type de cellules exposées [84, 85]. D'autres études ont démontré la dépendance de l'intensité des effets biologiques au type de cellules exposées [86–89]. Cette dépendance apparaîtrait pour des impulsions de durée inférieure à 300 ns et s'accroît d'autant plus que la durée des impulsions est réduite. Les nsPEFs agissent donc de manière sélective. À l'inverse des impulsions microsecondes, les effets des nsPEFs ne semblent cependant pas dépendre de la taille des cellules [87, 90, 91].

De nombreux auteurs ont étudié l'influence de l'intensité des impulsions électriques appliquées et/ou de leur nombre [71, 75, 77, 79, 84, 86, 88, 90, 92–94]. De manière générale, les résultats indiquent une intensification des effets avec ces deux paramètres, l'intensification étant plus prononcée pour les impulsions les plus longues [75, 95]. Un exemple de résultats obtenus est exposé Figure 1.24. L'histogramme montre la variation de l'intensité de fluorescence des cellules en fonction du nombre d'impulsions appliquées (pour une durée d'impulsion de 4 ns, une intensité de 10 mV/m et une fréquence de répétition de 1 kHz). L'augmentation de la fluorescence signifie que le nombre de fluorochromes YO-PRO-1 entrés dans la cellule augmente et donc que la membrane plasmique est davantage perméabilisée. Avant l'application des impulsions, les fluorochromes étaient en effet dans le milieu extracellulaire.

Beebe et co-auteurs ont étudié l'impact des temps de montée des impulsions en appliquant des impulsions de 600 ns avec des temps de montée de 15 ns ou 150 ns. Ils ont montré que les impulsions de temps de montée plus court induisent une augmentation plus marquée du potentiel transmembranaire des mitochondries, en ayant parallèlement moins d'effets sur la membrane plasmique [96].

Enfin, concernant l'influence de la fréquence de répétition, plusieurs groupes ont montré une meilleure efficacité des fréquences de répétition plus élevées [77, 97, 98]. Les

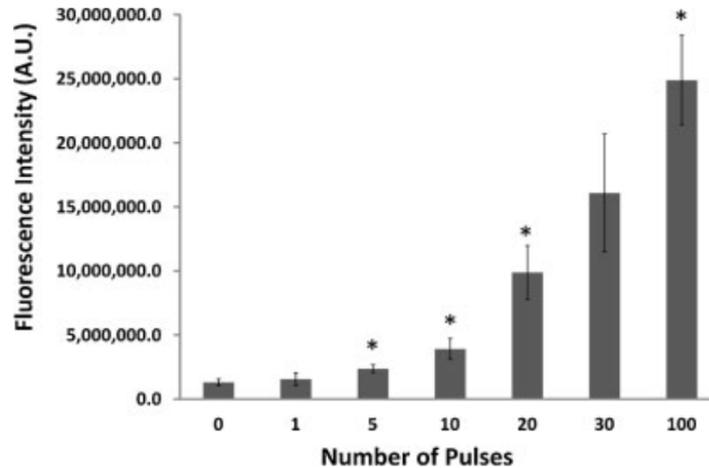


Figure 1.24 – Fluorescence des molécules YO-PRO-1 en fonction du nombre d’impulsions électriques appliquées (4 ns, 10 MV/m, 1 kHz). Une augmentation de fluorescence indique un nombre croissant de molécules YO-PRO-1 entrées dans la cellule. Ces molécules étaient initialement dans le milieu extracellulaire. D’après [71].

résultats restent cependant controversés [99]. Pakhomova et co-auteurs ont étudié l’impact des fréquences de répétition de 0.001 Hz à 2000 Hz sur la perméabilisation de la membrane plasmique et la viabilité des cellules lorsqu’elles étaient exposées à des impulsions de 60 ns (et jusqu’à 9 ms). Ils ont constaté une meilleure efficacité des fréquences de répétition les plus basses, avec l’apparition d’un plateau d’efficacité au-delà d’une certaine fréquence [99]. À haute fréquence de répétition, ils ont observé une plus grande efficacité des expositions fractionnées (envoi de deux trains de N impulsions séparés de quelques minutes plutôt que d’un train de $2 \times N$ impulsions). La Figure 1.25 reprend des résultats qui ont été obtenus. Cette observation concernant les expositions fractionnées a été interprétée par un phénomène d’électrosensibilisation « electro-sensitization » de la cellule, qui apparaîtrait progressivement après l’exposition. Les cellules seraient ainsi rendues plus vulnérables après un certain intervalle de temps suivant l’exposition.

Pour résumer, il apparaît clairement que l’expression et l’intensité des effets biologiques des nsPEFs dépendent des paramètres des impulsions. Nous ne disposons cependant pas de loi générale permettant de prédire l’intensité des effets engendrés en fonction des paramètres appliqués. Qualitativement, il semble que les effets des impulsions sont d’autant plus concentrés dans le milieu intracellulaire que la durée des impulsions est courte. Pour une durée d’impulsion nanoseconde donnée, les résultats montrent que l’intensité des effets tend à augmenter avec l’intensité et le nombre d’impulsions délivrées. L’influence de la fréquence de répétition est quant à elle davantage sujette à débat.

La maximisation des effets recherchés passant par l’optimisation des conditions d’exposition, des études plus larges sur les relations exposition-réponse (ou dose-effet) sont nécessaires. Ces études sont aujourd’hui difficiles du fait des systèmes d’exposition

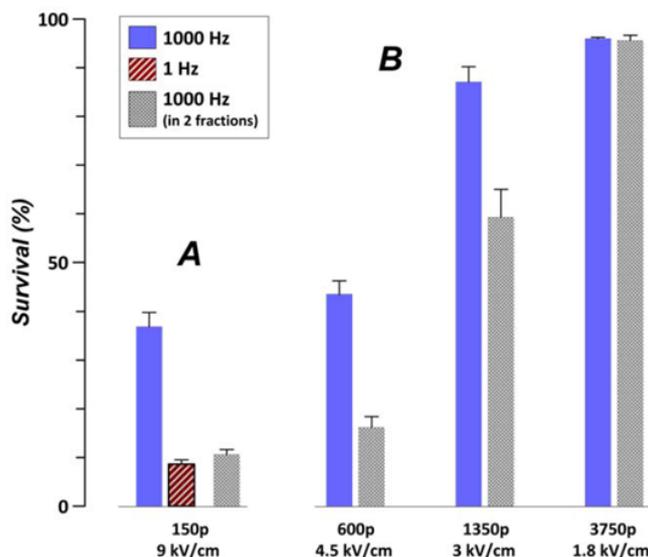


Figure 1.25 – Mise en évidence de la toxicité accrue des expositions fractionnées ($T = 300$ ns). D'après [99].

utilisés. En effet, ces derniers restent peu flexibles en termes des impulsions qui peuvent être appliquées, c'est-à-dire qu'ils ne pas capables de délivrer des impulsions dont la durée, la forme temporelle, l'intensité et la fréquence de répétition peuvent être variées à souhait.

Malgré les lacunes des systèmes d'exposition et celles relatives à notre compréhension des mécanismes d'action des nsPEFs, les chercheurs ont trouvé des applications très encourageantes aux effets biologiques connus de ces impulsions. La section suivante donne un aperçu de ces applications, principalement apparues ces dernières années.

1.3.3.3 Applications

L'exposition des cellules à d'intenses nsPEFs pouvant conduire à leur apoptose, il y a potentialité de traiter le cancer sans administration de médicaments au patient.

En 2010, Nuccitelli et co-auteurs ont réussi à éliminer chez des souris tous leurs mélanomes (tumeurs de la peau) exposés à 2000 impulsions de 100 ns, d'intensité 30 kV/cm et générées à une cadence de 5-7 impulsions par seconde [98]. D'autres études ont montré l'efficacité et la sécurité des nsPEFs pour le traitement de carcinomes (autre forme du cancer de la peau) [100]. Comparés aux traitements par électroporation irréversible, les traitements par nsPEFs présentent l'avantage de ne pas causer de contractions musculaires. Les désagréments du patient sont en conséquence fortement réduits. L'absence de contractions faciliterait également l'application des impulsions électriques par le chirurgien puisque la stabilité du patient est améliorée [101]. En outre, l'électroporation irréversible cause une nécrose des tissus, ce qui n'est pas le cas des traitements par nsPEFs. Nuccitelli et co-auteurs ont également observé l'arrêt de la vascularisation des tumeurs exposées à des nsPEFs [102]. Les cellules cancéreuses ayant besoin d'un important approvisionnement

sanguin pour s'alimenter et se développer, l'interruption de la vascularisation favorise le rétrécissement de la tumeur.

Pour résumer, les études en laboratoire ont montré que le traitement de tumeurs cutanées par nsPEFs peut être rapide, qu'il est local, non thermique, qu'il minimise les cicatrices et supprime tous les effets secondaires connus en chimiothérapie [1, 98, 101, 103, 104]. Le nombre d'études réalisées demeurent cependant faibles et les paramètres d'exposition restent à être optimisés [91]. Une standardisation d'une méthode de traitement du cancer par nsPEFs n'est donc pas à prévoir avant quelques longues années, si standardisation il peut y avoir. Nombre de méthodes prometteuses en laboratoire ne passeront en effet jamais l'épreuve de la standardisation.

Les potentielles applications thérapeutiques des nsPEFs ne se limitent pas au traitement du cancer. Les nsPEFs pourraient également servir à favoriser la cicatrisation de tissus endommagés. Les nsPEFs sont en effet capables de stimuler l'activation des thrombocytes (ou plaquettes) [105, 106]. Les thrombocytes jouent un rôle primordial dans la coagulation sanguine. En cas de plaie, ils s'accumulent au niveau de la rupture des vaisseaux et initient la formation d'un caillot sanguin par une cascade de processus complexes [107]. Stimuler leur activation permettrait ainsi d'accélérer le processus de cicatrisation.

Concernant les applications environnementales des nsPEFs, des études ont montré l'efficacité d'intenses impulsions de plusieurs centaines voire dizaines de nanosecondes pour la décontamination bactérienne de liquides [34, 108].

1.3.3.4 Conclusion

Pour conclure cette partie, nous avons vu que les effets biologiques des nsPEFs sont localisés aussi bien à la membrane plasmique qu'à l'intérieur des cellules. Comme les impulsions électriques longues, les nsPEFs sont capables d'électroporer la membrane plasmique mais la taille des pores semble plus petite et leur nature est possiblement différente. Pour différencier l'électroporation de la membrane liée à l'application d'impulsions longues de celles liée à l'application de nsPEFs, on parle d'électroporation classique pour la première et de nanoporation, supraporation ou encore supra-électroporation pour la seconde. De plus, alors que les impulsions longues induisent principalement une modification de la structure de la membrane plasmique, les nsPEFs permettent également de manipuler le contenu intracellulaire.

La Figure 1.26, extraite d'une publication de Schoenbach et co-auteur parue en 2002 [46], résume les applications des effets non thermiques des impulsions électriques de durée milliseconde à nanoseconde, en fonction de leur intensité. Dans la surface blanche inférieure à la zone grisée, aucun effet n'est observé. Dans la surface blanche supérieure, l'énergie des impulsions est telle que les effets deviennent thermiques : les cellules meurent par

hyperthermie.

Pour en revenir aux effets des impulsions nanosecondes, ils sont d'autant plus faibles à la membrane plasmique que la durée des impulsions diminue. Au contraire, les effets intracellulaires sont d'autant plus remarquables que l'impulsion est courte, en supposant que l'intensité de l'impulsion est suffisante. En particulier, des observations expérimentales ont mis en évidence la perméabilisation des membranes mitochondriales lorsque les cellules étaient exposées à quelques impulsions de durée 4 ns, d'intensité 10 MV/m et de fréquence de répétition de 1 kHz [71]. L'idée communément répandue est qu'en diminuant davantage la durée des impulsions et en augmentant leur intensité, il deviendrait possible d'« aisément » manipuler le contenu des organelles. La partie à suivre aborde plus largement les espoirs entrevus ainsi les quelques études conduites à ce jour avec des impulsions subnanosecondes.

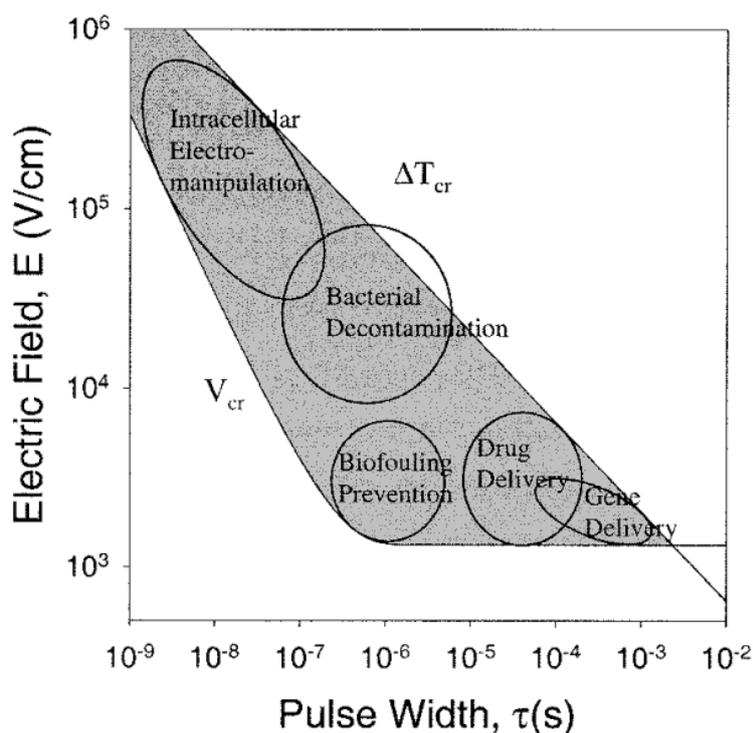


Figure 1.26 – Aperçu des applications liées aux effets non thermiques des impulsions électriques de durée milliseconde à nanoseconde, en fonction de l'intensité des impulsions. Dans la partie blanche inférieure à la zone grisée, aucun effet n'est observé. Dans la partie supérieure blanche, l'énergie des impulsions est telle que les effets deviennent thermiques. D'après [46].

1.3.4 Vers l'étude des effets biologiques des impulsions électriques de durée < 3 ns

1.3.4.1 Espoir pour la thérapie génique

La capacité de manipuler le contenu des organelles enchanterait passionnément les biologistes, en particulier pour le noyau. Le noyau contenant l'ADN, des applications en thérapie génique seraient alors envisageables.

La thérapie génique est un domaine de recherche dont l'objectif consiste à développer des traitements pour gènes déficients. Un gène déficient peut commander la fabrication de protéines indésirables et par là conduire à une pathologie, ou bien prédisposer la personne concernée à des pathologies telles que les maladies du cœur ou certains cancers [1]. La capacité de désactiver le gène altéré permettrait de supprimer l'anomalie. Depuis quelques décennies, des efforts considérables sont engagés dans la recherche en thérapie génique mais les résultats restent mitigés. Le principe des méthodes actuelles consiste soit à introduire le gène « normal » dans la cellule pour remplacer ou réparer le gène altéré, soit à modifier l'expression du gène [109, 110]. Les limites actuelles des méthodes non virales (celles n'utilisant pas de virus pour transporter le matériel génétique dans la cellule) sont leur faible efficacité. L'idée soumise par Schoenbach et co-auteurs dans [1] est la suivante : les impulsions électriques subnanosecondes pourraient servir à activer/désactiver un gène délétère en le ciblant très sélectivement. Cette idée est de toute évidence utopique à l'heure actuelle. Comme nous le verrons au paragraphe suivant, les premières études exploratoires continuent de se focaliser sur la possibilité d'induire la mort cellulaire et tentent de clarifier les mécanismes d'interaction.

1.3.4.2 Résultats des premières études exploratoires

Des études *in vitro* des effets biologiques d'impulsions électriques subnanosecondes ont été rapportées mais leur nombre reste limité [111–115]. La première d'entre elles a été publiée par Schoenbach et co-auteurs en 2008 [111]. Les raisons du peu d'études réalisées jusqu'à aujourd'hui sont d'une part que les biologistes ont encore largement de quoi explorer dans les domaines nanoseconde et microseconde, et sont d'autre part liées aux limites technologiques. Il subsiste en effet un manque de systèmes capables de générer des impulsions subnanosecondes d'intensité suffisante et adaptés pour des expérimentations biologiques *in vitro* et/ou *in vivo*.

Concernant les observations expérimentales des premières études *in vitro*, Schoenbach et co-auteurs ont constaté une augmentation de la perméabilité de la moitié des cellules exposées à des centaines d'impulsions de durée 800 ps et d'intensité 550 kV/cm [111]. La majorité des cellules avait retrouvé leur perméabilité initiale 40 min à 1 h après l'exposition, les autres étant mortes par apoptose. Les auteurs ont émis l'hypothèse d'une mort cellulaire causée par l'interaction directe des impulsions subnanosecondes avec les protéines présentes dans la membrane plasmique.

En 2011, le même groupe de recherche a étudié les effets biologiques d'impulsions subnanosecondes encore plus courtes (200 ps), mais moins intenses (25 kV/cm) du fait des limites du générateur employé [112]. Des mesures par la technique patch clamp ont montré que les cellules étaient davantage perméables 10 et 30 s après exposition à 2000 de ces impulsions délivrées avec une fréquence de répétition de 10 Hz. Le courant de fuite détecté circulait du milieu extérieur vers le milieu intérieur. La taille des pores, supposés formés, a été estimée à 1.4 nm. Avec une fréquence de répétition 1000 fois plus élevée (soit 10 kHz) et une durée d'exposition de plusieurs minutes, la mort des cellules exposées a été observée. Ce résultat a été interprété comme la combinaison d'effets électriques et thermiques étant donnée la forte élévation de température mesurée (supérieure à 10 °C, voir Figure 1.27). En 2012, le même groupe a suggéré que l'élévation de température entraîne une réduction de la viscosité des membranes et par là une diminution du champ électrique minimum capable d'accroître significativement la probabilité d'électroporation [115]. Ainsi, cet effet associé aux effets biologiques directs des impulsions électriques expliquerait la mort cellulaire observée.

Récemment, une équipe chinoise a publié des résultats sur l'exposition de cellules cancéreuses à des impulsions de 800 ps et d'intensité 250 kV/cm. Dans une première publication, les chercheurs ont conclu que les impulsions subnanosecondes induiraient l'apoptose par la voie des mitochondries, et dans une seconde publication que l'apoptose serait initiée par le stress du réticulum endoplasmique ainsi que par les voies de signalisation dépendantes des caspases [113, 114]. Dans [113], peu de précisions sont données sur le montage expérimental employé et l'allure des impulsions appliquées n'y figure pas (et seul le résumé de [114] a pu être lu).

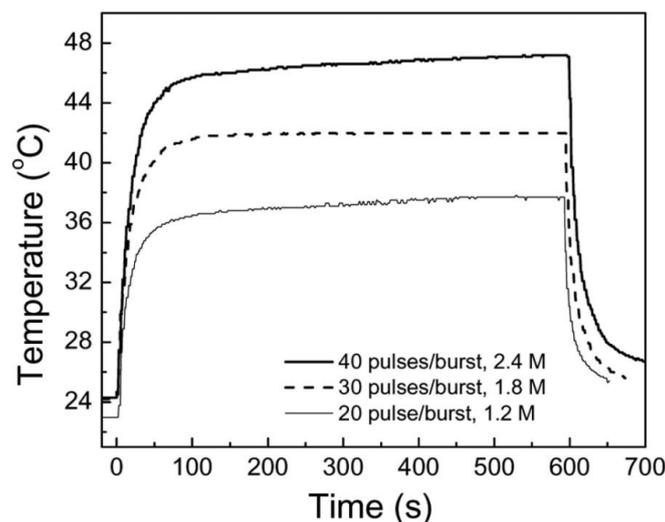


Figure 1.27 – Élévation macroscopique de température due à l'application de 1.2, 1.4 et 1.8 millions d'impulsions de durée 200 ps et d'intensité 25 kV/cm. « 20 pulses/burst » signifie que les impulsions électriques étaient envoyées par train de 20 impulsions. Le taux de répétition des impulsions dans chaque train était 10 kHz et les trains étaient déclenchés à une fréquence de 100 Hz (soit toutes les 10 ms). Pour les trois conditions, le temps d'exposition total s'élevait à 10 minutes. D'après [112].

Avec ce dernier paragraphe, nous avons désormais parcouru les observations expérimentales et applications des effets biologiques des impulsions électriques de durée milliseconde à subnanoseconde et de forte intensité. Pour aider les biologistes à clarifier la dépendance des effets à la durée de l'impulsion, nous verrons dans la suite que des recherches sont également réalisées *in silico* (c'est-à-dire via des moyens informatiques). Le comportement des modèles de cellules est alors étudié par application et résolution des lois connues de la science. Étant donnée la complexité des cellules, les modèles développés *in silico* sont toujours une vue très simplifiée de la réalité. Malgré tout, nous montrerons qu'ils permettent d'apporter des éléments de réponse aux questions toujours en suspens.

1.4 L'apport des modèles numériques

1.4.1 Modèles électriques de cellules

La Figure 1.28 présente deux modèles électriques de base. Ces modèles ont été développés pour calculer les potentiels induits dans la cellule lorsqu'elle baigne dans un champ électrique.

L'exemple à gauche (Figure 1.28a) est un modèle de cellule d'un point de vue circuit [116]. Les membranes sont assimilées à des condensateurs tandis que le cytosol et le milieu extracellulaire sont modélisés par des résistances. Les calculs des tensions aux nœuds du circuit sont réalisés en imposant une différence de potentiel entre l'extrémité inférieure et supérieure du modèle.

L'illustration à droite (Figure 1.28b) est un modèle électrique à l'échelle microscopique d'une cellule avec une organelle concentrique. Les cinq milieux modélisés, à savoir le milieu extracellulaire, la membrane plasmique, le cytosol, la membrane de l'organelle ainsi que le milieu interne à l'organelle sont considérés individuellement comme étant homogènes. Chaque milieu est assigné des propriétés électriques (permittivité et conductivité électrique) distinctes. Les potentiels dans le modèle soumis à un champ électrique sont calculés par résolution des lois de l'électromagnétisme.

1.4.2 Influence des paramètres des impulsions sur les potentiels induits

Pour étudier la dépendance des potentiels en fonction du champ électrique imposé aux bornes de la cellule, les modèles sont traités soit dans le domaine temporel, soit dans le domaine fréquentiel. L'évolution des potentiels est alors obtenue soit en fonction du temps, soit en fonction de la fréquence. Le passage du domaine temporel au domaine fréquentiel peut se faire par une transformée de Fourier, et celui du domaine fréquentiel au domaine temporel par une transformée de Fourier inverse.

Les cellules présentant à la fois des propriétés de conducteur et de diélectrique à pertes, leurs paramètres électriques sont complexes et varient en fonction de la fréquence

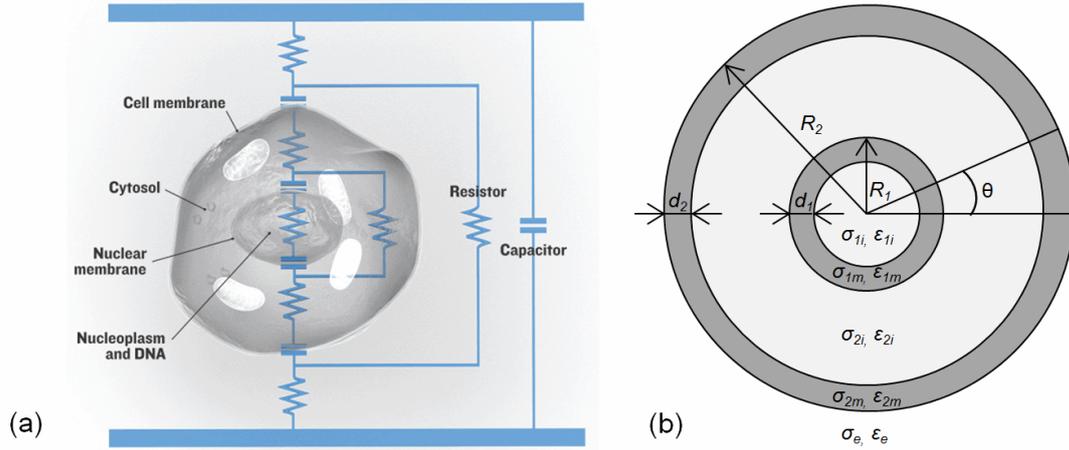


Figure 1.28 – Modèle numérique d'une cellule très simplifiée avec une organelle. Modèle électromagnétique (a) et modèle circuit (b). Pour le modèle en (a) : l'indice « e » désigne les propriétés du milieu extracellulaire, « 2m » ceux de la membrane plasmique, « 2i » ceux du cytosol, « 1m » ceux de la membrane de l'organelle et « 1i » ceux du milieu interne à l'organelle. σ désigne la conductivité électrique et ϵ la permittivité. D'après [1, 117].

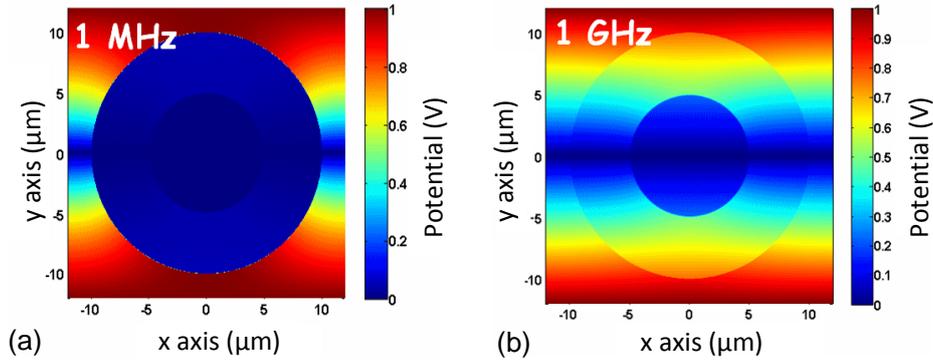


Figure 1.29 – Valeur absolue des potentiels dans la cellule et son environnement proche lorsqu'un champ électrique de 80 kV/m est appliqué dans le sens des y décroissants (1 V appliqué en $y = y_{max}$ et -1 V en $y = y_{min}$) pour une fréquence de 100 MHz (a) et une fréquence de 1 GHz (b). D'après [118].

considérée. Les modèles électriques les plus appropriés pour étudier l'interaction des impulsions électriques courtes et intenses avec une cellule sont donc ceux prenant en compte la sensibilité des permittivités et conductivités électriques au contenu fréquentiel de l'impulsion. Rappelons que la largeur spectrale d'une impulsion est d'autant plus large que l'impulsion est courte.

Un exemple de cartographie des potentiels (en valeur absolue), obtenus à partir d'un modèle électrique à deux dimensions prenant en compte la dispersion des permittivités, est montré Figure 1.29. Pour ces simulations, la cellule était soumise à un champ électrique de 80 kV/m dirigé dans le sens des y décroissants [118]. Ces cartographies mettent en évidence que les potentiels induits dans la cellule sont significativement plus élevés pour une fréquence de 1 GHz que pour celle de 100 MHz.

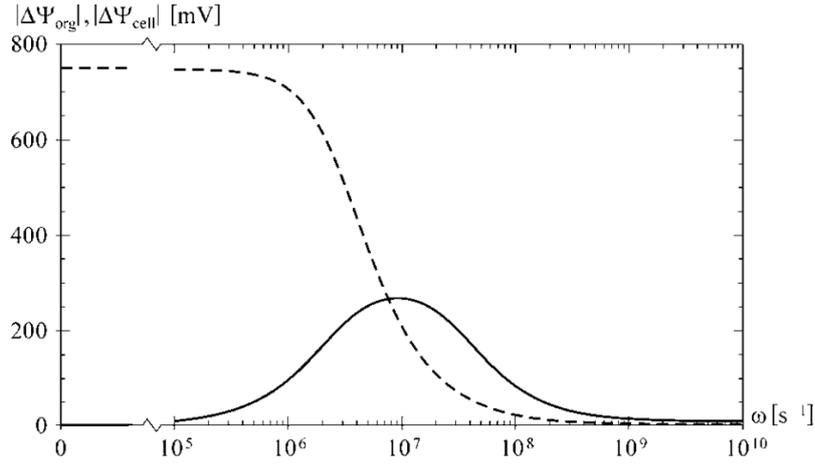


Figure 1.30 – Modélisation du potentiel transmembranaire à la membrane plasmique ($\Delta\Psi_{cell}$) et la membrane de l'organelle ($\Delta\Psi_{org}$) en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué. Le champ électrique était normal à la membrane et son intensité était de 50 kV/m. Dans le modèle, la conductivité électrique de l'organelle était de 65 % supérieure à celle du cytosol, la permittivité de la membrane de l'organelle était de 30 % inférieure à celle de la membrane plasmique et l'épaisseur de la membrane intracellulaire était le double de celle de la membrane extracellulaire. D'après [117].

À partir du modèle de la Figure 1.28b et de manière analytique, Kotnik et co-auteurs ont étudié l'évolution du potentiel transmembranaire induit à la membrane plasmique et à la membrane de l'organelle en fonction de la taille de la cellule, de sa géométrie, de son orientation par rapport au champ électrique et de la fréquence. À basse fréquence, ils ont montré que le potentiel transmembranaire à la membrane plasmique $\Delta\Psi_{cell}$ varie selon la position considérée suivant :

$$\Delta\Psi_{cell} = \frac{3}{2}E \cdot R \cdot \cos\theta, \quad (1.27)$$

où E est l'intensité du champ appliqué, R le rayon de la cellule et θ l'angle entre la direction du champ électrique et la tangente à la position d'intérêt à la membrane.

La Figure 1.30 présente pour $\theta = 0$ l'évolution du potentiel transmembranaire à la membrane plasmique et celle de l'organelle $\Delta\Psi_{org}$ en fonction de la pulsation ω (s^{-1}) ($\omega = 2\pi f$ avec f la fréquence en Hz). Dans le modèle étudié, la conductivité électrique de l'organelle était 65 % supérieure à celle du cytosol, la permittivité de la membrane de l'organelle était 30 % inférieure à celle de la membrane plasmique et l'épaisseur de la membrane intracellulaire était le double de celle de la membrane extracellulaire. Les résultats mettent en évidence trois phases. À basse fréquence ($\omega < 10^5 s^{-1}$), $\Delta\Psi_{cell}$ est maximum tandis que $\Delta\Psi_{org}$ est nulle. À partir de $\omega = 10^5 s^{-1}$, $\Delta\Psi_{cell}$ commence à diminuer tandis que $\Delta\Psi_{org}$ augmente progressivement jusqu'à devenir supérieure à $\Delta\Psi_{cell}$ pour $\omega = 10^7 s^{-1}$. Dans une troisième phase ($\omega > 10^7 s^{-1}$), $\Delta\Psi_{cell}$ diminue à son tour pour approcher zéro à très haute fréquence ($\omega > 10^9 s^{-1}$). Ces résultats sont en accord avec les observations expérimentales : les impulsions longues (basses fréquences) ciblent la membrane plasmique tandis que les impulsions nanosecondes sont capables de cibler la

membrane plasmique ainsi que la membrane des organelles. Les résultats montrés appuient également qu'en diminuant encore la durée des impulsions, celles-ci deviendraient capables de cibler directement le contenu interne des organelles. En effet, la membrane plasmique et la membrane des organelles n'auraient alors plus le temps nécessaire pour se charger au fur et à mesure que le champ électrique apparaît ; leur contenu ne serait donc plus isolé électriquement.

1.4.3 Modélisation de l'électroporation

Il existe un modèle probabiliste dérivé de la théorie de Smoluchowski qui permet d'inclure la formation d'une certaine densité de pores en fonction du temps et du potentiel transmembranaire [119, 120]. Cette densité de pores se traduit par une non-linéarité vis-à-vis du temps des paramètres électriques de la membrane. Les modèles électriques les plus appropriés à l'échelle microscopique sont donc ceux qui tiennent compte d'une part de la dépendance des paramètres électriques à la fréquence et d'autre part de leur non-linéarité liée à l'électroporation [121–124].

Si les modèles décrits précédemment peuvent servir au calcul des potentiels à l'échelle microscopique, ils ne permettent cependant pas d'expliquer les mécanismes de formation des « pores » à l'échelle atomique (les guillemets permettent d'appuyer que nous ne savons en réalité pas précisément ce dont il s'agit). En raison des échelles temporelles et spatiales requises pour l'étude de ces mécanismes, nous ne disposons actuellement pas d'outils expérimentaux appropriés. Nous devons donc faire appel à des techniques de modélisation. Pour les études à l'échelle atomique, ce sont les méthodes de la dynamique moléculaire qui sont mises à profit. Cette technique numérique permet de modéliser les déplacements des atomes d'un système moléculaire. Les principes à la base de cette technique de simulations seront détaillés Section 4.2. Pour les études qui nous intéressent, les systèmes de molécules modélisés sont des portions de membrane. Un exemple est montré Figure 1.31. Encore une fois, il s'agit d'un modèle très simplifié de la réalité.

Lorsque le modèle de membrane est soumis à un champ électrique de durée nanoseconde et de très forte intensité (plusieurs centaines de MV/m), les résultats des simulations ont montré qu'une colonne d'eau peut se former au travers de la membrane [125–130]. La Figure 1.32 en présente une illustration. Concernant les étapes de formation de la colonne d'eau (appelée pore), deux phases principales ont été identifiées. Une représentation schématique de ces deux phases est donnée Figure 1.33. Seuls les lipides de la membrane sont représentés sur cette figure. La première étape de la formation du pore consiste en la création d'un pore qualifié d'hydrophobe. Ce pore se forme progressivement (à l'échelle de quelques nanosecondes) avec l'entrée de molécules d'eau dans la bicouche lipidique. Dans une étape suivante, les lipides s'orientent vers la colonne d'eau ; le pore devient hydrophile. Lorsque le champ électrique n'est plus appliqué, le pore finit par se refermer.

Davantage de détails sur les mécanismes physiques à l'origine de la formation de ces

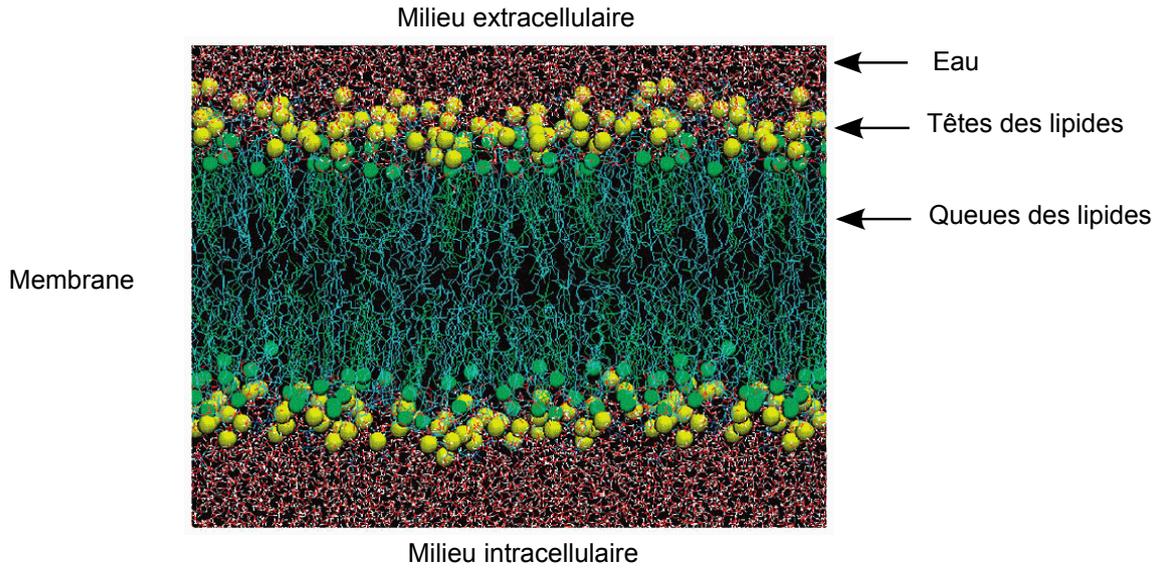


Figure 1.31 – Rendu visuel d'une portion de membrane simulée en dynamique moléculaire. D'après [125].

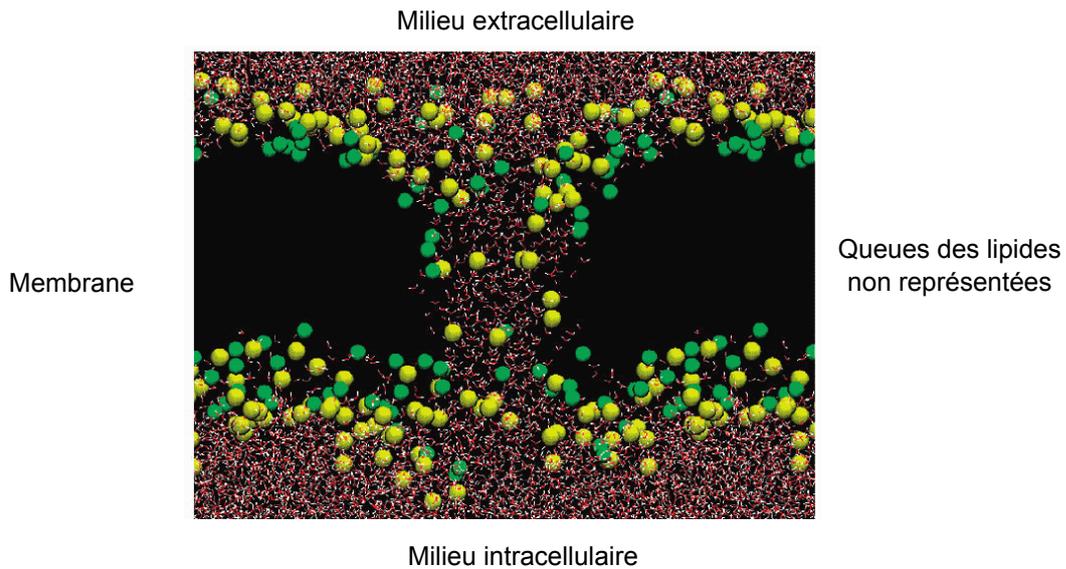


Figure 1.32 – Rendu visuel d'une portion de membrane électroporée en dynamique moléculaire. Les queues des lipides ne sont pas représentées. D'après [125].

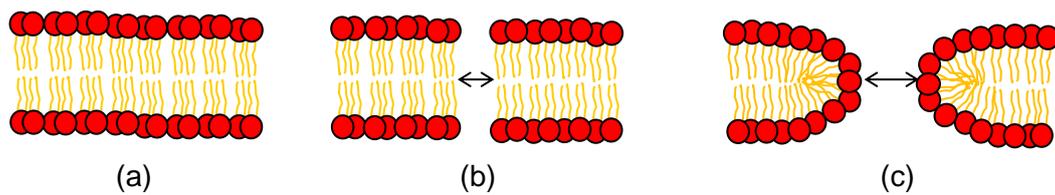


Figure 1.33 – Schéma de la formation d'un pore à l'échelle atomique. Membrane à l'état initial (a), formation d'un pore hydrophobe (b) et évolution en pore hydrophile (c).

colonnes d'eau seront donnés au dernier chapitre de ce manuscrit. Nous aborderons alors plus largement les enjeux de ces études, leurs limites ainsi que les travaux que nous avons réalisés à ce sujet.

1.5 Conclusion

Pour résumer ce chapitre, nous avons tout d'abord étudié les mécanismes physiques d'interaction qui peuvent survenir lorsqu'un matériau est soumis à un champ électrique. Nous avons vu que ces mécanismes consistent en une séparation spatiale des charges et que les échelles de séparation dépendent d'une part des propriétés électriques du matériau étudié et d'autre part du contenu spectral du champ électrique appliqué. En particulier, dans un matériau à la fois conducteur et diélectriques à pertes, nous avons mis en évidence que les échelles spatiales d'interaction sont d'autant petites que la fréquence augmente. Le comportement conducteur domine à basse fréquence puis s'efface peu à peu quand la fréquence augmente. Lorsque le champ électrique ne déplace plus les charges libres, c'est la polarisation par orientation dipolaire qui devient le principal mécanisme d'interaction. Globalement, la capacité d'un matériau à stocker l'énergie électrique appliquée diminue lorsque la fréquence augmente.

Pour comprendre l'engouement des biologistes pour les impulsions électriques de haute intensité, nous avons donné un aperçu des effets biologiques que peuvent engendrer de telles impulsions lorsqu'elles sont appliquées à des milieux vivants. Les observations expérimentales des effets biologiques induits montrent que pour des paramètres d'impulsion bien choisis, les effets biologiques des impulsions microsecondes sont localisés au niveau de la membrane plasmique alors que ceux des impulsions nanosecondes se retrouvent également dans le milieu intracellulaire. Comme suggéré par les modèles numériques, les effets des impulsions électriques semblent situés d'autant plus à l'intérieur de la cellule que la durée de l'impulsion diminue. Ainsi, en diminuant la durée des impulsions délivrées au régime subnanoseconde, les biologistes espèrent qu'ils pourront directement manipuler le contenu des organelles. À ce jour, seules quelques publications relatent des résultats d'exposition *in vitro* à des impulsions de durée inférieure à quelques nanosecondes. Ceci s'explique par le manque de systèmes d'exposition capables de générer des impulsions aussi courtes et d'intensité suffisante (\gg kV/cm). De très fortes intensités sont nécessaires car l'intensité minimum du champ électrique nécessaire au déclenchement d'effets biologiques augmente lorsque la durée des impulsions diminue.

Par ailleurs, nous avons vu que les mécanismes physiques à l'origine des effets biologiques observés sont toujours peu compris. De même, l'influence des paramètres des impulsions (durée, intensité, forme temporelle, nombre, fréquence de répétition) n'est pas maîtrisée.

Nous avons cité des études numériques visant à identifier les sites primaires

d'interaction ainsi que les phénomènes associés. Les cellules étant des unités vivantes très complexes, les modèles implémentés sont toutefois nécessairement très simplifiés.

Peu de détails ont été volontairement donnés sur les outils expérimentaux utilisés par les biologistes pour exposer leurs échantillons. Pour la majorité des expérimentations, il n'existait initialement pas d'outils commerciaux adaptés aux exigences spécifiques des expositions. Les expositions sont donc rendues possibles par la coopération de physiciens capables de développer des bancs expérimentaux innovants. Comme mentionné précédemment, le défi actuel consiste au développement de systèmes d'exposition capables de délivrer des impulsions électriques de durée inférieure à quelques nanosecondes et de très forte intensité. Des travaux ont été réalisés dans ce sens au cours de la thèse présentée ; ils sont décrits au chapitre suivant.

CHAPITRE 2

Systemes d'exposition : générateurs et applicateurs

Contenu

2.1	Objectifs en termes de développement	74
2.2	Les générateurs d'impulsions haute tension nano- et subnanosecondes à XLIM	76
2.3	Les applicateurs <i>in vitro</i> dans la littérature	94
2.4	Potentialités de la cellule TEM comme applicateur isolé d'impulsions ultracourtes	111
2.5	Conclusion et discussion	126

Dans ce chapitre, nous traitons des systèmes d'exposition pour délivrer d'intenses impulsions électriques de durée nanoseconde et subnanoseconde à des cellules *in vitro*. Plus précisément, nous nous intéresserons à la partie génération et application des impulsions, comme montré Figure 2.1.

Pour rappel, la partie génération d'un système d'exposition est la partie qui produit les impulsions de tension. L'applicateur sert quant à lui à transformer les impulsions de tension en champs électriques pulsés dans l'échantillon. Dans les systèmes *in vitro*, les cellules sont exposées en dehors de leur organisme d'origine, soit individuellement soit en grand nombre. Les cellules sont toujours exposées dans un milieu de culture, c'est-à-dire dans un milieu aqueux contenant les éléments nécessaires au bon fonctionnement des cellules.

Après présentation des spécifications auxquelles les générateurs et applicateurs doivent répondre pour les expositions souhaitées, nous présenterons les travaux qui ont été réalisés sur un générateur d'impulsions innovant. Nous poursuivrons avec un état de l'art des applicateurs *in vitro*. Cette partie nous permettra de mettre en évidence les difficultés rencontrées lorsque la durée des impulsions électriques souhaitées doit être réduite à quelques nanosecondes voire au régime subnanoseconde. Nous montrerons la nécessité de développer des applicateurs dans lesquels l'échantillon n'est pas en contact direct avec les parties métalliques du système. Nous proposerons et étudierons ensuite un applicateur « sans contact », qui n'avait jamais été étudié pour de telles applications auparavant.

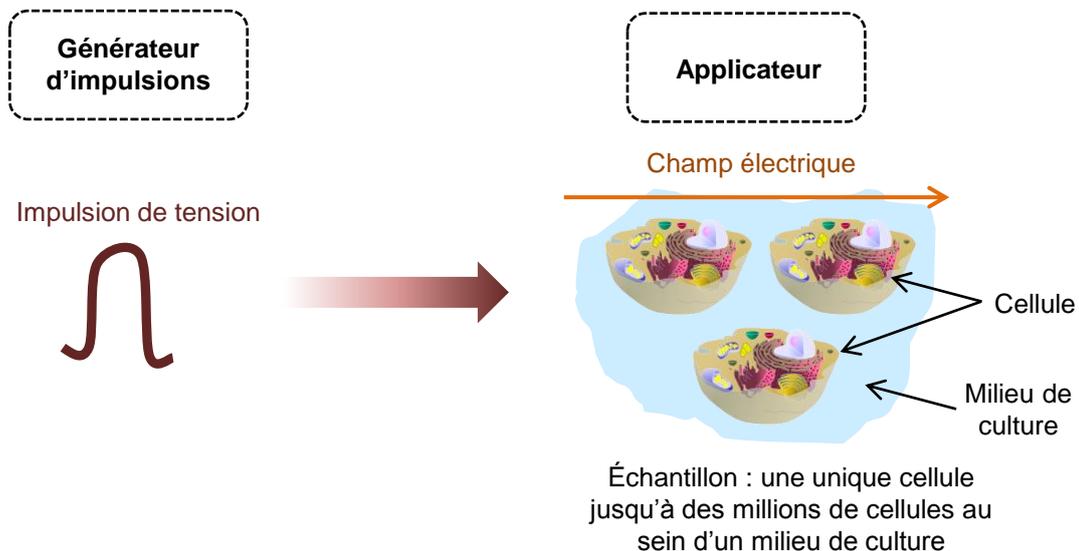


Figure 2.1 – Illustration de la partie génération et application d'un système d'exposition *in vitro*.

2.1 Objectifs en termes de développement

2.1.1 Objectifs pour les générateurs d'impulsions

Les caractéristiques souhaitées pour les générateurs d'impulsions sont les suivantes :

- génération d'impulsions électriques de paramètres :
 - durée : dizaines de nanosecondes à subnanoseconde,
 - amplitude : supérieure au kilovolt (kV) voire très supérieure au kV (20–30 kV),
 - allure temporelle : monopolaire, bipolaire,
- variation aisée des paramètres d'impulsion,
- répétabilité des impulsions générées,
- contrôle du nombre d'impulsions générées et de la fréquence de répétition,
- sortie coaxiale et adaptation d'impédance avec les outils en sortie,
- synchronisation possible avec un système d'imagerie,
- simplicité d'utilisation pour les non-initiés,
- robustesse, compacité.

La possibilité de générer des impulsions électriques de paramètres variables est très sollicitée pour les biologistes car elle permet une étude approfondie des relations dose-effet. Elle favorise également la détermination des paramètres optimaux pour la maximisation des effets biologiques recherchés. De manière générale, les impulsions de tension délivrées dans les expérimentations citées au chapitre précédent sont monopolaires. En termes de champ électrique, ceci implique que l'orientation du vecteur champ électrique généré en un point est invariante au cours du temps (si tant est que le milieu est linéaire). Pour des impulsions de durée microseconde, Kotnik et co-auteurs ont montré que la membrane plasmique est davantage perméabilisée sur la surface faisant face au champ électrique [131]. Appliquer des impulsions de tension bipolaires plutôt que des impulsions monopolaires permet ainsi d'élargir la surface perméabilisée, comme illustré Figure 2.2 [132–134].

La présence d'une sortie coaxiale sur le générateur facilite sa connexion aux câbles coaxiaux classiquement utilisés en expérimentation pour la transmission guidée des impulsions de tension. Par ailleurs, la satisfaction du critère « adaptation d'impédance avec les outils en sortie » permet de maximiser la transmission de puissance électrique entre le générateur et ces outils. L'impédance d'un dispositif, homogène à des ohms (Ω), est définie comme le rapport des amplitudes tension sur courant au travers du dispositif. Par adaptation d'impédance, on entend que l'impédance de la source est égale à l'impédance de la charge pour toutes les fréquences d'intérêt.

Concernant la synchronisation possible du générateur avec un système d'imagerie, elle permet de maîtriser l'instant auquel la « prise d'image » de l'échantillon est

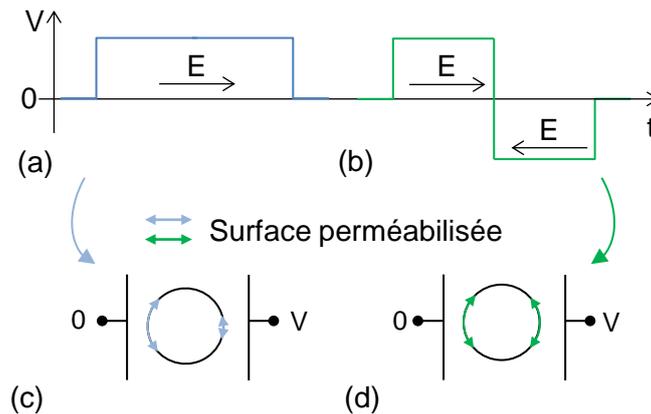


Figure 2.2 – Illustration de la meilleure efficacité, en termes de surface électroperméabilisée, des impulsions bipolaires par rapport aux impulsions monopolaires. Exemple dans le domaine temporel d'une impulsion de tension monopolaire de forme rectangulaire (a) et d'une impulsion de tension bipolaire symétrique (b). (c) et (d) schématisent la surface de perméabilisation d'une cellule exposée à une impulsion de type respectivement (a) et (b).

déclenchée après l'arrivée des impulsions électriques. En répétant l'exposition, l'évolution physiologique de l'échantillon peut alors être suivie avec une résolution temporelle égale au temps de la prise d'image.

Il existe aujourd'hui des générateurs commerciaux capables de délivrer des impulsions électriques de durée et d'amplitude variables. Par exemple, la société FID GmbH¹ (Burbach, Allemagne) propose un générateur (série FPG 10-P) délivrant des impulsions de durée réglable entre 200 ps et 3 ns et d'amplitude maximum de 10 kV. Un autre modèle (série FPG 1000-N) génère des impulsions dont la durée peut être ajustée entre 1 à 100 ns et dont l'amplitude peut atteindre 1 MV. Certes très performants, ces générateurs présentent l'inconvénient d'être limités à la génération d'impulsions monopolaires. De plus, ils ne disposent pas de voie d'entrée ou de sortie optique. Leur seul mode de déclenchement externe est électronique, via un signal d'entrée TTL (Transistor-Transistor Logic). Sans mode de déclenchement optique, la synchronisation du générateur avec un système d'imagerie optique est rendue périlleuse. Nous verrons Section 2.2 comment les technologies développées à XLIM pallient ces limitations. Nous démontrerons ensuite les potentialités d'un nouveau générateur.

1. <http://www.fidtechnology.com>

2.1.2 Objectifs pour les applicateurs d'impulsions

Pour nos études, l'applicateur idéal répond aux exigences suivantes :

- adaptation d'impédance avec le générateur,
- bande passante fréquentielle au moins aussi large que la bande passante des impulsions électriques à transmettre,
- capacité de délivrer d'intenses champs électriques (\gg kV/cm), robustesse,
- distribution spatiale du champ électrique définie et la plus homogène possible,
- confinement du champ électrique pour limiter l'exposition des manipulateurs et prévenir les interférences avec les appareils électroniques environnants,
- biocompatibilité des matériaux en contact avec les cellules, matériaux inertes préférés,
- écart aux protocoles standard de biologie minimisé,
- conditions environnementales maîtrisées (température, humidité, stérilité,...),
- possibilité d'observer l'échantillon en temps réel par microscopie,
- possibilité d'exposer simultanément un nombre suffisant de cellules pour des résultats statistiquement significatifs,
- simplicité de manipulation pour les non-spécialistes de la haute tension.

Comme pour les générateurs, les objectifs fixés relèvent à la fois des attentes des biologistes et des exigences de la physique.

Dans la partie à suivre, nous revenons sur le développement des générateurs d'impulsions haute tension nanosecondes et subnanosecondes à XLIM.

2.2 Les générateurs d'impulsions haute tension nanosecondes et subnanosecondes à XLIM

À XLIM, la génération d'impulsions électriques ultracourtes a fait l'objet de deux thèses de doctorat entre 2003 et 2011 [3, 135]. Ces deux thèses proposant un état de l'art avancé des technologies de la haute puissance pulsée, nous ne reviendrons pas sur ce point-là de manière approfondie. Nous aborderons essentiellement les travaux qui ont été conduits au sein d'XLIM et la contribution que nous y avons apportée.

Dans la suite, nous commençons par détailler les choix réalisés en matière de technologie de génération. Nous développerons ensuite les études expérimentales que nous avons conduites sur un nouveau générateur d'impulsions.

2.2.1 Les choix technologiques

2.2.1.1 Principe de génération

Le principe de génération à ondes gelées à la base de nos générateurs est schématisé Figure 2.3. Ce principe consiste à emmagasiner de l'énergie électrique dans une ligne de transmission puis à délivrer soudainement l'énergie à l'aide d'un commutateur ultra-rapide.

En pratique, la ligne de transmission est chargée par une alimentation de haute tension continue commerciale. Les commutateurs sont de type optoélectronique et sont commandables à la fermeture. Ils sont souvent désignés par l'acronyme « PCSS » pour « PhotoConductive Semiconductor Switch » [136, 137]. Dans nos générateurs, l'énergie optique nécessaire à la commande des PCSS est fournie par un laser impulsif.

D'autres types de générateurs ont été rapportés dans la littérature. Parmi eux se trouvent les réseaux de mise en forme d'impulsions du type Blumlein [138–140], les générateurs de Marx [141] et les générateurs à inductance saturable (en anglais « magnetic pulse compression generator ») [142, 143]. Ces topologies nécessitent également un ou plusieurs commutateurs qui sont principalement des semiconducteurs de puissance [138, 139, 142–144] ou des éclateurs à gaz [141]. Les semiconducteurs de puissance utilisés sont essentiellement les MOSFET (transistors à effet de champ à grille métal-oxyde) [138, 139, 144], les thyristors [143] et les diodes SOS (semiconductor opening switch) [142]. Ces trois commutateurs ont l'inconvénient d'avoir une faible tenue en tension (quelques kilovolts au plus). Les éclateurs à gaz supportent quant à eux de très

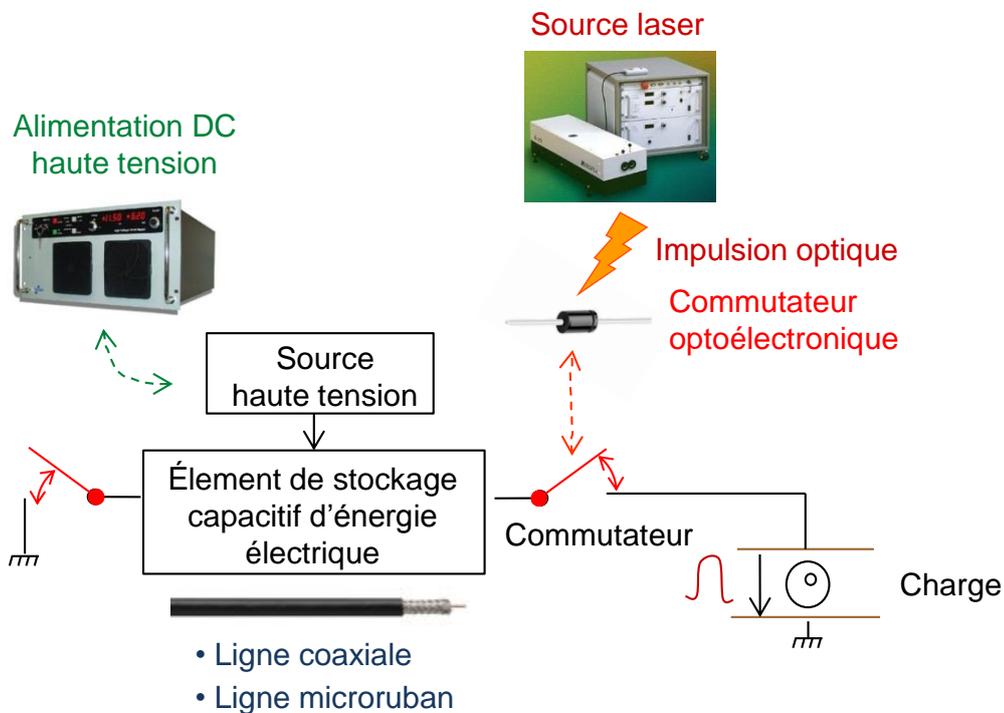


Figure 2.3 – Schéma du principe de fonctionnement de base des générateurs à ondes gelées de XLIM.

fortes tensions (jusqu'à plusieurs centaines de kilovolts). Néanmoins, la reproductibilité des impulsions générées est délicate, du fait des conditions particulières nécessaires au déclenchement de la commutation. De plus, la gigue temporelle, qui correspond à une fluctuation de l'instant d'émission des impulsions par rapport à une horloge, est significative par rapport aux durées d'impulsion souhaitées. Il n'est donc pas possible de synchroniser le générateur avec un système d'imagerie.

Pour nos expérimentations, les commutateurs optoélectroniques sont un bon compromis puisqu'ils allient des temps de commutation suffisamment courts pour nos besoins, une bonne tenue en tension (jusqu'à quelques dizaines de kilovolts) et une faible gigue temporelle lorsqu'ils sont utilisés en régime linéaire. Les PCSS ont en effet deux modes de fonctionnement, le régime linéaire et le régime d'avalanche. Pour un fonctionnement en régime linéaire, chaque photon arrivant sur le commutateur génère une paire électron-trou, c'est-à-dire que pour chaque photon, un électron supplémentaire participera au courant de conduction. Comparé au mode d'avalanche où un photon génère plusieurs paires électron-trou par un effet de cascades, le régime linéaire exige davantage d'énergie optique pour une même efficacité de commutation. Toutefois, le régime d'avalanche augmente fortement la gigue temporelle et limite grandement la durée de vie des PCSS ainsi que leur fréquence de commutation maximale [145, 146]. Mieux vaut donc employer les PCSS dans leur mode de commutation linéaire.

2.2.1.2 Mise en forme des impulsions

Les générateurs à ondes gelées ayant un commutateur aux deux extrémités de la ligne de transmission permettent d'obtenir des impulsions électriques d'allure temporelle diverse (ex. monopolaire, bipolaire) ainsi que d'amplitude et de durée variables. La Figure 2.4 montre le principe de génération d'une impulsion électrique monopolaire et bipolaire.

Une ligne de transmission sans pertes peut être modélisée par un ensemble de capacités en parallèle (C) séparées par des inductances en série (L) [147]. Lorsque la ligne est en circuit ouvert et polarisée à une tension notée V_b , les capacités se chargent jusqu'à ce que la différence de potentiel à leurs bornes atteigne la tension de polarisation. La tension vaut alors V_b le long de la ligne et 0 ailleurs. Si le photocommutateur PCSS 2 est illuminé par une impulsion optique, il passe à l'état fermé et devient l'équivalent d'un court-circuit. La capacité directement à gauche du photocommutateur commence alors à se décharger dans la capacité au plus près à droite du photocommutateur. La décharge s'achève lorsque la différence de potentiel atteint $V_b/2$ de part et d'autre. Les capacités à droite du photocommutateur se déchargent ainsi en cascade au travers des inductances distribuées, tandis que les capacités à gauche se chargent. Ces charges/décharges résultent en deux ondes se propageant dans des directions opposées avec une vitesse de propagation $v = 1/\sqrt{LC}$, où L (H/m) est l'inductance linéique de la ligne et C (F/m) sa capacité linéique.

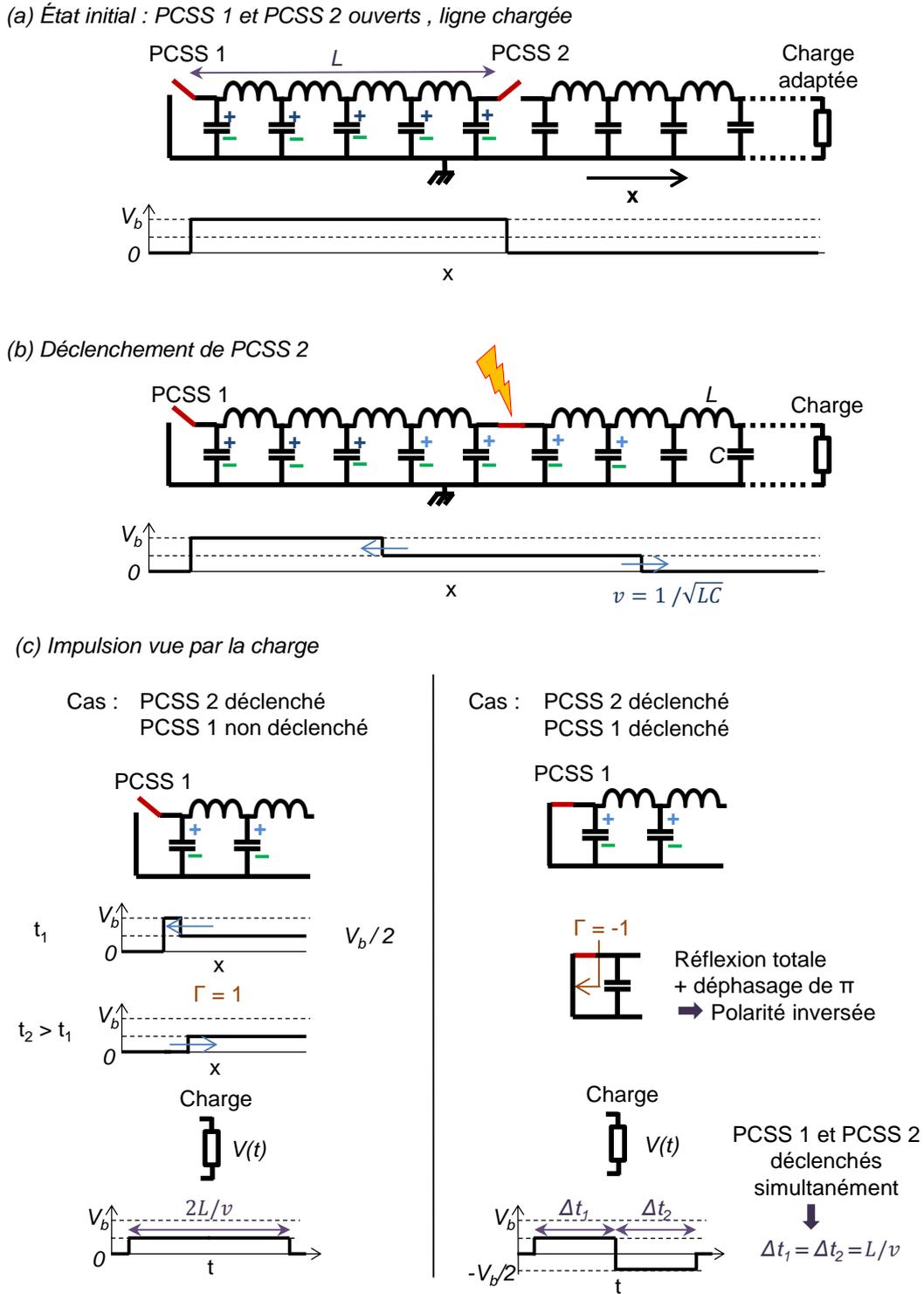


Figure 2.4 – (a) Modélisation d'une ligne de transmission chargée avec une tension de polarisation V_b ; PCSS 1 et PCSS 2 ouverts ; PCSS 2 connecté à une ligne de transmission se terminant sur une charge supposée adaptée. Partie inférieure : tension le long de la ligne. (b) Modélisation de la ligne de transmission chargée avec PCSS 2 déclenché (fermé) par une impulsion optique — naissance de deux ondes se propageant dans des directions opposées à partir de la position de PCSS 2. Γ désigne le coefficient de réflexion de l'onde en fin de ligne. (c) À droite : réflexion de l'onde au niveau de PCSS 1 fermé — génération d'une impulsion monopolaire. À gauche : réflexion de l'onde au niveau de PCSS 1 ouvert — génération d'une impulsion bipolaire.

Pour comprendre ce qu'il advient de l'onde se propageant vers $-\vec{x}$ lorsque celle-ci atteint le PCSS 1, nous définissons un coefficient de réflexion Γ tel que $\Gamma = E_i/E_r$, où E_i est l'amplitude complexe du champ électrique incident se propageant suivant $-\vec{x}$ et E_r celle du champ électrique réfléchi suivant \vec{x} . Pour un court-circuit, on montre que $\Gamma = 1$ et pour un circuit ouvert $\Gamma = -1$. Cela signifie qu'une onde incidente sur un court-circuit est totalement réfléchi et sa phase est conservée. En revanche, dans le cas d'un circuit ouvert, la réflexion est totale mais l'onde est déphasée de π radians ($-1 = e^{j\pi}$). Partant de notre configuration, l'impulsion vue par une charge adaptée en fin de ligne sera donc monopolaire si le PCSS 1 n'est pas illuminé, et bipolaire s'il est illuminé avant que la capacité à sa droite soit déchargée.

La durée totale T (s) de l'impulsion générée est dictée par la distance L (m) séparant les deux PCSS selon $T = 2L/v$ avec v (m/s) la vitesse de propagation de l'onde dans la structure. En déclenchant les deux PCSS avec des délais variés, il est possible de réduire la durée des impulsions, de générer des impulsions monopolaires à polarité négative ou encore de façonner des impulsions bipolaires à profil non symétrique [148].

2.2.1.3 La technologie microruban

Depuis les thèses de doctorat citées précédemment, notre équipe dispose de générateurs à ondes gelées basés sur des éléments de stockage de type microruban (voir Figure 2.5). Dans ces lignes, l'énergie est stockée sous forme capacitive dans un diélectrique compris entre deux éléments conducteurs de forme planaire. Comme montré sur la Figure 2.6, l'un des conducteurs sert de plan de masse, tandis que le second est connecté à la source de haute tension continue (DC). Le champ électrique généré lorsque le conducteur supérieur est sous tension est principalement confiné à l'intérieur du diélectrique de la structure.

Ces générateurs délivrent des impulsions monopolaires et bipolaires, de durée comprise entre quelques centaines de picosecondes et quelques nanosecondes et d'amplitude maximum de 2 kV (4 kV crête-à-crête) [148,149]. Une version compacte de ces générateurs a été développée conjointement avec la société HORUS Laser² (Limoges, France) qui les propose aujourd'hui à la vente. La tension de polarisation maximum de ces générateurs s'élève à 4 kV. Cette valeur est fixée par la technologie microruban et les types de connecteurs coaxiaux utilisés.

Dans le but de générer des impulsions électriques de plus forte amplitude, un nouveau générateur basé sur une ligne de transmission coaxiale et des connecteurs plus robustes a par la suite été développé [3]. Dans la partie à suivre, nous présentons l'étude expérimentale des capacités et limites du générateur. Ces études ont été conduites au cours de la thèse.

2. <http://www.horuslaser.com/>

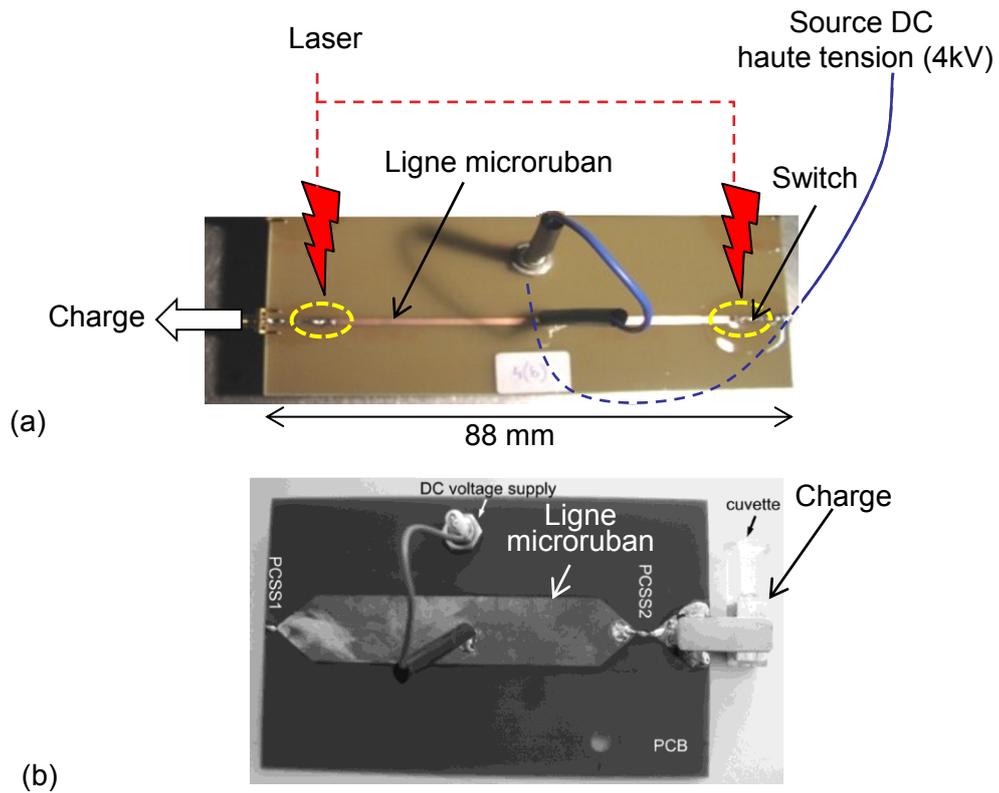


Figure 2.5 – Exemples de générateurs à ondes gelées comprenant une ligne de transmission de type microruban. Générateur avec une ligne de transmission d'impédance caractéristique de 50Ω (a) et une ligne de transmission d'impédance caractéristique de 10Ω (b). D'après [149] et [148].

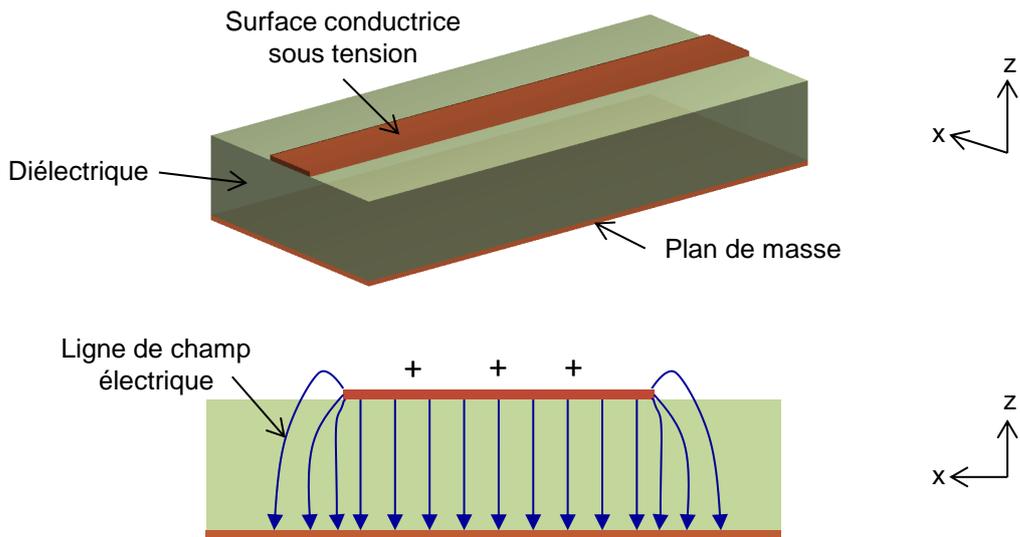


Figure 2.6 – Principe d'une ligne microruban.

2.2.2 Démonstration d'un générateur en technologie coaxiale

2.2.2.1 Description du générateur

Comme schématisé Figure 2.7, une ligne de transmission coaxiale est une structure constituée de deux matériaux conducteurs, cylindriques et concentriques, séparés par un matériau diélectrique. Le conducteur externe sert de référence de potentiel et blinde la structure vis-à-vis des champs électromagnétiques extérieurs. Le conducteur intérieur est pour sa part connecté à la source de potentiel. Pour des dimensions de section et des matériaux bien choisis, on montre que le champ électrique généré est normal à l'axe longitudinal des conducteurs. Ceci est vrai sur une bande continue de fréquences incluant les champs électrostatiques et dont la largeur spectrale est spécifique à la structure choisie.

La Figure 2.8 présente une vue schématique ainsi qu'une photographie des structures coaxiales qui ont été développées pour le nouveau générateur. Les PCSS sont chacun intégrés dans une structure coaxiale distincte. Une structure coaxiale présente trois axes d'entrée/sortie tandis que l'autre n'en a qu'un. La structure à un axe (structure 1) est court-circuitée à une extrémité et connectée au système de l'autre. La structure à trois axes (structure 2) est quant à elle connectée à l'alimentation haute tension continue au port numéro 1, à la structure 1 au port numéro 2 et à la charge au port numéro 3. L'intérêt de cette configuration est qu'il est possible de modifier la longueur de la ligne séparant les deux structures en connectant un ou des câbles coaxiaux de longueur totale différente. En comparaison à la structure microruban, l'éventail des durées d'impulsion électrique qui peuvent être générées est donc théoriquement bien plus vaste.

Le diélectrique dans les structures coaxiales est en Teflon[®] (PTFE). Ce matériau a été choisi pour sa bonne rigidité diélectrique et sa stabilité en température. Les conducteurs extérieurs sont en aluminium et les conducteurs intérieurs en cuivre, le cuivre présentant une meilleure conductivité électrique. La résistance (de 333 k Ω) connectée entre la source haute tension continue et le PCSS 2 limite le courant qui pourrait circuler vers la source et l'endommager. Cette résistance, ainsi que les photocommutateurs, est soudée de sorte que la longueur des « pattes » soit la plus courte possible. Les fils métalliques de faible diamètre sont indésirables puisqu'ils présentent une forte inductance. Cette inductance est d'autant plus grande que le fil est long et la fréquence d'utilisation augmente [150]. Une ouverture dans l'architecture métallique externe des structures permet d'amener l'énergie optique nécessaire à la commutation des PCSS soudés à ce niveau. Les connecteurs qui servent de transition entre les différents éléments de la chaîne de génération sont des connecteurs commerciaux de type THT (THT .20, Radiall USA, Inc., AZ, USA) spécialement conçus pour supporter une tension continue jusqu'à 20 kV. Leur bande passante à -3 dB atteint 1 GHz.

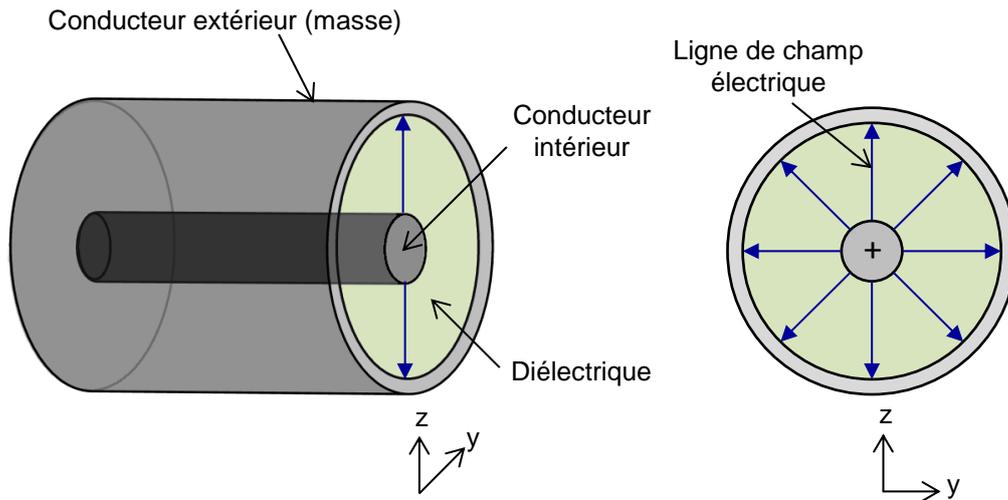


Figure 2.7 – Principe d'une ligne coaxiale cylindrique.

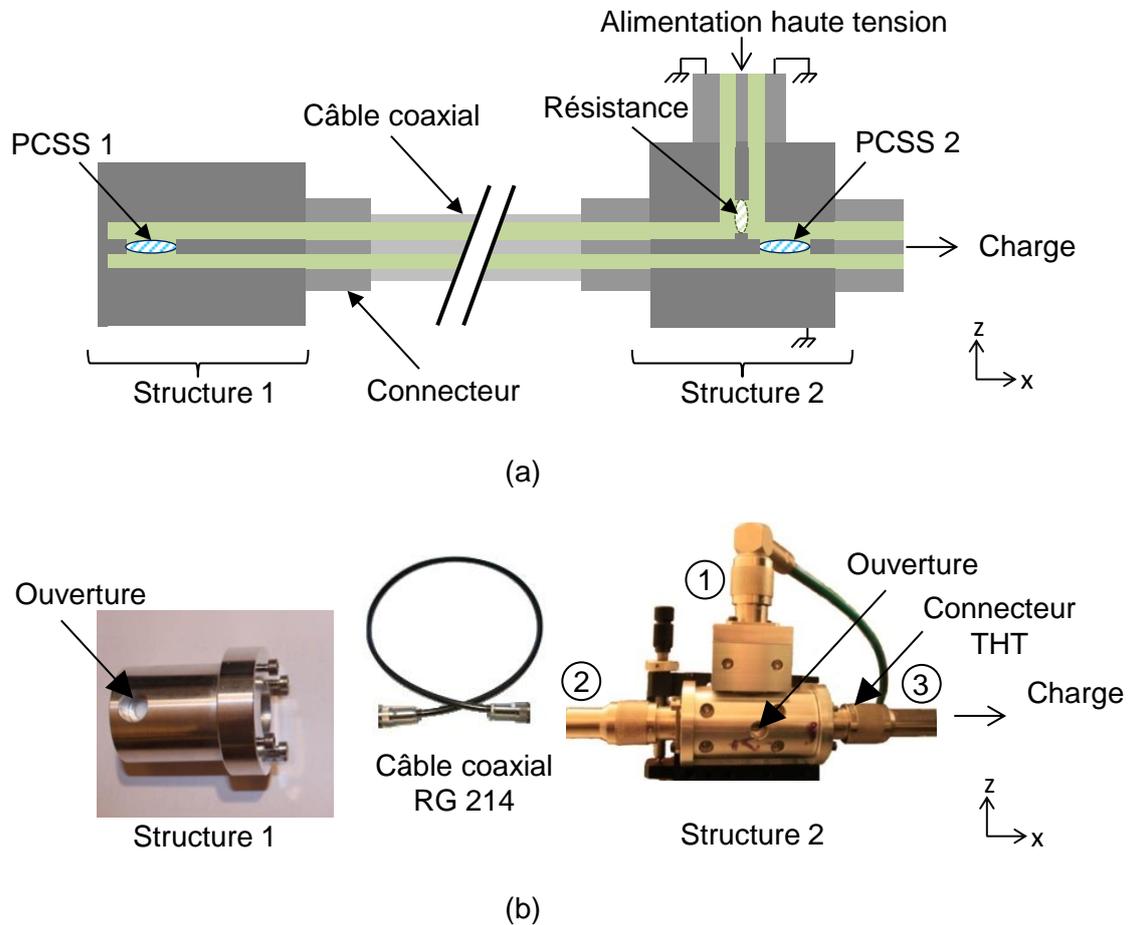


Figure 2.8 – Structure de mise en forme des impulsions du générateur en technologie coaxiale. (a) Coupe des structures coaxiales, connecteurs et câble coaxial (échelle non respectée). Les surfaces verdâtres modélisent les matériaux diélectriques (de couleur blanche en réalité), les surfaces grises modélisent les matériaux conducteurs et les surfaces rayées les composants électroniques et optoélectroniques. (b) Photographie des éléments (l'échelle diffère entre les images).

Les modèles de la source haute tension et des lasers utilisés dans la chaîne de génération sont donnés respectivement au Tableau 2.1 et Tableau 2.2.

Source DC haute tension	
Modèle	HCN140-3500, Technix, France
Tension de sortie maximum	35 kV

Tableau 2.1 – Modèle et caractéristique de la source haute tension.

	Source laser 1	Source laser 2
Modèle	SL300 (Ekspla, Lituanie)	PL2241A (Ekspla, Lituanie)
Longueur d'onde	1064 nm	1064 nm
Durée des impulsions optiques	2.4 ns	35 ps
Fréquence de répétition	10 Hz	10 Hz
Énergie par impulsion	jusqu'à 20 mJ	jusqu'à 50 mJ

Tableau 2.2 – Modèle et caractéristiques des lasers utilisés.

2.2.2.2 Caractérisation des structures coaxiales dans le domaine fréquentiel

Dans cette sous-partie, nous étudions les caractéristiques fréquentielles des structures coaxiales. Pour comprendre la nécessité de cette étude, il faut savoir qu'un champ électromagnétique subit les lois de la réflexion lorsqu'il rencontre un milieu de propriétés électriques différentes de celles de son milieu de propagation initiale. On montre que la transmission d'un champ électromagnétique d'une source vers une charge via une ligne de transmission (par ex. une ligne coaxiale) est optimale si et seulement si l'impédance de la source et celle de la charge sont égales à l'impédance caractéristique de la ligne de transmission [151].

L'impédance caractéristique Z_c d'une ligne de transmission est définie comme le rapport de l'amplitude complexe du champ électrique sur celle du champ magnétique s'y trouvant. La valeur de Z_c est fixée par la géométrie des conducteurs et la permittivité du matériau diélectrique, et elle est constante en tout point de la ligne. L'impédance caractéristique nominale des câbles coaxiaux que nous utilisons en expérimentation vaut 50Ω . Il s'agit d'une impédance « nominale » puisque les câbles coaxiaux sont « réels ». Ils présentent des pertes diélectriques significatives au-delà d'une certaine fréquence d'utilisation (typiquement 10 GHz). L'impédance caractéristique du câble devient alors dépendante de la fréquence.

Pour déterminer les limites d'utilisation en fréquence de nos structures coaxiales, les paramètres S de la structure à 3 axes ont été mesurés en transmission et en réflexion entre 30 MHz et 3 GHz [152]. La Figure 2.9 présente un schéma du montage. Le commutateur était remplacé par un court-circuit réalisé à partir d'un cylindre de cuivre dont le diamètre

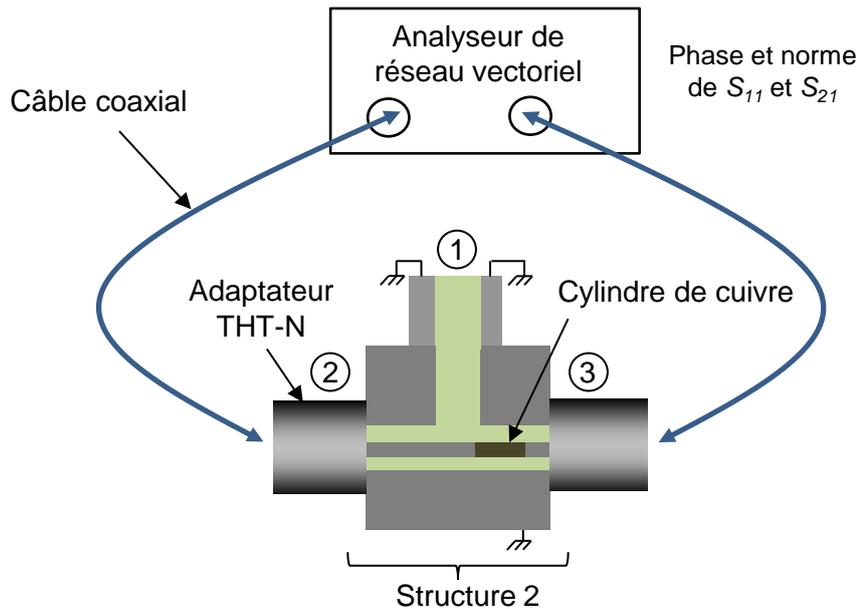


Figure 2.9 – Schéma du montage expérimental pour la caractérisation fréquentielle de la structure coaxiale.

est le même que celui du conducteur central des connecteurs THT. Les ports numéros 2 et 3 de la structure étaient connectés à un analyseur de réseau vectoriel (VNA 8753E, Agilent, USA) par l'intermédiaire d'un adaptateur THT-N. Cette analyseur présente une impédance interne de 50Ω sur la bande 0–6 GHz, soit une bande très supérieure à la bande de fréquences d'intérêt. La calibration de l'analyseur a été réalisée en sortie des câbles connectés aux adaptateurs THT-N. Pour mettre en évidence la nature (résistive, capacitive, inductive) du comportement de la structure en fonction de la fréquence, l'impédance équivalente de la structure a été calculée à partir des paramètres S en réflexion.

Les résultats sont montrés Figure 2.10. La bande passante de la structure coaxiale à -10 dB atteint 800 MHz. Cette limite est attribuable aux connecteurs THT conçus pour fonctionner jusqu'à 1 GHz ainsi qu'au design particulier des connexions dans la structure. Elle ne contraint cependant pas la génération d'impulsions électriques nanosecondes sachant que leur énergie électrique est typiquement concentrée à des fréquences bien inférieures à 800 MHz. Le paramètre en transmission S_{21} est supérieur à -1 dB jusqu'à 850 MHz. En termes de puissance transmise, cela signifie qu'au moins 90% de la puissance incidente est transmise sur la bande 0-850 MHz. L'impédance équivalente de la structure est montrée Figure 2.10b. Le comportement de la structure est essentiellement résistif jusqu'à quelques centaines de MHz. Des effets capacitifs (partie imaginaire négative) et inductifs (partie imaginaire positive) apparaissent au-delà. En pratique, les effets capacitifs se traduisent par une opposition à un changement de tension entre les conducteurs intérieur et extérieur tandis que les effets inductifs se manifestent

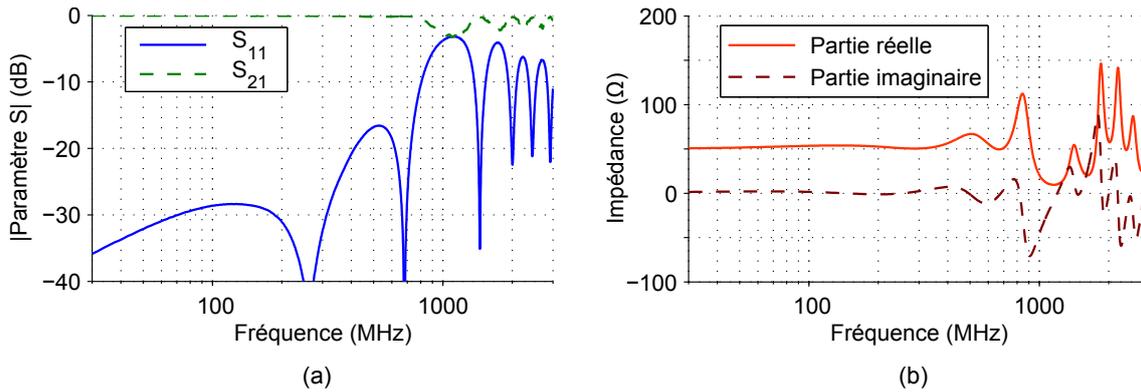


Figure 2.10 – Paramètres S (a) et impédance équivalente (b) de la structure coaxiale à 3 axes connectée à l'analyseur de réseau vectoriel en entrée et sortie.

par une opposition aux variations de courant dans les conducteurs ; d'où la dégradation de la transmission des signaux aux fréquences concernées. Nous verrons ultérieurement que la bande passante du système reste suffisante pour la génération d'impulsions électriques subnanosecondes.

Le comportement fréquentiel des structures coaxiales étant validé, le photocommutateur est soudé à la place du court-circuit.

2.2.2.3 Caractérisation des photocommutateurs

Les photocommutateurs employés (voir Figure 2.11) sont des diodes à jonction PN (X200FG, VMI, USA) avec une tenue en tension inverse de 20 kV. Leur principe de fonctionnement est relativement simple dans son concept. Lorsque la diode n'est pas illuminée, les électrons du semiconducteur sont fortement liés au noyau des atomes auxquels ils appartiennent. La diode se comporte alors comme un isolant électrique ; sa résistance au passage d'un courant est forte (plusieurs $M\Omega$). On dit qu'elle est à l'état ouvert. Supposons à présent que la diode est illuminée par un faisceau laser. Si l'énergie des photons incidents dépasse un certain seuil, elle excite suffisamment certains électrons pour les « libérer » de l'atome. En appliquant une différence de potentiel de part et d'autre de la diode, ces nouveaux électrons libres sont accélérés par le champ électrique et participent alors au processus de conduction. Comme mentionné précédemment, un photon génère un seul électron dans la bande de conduction lorsque la diode fonctionne en mode linéaire. Avec ce mode de fonctionnement, la résistance de la diode peut donc être fortement réduite en l'éclairant avec un faisceau laser de forte puissance. Si tel est le cas, la diode devient un bon conducteur électrique. On dit qu'elle est à l'état fermé. La diode revient à l'état ouvert lorsqu'elle n'est plus illuminée. Le temps de passage de l'état fermé à l'état ouvert dépend d'une constante de temps propre au semiconducteur. La documentation technique de notre diode indique une constante de temps de 200 ns. Le choix de la longueur d'onde optimale du laser illuminant la diode dépend des composés chimiques du semiconducteur.

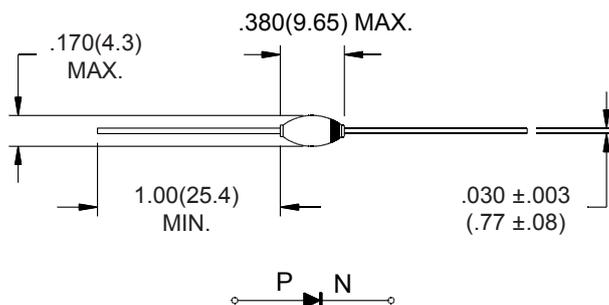


Figure 2.11 – Dimensions en pouce (en millimètre en parenthèse) des photocommutateurs employés. D'après [153].

Rappelons que l'énergie E (J) d'un photon est quantifiée et liée à sa fréquence ν (s^{-1}) selon :

$$E = h\nu, \quad (2.1)$$

où h est la constante de Planck ($\approx 6.62 \cdot 10^{-34}$ J.s). Sachant que la longueur d'onde d'un photon est inversement proportionnelle à sa fréquence, son énergie est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Dans le même temps, nous savons que la profondeur de pénétration des photons dans un matériau augmente avec la longueur d'onde. Le choix de la longueur d'onde la plus appropriée pour une génération efficace d'électrons appelle donc un compromis entre l'absorption et la profondeur de pénétration des photons. Pour une diode en silicium, une longueur d'onde de 1064 nm apparaît comme un bon compromis [146].

À notre connaissance, le modèle de diode que nous utilisons n'avait jamais été testé en tant que PCSS. En conséquence, nous ne disposions initialement d'aucune information relative à la résistance de la diode en fonction de l'énergie optique incidente et de la tension de polarisation. La caractérisation du composant en tant que PCSS nous est donc revenue. Notre objectif était d'une part de déterminer la dépendance de la résistance à l'énergie optique incidente pour une tension de polarisation donnée et d'autre part de déterminer la variation de la résistance en fonction de la tension de polarisation pour une énergie optique fixée. Le montage expérimental mis en place pour cette étude est schématisé Figure 2.12. Le port numéro 2 de la structure coaxiale à 3 axes était connecté à un câble coaxial de 86 cm en circuit ouvert. Comme pour toute expérimentation, nous nous sommes assurés que les adaptateurs, câbles et autres éléments insérés dans le montage expérimental ne sont pas dispersifs et n'introduisent pas d'atténuation significative sur la bande de fréquences d'intérêt. La mesure de la tension en sortie du PCSS a été réalisée en connectant le port numéro 3 de la structure à un oscilloscope de bande passante de 12 GHz (DSO, TDS6124C, Tektronix, USA) et d'impédance interne de 50 Ω . La tension d'entrée maximum admissible à l'entrée de l'oscilloscope ne dépassant pas quelques volts, trois atténuateurs haute tension large bande de 26 dB (142-GHMFP-

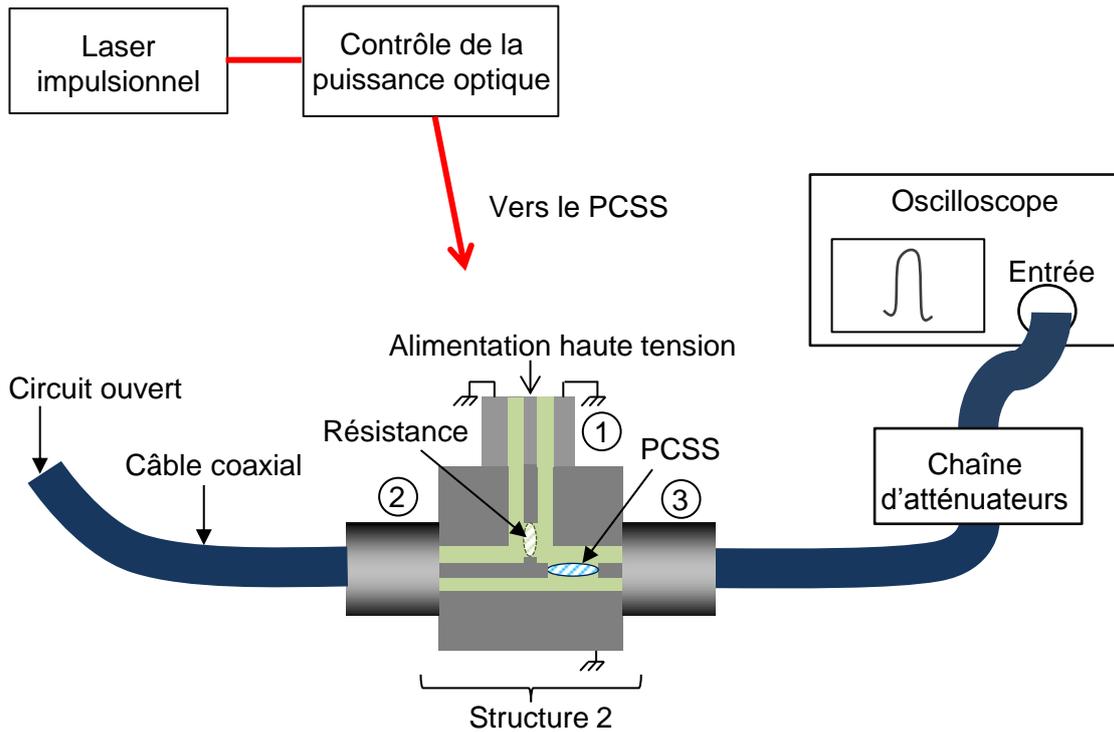


Figure 2.12 – Schéma du montage expérimental pour la caractérisation du photocommutateur.

26B, Barth Electronics, Inc., NV, USA) étaient insérés en amont. Ces atténuateurs ayant une connectique du type GHV, un câble de transition THT-GHV était nécessaire pour connecter la série d'atténuateurs à la structure 3 axes. Le port numéro 1 de la structure était connecté à la source de tension continue. La puissance optique en sortie du laser était ajustée à l'aide d'un polariseur et mesurée à l'aide d'un puissance mètre optique.

La résistance R_s du PCSS est définie selon :

$$R_s = \frac{(V_b - V_{out}) \cdot R_{charge}}{V_{out}} - R_{source}, \quad (2.2)$$

où R_{charge} est la résistance de la charge et R_{source} la résistance de la structure en amont du commutateur.

L'efficacité de conversion η du PCSS est quant à elle définie par :

$$\eta = \frac{V_{out}}{V_b/2}, \quad (2.3)$$

où V_{out} (V) est l'amplitude de la tension en sortie du générateur et V_b (V) la tension de polarisation.

Les résultats de caractérisation qui ont été obtenus sont montrés Figure 2.13. La Figure 2.13a présente les résultats des mesures en fonction de l'énergie optique incidente

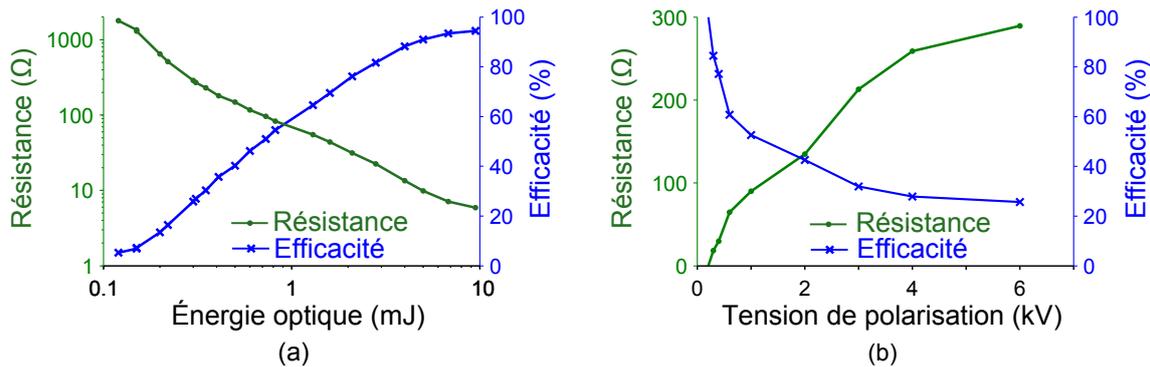


Figure 2.13 – (a) Résistance équivalente et efficacité du commutateur en fonction de l'énergie incidente pour une tension de polarisation de 8 kV. (b) Résistance équivalente et efficacité du commutateur en fonction de la tension de la polarisation pour une énergie optique de 500 μJ .

pour une tension de polarisation de 8 kV (tension maximum admissible : 20 kV). Comme attendu, la résistance du commutateur décroît quand l'énergie optique incidente augmente. Sans illumination, un ohmmètre conventionnel branché en inverse aux bornes de la diode en circuit ouvert indique une résistance de 33 M Ω ; la diode est alors effectivement à l'état ouvert. Pour une énergie optique de 10 mJ, nous observons que la résistance équivalente du commutateur est réduite à 6 Ω ; la diode atteint l'état fermé.

Les résultats de la Figure 2.13b ont été obtenus avec une énergie optique constante de 500 microjoules (μJ). La résistance équivalente du commutateur augmente avec la tension de polarisation, d'où la diminution de l'efficacité de commutation. Cette réduction de l'efficacité en fonction de la tension de polarisation était déjà observée dans les commutateurs des générateurs en technologie microruban. Ce phénomène a été expliqué par l'effet Franz-Keldysh [154]. Cet effet se manifeste par un décalage de la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption d'un matériau quand il est soumis à un fort champ électrique. Dans notre cas, la perte d'efficacité liée à l'effet Franz-Keldysh peut être compensée en augmentant l'énergie optique apportée au semiconducteur. Par ailleurs, comparé au commutateur utilisé dans les générateurs en technologie microruban, ce nouveau commutateur requiert une quantité d'énergie optique très supérieure pour une même efficacité de commutation à une tension de polarisation donnée. Mais il a l'avantage de fonctionner à des tensions de polarisation très supérieures à 4 kV.

La capacité de nos diodes à commuter des hautes tensions à partir d'une commande optique étant caractérisée, il reste à montrer l'aptitude du générateur à produire les impulsions électriques désirées aux bornes d'une charge 50 Ω .

2.2.2.4 Génération d'impulsions haute tension nanosecondes à profil variable

Dans cette sous-partie, nous traitons de la capacité du générateur à délivrer des impulsions haute tension de durée nanoseconde.

Le montage expérimental utilisé pour les tests était basé sur le montage employé pour la caractérisation du photocommutateur, la différence entre les deux montages étant que le câble coaxial précédemment en circuit ouvert est désormais connecté à la structure coaxiale à 1 axe avec un PCSS intégré. La source optique utilisée était le laser générant des impulsions optiques de 2.5 ns.

La Figure 2.14 montre deux impulsions électriques monopolaires générées en déclenchant uniquement le PCSS de la structure coaxiale à 3 axes. Dans les deux cas, l'énergie optique s'élève à 6 mJ et la tension de polarisation est de 8 kV. L'impulsion électrique de 8.3 ns (respectivement 17.5 ns) est obtenue en connectant un câble coaxial de 0.8 m (respectivement 1.7 m environ) entre les deux structures coaxiales. Les fronts de montée des impulsions électriques ont la même allure quelle que soit la durée totale de l'impulsion car leur évolution est dictée par le front de montée de l'impulsion optique incidente. L'impulsion de faible amplitude suivant l'impulsion principale (autour de $t = 23$ ns pour l'impulsion de 8.3 ns et autour de $t = 40$ ns pour l'autre impulsion) est vraisemblablement liée à une réflexion à l'entrée du PCSS 2 dont la résistance n'est pas strictement nulle à l'état fermé. Le spectre normalisé des impulsions met en évidence une largeur spectrale à -10 dB de 42 MHz pour l'impulsion de durée 17.5 ns et de 84 MHz pour l'impulsion de durée 8.3 ns.

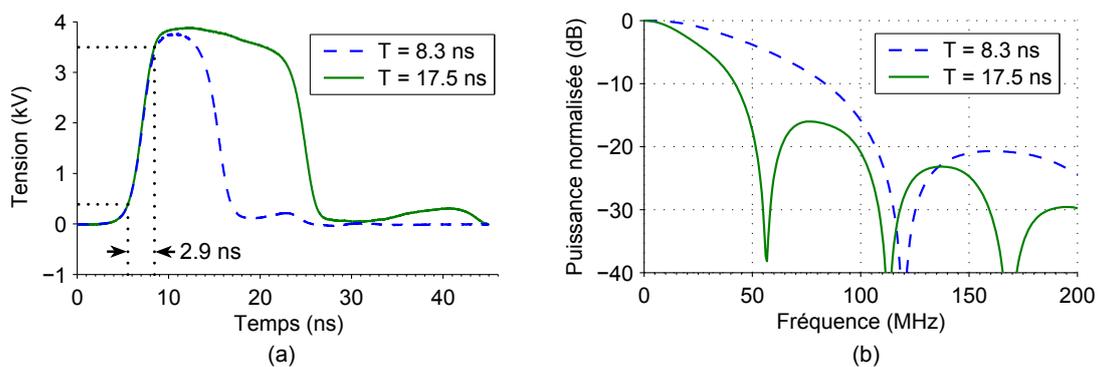


Figure 2.14 – Impulsions électriques générées avec des impulsions optiques de 2.5 ns, une tension de polarisation de 8 kV et une énergie optique totale de 6 mJ. Résultats dans le domaine temporel (a) et le domaine fréquentiel (b). L'impulsion de 8.3 ns (resp. 17.5 ns) est obtenue avec un câble coaxial de 0.8 m environ (resp. 1.7 m). Le temps de montée des impulsions électriques s'élève à 2.9 ns.

Dans cette configuration, il est difficile de générer des impulsions électriques de durée inférieure à quelques nanosecondes en raison du temps de montée nanoseconde de l'impulsion optique. La génération d'impulsions plus courtes a donc été testée avec le laser délivrant des impulsions optiques de 35 ps.

2.2.2.5 Génération d'impulsions haute tension subnanosecondes

L'impulsion électrique la plus courte qui a été obtenue est montrée Figure 2.15a. Sa durée atteignait 745 ps. L'énergie de l'impulsion optique et la tension de polarisation étaient respectivement de 1.05 mJ et 10 kV. Pour obtenir cette durée d'impulsion, le port numéro 2 de la structure coaxiale à 3 axes était en circuit ouvert. Dans le domaine fréquentiel (voir Figure 2.15b), l'impulsion présente des oscillations liées à la bande passante sub-GHz de la structure coaxiale. Comme démontré par cet exemple, la bande passante limitée de la structure ne contraint cependant pas la génération d'impulsions à temps de montée de l'ordre de la centaine de picosecondes.

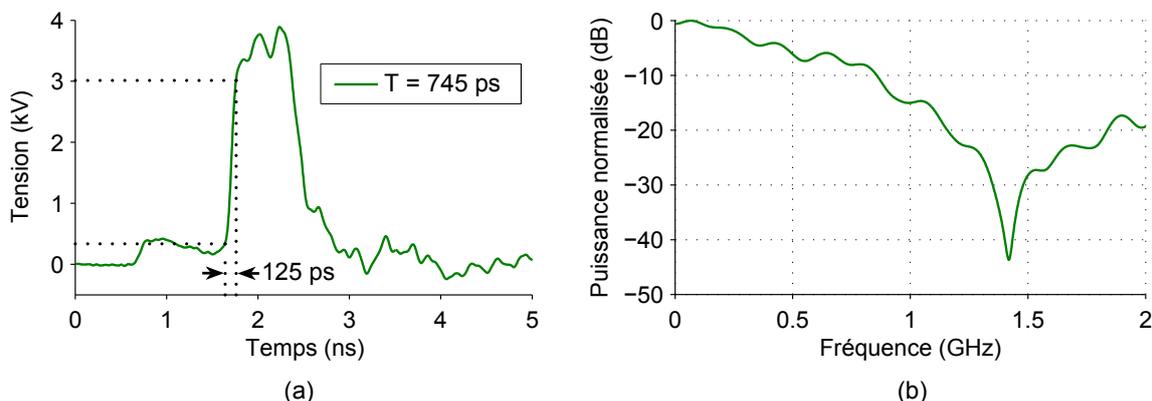


Figure 2.15 – Impulsion électrique générée avec une impulsion optique de 35 ps, une tension de polarisation de 10 kV et une énergie optique totale de 1.05 mJ. Résultat dans le domaine temporel (a) et le domaine fréquentiel (b). La durée de l'impulsion électrique et son temps de montée s'élèvent respectivement à 745 ps et 125 ps.

2.2.2.6 Contrôle du nombre d'impulsions générées

Nous avons omis jusque là le contrôle du nombre d'impulsions électriques générées. Il n'est pas rare que les biologistes souhaitent exposer leur échantillon à un nombre précis d'impulsions électriques (par exemple 1, 5 ou 10 impulsions). Une impulsion électrique étant générée à chaque impulsion optique incidente sur le photocommutateur, le nombre d'impulsions électriques auquel la cible sera successivement soumise dépend du nombre de tirs de la source laser pulsée. L'énergie des premières impulsions optiques émises par nos lasers impulsions étant peu stable, il est préférable de les laisser tirer quelques instants avant de les diriger vers les commutateurs. En pratique, ceci est réalisé en insérant un obturateur entre la source laser et le générateur. Tant que la source laser se stabilise,

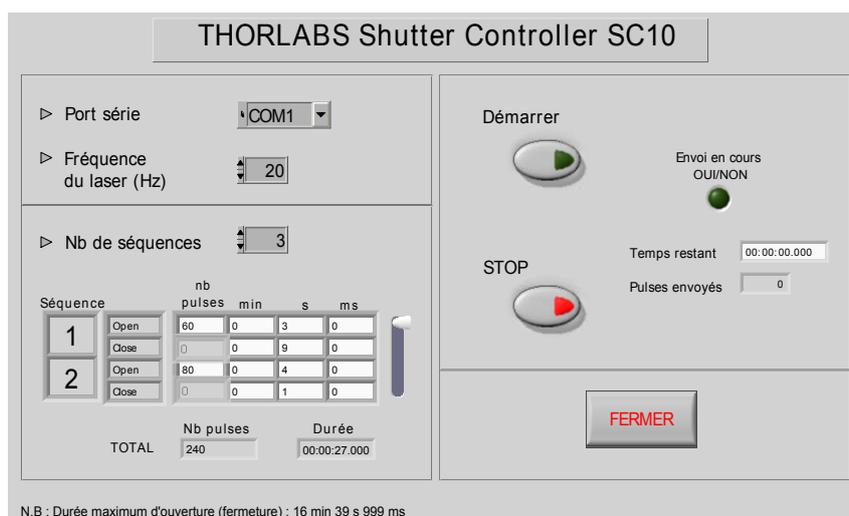


Figure 2.16 – Face-avant du programme LabVIEW développé pour le contrôle du nombre d'impulsions délivrées à l'échantillon.

l'obturateur est laissé fermé puis il est ouvert le temps que le nombre d'impulsions optiques souhaitées l'ait traversé. Un isolateur optique placé en sortie du laser assure toujours que ce dernier est protégé des faisceaux optiques réfléchis dans sa direction. L'obturateur utilisé à XLIM est un obturateur électro-mécanique (SC10-SH05, Thorlabs, Inc., NJ, USA) pilotable manuellement ou à l'aide d'un signal TTL externe. Sa résolution et sa précision sont respectivement 1 ms et 0.1 ms. Nos lasers ayant une fréquence de répétition de 10 Hz (soit une impulsion émise toutes les 100 ms), la résolution et la précision de l'obturateur sont satisfaisantes si toutefois l'obturateur n'est pas en phase d'ouverture ou de fermeture à l'instant où une impulsion optique arrive sur le diaphragme. Si tel était le cas, l'impulsion optique serait alors partiellement réfléchi et l'efficacité de la commutation serait dégradée. Pour éviter cette situation, l'obturateur peut être synchronisé avec la source laser au travers d'un câble coaxial BNC.

Pour faciliter la manipulation de l'obturateur, un programme de commande par ordinateur a été développé sous LabVIEW. La face-avant de l'exécutable est montrée Figure 2.16.

La synchronisation du générateur avec un système d'imagerie optique de l'échantillon est envisageable. Le générateur étant commandé par une source laser, il est possible de diviser la commande en 2 faisceaux optiques, l'un servant à déclencher le générateur et l'autre le système d'imagerie. Le délai de déclenchement des deux systèmes serait aisément ajustable à l'aide d'une ligne à retard optique.

2.2.3 Conclusion

Avec ces résultats expérimentaux, nous avons montré que le générateur en technologie coaxiale est capable de délivrer des impulsions électriques de durée nanoseconde et subnanoseconde et d'amplitude supérieure à celles accessibles avec le générateur en

technologie microruban. Nous avons également étudié la réponse des commutateurs opto-électroniques en fonction de l'énergie optique incidente et de la tension de polarisation.

L'ensemble des travaux a été publiée dans *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* [155] et présentés à deux conférences internationales, *European electromagnetics EuroEM 2012* [156] et *IEEE International Power Modulator and High Voltage Conference (IPMHVC) 2012* [157].

Théoriquement, ce nouveau générateur admet des tensions de polarisation de 20 kV. En pratique, des grésillements apparaissent dans la structure coaxiale pour des tensions de polarisation supérieures à 11–12 kV. Le champ électrique disruptif de l'air étant d'approximativement 30 kV/cm (variable selon les conditions ambiantes), un espace d'air dans la structure coaxial devient rapidement critique. De ce point de vue, des points faibles ont été identifiés au niveau des connecteurs d'entrée ainsi qu'à l'intérieur de la structure coaxiale. Une meilleure isolation des parties métalliques à ces endroits a permis d'atteindre une tension de polarisation supérieure à 20 kV sans claquage électrique. Il reste à tester le fonctionnement du générateur à ces tensions de polarisation lorsqu'il est illuminé par des impulsions optiques.

Finalement, ce générateur offre un large champ d'investigation pour l'étude des effets biologiques des impulsions électriques nanosecondes et subnanosecondes de haute intensité. Mais pour ce faire, il doit être associé à un applicateur adapté. L'état de l'art et les travaux réalisés en matière d'applicateurs d'impulsions ultracourtes sont présentés dans la partie à suivre.

2.3 Les applicateurs *in vitro* dans la littérature

Dans cette partie, nous proposons un tour d'horizon des applicateurs d'impulsions électriques courtes d'une part et d'impulsions électriques ultracourtes d'autre part. Par « impulsions courtes » nous entendons les impulsions électriques de durée nanoseconde mais supérieure à 3–4 ns et par « impulsions ultracourtes » les impulsions électriques de durée inférieure à 3–4 ns.

Avant d'exposer l'état de l'art, nous commençons par poser/rappeler quelques bases de physique. L'objectif est de clarifier les raisons pour lesquelles nous dissociions les applicateurs d'impulsions courtes des applicateurs d'impulsions ultracourtes.

2.3.1 La problématique impulsion courte – impulsion ultracourte

Pour appliquer un champ électrique pulsé à une cible, le principe de base consiste à imposer une différence de potentiel de part et d'autre de cette cible. Nous savons en effet qu'un champ électrique est généré entre deux points de potentiel électrique différent. En pratique, pour exposer des cellules *in vitro* à une impulsion électrique, la méthode élémentaire consiste à plonger deux plaques conductrices identiques dans le milieu de culture puis à positionner ces plaques dites électrodes de part et d'autre des cellules à exposer (comme sur l'illustration de la Figure 2.17). Une électrode est connectée à la masse du système et l'autre à la sortie du générateur de tension. La taille des électrodes est choisie de sorte que le champ électrique couvre tout le volume à exposer.

Supposons désormais que les longueurs d'onde de l'impulsion de tension délivrée par le générateur sont très grandes devant la distance inter-électrodes d (comme définie Figure 2.17). Alors, la propagation du champ électrique entre les électrodes est négligeable et les conditions de l'approximation des régimes quasi-stationnaires sont vérifiées. Le champ électrique généré dans le milieu exposé dérive alors du potentiel électrique suivant

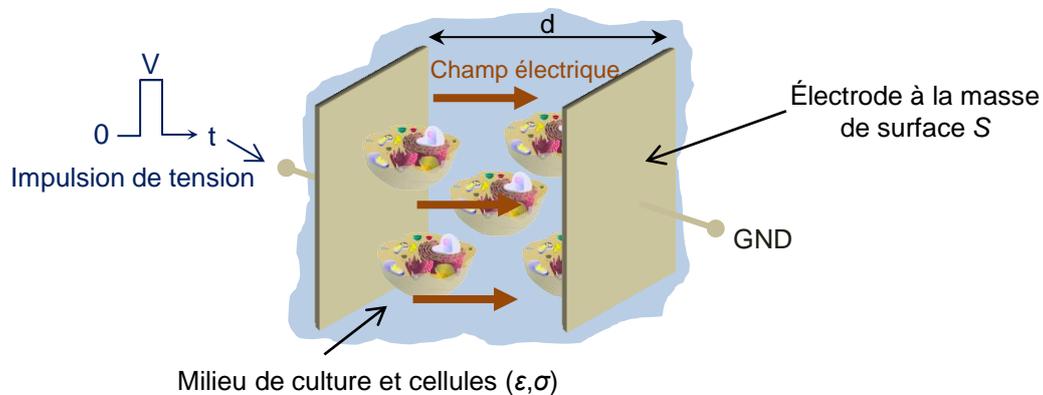


Figure 2.17 – Méthode de base pour exposer des cellules à un champ électrique pulsé. ϵ désigne la permittivité du milieu exposée et σ sa conductivité électrique.

l'équation (1.10). Les milieux de culture se comportant à la fois comme des conducteurs et des diélectriques, la densité de courant \vec{J}_{tot} (A/m²) induite par l'application d'un champ électrique suit l'équation (1.19), et en supposant que les propriétés électriques du milieu ne sont pas dispersives et sont uniformes, nous obtenons que :

$$\vec{J}_{tot} = (\sigma + j \cdot 2\pi\epsilon_0\epsilon_r \cdot f) \cdot \vec{E}, \quad (2.4)$$

où σ (S/m) est la conductivité électrique du milieu exposé et ϵ_r sa permittivité relative. En combinant cette équation à l'équation (1.10) et à partir de sa définition, l'impédance équivalente Z_e (Ω) de l'applicateur avec son contenant s'exprime par :

$$Z_e = \frac{d}{S \cdot (\sigma + j \cdot 2\pi\epsilon_0\epsilon_r \cdot f)}, \quad (2.5)$$

où S (m²) est la surface des électrodes en contact avec le milieu exposé et f la fréquence considérée (Hz).

Pour ($2\pi\epsilon_r\epsilon_0f \ll \sigma$) , le comportement du système est indépendant de la fréquence et essentiellement résistif puisque $Z_e \approx d/(S\sigma)$. En revanche, lorsque ($2\pi\epsilon_r\epsilon_0f$) > σ le système devient capacitif et son impédance équivalente dépend fortement de la fréquence. Dans les milieux de culture typiques, la permittivité relative s'approche de 80 et la conductivité électrique de 1.5 S/m. Avec un tel milieu, nous obtenons que ($2\pi\epsilon_r\epsilon_0f$) > σ devient vrai pour $f = 337$ MHz.

En expérimentation, les câbles coaxiaux que nous utilisons pour connecter l'applicateur au générateur ont une impédance caractéristique de 50 Ω . Pour s'assurer que les impulsions électriques fournies par le générateur sont fidèlement transmises à l'applicateur, il faut donc que $Z_e = 50$ Ω sur toute la largeur du spectre de l'impulsion. Le modèle d'applicateur étudié précédemment ayant un comportement dépendant de la fréquence à partir de $f \approx 300$ MHz, il n'est donc pas possible d'assurer l'adaptation d'impédance sur tout le spectre d'une impulsion de largeur spectrale supérieure à 300 MHz. Dans le domaine temporel, une impulsion rectangulaire dont le premier zéro de transmission se trouve à 300 MHz a pour durée 3.3 ns. En pratique, cela signifie que le principe de l'applicateur schématisé Figure 2.17 ne permet pas de transmettre fidèlement des impulsions de durée supérieure à quelques nanosecondes. Il est adapté pour délivrer des impulsions courtes mais ne l'est plus pour délivrer des impulsions ultracourtes. Cette limitation s'explique par les forts effets capacitifs liés à la configuration électrode/diélectrique/électrode, le tout étant en contact. Pour limiter les effets capacitifs et donc permettre la transmission d'impulsions ultracourtes, les électrodes doivent être isolées (séparées) du milieu exposé ; l'applicateur doit être « sans contact ». À notre connaissance, aucun résultat biologique n'a jamais été publié avec un applicateur sans contact délivrant des impulsions ultracourtes.

Dans l'état de l'art qui suit, nous commençons par présenter les applicateurs avec contact publiés dans la littérature. Cette partie nous permettra de mettre en évidence

que le comportement fréquentiel attendu en théorie se retrouve effectivement en pratique. Seuls les applicateurs prévus pour des études *in vitro* seront présentés. Un aperçu des applicateurs utilisés pour les expositions *in vivo* est donné en Annexe A. Nous poursuivrons ensuite avec un applicateur sans contact qui a été envisagé récemment. Toutefois, nous verrons qu'en raison de ses limites (en termes d'intensité induite dans la cible), il ne permet pas d'appliquer des impulsions ultracourtes potentiellement capables d'induire des effets biologiques. Ainsi, nous proposerons un nouvel applicateur sans contact, dont le développement et l'étude expérimentale feront l'objet de la dernière partie du chapitre.

2.3.2 Les applicateurs avec contact électrodes/échantillon

Dans cette section dédiée aux applicateurs avec contact, nous distinguons les applicateurs destinés à exposer un grand nombre de cellules de ceux développés pour exposer un petit nombre de cellules.

2.3.2.1 Applicateurs pour exposer un grand nombre de cellules

La cuvette d'électroporation

Principe. La cuvette d'électroporation est historiquement l'applicateur d'impulsions courtes le plus populaire. Il est disponible commercialement et par ailleurs bien connu des biologistes pour l'électroporation des cellules avec des impulsions électriques longues. Les cuvettes d'électroporation sont stériles à la réception et prévues pour un usage unique. Un modèle de cuvette d'électroporation (ou plus simplement « cuvette ») utilisé à XLIM est montré Figure 2.18a. Il s'agit d'un tube en plastique de section carrée, intégrant deux électrodes métalliques planaires. Suivant la distance séparant les électrodes (4, 2 ou 1 mm selon le modèle), la cuvette permet d'exposer des volumes de cellules en suspension de 800, 400 ou 100 microlitres (μl).

Un champ électrique pulsé est obtenu dans le volume inter-électrodes en connectant une électrode au potentiel de référence (la masse) et l'autre à la sortie du générateur impulsionnel (voir la Figure 2.18b pour un exemple de connectique). Le champ électrique généré est perpendiculaire aux électrodes et spatialement uniforme dans l'échantillon, pour des impulsions de tension incidentes de durée nanoseconde (voir le schéma de la Figure 2.18c) [158].

Caractéristique fréquentielle. En pratique, Kenaan et co-auteurs ont montré que le niveau de puissance réfléchi en entrée des cuvettes d'électroporation avec une distance inter-électrodes de 4 mm est acceptable (< -10 dB) sur la bande 0–70 MHz, à condition que $\sigma = 0.31$ S/m [158]. La Figure 2.19 montre la superposition de la partie réelle et imaginaire de l'impédance de la cuvette obtenue de manière analytique et expérimentale. Le fait d'imposer $\sigma = 0.31$ S/m leur a permis d'obtenir une impédance de 50 Ω aux

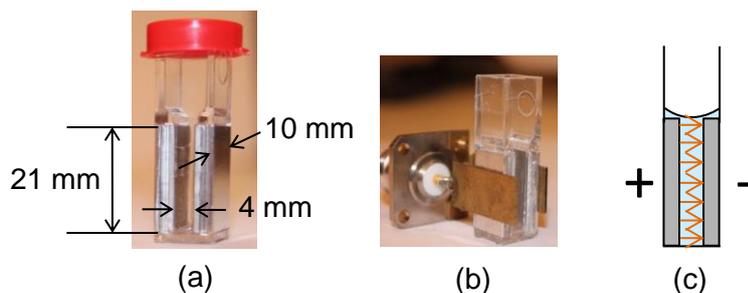


Figure 2.18 – (a) Une cuvette d'électroporation de largeur de distance inter-électrodes de 4 mm (Sigma-Aldrich[®] electroploration cuvette, Sigma-Aldrich Co. LLC., MO, USA). (b) Système d'électrodes pour connecter la cuvette à un générateur d'impulsions de sortie coaxiale (connecteur coaxial de type N). (c) Schématisation des lignes de champ électrique dans le volume exposé.

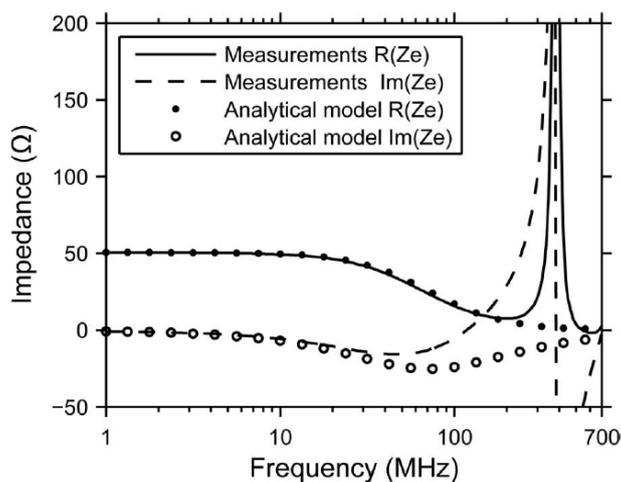


Figure 2.19 – Impédance équivalente, en fonction de la fréquence, de la cuvette d'électroporation de distance inter-électrodes de 4 mm. Résultats analytiques et numériques pour un volume exposé de conductivité électrique $\sigma = 0.31$ S/m et de permittivité $\epsilon \approx 80 \times \epsilon_0$. D'après [158].

basses fréquences (BF). Imposer une conductivité électrique aussi faible n'est cependant pas idéal pour la biologie. En effet, les milieux de culture propices à la bonne santé des cellules ont une conductivité électrique typiquement autour de 1.5 S/m en BF.

Capacité à délivrer des impulsions ultracourtes. Kenaan et co-auteurs ont également étudié la réponse de l'applicateur dans le domaine temporel. Le générateur d'impulsions employé avait une impédance de 50 Ω . Ils ont montré expérimentalement et numériquement que la cuvette d'électroporation dégrade significativement les fronts de montée des impulsions de tension de durée inférieure à 3 ns (sinon plus) [158]. Ces résultats étaient attendues étant donnée la bande passante à -10 dB de l'applicateur limitée à 70 MHz. Les fronts de montée représentant la partie haute fréquence des impulsions, ils sont particulièrement sensibles à une désadaptation d'impédance à haute fréquence.

Une cuvette miniaturisée. Pour exposer des cellules en suspension à des impulsions

électriques de durée 200 ps, Xiao et co-auteurs ont fabriqué un modèle de cuvette de dimensions fortement réduites (volume exposé de 6 μl). La réduction des dimensions a permis de diminuer les effets capacitifs à haute fréquence (HF). En connectant un réseau d'impédance réelle en parallèle à la cuvette, ils ont pu transmettre des impulsions électriques de temps de montée aussi courts que 70 ps [112].

Biocompatibilité des matériaux. Fabriquer ses propres cuvettes présente un autre intérêt : la possibilité de choisir le matériau des électrodes. Les électrodes étant en contact direct avec la suspension de cellules à exposer, le matériau doit être biocompatible, inerte et résistant à la corrosion. Des auteurs ont montré que l'application d'un potentiel électrique peut corroder les électrodes et causer le relargage d'ions métalliques. Ces ions métalliques peuvent engendrer des effets biologiques tels que la mort cellulaire pour les ions cuivre [159] ou l'inhibition de la division cellulaire via la formation de complexes chimiques pour les électrodes en platine [160].

Les électrodes d'un certain nombre de cuvettes d'électroporation commerciales sont en aluminium. Des études ont montré que des d'ions Al^{3+} peuvent apparaître dans le milieu exposé lorsque d'intenses impulsions électriques longues de forme monopolaire sont appliquées [132]. La présence d'ions aluminium dans la suspension n'est pas anodine puisqu'elle peut provoquer des effets biologiques similaires à ceux engendrés par un champ électrique pulsé [132]. Sans étude préliminaire sur la rigidité des électrodes, les résultats obtenus sont donc sujets à controverse.

Kotnik et co-auteurs ont montré qu'appliquer des impulsions électriques de forme bipolaire permet de réduire la concentration d'ions Al^{3+} détachés dans la suspension de cellules [161]. Pour assurer la fiabilité des résultats et leur reproductibilité, l'utilisation d'un métal à forte résistance mécanique reste cependant la règle.

Pour des expérimentations avec des impulsions électriques de 10 ns, Kolb et co-auteurs ont fabriqué une cuvette avec des électrodes en acier inoxydable (voir Figure 2.20) [162]. Ce matériau, au même titre que le tungstène, est couramment utilisé pour la fabrication de microélectrodes d'enregistrement et/ou de stimulation électrique de matériaux vivants [163]. En comparant les effets biologiques obtenus dans cette cuvette avec

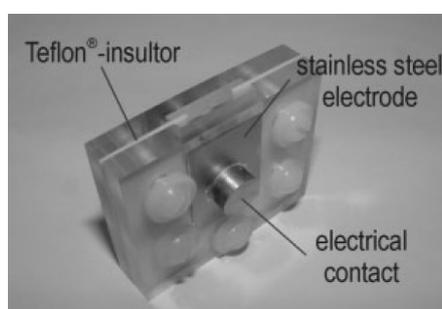


Figure 2.20 – Cuvette d'électroporation personnalisée avec électrodes en acier inoxydable. D'après [162].

ceux obtenus dans la cuvette d'électroporation commerciale, les auteurs ont observé une diminution notable de l'intensité des effets biologiques dans la cuvette « maison ». De plus, ils ont constaté que la résistance équivalente de la cuvette d'électroporation commerciale remplie d'eau distillée diminue progressivement au cours du temps, même lorsque la cuvette n'est pas soumise à une impulsion électrique. Dans les mêmes conditions, la résistance de la cuvette personnalisée était quant à elle demeurée constante.

Même optimisé, le principe des cuvettes d'électroporation reste un obstacle à l'observation microscopique des cellules en temps réel. Du fait du relatif grand volume exposé et du mouvement incessant des cellules en suspension, l'observation individuelle des cellules pendant l'exposition est rendue difficile.

Un système à aiguilles

Chen et co-auteurs ont développé et comparé les trois applicateurs schématisés Figure 2.21a. Les trois applicateurs sont basés sur une ligne coaxiale coupée à une extrémité. Pour les systèmes -2- et -3-, une aiguille prolonge le conducteur central de la ligne coaxiale, et pour le système -3- quatre aiguilles prolongent également le conducteur extérieur de la ligne. Le diamètre des aiguilles s'élève à 0.2 mm et leur longueur à 5 mm ; les conducteurs intérieur et extérieur sont séparés de 1.7 mm.

Pour un même potentiel appliqué, ils ont montré par des simulations que le champ électrique maximum généré est le plus intense pour le système sans aiguille (c'est-à-dire la configuration -1- de la Figure 2.21a). En revanche, le champ électrique généré par le système à cinq aiguilles (configuration -3- de la Figure 2.21a) a l'avantage d'être plus homogène dans le volume exposé.

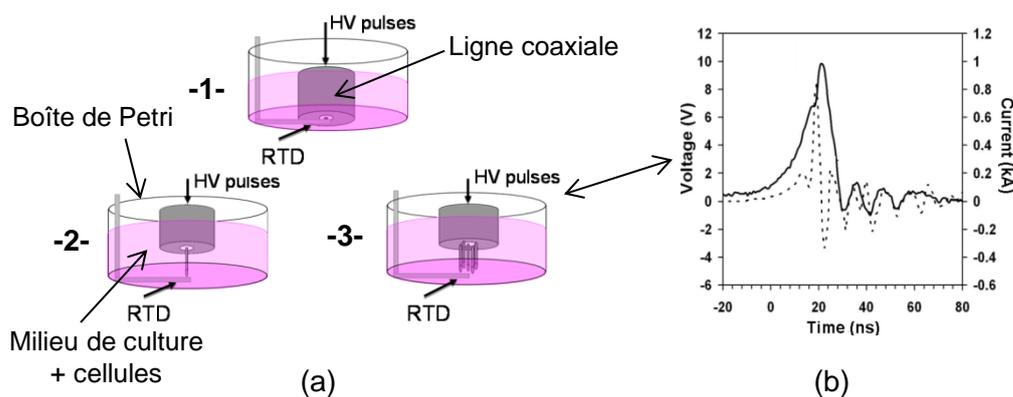


Figure 2.21 – (a) -1- Applicateur coaxial sans aiguille, -2- applicateur coaxial à une aiguille et -3- applicateur coaxial à cinq aiguilles. « RTD » (Resistance temperature detector) désigne une sonde de température. (b) Impulsions de tension (trait continu) et de courant (trait discontinu) délivrées par l'applicateur coaxial à cinq aiguilles à la boîte de Petri. La durée de l'impulsion de tension est de 15 ns. D'après [164].

Les applicateurs ont été testés expérimentalement pour délivrer des impulsions de 15 ns à un milieu de culture contenant des cellules dans une boîte de Petri (comme sur la Figure 2.21a). Un exemple des impulsions de tension et de courant qui ont été délivrées par le système à cinq aiguilles est montré Figure 2.21b.

Les auteurs ont également réalisé des mesures de température dans le milieu de culture, lorsque celui-ci était exposé à des impulsions de tension de durée 15 ns, d'intensité 10 kV et de fréquence de répétition de 50 Hz. La sonde de température était un thermomètre à résistance de platine (dit « RTD » pour Resistance Temperature Detector) d'environ 2 mm de diamètre. Les résultats ont montré que l'élévation de température était la plus forte pour le système à une aiguille et la moins marquée pour le système sans aiguille.

2.3.2.2 Applicateurs pour exposer un petit nombre de cellules : les microsystemes

Nous désignons par « microsystemes » les applicateurs dont la distance inter-électrodes et la hauteur des électrodes sont micrométriques. Ces applicateurs sont destinés à exposer un petit nombre de cellules (quelques dizaines tout au plus).

Le développement de tels dispositifs a principalement deux objectifs. L'un est la possibilité d'observer les cellules au microscope en temps réel, et l'autre la capacité de délivrer des impulsions électriques nanosecondes de forte intensité (10–100 kV/cm) tout en conservant des tensions incidentes de l'ordre du kilovolt.

Un microsysteme pour l'exposition d'une cellule

Pakhomov et co-auteurs ont mis au point un système permettant d'exposer une seule cellule et de mesurer simultanément les courants et potentiels transmembranaires [90]. Le dispositif est présenté Figure 2.22. L'application du champ électrique est réalisée grâce à deux électrodes en tungstène dont les extrémités sont placées de part et d'autre de la cellule d'intérêt. Les mesures des courants et potentiels dans la membrane sont obtenues par la méthode patch-clamp respectivement en mode voltage-clamp et current-clamp. Les électrodes et la micropipette de verre sont positionnées sous microscope grâce à des micromanipulateurs. Le diamètre des électrodes est de 125 μm et la distance inter-électrodes de 310 μm . La forme temporelle des impulsions de tension appliquées (incidente et réfléchie) est montrée Figure 2.22c. L'impulsion de tension incidente était monopolaire et de durée 60 ns.

Un système filaire

Pour exposer un plus grand nombre de cellules, Wu et co-auteurs ont développé un applicateur composé de deux électrodes filaires en tungstène plaqué or de diamètre 100 μm et connectées en entrée par une résistance de 50 Ω [165]. Comme représenté

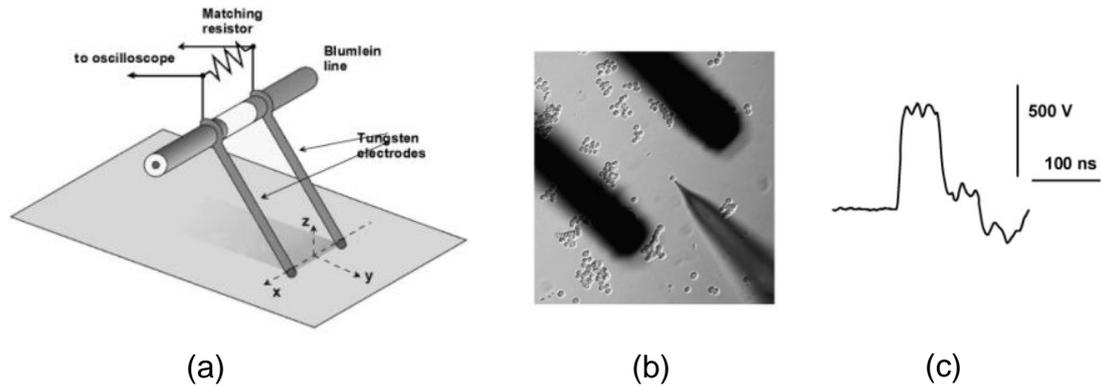


Figure 2.22 – Microsystème pour l'exposition d'une cellule. (a) Schéma du système (échelles non respectées). (b) Image microscopique en contraste de phase du positionnement des électrodes et de la micropipette par rapport à la cellule d'intérêt. (c) Impulsion de tension délivrée. D'après [90].

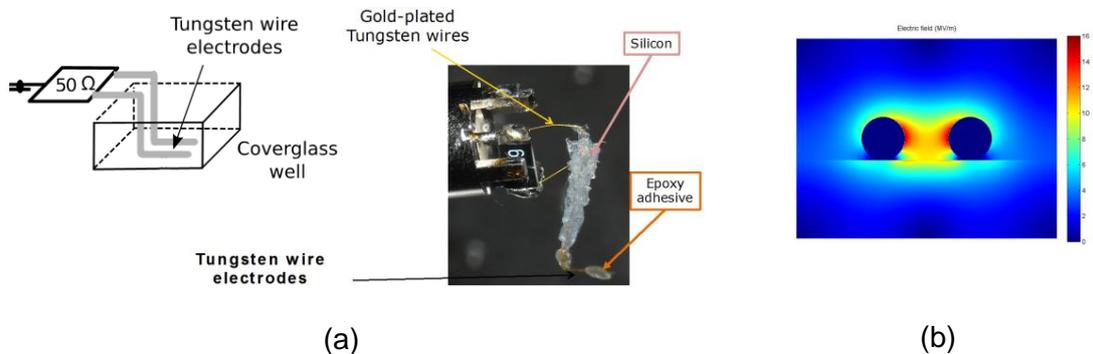


Figure 2.23 – Microsystème filaire avec électrodes parallèles. (a) Schéma et photographie du système. (b) Modélisation électrostatique de la répartition 2D du champ électrique entre les électrodes posées sur une lamelle couvre-objet. D'après [165].

Figure 2.23a, les électrodes sont posées à plat au fond de la boîte en plastique contenant l'échantillon. Le maintien du parallélisme ainsi que de la distance entre les électrodes (200 μm centre-à-centre) sont assurés par un film de résine époxyde (ou « résine époxy ») recouvrant les extrémités des électrodes. La longueur de la zone exposée est de 3 mm. Par des simulations numériques en 2D, les auteurs ont montré l'homogénéité du champ électrique sur une largeur d'environ 80 μm à mi-hauteur des électrodes (voir la Figure 2.23b). Les mesures expérimentales ont montré une bonne adaptation du système jusqu'à 300 MHz.

Les microchambres

Des exemples de microchambres sont montrés Figure 2.24. Les microchambres consistent en une lame de microscope sur laquelle sont fixées des électrodes planaires de dizaines de micromètres d'épaisseur et séparées de 100 μm environ à quelques centaines de micromètres. Les cellules baignant dans leur milieu de culture sont injectées dans le

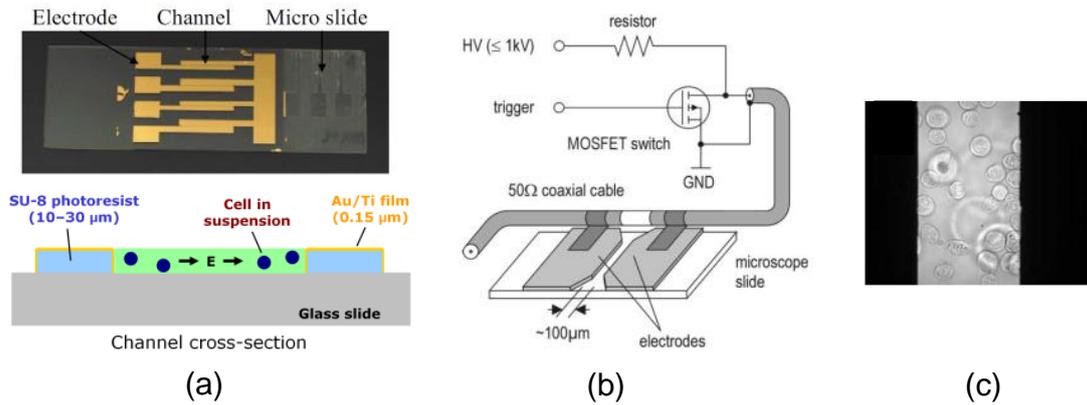


Figure 2.24 – Exemples de microchambres sur lame de microscope (75 mm × 25 mm). (a) Microchambre fabriquée par photolithographie. D’après [166]. (b) Microchambre à électrodes en acier inoxydable et générateur associé. D’après [116]. (c) Observation microscopique en contraste de phase des cellules dans un canal. Les surfaces noires correspondent aux électrodes. D’après [139].

canal formé par les électrodes. Au vu du volume du canal, le système permet d’exposer quelques dizaines de cellules. Si la surface des électrodes est lisse, les résultats numériques montrent que le champ électrique est distribué de manière homogène dans le canal.

Les matériaux utilisés pour fabriquer ou recouvrir les électrodes sont majoritairement l’or [79, 139, 166] et plus rarement l’acier inoxydable [116]. Les électrodes plaquées or sont réalisées par photolithographie (voir la Figure 2.24a). Dans [167], Frey et co-auteurs ont collé à la lame de microscope leurs électrodes en acier inoxydable grâce à une couche intermédiaire d’époxy de hauteur inférieure à une dizaine de micromètres. Dans tous les cas, les dispositifs doivent être rincés, nettoyés et stérilisés entre chaque exposition.

Dans [79], les auteurs ont fabriqué une microchambre dont l’impédance équivalente est très supérieure à 50 Ω en BF. En connectant une impédance de 50 Ω en parallèle à l’entrée de la microchambre, l’ensemble présentait ainsi une impédance équivalente s’approchant de 50 Ω en BF. L’avantage de cette configuration est une plus grande flexibilité sur la conductivité électrique du milieu pouvant être exposé de manière optimale. En expérimentation, la bande passante à -10 dB de leur système était d’environ 100 MHz, soit le premier zéro du spectre d’une impulsion rectangulaire de durée 10 ns.

Les systèmes microfluidiques

Dalmay et co-auteurs ont développé des applicateurs microfluidiques, c’est-à-dire des applicateurs qui permettent de faire circuler les cellules à l’intérieur du canal [168, 169]. Ces applicateurs, dont un exemple est montré Figure 2.25a, sont fabriqués sur un substrat transparent de quartz. Les électrodes sont en or. La distance inter-électrodes mesurée était de 130 μm, la hauteur du canal de 47 μm et sa longueur de 33 mm. La bande passante du système déterminée expérimentalement s’élevait à 110 MHz.

Les auteurs ont testé la capacité de l’applicateur à délivrer des impulsions de durée 2.4 ns et de temps de montée 1.4 ns. Les résultats des mesures de tension sont montrés

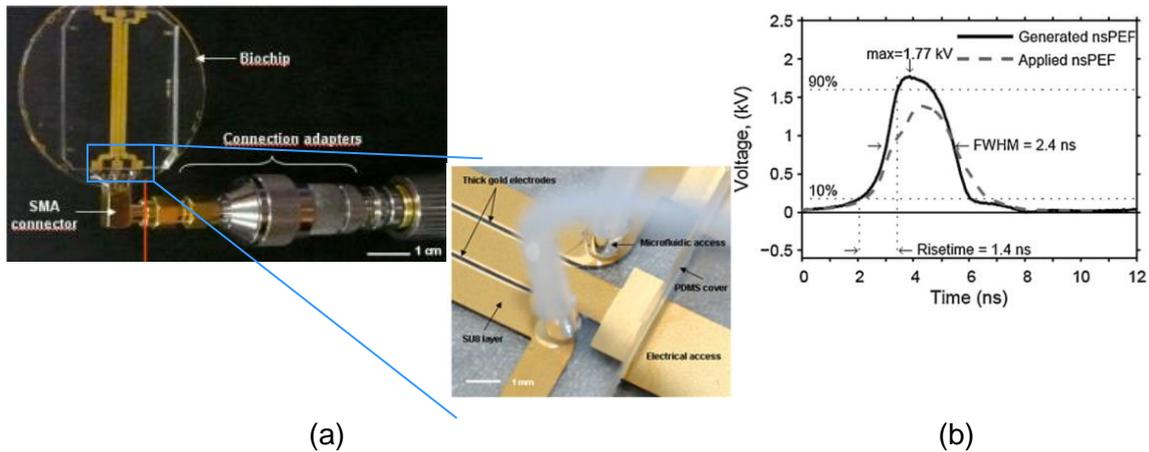


Figure 2.25 – (a) Système microfluidique dit « biochip » et sa connectique. (b) Impulsions de tension incidente et transmise par le système (la durée de l'impulsion incidente était de 2.4 ns). D'après [168, 169].

Figure 2.25b. La limitation de la bande passante du système induit une atténuation de l'impulsion ainsi qu'une dégradation des fronts de montée.

Les principaux types d'applicateurs avec contact étant présentés et leurs limites en fréquence confirmées, nous nous tournons à présent vers les systèmes sans contact, *a priori* davantage adaptés à l'application d'impulsions ultracourtes.

2.3.3 Les applicateurs sans contact électrodes/échantillon

Dans cette section, nous évoquerons deux applicateurs potentiels sans contact : un applicateur rayonnant et un applicateur propagatif (c'est-à-dire pour la propagation guidée des ondes).

2.3.3.1 Vers un applicateur rayonnant : l'antenne ultra-large bande

Une antenne en tant qu'émetteur sert à transmettre un signal électrique d'une source vers l'espace libre. L'antenne peut être associée à la source primaire d'énergie par une ligne de transmission. Il existe une multitude de topologies selon les caractéristiques désirées de l'antenne telles que la ou les fréquences d'utilisation, les contraintes géométriques ou encore la répartition spatiale du rayonnement (par exemple une ou plusieurs directions d'émission du rayonnement) [170]. L'antenne ultra-large bande (ULB) est un cas particulier d'antenne, capable d'émettre des signaux électriques impulsionnelles. Cependant, une antenne ne peut pas émettre fidèlement une impulsion électrique ayant un fort contenu basse fréquence car celui-ci n'est pas rayonné (voir Section 1.1.1). Une antenne ne peut donc pas servir à la transmission d'impulsions électriques de forme rectangulaire, car les variations temporelles très lentes (le plateau de l'impulsion) représentent le contenu basse fréquence de l'impulsion.

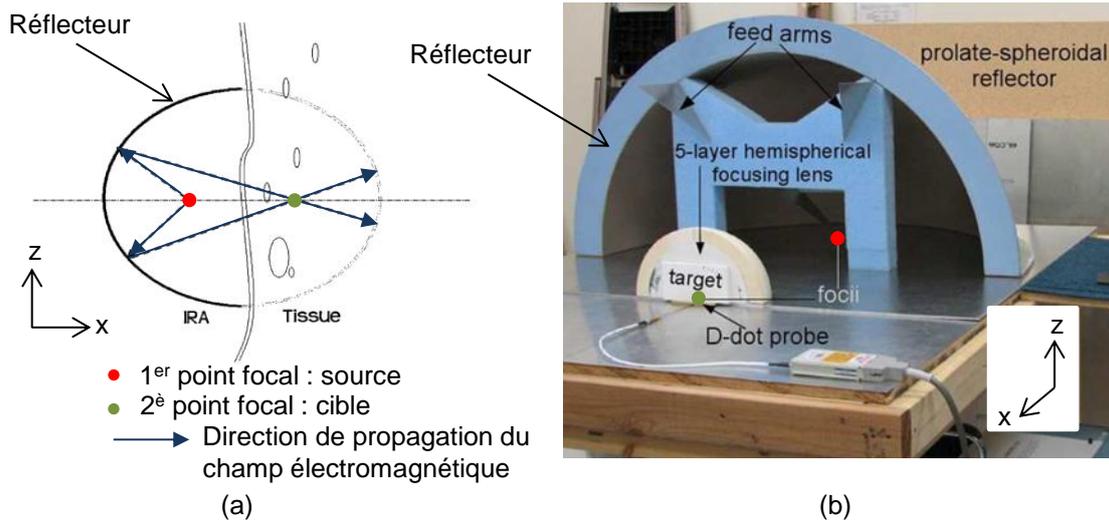


Figure 2.26 – Antenne IRA à réflecteur. Principe de fonctionnement (a), antenne, lentille et cible dans le montage expérimental (b). Adaptée de [176].

Les impulsions émises par toute antenne subissent une différenciation temporelle, c'est-à-dire que les impulsions rayonnées ont la forme de la dérivée temporelle des impulsions alimentant l'antenne [171–173]. La possibilité d'utiliser des applicateurs rayonnants survient donc seulement lorsque la durée des impulsions souhaitées est réduite dans le domaine subnanoseconde.

Pour nos applications, Altunc et co-auteurs ont proposé l'utilisation d'une antenne IRA (Impulse-Radiating Antenna) [174]. En particulier, ils ont développé une antenne IRA à réflecteur dont la forme est sphéroïdale allongée [175]. Ces antennes sont désignées par l'acronyme « psIRA » pour prolate-spheroidal IRA. La géométrie de ces antennes assure une forte directivité de l'antenne et donc la capacité de cibler le champ électrique rayonné sur une cible de taille réduite. Le principe de fonctionnement de l'antenne est schématisé Figure 2.26a. Une onde sphérique est rayonnée à partir du premier point focal de l'antenne puis réfléchi et focalisée par le réflecteur sur le deuxième point focal où se trouve la cible. Dans l'antenne conçue, l'onde sphérique est émise par deux lignes de transmission de forme conique. L'antenne étant posée sur un plan métallique, elle est virtuellement alimentée par deux fois deux « bras », d'où le nom anglais « four feed-arm psIRA » [176].

La forme temporelle des impulsions émises par cette antenne se décompose en 3 parties : la pré-impulsion, l'impulsion et la post-impulsion (arrivant à la cible dans cet ordre). La pré-impulsion est générée par l'énergie directement émise par la source vers la cible tandis que la post-impulsion résulte principalement des effets de diffraction. Les pré- et post-impulsions sont d'intensité très réduite comparée à celle de l'impulsion principale.

L'antenne a été testée pour délivrer des impulsions de 100 ps à une cible de permittivité relative $\epsilon_r = 81$ (similaire à la permittivité relative de l'eau) [176]. Le dispositif expérimental est montré Figure 2.26b. La permittivité relative de l'air étant

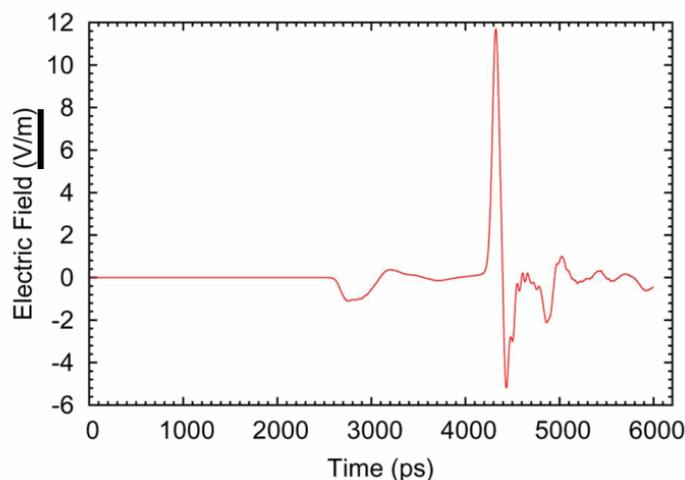


Figure 2.27 – Champ électrique émis par l’antenne IRA à réflecteur au second point focal. À noter que l’échelle des intensités est en V/m. D’après [176].

égale à 1, il est nécessaire d’ajouter un réseau d’adaptation en amont de la cible pour minimiser les réflexions à l’interface air/cible. Pour ce faire, les auteurs ont placé devant une lentille de focalisation à gradient de permittivité diélectrique. Les résultats ont montré que l’impulsion reste fortement atténuée dans la cible (voir Figure 2.27). Les auteurs ont également constaté que la lentille filtre les composantes fréquentielles supérieures à 5 GHz.

Finalement, la forte atténuation des impulsions incidentes combinée à une fréquence de répétition citée comme limitée en raison des commutateurs employés, fait que le système doit être optimisé pour espérer induire des effets biologiques dans un milieu vivant [176]. Un tel système serait particulièrement attractif pour les biologistes et médecins car il permettrait d’exposer à distance un tissu voire un organisme.

Les systèmes rayonnants ne sont pas les seuls applicateurs potentiels d’impulsions électriques subnanosecondes. Par exemple, nous avons envisagé, au cours de cette thèse, d’utiliser une cellule transverse électromagnétique (cellule TEM) qui est un cas particulier de ligne de transmission. Ce choix a été motivé par l’existence d’un tel système dans l’équipe. Le système avait été dimensionné et conçu pour délivrer des champs électromagnétiques de type téléphonie mobile à des cibles de taille centimétrique. La question de sa capacité à transmettre d’intenses champs électriques pulsés de durée nanoseconde et subnanoseconde s’est alors posée.

Dans le paragraphe à suivre, nous donnons les principes de fonctionnement de base de la cellule TEM. L’étude expérimentale de sa capacité à transmettre des impulsions ultracourtes sera présentée dans une partie séparée, qui viendra immédiatement après la présentation introductive.

2.3.3.2 Vers un applicateur propagatif : introduction à la cellule TEM

Principe de fonctionnement. La cellule TEM est une ligne de transmission de section rectangulaire introduite pour la première fois en 1973 par Myron L. Crawford (salarié du NIST - National Institute of Standards and Technology) [177]. Le développement de cet outil a été motivé par le manque de systèmes capables de délivrer des champs électromagnétiques spatialement uniformes dans un espace blindé. Les objectifs étaient quadruples, à savoir [177] :

- maximiser la section transversale de l'outil,
- maximiser sa fréquence maximale d'utilisation,
- minimiser les désadaptations d'impédance et les ondes stationnaires,
- maximiser l'uniformité du champ électromagnétique délivré.

Une cellule TEM fermée (resp. ouverte) est schématisée Figure 2.28a (resp. Figure 2.28b). Les cellules TEM sont composées d'une partie centrale de forme parallélépipédique se prolongeant de part et d'autre en deux sections pyramidales. Ces sections de transition permettent la connexion de la cellule TEM à d'autres dispositifs électroniques via des connecteurs coaxiaux standard. Toutes les parois sont métalliques. Les parois extérieures sont connectées au potentiel de référence (la masse) tandis que la plaque centrale, appelée le septum, est connectée à l'excitation en entrée et à une charge adaptée en sortie. La largeur du septum est inférieure à celle des parois inférieure et supérieure.

En appliquant une tension à l'entrée, un champ électrique est généré perpendiculairement aux parois (voir Figure 2.29). Le champ électrique est confiné à l'intérieur de la cellule TEM et sous certaines conditions de géométrie, il est homogène dans une large partie de la section centrale dite zone de test. C'est dans la zone de test que les échantillons à exposer doivent être positionnés. La cellule TEM conçue par Crawford était fermée; une fenêtre dans la paroi latérale donnait accès à la zone de test. Les modèles ouverts ont d'une part l'avantage de simplifier les manipulations et d'autre

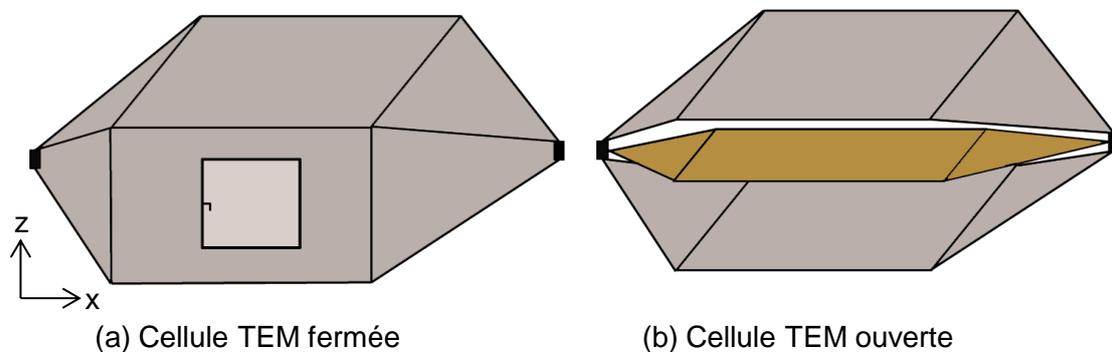


Figure 2.28 – Schéma d'une cellule TEM fermée avec fenêtre d'accès (a) et d'une cellule TEM ouverte (b). Toutes les parois sont métalliques.

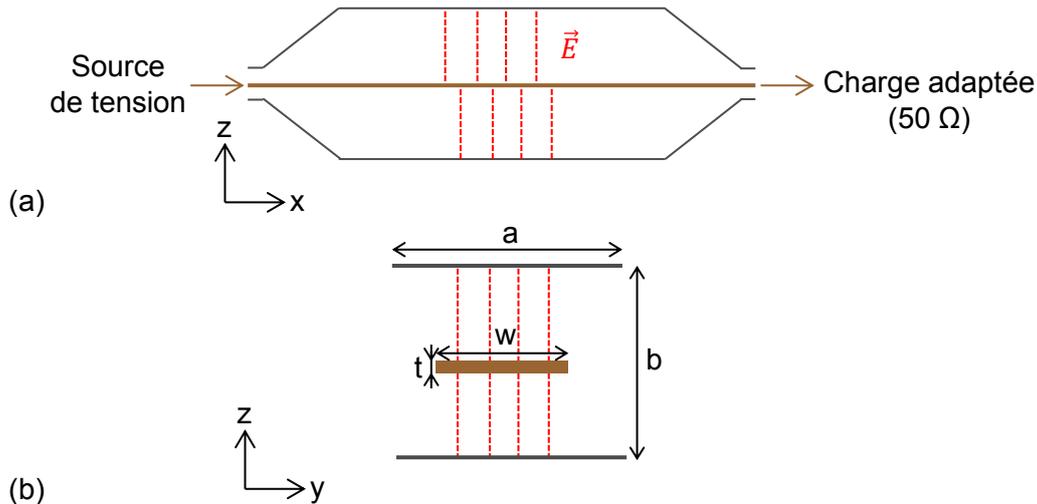


Figure 2.29 – Coupes longitudinale (a) et transversale (b) de la cellule TEM. Pour une géométrie judicieusement choisie, le champ électrique généré est perpendiculaire aux parois. Il pointe vers le septum si le potentiel électrique de celui-ci est négatif et dans le sens inverse s’il est positif.

part leur zone de test est élargie par rapport à celle du modèle équivalent fermé [178]. Pour des expérimentations biologiques, les ouvertures latérales garantissent également une meilleure thermorégulation à l’intérieur du système.

Une bonne uniformité du champ électrique est garantie dans la zone de test lorsque seul le mode de propagation TEM existe. Ce mode de propagation correspond à un champ électrique dirigé suivant \vec{z} et un champ magnétique dirigé suivant \vec{y} (\vec{z} et \vec{y} étant définis sur la Figure 2.29). La possible présence d’un ou de plusieurs autres modes de propagation dépend de la fréquence d’utilisation et des dimensions de la section de la cellule TEM. On montre que la fréquence à partir de laquelle d’autres modes de propagation peuvent se propager, diminue lorsque la largeur de la cellule TEM augmente. Ceci implique que la fréquence maximum d’utilisation optimale de la cellule TEM diminue avec l’élargissement de la cellule. Ainsi, la taille maximale de la zone de test diminue avec la fréquence, réduisant par là même la taille des cibles pouvant être exposées [177,179,180].

Cellule GTEM. Une variante de la cellule TEM, appelée cellule GTEM (Gigahertz Transverse ElectroMagnetic), a été mise au point pour délivrer des champs électromagnétiques de fréquence gigahertz à des cibles de plusieurs dizaines de centimètres. Un exemple de cellule GTEM est représenté Figure 2.30. La forme pyramidale de la cellule GTEM permet de s’affranchir de l’excitation de modes supérieurs liée à la présence de coudes dans la structure. Dans la cellule TEM, ces coudes se trouvent entre les zones de transition et la zone centrale. À la différence de la cellule TEM qui dispose de deux ports de connexion, la cellule GTEM n’a qu’un port en entrée. Pour limiter les réflexions au fond de la cellule GTEM, le septum est connecté à la base pyramidale par un réseau de charges adapté à 50 Ω . La base pyramidale est également tapissée d’un matériau absorbant

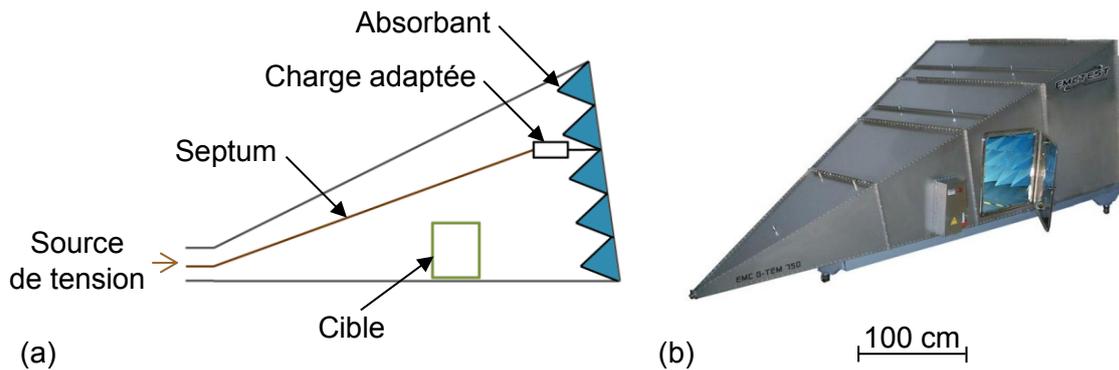


Figure 2.30 – Cellule GTEM. (a) Schéma d'une coupe longitudinale. (b) Photographie d'un modèle commercial³ (EMC GTEM-750, EMCTEST Technologies, Italie). Fréquences d'utilisation : 0.1 MHz-6 GHz, dimensions extérieures (l×L×H) : 400 cm × 200 cm × 150 cm, taille maximale de l'objet sous test (l×L×H) : 60 cm × 60 cm × 50 cm.

à large bande. Ces absorbants se présentent typiquement sous la forme de mousses à relief pyramidal similaires à celles des chambres anéchoïques. L'échantillon à exposer est toujours positionné dans la partie inférieure de la cellule GTEM tandis que dans la cellule TEM, il peut être placé aussi bien au-dessus qu'en dessous du septum.

Pour nos études, l'utilisation de la cellule GTEM en tant qu'applicateur d'impulsions électriques ultracourtes a été écartée pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la cellule GTEM a déjà été étudiée pour délivrer des impulsions électriques de durée nanoseconde à des cibles biologiques. Les résultats ont montré que les impulsions incidentes sont fidèlement transmises à l'entrée du système, mais la base pyramidale n'étant jamais strictement adaptée pour toutes les fréquences, des réflexions multiples apparaissent [181]. L'énergie réfléchie contribue à l'établissement de modes de propagation d'ordre supérieur qui résonnent dans la cellule GTEM. Ces modes se propageant à des vitesses différentes, des oscillations apparaissent dans le signal en plus des réflexions [181]. Par ailleurs, des simulations numériques ont montré la forte inhomogénéité du champ électrique à l'intérieur des échantillons lorsqu'ils sont exposés dans des flasques [182] ou des cuvettes en plastique [183, 184]. À cela s'ajoute que les cellules GTEM sont très encombrantes et inadaptées pour une observation microscopique des échantillons en temps réel.

Applications standard de la cellule TEM. La cellule TEM a été pensée et reste aujourd'hui principalement utilisée pour les tests de compatibilité électromagnétique des circuits intégrés (tests d'émission et de susceptibilité). Les tests d'émission contrôlent que le circuit intégré n'émet pas de signaux électromagnétiques à même de perturber les dispositifs électroniques environnants, tandis que les tests de susceptibilité vérifient l'immunité du circuit face aux perturbations électromagnétiques extérieures. La Commission Électrotechnique Internationale (CEI ou IEC en anglais) a publié des normes pour les tests d'émission et de susceptibilité électromagnétique des circuits intégrés entre

3. http://www.emctest.it/it/prodotti/emc/gtem/gtem_750/

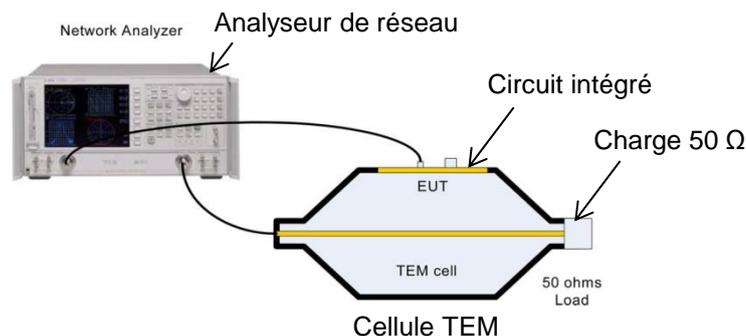


Figure 2.31 – Dispositif expérimental pour les tests d’émission d’un circuit intégré à l’aide d’une cellule TEM. « EUT » désigne l’élément sous test. D’après [187].

150 kHz et 1 GHz (les normes IEC 61967 et IEC 62132). La norme IEC 61967-2 pour les tests d’émission exige l’utilisation d’une cellule transverse électromagnétique [185]. Le dispositif expérimental pour les mesures est montré Figure 2.31. Le circuit intégré sous test est enfiché dans un circuit imprimé lui-même intégré dans la paroi supérieure de la cellule TEM. Les composants du circuit sont face au septum tandis que les câbles d’alimentation sont amenés par l’extérieur de la cellule TEM.

Les émissions électromagnétiques des circuits imprimés sont principalement attribuées à des variations du courant d’alimentation [186, 187]. Le principe du test consiste à évaluer le couplage électromagnétique entre le circuit intégré alimenté et le septum. La cellule TEM est connectée en entrée à un analyseur de spectre ou un récepteur de mesure d’interférence électromagnétique et en sortie à une charge adaptée [179]. La mesure donne accès à l’intensité de la somme du champ électrique émis orthogonal au septum et du champ magnétique émis transverse au septum [188]. Pour les mesures de susceptibilité, la cellule TEM est utilisée pour délivrer les signaux électromagnétiques requis. Elle est pour cela connectée à un générateur de signaux en entrée. L’état de fonctionnement du circuit intégré est analysé grâce à des instruments spécifiques de contrôle [189].

La cellule TEM se prête également à l’étude des effets potentiels des signaux de communication sans fil sur la santé [27]. Elle est adaptée pour des expositions *in vitro*, par exemple en y plaçant une boîte de Petri contenant des cellules [190]. Comme illustré Figure 2.32, elle peut également servir pour des expositions *in vivo*, par exemple en positionnant une souris dans la zone de test [191]. Pour ces études, la cellule TEM est connectée en entrée au générateur des signaux radiofréquences à transmettre et en sortie à une charge adaptée. Les champs électromagnétiques délivrés ont des fréquences typiquement autour de 900 MHz, 1800 MHz ou 2450 MHz.

La cellule TEM permettant de générer des champs électromagnétiques uniformes et bien définis, elle est par ailleurs employée pour la calibration des sondes de champ électrique ou de champ magnétique [192].

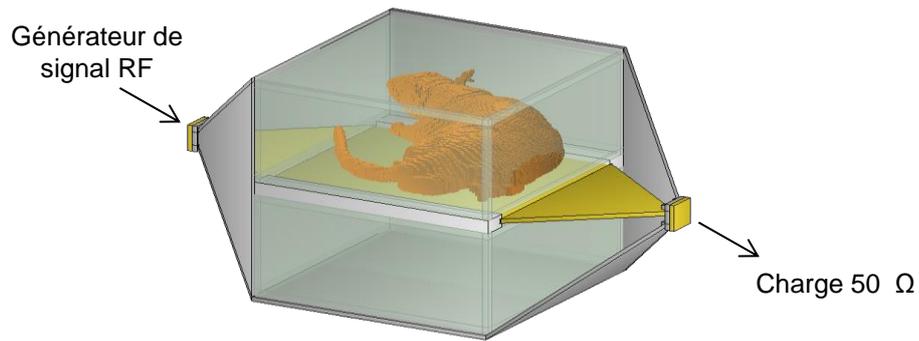


Figure 2.32 – Illustration d'un rat exposé à des champs électromagnétiques radiofréquences dans une cellule TEM. La cellule a été rendue partiellement transparente pour des raisons de clarté.

Pour résumer, l'utilisation de la cellule TEM est répandue pour délivrer des champs électromagnétiques de faible puissance et de faible largeur spectrale. Dans la partie à suivre, nous présentons l'étude que nous avons conduite dans le but d'identifier les capacités de la cellule TEM à transmettre d'intenses impulsions ultracourtes.

2.4 Étude des potentialités de la cellule TEM comme applicateur isolé d'impulsions ultracourtes

2.4.1 Géométrie de la cellule TEM étudiée

La première cellule TEM étudiée est montrée Figure 2.33. Le septum est fait de cuivre pour assurer une bonne conductivité électrique tandis que les parois extérieures sont en aluminium. Les connecteurs coaxiaux soudés en entrée et sortie sont du type SMA (SubMiniature version A, développé dans les années 1960).

Cette cellule TEM a été conçue initialement pour étudier les effets potentiels de la téléphonie mobile sur la santé. En particulier, elle a été utilisée pour examiner *in vitro* le comportement de cellules biologiques exposées à des champs électromagnétiques similaires aux signaux GSM (fréquence centrale de 900 MHz) [193]. Un modèle a de plus été accommodé en vue d'étudier l'activité physiologique de neurones exposés à des champs électromagnétiques de fréquence 1800 MHz [194]. Les puissances électriques moyennes envoyées étaient inférieures à la dizaine de watts.

La dimension entre le septum et la plaque inférieure a été fixée à 12 mm de sorte que les boîtes de Petri conventionnelles de 35 mm de diamètre logent dans cet espace. Les cellules étant exposées à l'intérieur de la boîte de Petri; elles ne sont donc jamais en contact avec les électrodes. Tout effet potentiel lié au contact direct de l'échantillon avec les parties métalliques de l'applicateur est donc écarté. La boîte de Petri est placée dans la zone de test, généralement au centre de la plaque inférieure de la cellule TEM (voir Figure 2.33a). Un trou a été percé au centre de chacune des 3 plaques. Celui de la plaque inférieure permet d'insérer l'objectif d'un microscope inversé jusqu'au fond de la boîte de Petri. Le comportement des cellules peut ainsi être suivi en temps réel. Les trous dans le septum et la plaque supérieure autorisent l'insertion d'une sonde de température dans l'échantillon, pour le contrôle de la température globale pendant l'expérimentation.

Dans ce qui suit, sont présentées les études expérimentales réalisées afin d'évaluer la capacité de la cellule TEM à transmettre des impulsions de tension de durée inférieure à 3 ns et d'amplitude supérieure au kilovolt.

2.4.2 Étude fréquentielle

L'évaluation commence par une mesure de la réponse fréquentielle de la cellule TEM en réflexion et en transmission. Connecter un générateur d'impulsions à une cellule TEM désadaptée en impédance (par exemple à cause d'une soudure défailante) risquerait d'endommager le générateur puisque toute l'énergie réfléchi par la cellule TEM serait renvoyée vers celui-ci.

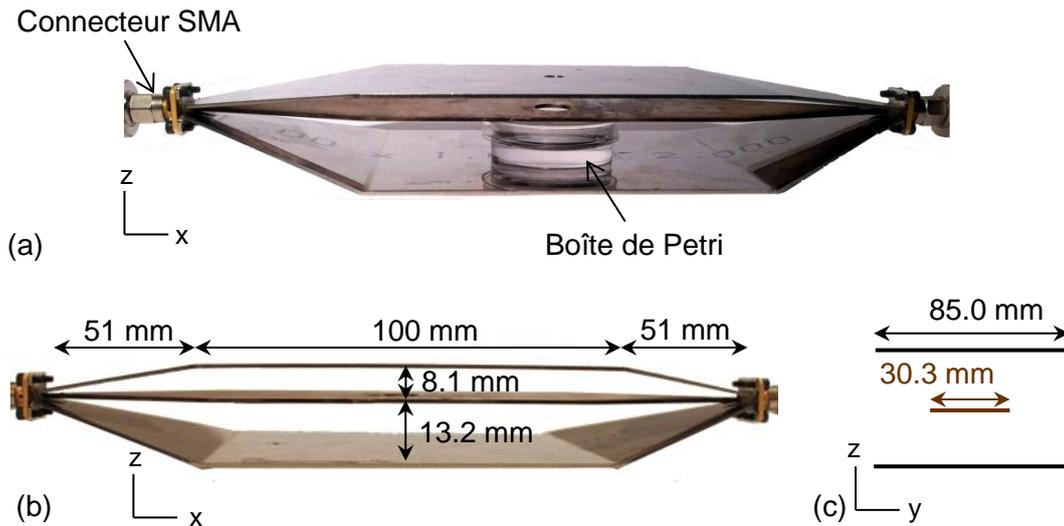


Figure 2.33 – Photographie de la grande cellule TEM. La cellule TEM contenant une boîte de Petri (a), vue longitudinale avec dimensions (b) et dimensions transversales (c).

La mesure des paramètres S_{11} et S_{21} sur la bande 30 MHz–3 GHz a été réalisée en connectant l’analyseur de réseau vectoriel (VNA 8753E, Agilent, USA) aux ports d’entrée et de sortie de la cellule TEM. La calibration de l’analyseur a été effectuée dans le plan des connecteurs SMA de la cellule TEM. Les mesures ont été conduites d’une part avec la cellule TEM vide et d’autre part avec la cellule TEM contenant une boîte de Petri remplie de 3 mL du milieu de culture cellulaire appelé « Tampon phosphate salin » (PBS en anglais). Ce milieu est une solution aqueuse contenant différents types d’ions. Pour simplifier les manipulations, le milieu était exempt de cellules. La présence de cellules ne modifierait pas les propriétés électriques macroscopiques du milieu.

La mesure de la permittivité et de la conductivité électrique du milieu de culture a été réalisée grâce à une sonde diélectrique calibrée au préalable (85070E Dielectric Probe Kit, Agilent, USA). Une photographie de la sonde est montrée Figure 2.34a. La sonde, un câble coaxial en circuit ouvert (Figure 2.34b), était plongée au centre de la solution contenue dans un tube en plastique de 50 ml. L’analyseur de réseau connecté en entrée de la sonde mesurait les paramètres S_{11} du système sur la bande de fréquences souhaitée. À partir de ces valeurs, un programme informatique fourni avec la sonde détermine les parties réelle et imaginaire de la permittivité du milieu en fonction de la fréquence. La permittivité relative de l’échantillon ainsi que sa conductivité équivalente sont ensuite calculées à partir de l’équation (1.23) grâce à un script écrit sous Matlab⁴.

Les résultats obtenus en termes de permittivité relative et de conductivité sont montrés Figure 2.35. La décroissance de la permittivité quand la fréquence augmente est liée à l’atténuation progressive de la polarisation du milieu par orientation dipolaire (revoir

4. MATLAB version 7.4.0 (R2007a), The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA

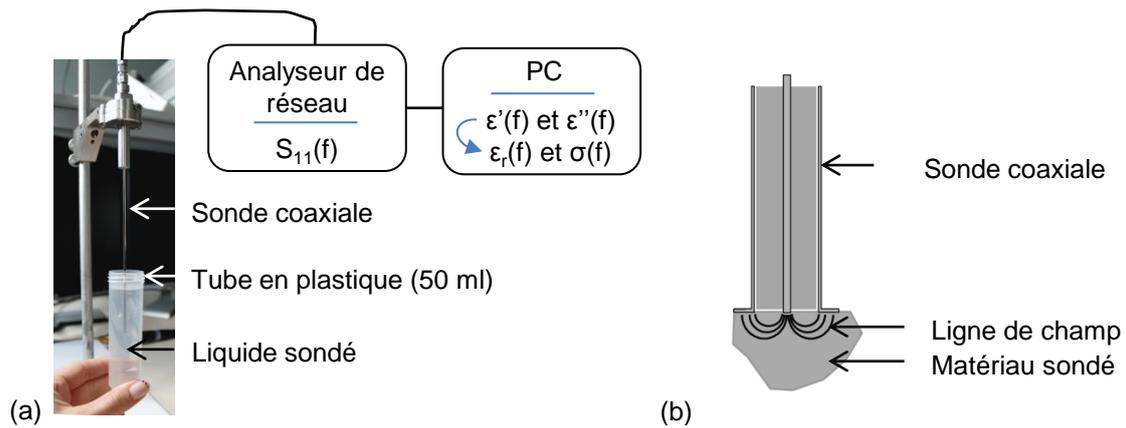


Figure 2.34 – Principe de la mesure de la permittivité et de la conductivité électrique d'une solution tampon. (a) Positionnement de la sonde dans l'échantillon liquide. (b) Coupe longitudinale de la sonde en contact avec la surface d'un matériau. D'après [11].

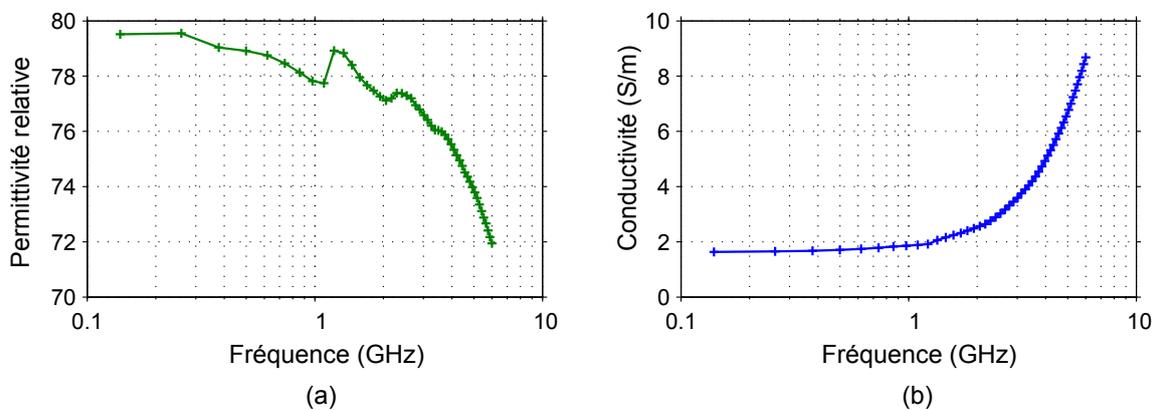


Figure 2.35 – Propriétés électriques d'une solution tampon PBS en fonction de la fréquence. Permittivité relative (a) et conductivité électrique équivalente (b).

Section 1.1.5.2). L'augmentation de la conductivité traduit quant à elle l'amplification des pertes diélectriques et des pertes par conduction. Pour une fréquence inférieure à 150 MHz environ, la permittivité relative du milieu s'élève à 79.5 tandis que sa conductivité électrique est de 1.6 S/m. Ces valeurs sont typiques des milieux de culture cellulaire.

Les résultats de mesure des paramètres S de la cellule TEM sont montrés Figure 2.36. Le module du paramètre S_{11} est inférieur à -10 dB jusqu'à 3 GHz (et possiblement encore au-delà), avec ou sans la boîte de Petri. La bande passante à -10 dB de la cellule TEM est donc au minimum d'une décade supérieure à celle de la cuvette d'électroporation et des microsystèmes dans la littérature. Une fréquence de 3 GHz correspond au premier zéro du spectre d'une impulsion rectangulaire de durée 333 ps. Les minimums locaux du paramètre S_{11} sont dus à des résonances qui apparaissent lorsque la longueur électrique de la cellule TEM est un multiple de la demi-longueur d'onde du signal incident.

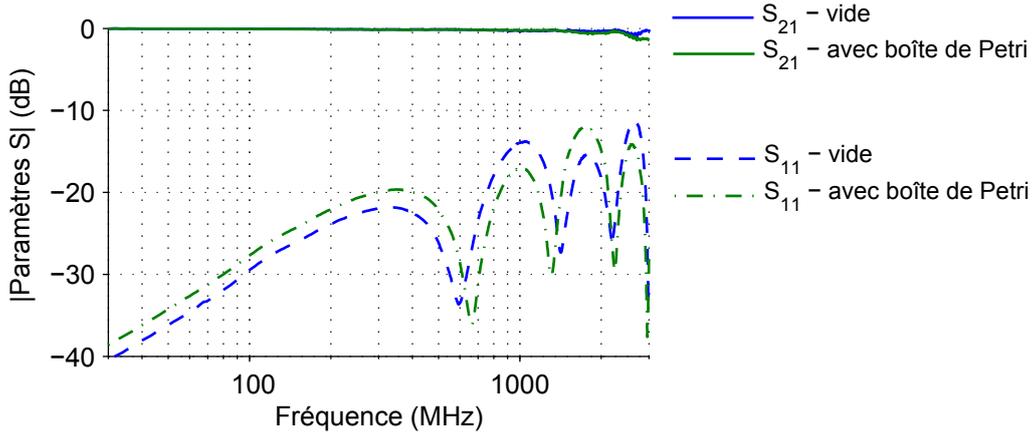


Figure 2.36 – Module des paramètres S_{11} et S_{21} de la grande cellule TEM sans et avec boîte de Petri.

À partir de S_{11} , l'impédance Z (Ω) vue dans le plan d'entrée de la cellule TEM est calculée selon :

$$Z = Z_0 \frac{1 + S_{11}}{1 - S_{11}}, \quad (2.6)$$

où Z_0 (Ω) est l'impédance du système connectée à l'entrée de la cellule TEM soit $Z_0 = 50 \Omega$. Cette équation se retrouve à partir de l'expression du coefficient de réflexion Γ . La Figure 2.37 montre les parties réelle et imaginaire de Z en fonction de la fréquence. À la fréquence $f = 30$ MHz, l'impédance Z vaut $Z = 50.1 - 1.1j$; le système est bien adapté. La présence de la boîte de Petri impacte peu l'adaptation de la cellule TEM. Ceci reste vrai pour des solutions de diverses conductivités électriques (par exemple 0, 1 ou 2 S/m). Pour évaluer l'impact des oscillations de l'impédance Z à haute fréquence, le rapport de la puissance transmise sur la puissance incidente est calculé en fonction de la fréquence à l'entrée de la cellule TEM. Les résultats montrés Figure 2.38 mettent en évidence que plus de 99 % de l'énergie incidente est transmise jusqu'à 850 MHz puis plus de 93 % jusqu'à 3 GHz. L'impact des oscillations apparaît donc limité.

L'évolution de la phase de S_{21} en fonction de la fréquence est donnée Figure 2.39. Une variation linéaire de la phase en fonction de la fréquence signifie que la structure de transmission est non dispersive. Si tel est le cas, la vitesse de groupe (vitesse de propagation de l'enveloppe de l'onde) est égale à la vitesse de phase (vitesse de propagation de chacune des fréquences). Les mesures montrent que la cellule TEM vide est non dispersive. Dans la cellule TEM contenant la boîte de Petri, la vitesse de phase diminue légèrement avec la fréquence. Ce comportement s'explique par la dispersion dans l'échantillon fortement diélectrique. Celle-ci n'est cependant pas significative.

La réponse fréquentielle de la cellule TEM étant désormais connue et validée, la réponse temporelle de la cellule TEM à des impulsions électriques ultracourtes de haute intensité est étudiée.

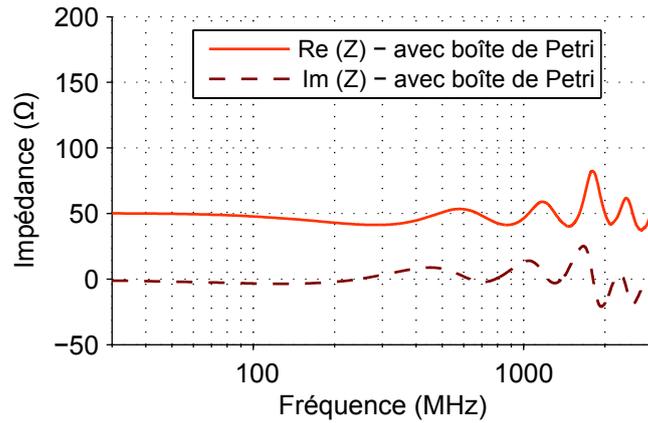


Figure 2.37 – Partie réelle et partie imaginaire de l'impédance dans le plan d'entrée de la cellule TEM connectée à l'analyseur de réseau aux deux extrémités.

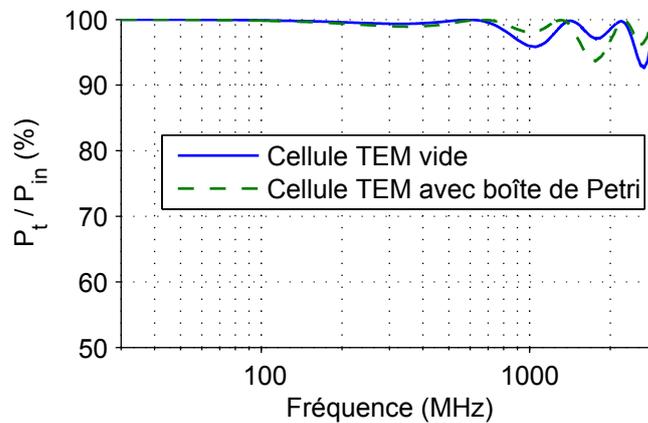


Figure 2.38 – Puissance transmise normalisée par rapport à la puissance incidente dans la cellule TEM sans et avec boîte de Petri.

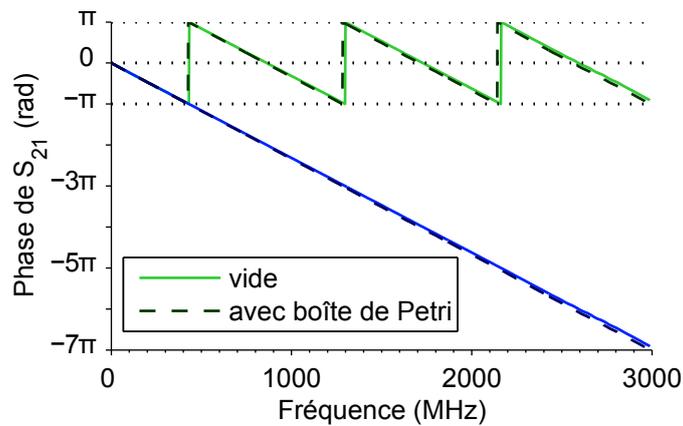


Figure 2.39 – Évolution de la phase du paramètre S_{21} en fonction de la fréquence : en vert la phase entre $-\pi$ et π radians et en bleu la phase « déroulée » (sauts de phase de π radians supprimés).

2.4.3 Étude des capacités de la cellule TEM à transmettre des impulsions électriques haute tension de durée < 3 ns

2.4.3.1 Matériel et méthodes

Le banc expérimental permettant d'étudier la capacité de la cellule TEM à transmettre des impulsions électriques ultracourtes est schématisé Figure 2.40. Les impulsions électriques étaient délivrées par un générateur d'impulsions compact de la société HORUS Laser S.A.S (Limoges, France). Ce générateur se compose de trois sous-systèmes qui sont une microsource laser, une source haute tension et une ligne de mise en forme des impulsions. Le générateur était connecté à l'entrée d'un tap-off (245-NMFFP-100, Barth Electronics Technology, USA) par l'intermédiaire de câbles coaxiaux. Le tap-off permet de mesurer en temps réel l'impulsion de tension incidente (V_i) et les impulsions de tension réfléchies (V_r) se propageant dans le banc expérimental. Une image de cette structure coaxiale est montrée Figure 2.41. La ligne coaxiale indirecte présente une impédance d'entrée de 4850Ω . Une impulsion de tension la traversant est atténuée d'un facteur d'environ 100 (soit une atténuation de 40 dB en échelle logarithmique). La ligne indirecte était connectée en sortie à l'oscilloscope numérique dont la bande passante atteint 12 GHz (Tektronix TDS 6124C, Tektronix, Inc., USA). Pour s'assurer que la tension maximale admissible à l'entrée de l'oscilloscope n'était pas dépassée, deux atténuateurs haute tension de respectivement 20 dB et 10 dB (R414.720.000, Radiall, France) ont été ajoutés en sortie du tap-off. La ligne directe du tap-off était pour sa part

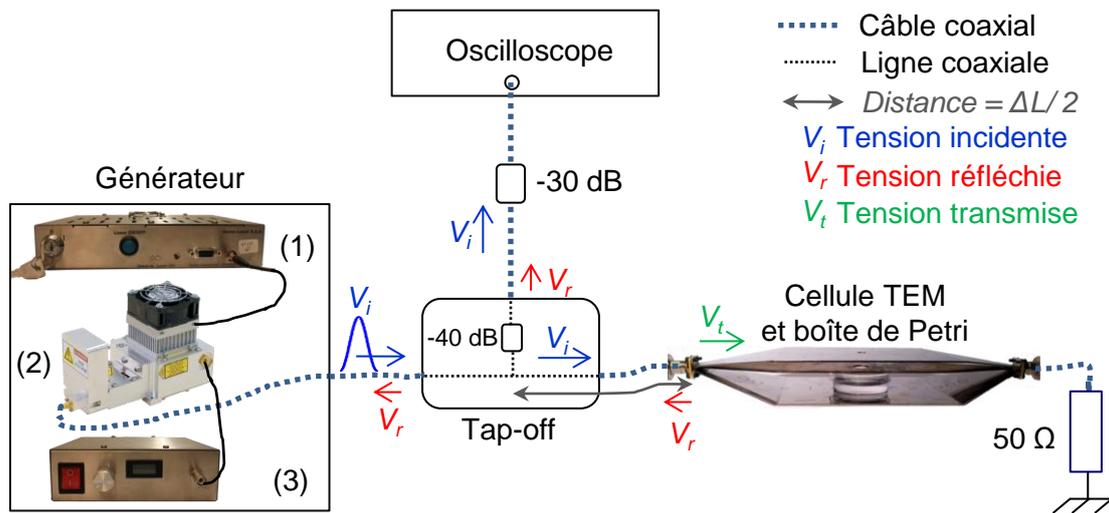


Figure 2.40 – Montage expérimental pour étudier la capacité de la cellule TEM à transmettre des impulsions électriques de durée 1–2 ns, d'amplitude 0–2 kV et de forme monopolaire ou bipolaire. Les éléments composant le générateur sont une source laser (1), un système de mise en forme des impulsions (2) et une source haute tension (3). V_i désigne l'impulsion de tension incidente et V_r l'impulsion de tension réfléchie.

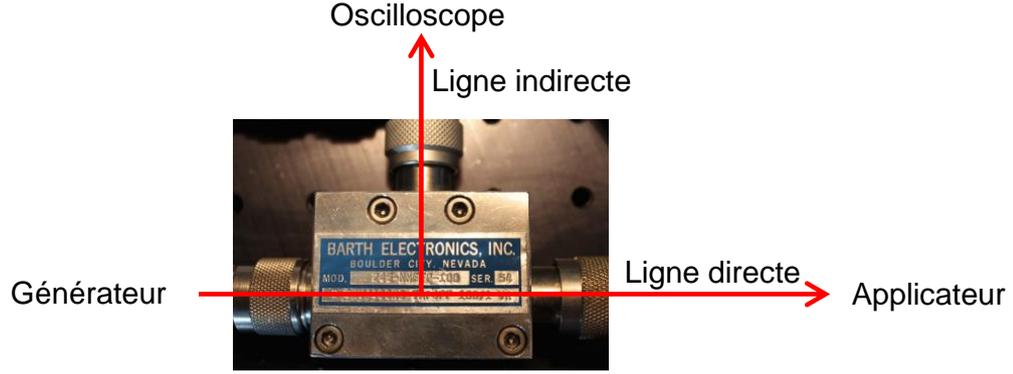


Figure 2.41 – Photographie du tap-off (245-NMFFP-100, Barth Electronics Technology, USA) avec annotation de la ligne directe et indirecte.

connectée à l'entrée de la cellule TEM. En sortie, la cellule TEM était chargée par une impédance de 50Ω (2051 GHMP, Barth Electronics Technology, USA). Cette charge large bande a été développée spécifiquement pour supporter des impulsions de haute tension (jusqu'à 10 kV sur 100 ns). Les connecteurs et adaptateurs coaxiaux employés étaient du type SMA, N⁵ ou GHV.

L'impulsion de tension V_t effectivement transmise à l'entrée de la cellule TEM est calculée comme la somme de l'impulsion de tension incidente et des impulsions de tension réfléchies. Avant d'atteindre l'entrée de l'oscilloscope, les impulsions de tension réfléchies parcourent une distance électrique plus grande que l'impulsion incidente. La distance supplémentaire parcourue par l'impulsion réfléchie s'élève à ΔL (m), où $\Delta L/2$ est défini Figure 2.40. Cette différence de distance parcourue se traduit par un retard à l'arrivée. Ce retard doit être compensé avant d'additionner les impulsions $V_r(t)$ et $V_i(t)$. La vitesse de propagation v_p (m/s) d'une onde électromagnétique dans un diélectrique de permittivité relative ϵ_r et de perméabilité magnétique relative μ_r est donnée par :

$$v_p = \frac{c}{\sqrt{\epsilon_r \cdot \mu_r}} \quad (\text{m/s}), \quad (2.7)$$

où c (m/s) est la célérité des ondes électromagnétiques dans le vide. Ainsi, le retard d'arrivée Δt (s) de l'onde réfléchie par rapport à l'onde incidente est donné par :

$$\Delta t = \frac{\Delta L \sqrt{\epsilon_r \cdot \mu_r}}{c} \quad (\text{m/s}). \quad (2.8)$$

Dans nos câbles coaxiaux, le diélectrique est en Polyéthylène ($\epsilon_r = 2.3$ et $\mu_r = 1$) ; la vitesse de propagation des impulsions est donc réduite à $0.66 \cdot c$. Pour une distance Δt de 1 m, Δt s'élève donc à 5 ns.

5. Le type N a été développé dans les années 1940 et nommé d'après la première lettre du nom de son inventeur, Paul Neill.

Les impulsions de tension délivrées par le générateur étaient au choix de forme monopolaire ou bipolaire. La durée totale des impulsions était ajustable entre 1 et 2 ns. La durée d'impulsion choisie pour les tests était de 1.2 ns. Le temps de montée de l'impulsion monopolaire était de 570 ps. L'amplitude crête-à-crête des impulsions monopolaires s'élevait à 1.9 kV et celle des impulsions bipolaires à 1.8 kV. L'instant d'envoi des impulsions, le nombre d'impulsions envoyées ainsi que la fréquence de répétition étaient contrôlés par ordinateur. Ce dernier communiquait avec le générateur via une liaison série RS-232. Le nombre d'impulsions générées était fixé à 100 et la fréquence de répétition à 100 Hz. Les mesures sauvegardées par l'oscilloscope étaient le résultat de la moyenne des impulsions acquises.

Avant d'envoyer les premières impulsions, le serrage optimal des connecteurs et adaptateurs du montage est toujours vérifié. Pour s'en assurer, la cellule TEM est enlevée du montage et la charge haute tension de 50Ω est connectée directement en sortie du câble coaxial alimentant la cellule TEM. La charge étant adaptée, aucune réflexion ne doit apparaître à l'oscilloscope lorsque des impulsions sont délivrées. Si des réflexions apparaissent, la ou les connexions défaillantes doivent être identifiées et corrigées.

2.4.3.2 Résultats et discussions

Aucun problème de claquage diélectrique ou de grésillement n'est survenu pendant les expérimentations. La cellule TEM a donc pu être utilisée sous sa forme initiale. Les mesures de tension brutes acquises à l'oscilloscope au travers du tap-off sont montrées Figure 2.42a pour l'impulsion monopolaire et Figure 2.42b pour l'impulsion bipolaire. Dans les deux cas, monopolaire et bipolaire, une faible partie de l'énergie incidente était réfléchiée par la cellule TEM. La longueur du câble coaxial connectant le tap-off à la cellule TEM a été allongée pour le cas bipolaire, d'où le retard accru de l'impulsion réfléchiée par rapport à l'impulsion incidente. Les Figure 2.42c et Figure 2.42d montrent la superposition temporelle des impulsions de tension incidente et réfléchiée ainsi que l'impulsion de tension transmise résultante. Dans les deux cas, la forme temporelle de l'impulsion transmise est peu modifiée par rapport à l'impulsion incidente. L'amplitude crête-à-crête de l'impulsion transmise monopolaire est atténuée de 4 % par rapport à l'impulsion incidente tandis que celle de l'impulsion bipolaire l'est de 6 %. Les fronts de montée et de descente n'apparaissent pas significativement distordus. Les représentations dans le domaine fréquentiel des Figure 2.42e et Figure 2.42f offrent un meilleur aperçu de la capacité de la cellule TEM à transmettre des impulsions ultracourtes. En accord avec l'impédance d'entrée de la cellule TEM, qui n'est pas strictement égale à 50Ω de 0 à 3 GHz, certaines fréquences sont mieux transmises que d'autres. Pour un ordre d'idée, une atténuation de 1 dB correspond à 20 % de l'énergie non transmise. L'amplification du contenu basse fréquence ($f < 30$ MHz) de l'impulsion bipolaire, lorsqu'elle est transmise, se traduit dans le domaine temporelle par une modification de la symétrie de l'impulsion. Les composantes HF du spectre apparaissent globalement bien transmises.

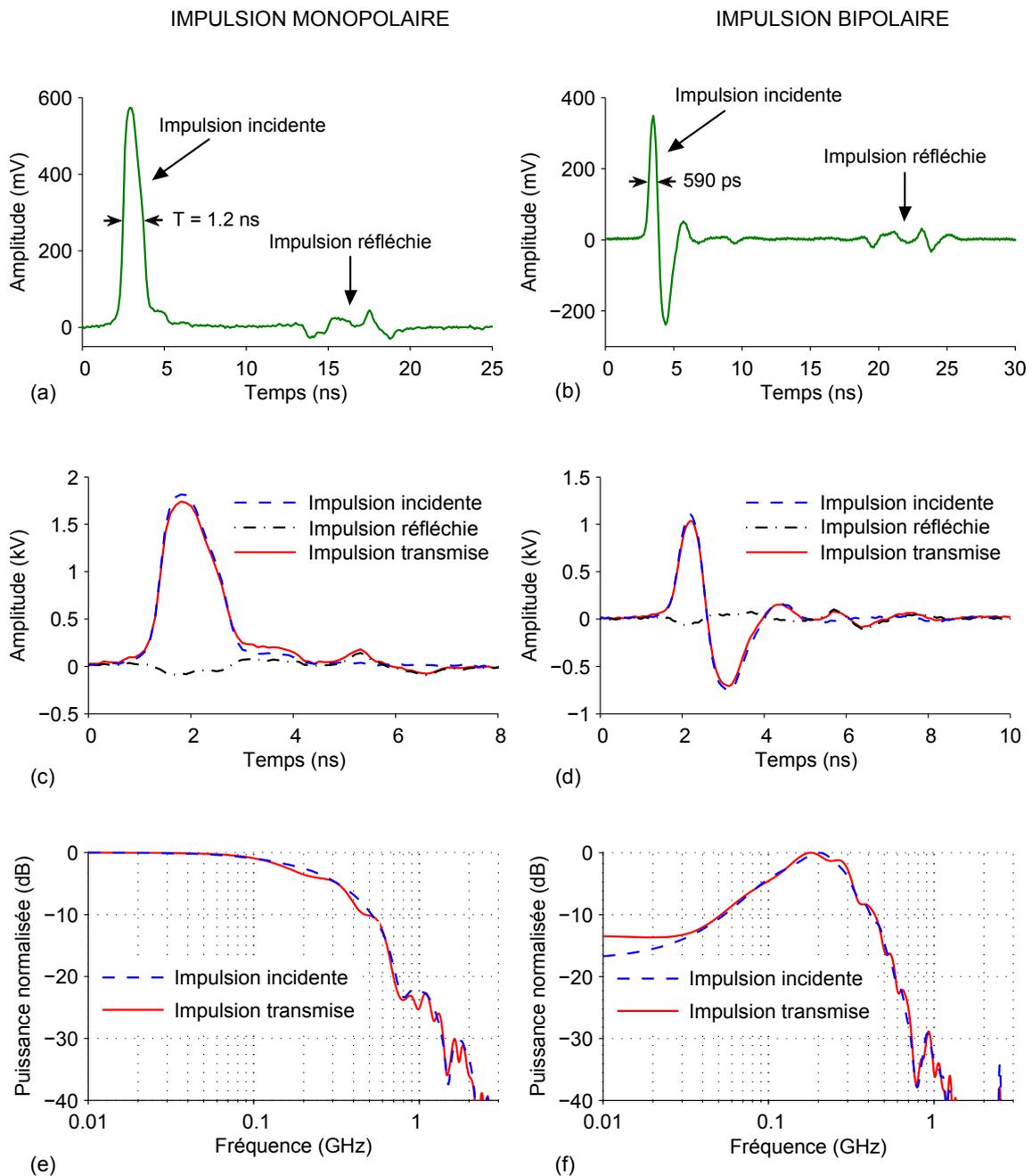


Figure 2.42 – Résultats de l'étude de la capacité de la cellule TEM à transmettre des impulsions de tension de durée totale de 1.2 ns. Mesures de tension acquises à l'oscilloscope lorsque l'impulsion est monopolaire (a) et bipolaire (b). Superposition des impulsions de tension incidente, réfléchie et transmise lorsque l'impulsion de tension incidente est monopolaire (c) et bipolaire (d). Spectre normalisé des impulsions incidente et transmise pour le cas monopolaire (e) et bipolaire (f).

Se pose à présent la question de l'allure du champ électrique dans la zone de test.

Comme expliqué dans [195] et [196], la distance parcourue par les courants se propageant le long des parois extérieures de la cellule TEM est plus grande que celle parcourue par les courants circulant le long du septum. Cette différence de chemin parcouru est liée à la forme pyramidale de la zone de transition. En pratique, cela se traduit par une courbure des fronts d'onde dans la cellule TEM et donc par une dégradation des temps de montée du champ électrique dans la zone de test. Pour une impulsion initiale de temps de montée noté t_{input} (en seconde) et une différence de temps de parcours des courants δt_r (s), le temps de montée t_{rm} (s) de l'impulsion dans la zone de test devient :

$$t_{rm} = \sqrt{t_{input}^2 + \delta t_r^2}. \quad (2.9)$$

Considérant la plus grande différence de temps de parcours possible dans une géométrie donnée, δt_r est donnée par :

$$\delta t_r = \frac{(L_T^2 + a^2 + b^2)^{1/2} - L_T}{c}, \quad (2.10)$$

où L_T (m) est la longueur de la zone de transition et c (m/s) la vitesse de propagation des courants. L'application numérique pour notre cellule TEM conduit à $\delta t_r \approx 12$ ps. Sachant que le temps de montée des impulsions délivrées est très supérieur à 12 ps, les distorsions induites par la zone de transition peuvent être considérées comme négligeables dans notre cas.

Concernant l'intensité maximale E (V/m) du champ électrique générée dans le volume d'essai, elle est définie par :

$$E = \frac{V_m}{d}, \quad (2.11)$$

où V_m (V) est la tension maximale appliquée et d (m) la distance entre le septum et la plaque supérieure ou inférieure suivant la zone de calcul. Dans la zone inférieure de notre cellule TEM (où $d = 13.2$ mm), le champ électrique délivré s'élève donc à 1.4 kV/cm pour une tension appliquée de 1.8 kV.

Pour s'assurer que le champ électrique est uniforme et perpendiculaire aux plaques dans la zone de test vide, il faut vérifier que seul le mode de propagation TEM se propage. La fréquence de coupure théorique f_c du premier mode de propagation d'ordre supérieur s'élève à 1.8 GHz, en approximant f_c par $f_c = c/(2 \cdot A)$, où A est la largeur des plaques extérieures [177]. Le mode TE_{10} , qui est le premier mode de propagation d'ordre supérieur, peut donc exister au-delà de 1.8 GHz, mais il ne sera pas nécessairement excité.

Notons que le champ électrique traité aux paragraphes précédents est le champ électrique généré dans la partie inter-électrodes « vide » et non pas celui dans l'échantillon. Calculer de manière analytique le champ électrique à l'intérieur de la boîte de Petri n'est

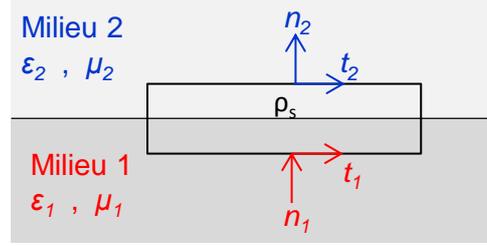


Figure 2.43 – Définition des paramètres pour l'expression des équations de continuité du champ électrique. n_1, n_2, t_1 et t_2 sont des vecteurs. ϵ désigne une permittivité, σ une conductivité et ρ_s la densité de charges à l'interface.

pas envisageable en raison de la géométrie complexe de l'échantillon. L'évaluation du champ électrique induit exige des méthodes expérimentales et numériques spécifiques qui seront au centre du chapitre suivant.

Intuitivement, nous pouvons nous attendre à une forte atténuation du champ électrique induit dans la cible. En effet, les champs électriques à l'interface de deux milieux de propriétés électriques différentes sont régis par les « équations de continuité du champ électrique » dérivées des équations de Maxwell (données en (1.4)). Pour comprendre les équations de continuité, supposons le cas général de la Figure 2.43. Par intégration de la loi de Gauss (donnée en (1.4)) et application du théorème de Green-Ostogradsky, on montre que si la hauteur du rectangle (en noir sur la Figure 2.43) tend vers zéro et que la densité de charge est uniforme, alors :

$$D_{n2} - D_{n1} = \rho_s, \quad (2.12)$$

où \vec{D} est le déplacement, D_{n1} étant la projection de \vec{D} sur \vec{n}_1 dans le milieu 1 et D_{n2} la projection de \vec{D} sur \vec{n}_2 dans le milieu 2. Si la permittivité est uniforme à l'interface de chaque milieu, l'équation s'écrit également :

$$\epsilon_2 \cdot E_{n2} - \epsilon_1 \cdot E_{n1} = \rho_s, \quad (2.13)$$

où \vec{E} désigne le champ électrique. De plus, à partir de la loi de Maxwell-Faraday (donnée en (1.4)), on montre que :

$$E_{t2} - E_{t1} = 0, \quad (2.14)$$

$$(2.15)$$

où E_{t1} est le champ électrique projeté sur \vec{t}_1 dans le milieu 1 et E_{t2} le champ électrique projeté sur \vec{t}_2 dans le milieu 2.

Les équations (2.13) et (2.14) montrent qu'il y a discontinuité de la composante de \vec{E} normale à l'interface des deux milieux de permittivité différentes, mais continuité de la composante tangentielle. Ces équations sont regroupées sous le nom d'équations de continuité du champ électrique.

Pour une configuration d'interface où la densité de charge est nulle, l'équation (2.13) nous montre que la composante normale de \vec{E} est d'autant plus atténuée au passage du milieu 1 au milieu 2 que le rapport ϵ_1/ϵ_2 est petit. Si nous revenons à notre situation, où le milieu 1 est l'air et le milieu 2 le milieu biologique, cela signifie qu'aux interfaces normales à la direction du champ électrique, le champ électrique est 80 fois moins intense dans le milieu 2 que dans le milieu 1. Dans la cellule TEM, le champ électrique étant normal aux électrodes, nous pouvons donc présumer que l'intensité du champ électrique moyen induit dans l'échantillon est fortement atténuée par rapport au champ électrique dans la partie vide. Sachant que le déclenchement d'effets biologiques par des impulsions ultracourtes requiert un champ électrique intense, nous avons développé et conçu deux modèles de cellules TEM de taille réduite. Pour une tension d'entrée donnée, diminuer la distance inter-électrodes permet en effet d'augmenter le champ électrique induit.

Dans la partie à suivre, nous donnons un récapitulatif des tests réalisés sur ces deux nouveaux modèles.

2.4.4 Cellules TEM miniaturisées

2.4.4.1 Géométrie

Les deux modèles réduits de cellules TEM qui ont été conçus sont exposés Figure 2.44b et Figure 2.44c; la Figure 2.44a montre le modèle étudié précédemment. La méthode théorique qui a été suivie pour s'assurer *a priori* que leurs dimensions conduiraient à une impédance caractéristique nominale de 50 Ω est décrite en Annexe B. Suivant les paramètres définis Figure 2.45, les dimensions finales des cellules TEM sont données Tableau 2.3. Ces dimensions correspondent à plus ou moins 1 mm aux dimensions envoyées au fabricant des plaques métalliques.

Pour distinguer les trois modèles de cellules TEM dont nous disposons, nous appellerons « grande cellule TEM » la cellule TEM étudiée précédemment, « moyenne cellule TEM » la cellule TEM de distance inter-électrodes 6.4 mm et 4.5 mm, et « petite cellule TEM » le troisième modèle. La longueur de la moyenne, et de la petite cellule TEM a été volontairement réduite à 16.7 cm (contre 20.2 cm pour la grande cellule TEM) de sorte que les cellules TEM logent dans la chambre thermostatée du microscope utilisé par les biologistes. Cette chambre permet de réguler la température et le taux de CO₂ ambiants pendant les expérimentations.

La moyenne cellule TEM a été initialement dimensionnée pour exposer les cellules biologiques dans une FluoroDishTM (modèle représenté Figure 2.46a) et la petite cellule TEM pour exposer les cellules sur une lame de microscope (voir la photo de la Figure 2.46b). Cependant, la quantité de milieu de culture pouvant être déposée sur une lame de microscope ne dépassant pas quelques dizaines de microlitres, le milieu tend à s'évaporer rapidement. Ce support ne convient donc pas pour des expérimentations

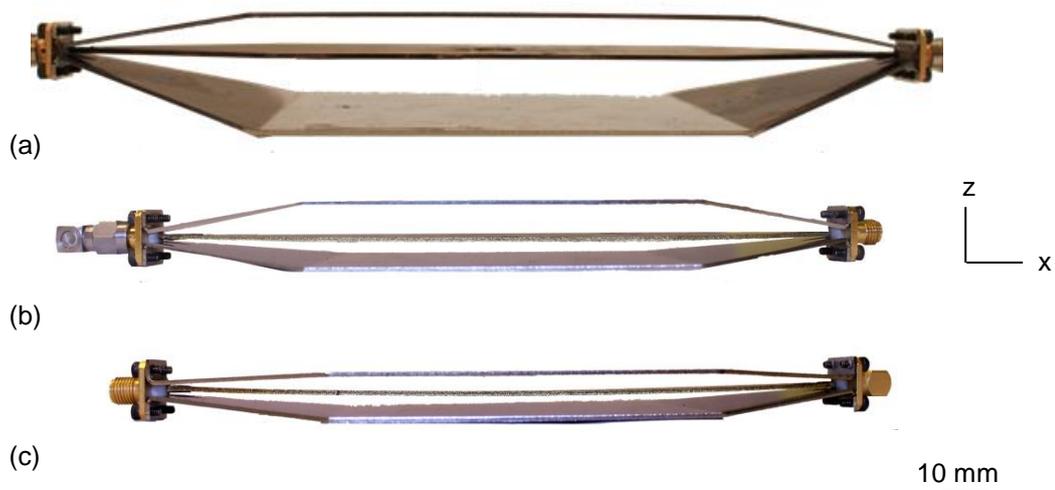


Figure 2.44 – Photographie des modèles de cellules TEM avec « la grande cellule TEM » (a), la « moyenne cellule TEM » (b) et la « petite cellule TEM » (c).

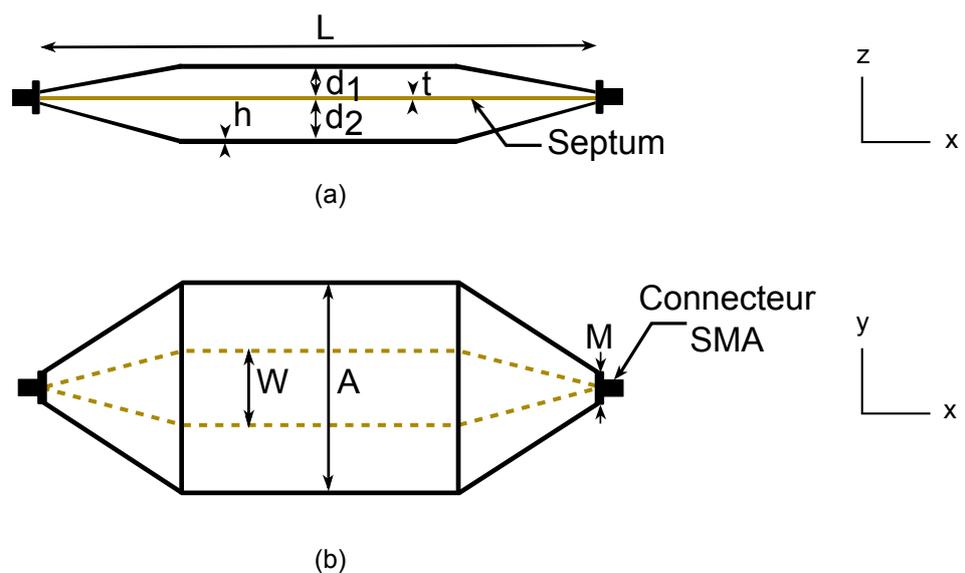


Figure 2.45 – Définition des variables pour le dimensionnement des cellules TEM. (a) Vue latérale et (b) vue de haut.

	L	d_1	d_2	A	W	t	h	M
Moyenne cellule TEM	167.0	6.4	4.5	60.4	14.5	1.0	1.0	14.0
Petite cellule TEM	167.0	3.1	2.8	50.1	8.8	1.0	1.0	14.0

Tableau 2.3 – Dimensions de la moyenne et de la petite cellule TEM (en mm).

s'étendant sur plusieurs dizaines de minutes voire davantage. Pour des expérimentations avec des cellules, Rodney O'Connor (Chaire d'excellence « Biophysique et Santé » du LABEX Σ -Lim) a donc fabriqué un contenant « maison » de plus grand volume et adapté à la petite cellule TEM. Une photo de cette boîte de Petri miniature est montrée Figure 2.46c.

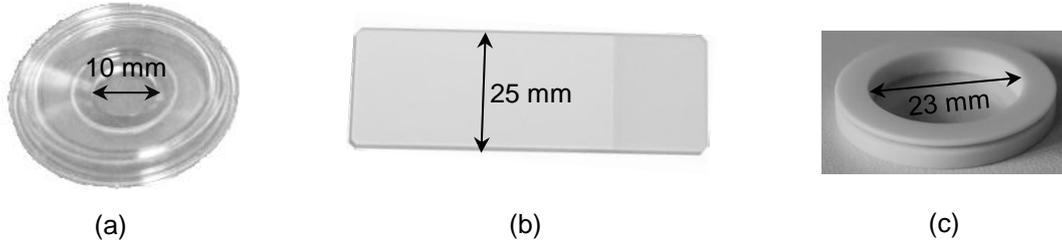


Figure 2.46 – Contenants pour l'exposition des cellules : une Fluorodish (Fluorodish cell culture dish FD3510, WPI, USA) (a), une lame de microscope (b) et la boîte de Petri miniature maison adaptée pour la petite cellule TEM (c).

2.4.4.2 Études fréquentielle et temporelle

Les méthodes et outils expérimentaux employés pour l'étude des nouvelles cellules TEM dans les domaines fréquentiel et temporel sont identiques à ceux détaillés Section 2.4.3.1. La fréquence de coupure f_c du mode TE_{10} s'élève à 2.5 GHz dans la moyenne cellule TEM vide et 3 GHz dans la petite cellule TEM. Ces fréquences étant très supérieures à nos fréquences de travail, seul le mode TEM se propage en théorie dans ces deux structures.

Les mesures fréquentielles ont montré que les paramètres S_{11} des deux applicateurs vides sont inférieurs à -10 dB sur la bande de fréquence 0–3 GHz. En présence de la boîte de Petri miniature remplie de 1.5 ml du milieu de culture, la bande passante à -10 dB de la petite cellule TEM est limitée à 1.7 GHz. Cette réduction de la bande passante s'explique par le volume significatif de la cible par rapport au volume de la zone de test. Le couplage entre le septum et l'échantillon s'en retrouve fortement augmenté si comparé au cas de la grande cellule TEM. La bande passante obtenue reste cependant satisfaisante pour délivrer les impulsions électriques envisagées (de durée minimale d'environ 750 ps).

L'exposition des deux cellules TEM à des impulsions électriques de 1.2 ns et d'amplitude 1.8 kV n'a pas engendré de claquage électrique. La Figure 2.47 montre des exemples d'impulsions de tension mesurées au travers du tap-off lorsque l'applicateur était la moyenne ou la petite cellule TEM (vide). Conformément à nos attentes, les cellules TEM réfléchissaient peu d'énergie.

Rodney O'Connor et son équipe de biologistes ont exposé des cellules cancéreuses du cerveau (lignée cellulaire U87) dans la boîte de Petri miniature à l'intérieur de la petite cellule TEM. La Figure 2.48b montre la position de la cellule TEM sur la platine du

microscope inversée. L'emplacement des objectifs du microscope est montré Figure 2.48a. La Figure 2.48c donne un exemple de cellules biologiques observées au travers d'un filtre rouge. Les cellules humaines U87 sont adhérentes; elles ont besoin d'être ancrées sur un support pour se développer. Elles se déplacent donc peu par rapport aux cellules en suspension et leur observation est ainsi facilitée.

Lorsque plusieurs millions d'impulsions de 1.2 ns, d'amplitude 1.8 kV et de fréquence de répétition 3 kHz ont été appliquées à la cellule TEM, une dilatation des cellules a été observée. Les résultats obtenus sont préliminaires; d'autres études sont en cours.

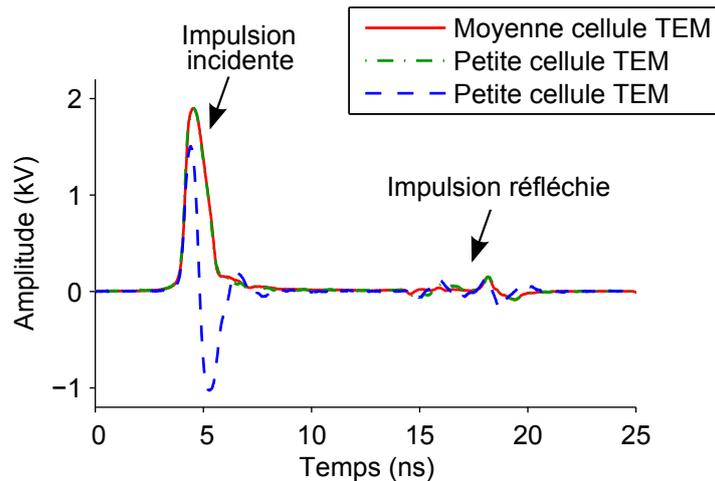


Figure 2.47 – Impulsions de tension mesurées à l'oscilloscope au travers du tap-off lorsque l'applicateur est la moyenne cellule TEM (trait plein rouge) ou la petite cellule TEM (traits pointillés). Les impulsions monopolaires ont une durée totale de 1.2 ns et une amplitude de 1.9 kV.

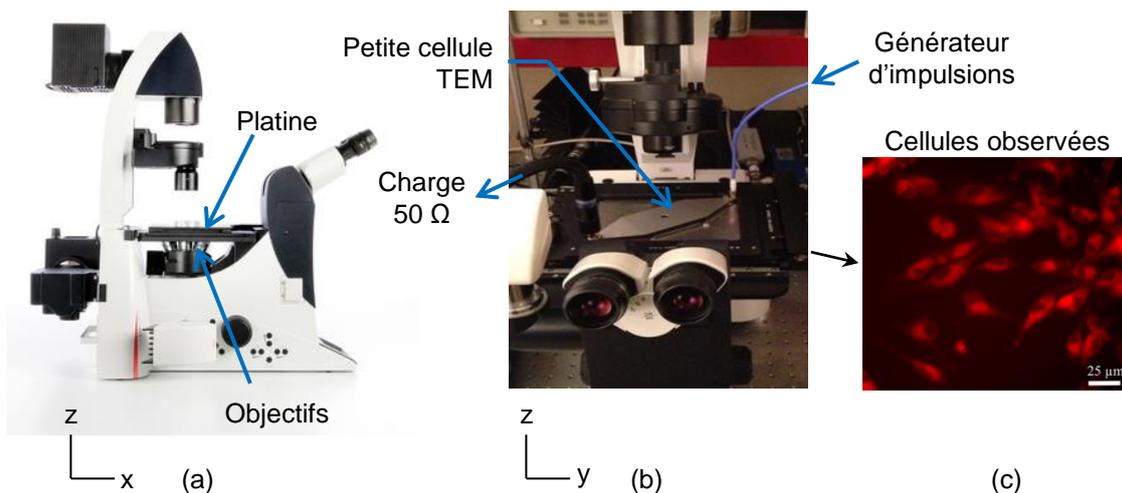


Figure 2.48 – Vue latérale du microscope inversée⁶ (a), vue plongeante sur la cellule TEM posée sur la platine du microscope (b) et un exemple d'observation de cellules au travers d'un filtre rouge. Les cellules étaient contenues dans la boîte de Petri miniature posée au centre de la cellule TEM.

6. <http://www.leica-microsystems.com>

2.4.5 Synthèse

Pour conclure cette partie, nous avons montré la capacité de trois cellules TEM à transmettre des impulsions de tension de durée ultracourte (1.2 ns) et d'amplitude de 1.8 kV. Les impulsions délivrées étaient soit de forme monopolaire soit bipolaire.

La première cellule TEM étudiée avait été développée et fabriquée lors de travaux antérieurs dans l'équipe. Elle était alors destinée à l'exposition d'échantillons à des signaux électromagnétiques de type téléphonie mobile. Les puissances nécessaires pour ces expositions étant faibles (relativement à celles que nous souhaitons générer), la distance entre le septum et les plaques extérieures de la cellule TEM avait été choisie de l'ordre du centimètre. Cette hauteur permettait de positionner une boîte de Petri conventionnelle (diamètre de 35 mm) sous le septum de la cellule TEM. Souhaitant pour notre part générer des champs électriques de puissance aussi forte que possible, nous avons développé, assemblé et caractérisé deux modèles de cellule TEM de taille réduite. Le modèle de plus petite hauteur est actuellement utilisé par les biologistes pour exposer leurs cellules à des impulsions ultracourtes et observer en temps réel si des effets biologiques sont induits.

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une présentation orale à *IMS2012 International Microwave Symposium* [197].

2.5 Conclusion et discussion

Dans ce second chapitre, nous avons traité des systèmes d'exposition pour délivrer des impulsions nanosecondes et subnanosecondes de haute intensité à des cellules *in vitro*.

Dans une première partie, nous avons abordé la génération d'impulsions de haute tension et de durée nanoseconde et subnanoseconde. En particulier, nous avons présenté les technologies de génération développées à XLIM. Nous avons introduit une nouvelle structure de génération basée sur des lignes coaxiales et des connecteurs théoriquement capables de supporter une tension continue de 20 kV. Les structures initiales, basées sur une ligne microruban, étaient limitées à une tension de polarisation de 4 kV.

Par une étude dans le domaine fréquentiel, nous avons montré que la structure coaxiale du générateur offre une bande passante de 800 MHz environ. Le générateur a ensuite été caractérisé dans le domaine temporel. L'étude a montré que le générateur est capable de délivrer des impulsions haute tension de durée nanoseconde (jusqu'à 17 ns au moins) et subnanoseconde (750 ps), pour des impulsions optiques de durée et d'énergie bien choisies. Concernant les amplitudes atteintes, elles étaient supérieures à celles obtenues avec le générateur en technologie microruban (limité à 4 kV crête-à-crête).

Dans une seconde partie, nous avons discuté des applicateurs d'impulsions courtes (quelques nanosecondes et plus) et ultracourtes (quelques nanosecondes et moins). Nous avons montré que les applicateurs avec contact entre l'échantillon et les électrodes ne

sont intrinsèquement pas capables de délivrer fidèlement des impulsions ultracourtes. Cette limitation a été expliquée par le comportement capacitif de la géométrie électrode/échantillon/électrode. Nous avons donné plusieurs exemples d'applicateurs de ce type trouvés dans la littérature. Nous avons ensuite montré que des travaux de recherche sont en cours pour la mise au point d'un applicateur sans contact basé sur une antenne ultra-large bande. Les résultats des travaux ont confirmé la capacité de l'antenne à délivrer des impulsions ultracourtes mais les intensités de champ électrique atteintes dans la cible exposée étaient faibles ($\ll 100$ V/m). Nous avons alors proposé un système propagatif, plutôt que rayonnant, pour délivrer d'intenses impulsions ultracourtes à des cibles biologiques. Le principe de l'applicateur, une cellule TEM, a ensuite été détaillé puis nous avons exposé les études fréquentielles et temporelles que nous avons réalisées pour trois modèles de taille différente. Les résultats dans le domaine fréquentiel ont montré que les trois cellules TEM, en présence de leur échantillon respectif, ont une bande passante d'au moins 1.5 GHz. Les résultats dans le domaine temporel ont eux montré que les cellules TEM sont capables de transmettre fidèlement des impulsions de tension de durée 1.2 ns et d'amplitude 1.8 kV. Le modèle dont la hauteur est la plus réduite est actuellement testé par les biologistes. Leur objectif étant de déterminer si des effets biologiques peuvent être engendrés en délivrant des impulsions de 1.2 ns et d'amplitude 1.8 kV à un échantillon dans une boîte en plastique exposée au travers de la cellule TEM.

À propos de la validité scientifique des résultats de biologie. De manière générale, un résultat dit « scientifique » doit être répétable et reproductible. Un résultat est répétable lorsqu'il peut être obtenu successivement dans les mêmes conditions d'expérimentation (même laboratoire, même équipement, même personnel et répétition dans un intervalle de temps court). La répétabilité quantifie la dispersion des résultats obtenus selon ces mêmes conditions. Un résultat reproductible est un résultat qui peut être vérifié suivant la même méthode mais dans des conditions d'expérimentation différentes (différents laboratoires, différents équipements (toutefois analogues) et différents opérateurs). Les définitions normalisées des termes « répétabilité » et « reproductibilité », et des termes de métrologie en général, sont rassemblées dans [198]. Les propriétés de répétabilité et de reproductibilité d'un résultat sont essentielles pour minimiser les erreurs d'analyse et d'interprétation.

Pour assurer la reproductibilité de résultats publiés et obtenus à partir de méthodes numériques, Ince et co-auteurs ont revendiqué le libre accès aux codes sources (dans une publication parue dans la revue *Nature* [199]). Pour des expérimentations pratiques, la reproductibilité de la méthode et de ses résultats ne peut être assurée qu'au travers d'une description exhaustive du matériel et des méthodes employés. Dans le cas particulier de notre domaine, les études de répliquations peuvent s'avérer complexes car il n'est pas rare que le laboratoire dispose d'un système d'exposition « fait maison » présentant des caractéristiques fréquentielles et temporelles très spécifiques. Sachant que les effets biologiques observés dépendent des paramètres du champ électrique induit à l'intérieur

de l'échantillon exposé, la description du champ électrique incident n'est pas suffisante. Les impulsions électriques doivent être définies *in situ*, c'est-à-dire dans l'échantillon. La quantification *in situ* du champ électrique permet de comparer les expérimentations entre elles, en donnant la dose réellement absorbée par l'échantillon.

Dans le chapitre à suivre, nous verrons que la mesure d'intenses impulsions électriques ultracourtes *in situ* n'est pas chose commune dans des échantillons de faible volume. Nous évoquerons de plus l'importance de maîtriser la température dans l'échantillon, également pour l'interprétation et la compréhension des effets obtenus.

CHAPITRE 3

Techniques de dosimétrie expérimentale

Contenu

3.1	La dosimétrie : une étude multi-physiques et multi-échelles	131
3.2	Les sondes de champ électrique induit à l'échelle macroscopique	133
3.3	La sonde électro-optique étudiée	140
3.4	Caractérisation de la sonde EO dans la cuvette d'électroporation soumise à d'intenses nsPEFs.	145
3.5	Caractérisation de la sonde EO dans les cellules TEM vides soumises à d'intenses nsPEFs	155
3.6	Application à la mesure du champ électrique induit dans les échantillons exposés via la cellule TEM	159
3.7	Vers la dosimétrie expérimentale à l'échelle microscopique	166
3.8	Conclusion	175

Dans ce chapitre, nous abordons la dosimétrie des systèmes d'exposition pour l'étude *in vitro* des interactions entre les champs électriques pulsés nanosecondes de forte intensité et les cellules. Afin d'appréhender l'organisation du chapitre, nous commençons par décrire ce que suppose d'effectuer la dosimétrie d'un système.

L'abréviation « nsPEFs » sera utilisée pour désigner les champs électriques pulsés de durée nanoseconde.

3.1 La dosimétrie : une étude multi-physiques et multi-échelles

Par dosimétrie, nous entendons la quantification de l'énergie absorbée par une cible exposée à un champ électrique. La quantification peut être obtenue par des méthodes expérimentales ou numériques, et idéalement par les deux méthodes.

Comme illustré Figure 3.1, les grandeurs qui sont d'intérêt pour nos recherches sont le champ électrique induit dans la cible exposée ainsi que les potentielles variations de température engendrées. La dosimétrie est donc multi-physiques puisqu'elle fait appel à la fois aux notions fondamentales de l'électromagnétisme et à celles de la thermodynamique. Elle est de plus multi-échelles car les grandeurs d'intérêt dépendent de l'échelle spatio-temporelle considérée.

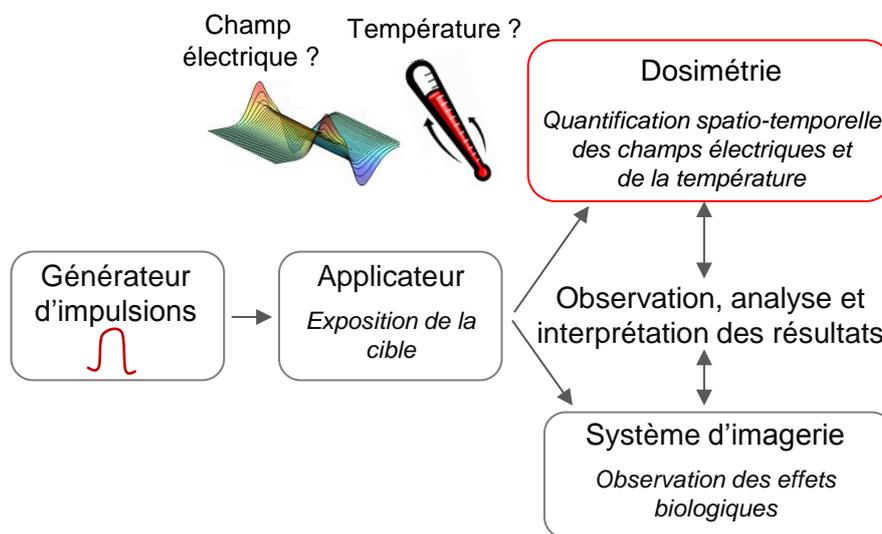


Figure 3.1 – La place de la dosimétrie dans un système d'exposition.

Au niveau spatial, nous distinguons trois échelles différentes, à savoir l'échelle macroscopique, l'échelle microscopique et l'échelle nanoscopique. La Figure 3.2 illustre ces trois échelles. Lorsque l'échantillon est analysé dans sa globalité, l'étude est dite

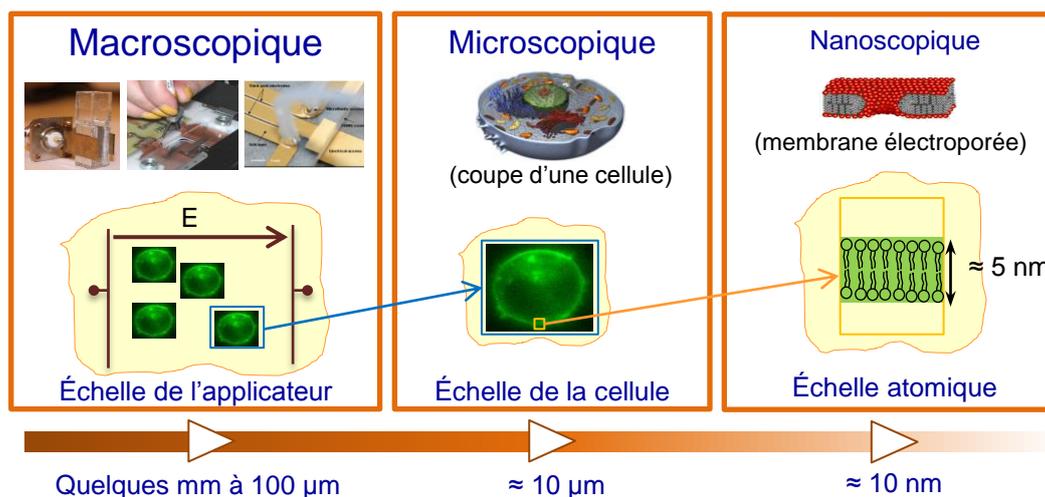


Figure 3.2 – Définition des échelles macroscopique, microscopique et nanoscopique.

macroscopique; nous parlerons de macrodosimétrie. Une étude des doses¹ à l'échelle cellulaire est quant à elle microscopique; il s'agit de microdosimétrie. Lorsque les grandeurs sont évaluées à l'échelle encore inférieure, à savoir l'échelle des atomes, nous parlerons de nanodosimétrie.

Dans ce chapitre, nous traiterons de la dosimétrie expérimentale aux échelles macroscopique et microscopique. La dosimétrie à l'échelle atomique nécessite l'implémentation de méthodes numériques très spécifiques qui seront développées au dernier chapitre.

Dans un premier temps, nous aborderons la dosimétrie à l'espace spatiale la plus grande, à savoir l'échelle macroscopique. La macrodosimétrie des systèmes d'exposition est indispensable. Par exemple, nous avons vu au chapitre précédent que la bande passante des systèmes d'exposition avec contact est limitée par le comportement capacitif de la structure à haute fréquence. La forme de l'impulsion électrique induite dans l'échantillon peut donc être significativement différente de la forme de l'impulsion incidente, en particulier pour des impulsions incidentes de durée inférieure à quelques nanosecondes. Sachant que les effets biologiques engendrés dépendent fortement de la durée et de l'intensité des impulsions appliquées (se rappeler de la Section 1.3), une méconnaissance du champ électrique effectivement induit peut conduire à des analyses erronées. Il n'existe cependant pas d'outil clés en main adapté pour la mesure du champ électrique pulsé induit dans nos systèmes d'exposition. Ainsi, nous introduirons une sonde électro-optique (sonde EO) qui était théoriquement adaptée pour de telles mesures. Nous exposerons les études que nous avons conduites afin de caractériser la capacité de la sonde EO à mesurer en pratique

1. Ce terme est usuellement employé pour définir l'énergie déposée dans un échantillon à la suite d'une exposition à un rayonnement ionisant. Il s'agit bien de la dose d'un « rayonnement » non ionisant dont nous parlons ici.

d'intenses champs électriques pulsés nanosecondes, aussi bien dans un milieu aqueux que dans l'air. Enfin, nous montrerons des mesures de champ électrique que nous avons obtenues à l'intérieur d'un milieu de culture exposé à d'intenses impulsions ultracourtes au sein de la cellule TEM.

Dans un deuxième temps, nous évoquerons l'intérêt de la microdosimétrie et nous montrerons des résultats de température cellulaire et intracellulaire obtenus dans des cellules biologiques exposées dans la cellule TEM.

3.2 Les sondes de champ électrique induit à l'échelle macroscopique

Dans cette partie, nous développons les techniques expérimentales de microdosimétrie visant à quantifier le champ électrique induit dans les échantillons. Nous introduirons ensuite la sonde électro-optique fibrée que nous avons caractérisée puis utilisée pour le contrôle de nos expositions à des nsPEFs.

L'étude de cette sonde électro-optique, alors à l'état de prototype, s'est inscrite dans un projet plus général connu sous le nom de BIOCAPTEO. Ce projet, financé par la Fondation Santé et Radiofréquences, était soutenu par Lionel Duvillaret de l'Institut de Microélectronique, Électromagnétisme et Photonique - Laboratoire d'Hyperfréquences et de Caractérisation (IMEP-LAHC) de l'INP Grenoble, en partenariat avec l'équipe bioélectrophotonique de XLIM. L'objectif du projet initié fin 2008 consistait au développement et à la caractérisation de sondes électro-optiques pour la microdosimétrie des systèmes d'exposition, en particulier pour celle des systèmes dédiés à l'exposition de milieux biologiques à des signaux de télécommunications radiofréquences (dans la gamme 850 MHz–5 GHz). Le développement et l'optimisation des sondes revenait au laboratoire IMEP-LAHC tandis que l'établissement du cahier des charges et la caractérisation des sondes appartenait à XLIM.

3.2.1 Notion de DAS

Comparés aux impulsions électriques que nous employons, les signaux électriques d'intérêt dans le projet BIOCAPTEO ont une faible étendue spectrale (environ 200 kHz pour les signaux GSM² et 5 MHz pour les signaux UMTS³, autour d'une fréquence centrale de typiquement 850 à 2200 MHz), et sont de faible intensité (de l'ordre du V/m).

Dans la bande des fréquences s'étendant de 100 kHz à 10 GHz, la grandeur de référence utilisée pour quantifier les interactions entre les champs électromagnétiques et le vivant est le débit d'absorption spécifique (DAS, ou SAR en anglais). Le DAS peut s'exprimer

2. Global System for Mobile Communications (à l'origine Groupe Spécial Mobile) est une norme de téléphonie mobile de deuxième génération (2G)

3. Universal Mobile Telecommunications System est une norme de téléphonie mobile de troisième génération (3G)

soit en fonction de la norme du champ électrique induit dans l'échantillon $|E|$ (V/m), soit en fonction de l'élévation de température induite $\partial T/\partial t$ (K/s), selon respectivement [27] :

$$\text{DAS} = \frac{\sigma |E|^2}{2\rho} \quad (\text{W/kg}) \quad (3.1)$$

et

$$\text{DAS} = c \left. \frac{\partial T}{\partial t} \right|_{t=0} \quad (\text{W/kg}), \quad (3.2)$$

où

ρ est la densité massique de l'échantillon sondé (kg/m^3),

c sa capacité thermique massique ($\text{J}/(\text{kg.K})$),

σ sa conductivité électrique (S/m) et

$t = 0$ est l'instant où l'exposition est amorcée.

Physiquement, le DAS représente la puissance (débit d'énergie) absorbée par unité de masse dans l'échantillon exposé.

Pour les systèmes domestiques et industriels émettant des ondes électromagnétiques sur la bande de fréquence 100 kHz–10 GHz, des restrictions de base concernant le DAS ont été formulées. Ces restrictions imposent les valeurs limites de DAS ne devant pas être dépassées. Elles ont pour seul but de limiter l'échauffement local des tissus biologiques dans le cas d'une exposition localisée, ou de prévenir un stress thermique généralisé du corps lorsque le corps entier est exposé [25]. Pour une exposition locale de la tête, la valeur de DAS limite est de 2 W/kg pour le grand public.

La quantification du DAS, qui doit être moyennée sur un intervalle de temps de 6 minutes, est aujourd'hui systématique pour la mise en conformité des téléphones mobiles. En France, les spécifications techniques applicables aux équipements terminaux radioélectriques sont fixées par l'arrêté du 8 octobre 2003. Comme montré Figure 3.3, le banc de test standard comprend un fantôme (mannequin) rempli d'un gel dont la forme et les propriétés électriques (spatialement homogènes) modélisent celles d'une tête humaine [200]. Le téléphone mobile est positionné contre l'oreille du fantôme, mis en fonctionnement et le DAS est évalué via des mesures de champ électrique. Ces mesures sont réalisées par une sonde métallique plongée dans le fantôme et déplacée suivant les méthodes prescrites.

Dans le paragraphe à suivre, nous décrivons le principe de fonctionnement de ces sondes de champ électrique. Ces descriptions nous permettront d'exposer les raisons pour lesquelles nous ne pouvons pas employer ces sondes pour la mesure des impulsions électriques de forte intensité induites dans nos échantillons.



Figure 3.3 – Banc de test pour la quantification du SAR local engendré par un téléphone mobile collé à l'oreille de l'utilisateur⁴.

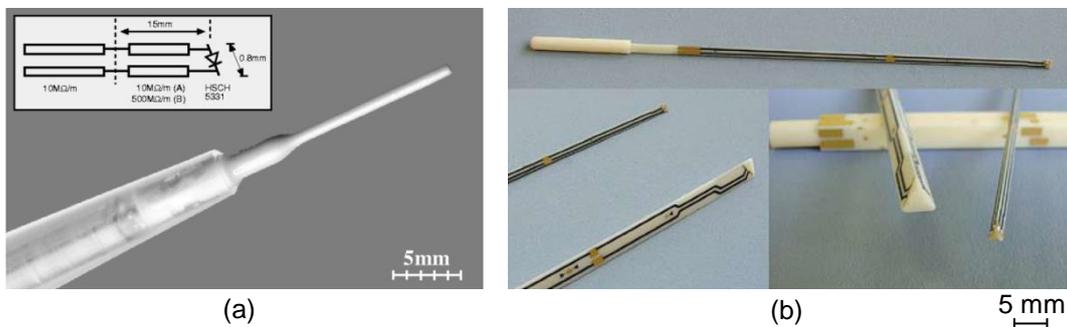


Figure 3.4 – Exemples de capteur métallique : (a) d'après [201] et (b) d'après [202].

3.2.2 Les limites des sondes métalliques

Deux exemples de capteur métallique utilisé pour la mesure du DAS sont montrés Figure 3.4 [201, 202]. La sonde de la Figure 3.4a est basée sur l'utilisation d'une antenne miniature pour la mesure d'une composante du champ électrique et la sonde de la Figure 3.4b comprend trois antennes pour la mesure de l'enveloppe du champ électrique. Chaque antenne consiste en un dipôle électriquement petit par rapport aux longueurs d'onde du champ électrique à mesurer. Dans le modèle de la Figure 3.4b, les dipôles sont positionnés de sorte à maximiser l'isotropie de la mesure.

Les dipôles sont chargés par une diode de détection dont la composante continue de la tension de sortie est proportionnelle au carré de l'intensité du champ électrique sondé. Des lignes à forte résistivité conduisent les signaux électriques générés par les diodes vers les instruments nécessaires au traitement de ces signaux. La forte résistivité est indispensable pour immuniser le capteur face aux perturbations externes.

Ces capteurs métalliques ont l'avantage d'être miniaturisables et suffisamment sensibles pour la quantification du DAS. Pour donner un exemple, le diamètre de l'extrémité du capteur montré Figure 3.4a est à peine de 0.8 mm et il offre une sensibilité inférieure à

4. <http://www.indexsar.com/>

20 mW/kg [201]. La dynamique des intensités de champ électrique mesurables par ces capteurs est cependant limitée en raison des diodes utilisées. En effet, le comportement optimal des diodes ne peut être assuré quelle que soit la tension à leurs bornes. Pour les champs électriques que nous souhaitons mesurer (d'intensité très supérieure au kV/m), ces diodes seraient très certainement détruites. De plus, les électrodes de nos systèmes d'exposition avec contact sont séparées de seulement quelques millimètres voire moins. L'insertion d'une sonde métallique serait donc critique puisqu'elle augmenterait sensiblement la probabilité d'un claquage électrique dans le milieu sondé pendant les expositions. Enfin, une sonde idéale ne perturbe pas l'environnement électromagnétique dans lequel elle est plongée. Pour minimiser l'impact de la mesure sur le milieu sondé, les propriétés électriques de la sonde doivent être au plus proches de celles de l'échantillon. Les éléments métallisés ne sont donc pas souhaités.

Afin de limiter le caractère invasif des mesures et augmenter les dynamiques mesurables, une autre famille de sondes de champ électrique a été proposée dans la littérature : les sondes électro-optiques.

3.2.3 Les sondes électro-optiques (EO)

Les sondes électro-optiques sont des sondes entièrement diélectriques basées sur une mesure optique du champ électrique. Ces sondes sont principalement développées par des groupes de recherche japonais et coréens (par exemple NTT Corporation au Japon et Korea Research Institute of Standards and Science en Corée) mais des groupes français sont également bien positionnés dans le domaine (à savoir le groupe de Lionel Duvillaret, et l'équipe MINANO de l'Institut FEMTO-ST UMR CNRS 6174).

Contrairement aux sondes métalliques, les sondes électro-optique (EO) restent encore majoritairement confinées à des études en laboratoire. Trois exemples sont donnés Figure 3.5.

Les sondes EO présentent un certain nombre d'avantages tels que d'être [203,206–210] :

- miniaturisables,
- entièrement diélectriques (absence d'éléments métallisés),
- à large bande passante,
- à haute résolution spatiale,
- capables de mesurer des signaux électriques à très forte dynamique d'amplitude et
- capables de mesurer l'amplitude du champ électrique simultanément à différentes fréquences.

Ces sondes reposent sur l'utilisation d'un ou plusieurs cristaux dont les propriétés optiques varient lorsque le cristal est plongé dans un champ électrique. L'effet le plus couramment exploité est l'effet Pockels. Cet effet correspond à une variation d'indice de réfraction du cristal, variation qui est proportionnelle à l'intensité du champ électrique

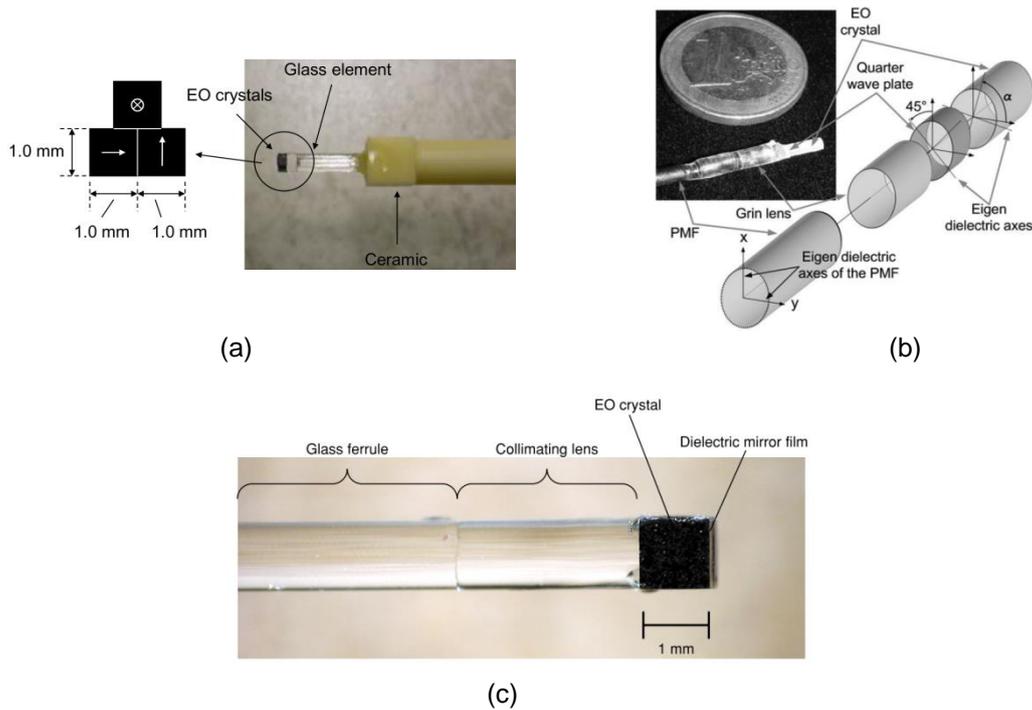


Figure 3.5 – Exemples de sonde électro-optique : (a) d'après [203], (b) d'après [204] et (c) d'après [205]. La sonde en (a) est capable de mesurer les trois composantes du champ électrique, chaque cristal étant sensible à une composante du champ électrique. « PMF » est l'acronyme pour Polarization-Maintaining Fiber soit fibre à maintien de polarisation. Les sonde EO en (b) et (c) ont été développées pour mesurer une unique composante du champ électrique.

appliqué. Pour sonder cette variation d'indice, un faisceau optique est injecté dans le cristal grâce à une fibre optique collée en amont. Une illustration est donnée Figure 3.6.

Si la sonde fonctionne en réflexion, un miroir diélectrique sur la face arrière du cristal réfléchit le signal sur lui-même. Après propagation inversée dans le cristal et la fibre, les modulations du signal optique induites par l'effet Pockels dans le cristal sont démodulées par une photodiode. La longueur de la fibre peut atteindre plusieurs mètres de sorte que la démodulation peut être déportée à distance du lieu de mesure. Le signal électrique en sortie de la photodiode est observable en temps réel sur un analyseur de spectre pour des mesures dans le domaine fréquentiel, ou sur un oscilloscope pour des résultats dans le domaine temporel. La résolution spatiale du capteur est liée au volume du faisceau sondant le cristal. La grandeur sondée est donc moyennée sur la longueur et le diamètre du faisceau.

Un cristal est une structure ordonnée qui peut être isotrope (même indice de réfraction dans les trois directions de l'espace) ou anisotrope (au moins deux indices de réfraction différents dans deux directions orthogonales). Duvillaret et co-auteurs ont montré analytiquement que les cristaux anisotropes sont sensibles à une unique composante du champ électrique appliqué tandis que les cristaux isotropes sont sensibles à deux de ces composantes [211]. Le cas des cristaux isotropes étant plus complexe à traiter, les cristaux employés dans les sondes électro-optiques sont principalement anisotropes. La

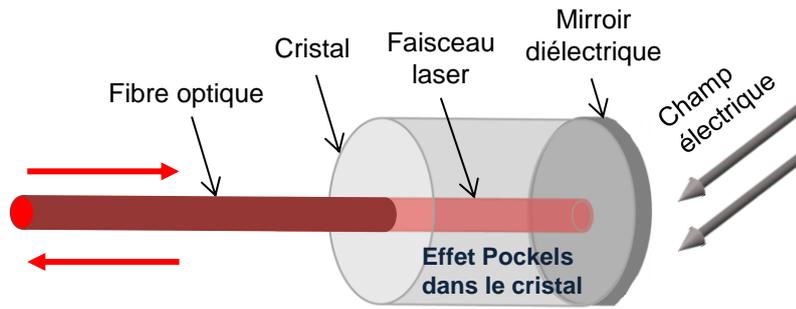


Figure 3.6 – Schéma d'un capteur optique fibré fonctionnant en réflexion.

sonde électro-optique que nous avons caractérisée expérimentalement s'appuie sur un cristal anisotrope mais le groupe de Lionel Duvillaret développe également des sondes dites « deux axes » reposant sur un cristal isotrope [212, 213].

Une variation d'indice de réfraction dans un cristal peut entraîner une modulation de l'amplitude, de la phase, de l'état de polarisation ou encore de la fréquence du faisceau optique le traversant. La modulation de l'état de polarisation est de loin la plus exploitée [210, 214], et c'est également qui elle l'est dans le prototype de la sonde EO étudiée. Le principe de la modulation de l'état de polarisation est rappelé brièvement dans les lignes à suivre.

La vitesse de propagation v (m/s) d'un faisceau optique dépend de l'indice de réfraction n du milieu de propagation selon :

$$v = \frac{c}{n}, \quad (3.3)$$

où c (m/s) est la célérité de la lumière dans le vide.

Supposons à présent un faisceau décomposé en ses composantes cartésiennes. Si deux composantes sont orientées suivant deux axes d'indice de réfraction respectivement n_1 et n_2 , alors elles subissent un déphasage $\Delta\Phi$ (en radian), en fonction de la distance parcourue L (m), défini par :

$$\Delta\Phi = \left| \frac{2 \cdot \pi \cdot (n_2 - n_1) \cdot L}{\lambda} \right|, \quad (3.4)$$

où λ est la longueur d'onde du faisceau optique. Comme illustré par l'exemple de la Figure 3.7, ce déphasage induit une modulation de l'état de polarisation du faisceau. Cette modulation est d'autant plus marquée que L est grand. Dans une sonde électro-optique, L est la distance parcourue par le faisceau optique dans le cristal soit deux fois la longueur du cristal. La sensibilité de la sonde, définie comme la variation de sa réponse sur la variation de la grandeur physique à mesurer (le champ électrique), augmente donc avec la longueur du cristal.

À l'origine, les sondes électro-optiques n'étaient pas adaptées à la mesure du DAS

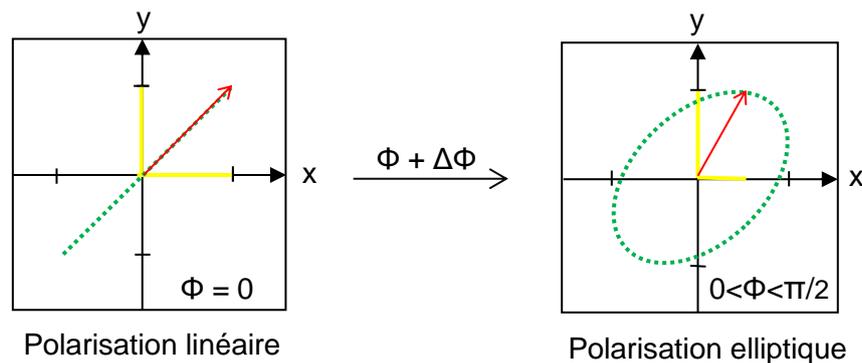


Figure 3.7 – Illustration de la modulation de l'état de polarisation d'un faisceau due à l'introduction d'un déphasage $\Delta\Phi$ entre ses composantes dans l'espace cartésien. La direction de propagation du faisceau est supposée suivant \vec{z} . La flèche rouge représente le vecteur champ électrique du faisceau optique à un instant donné. Les traits pleins de couleur jaune sont les composantes du champ électrique $\vec{E}_{\text{faisceau}}$ projeté suivant \vec{x} et \vec{y} , et Φ est le déphasage entre $\vec{E}_{\text{faisceau}} \cdot \vec{x}$ et $\vec{E}_{\text{faisceau}} \cdot \vec{y}$. La polarisation (en trait pointillé vert) décrit l'orientation du vecteur champ électrique en fonction du temps. Suivant le déphasage entre les composantes du champ électrique, la polarisation du faisceau est modifiée.

en raison de leur limite en sensibilité. L'amélioration de leur sensibilité a été et reste une des priorités des groupes de recherche travaillant à leur développement. Les écarts de sensibilité entre les sondes métalliques et les sondes électro-optiques tendent donc à s'amoinrir. Récemment, la capacité de nouvelles sondes électro-optiques à évaluer le DAS a ainsi pu être démontrée [203, 215]. Dans [215], les auteurs (de FEMTO-ST) ont montré que leurs sondes EO sont capables de détecter des champs électriques d'amplitude inférieure à 1 V/m. Dans [203], Onishi et co-auteurs ont eux mesuré de manière fiable des DAS aussi faibles que 2 mW/kg. Les sondes métalliques demeurent toutefois l'outil de mesure standard du DAS.

Les sondes électro-optiques sont davantage attractives pour leur capacité à mesurer des champs électriques pulsés de forte intensité. Quelques sondes ont été développées et testées dans ce but [216]. Dans [216], les applications citées concernent par exemple l'étude des phénomènes physiques intervenant dans les décharges coronaires et les claquages électriques, ou encore la caractérisation des risques associés aux hautes puissances électromagnétiques pulsées utilisées dans le domaine militaire.

À notre connaissance, jamais une mesure de champ électrique pulsé de haute intensité n'a été démontrée à l'intérieur d'un volume de taille subcentimétrique (quelles que soient les applications), et il n'existait pas, avant les faits, de sonde de champ électrique commerciale adaptée pour de telles mesures.

Dans la partie à suivre, nous présentons le prototype de sonde électro-optique que nous avons caractérisé non seulement pour la mesure du champ électrique mais également pour la mesure simultanée des variations de température potentiellement induites dans

l'échantillon exposé. En effet, ce prototype développé par l'IMEP-LAHC et Kapteos[®] présentait *a priori* cette double capacité. Kapteos est une start-up française qui a été fondée conjointement par Lionel Duvillaret et Gwenaël Gaborit à la fin de l'année 2009. Elle développe des solutions optiques de mesure de champ électrique et de température. Sa première gamme de capteurs de champ électrique a été commercialisée à partir de juillet 2012. À titre d'informations, les travaux de caractérisation que nous avons réalisés ont été conduits entre le mois d'octobre 2010 et la fin de l'année 2011 (soit au début des travaux de thèse présentés).

3.3 La sonde électro-optique étudiée

3.3.1 Description et fonctionnement

Le prototype de sonde EO dont nous disposons est montré Figure 3.8.

Le boîtier d'asservissement, d'encombrement d'environ 50 cm × 50 cm × 15 cm, se compose de composants optiques, électroniques et mécaniques. Ce boîtier génère le signal laser sondant le cristal puis démodule le signal après son aller-retour dans fibre optique. La longueur d'onde du signal laser est fixée à 1550 nm. Le boîtier d'asservissement offre une sortie coaxiale permettant sa connexion à un oscilloscope ou un analyseur de spectre. La sortie USB permet de connecter le système au programme informatique qui lui est associé. Ce programme affiche en temps réel les variations de température mesurées. Des explications détaillées sur le principe de fonctionnement du boîtier d'asservissement sont donnés dans [204].

La fibre optique est une fibre monomode à maintien de polarisation longue de 5 mètres et relativement souple. Le cristal employé est un cristal de tantalate de lithium (LiTaO₃) de 7.1 mm de longueur et de diamètre 1.8 mm. Sa permittivité relative est de 42. Les cristaux de LiTaO₃ sont anisotropes et donc sensibles à une unique composante du champ électrique. L'orientation du cristal par rapport à la fibre optique est ici telle que son axe de sensibilité au champ électrique est perpendiculaire à la direction de propagation du faisceau laser.

Pour comprendre comment le système peut mesurer simultanément le champ électrique et la température, il faut savoir qu'une variation de température dans le cristal, tout comme l'application d'un champ électrique, induit une modulation de l'état de polarisation du faisceau optique s'y propageant. Sous certaines conditions, il est possible de dissocier les modulations liées à la température de celles liées au champ électrique. En effet, la réactivité du cristal plongé dans un milieu soumis à un échelon de température est limitée par sa constante de temps d'inertie thermique. Le cristal agit donc comme un filtre passe-bas vis-à-vis d'un changement de température. Face à un champ électrique, la réponse du cristal est quant à elle immédiate par rapport aux échelles temporelles qui nous intéressent. La modulation de l'état de polarisation du faisceau optique due à une variation de température est donc caractérisée par des fréquences inférieures à celles de la modulation induite par un

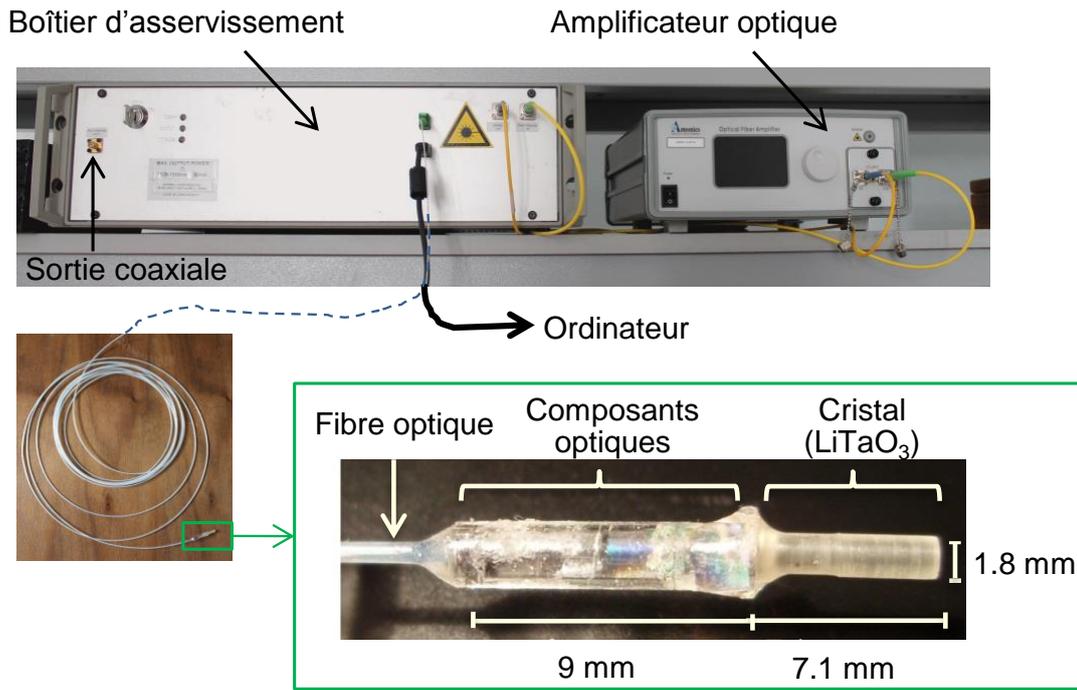


Figure 3.8 – Photographie du système électro-optique de mesure macroscopique du champ électrique et de la température.

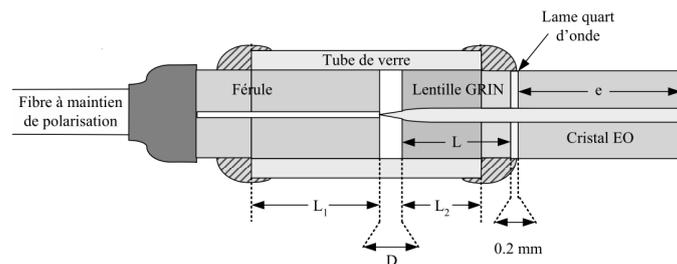


Figure 3.9 – Schéma illustrant la position de la lame quart d'onde et de la lentille GRIN dans la sonde électro-optique. D'après [217].

champ électrique, si toutefois les variations du champ électrique sont suffisamment rapides (c'est-à-dire supérieures à 1 kHz pour le prototype étudié). Dans le boîtier d'asservissement de la sonde EO étudiée, les deux modulations sont ainsi dissociées par l'intermédiaire d'un filtre passe-bas et d'un filtre passe-haut. Par ailleurs, les variations de température de la fibre contribuent également aux modulations lentes du faisceau optique. Grâce au formalisme de Jones, Bernier et co-auteurs ont montré que la modulation lente induite dans le cristal peut être dissociée de celle liée à la fibre en ajoutant une lame quart d'onde à l'entrée du cristal [204]. Comme schématisé Figure 3.9, une lentille GRIN est également utilisée et insérée en amont de la lame quart d'onde. Cette lentille permet d'optimiser l'injection du faisceau dans la fibre après réflexion sur la face arrière du cristal [217].

S'agissant de la bande passante de la sonde, elle est essentiellement limitée par le temps de transit du faisceau optique dans le cristal [214]. La bande passante est d'autant plus large que le cristal est court. Sachant que la sensibilité du cristal est réduite quand

la longueur du cristal diminue, la bande passante et la sensibilité de la sonde ne peuvent être maximisées simultanément ; il y a nécessité d'un compromis. La bande passante à -3 dB du prototype étudié est estimée à 2.5 GHz [218].

Avant d'étudier la capacité de la sonde à mesurer d'intenses champs électriques pulsés à l'intérieur de nos systèmes d'exposition, nous l'avons caractérisée pour la mesure de signaux radiofréquences de type téléphonie mobile. Comme mentionné précédemment, c'était en effet la mesure de ces signaux qui était au centre du projet BIOCAPTEO. Le premier objectif de cette étude était d'identifier la linéarité, la sensibilité, la sélectivité ainsi que la dynamique de la sonde lorsqu'elle est exposée à des champs électromagnétiques de type continuous-wave (CW). Le second objectif était de tester son applicabilité pour l'évaluation simultanée du DAS par la mesure du champ électrique et celle des variations de température. Ces travaux ont été réalisés conjointement avec Pierre Jarrige, alors doctorant à l'IMEP-LAHC et Nicolas Ticaud, alors doctorant à XLIM. Dans la section à suivre, nous proposons un récapitulatif des résultats obtenus.

3.3.2 Réponse à des champs électromagnétiques de type CW

La réponse de la sonde à des champs électromagnétiques de type CW a été étudiée en l'exposant à des champs électromagnétiques de fréquence 1800 MHz. Les études ont été réalisées d'une part dans l'air et d'autre part avec la sonde plongée dans une solution d'eau salée de permittivité relative $\epsilon_r = 77$ et de conductivité $\sigma = 1.7$ S/m (pour $f < 200$ MHz). Dans les deux cas, la grande cellule TEM décrite au chapitre précédent était utilisée pour délivrer les champs électromagnétiques souhaités. Comme alors expliqué, la cellule TEM a l'avantage de générer des champs électriques bien définies lorsqu'elle est utilisée sur sa bande de fréquence optimale, ce qui est le cas dans la présente étude.

La Figure 3.10 montre un schéma du montage expérimental ainsi que le positionnement de la sonde dans la cellule TEM vide et dans la solution d'eau salée. La solution d'eau salée était contenue dans une cuvette en plastique sans électrodes. Les champs électromagnétiques de fréquence 1800 MHz et de puissance ajustable entre -40 dBm (= 0.1 μ W) et 40 dBm (= 10 W) étaient fournis par un générateur du commerce (HP8648C, Hewlett-Packard, USA) suivi d'un amplificateur de puissance de gain 40 dB (RFS 900-60, RFPA, France). Les puissances incidentes et réfléchies par la cellule TEM étaient contrôlées en temps réel par l'intermédiaire d'un puissance-mètre (E4412A, Hewlett-Packard) qui était connecté à l'entrée de la cellule TEM via un coupleur bidirectionnel. La sortie coaxiale du boîtier d'asservissement de la sonde EO était connecté à un analyseur de spectre pour l'acquisition en temps réel de la puissance en sortie du système (P_{sortie}). L'évolution de la température était visualisée via le programme informatique associé à la sonde.

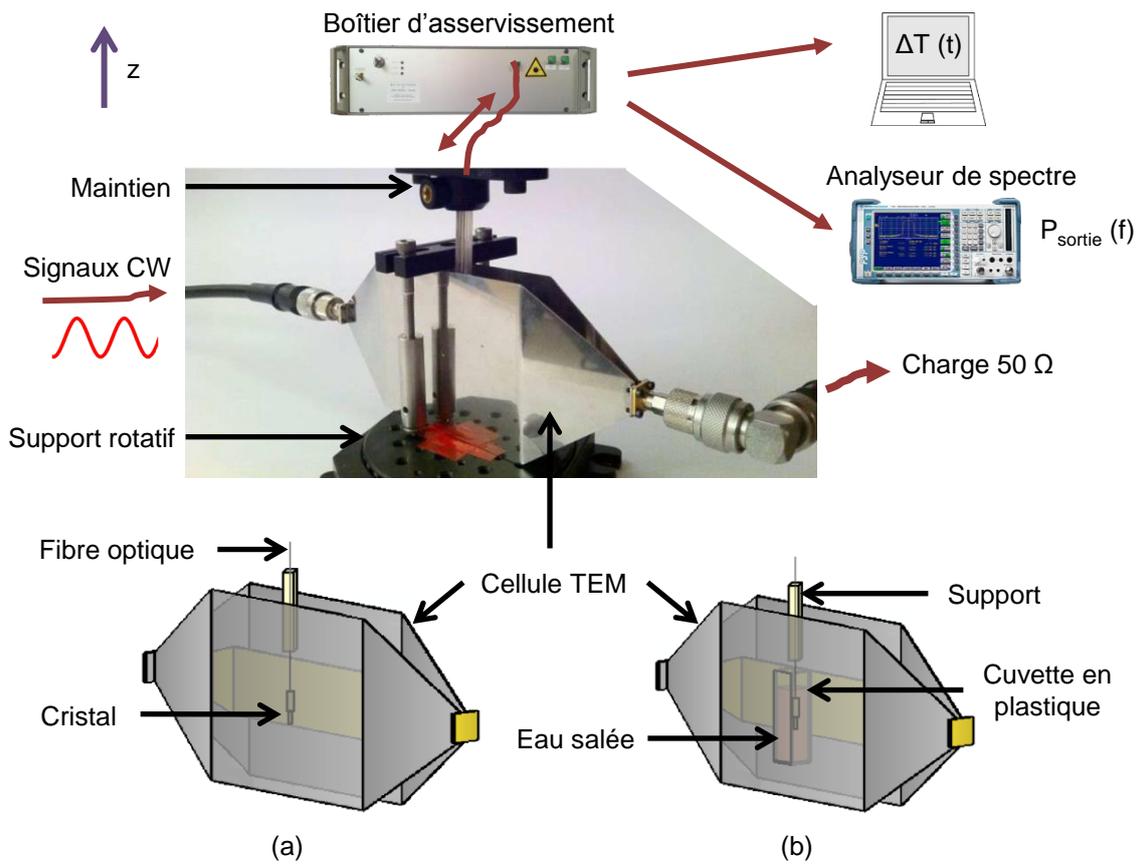


Figure 3.10 – Schéma du montage expérimental pour caractériser la réponse de la sonde électro-optique à des champs électromagnétiques de fréquence $f = 1800$ MHz. Illustration de la position de la sonde dans la cellule TEM vide (a) et dans la cuvette en plastique contenant de l'eau salée (b).

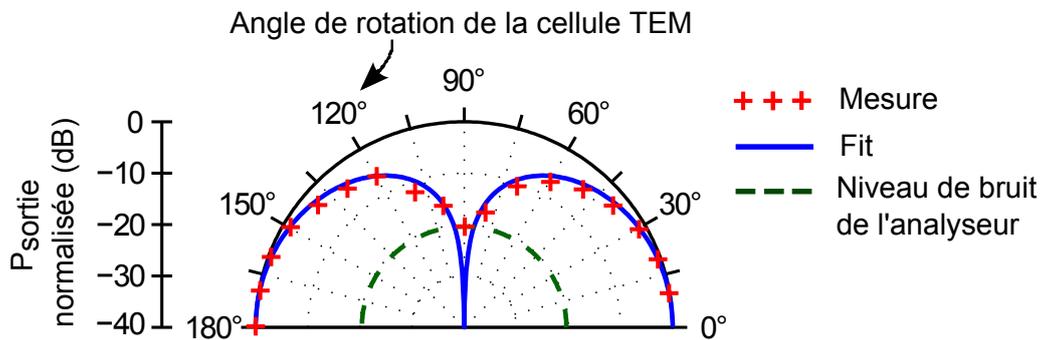


Figure 3.11 – Résultats des mesures de sélectivité avec la sonde positionnée dans la cellule TEM vide. La puissance en sortie de la sonde qui a été tracée est normalisée par rapport au maximum de puissance mesurée.

Les résultats ont montré que la réponse de la sonde était linéaire à ± 0.5 dB sur la plage de puissance allant de -20 dBm (= 10 μ W) à 40 dBm (= 10 W). En deçà de -20 dBm appliqué, le signal en sortie de la sonde était noyé dans le niveau de bruit de l'analyseur de spectre. Le champ électrique minimum qui a pu être mesuré était de 0.77 V/m/Hz^{1/2} dans l'air et de 0.18 V/m/Hz^{1/2} dans la solution d'eau salée.

Les mesures de sélectivité consistaient à tourner la cellule TEM selon l'axe \vec{z} et à évaluer le champ électrique mesuré par la sonde en fonction de l'angle de rotation θ de la cellule TEM ; l'orientation de la sonde était fixée ainsi que la puissance appliquée en entrée de la cellule TEM. Les résultats des mesures alors obtenues dans la cellule vide sont montrés Figure 3.11. Ces résultats ont confirmé la sensibilité de la sonde à une unique composante du champ électrique. En effet, la puissance en sortie de la sonde variait proportionnellement au cosinus carré de θ . Le maximum et le minimum de puissance obtenue à l'analyseur étaient séparés d'un angle de 90 degrés. L'angle correspondant au maximum de puissance mesurée nous a permis de déterminer l'orientation de l'axe de sensibilité de la sonde (sachant que celui-ci est perpendiculaire à l'axe de propagation du faisceau optique dans la sonde). Ces résultats ont été publiés dans [219].

Nous ne retranscrivons pas ici les résultats de quantification simultanée du DAS via la mesure des variations de température et celle du champ électrique induit, mais ils pourront être trouvés dans [220] qui est la publication dédiée à la communication de ces mesures.

Dans les parties à suivre, nous présentons les études de caractérisation de la réponse de la sonde à d'intenses champs électriques pulsés de durée nanoseconde (nsPEFs). Ces études ont été conduites avec la sonde exposée d'une part dans une solution d'eau salée et d'autre part dans l'air. Nous commençons par présenter la caractérisation de la sonde lorsqu'elle était exposée dans la solution d'eau salée. L'applicateur choisi pour l'exposition était une cuvette d'électroporation de distance inter-électrodes de 4 mm. Cet applicateur a été adopté d'une part parce qu'il offre un volume de test suffisant pour y plonger le cristal de la sonde, et d'autre part parce que des simulations spatio-temporelles ont montré que le champ électrique y est homogène [158].

Pour tester les capacités de la sonde à mesurer d'intenses nsPEFs dans l'air, l'applicateur choisi était la cellule TEM. La cuvette d'électroporation vide ne peut servir comme applicateur car elle n'est pas adaptée à 50 Ω dans cette configuration.

3.4 Caractérisation de la sonde EO dans la cuvette d'électroporation soumise à d'intenses nsPEFs

Dans cette partie, nous détaillons les travaux de caractérisation de la réponse de la sonde EO exposée à des nsPEFs dans la cuvette d'électroporation. Dans un premier temps, nous décrivons le montage expérimental et les méthodes employées. Les résultats et les discussions associées seront présentés dans un second temps.

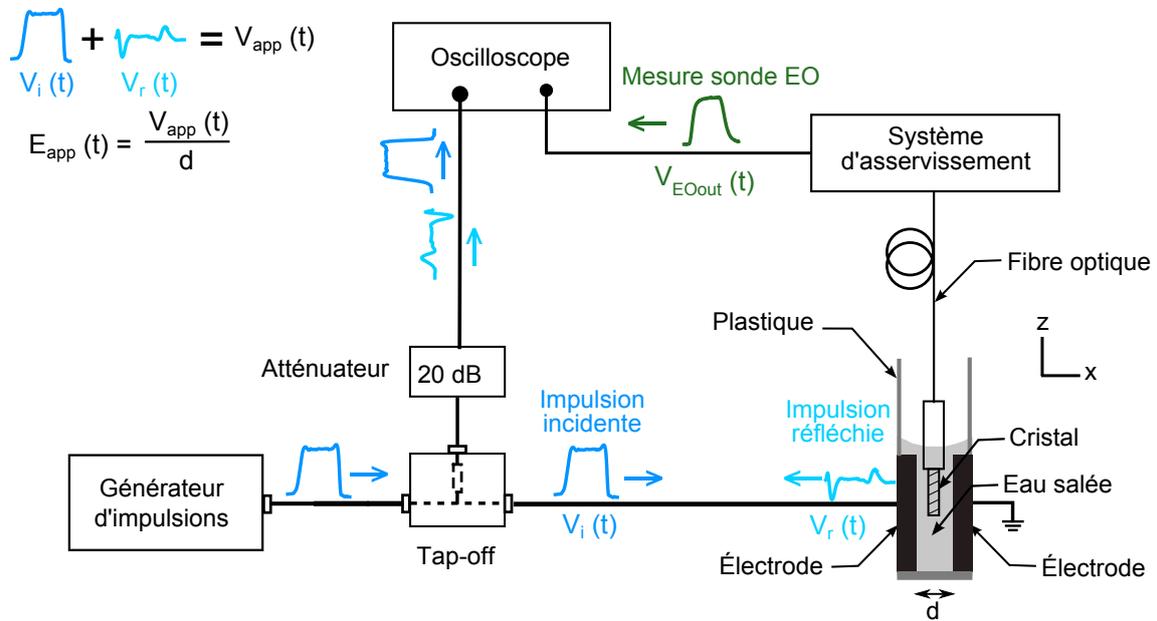
3.4.1 Matériel et méthodes

Le banc expérimental développé pour les tests de la sonde EO dans la cuvette d'électroporation est schématisé Figure 3.12.

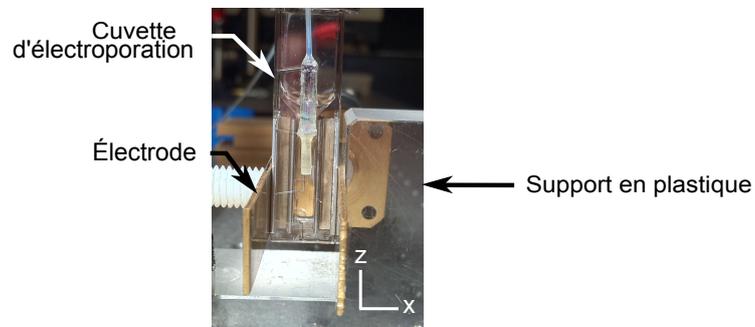
Pour contrôler la réponse de la sonde à des impulsions de diverses durées et temps de montée, trois générateurs d'impulsions haute tension étaient utilisés. Le premier était le générateur en technologie coaxiale que nous avons étudié Section 2.2.2. Il était déclenché par des impulsions optiques de 2.5 ns. Le deuxième générateur était le générateur FPG 10-1SM10 développé par la société allemande FID GmbH. Ce générateur délivre des impulsions de durée 11.2 ns, d'amplitude réglable jusqu'à 10 kV et de temps de montée/descente de 1 ns. Le déclenchement du générateur était commandé de manière externe par un générateur de fonctions basse tension (Agilent 33210A) lui-même piloté depuis un programme maison LabVIEW. Ce générateur sera désormais désigné comme le générateur « FID ». Le troisième générateur était un générateur de la société Horus Laser délivrant des impulsions de 2.4 ns, d'amplitude réglable jusqu'à 1.8 kV et de temps de montée/descente de 800 ps. Ce générateur sera appelé « le générateur Horus ».

L'applicateur était une cuvette d'électroporation commerciale (BTX electroporation cuvette, BTX, USA) de distance inter-électrode de 4 mm et de dimensions extérieures 44 mm (hauteur) \times 12 mm \times 12 mm. Dans cette cuvette, la surface des électrodes en contact avec l'échantillon s'élève à 10 mm (largeur) \times 21 mm (hauteur). Notre échantillon était une solution d'eau salée de volume 800 μ l. La quantité de sel (NaCl) dissous dans l'eau était telle que la conductivité de l'échantillon valait 0.31 S/m à basse fréquence ($f < 200$ MHz). Comme expliqué Section 2.3.2.1, le choix de cette conductivité assure une adaptation d'impédance à 50 Ω satisfaisante jusqu'à 70 MHz. La permittivité relative de la solution était $\epsilon_r \approx 78$ à température ambiante et pour les fréquences d'intérêt.

La sonde électro-optique était plongée verticalement dans la cuvette et tournée selon son axe optique afin que son axe de sensibilité soit perpendiculaire au plan des électrodes (donc orienté selon \vec{x}). La tension de sortie de la sonde $V_{EOout}(t)$ était visualisée en temps réel sur l'oscilloscope à 12 GHz de bande passante.



(a)



(b)

Figure 3.12 – Montage expérimental pour tester les performances de la sonde électro-optique dans la cuvette d'électroproportion. (a) Schéma du montage. (b) Photographie du positionnement de la sonde dans la cuvette d'électroproportion.

La cuvette d'électroporation était connectée au système en amont via deux électrodes en cuivre soudées à l'extrémité d'un câble coaxial de type RG 214 (voir la Figure 2.18b pour une photographie). Le tap-off, dont le principe de fonctionnement a été décrit Section 2.4.3.1, était inséré entre le générateur et l'applicateur pour le contrôle des impulsions de tension incidentes et réfléchies. La longueur des câbles coaxiaux entre la sortie non atténuée du tap-off et la cuvette était choisie suffisamment longue pour que les signaux réfléchis ne se superposent pas au signal incident au niveau de l'oscilloscope.

Le champ électrique induit dans la cuvette d'électroporation soumise à des nsPEFs n'avait jamais été mesuré auparavant. Toutefois, des études numériques ont montré que la répartition spatiale du champ électrique induit y est homogène, et que celui-ci est dirigé suivant la perpendiculaire au plan des électrodes [158]. L'intensité du champ électrique appliqué dans la cuvette d'électroporation (E_{app}) peut ainsi être indirectement évaluée à partir de $\Delta V_{app}(t)$ (en volt), défini comme la différence de tension appliquée à la cuvette, suivant :

$$E_{app}(t) = \frac{\Delta V_{app}(t)}{d} \quad (\text{V/m}), \quad (3.5)$$

où d (m) est la distance inter-électrodes.

Dans notre montage expérimental, $\Delta V_{app}(t)$ est obtenu via les mesures de l'impulsion de tension incidente et de l'impulsion de tension réfléchie. Comme expliqué Section 2.4.3.1, la méthode consiste à superposer temporellement l'impulsion de tension réfléchie à l'impulsion de tension incidente puis à additionner leurs amplitudes. Le résultat obtenu correspond alors à $\Delta V_{app}(t)$ sachant qu'une des électrodes de la cuvette est à la masse.

La tension en sortie de la sonde et mesurée à l'oscilloscope, $V_{EOout}(t)$ (en volt), est proportionnelle à l'intensité de la composante du champ électrique mesurée par la sonde à l'intérieur de l'échantillon. La valeur du facteur de calibration n'était cependant pas connue. Nous appellerons ce facteur α et le définirons comme :

$$\alpha = \frac{E_{app}}{V_{EOout}} \quad (\text{m}^{-1}). \quad (3.6)$$

Le facteur de calibration α de la sonde dépend de la permittivité du milieu dans lequel le cristal est plongé. Pour un même champ électrique dans le milieu sondé, le champ électrique induit à l'intérieur du cristal ($E_{cristal}$) dépend en effet du rapport des permittivités entre le cristal et le milieu sondé. Ceci s'explique par les équations de continuité régissant le champ électrique à l'interface de deux milieux de propriétés électriques différentes. Ces équations de continuité du champ électrique ont été abordées précédemment Section 2.4.3.2.

Pour déterminer la valeur de α dans nos conditions d'expérimentation, une vingtaine de mesures simultanées de E_{app} (via V_i et V_r) et de V_{EOout} ont été réalisées lorsque la cuvette était exposée aux impulsions de tension délivrées par nos générateurs. Ces mesures ont été réparties sur plusieurs mois. Le prototype présentait quelquefois des

instabilités de fonctionnement qui ne permettaient pas de l'utiliser de manière optimale. Le fonctionnement optimal ou non de la sonde était connu en temps direct grâce à des informations indiquées sur le programme informatique en communication avec le boîtier d'asservissement. Les modèles de sondes ultérieurs au prototype étudié ne présentent plus ces instabilités.

Des mesures de variations de température ont également été réalisées. Dans un souci de clarté, les méthodes et résultats correspondants seront présentés dans un paragraphe séparé.

3.4.2 Résultats des mesures du champ électrique

Dans la configuration donnée, les acquisitions simultanées de $V_i(t)$, $V_r(t)$ et $V_{EOout}(t)$ ont conduit à un facteur de calibration α de $2500 \pm 375 \text{ m}^{-1}$. L'incertitude associée à la valeur est liée à l'incertitude estimée sur la mesure de V_{EOout} .

La Figure 3.13 présente des résultats de superposition temporelle du champ électrique mesuré par la sonde et du champ électrique appliqué E_{app} déduit des mesures de tension via le tap-off. À droite, sont données l'allure temporelle de l'impulsion de tension incidente et celle de l'impulsion de tension réfléchie, qui ont été acquises pendant les mesures. L'échelle des amplitudes est la même pour les deux impulsions (incidente et réfléchie).

De manière générale, nous observons un bon accord entre la durée et les fronts de montée/descente des impulsions mesurées par la sonde EO et de celles des impulsions électriques appliquées. Les résultats confirment également que la cuvette d'électroporation dégrade les fronts de montée des impulsions incidentes de quelques nanosecondes ou moins. En effet, l'impulsion délivrée par le générateur HORUS, dont la durée initiale est de 2.4 ns, est allongée à 4 ns à l'intérieur de la cuvette.

La Figure 3.14 propose une représentation fréquentielle des impulsions. Elle superpose le spectre de l'impulsion de tension incidente à celui de l'impulsion de tension appliquée et de l'impulsion mesurée par la sonde EO. Les Figure 3.14a, Figure 3.14b et Figure 3.14c montrent les résultats obtenus lorsque l'impulsion incidente était délivrée respectivement par le générateur coaxial, le générateur FID et le générateur HORUS. Nous observons que les hautes fréquences de l'impulsion effectivement appliquée sont atténuées par rapport à celles de l'impulsion incidente. Ces résultats ne sont pas surprenants sachant que la bande passante à -10 dB de la cuvette d'électroporation utilisée est limitée à 70 MHz, comme montré précédemment Section 2.3.2.1.

Par ailleurs, nous avons également mis en évidence que la réponse de la sonde est linéaire pour des intensités de champs électriques appliqués jusqu'à 1 MV/m.

3.4. Caractérisation de la sonde EO dans la cuvette d'électroporation soumise à d'intenses nsPEFs.

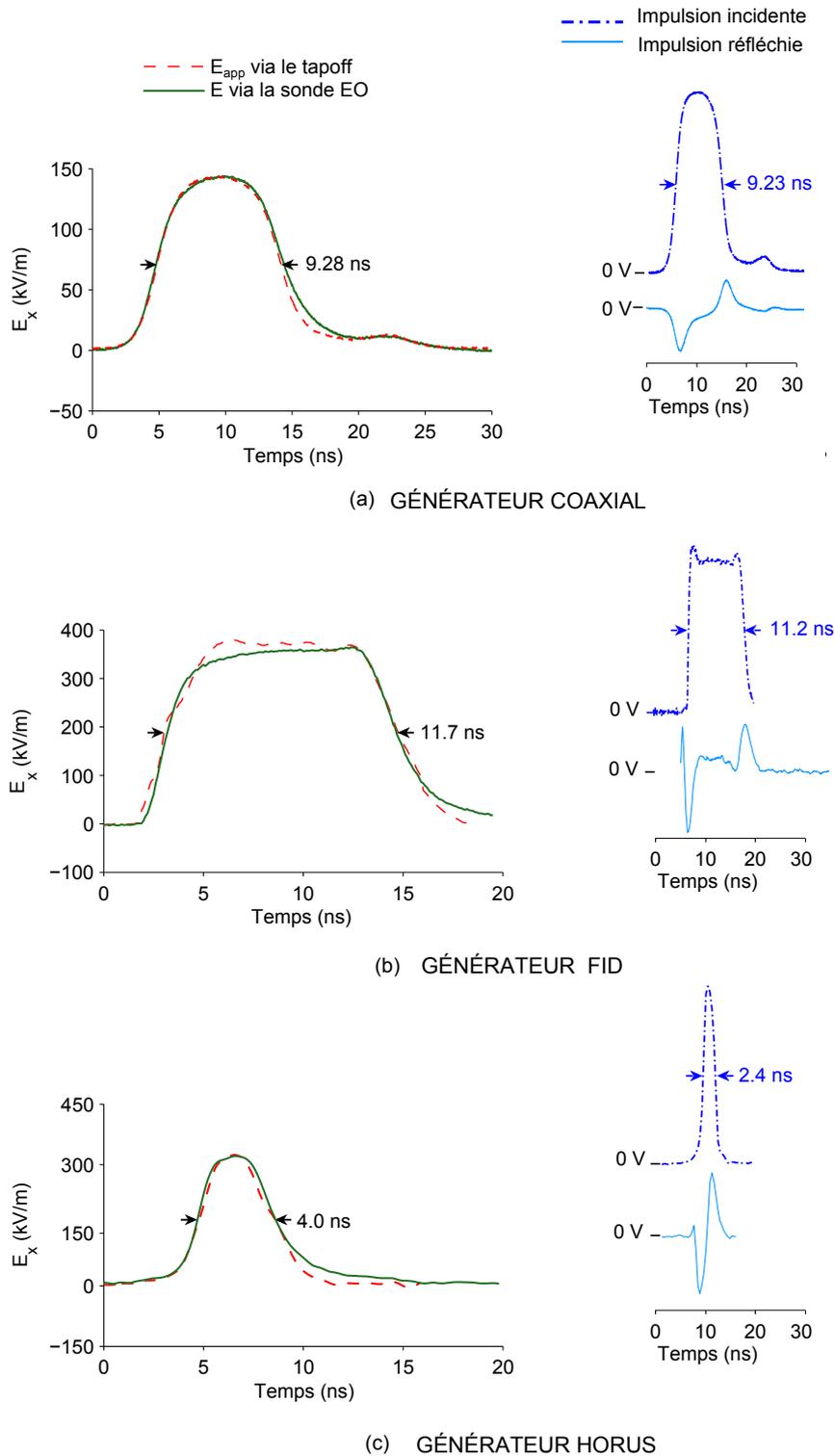
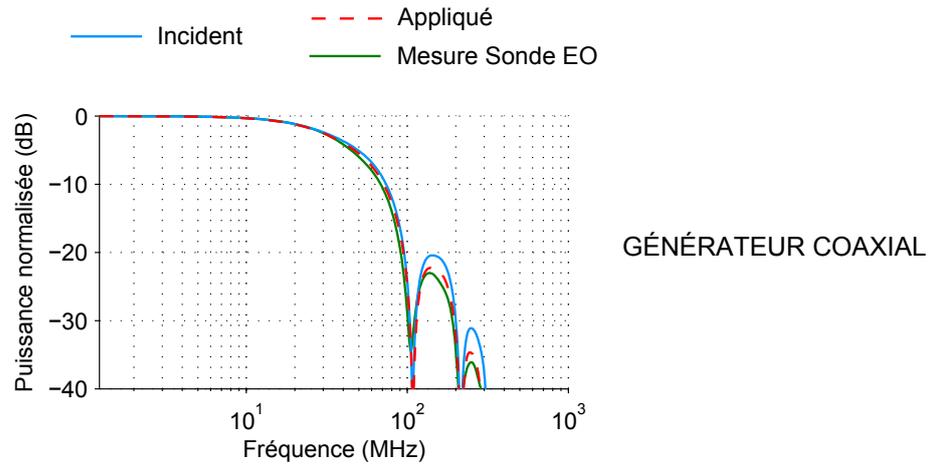
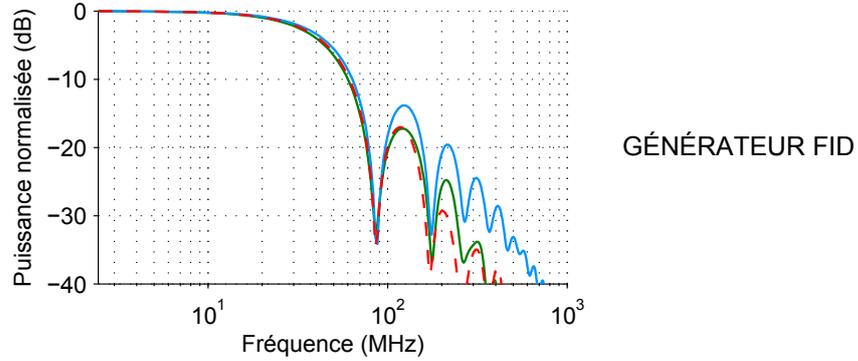


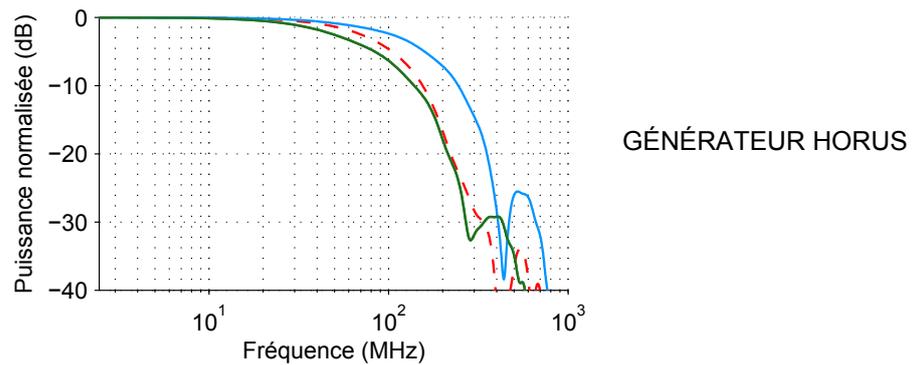
Figure 3.13 – Champ électrique dans la cuvette d'électroporation remplie d'eau salée ($\epsilon_r = 78$). Exemple avec le générateur coaxial (a), le générateur FID (b) et le générateur HORUS (c). Colonne de gauche : superposition temporelle de l'intensité du champ électrique mesuré par la sonde électrooptique suivant l'axe \vec{x} et de celle du champ électrique appliqué E_{app} déduit des mesures de tension via le tap-off. Colonne de droite : allure temporelle de l'impulsion de tension incidente et celle de l'impulsion de tension réfléchie obtenues lors des mesures de la colonne de gauche.



(a)



(b)



(c)

Figure 3.14 – Superposition du spectre des impulsions incidente et appliquée ainsi que de l'impulsion mesurée par la sonde EO, pour une impulsion incidente délivrée par le générateur coaxial (a), le générateur FID (b) et le générateur Horus (c).

3.4.3 Quantification des variations de température

Des mesures simultanées de température ont été enregistrées lorsque la cuvette était connectée au générateur FID délivrant des impulsions de 1.8 kV. Un nombre total de 120000 impulsions était alors appliqué avec une fréquence de répétition de 1 kHz. Pour s'assurer de la stabilité de la température dans la cuvette avant l'exposition, le générateur était déclenché 40 secondes après le début de l'acquisition des données. La température était acquise au rythme de 4 points par seconde.

Pour déterminer l'incertitude de mesure, les variations temporelles de la température $\Delta T(t)$ étaient modélisées par :

$$\Delta T(t) = \begin{cases} 0 & \text{pour } t < t_{ON} \\ A_1 \cdot \exp\left(-\frac{B_1}{t}\right) + A_2 \cdot \exp\left(-\frac{B_2}{t}\right) & \text{pour } t \geq t_{ON}, \end{cases} \quad (3.7)$$

où A_1 , A_2 , B_1 et B_2 sont des constantes, T la température, t le temps et t_{ON} l'instant où le générateur est déclenché. Physiquement, une exponentielle modélise l'évolution vers un nouvel équilibre de la température dans l'échantillon tandis que l'autre exponentielle modélise l'influence de la constante de temps d'inertie thermique du cristal (c'est-à-dire son temps de réponse) [221]. À partir du meilleur modèle au sens des moindres carrés, l'incertitude de mesure était évaluée comme deux fois l'écart-type entre le modèle et les mesures. Sachant que la fonction densité de probabilité associée était supposée normale (loi gaussienne), l'incertitude de mesure calculée est donnée avec un intervalle de confiance de 95% .

Un résultat de la mesure de température est montré Figure 3.15. L'exposition a conduit à une élévation totale de température inférieure à 0.3 °C. L'incertitude de mesure obtenue s'élevait à ± 22 mK. Cette incertitude de mesure est inférieure d'un ordre de grandeur à celle de la sonde à fibre optique que nous utilisons d'ordinaire pour le contrôle de la température (LXT-812, Lumasense, CA, USA). Cette sonde à fibre optique disponible à la vente nous a par exemple servi pour la macrosimétrie expérimentale à l'intérieur d'une cuvette en plastique exposée dans une cellule TEM à des champs électromagnétiques de fréquence 2500 MHz. Cette étude a été réalisée à l'université Carol Davila de médecine et de pharmacie à Bucarest (Roumanie). L'objectif était de caractériser la capacité du système d'exposition à chauffer par micro-ondes, de manière contrôlée et définie, le milieu de culture contenu dans la cuvette en plastique. Les chercheurs de l'université Carol Davila s'intéressent en effet au changement d'état des membranes cellulaires en fonction de la température. Un premier système de chauffage

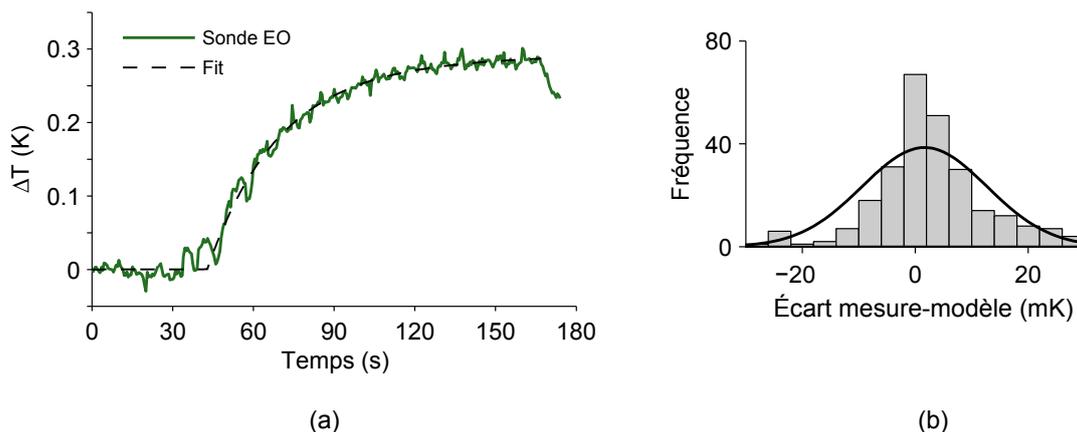


Figure 3.15 – Résultats des mesures des variations de température et modèle numérique associé. (a) En trait plein l'évolution temporelle de la température mesurée par la sonde EO dans la cuvette d'électroporation lorsque le milieu était exposé à 120000 impulsions électriques de 11.7 ns, d'intensité 320 kV/m et de fréquence de répétition de 1 kHz. Le générateur était déclenché à $t = 40$ s donc le temps d'exposition s'élevait à 2 minutes. En trait pointillé le modèle à partir duquel l'incertitude de mesure a été évaluée. (b) Histogramme représentant la répartition de l'erreur au sens des moindres carrés entre la mesure et le modèle, et en trait plein loi gaussienne associée.

micro-ondes avait été développé antérieurement. Mais ce système, basé sur un câble coaxial en circuit ouvert amené sur le dessus de la cuvette, ne permettait pas de chauffer l'échantillon de manière uniforme [222]. Le système d'exposition basé sur la cellule TEM a permis des améliorations dans ce sens et les résultats ont été communiqués à *BioEM2013, Joint Meeting of the BioElectromagnetics Society and the European BioElectromagnetics Association* [223].

Pour en revenir à la sonde EO, les résultats de sa caractérisation dans la cuvette d'électroporation ont été publiés dans *IEEE Microwave and Wireless Components Letters* [224] et présentés à *13th International Conference on Microwave and High Frequency Heating* [225], *2011 International Bioelectrics Symposium* [226] et *EBEA 2011, 10th International Conference of the European BioElectromagnetics Association* [227].

Dans la partie à suivre, nous présentons des résultats de simulations numériques qui ont été réalisées en complément des mesures électro-optique de champ électrique. L'objectif de ces simulations était d'évaluer dans quelle mesure la présence de la sonde perturbe le champ électrique généré dans la cuvette d'électroporation. En effet, la sonde électro-optique n'ayant pas la même permittivité que le milieu sondé, nous savons qu'elle n'est pas transparente au champ électrique.

3.4.4 Simulations numériques

L'influence de la présence de la sonde sur le champ électrique généré dans la cuvette d'électroporation a été étudiée à l'aide d'un script implémentant la méthode des différences finies. Ce script permettait de calculer et visualiser en 2D les potentiels et les champs électriques dans la structure modélisée. Nous avons supposé l'approximation des régimes quasi-stationnaires sachant que les principales longueurs d'onde des impulsions délivrées en expérimentation sont grandes devant la distance séparant les électrodes de la cuvette.

La Figure 3.16 schématise la structure à deux dimensions que nous avons modélisée. Les électrodes étaient considérées comme des conducteurs parfaits tandis que la solution et la sonde ont été modélisées comme des diélectriques parfaits. La permittivité relative de la solution était fixée à 78, celle du cristal à 42 et celle de la partie optique de la sonde à 7 (il s'agit essentiellement de verre). La structure était maillée avec un maillage rectangulaire de dimensions $\Delta x = \Delta z = 0.1$ mm. Concernant les conditions aux limites, le potentiel imposée à l'électrode de gauche était de $V_+ = 2$ V et celui à l'électrode de droite de $V_- = 0$ V (conditions aux limites dites de Dirichlet). Sachant que la distance entre les électrodes modélisées étaient de 4 mm, le champ électrique appliqué s'élevait donc à 250 kV/m. Les conditions aux limites de Neumann étaient imposées aux frontières du domaine de simulation où les conditions de Dirichlet n'étaient pas appliquées. Ces conditions imposent que les gradients de potentiel soient nuls aux interfaces considérées et permettent ainsi de simuler l'espace libre. Pour comparaison, la distribution du champ électrique a également été calculée dans la structure ne contenant pas la sonde.

Les Figure 3.17a et Figure 3.17b montrent les résultats obtenus respectivement avec et sans la sonde modélisée. Les cartographies tracées montrent la distribution spatiale de l'intensité de la composante du champ électrique suivant \vec{x} (E_x). En l'absence de la sonde, nous observons comme attendu que le champ électrique entre les électrodes est homogène

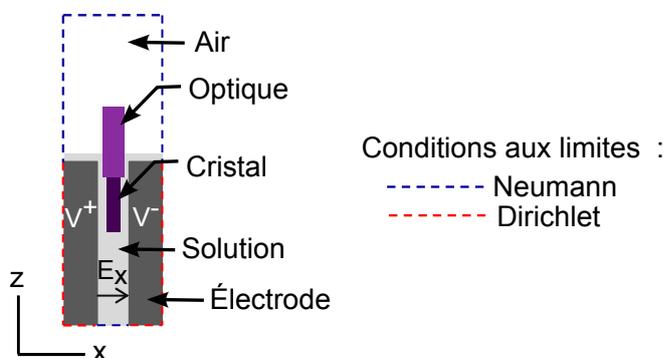


Figure 3.16 – Structure modélisée pour les calculs électrostatiques à deux dimensions.

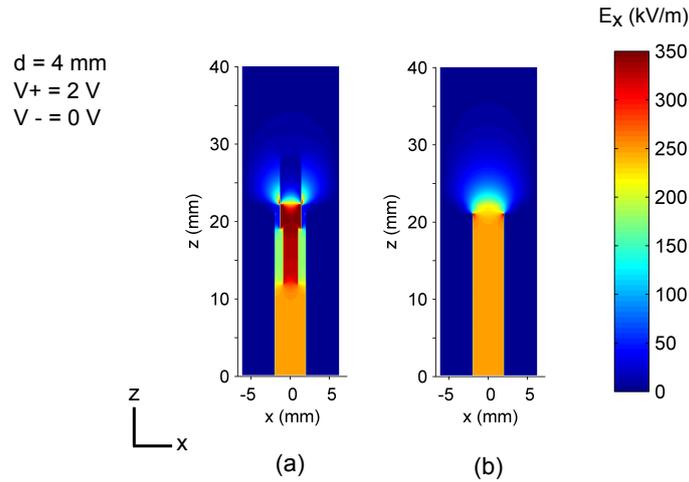


Figure 3.17 – Distribution 2D du champ électrostatique dans la cuvette d'électroporation en présence de la sonde (a) et en l'absence de la sonde (b). La différence de potentiel entre les électrodes s'élève à 2 kV.

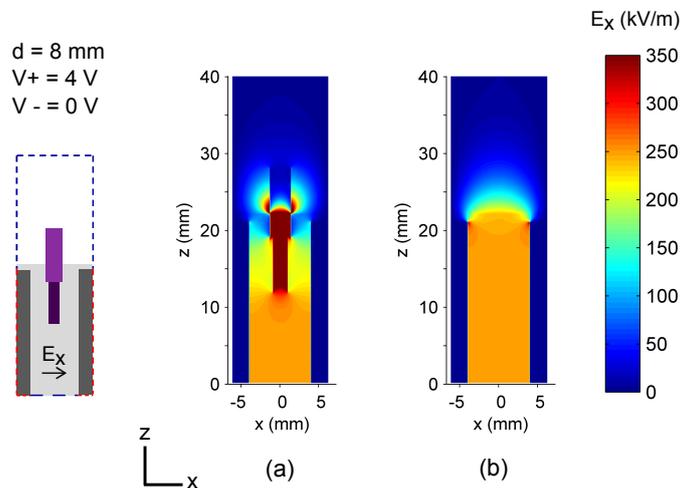


Figure 3.18 – Distribution 2D du champ électrostatique dans une cuvette d'électroporation dont la distance inter-électrodes serait de double de la cuvette classique. Résultats en présence de la sonde (a) et en l'absence de la sonde (b). La différence de potentiel entre les électrodes s'élève à 4 kV.

et s'élève à 250 kV/m. En présence de la sonde, il apparaît que E_x n'est pas modifié dans l'espace sous la sonde. À hauteur de la sonde, la distribution de E_x est homogène mais son intensité est réduite à 179 kV/m. Notons que cette atténuation correspondant à un scénario « pire cas » sachant qu'en réalité, le cristal est cylindrique et non pas rectangulaire et son diamètre ne représente effectivement qu'un cinquième de la dimension des électrodes suivant \vec{y} . La question s'est tout de même posée de savoir comment le champ électrique évoluerait à hauteur de la sonde si la distance inter-électrodes était augmentée, mais que le champ électrique appliqué entre les électrodes était conservé. Nous avons donc simulé un modèle de cuvette d'électroporation de mêmes dimensions extérieures, mais dont la distance inter-électrodes était le double. Pour conserver le champ électrique appliqué, V_+ a également été doublé. Les résultats obtenus sont montrés

Figure 3.18. En l'absence de la sonde, le champ électrique moyen est toujours très proche de 250 kV/m dans la zone que couvrirait le cristal s'il était présent (il y vaut précisément 249.4 kV/m). Par rapport à la configuration précédente où la distance inter-électrodes était de 4 mm, le champ électrique est cependant plus intense le long du cristal et donc à l'intérieur de celui-ci. Plus précisément, le champ électrique moyenné dans le cristal est de 20% supérieur à celui dans le cristal plongé entre les électrodes séparées de 4 mm. En pratique, cela signifie que le facteur de calibration de la sonde, tel que défini par l'équation 3.6, peut varier suivant l'applicateur dans lequel le milieu sondé est exposé.

Dans tous les cas, nous savons que le facteur de calibration de la sonde doit être déterminé pour chaque milieu de permittivité différente. Ainsi, pour que la sonde EO puisse servir à la mesure d'un champ électrique à l'extérieur de la cuvette d'électroporation (par exemple pour déterminer si celle-ci rayonne), son facteur de calibration doit être déterminé dans l'air. Comme expliqué précédemment, la cuvette d'électroporation vide ne peut pas servir pour exposer la sonde à d'intenses nsPEFs. En effet, son impédance Z serait alors égale à $Z = d/(S \cdot j2\pi\epsilon_0 f)$; la cuvette ne serait donc pas adaptée à 50 Ω . En conséquence, la calibration de la sonde dans l'air nécessite un autre applicateur. Comme mentionné Section 2.3.3.2, la cellule TEM est un exemple d'applicateur adapté à la calibration de sondes de champ électrique dans l'air.

3.5 Caractérisation de la sonde EO dans les cellules TEM vides soumises à d'intenses nsPEFs

Dans cette partie, nous présentons l'étude des capacités de la sonde EO à mesurer d'intenses nsPEFs dans l'air. Les applicateurs utilisés pour ces travaux étaient les cellules TEM dont l'aptitude à délivrer d'intenses impulsions ultracourtes a été montrée au chapitre précédent.

3.5.1 Matériel et méthodes

L'étude expérimentale s'est appuyée sur le même montage expérimental que celui détaillé Section 2.4.3.1, à ceci près que les générateurs employés étaient non seulement un modèle du générateur HORUS mais également le générateur en technologie coaxiale. Comme pour toutes les études précédentes, le tap-off était inséré entre le générateur et la cellule TEM, pour le contrôle en temps réel des impulsions de tension incidentes et réfléchies.

Le générateur coaxial était polarisé à 3 kV et délivrait des impulsions de 8.8 ns avec une fréquence de répétition de 10 Hz. Le générateur HORUS était quant à lui polarisé à 4 kV et sa fréquence de répétition était fixée à 50 Hz. Les impulsions délivrées étaient de forme

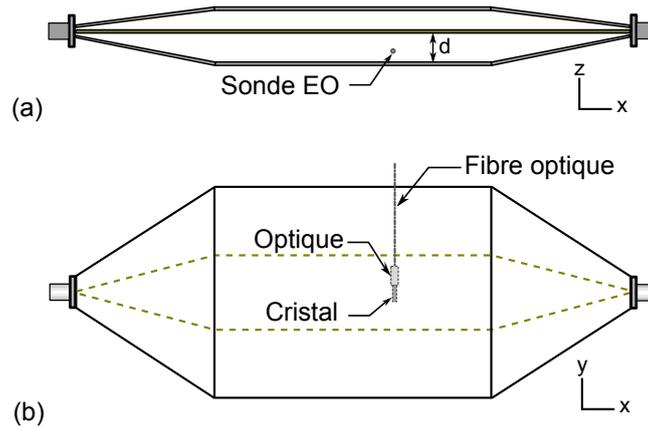


Figure 3.19 – Calibration de la sonde EO dans l'air ($\epsilon_r = 1$) : représentation schématique du positionnement de la sonde à l'intérieur de la cellule TEM. (a) Vue latérale et (b) vue de haut, les plaques étant rendues transparentes.

monopolaire ou bipolaire et leur durée totale était ajustée entre 1.0 et 1.4 ns. Les impulsions enregistrées par l'oscilloscope étaient moyennées sur 500 impulsions consécutives. Les expériences employant le générateur coaxial ont été conduites uniquement dans la grande cellule TEM, alors que celles employant le générateur HORUS l'ont été dans la grande, la moyenne ainsi que la petite cellule TEM décrites précédemment Section 2.4.3. La sonde EO était insérée horizontalement sous le septum comme montré sur le schéma de la Figure 3.19. Son axe de sensibilité était orienté suivant l'axe $-\vec{z}$.

Comme pour la cuvette d'électroporation, le champ électrique appliqué dans la cellule TEM, E_{app} (V/m), était calculé à partir de la mesure des impulsions de tension incidente (V_i en volt) et réfléchie (V_r en volt) selon $E_{app} = (V_i + V_r)/d$ où d (m) est la distance séparant le septum de la plaque métallique inférieure de la cellule TEM employée.

Le facteur de calibration de la sonde dans l'air sera noté β (m^{-1}). Ce facteur a été calculé selon la même méthode que celle employée au paragraphe 3.4.1 pour le calcul du facteur de calibration α dans la cuvette d'électroporation, à savoir $\beta = E_{app}/V_{EO_{out}}$ où $V_{EO_{out}}$ est la tension (en volt) mesurée en sortie du boîtier d'asservissement de la sonde EO.

3.5.2 Résultats expérimentaux

Le traitement des différentes mesures ont conduit à un facteur de calibration de $\beta = 35000 \pm 1750 m^{-1}$. Comme pour le facteur de calibration dans l'air, l'incertitude sur β est liée à l'incertitude sur la mesure de la sonde électro-optique.

La Figure 3.20 montre l'allure temporelle du champ électrique pulsé mesuré par la sonde EO dans la grande cellule TEM lorsque celle-ci était connectée au générateur coaxial. La mesure est superposée au champ électrique appliqué E_{app} . Comme attendu, la forme de l'impulsion mesurée est très similaire à celle de l'impulsion appliquée. L'impulsion de

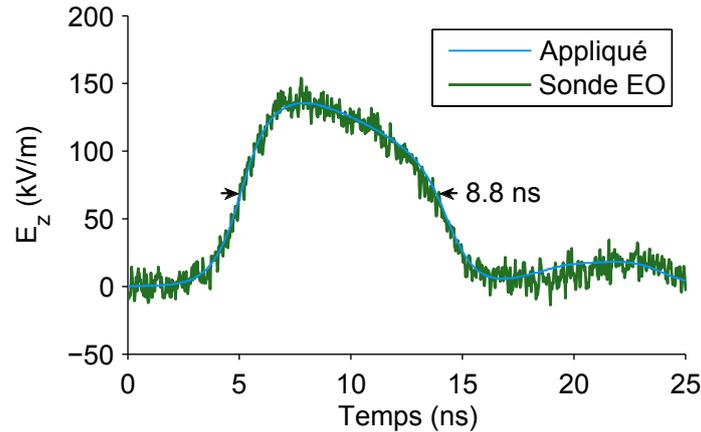


Figure 3.20 – Exemple de superposition temporelle de l'impulsion transmise calculée à partir des mesures de tension via le tap-off et de l'impulsion mesurée par la sonde EO dans la grande cellule TEM connectée au générateur en technologie coaxiale.

faible intensité apparaissant autour de $t = 22$ ns est délivrée par le générateur. Il ne s'agit pas d'une impulsion réfléchie au sein du système d'exposition.

La Figure 3.21 montre des mesures obtenues lorsque le générateur HORUS délivrait des impulsions monopolaires (colonne de droite) et bipolaires (colonne de gauche), à la grande cellule TEM (Figure 3.21a–b), à la moyenne cellule TEM (Figure 3.21c–d) et à la petite cellule TEM (Figure 3.21e–f). Le champ électrique généré étant d'autant plus fort que d est faible, le rapport signal sur bruit est le meilleur dans la petite cellule TEM. L'impulsion de faible intensité apparaissant autour de 25–30 ns n'est pas une impulsion délivrée par le générateur. Comme expliqué Figure 3.22, il s'agit de l'impulsion réfléchie par la cellule TEM qui revient vers celle-ci après réflexion à la sortie du générateur. Il y a réflexion sans changement de polarité puisque le générateur est en circuit ouvert lorsqu'il est au repos.

De manière générale, nous observons une très bonne corrélation entre l'impulsion appliquée calculée à partir des mesures de tension et l'impulsion mesurée par la sonde EO dans la zone de test.

Une fois encore, nous pouvons questionner l'influence de l'encombrement de la sonde sur la mesure, en particulier dans la petite cellule TEM. En expérimentation, nous n'avons pas observé de tendance particulière entre la valeur de β dans la grande, la moyenne et la petite cellule TEM. La valeur de β semble donc être une bonne approximation du facteur de calibration de la sonde EO dans l'air.

Avec ces résultats expérimentaux, nous avons montré la capacité de la sonde EO à mesurer d'intenses nsPEFs dans un milieu aqueux et dans l'air. Son fonctionnement validé, nous l'avons ensuite utilisée pour évaluer les impulsions électriques induites dans un milieu de culture exposé « sans contact » à l'intérieur de la grande cellule TEM. De telles mesures n'avaient jamais été publiées auparavant.

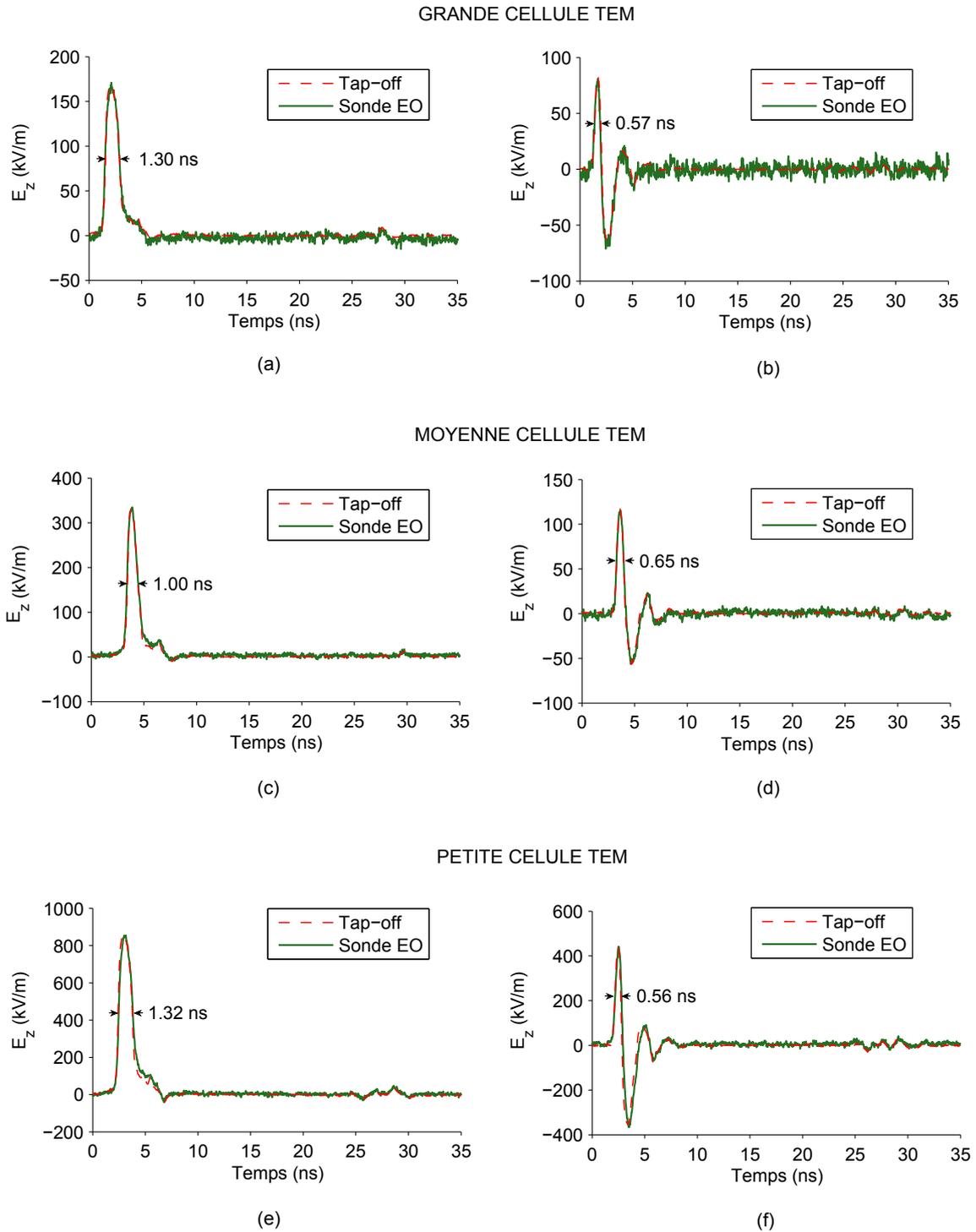


Figure 3.21 – Exemples de superposition temporelle de l'impulsion calculée à partir des mesures de tension et de l'impulsion mesurée par la sonde EO dans la zone inférieure de la grande cellule TEM (a–b), de la moyenne cellule TEM (c–d) et de la petite cellule TEM (e–f). Les impulsions incidentes étaient délivrées par le générateur HORUS polarisé à 4 kV.

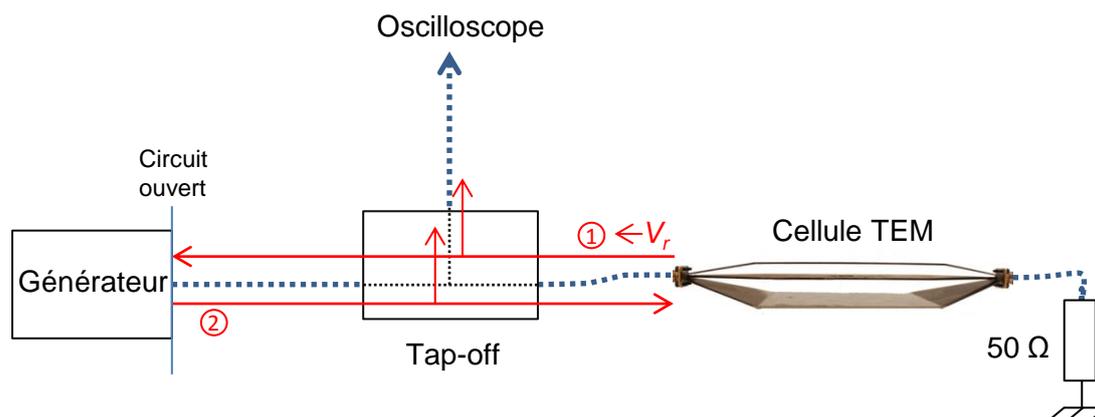


Figure 3.22 – Impulsion de tension réfléchie par la cellule TEM qui revient vers celle-ci après réflexion à la sortie du générateur en circuit ouvert.

3.6 Application à la mesure du champ électrique induit à l'intérieur des échantillons exposés « sans contact » dans la grande cellule TEM

Dans cette partie, nous présentons les résultats de mesure de champ électrique obtenus à l'intérieur d'un milieu de culture exposé à des nsPEFs au travers de la grande cellule TEM. Comme pour les parties précédentes, nous commençons par décrire le matériel et les méthodes employées, puis nous présentons et analyserons les résultats obtenus. Pour finir, nous confronterons les résultats expérimentaux avec un résultat de simulation numérique basée sur la méthode des différences finies dans le domaine temporel.

3.6.1 Matériel et méthodes

Le dispositif expérimental était le même que celui décrit Section 2.4.3.1 et schématisé Figure 2.40.

Le modèle de cellule TEM utilisé était la grande cellule TEM. L'échantillon était un milieu de culture cellulaire à température ambiante et dont la permittivité et la conductivité électrique étaient respectivement de 77 et 1.5 S/m (pour $f < 200$ MHz). L'échantillon de volume 4 ml était exposé dans une boîte de Petri posée au centre de la plaque inférieure de la cellule TEM. Le diamètre de la boîte de Petri était de 35 mm. La Figure 3.23 montre une photographie de la position de la sonde électro-optique dans l'échantillon. La sonde électro-optique était plongée à l'horizontal au centre de l'échantillon grâce à deux petites encoches, une dans le haut de la paroi latérale de la boîte de Petri et une autre dans le rebord de son couvercle. La sonde était pivotée afin

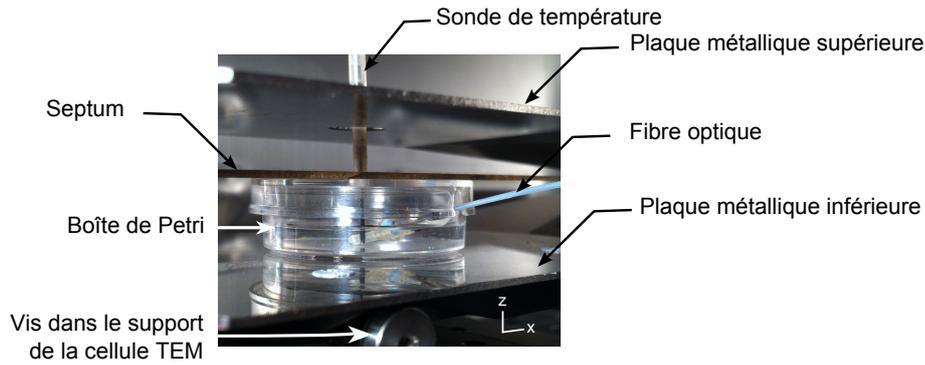


Figure 3.23 – Positionnement de la sonde électro-optique à l'intérieur de l'échantillon dans la boîte de Petri. La sonde insérée verticalement dans la boîte de Petri est une sonde de température à fibre-optique du commerce (LXT-812, Lumasense, CA, USA) ; les mesures réalisées avec cette sonde ne sont pas exploitées dans cette partie du manuscrit.

de mesurer la composante E_z du champ électrique ($E_z = -\vec{E} \cdot \vec{z}$). Pour des raisons pratiques, l'axe optique du cristal ne pouvait être rigoureusement placé suivant \vec{y} . L'axe de sensibilité de la sonde n'était donc pas exactement tangent à \vec{z} . La mesure de E_z n'était toutefois pas compromise car la sonde offre une marge de manœuvre d'environ $\pm \pi/12$ radians ($\pm 15^\circ$) [219]. L'intensité de E_z a également été mesurée à côté de la boîte de Petri, mais toujours sous le septum, pour vérifier que la présence de la boîte de Petri ne modifie pas le champ électrique attendu dans la cellule TEM.

Les impulsions électriques étaient délivrées par le générateur HORUS polarisé à 4 kV. La forme des impulsions était bipolaire ou monopolaire et leur durée totale de 1.2 ns. Le facteur de calibration β a été appliqué pour déterminer l'intensité du champ électrique mesuré par la sonde EO en dehors de la boîte de Petri. Dans le milieu de culture, c'est le facteur de calibration α qui a été appliqué. Même s'il s'agissait du facteur de calibration obtenu dans la cuvette d'électroporation, il permettait tout au moins d'avoir une idée de l'intensité du champ électrique induit dans l'échantillon. Dans tous les cas, le choix d'un facteur de calibration, plutôt que d'un autre, n'influence pas l'allure temporelle de l'impulsion mesurée. L'impulsion mesurée par la sonde EO dans l'échantillon était ensuite superposée temporellement soit à l'impulsion incidente mesurée via le tap-off soit à l'impulsion mesurée par la sonde EO à l'extérieur de la boîte de Petri. Le spectre fréquentiel de chaque impulsion était calculé par une transformée de Fourier rapide. Pour les impulsions mesurées par la sonde EO, le calcul numérique des spectres était précédé par un lissage des données obtenues dans le domaine temporel. Ce lissage était réalisé par un filtre à moyenne glissante dont la fenêtre temporelle de moyennage était ajustée entre 0.15 et 0.35 ns suivant les mesures et les portions de courbe considérées.

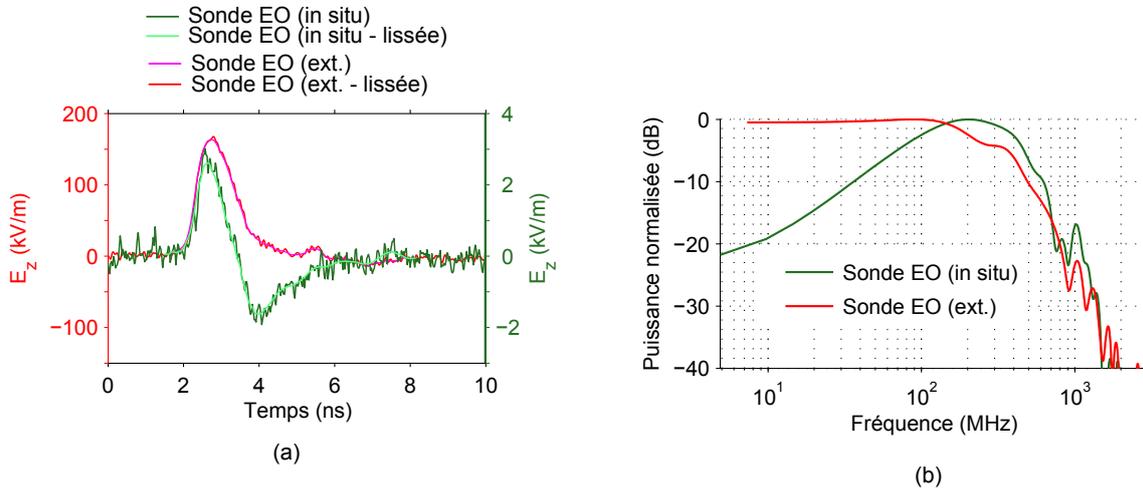
3.6.2 Résultats expérimentaux

Des résultats obtenus dans les domaines temporel et fréquentiel sont montrés Figure 3.24. Les deux figures du haut montrent un résultat obtenu lorsque l'impulsion incidente était de forme monopolaire et les deux figures du bas lorsque l'impulsion incidente était de forme bipolaire. Le qualificatif « in situ » indique une mesure à l'intérieur de l'échantillon et « ext. » une mesure à côté de la boîte de Petri. Pour des raisons de clarté, les figures dans le domaine temporel (Figure 3.24a et Figure 3.24c) ont deux échelles d'ordonnée, l'échelle de droite correspondant à l'échelle des impulsions mesurées à l'intérieur de l'échantillon.

S'agissant des résultats obtenus avec l'impulsion incidente monopolaire, la Figure 3.24a montre d'une part que la forme de l'impulsion induite dans l'échantillon est significativement modifiée par rapport à l'impulsion appliquée, et d'autre part que son intensité est fortement atténuée. Les spectres normalisés des deux impulsions, montrés Figure 3.24b, mettent en évidence que le contenu basse fréquence de l'impulsion appliquée est fortement atténué à l'intérieur de l'échantillon. Ces résultats ne sont pas surprenants car l'échantillon est composé d'ions et de molécules polaires. Aux basses fréquences il est donc capable de se polariser suffisamment pour s'opposer à l'établissement du champ électrique mais il ne l'est plus à haute fréquence; l'échantillon agit à la manière d'un filtre passe-haut. Une impulsion incidente sera donc transmise d'autant plus fidèlement à l'échantillon que son contenu basse fréquence est faible. Les impulsions bipolaires sont des exemples d'impulsions dont le contenu basse fréquence est faible relativement au contenu de plus haute fréquence. La Figure 3.24c montre effectivement que l'allure temporelle de l'impulsion incidente de forme bipolaire est modifiée de manière moins significative que ne l'est l'impulsion de forme monopolaire. L'impulsion induite reste toutefois fortement atténuée par rapport à l'impulsion appliquée (rapport de 50 sur l'intensité). Les spectres de la Figure 3.24d montrent une fois encore que les fréquences inférieures à la centaine de mégahertz sont atténuées dans l'échantillon tandis que les fréquences supérieures à 400 MHz sont relativement bien transmises.

Pour compléter l'étude expérimentale, une modélisation électromagnétique du système a été effectuée en trois dimensions dans le domaine spatio-temporel. Les méthodes et résultats obtenus sont exposés dans le paragraphe à suivre.

IMPULSION INCIDENTE MONOLAIRE



IMPULSION INCIDENTE BIPOLAIRE

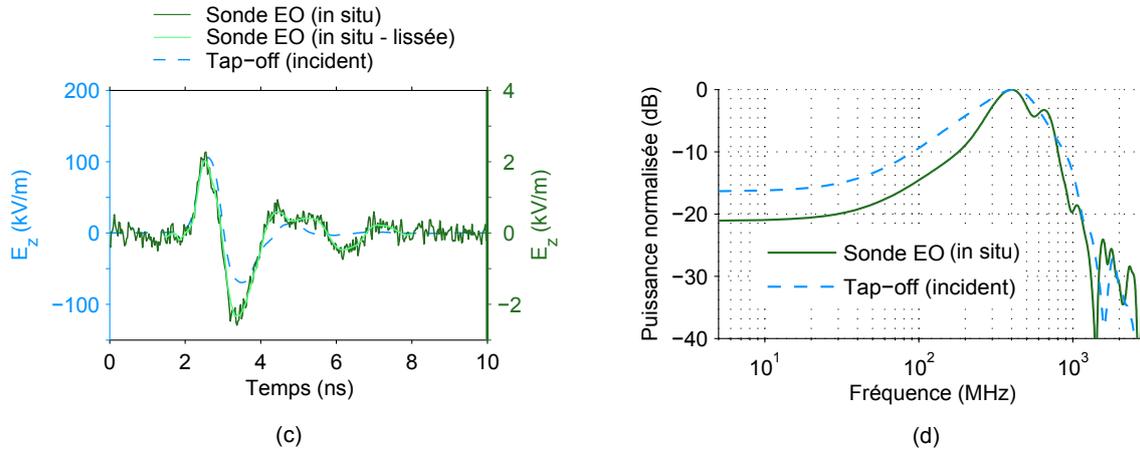


Figure 3.24 – Mesures des impulsions électriques induites dans un échantillon exposé dans la grande cellule TEM. Résultats pour une impulsion incidente monopolaire, dans le domaine temporel (a) et le domaine fréquentiel (b). Résultats pour une impulsion incidente bipolaire, dans le domaine temporel (c) et le domaine fréquentiel (d). Pour une meilleure lisibilité des résultats dans le domaine temporel, les graphes ont deux axes d'ordonnée d'échelle différente. L'axe à droite correspond à l'échelle de l'impulsion mesurée *in situ*, c'est-à-dire à l'intérieur de l'échantillon. Les impulsions incidentes étaient délivrées par le générateur HORUS. Le spectre des impulsions mesurées par la sonde EO était calculé à partir des données lissées (débruitées).

3.6.3 Simulation spatio-temporelle 3D

La distribution spatio-temporelle du champ électrique à l'intérieur de la cellule TEM a été simulée via la méthode des différences finies dans le domaine temporel. Cette méthode est connue sous le nom de méthode FDTD pour Finite-Difference Time-Domain [228, 229]. Le code implémenté a été développé au sein du laboratoire XLIM [230].

La structure modélisée en trois dimensions est montrée Figure 3.25. Elle comprenait la cellule TEM, l'échantillon ainsi que la sonde EO. Les parois métalliques de la cellule TEM étaient considérées comme parfaitement conductrices. La permittivité relative des parois latérales et du couvercle du modèle de la boîte de Petri étaient fixées à 3.0. La boîte de Petri était remplie d'un diélectrique de même volume et de mêmes paramètres électriques qu'en expérimentation. En pratique, la surface des échantillons aqueux n'est pas plane mais se présente sous forme de ménisque ; cette forme a donc été reproduite dans le modèle. La position de la sonde EO à l'intérieur de l'échantillon est montrée plus précisément dans la partie inférieure droite de la Figure 3.25. La permittivité relative du cristal était fixée à 42 et celle de la partie optique à 7. Tous les paramètres électriques étaient considérés comme constants au cours de la simulation.

Le maillage était composé de mailles cubiques de côté 0.2 mm. Pour simuler l'espace libre aux limites du domaine de simulation, les interfaces étaient décrites comme des zones absorbantes parfaitement adaptées (en anglais Perfectly matched layer, PML) [231]. La cellule TEM était excitée à l'aide d'une source de tension connectée au septum. Les parois inférieures et supérieures étaient connectées à la masse. L'impulsion de tension délivrée en simulation était l'impulsion de tension incidente obtenue via le tap-off lors des mesures présentées Figure 3.24a.

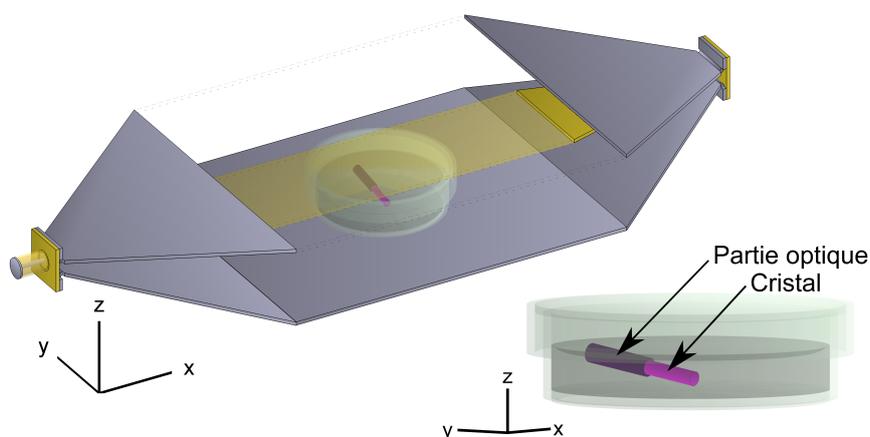


Figure 3.25 – Cellule TEM modélisée et simulée via la méthode FDTD. La sonde EO est positionnée tel qu'en expérimentation. La plaque supérieure et le septum sont rendus transparents afin de rendre visible la position de la boîte de Petri.

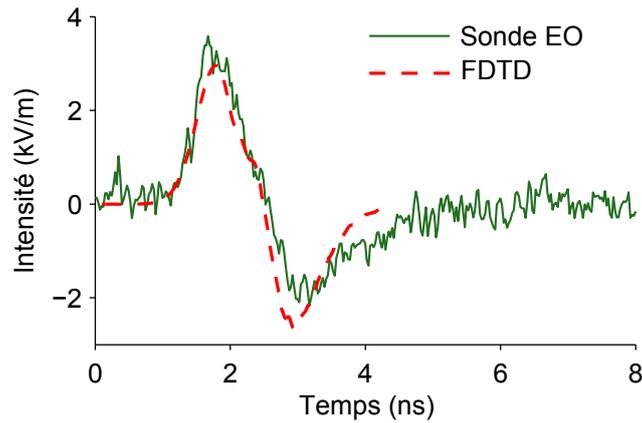


Figure 3.26 – Impulsion électrique obtenue dans l'échantillon via la méthode FDTD (trait pointillé) superposée à l'impulsion électrique mesurée par la sonde EO (trait plein), pour une même impulsion incidente.

L'allure temporelle du champ électrique moyenné sur la longueur du cristal est montrée Figure 3.26. L'impulsion obtenue en simulation est superposée temporellement à l'impulsion électrique mesurée par la sonde EO dans la même configuration. Nous observons un bon accord entre le résultat de la simulation et celui la mesure, aussi bien pour l'allure temporelle que pour l'intensité des impulsions. *A posteriori*, l'utilisation du facteur de calibration déterminée dans la cuvette d'électroporation, pour calibrer la sonde dans le milieu de culture exposé dans la cellule TEM, n'était donc pas déraisonnable.

Concernant la distribution spatiale du champ électrique simulé par la méthode FDTD, elle était homogène en tout point le long du cristal.

En pratique, la cellule TEM est posée sur la platine d'un microscope lorsqu'elle est utilisée pour étudier les effets biologiques des nsPEFs. L'observation en temps réel des effets induits par l'exposition est alors réalisée au travers d'un objectif amené sous la boîte de Petri contenant l'échantillon. L'insertion de l'objectif dans la cellule TEM est réalisée via un trou percé dans la plaque métallique inférieure de la cellule TEM. Lors de nos travaux, la cellule TEM était posée sur un support métallique. Le trou dans la plaque inférieure était donc obturé et nous ne l'avons de ce fait pas modélisé pour les simulations FDTD. Des travaux de modélisation sont actuellement en cours au sein de l'équipe pour évaluer dans quelle mesure le trou et l'insertion d'un objectif impactent la distribution spatiale du champ électrique dans l'échantillon [232].

3.6.4 Conclusion

Pour la première fois, nous avons mesuré les impulsions électriques induites dans un milieu de culture exposé à d'intenses nsPEFs au travers d'une cellule TEM. L'outil de mesure employé était une sonde électro-optique que nous avons caractérisée et calibrée au préalable.

Les mesures ont montré des différences significatives entre les impulsions appliquées

et les impulsions induites dans l'échantillon, non seulement en termes d'allure temporelle mais également en termes d'intensité. En effet, alors que le champ électrique appliqué était supérieur à 150 kV/m, celui-ci n'atteignait que 3 kV/m dans l'échantillon. De plus, les mesures ont mis en évidence que le milieu de culture agit comme un filtre passe-haut vis-à-vis des fréquences du champ électrique appliqué.

Utilisé sous cette forme, le système d'exposition ne permet donc pas d'étudier *in vitro* les effets biologiques d'impulsions de forme rectangulaire, puisque le plateau des impulsions ne serait pas transmis à l'échantillon. En revanche, ce système permet d'étudier spécifiquement les effets des fréquences supérieures à une centaine de mégahertz et ce jusqu'à quelques gigahertz (au moins).

Les résultats de mesure et de simulation mis en valeur dans cette partie ont été publiés dans *IEEE transactions on Microwave Theory and Techniques* [233], conjointement avec les résultats expérimentaux de microdosimétrie détaillés dans la partie à venir. Les travaux ont de plus été communiqués à *BioEM2013, Joint Meeting of the BioElectroMagnetics Society and the European BioElectromagnetics Association* [234].

Du macroscopique au microscopique. Si la détermination du champ électrique induit à l'échelle macroscopique suffit aux physiciens pour valider leur système, les biologistes sont davantage intéressés par le champ électrique appliqué à l'échelle de la cellule, c'est-à-dire à l'échelle microscopique. En l'état actuel des connaissances, la mesure du champ électrique à l'échelle macroscopique ne permet pas de conclure par des formulations simples et directes sur le champ électrique à l'échelle microscopique. Ceci s'explique par l'inhomogénéité à l'échelle microscopique des propriétés électriques d'un milieu de culture contenant des cellules.

Le concept de la microdosimétrie a été introduit dans les années 1960 par Harald Rossi de l'université Columbia (NY, USA). L'approche était alors destinée à l'étude de la quantité d'énergie déposée à l'échelle cellulaire et subcellulaire dans un organisme traversé par des particules ionisantes [235]. La microdosimétrie est depuis fondamentale dans de nombreux domaines tels que la radiothérapie ou la radioprotection [236,237]. Elle est devenue toute aussi essentielle pour l'étude des interactions entre rayonnements non ionisants, tels que les nsPEFs, et le vivant.

3.7 Vers la dosimétrie expérimentale à l'échelle microscopique

Dans cette partie, nous abordons l'apport des techniques de microfluorimétrie pour la microdosimétrie expérimentale. Nous appelons techniques de microfluorimétrie les méthodes expérimentales qui permettent d'analyser la fluorescence d'un échantillon à l'échelle microscopique.

Nous commencerons par donner des exemples de publications qui ont exploité la microfluorimétrie pour la microdosimétrie. En particulier, nous mentionnerons des travaux de microfluorimétrie qui visaient à sonder les variations temporelles du potentiel transmembranaire de cellules exposées à des impulsions électriques. Nous évoquerons ensuite l'apport de la microfluorimétrie pour visualiser les variations temporelles de la température des cellules. Finalement, nous verrons comment l'utilisation d'un système d'exposition basé sur une cellule TEM nous a permis de contrôler par microfluorométrie l'évolution temporelle des températures cellulaires et subcellulaires lorsque les cellules étaient exposées à des champs électriques pulsés nanosecondes.

3.7.1 Littérature

3.7.1.1 Technique de microfluorimétrie pour sonder le potentiel transmembranaire

Dans [131], [238] et [167], les auteurs ont publié des mesures de potentiel transmembranaire lorsque les cellules étaient exposées à des impulsions électriques de durée respective 50 ms, quelques microsecondes et 60 ns. Les mesures reposaient sur des colorants potentiométriques, c'est-à-dire des molécules dont la fluorescence varie en fonction de la variation locale du potentiel. Les molécules utilisées avaient l'avantage de s'intégrer dans la membrane des cellules et de ne perturber ni le fonctionnement cellulaire ni le champ électrique local. Une fois calibrées, les variations de fluorescence donnaient ainsi accès au potentiel transmembranaire. Les variations de la fluorescence, en fonction du champ électrique local, sont liées au déplacement du nuage électronique des atomes composant la sonde. Les déplacements induisent une modification des niveaux d'énergie et par là un décalage de la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission de la sonde.

Dans [167], Frey et co-auteurs ont utilisé le fluorochrome ANINE-6 dont le temps de réponse est subnanoseconde. Grâce à une excitation optique des molécules avec une impulsion de seulement 5 ns, ils ont obtenu des mesures de potentiel transmembranaire en fonction du temps avec une résolution temporelle d'à peine 5 ns. Les échantillons de

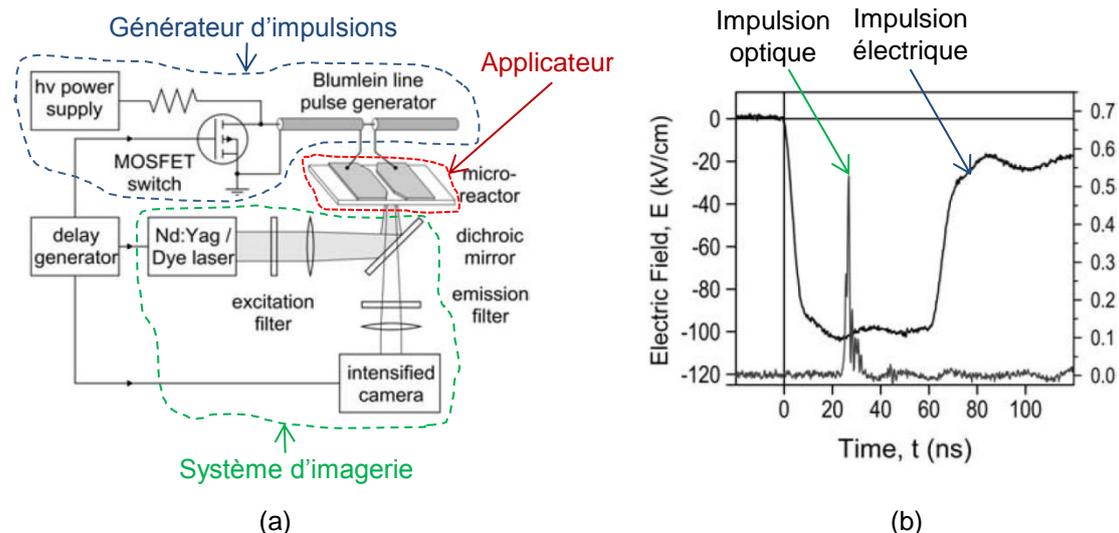


Figure 3.27 – Exemple d'un montage expérimental pour le contrôle du potentiel transmembranaire de cellules exposées à des nsPEFs. Montage expérimental (a) et allure des impulsions optiques et électriques (b). Adaptée de [167].

cellules étaient exposés simultanément à d'intenses impulsions électriques de durée 60 ns. Le montage expérimental qu'ils ont employé est montré Figure 3.27a. La Figure 3.27b montre l'allure temporelle de l'impulsion optique et de l'impulsion électrique nanoseconde qui étaient délivrées à l'échantillon.

3.7.1.2 Technique de microfluorimétrie pour sonder la température cellulaire et intracellulaire

Les effets des impulsions électriques nanosecondes sont communément dits non thermiques car les élévations de température mesurées *in situ* à l'échelle macroscopique sont généralement inférieures à quelques degrés. Des études analytiques et numériques ont cependant montré qu'une forte augmentation de température peut apparaître localement dans la membrane même lorsque les impulsions électriques n'induisent pas d'élévation notable de la température globale [239–241]. Par exemple, les résultats d'une étude numérique conduite par Song et co-auteurs ont montré qu'une seule impulsion d'intensité 60 kV/cm et de durée 60 ns pouvait induire une élévation de température de 6 °C localement à la membrane, alors que la température ailleurs était stable. Le modèle de cellule étudié était une cellule sphérique, sans organelle, dont les dimensions et paramètres électriques sont donnés au Tableau 3.1.

La température modulant entre autres la fluidité de la membrane et la constante cinétique des processus biochimiques, des effets biologiques considérés aujourd'hui comme primaires (c'est-à-dire directement liés à l'application du champ électrique) pourraient s'avérer secondaires (c'est-à-dire induits par les effets thermiques eux-mêmes causés par le champ électrique).

	Dimension	Permittivité relative	Conductivité électrique
Cytoplasme	Diamètre : 10 μm	60	0.13 S/m
Membrane	Épaisseur : 5 nm	8	5.3 $\mu\text{S/m}$
Milieu extracellulaire	x	80	0.6 S/m

Tableau 3.1 – Dimensions et propriétés électriques du modèle de cellule étudié par Song et co-auteurs dans [239].

À ce jour, aucune mesure expérimentale de la température à la membrane, ou même à l'échelle cellulaire, n'a été publiée lorsque les cellules étaient exposées à des nsPEFs de haute intensité.

Les sondes typiquement utilisées pour le contrôle de la température, à savoir les thermocouples [242], les thermomètres à résistance [164] ou encore les sondes à fibre optique [112, 243, 244], ne conviennent pas pour des mesures intracellulaires. Fiso Technologies (Canada) propose une sonde entièrement diélectrique à fibre optique dont la partie sensible mesure à peine 5 μm (le modèle FOT-HERO). Le diamètre des cellules étant en moyenne d'une dizaine de micromètres, la résolution spatiale de cette sonde serait suffisante pour mesurer la température à l'intérieur d'une cellule. Cependant, l'insertion d'une telle sonde au sein d'une cellule perturberait l'intégrité ou du moins le fonctionnement de la cellule.

Dans la littérature, quelques molécules fluorescentes thermosensibles ont été démontrées pour l'évaluation des variations temporelles ou spatio-temporelles de la température au sein de cellules *in vitro* [245–249].

Dans [249], publication de *Nature* datée de 2012, Okabe et co-auteurs ont proposé un nouveau polymère qui, associé à un système d'imagerie performant, permet des mesures tri-dimensionnelles de la température intracellulaire, avec une résolution spatiale de 200 nm (limite de diffraction) et une résolution en température de 0.18-0.58 $^{\circ}\text{C}$. Les cellules étaient maintenues dans les conditions physiologiques (elles n'étaient pas exposées à un champ électrique) et la fluorescence était moyennée sur 1 minute. Les auteurs ont mis en évidence des points chauds à l'intérieur du cytoplasme, points chauds qu'ils ont localisés dans le noyau et les mitochondries.

Dans une publication de 2009 [247], Chen et co-auteurs ont quant à eux utilisé le fluorochrome rhodamine B pour cartographier les variations spatio-temporelles de la température dans leur échantillon de cellules. La topologie de cette molécule, disponible à la vente, est montrée Figure 3.28. À notre connaissance, ce sont les seuls auteurs qui ont mis à profit la microfluorimétrie pour évaluer les élévations de température cellulaires alors même que l'échantillon était exposé à des champs électromagnétiques. En particulier, ils ont incubé des tendons de queue de rat, les ont marqués à la rhodamine

5. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r6626?lang=fr®ion=FR>

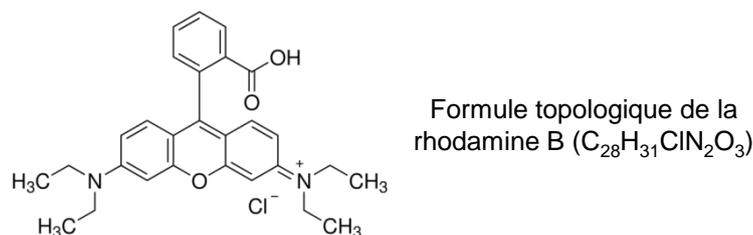


Figure 3.28 – Formule topologique de la rhodamine B (formule brute : $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$)⁵.

B puis les ont exposés à des champs électromagnétiques de fréquence 900 MHz et de puissance 2 dB (≈ 1.6 mW). Les échantillons étaient contenus à l'intérieur d'une boîte en plastique positionnée à l'extrémité d'un câble coaxial. La calibration de la rhodamine B a révélé une baisse de fluorescence de 3.4 ± 0.2 % par degré d'élévation de température. L'erreur quadratique moyenne de la mesure de température a été évaluée à 1.5 °C. La résolution temporelle du système d'imagerie était de l'ordre de la seconde (donc élevée) et la résolution spatiale s'élevait à quelques micromètres.

À XLIM, nous souhaitions tester la rhodamine B pour contrôler les variations temporelles de la température au sein des cellules exposées à des nsPEFs. Dans la partie à suivre, nous montrons comment le développement d'un système d'exposition basé sur une cellule TEM nous a permis de calibrer la rhodamine B. Nous évoquerons ensuite les mesures réalisées lorsque les cellules étaient exposées à des nsPEFs.

3.7.2 Un système d'exposition basé sur la cellule TEM pour la calibration en température des fluorochromes thermosensibles

3.7.2.1 Principe et description

Pour calibrer la variation de la fluorescence de la rhodamine B en fonction des variations de température, une méthode consiste à induire une forte élévation de température dans l'échantillon étudié, puis à comparer les variations de fluorescence mesurées avec les variations de température obtenues par une sonde de référence. Une forte augmentation de température (à savoir de plusieurs degrés) assure la fiabilité du facteur de calibration obtenu car elle facilite l'interprétation et la répétabilité des mesures. Une telle augmentation de température peut être induite à l'intérieur d'un milieu biologique en l'exposant à des champs électromagnétiques CW de forte puissance, et dont la fréquence d'oscillation permet au milieu de se polariser par orientation dipolaire mais avec un retard afin d'induire des pertes. De plus, si l'élévation de la température est lente, les variations de température moyennées dans les cellules peuvent être supposées égales aux variations de température à l'échelle macroscopique.

La rhodamine B a ainsi été calibrée dans une boîte de Petri exposée dans la grande

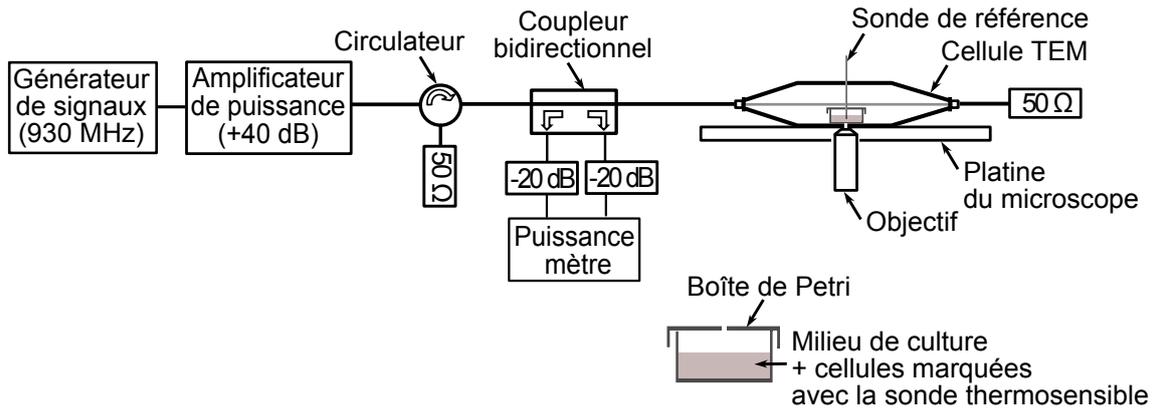


Figure 3.29 – Schéma du montage expérimental pour la calibration de la sonde fluorescente thermosensible dans la cellule TEM.

cellule TEM à des champs électromagnétiques oscillant à la fréquence 930 MHz et dont la puissance s'élevait à 50 W. En termes de champ électrique, ceci implique que l'intensité du champ était de 5.9 kV/m dans la zone de test vide. Le montage expérimental mis en place est schématisé Figure 3.29. Les champs électromagnétiques RF étaient délivrés par un générateur de signaux radiofréquences (HP8648C, Hewlett-Packard) suivi d'un amplificateur de puissance dont le gain s'élevait à 40 dB (Nuclétudes, France). Les puissances incidente et réfléchie étaient contrôlées en temps réel via un coupleur bidirectionnel (BC-J000-30N, UMCC) connecté à deux capteurs de puissance (E4412A, Hewlett-Packard). La cellule TEM était posée sur la platine d'un microscope inversé (DMI6000, Leica). Pour la quantification de la fluorescence, l'objectif $\times 40$ du microscope était inséré jusqu'au fond de la boîte de Petri, au travers du trou percé dans la plaque inférieure de la cellule TEM. La température de référence était mesurée à l'aide d'une sonde à fibre optique standard (LXT-812, Lumasense, CA, USA). Cette dernière était plongée verticalement dans la boîte de Petri (voir la Figure 3.23). L'incertitude sur la mesure de cette sonde s'élève à 0.2 °C pour un intervalle de confiance de 95%.

La préparation et le marquage des échantillons de cellules n'ayant pas été de mon ressort, tout comme la quantification de la fluorescence, ces étapes ne seront pas développées ici ; les détails du protocole sont néanmoins donnés dans [233]. Pour résumer les points importants, l'échantillon consistait en 3 ml d'un milieu de culture appelé HEPES. Ce milieu contenait des cellules de la lignée cellulaire U87, qui sont des cellules d'un cancer du cerveau. Ces cellules étaient marquées non seulement avec la rhodamine B mais également avec la rhodamine 110. Le marquage à la rhodamine 110, dont la fluorescence est très peu sensible à la température, permet de compenser les variations de fluorescence qui sont liées à des variations de l'intensité de la lumière d'excitation [250].

Concernant la quantification de la fluorescence, celle-ci étant moyennée dans des zones fixes définies manuellement autour des cellules d'intérêt. La densité de fluorescence était

exprimée soit en niveau de gris séparément pour la rhodamine B et la rhodamine 110, soit comme le rapport $F(t)/F_0$ où $F(t)$ était la fluorescence de la rhodamine B sur celle de la rhodamine 110 au cours du temps et F_0 ce même rapport à l'état initial. Le temps d'excitation optique épifluorescente des cellules était fixé à 50 ms. Une image était acquise toutes les 0.5 s et alternativement pour sonder la rhodamine B et la rhodamine 110. La résolution spatiale de la mesure était d'environ 0.5 μm .

3.7.2.2 Résultats de la calibration en régime CW

Comme montré Figure 3.30a, une élévation de température de 5 °C a été obtenue dans l'échantillon après 11 minutes d'exposition. Un coefficient de corrélation de -0.99 a été obtenu entre le rapport $F(t)/F_0$ et la mesure de référence. D'après les mesures de fluorescence montrées Figure 3.30b, la décroissance de la fluorescence de la rhodamine B a été évaluée à 4.1 ± 1.0 % par degré d'élévation de température. Chaque couple de courbes (vertes/rouge) montré Figure 3.30b correspond à l'évolution de la fluorescence dans une cellule. L'intensité de fluorescence initiale diffère selon les cellules car la quantité de molécules fluorescentes présentes dans chaque cellule n'est pas identique.

La sensibilité de la mesure des variations temporelles de température était inférieure à 0.5 °C par la technique de microfluorimétrie (en définissant la sensibilité comme la température minimale détectable avec fiabilité).

La Figure 3.31 illustre la variation de fluorescence de la rhodamine B dans les cellules, à trois instants pendant l'exposition. L'image de gauche montre la fluorescence des cellules à l'état initial et celle le plus à droite la fluorescence de ces mêmes cellules après que l'élévation de température globale avait atteint 3.5 °C. L'image au centre montre un état intermédiaire.

3.7.2.3 Application à la mesure de la température dans les cellules biologiques exposées à des nsPEFs

Une fois calibrée, la sonde thermosensible a été utilisée pour déterminer si une élévation de température était détectée à l'échelle cellulaire ou subcellulaire lorsque les cellules étaient exposées à 3 millions d'impulsions ultracourtes similaires à celles montrées Figure 3.24a. La forme des impulsions induites était donc bipolaire, leur durée d'environ 2 ns et leur intensité maximum de 3 kV/m. La fréquence de répétition était fixée à 3 kHz donc la durée totale de l'exposition était d'environ 17 minutes.

Sur l'échelle temporelle explorée (50 ms toutes les secondes), aucune élévation de température n'a été détectée à l'échelle de la cellule. Ce résultat était attendu étant donné le faible contenu énergétique de chaque impulsion. En effet, supposons un échantillon homogène n'échangeant aucune chaleur avec son environnement (système adiabatique). L'élévation de température ΔT (K) induite dans l'échantillon par l'application de N

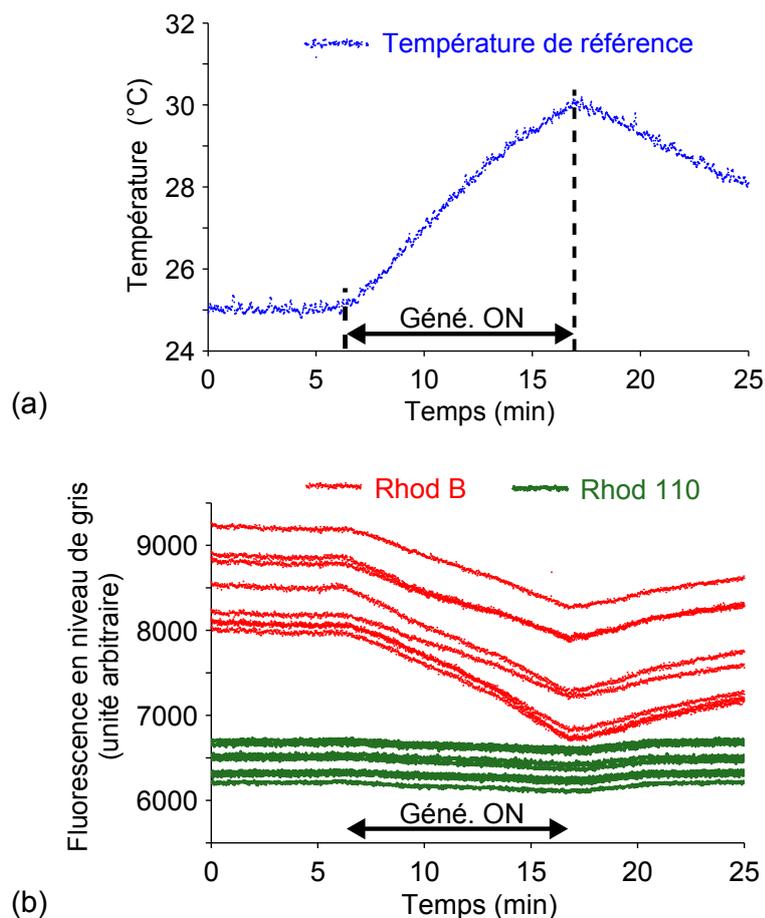


Figure 3.30 – Résultats de calibration de la rhodamine B dans la grande cellule TEM exposée à des champs électromagnétiques de fréquence 900 MHz et de puissance 50 W. (a) Élévation de température mesurée par la sonde à fibre-optique au centre de l'échantillon. (b) Évolution temporelle correspondante de la fluorescence de la rhodamine B et de la rhodamine 110 pour 8 cellules (données exploitées par Rodney O'Connor).

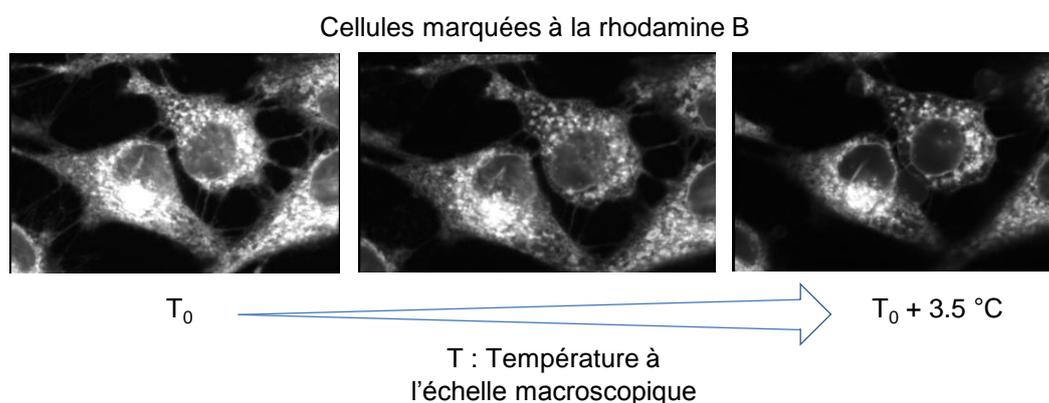


Figure 3.31 – Diminution de la fluorescence de la rhodamine B en fonction de la température mesurée à l'échelle macroscopique. L'élévation de température était induite par chauffage micro-ondes au sein de la grande cellule TEM.

impulsions, de durée τ (s) et d'intensité E (V/m) uniforme, s'exprime alors selon :

$$\Delta T = \frac{1}{c} \frac{\sigma |E|^2}{\rho} N \cdot \tau, \quad (3.8)$$

où c est la capacité thermique massique (J/(kg.K)) de l'échantillon, σ sa conductivité électrique (S/m) et ρ sa densité massique (kg/m³). Pour un milieu aqueux tel que notre échantillon de cellules, $c \approx 4.184$ J/(kg.K) et $\rho \approx 1e3$ kg/m³. Sachant que la conductivité électrique de notre milieu vaut $\sigma = 1.5$ S/m à l'échelle macroscopique, l'application numérique conduit à $\Delta T \approx 0.012$ K pour les conditions d'exposition fixées. Même en l'absence d'échange thermique entre l'échantillon et le milieu extérieur, l'élévation de température globale attendue est négligeable.

À l'échelle subcellulaire, une diminution du rapport F/F_0 a été détectée aux membranes cellulaires pendant l'exposition. Nous ne pouvons cependant pas dire si cette baisse était liée à des élévations locales de température ou au gonflement des cellules observées. Ce pourrait aussi être la conséquence des deux faits combinés. Les variations de F/F_0 pourraient également être liées à une différence de séquestration et/ou de solubilité, en fonction de la température, de la rhodamine B par rapport à la rhodamine 110. L'utilisation d'une sonde fluorescente ratiométrique (telle qu'une nanoparticule contenant à la fois un fluorochrome sensible à la température et un autre qui y est insensible) permettrait de s'affranchir de ces problèmes. Ce concept, associé à la microscopie confocale, est en cours d'investigation par les biologistes de l'équipe.

Par rapport aux microscopes classiques, les microscopes confocaux permettent d'obtenir des images avec une profondeur de champ significativement réduite (400 à 600 nm de profondeur). Des images 3D à haute résolution peuvent ainsi être construites à partir des images de coupe obtenues par le microscope confocal. La Figure 3.32a présente une photographie de notre microscope confocal avec la grande cellule TEM fixée sur sa platine. L'image de droite (Figure 3.32b) montre une image de cellules marquées à la rhodamine B, qui a été obtenue via le microscope confocal. Les gradients de couleurs n'indiquent pas des gradients de température mais l'inhomogénéité de la répartition de la rhodamine B au sein des cellules. Pour cette raison, ce ne sont pas les fluorescences absolues qui ont un sens mais les variations de fluorescence au cours du temps.

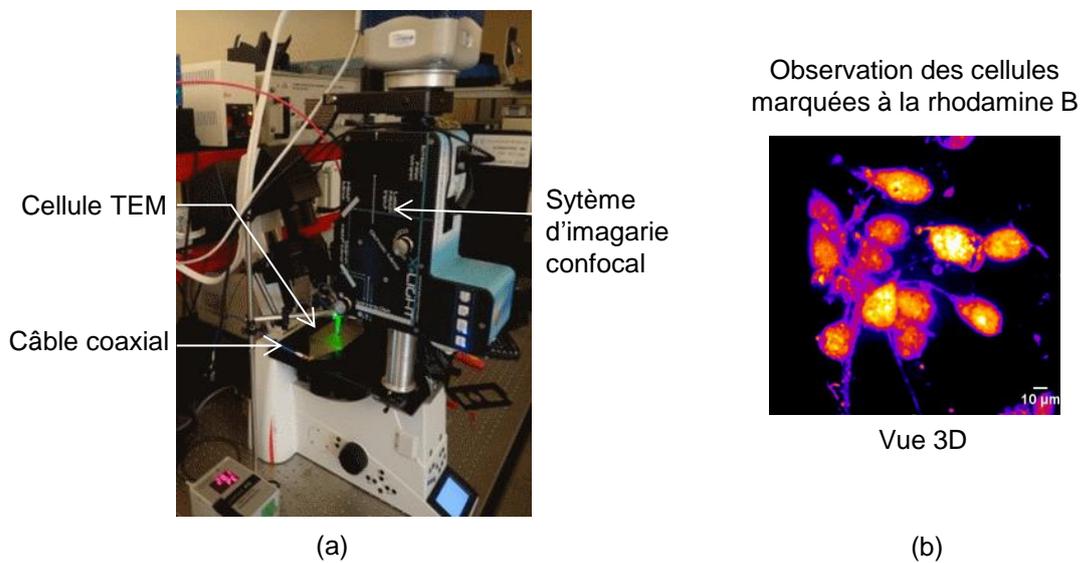


Figure 3.32 – Microscope confocal avec la grande cellule TEM fixée sur la platine (a) et image obtenue de cellules marquées à la rhodamine B et contenues dans une boîte de Petri posée au centre de la cellule TEM (b). Le microscope est inversé — la couleur verte apparaissant sur le dessus de la cellule TEM est causé par un tube en plastique diffusant le faisceau de couleur verte émis par la partie inférieure du microscope. Ce tube servait à insérer la sonde de température commerciale à la verticale dans la cellule TEM.

3.8 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons abordé la dosimétrie expérimentale des systèmes d'exposition, d'une part à l'échelle macroscopique et d'autre part à l'échelle microscopique.

Dans une première partie, nous avons étudié les capacités d'une nouvelle sonde électro-optique à mesurer le champ électrique macroscopique dans des échantillons de faible volume ainsi que dans l'air. Les études expérimentales, complétées par des études numériques, ont montré que la sonde est adaptée aussi bien pour des mesures de champ électrique dans le domaine fréquentiel que pour des mesures dans le domaine temporel. En particulier, nous avons montré que la sonde est capable de mesurer des champs électriques pulsés de forte intensité (jusqu'à 1 MV/m) et de très courte durée (une nanoseconde). Pour arriver à ces résultats, nous avons exposé la sonde à des nsPEFs d'une part au sein d'un milieu de culture contenu dans une cuvette d'électroporation, et d'autre part au sein des cellules TEM vides étudiées au chapitre précédent. Le choix de ces applicateurs était lié à leur capacité à délivrer d'intenses champs électriques pulsés *a priori* connus ; « *a priori* » puisqu'aucune mesure de champ électrique pulsé à l'intérieur de ces systèmes n'avait jamais été publiée auparavant. Nous avons ensuite tiré parti de la sonde pour mesurer les impulsions électriques induites dans un milieu de culture contenu dans une boîte de Petri et exposé à des nsPEFs au sein de notre plus grand modèle de cellule TEM. Les mesures ont montré que l'intensité de l'impulsion induite est grandement réduite par rapport à celle du champ électrique appliqué (environ 50 fois moindre). De plus, une analyse fréquentielle des mesures a mis en évidence que le contenu basse fréquence (< 100 MHz) des impulsions incidentes est fortement atténué au sein de l'échantillon. Ces résultats montrent toute l'importance de la macrodosimétrie, en particulier dans les applicateurs sans contact.

Dans une deuxième partie du chapitre, nous avons réduit notre étude à l'échelle microscopique. Nous avons montré comment un système d'exposition basé sur une cellule TEM nous a permis d'exploiter la microfluorimétrie pour des mesures de température cellulaire et intracellulaire lorsque les cellules étaient exposées à des nsPEFs. La mesure par microfluorimétrie a tout d'abord été calibrée en délivrant à la cellule TEM des champs électromagnétiques de fréquence 900 MHz et de forte puissance (50 W). Avec la méthode employée, l'élévation de température minimum qui peut être détectée de manière fiable a été évaluée à 0.5 °C environ. Les fluorochromes ont ensuite été employés pour contrôler la température à l'intérieur de cellules biologiques exposées à des nsPEFs de durée 2 ns et d'intensité 3 kV/m (comme déterminées par la sonde électro-optique). Des modifications de fluorescence ont été mesurées aux membranes des cellules mais il est possible que celles-ci étaient liées au gonflement induit des cellules plutôt qu'à une élévation locale de

température.

Finalement, si des élévations significatives de température étaient effectivement induites à la membrane lors d'expositions dont les effets étaient considérés jusque-là non thermiques, il resterait encore à identifier leur contribution dans les effets biologiques observés. Pour comprendre les mécanismes physiques à l'origine des effets biologiques à la membrane, l'approche microdosimétrique n'est plus suffisante du fait des fines échelles de temps et d'espace impliquées. Les études deviennent nécessaires aux échelles spatiales nanométriques et subnanométriques et aux échelles temporelles nanosecondes et subnanosecondes.

À l'échelle de quelques nanomètres, l'organisation spatiale de la matière n'est plus continue mais discrète : nous distinguons les molécules et atomes. Contrôler l'intensité du champ électrique induit à l'échelle de chaque atome n'est à ce jour pas possible en expérimentation et reste problématique en simulation. La connaissance du champ électrique à ces échelles, de même que des potentiels et des gradients de champ électrique, permettrait indéniablement de mieux comprendre les effets biologiques à la membrane. Ce point est plus largement abordé au chapitre suivant, dans lequel nous proposons un nouvel outil de nanodosimétrie numérique.

CHAPITRE 4

Technique de nanodosimétrie numérique

Contenu

4.1	Introduction aux intérêts de la nanodosimétrie	179
4.2	Les simulations de dynamique moléculaire	182
4.3	À propos des mécanismes moléculaires de formation d'un pore en dynamique moléculaire	187
4.4	L'outil développé	189
4.5	Résultats	194
4.6	Conclusion	205

4.1 Introduction aux intérêts de la nanodosimétrie

Dans ce chapitre, nous traitons de la dosimétrie à l'échelle nanoscopique et subnanoscopique (c'est-à-dire de la nanodosimétrie) au sein des cellules biologiques exposées à d'intenses champs électriques pulsés de durée nanoseconde. Comme illustré par la Figure 4.1, notre objet d'étude sera plus précisément la membrane plasmique des cellules.

Au premier chapitre, nous avons vu que des champs électriques pulsés de durée nanoseconde et de forte intensité (\gg kV/cm) sont capables d'induire des modifications dans la structure de la membrane plasmique sans engendrer une rupture irréversible de celle-ci. Par exemple, des observations expérimentales ont mis en évidence que la membrane plasmique était rendue temporairement davantage perméable à certaines molécules contenues dans le milieu extracellulaire. Cette « électroperméabilisation » de la membrane est interprétée par la formation de pores la traversant de part en part. Étant donnée la taille des molécules pouvant être introduites dans les cellules électroperméabilisées, le diamètre de ces pores serait de l'ordre de 1 à 1.5 nm. À notre connaissance, les travaux expérimentaux explorant l'échelle spatiale la plus fine pour l'étude de l'électroperméabilisation ont été publiés très récemment par Chopinet et co-auteurs dans [251]. Les auteurs ont mis à profit la microscopie à force atomique (AFM pour « atomic force microscopy ») pour visualiser les effets de l'électroperméabilisation sur la topographie de la surface membranaire ainsi que pour mesurer localement l'élasticité de la membrane. Les impulsions appliquées avaient pour durée 5 ns et pour intensité 400 V/cm à l'échelle macroscopique ; il s'agissait donc d'impulsions longues. Après exposition, les auteurs ont observé des ondulations à la surface de la membrane. Ils ont de plus mesuré une décroissance de 40% de son élasticité.

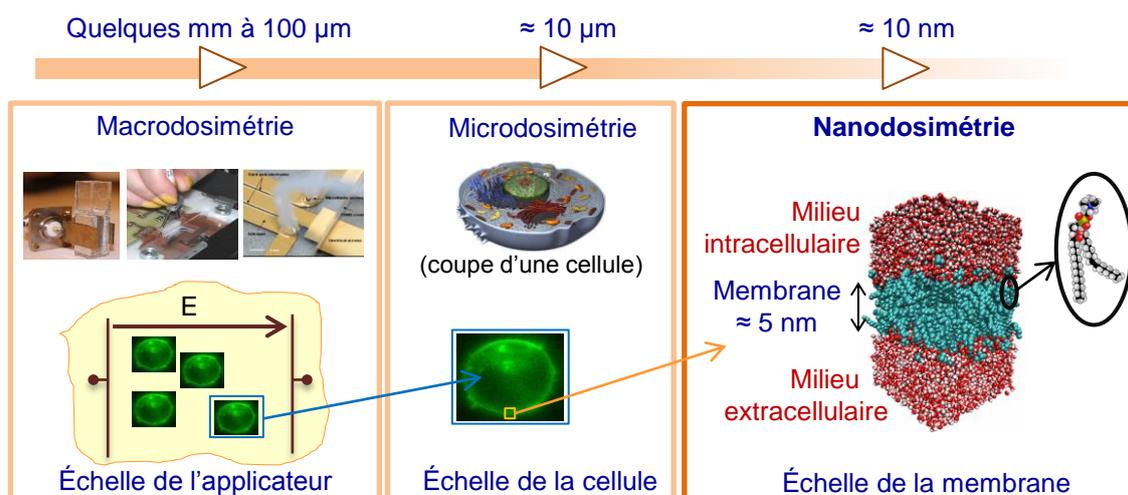
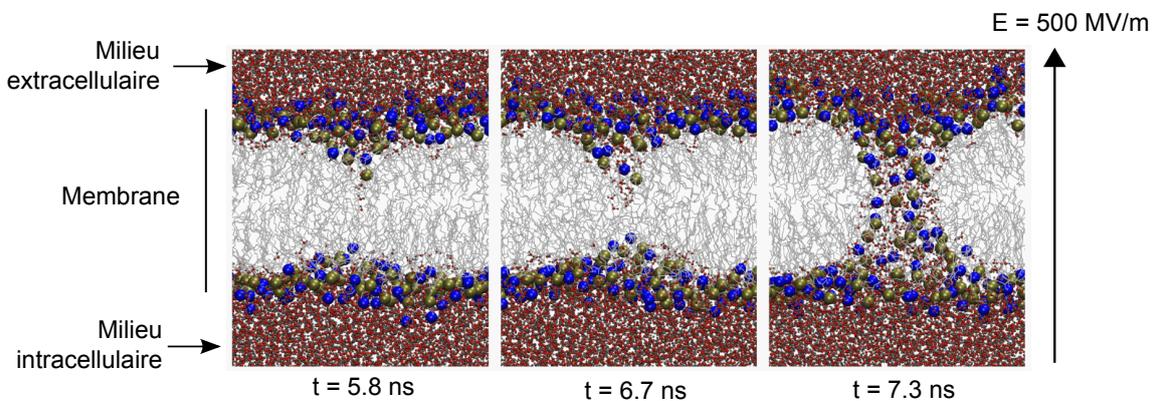


Figure 4.1 – Rappel des objets et dimensions spatiales d'intérêt pour la macro-, micro- et nanodosimétrie.

En raison des échelles spatio-temporelles impliquées dans l'électroporation, aucune observation directe de la formation des pores n'a pu être possible à ce jour. Pour cela, il faudrait disposer d'un système d'imagerie qui offre une résolution spatiale subnanométrique et qui puisse sonder la dynamique d'une multitude de molécules avec une résolution temporelle inférieure à la nanoseconde. À titre anecdotique, une équipe de IBM Research (CA, USA) a publié cette année une animation image par image (Stop-Motion film en anglais) mettant en scène des molécules de monoxyde de carbone se déplaçant individuellement sur une surface plane¹. Jamais auparavant un film n'avait été réalisé à une échelle aussi réduite. Le facteur de grossissement atteignait 10^8 ; des explications sur la technique employée pour la mise en mouvement des atomes ainsi que la technique de détection sont données dans [252].

À notre niveau et pour nos systèmes biologiques complexes, seules des techniques numériques telles que la dynamique moléculaire nous permettent aujourd'hui d'atteindre les échelles spatio-temporelles impliquées dans la formation des pores. La Figure 4.2 donne l'exemple d'un modèle de membrane étudiée via la technique dynamique moléculaire et électroporée par l'application d'un champ électrique de très forte intensité. Ces résultats montrent que la formation du pore se produit en l'espace de quelques nanosecondes une fois qu'elle est initiée. Les mécanismes physiques à l'origine de l'initiation des pores ne sont cependant toujours pas identifiés.



Profil spatial (3D) et temporel des
densités de charges,
potentiels,
champs électriques,
gradients de champ électrique, ?
avant et pendant la formation du pore

Figure 4.2 – Un modèle de membrane simulée en dynamique moléculaire et électroporée pendant l'application d'un champ électrique de 500 MV/m. Le champ électrique était appliqué à partir de $t = 0$ ns.

1. <http://www.research.ibm.com/articles/madewithatoms.shtml>

La membrane plasmique ainsi que les milieux intra- et extracellulaire contenant des molécules et groupements polaires, des charges partielles ou encore des ions, nous savons que les interactions électrostatiques y sont omniprésentes même en l'absence d'un stimulus électrique externe, et qu'elles jouent un rôle central dans la structure et le fonctionnement de la membrane [16, 253, 254]. En conséquence, il se pourrait qu'une étude électrostatique des systèmes étudiés en dynamique moléculaire, avant et pendant la formation du pore, puisse apporter des informations précieuses quant aux interactions physiques motivant la formation d'un pore. Une telle étude n'est cependant pas simple et requiert des outils spécifiques de modélisation électromagnétique.

L'équipe bioélectrophotonique au sein de XLIM dispose d'une expertise d'une quinzaine d'années sur la modélisation électromagnétique des systèmes d'exposition. Les études réalisées couvrent aussi bien la modélisation numérique des systèmes d'exposition à l'échelle macroscopique qu'à l'échelle microscopique, que ce soit dans le domaine fréquentiel ou temporel [5, 158, 190, 194, 230]. Ainsi, la question s'est posée de savoir ce que nous pouvions apporter pour l'étude électrostatique des systèmes modélisés en dynamique moléculaire. Suite à une collaboration, P. Thomas Vernier, alors chercheur à l'Université de Californie du Sud (USC, CA, USA) et désormais chercheur au Frank Reidy Research Center for Bioelectrics (VA, USA), nous a précisément interrogés sur la possibilité de calculer en trois dimensions et en fonction du temps, les potentiels, champs électriques et gradients de champ électrique au sein des systèmes moléculaires étudiés par son équipe, tels que le système montré Figure 4.2.

L'objectif de ce chapitre est de présenter l'outil numérique de nanodosimétrie que nous avons développé et utilisé dans ce but. Afin de mieux appréhender la méthode, nous introduirons tout d'abord les principes fondamentaux de la dynamique moléculaire puis nous présenterons un système moléculaire que nous avons étudié. Dans une seconde partie, nous discuterons des études antérieures visant à clarifier les mécanismes moléculaires de formation des pores. Les résultats de ces études nous permettront de clarifier les enjeux associés au développement d'un outil capable de calculer et de représenter les variations spatio-temporelles des potentiels, champs électriques et gradients de champ électrique à l'échelle subnanométrique. Dans une troisième partie, nous développerons le principe de fonctionnement de l'outil puis dans une dernière partie, nous présenterons et analyserons les résultats obtenus.

4.2 Les simulations de dynamique moléculaire

4.2.1 Les principes à la base de la dynamique moléculaire

La méthode dynamique moléculaire est une méthode déterministe dont le but est de calculer numériquement le mouvement, en fonction du temps, des atomes ou groupes d'atomes d'un système de molécules. La méthode a été introduite pour la première fois par Alder et Wainwright à la fin des années 1950. La première simulation d'un système réaliste a été réalisée par Rahman et Stillinger en 1974 [255].

Le principe de la méthode « all-atom » consiste à calculer l'évolution temporelle de la position des atomes par résolution numérique de la deuxième loi de la mécanique classique appliquée à chacun des atomes. Cette loi connue sous le nom de « principe fondamental de la dynamique » s'écrit :

$$m_i \cdot \vec{a}_i = \sum_j \vec{F}_{ij}, \quad (4.1)$$

où a_i ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$) est l'accélération du i -ème atome du système, m_i (kg) sa masse et F_{ij} (N) les forces qui s'exercent sur lui (ces forces seront explicitées ultérieurement). Les atomes sont donc considérés comme des masses ponctuelles dont les déplacements sont dictés par les forces s'exerçant sur eux. La géométrie initiale des atomes est imposée par l'utilisateur et les vitesses initiales, calculées à partir d'une distribution donnée, sont attribuées de manière aléatoire.

En dynamique moléculaire, seul le mouvement des noyaux atomiques est traité. La possibilité de dissocier le mouvement du noyau de celui de ses électrons est justifiée par l'approximation de Born-Oppenheimer. Cette approximation part du principe que la dynamique des électrons est beaucoup plus rapide que celle des noyaux, la masse des électrons étant très inférieure à celle du noyau. Les électrons suivent donc instantanément le mouvement des noyaux. De plus, la longueur d'onde moyenne de de Broglie associée à chaque atome (se rappeler de la dualité onde-corpuscule) est très inférieure aux distances inter-atomiques [256]. La probabilité que les paquets d'ondes se recouvrent et interfèrent est donc négligeable et les effets quantiques peuvent être négligés. Il n'y a pas nécessité de faire appel à la mécanique quantique pour les calculs souhaités.

Les intégrations numériques de l'équation (4.1) sont réalisées avec un pas d'intégration temporel infinitésimal de 1 ou 2 fs. Cet intervalle de temps est défini par rapport à la période des mouvements de plus haute fréquence. Les algorithmes fréquemment employés pour les intégrations numériques sont par exemple les algorithmes de Verlet ou de Leap-Frog [257]. Au vu des ressources nécessaires pour les calculs et la sauvegarde des données, les systèmes étudiés de nos jours excèdent rarement quelques millions d'atomes et les échelles de temps simulées se limitent souvent à la centaine de nanosecondes pour les systèmes complexes.

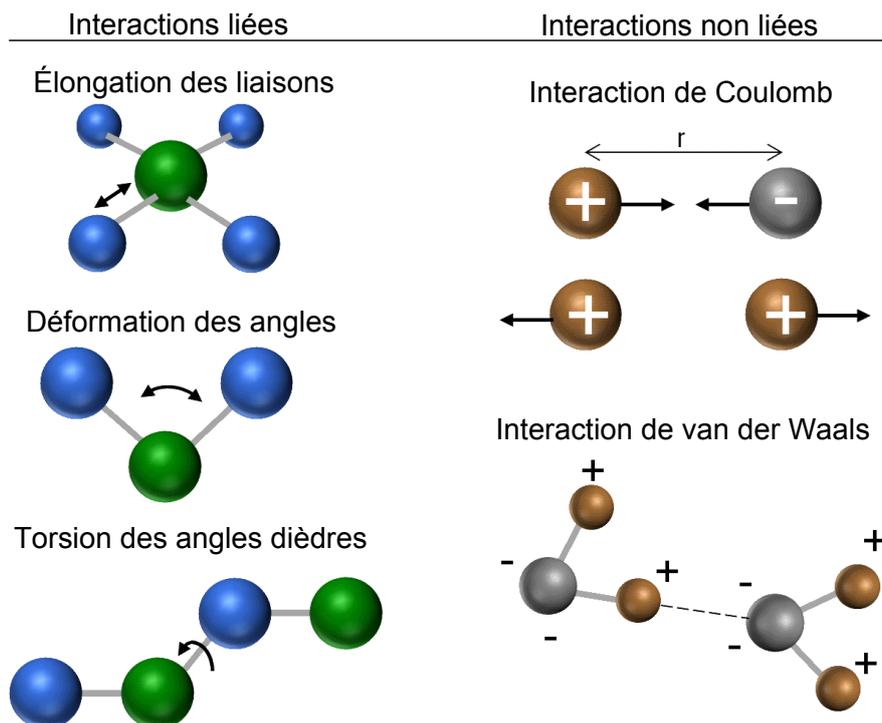


Figure 4.3 – Illustration des interactions liées (à gauche) et non-liées (à droite) en dynamique moléculaire.

Les forces d'interaction prises en compte dans les simulations regroupent les forces intra- et intermoléculaires. Comme illustrées Figure 4.3, les interactions liées sont principalement dues à l'élongation des liaisons, à la déformation des angles entre atomes liés ou encore à la torsion de ces angles. Les interactions non liées comprennent notamment les interactions électrostatiques (entre charges électriques) et les interactions de van der Waals (entre dipôles). Parmi les interactions non liées, on distingue les interactions à longue distance de celles à courte distance. Une interaction est dite à courte distance si et seulement si l'énergie potentielle dont elle dérive décroît en $1/r^d$ avec $d > 2$ (r étant la distance entre les éléments considérés). Force et énergie potentielle sont liées par une relation de gradient tout comme le champ électrique et le potentiel électrostatique. Ainsi, il n'est pas rare que l'énergie potentielle soit simplement désignée par le terme « potentiel ».

L'interaction électrostatique (ou de Coulomb) est une interaction à longue distance. L'énergie potentielle électrostatique E_{elec} associée à cette interaction est en effet inversement proportionnelle à la distance r séparant les deux charges q_1 et q_2 considérées :

$$E_{elec} = \frac{q_1 \cdot q_2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r}. \quad (4.2)$$

Les interactions de van der Waals sont quant à elles modélisées par un potentiel de

Lennard-Jones E_{vdW} d'expression :

$$E_{vdW} = \frac{A}{r^6} - \frac{B}{r^{12}}, \quad (4.3)$$

où A et B sont des paramètres qui dépendent des deux atomes d'intérêt et r est la distance entre leur noyau atomique. Les interactions de van der Waals sont donc à courte distance.

L'ensemble de toutes les forces modélisées compose le « champ de forces » (force field en anglais).

Des contraintes peuvent être imposées sur les liaisons covalentes, par exemple en fixant la longueur des liaisons. Si tel est le cas, les vibrations de liaisons à dynamique très rapide sont alors supprimées et le pas d'intégration peut être réduit à 1 fs.

Pour limiter les artefacts de simulation liés aux effets de bord dans le système étudié, ce dernier (contenu dans une boîte à 3 dimensions) est répliqué à l'infini dans toutes les directions de l'espace ; on parle de condition périodique aux limites. Pour limiter les temps de calcul, des sphères de troncature sont virtuellement introduites autour de chaque atome. Seules les interactions de l'atome avec les atomes compris dans cette sphère sont prises en compte. Ces troncatures peuvent induire des erreurs de calcul importantes pour les interactions à longue distance. Des méthodes ont été développées pour minimiser ces erreurs (par exemple les sommations d'Ewald, la méthode PME (Particle Mesh Ewald) [258] ou encore la méthode P3M (Particle-particle particle-Mesh) [259]).

Des fluctuations voire une dérive de l'énergie du système peuvent apparaître pendant les simulations. Pour restreindre les propriétés thermodynamiques du système à l'échelle de la boîte simulée, des conditions regroupées sous le terme d'« ensemble » sont imposées au système à chaque intégration temporelle. Les ensembles les plus souvent adoptés sont l'ensemble microcanonique (nombre d'atomes, volume et énergie totale fixés), l'ensemble canonique (nombre d'atomes, volume et température fixés) et l'ensemble isotherme-isobare (nombre d'atomes, température et pression fixés). Pour maintenir la température du système constante au cours du temps, les algorithmes typiquement utilisés sont les thermostats d'Andersén [260], de Berendsen [261] ou de Nové-Hoover [262] tandis que ceux employés pour le maintien de la pression sont principalement les barostats de Berendsen [261] ou d'Andersén [260].

Les domaines d'application de la dynamique moléculaire couvrent aussi bien la chimie que la biophysique ou encore les sciences des matériaux. En général, les résultats de simulation obtenus au cours du temps sont exploités pour l'étude des propriétés macroscopiques du système étudié. Le passage de l'échelle des atomes à l'échelle macroscopique s'appuie sur l'hypothèse ergodique. Celle-ci stipule qu'au sein d'un système dans un état stationnaire, la moyenne temporelle (sur un temps suffisamment long) d'une observable A à l'échelle d'une particule est égale à sa moyenne « instantanée » sur l'ensemble des particules du système, pour un système contenant un nombre infini de particules.

Il existe des programmes de simulation de dynamique moléculaire en libre accès sur Internet. Parmi eux se trouvent par exemple les suites logicielles GROMACS² (GRONingen MACHine for Chemical Simulations) et NAMD³ (Not (just) Another Molecular Dynamics program).

4.2.2 Un système de dynamique moléculaire à étudier avec l'outil de nanodosimétrie

À l'université de Californie du Sud, les simulations de dynamique moléculaire sont réalisées à l'aide de la suite logicielle GROMACS v.4.0.5. Un rendu visuel d'un des systèmes étudiés est montré Figure 4.4. Ce rendu visuel des atomes sous forme de sphères a été généré avec Visual Molecular Dynamics (VMD) [263], un programme de visualisation des résultats de dynamique moléculaire.

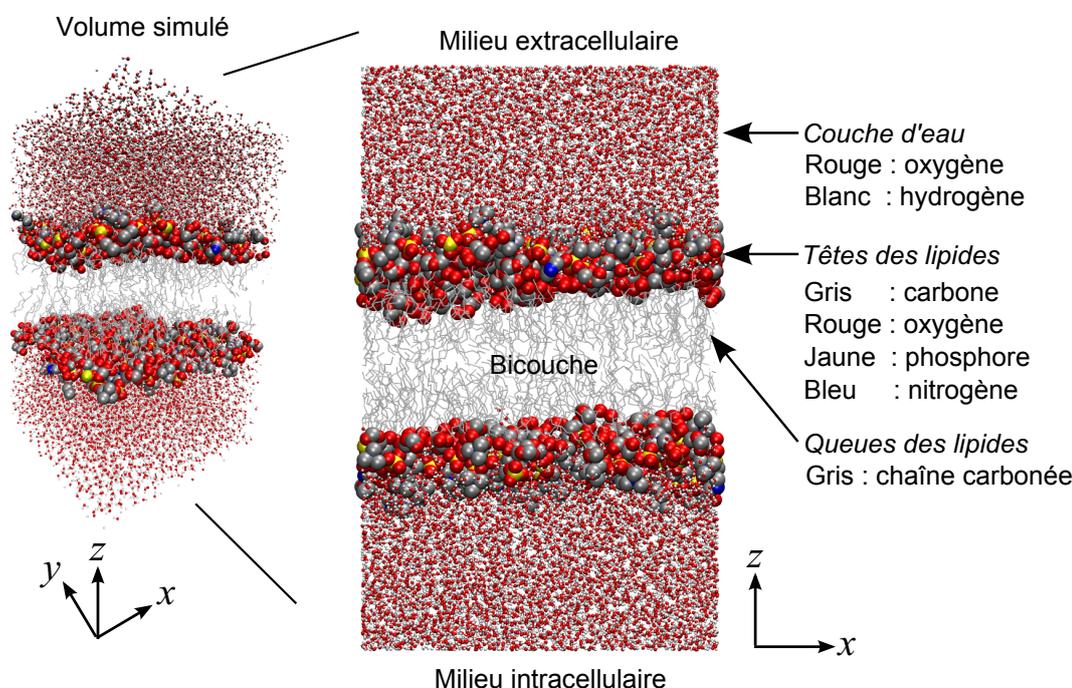


Figure 4.4 – Système d'atomes étudié à USC par les méthodes de la dynamique moléculaire. Représentation graphique générée avec Visual Molecular Dynamics (VMD) [263].

Le système modélisé représente une portion de membrane très simplifiée. La couche bilipidique, composée d'un unique type de phospholipides, est entourée d'un milieu aqueux composé exclusivement de molécules d'eau. Quantitativement, le modèle comprend un total de 128 lipides POPC (voir la Figure 1.13 pour leur topologie) et 9006 molécules d'eau, résultant en un système de taille initiale d'environ 7 nm (x) × 7 nm (y) × 10 nm (z). Le solvant (l'eau) est traité de manière explicite (voir l'illustration de la Figure 4.5).

2. <http://www.gromacs.org/>

3. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>

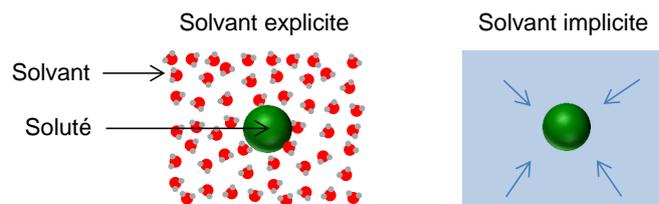


Figure 4.5 – Solvant modélisé de manière explicite (à gauche) et de manière implicite (à droite). Le soluté est schématisé comme une simple sphère.

En dynamique moléculaire, le solvant est plus souvent représenté par un continuum diélectrique modélisant l'effet de sa présence sur le soluté. Cette description implicite permet un allègement considérable des temps de calcul. Si cette représentation est adaptée pour l'identification des conformations préférées d'une seule molécule, ou bien pour l'étude des interactions entre une macromolécule et une protéine, elle ne l'est pas pour l'étude des interactions électrostatiques à la membrane [264].

Pour appliquer un champ électrique uniforme et perpendiculaire à l'interface membranaire, une force supplémentaire $\vec{F} = q \cdot \vec{E}_z$ est imposée sur chaque atome. Cette méthode revient à imposer virtuellement une différence de potentiel $\Delta V = E \cdot L_z$ aux bornes du système, où L_z est la longueur du système suivant l'axe \vec{z} [265, 266]. Il existe une autre méthode basée sur un déséquilibre des charges ioniques de part et d'autre de la membrane [265, 267–269]. Elle demande toutefois davantage de ressources informatiques et le maintien d'un champ électrique constant aux bornes du système est moins aisé lorsque la membrane est électroporée.

La Figure 4.6 montre un exemple d'électroporation du modèle décrit précédemment, lorsque le champ électrique appliqué était de 350 MV/m. Les trajectoires des atomes, obtenues par Ming-Chak Ho^{4,5}, ont été générées dans l'ensemble isobare-isotherme à l'aide des supercalculateurs de l'université de Californie du Sud⁶. Les détails des paramètres de simulation sont les mêmes que ceux donnés dans [270].

L'intensité du champ électrique était volontairement choisie très supérieure à celle appliquée à l'échelle macroscopique en expérimentation car le temps nécessaire à l'initiation d'un pore décroît exponentiellement quand le champ électrique augmente [270]. Le fait d'imposer un champ électrique aussi intense ne semble pas avoir d'incidence majeure sur les caractéristiques de formation du pore [267]. Augmenter la surface de la membrane simulée et/ou le temps de simulation permettrait également d'accroître la probabilité de formation d'un pore au cours du temps de la simulation [271]. Ces méthodes sont cependant très coûteuses en termes de temps d'exécution des calculs.

4. Department of Physics and Astronomy, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

5. MOSIS, Information Sciences Institute, Viterbi School of Engineering, University of Southern California, 4676 Admiralty Way, Marina del Rey, CA 90292, USA

6. <http://www.usc.edu/hpcc/>

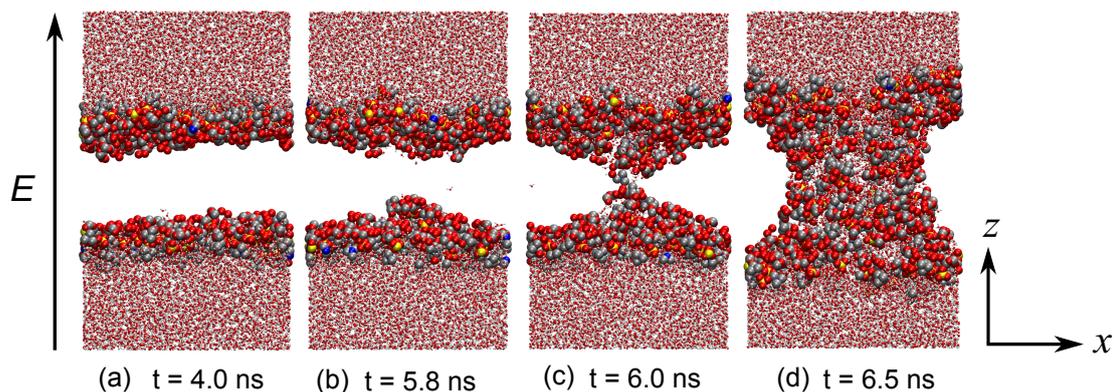


Figure 4.6 – Électroporation du modèle de membrane obtenue en dynamique moléculaire lorsque le système était soumis à un champ électrique de 350 MV/m à partir de $t = 0$.

Le champ électrique était appliqué une fois le système à l'équilibre (ici à $t = 0$) et son intensité était maintenue constante jusqu'à la formation du pore. En pratique, cela reviendrait à appliquer une impulsion parfaitement rectangulaire. À notre connaissance, seuls Hu et co-auteurs ont conduit des simulations de dynamique moléculaire avec un champ électrique dont les temps de montée et de descente étaient finis. Ils ont noté une diminution du temps de formation des pores par rapport au régime statique mais n'ont pas donné davantage de détails [272, 273].

4.3 À propos des mécanismes moléculaires de formation d'un pore en dynamique moléculaire

4.3.1 Les études antérieures

Comme expliqué précédemment Section 1.4.3 et mis en évidence Figure 4.6, l'électroporation de la membrane en dynamique moléculaire se manifeste par la formation d'une colonne de molécules d'eau traversant la membrane de part en part. Une étude récente, publiée par Tokman et co-auteurs, a proposé une justification à cette réorganisation des molécules d'eau sous l'effet d'un champ électrique [274]. Avant de donner les résultats de cette étude, nous retraçons brièvement les quelques résultats relatifs aux mécanismes physiques à la base de la formation des électro-pores qui ont été obtenus antérieurement par des simulations de dynamique moléculaire.

Les premiers travaux s'appuyant sur la dynamique moléculaire pour étudier la formation des électro-pores ont été publiés par D. Peter Tieleman en 2004 [126]. Ce dernier suggérait alors que la formation des pores était motivée par des gradients locaux de champ électrique générés à l'interface eau/lipides. Sous l'influence de ces gradients, les molécules d'eau (qui sont des dipôles permanents) seraient incitées à se déplacer vers la membrane, d'où leur probabilité accrue de pénétration dans celle-ci. En présence d'un gradient de

champ électrique $\vec{\nabla}E$, toute molécule présentant un moment dipolaire μ subit en effet une force \vec{F} telle que :

$$\vec{F} = \mu \cdot \vec{\nabla}E. \quad (4.4)$$

Il lui semblait par ailleurs que la probabilité de formation d'un pore augmentait lorsque des défauts locaux apparaissaient dans l'organisation des têtes polaires des lipides.

Des simulations réalisées ultérieurement par d'autres groupes de recherche ont mis en évidence une augmentation de quelques degrés vers la membrane de l'inclinaison moyenne des têtes polaires soumises à un champ électrique [128, 275]. Ziegler et co-auteurs ont toutefois écarté une contribution directe et exclusive des têtes polaires dans la formation d'un pore. Ils ont en effet montré, toujours par des simulations de dynamique moléculaire, que des membranes sans tête polaire pouvaient être électroporées [270]. Globalement, les détails des mécanismes moléculaires à l'origine de l'électroporation en simulation restaient alors mal compris.

Tokman et co-auteurs ont ensuite proposé une analyse énergétique du système à l'échelle moléculaire, et ont ainsi trouvé une possible justification à la formation des colonnes d'eau dans la membrane [274]. Comme illustré par un de leurs résultats montré Figure 4.7, lorsque l'intensité du champ électrique appliqué atteint un certain seuil, une configuration de dipôles empilés à la verticale devient moins énergétique qu'une organisation planaire de ces mêmes dipôles. L'apparition d'une protusion dans la membrane serait donc motivée si le champ électrique appliqué est suffisamment intense pour qu'une configuration verticale des molécules d'eau soit moins gourmande en énergie que la configuration horizontale. Les auteurs ont également montré que l'énergie totale d'interaction des molécules d'eau de la protusion avec toutes les autres molécules d'eau diminue lorsque la hauteur de la protusion augmente. Ceci expliquerait l'apparition à terme d'une colonne d'eau traversant la membrane. Les auteurs ont par ailleurs confirmé que les lipides de la membrane ont un rôle essentiellement passif dans la formation d'un pore car ils se contentent de suivre le mouvement des molécules d'eau à l'interface. Finalement, les mécanismes de formation d'un pore en dynamique moléculaire seraient relativement simples.

4.3.2 Les questions en suspens

La question soulevée à présent est la suivante : peut-on prédire la position où le pore se formera dans la membrane ? En particulier, nous nous interrogeons sur l'existence d'une possible corrélation entre la distribution spatio-temporelle des gradients de champ électrique et le site initial d'intrusion des molécules d'eau dans la membrane lorsqu'un pore se forme. Pour répondre à cette question, les gradients de champ électrique doivent être analysés avant l'initiation du pore à l'échelle des molécules. Dans les simulations de dynamique moléculaire à analyser, les longueurs des liaisons O-H et H-H de la molécule d'eau sont respectivement d'environ 0.10 nm et 0.16 nm. Les gradients de champ électrique

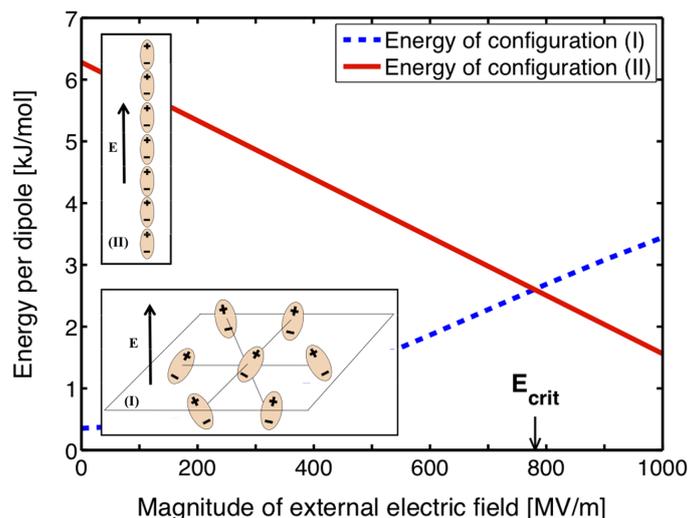


Figure 4.7 – Énergie totale de l'organisation planaire (I) et verticale (II) des dipôles en fonction de l'intensité du champ électrique appliqué. En trait pointillé bleu, l'énergie totale liée aux interactions dipôle-dipôle et dipôle-champ électrique pour la configuration (I). En trait plein rouge, la somme de l'énergie totale de solvatation nécessaire pour retirer les molécules d'eau du milieu extracellulaire et des énergies liées aux interactions dipôle-dipôle et dipôle-champ électrique pour la configuration (II). D'après [274].

doivent donc être analysés à l'échelle subnanométrique. Dans la partie à suivre, nous présentons l'outil numérique qui a été développé pour l'étude à cette échelle non seulement des gradients de champ électrique mais également des potentiels et champs électriques, qui sont eux aussi susceptibles d'apporter des informations intéressantes.

4.4 L'outil développé

4.4.1 Principe et mise en équation du problème

La méthode décrite dans ce paragraphe s'appuie sur le schéma de la Figure 4.8.

Les simulations de dynamique moléculaire donnant accès à la position des atomes au cours du temps et la topologie des molécules étant connue, il est possible d'en extraire la distribution spatio-temporelle des charges. Nous distinguerons désormais deux types de charges, à savoir les charges ponctuelles et les charges partielles. Une charge ponctuelle est une charge due au déficit ou au gain d'au moins un électron ; elle se rencontre dans les atomes ionisés (par exemple l'atome d'azote dans les têtes polaires des lipides POPC). Les charges partielles sont quant à elles dues aux liaisons covalentes polaires (par exemple la liaison O-H dans la molécule d'eau).

Pour mettre en équation les grandeurs électriques à calculer, supposons désormais un système d'atomes de densité volumique de charge ponctuelle notée $\rho^*(x, y, z)$. D'après la

loi de Gauss et les résultats obtenus Section 1.1.1, nous avons :

$$\nabla \cdot \vec{D}(x, y, z) = \rho^*(x, y, z) \quad (4.5)$$

$$\text{avec} \quad \vec{D}(x, y, z) = \epsilon_0 \vec{E}(x, y, z) + \vec{P}(x, y, z), \quad (4.6)$$

où \vec{D} est le vecteur déplacement, \vec{E} le vecteur champ électrique et \vec{P} le vecteur polarisation. En combinant ces deux dernières équations, nous obtenons alors :

$$\nabla \cdot (\epsilon_0 \vec{E}(x, y, z) + \vec{P}(x, y, z)) = \rho^*(x, y, z). \quad (4.7)$$

En posant $\rho(x, y, z)$ la densité volumique des charges incluant à la fois les charges ponctuelles et partielles (permanentes et induites), l'équation (4.7) devient :

$$\nabla \cdot \vec{E}(x, y, z) = \frac{\rho(x, y, z)}{\epsilon_0}. \quad (4.8)$$

L'épaisseur des membranes étant bien inférieure aux longueurs d'onde du spectre de l'impulsion délivrée en simulation, la propagation du champ électrique est négligeable et l'approximation des régimes quasi-stationnaires peut être appliquée. Le champ électrique dérive ainsi du potentiel électrique suivant $\vec{E} = -\vec{\nabla}V$ et nous en déduisons que :

$$\Delta V(x, y, z) = -\frac{\rho(x, y, z)}{\epsilon_0}, \quad (4.9)$$

où

$$\Delta V(x, y, z) = \frac{\partial^2 V(x, y, z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V(x, y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 V(x, y, z)}{\partial z^2}. \quad (4.10)$$

L'équation (4.9) est connue sous le nom d'équation de Poisson. Vu la complexité du système étudié, une résolution analytique de l'équation de Poisson n'est pas « possible ». Il faut donc faire appel à des méthodes numériques.

Une fois la distribution spatiale de V déterminée, les calculs de \vec{E} ($= -\vec{\nabla}V$) puis $\vec{\nabla}E$ sont directs. Pour déterminer l'évolution temporelle de ces grandeurs, en plus de la distribution spatiale, l'équation de Poisson est résolue pour toutes les densités de charge $\rho(x, y, z, t)$ extraites des trajectoires obtenues en dynamique moléculaire. Pour limiter le volume des fichiers à traiter et le temps d'exécution des calculs, les densités de charge ne sont pas extraites à chaque pas d'intégration de la simulation de dynamique moléculaire (qui vaut en l'occurrence 1 fs), mais sont typiquement échantillonnées toutes les picosecondes puis moyennées sur une certaine fenêtre temporelle (par exemple 50 ps pour le cas étudié).

Dans la partie à suivre, nous décrivons la méthode que nous avons implémentée pour la résolution numérique de l'équation de Poisson.

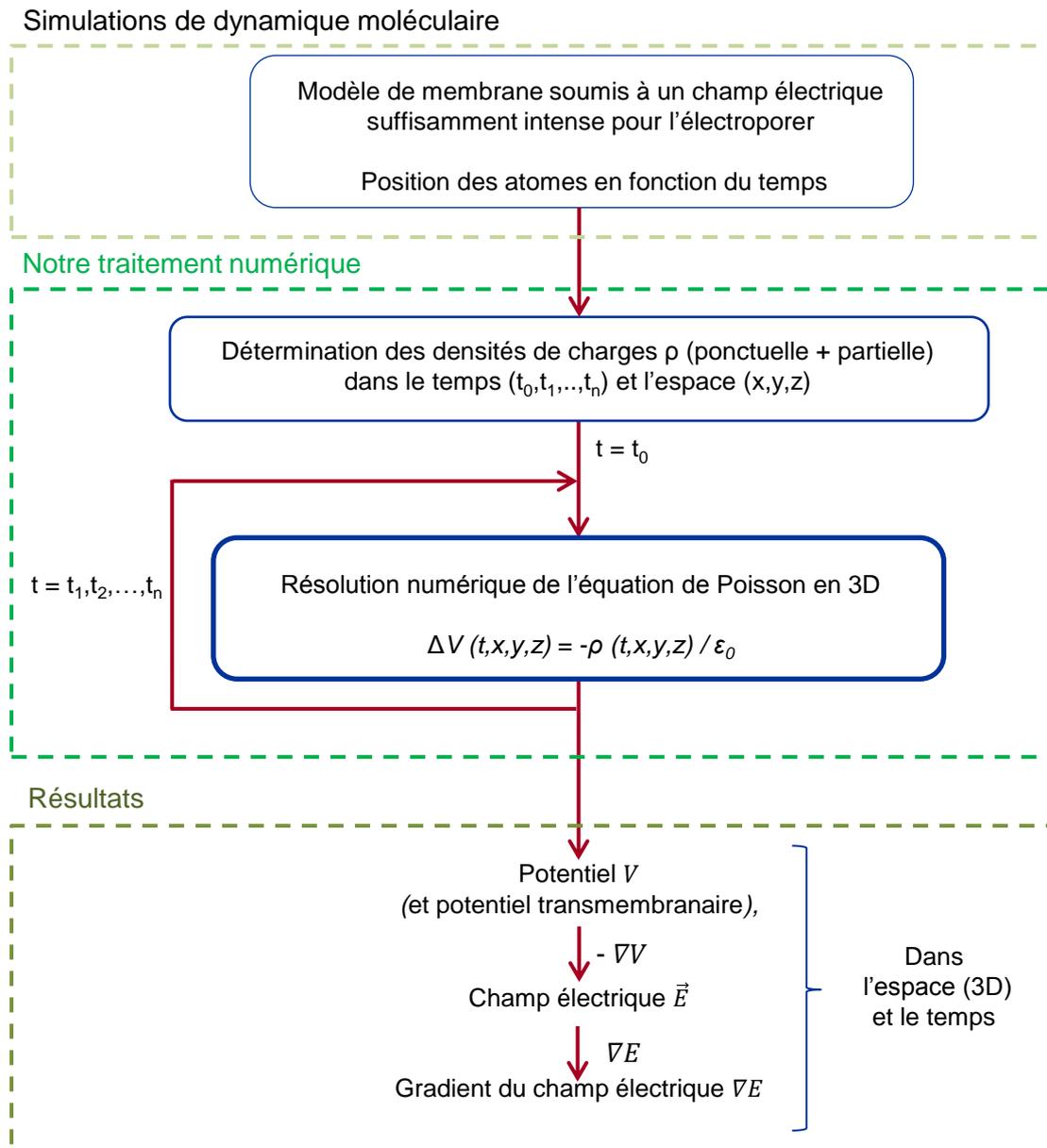


Figure 4.8 – Schéma de la méthode suivie pour déterminer la distribution spatio-temporelle de V , \vec{E} et $\vec{\nabla}E$ aux échelles subnanométrique/subnanoseconde.

4.4.2 Résolution numérique de l'équation de Poisson dans un système d'atomes

4.4.2.1 Les limites des outils existants

Il existe des outils en libre accès pour le calcul des potentiels électrostatiques en 3D au sein d'une distribution donnée d'atomes. Dans Visual Molecular Dynamics (VMD), deux modules d'extension y sont consacrés, PMEPot⁷ et Volmap⁸. Toutefois, ces outils m'ont paru plus appropriés pour une utilisation combinée avec les programmes de dynamique moléculaire NAMD⁹. En effet, ces modules sont capables de traiter directement les fichiers de trajectoire générés par NAMD mais ne lisent pas les fichiers de trajectoire de GROMACS. Il existe des outils en ligne dédiés à la conversion des formats de fichier de GROMACS vers ceux lisibles par VMD, mais ces outils ne semblent pas adaptés pour traiter des systèmes moléculaires aussi complexes que les nôtres. Il faut donc automatiser les conversions soi-même.

Par ailleurs, peu d'informations sont données sur les méthodes implémentées pour le calcul des potentiels dans les modules d'extension cités. Le calcul des champs électriques et gradients de champ électrique n'est de plus pas intégré et les possibilités de visualisation 3D des potentiels électrostatiques sont limitées. De manière générale, les outils existants de calcul électrostatique sont davantage prévus pour étudier des systèmes simples comprenant une voire quelques molécules et visualiser les potentiels électrostatiques à la surface des molécules [254].

Pour toutes ces raisons, le développement d'un outil « maison » a été motivé pour le calcul et la visualisation dans le temps et l'espace des potentiels, champs électriques et gradients de champ électrique à la membrane.

4.4.2.2 La méthode implémentée

Dans notre outil, les calculs électrostatiques sont réalisés par un code implémentant la méthode des différences finies ; le script a été développé sous MATLAB. Du fait de sa relative simplicité d'implémentation, la méthode des différences finies est une technique populaire de résolution approchée des équations aux dérivées partielles. Ci-dessous, nous décrivons le principe général de la méthode pour un problème tridimensionnel. Dans un souci d'allègement du texte, les détails de tous les calculs sont donnés en Annexe C.

Comme illustré Figure 4.9, la méthode des différences finies à trois dimensions consiste tout d'abord à discrétiser le volume de calcul en mailles rectangulaires de côté $dx \times dy \times dz$. Suivant ce maillage, les dérivées partielles de l'équation de Poisson sont ensuite développées en série de Taylor d'ordre 2.

7. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/pmepot/>

8. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/plugins/volmapgui/>

9. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>

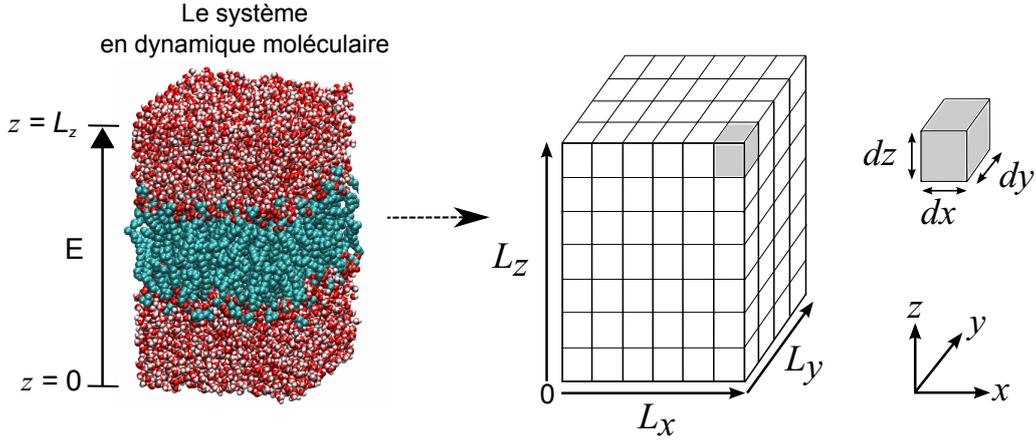


Figure 4.9 – Définition des volumes pour la discrétisation spatiale du volume étudié.

Suivant cette méthode, l'équation de Poisson (équation (4.9)) devient alors :

$$\frac{V^{x+dx} - 2V + V^{x-dx}}{dx^2} + \frac{V^{y+dy} - 2V + V^{y-dy}}{dy^2} + \frac{V^{z+dz} - 2V + V^{z-dz}}{dz^2} = -\frac{\rho(x, y, z)}{\epsilon_0}, \quad (4.11)$$

où V , V^{x+dx} , V^{y+dy} , V^{z+dz} sont les potentiels électriques respectivement aux points (x, y, z) , $(x + dx, y, z)$, $(x, y + dy, z)$ et $(x, y, z + dz)$, et $\rho(x, y, z)$ est la densité de charge moyennée dans la maille considérée.

Après développement, nous obtenons alors :

$$V = \frac{(V^{x+dx} + V^{x-dx}) \cdot dy^2 dz^2 + (V^{y+dy} + V^{y-dy}) \cdot dx^2 dz^2 + (V^{z+dz} + V^{z-dz}) \cdot dx^2 dy^2}{2(dy^2 dz^2 + dx^2 dz^2 + dx^2 dy^2)} + \frac{dx^2 dy^2 dz^2}{2 \cdot (dy^2 dz^2 + dx^2 dz^2 + dx^2 dy^2)} \frac{\rho(x, y, z)}{\epsilon_0}. \quad (4.12)$$

Par ailleurs, cette équation est associée à des conditions sur les potentiels aux frontières du système ; ces conditions sont appelées les conditions aux limites. Pour notre système, les conditions aux limites sont du type Dirichlet aux deux faces où étaient virtuellement appliqués les potentiels, soit $V = 0$ en $z = 0$ et $V = -E/L_z$ en $z = L_z$. Aux autres faces aux frontières du système étaient imposées les conditions aux limites de Neumann pour simuler l'espace libre infini. Nous imposons donc $dV/dx = 0$ pour les faces à x constant, $dV/dy = 0$ pour celles à y constant et $dV/dz = 0$ pour celles à z constant.

Pour résoudre de manière approchée l'équation (4.12) associée aux conditions aux limites, nous faisons appel à un algorithme itératif. À partir de la condition initiale choisie (potentiels nuls à l'intérieur du domaine) puis des solutions calculées à l'étape précédente, l'algorithme est réitéré jusqu'à satisfaction du critère de convergence défini. Pour accélérer la rapidité de convergence de l'algorithme et donc le temps d'exécution des calculs, la méthode de sur-relaxation successive rouge-noir (ou Red-Black SOR pour Successive over relaxation) a été implémentée au sein de l'algorithme. Le principe de

cette méthode est développé en Annexe C.

Une fois la convergence de l'algorithme atteinte, les composantes de \vec{E} sont calculées comme $\vec{E} = -\vec{\nabla}V$ et celles des gradients de champ électrique par définition comme $\vec{\nabla}E$.

Comme mentionné précédemment, les calculs sont réitérés pour toutes les densités de charge extraites au fil des simulations de dynamique moléculaire. Ceci permet d'obtenir l'évolution des grandeurs électriques dans le temps. L'algorithme reste le même pour la deuxième fenêtre temporelle et les suivantes, à ceci près que la condition initiale imposée sur les potentiels n'est alors plus la matrice nulle mais les potentiels obtenus à l'intervalle de temps précédent. Cette modification permet d'accélérer la convergence de l'algorithme.

Enfin, l'outil inclut une interface graphique permettant de visualiser en direct l'évolution spatio-temporelle des grandeurs calculées. Les résultats peuvent être enregistrés sous forme de vidéos.

4.5 Résultats

Dans cette partie, nous présentons des résultats de nanodosimétrie qui ont été obtenus grâce à l'outil de simulation électrostatique. Nous commencerons par montrer les différentes configurations de la membrane qui ont été étudiées avant et pendant l'électroporation. Nous exposerons et examinerons ensuite les cartographies des densités de charge, des potentiels, des champs électriques et des gradients de champ électrique qui ont été obtenues pour les configurations étudiées et les paramètres de simulation choisis.

4.5.1 Configurations analysées

Tous les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus à partir des configurations de la Figure 4.10. Pour des raisons de clarté, les queues des lipides ne sont pas représentées sur les figures. Les Figure 4.10d à Figure 4.10f correspondent respectivement aux états des Figure 4.10a à Figure 4.10c mais seules les molécules d'eau y sont représentées.

Nous appellerons « état 1 » ou « état initial » l'état correspondant à la Figure 4.10a, « état 2 » ou « état de protusion » celui associé à la Figure 4.10b et « état 3 » ou « état poré » celui de la Figure 4.10c.

Pour les calculs électrostatiques, le nombre de mailles n_x , n_y et n_z suivant les longueurs respectives L_x , L_y et L_z était imposé à $n_x \times n_y \times n_z = 64 \times 64 \times 106$. Étant données les dimensions du système, ce maillage résulte en une discrétisation spatiale de $dx \times dy \times dz = 0.10 \text{ nm} \times 0.10 \text{ nm} \times 0.10 \text{ nm}$. La taille des mailles peut varier de quelques picomètres en fonction du temps. Cette variation est liée aux fluctuations du volume de l'espace simulé en dynamique moléculaire. Cette fluctuation est nécessaire au maintien de la pression et de la température du système au cours de la simulation.

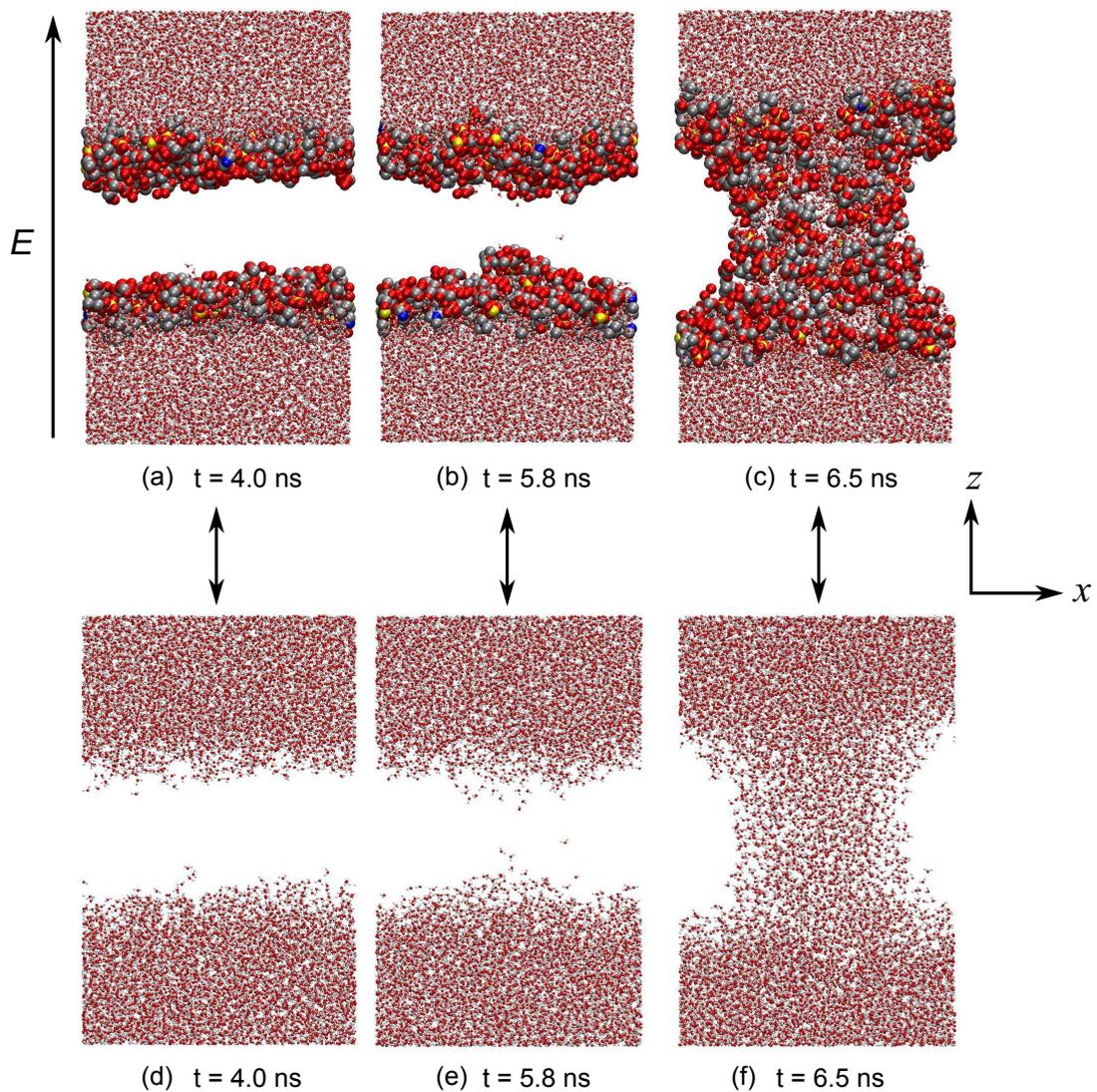


Figure 4.10 – Organisation des atomes dans le système étudié à $t = 4.0$ ns (a), $t = 6.0$ ns (b) et $t = 6.5$ ns (d). Les queues des lipides ne sont pas représentées. Les rendus (d–f) ne montrent que les molécules d’eau.

Pour les calculs, les densités de charge volumique (et donc les grandeurs électriques calculées) étaient moyennées temporellement sur une durée de 50 ps autour de l'instant considéré. Les fenêtres temporelles considérées pour les état 1, état 2 et état 3 sont données au Tableau 4.1.

État	Fenêtre temporelle de moyennage
État 1 (état initial)	4000 – 4050 ps
État 2 (état de protusion)	5800 – 5850 ps
État 4 (état poré)	6450 – 6500 ps

Tableau 4.1 – Fenêtre temporelle de moyennage pour les trois états étudiés.

4.5.2 Profil des densités volumiques de charge

Nous commençons par visualiser le profil des densités volumiques de charge moyennées dans le temps et l'espace selon les paramètres donnés précédemment. Sont prises en compte les charges partielles ainsi que les charges ponctuelles. Les résultats obtenus sont montrés Figure 4.11a pour l'état 1 et Figure 4.11b pour l'état 3. Les Figure 4.11c et Figure 4.11d montrent les densités de charge à l'état 1 associées respectivement aux lipides et aux molécules d'eau. Les densités de charge au sein des mailles sont représentées par une sphère dont la couleur et le diamètre dépendent de la valeur de la densité correspondante. Le diamètre de la sphère augmente avec la valeur absolue de la densité de charge correspondante.

Des cartographies, il apparaît que les densités volumiques de charge sont inhomogènes aussi bien dans la phase aqueuse que dans le plan des têtes polaires. À l'état initial, il n'y a logiquement pas de charge à l'intérieur de la membrane sachant que les queues des lipides sont apolaires. Les densités de charge sont en outre plus grandes dans les têtes polaires que dans la phase aqueuse. Une fois la membrane électroporée, nous observons de fortes densités de charge à l'intérieur du pore. Ceci est lié à la réorientation des lipides. Notons que les valeurs numériques indiquées sont spécifiques à la discrétisation spatio-temporelle choisie. Si le volume des mailles était augmenté, les densités de charge auraient tendance à diminuer du fait de la probabilité accrue que les charges se compensent au sein de la maille.

4.5.3 Profil des potentiels

La répartition spatiale des potentiels électrostatiques obtenus à l'état 1 et l'état 3 est montrée Figure 4.12. Les quatre plans affichés pour les deux configurations sont les plans $x = 0$, $y = 0$, $z = -1.5$ nm et $z = 2$ nm. Comme expliqué Figure 4.13, les potentiels aux noeuds des faces des mailles appartenant aux plans d'intérêt sont représentés par une

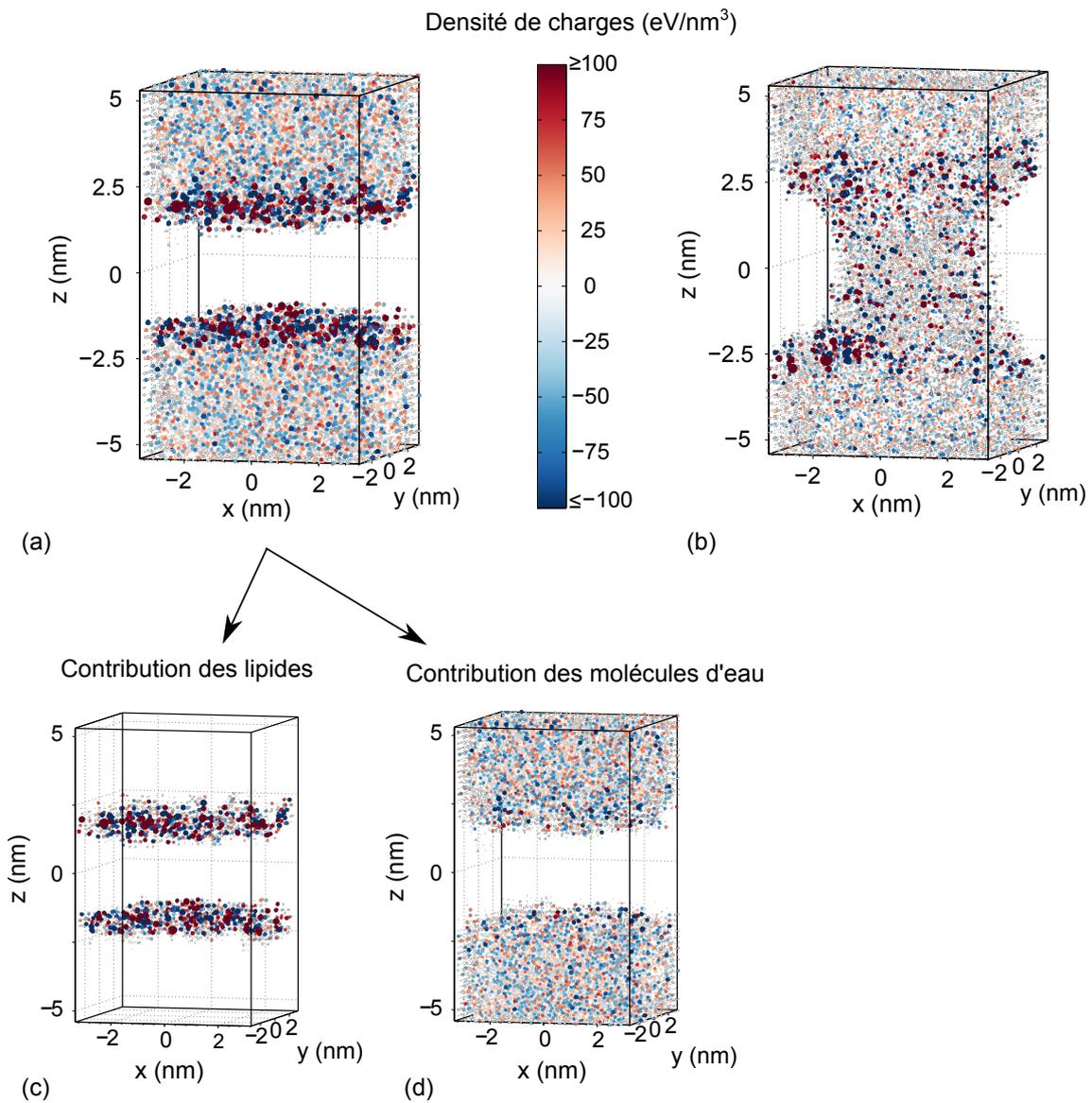


Figure 4.11 – Densité volumique de charge en eV/nm^3 à l'état initial (a,c,d) et à l'état poré (b). La figure (c) montre uniquement la contribution des lipides à l'état 1 et figure (d) uniquement la contribution des molécules d'eau dans ce même état. La densité de charge au sein de chaque maille est représentée par une sphère dont la couleur et le diamètre dépendent de sa valeur. Le diamètre de la sphère augmente avec la valeur absolue de la densité de charge correspondante. Cette représentation met en évidence les positions où les densités de charge sont les plus fortes (en valeur absolue).

surface rectangulaire dont la couleur dépend de la valeur du potentiel.

À partir des résultats, nous observons qu'à l'état initial, la chute de potentiel a lieu essentiellement aux bornes de la membrane qui agit comme un isolant. À l'état poré, la différence de potentiel entre les plans $z = -1.5$ nm et $z = 2$ nm est visiblement réduite. Le potentiel transmembranaire (entre les interfaces eau/lipides supérieure et inférieure) apparaît donc atténué à l'état poré par rapport à l'état initial.

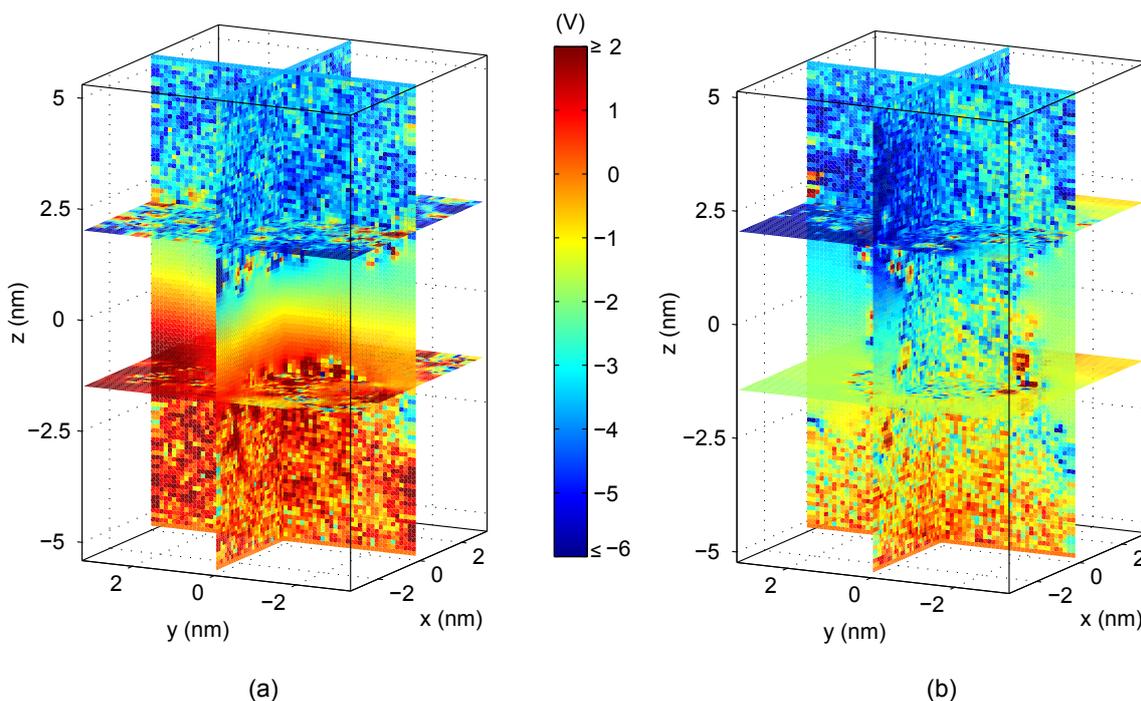


Figure 4.12 – Potentiel électrostatique à l'état initial (a) et à l'état poré (b) — à noter que les contrastes peuvent apparaître modifiés si la figure est visualisée en niveau de gris car la luminosité des couleurs ne varie pas linéairement avec les valeurs qu'elle représente.

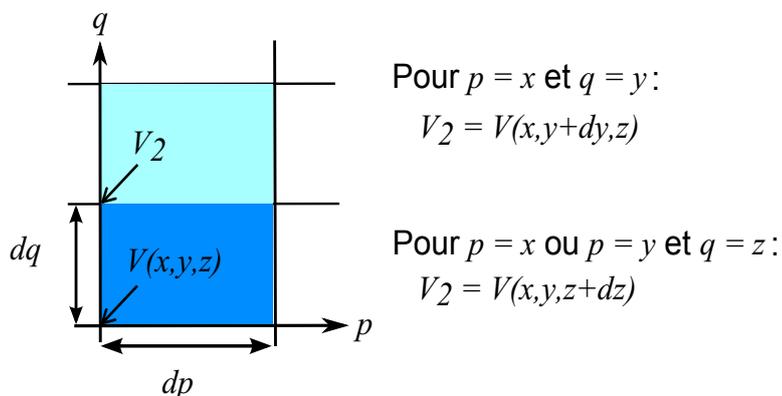


Figure 4.13 – Clarification de la méthode d'illustration des potentiels avec des surfaces rectangulaires à 2 dimensions.

4.5.4 Profil des champs électriques

4.5.4.1 Profil 3D

Les profils du champ électrique obtenu sont montrés Figure 4.14. Le champ électrique au centre de chaque maille est représenté par un cône dont la couleur et la taille (longueur et diamètre de la base) dépendent de l'intensité de \vec{E} . Le centre de la base du cône est positionné au centre de la maille. La taille des cônes augmente avec la norme du vecteur champ électrique associé. Les intensités indiquées sont à considérer avec précaution sachant qu'elles ne représentent qu'une seule simulation de dynamique moléculaire et une discrétisation spatio-temporelle donnée. Pour être statistiquement représentatifs, les champs électriques devront être calculés pour des trajectoires d'atomes obtenues à partir de conditions initiales différentes.

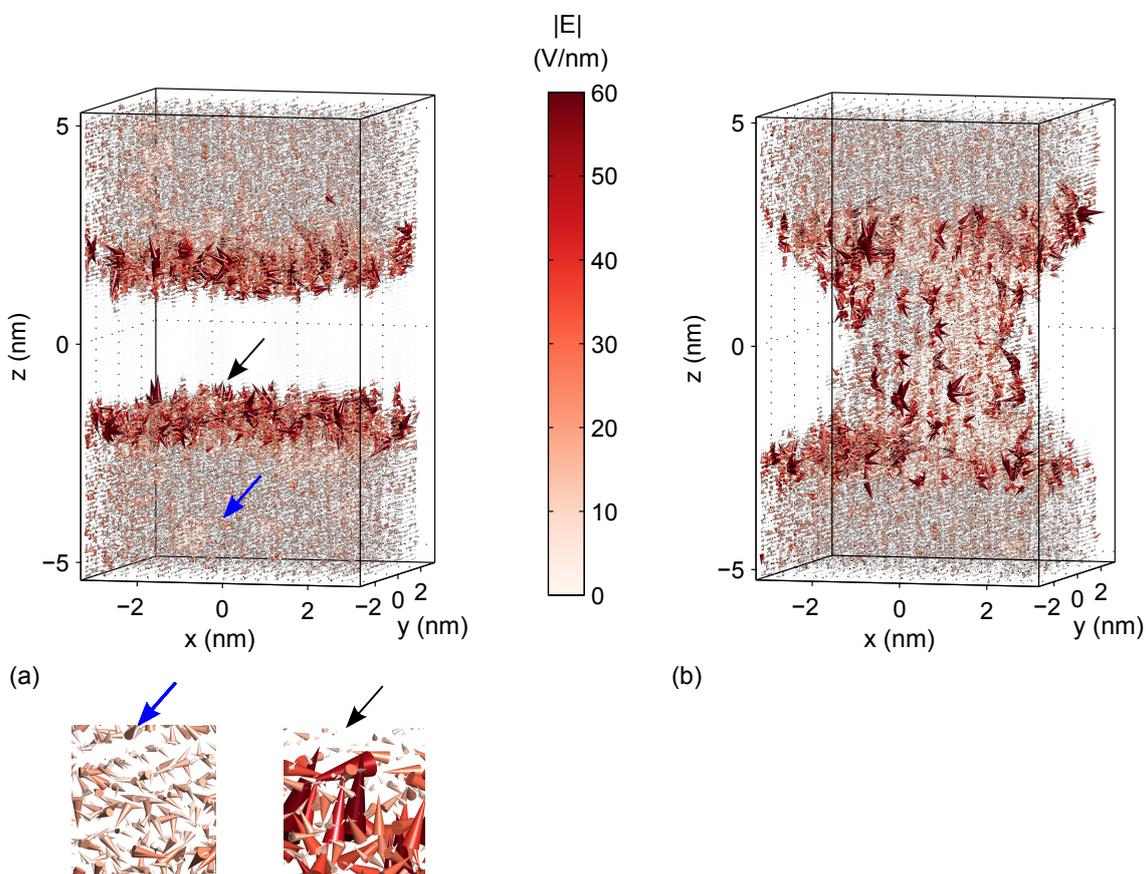


Figure 4.14 – Vecteur champ électrique à l'état initial (a) et à l'état poré (b). Le vecteur champ électrique au centre des mailles est représenté par un cône dont la couleur et la taille (longueur et diamètre de la base) dépendent de sa valeur. Pour des raisons de lisibilité, seul le champ électrique d'une maille sur quatre est affiché suivant la direction \vec{y} (excepté pour les représentations zoomées). Du fait des ombres appliquées, les cônes dont la couleur s'approche du blanc apparaissent grisés. La taille des cônes augmente avec la norme du vecteur champ électrique.

4.5.4.2 Profil 1D

Nous nous sommes également intéressés à la variation à une dimension de $E_z = \vec{E} \cdot \vec{z}$ en fonction de z . Pour se ramener à une dimension, E_z a été moyenné séparément sur chaque couche $xydz$, comme définie Figure 4.15. Pour comparaison, E_z à une dimension, désormais noté E_{z1D} , a de plus été calculé pour E_z moyenné sur le volume des couches dans la zone du pore ainsi que pour E_z moyenné uniquement à l'extérieur de la zone du pore. Le cylindre rose de la Figure 4.16 délimite la zone choisie pour le moyennage dans le (futur) pore tandis que la réunion des deux demi-cylindres verts délimite la zone de moyennage hors du pore. La section du cylindre vert est la même que celle des deux demi-cylindres verts réunis.

Les résultats obtenus pour l'état 1, l'état 2 et l'état 3 sont montrés Figure 4.17. À l'état initial (Figure 4.17a), le profil de E_{z1D} est similaire quelle que soit la zone de moyennage. Ceci n'est plus vrai dès lors que le pore commence à se former. E_{z1D} devient alors plus intense dans la zone de la protusion qu'à l'extérieur de celle-ci (voir Figure 4.17b). Une fois le pore formé (Figure 4.17c), nous observons un relâchement de l'intensité de E_{z1D} à hauteur du pore.

À titre de comparaison, ces résultats ont été superposés à ceux obtenus à partir des potentiels électrostatiques calculés par les modules PMEpot et Volmap. La discrétisation spatio-temporelle choisie était la même que celle imposée pour les calculs dans notre outil. Dans PMEpot, le facteur d'Ewald noté α (Ewald factor en anglais) était fixé à 5.0 \AA^{-1} . Ce facteur contrôle la largeur de la Gaussienne utilisée pour lisser les densités de charge dans l'espace. La largeur de cette Gaussienne augmente quand le facteur d'Ewald diminue. Dans la littérature, α est typiquement fixé en deçà de 1 \AA^{-1} [266, 276]. Pour notre étude, nous préférons limiter le lissage puisque notre intérêt se porte sur les grandeurs électriques locales. Les potentiels électrostatiques 3D calculés par les modules PMEpot et Volmap sont écrits dans un fichier .dx. Le calcul et la visualisation des champs électriques ont été réalisés par un script développé sous Matlab.

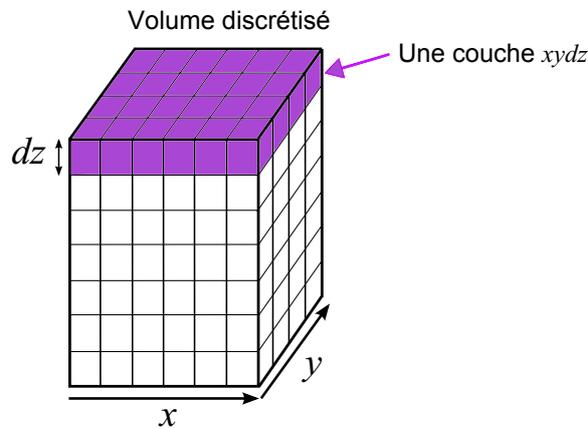


Figure 4.15 – Définition d'une couche $xydz$.

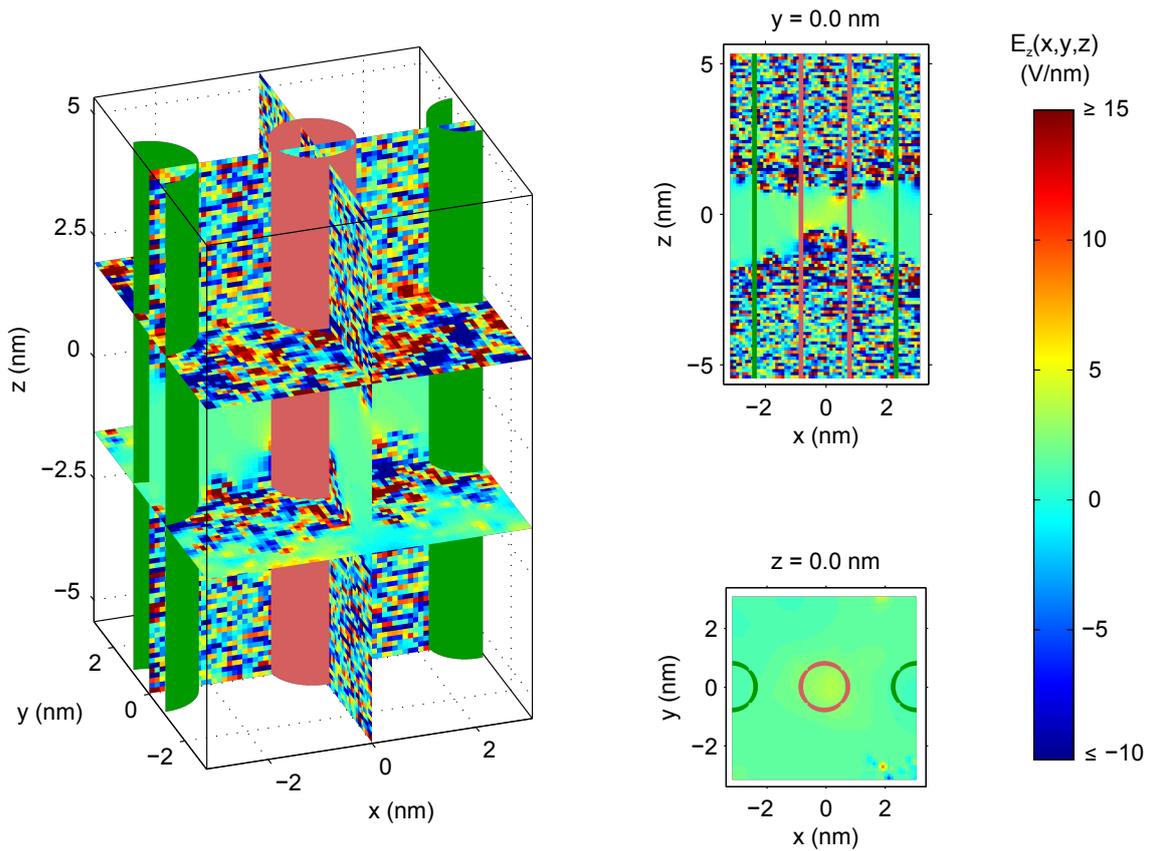


Figure 4.16 – Définition des surfaces de moyennage pour le calcul de E_z à 1 dimension. Le cylindre rose délimite la zone de moyennage dans le (futur) pore tandis que la réunion des deux demi-cylindres verts délimite la zone de moyennage hors du pore. La grandeur tracée est $E_z(x, y, z)$ à l'état 2. Les deux plans à droite montrent $E_z(x, y, z)$ dans le plan ($y = 0$) pour le graphe du haut et dans le plan ($y = 0$) pour le graphe du bas. Les traits pleins verts et roses donnent un aperçu des zones de moyennage.

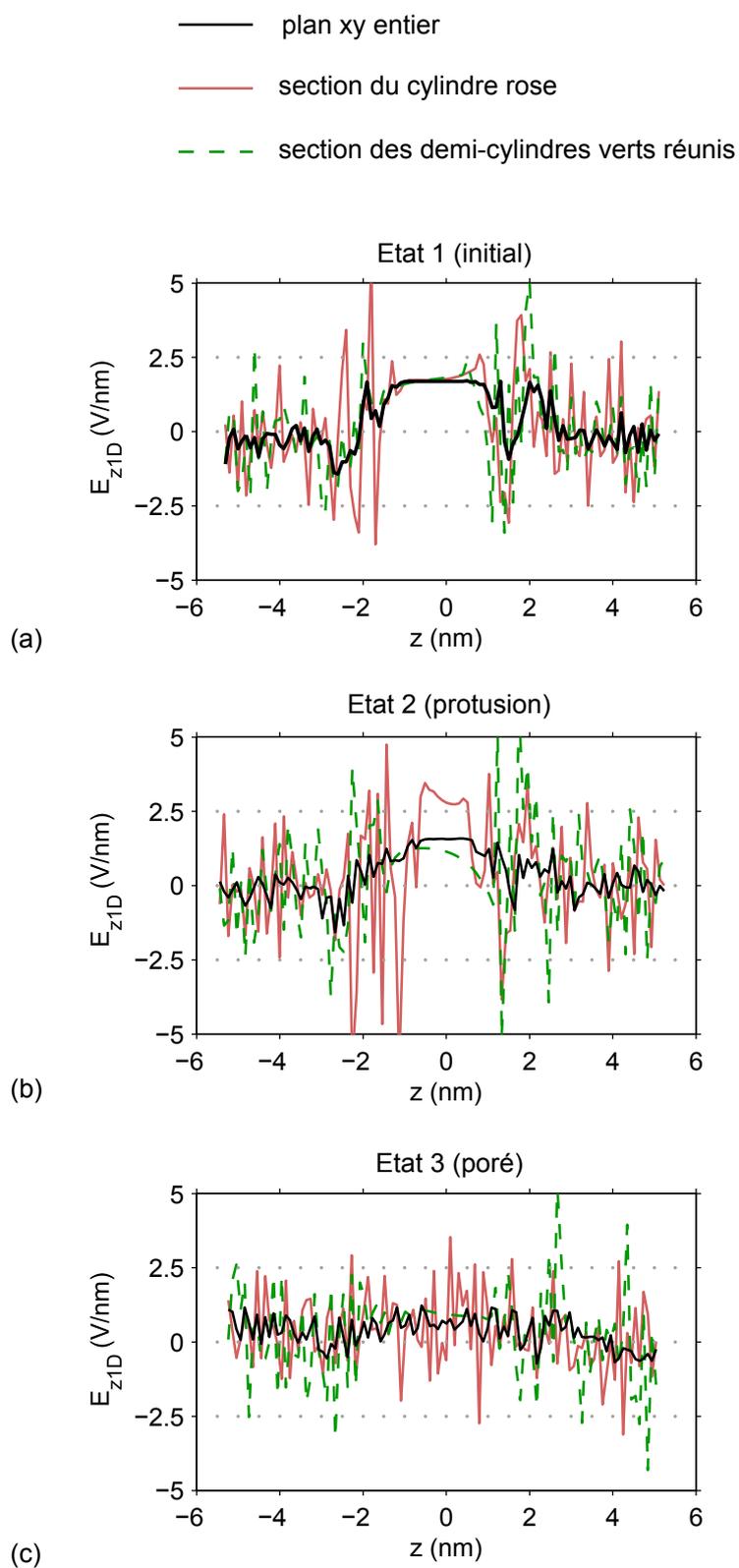


Figure 4.17 – E_z moyenné suivant les surfaces définies Figure 4.16 pour l'état 1 (a), l'état 2 (b) et l'état 3 (c).

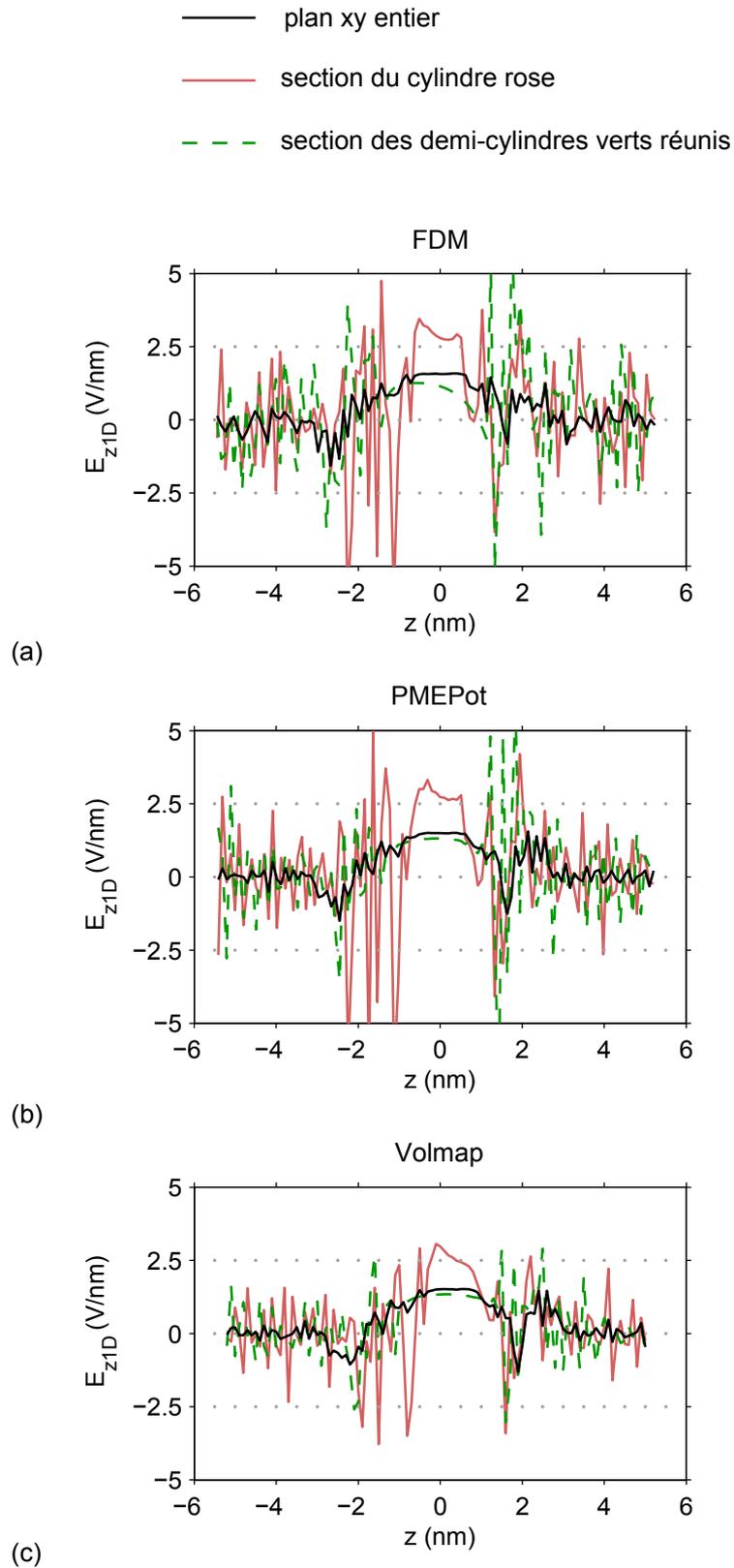


Figure 4.18 – $E_{z1D}(z)$ à l'état 2 à partir des potentiels électrostatiques calculés par la méthode des différences finies (a), PMEPot (b) et Volmap (c). Les surfaces sur lesquelles E_z est moyenné sont celles définies Figure 4.16.

Comme mentionné précédemment, nous en savons relativement peu sur les méthodes de calcul implémentées par PMEPot et Volmap. Des informations sur le site web de VMD indiquent que PMEPot calcule les potentiels électrostatiques à longue distance tandis que Volmap inclut les interactions électrostatiques à courte et longue distance. Dans tous les cas, les potentiels électrostatiques calculés par PMEPot et Volmap incluent uniquement le potentiel dit de réaction, c'est-à-dire le potentiel lié à la réorganisation des atomes en réponse au champ électrique appliqué [265]. Pour obtenir le potentiel électrostatique total, le potentiel appliqué, $V(z) = E \cdot z$, a donc été ajouté au potentiel de réaction. La méthode appliquée pour la réduction du problème à 1 dimension était la même que celle donnée aux paragraphes précédents.

Les résultats obtenus pour $E_{z_{1D}}(z)$ à l'état 2 sont montrés Figure 4.18. La Figure 4.18a est une copie de la Figure 4.17b. La Figure 4.18b montre les résultats obtenus à partir des potentiels électrostatiques calculés par PMEPot et la Figure 4.18c ceux obtenus via Volmap. Globalement, l'allure de $E_{z_{1D}}$ en fonction de z est similaire pour les trois outils de calcul électrostatique. Davantage d'analyses pourront être conduites dans le futur.

4.5.5 Profil des gradients de champ électrique

La problématique initiale était d'identifier s'il existe une corrélation entre les gradients de champ électrique avant la formation de la protusion et le lieu où celle-ci s'est formée. Si tel était le cas, il deviendrait alors possible de prédire voire de contrôler le lieu de formation du pore au cours de la simulation.

Une analyse visuelle du profil spatial des gradients de champ électrique en fonction du temps n'a pas mis en évidence de corrélation claire entre les gradients de champ électrique avant la formation de la protusion et le lieu de formation de celle-ci. Pour cette analyse, les trois composantes des gradients de champ électrique ont été visualisées à différentes hauteurs z en fonction du temps.

La Figure 4.19 montre un exemple de représentation graphique utilisée pour examiner une composante, à une hauteur z et une fenêtre temporelle donnés. Cette représentation montre l'intensité de $\vec{\nabla}E$ projeté selon \vec{z} dans toutes les mailles du plan $z = -1.8$ nm à l'état 1. Le plan du bas est la projection sur le plan xy de la visualisation en 3D.

Si une étude statistique venait à confirmer l'inexistence de la corrélation recherchée, alors les résultats plaideraient en faveur de l'hypothèse selon laquelle la formation des pores est un processus stochastique.

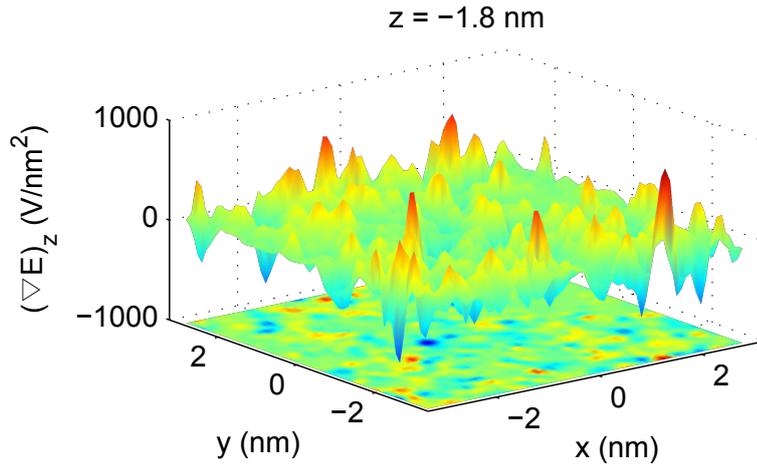


Figure 4.19 – Visualisation de l'intensité de $\vec{\nabla}E$ projeté selon \vec{z} dans toutes les mailles du plan $z = -1.8 \text{ nm}$ à l'état 1. Le plan du bas est la projection sur le plan xy de la visualisation en 3D.

4.6 Conclusion

Pour conclure ce chapitre, nous avons proposé un nouvel outil numérique pour l'étude électrostatique aux échelles subnanométrique et subnanoseconde des membranes biologiques électroporées en dynamique moléculaire. Les grandeurs électriques sont d'intérêt à cette échelle spatio-temporelle puisqu'elles pourraient nous aider à clarifier les mécanismes physiques impliqués dans l'électroporation des membranes soumises à d'intenses champs électrique pulsés nanosecondes.

L'outil développé permet de calculer et de visualiser les densités volumiques de charge, les potentiels, les champs électriques ainsi que les gradients de champ électrique. Ces grandeurs sont moyennées suivant des mailles parallélépipédiques rectangles de dimension souhaitée. La méthode de calcul des potentiels à partir des densités de charges ponctuelles et partielles s'appuie sur une résolution approchée de l'équation de Poisson. Cette résolution est réalisée numériquement par une approche aux différences finies.

Pour une discrétisation spatio-temporelle donnée, nous avons montré des cartographies 3D de grandeurs électrostatiques calculées par l'outil avant et pendant l'électroporation du modèle de membrane étudié. L'électroporation du modèle à l'échelle atomique avait été obtenue par des simulations de dynamique moléculaire à l'université de Californie du Sud. Le modèle était alors soumis à un champ électrique de 350 MV/m.

Les résultats obtenus via l'outil développé ont été communiqués à *57th Annual Meeting of the Biophysical-Society* [277] et *BioEM2013, Joint Meeting of the BioElectroMagnetics*

Society and the European BioElectromagnetics Association [278].

Discussions. Pour tirer des conclusions probantes à partir des cartographies spatio-temporelles des grandeurs électriques obtenues, davantage d'études statistiques seront nécessaires. Par ailleurs, les densités volumiques de charge extraites des simulations de dynamique moléculaire varient fortement en fonction de la discrétisation choisie. En conséquence, il conviendrait d'étudier l'évolution des grandeurs électriques en fonction du maillage spatio-temporel fixé. Qui plus est, le choix d'une fenêtre de moyennage temporelle aussi courte que 50 ps peut être sujet à discussion. En dynamique moléculaire, ce sont en effet les grandeurs moyennées dans le temps qui ont un sens. Il n'est pas certain qu'étudier un intervalle de temps aussi court soit pertinent [279]. Ce point-là demande à être éclairci.

Vers un modèle numérique multi-échelles. Les phénomènes physiques se produisant aux échelles macroscopique, microscopique et nanoscopique ne sont pas indépendants; ils sont couplés entre eux. L'enjeu actuel réside dans le développement d'un modèle reliant ces trois niveaux d'observation sans discontinuité. Pour atteindre cet objectif, il faut d'une part mettre en équation les phénomènes agissant à chaque échelle individuellement, et d'autre part identifier les données permettant de passer d'un niveau d'échelle à un autre.

Par exemple, le modèle prendrait comme condition initiale les impulsions électriques mesurées en expérimentation à l'échelle macroscopique. Un premier module déterminerait les conditions aux limites à appliquer au module traitant l'échelle microscopique. Ce module donnerait alors accès au champ électrique à appliquer en dynamique moléculaire. En fonction des effets biologiques observés à l'échelle moléculaire, les paramètres des impulsions appliquées en expérimentation pourraient être optimisés. La confrontation des effets obtenus en expérimentation et en simulation permettrait en outre d'affiner les modèles numériques.

Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse se sont inscrits dans un cadre de recherche interdisciplinaire visant à étudier les effets pouvant être induits dans des cellules exposées *in vitro* à d'intenses champs électriques pulsés nanosecondes et subnanosecondes.

Historiquement, ce sont les effets et applications pratiques des champs électriques pulsés de durée milliseconde et microseconde qui ont été les premiers explorés. Selon les paramètres de l'exposition, à savoir l'intensité des impulsions délivrées (typiquement 0.1–2 kV/cm), leur durée, le nombre d'impulsions envoyées ainsi que la fréquence de répétition imposée, les impulsions peuvent perméabiliser de manière réversible ou irréversible la membrane plasmique des cellules. Ce phénomène non thermique est plus largement connu sous le nom d'électroporation réversible ou irréversible. L'électroporation réversible est à la base d'un nouveau traitement standard du cancer appelé électrochimiothérapie et d'abréviation ECT. Ce traitement combine l'injection d'un médicament anticancéreux à l'application locale d'impulsions électriques microsecondes au niveau de la ou des tumeurs. En électroporant la membrane, les impulsions électriques facilitent l'accès du médicament dans les cellules et potentialisent ainsi son action toxique. La dose de médicaments à administrer au patient peut donc être significativement diminuée tout en maintenant l'efficacité du traitement comparable à celle d'un traitement par chimiothérapie seul.

Les études expérimentales des effets des impulsions électriques nanosecondes de haute intensité (3–300 ns, 5–400 kV/cm) sont apparues ultérieurement en raison du manque initial de technologies capables de générer et de délivrer de telles impulsions à des cellules. Les résultats des études, conduites à partir des années 2000, ont montré la capacité de ces impulsions à induire des effets intracellulaires pouvant conduire à l'apoptose des cellules exposées.

Alors que la membrane plasmique joue le rôle d'isolant électrique aux basses fréquences (fréquences inférieures au domaine mégahertz), elle devient d'autant plus transparente au champ électrique que les composantes spectrales de ce dernier sont de hautes fréquences.

Même si les modes d'action des nsPEFs restent peu connus et promettent d'animer encore de nombreuses années de recherche, la question des effets que pourraient engendrer des impulsions électriques encore plus courtes (quelques nanosecondes à

subnanosecondes) est déjà soulevée. L'engouement pour les impulsions électriques subnanosecondes s'explique par la potentialité d'atteindre les temps de relaxation diélectrique des molécules des systèmes biologiques étudiés. Des chercheurs y voient aussi l'opportunité d'exposer les cibles grâce à une antenne large bande. À ce jour, les études des effets des impulsions subnanosecondes sont encore limitées par le manque de systèmes d'exposition adaptés. La difficulté est liée d'une part à la large bande passante requise et d'autre part aux très fortes intensités à générer. Dans ce contexte, le premier objectif des travaux de cette thèse était d'étudier de nouveaux outils expérimentaux pour l'exposition *in vitro* de cellules biologiques à d'intenses champs électriques pulsés de durée pouvant être inférieure à 3 ns.

Pour assurer l'interprétation, la reproductibilité et donc la validité scientifique d'un résultat de biologie obtenu à partir d'un système d'exposition, les conditions d'exposition doivent être maîtrisées et connues. Dans le cadre de nos études bioélectromagnétiques, ce sont la distribution spatio-temporelle du champ électrique ainsi que celle de la température qui sont d'intérêt à l'intérieur de l'échantillon exposé. L'évaluation de ces grandeurs à l'échelle macroscopique permet une caractérisation électromagnétique du système d'exposition. Un deuxième objectif de la thèse était ainsi d'étudier une méthode de dosimétrie expérimentale à l'échelle macroscopique. Si la macrodosimétrie est suffisante pour valider le fonctionnement d'un système d'exposition, elle ne l'est plus pour l'étude des mécanismes physiques impliqués dans les effets biologiques induits au niveau cellulaire. Un troisième objectif était donc d'étudier des méthodes de dosimétrie aux échelles microscopiques et nanoscopiques.

Générateur. Les travaux sur le générateur d'impulsions basé sur une structure coaxiale ont montré la capacité du générateur à délivrer des impulsions de plusieurs kilovolts et de durée allant de la vingtaine de nanosecondes jusqu'au régime subnanoseconde. La durée d'impulsion la plus courte qui a pu être délivrée est de 750 ps pour une amplitude de 3.5 kV environ. De plus, l'efficacité de commutation des commutateurs optoélectroniques employés a été étudiée en fonction de l'énergie optique incidente et de la tension de polarisation appliquée. Cette étude paramétrique permet de vérifier si la commutation est optimale pour les paramètres choisis et d'ajuster les paramètres dans le cas échéant. En théorie, la limite en tension du générateur est fixée à 20 kV par les composants utilisés. Des efforts sont en cours pour assurer une montée en tension parfaitement sécurisée jusqu'à cette limite.

Applicateur. Les applicateurs d'impulsions *in vitro* décrits dans la littérature (par exemple les cuvettes d'électroporation, les systèmes à microélectrodes et les systèmes planaires) sont limités par leur bande passante atteignant tout au plus quelques centaines de mégahertz. Cette limitation est liée à la configuration de contact électrode/milieu biologique/électrode. Pour délivrer de manière optimale des fréquences au-delà de cette

bande, nous avons proposé des cellules transverses électromagnétiques (cellule TEM) dans lesquelles les cellules biologiques sont exposées dans une boîte en plastique. Les cellules biologiques y sont donc isolées des électrodes et l'ensemble est simple d'utilisation pour les biologistes. Trois cellules TEM de taille différente ont été étudiées. Les mesures fréquentielles ont montré que la bande passante des trois cellules TEM excède 1 GHz. Dans le domaine temporel, les mesures ont mis en évidence la capacité des systèmes à délivrer fidèlement des impulsions de tension monopolaires et bipolaires aussi courtes qu'une nanoseconde et d'amplitude jusqu'à 2 kV. Pour délivrer des impulsions de tension de plus forte amplitude, les parois métalliques du plus petit modèle de cellule TEM devront être recouvertes d'un matériau isolant, afin d'éviter toute rupture diélectrique.

Dosimétrie expérimentale. Concernant la dosimétrie expérimentale à l'échelle macroscopique, nous avons montré la capacité d'une sonde électro-optique à mesurer les nsPEFs induits dans une cuvette d'électroporation de distance inter-électrodes de 4 mm. Cette sonde présente l'avantage d'être entièrement diélectrique. Sa capacité à mesurer d'intenses champs électriques pulsés dans l'air a été démontrée dans les cellules TEM. Les mesures réalisées au centre d'un milieu biologique contenu dans une boîte de Petri et exposé dans notre plus grand modèle de cellule TEM, ont révélé qu'une impulsion incidente monopolaire de durée 1 ns est transformée en une impulsion bipolaire dans l'échantillon. Dans le domaine fréquentiel, l'impulsion mesurée *in situ* par la sonde EO était caractérisée par un faible contenu basses fréquences pourtant présent dans le spectre de l'impulsion incidente. Ces résultats sont en accord avec le comportement conducteur du milieu biologique aux basses fréquences et son comportement d'isolant aux hautes fréquences. De plus, les mesures ont mis en exergue la forte atténuation du champ électrique dans l'échantillon par rapport aux impulsions électriques générées dans la zone de test en dehors de l'échantillon. Cette atténuation était attendue étant donnée la différence de permittivité diélectrique entre l'air et le milieu biologique. Des simulations électromagnétiques implémentant la méthode des différences finies dans le domaine temporel ont conduit à des résultats de champ électrique en accord avec ceux obtenus en expérimentation. Finalement, les milieux biologiques filtrant les basses fréquences, les cellules TEM sont adaptées pour l'étude spécifique des effets biologiques des hautes fréquences.

Par ailleurs, les cellules TEM développées ont été utilisées pour la calibration d'une sonde moléculaire thermosensible, en l'occurrence la rhodamine B. Cette sonde fluorescente a la particularité de pouvoir imager la température à l'échelle subcellulaire sans perturber le champ électrique local. Même miniaturisées, les sondes de température classiquement utilisées (thermocouple, thermistance à résistance et sonde à fibre optique) ne peuvent réaliser de mesures intracellulaires car elles perturberaient le fonctionnement de la cellule. Dans la littérature, les effets biologiques des impulsions électriques étudiées sont majoritairement considérés comme non thermiques. Des simulations numériques ont cependant montré qu'une absence d'élévation globale de température n'exclut pas que

des élévations de température de plusieurs degrés puissent apparaître localement aux sites d'interaction entre les impulsions électriques et la cellule. Ce point est actuellement investigué de manière expérimentale par les biologistes de notre équipe. Dans ce but, ils utilisent le système d'exposition basé sur la cellule TEM pour exposer les cellules biologiques à des impulsions électriques ultracourtes. Les variations temporelles de la température cellulaire sont visualisées simultanément grâce à la sonde précédemment calibrée.

Nanodosimétrie numérique. La fin de la thèse a été consacrée au développement d'un outil numérique électrostatique pour le calcul et la visualisation des potentiels, champs électriques et gradients de champ électrique à l'échelle atomique. En particulier, l'objectif était d'obtenir ces grandeurs au site d'électroporation des modèles de membrane exposés en dynamique moléculaire, avec l'espoir que la connaissance de ces grandeurs apportera des informations sur les mécanismes physiques à l'origine de la formation des pores. Le principe de l'outil de calcul développé s'appuie sur la résolution de l'équation de Poisson à partir de la distribution spatio-temporelle des densités volumiques de charge extraites des simulations de dynamique moléculaire. La méthode des différences finies a été implémentée pour la résolution de l'équation dans l'espace 3D.

La visualisation dans l'espace des densités volumiques de charge a révélé que leur distribution est très inhomogène pour un maillage de côté 0.1 nm et une fenêtre de moyennage temporelle de 50 ps. Pour la configuration étudiée, il est apparu que le potentiel transmembranaire diminue une fois que le pore est formé. Il semble également que le champ électrique dans la membrane augmente dans la zone de formation du pore, puis diminue dès lors que la protusion formée traverse la membrane de part en part. Concernant un possible lien entre la distribution spatio-temporelle des gradients de champ électrique et la position de formation initiale du pore, une analyse visuelle des résultats n'a à ce jour pas révélé de corrélation claire. Le processus semblerait stochastique. Davantage d'analyses seront toutefois requises pour confronter ces observations; l'outil est prêt dans ce but.

L'intitulé du manuscrit est ainsi justifié par tous les travaux décrits précédemment. Des expérimentations aux modélisations, de l'échelle macroscopique à l'échelle nanoscopique, des champs électriques oscillants aux champs électriques pulsés ultracourts, des volts par mètre aux mégavolts par mètre, de l'électronique à la biologie, des États-Unis à la Roumanie, cette thèse m'a permis d'explorer de nombreux horizons. Les champs électriques pulsés nanosecondes et subnanosecondes de haute intensité promettent sans aucun doute un avenir florissant au domaine du bioélectrique. Peut-être les trouvera-t-on un jour dans nombre de cabinets médicaux pour des applications thérapeutiques et/ou cosmétiques. J'espère en cela avoir apporté mon grain de sable au château.

Annexe A

Applicateurs pour exposition *in vivo*

A.1 Applicateurs standard pour l'électrochimiothérapie (ECT)

La méthode la plus élémentaire pour exposer une cible à un champ électrique consiste à positionner deux plaques rectangulaires conductrices de part et d'autre de la cible. Une plaque (appelée électrode) est alors connectée au potentiel de référence (la masse) et l'autre à la source de tension. Figure A.1a montre un exemple d'électrodes « plaques » utilisées en clinique pour l'ECT. Pour ce type d'électrodes, les cibles sont essentiellement

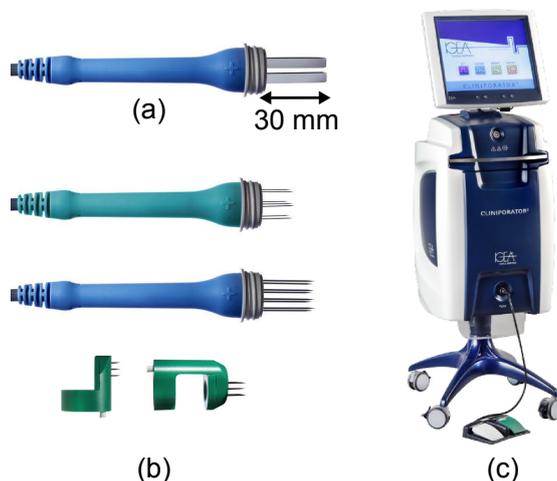


Figure A.1 – Applicateur pour l'électrochimiothérapie. (a) Applicateur avec électrodes de type plaques, (b) applicateurs avec électrodes de type aiguilles et (c) le CliniporatorTM pour délivrer les impulsions électriques de paramètres voulus¹. L'échelle entre les images (a)-(b) et (c) n'est pas respectée.

1. <http://www.igeamedical.com/oncology/cliniporator/synthesis-chemistry-and-physics-fight-cancer>

des tumeurs cutanées de taille réduite. L'inconvénient des applicateurs plaques *in vivo* est la faible homogénéité spatiale du champ électrique au sein de la tumeur exposée et l'impossibilité de traiter sans intervention chirurgicale des tumeurs localisées quelques centimètres sous l'épiderme. Pour pallier ces limites, des électrodes sous forme de réseaux d'aiguilles ont été développées. Ces électrodes, insérées dans la peau, permettent de traiter des nodules jusqu'à quelques centimètres de profondeur. Selon le nombre et la configuration des aiguilles, la distribution spatiale du champ électrique généré dans la tumeur peut être significativement plus homogène que celle qu'induirait des électrodes plaques. Selon la taille de la tumeur, une application répétée des impulsions électriques peut être nécessaire au traitement de l'ensemble de la tumeur. Le CliniporatorTM, appareil commercialisé par la société italienne IGEA S.p.A, est utilisé dans le traitement par ECT des lésions cutanées ainsi que des tumeurs des muqueuses et des tumeurs sous-cutanées. L'appareil dispose des configurations d'électrodes plaques et en aiguilles montrées Figure A.1 [35].

A.2 Appareils d'impulsions électriques haute tension nanosecondes (> 10 ns)

Les applicateurs utilisés pour délivrer d'intenses champs électriques pulsés nanosecondes *in vivo* s'appuient sur le même principe que ceux montrés au paragraphe précédent.

Nuccitelli et co-auteurs ont testé différentes configurations d'électrodes à succion pour traiter les mélanomes de souris via l'application d'impulsions électriques de 100 ns [98]. Les configurations sont montrées Figure A.2. Les auteurs ont mis en exergue une grande disparité d'efficacité des configurations. En prenant comme élément de comparaison la réduction de la taille de la tumeur à un instant donné après le traitement, la configuration (b) s'est révélée être la plus efficace tandis que la configuration (a) l'était le moins. Deux mille impulsions de durée 100 ns, d'intensité 30 kV/cm et envoyées avec une fréquence

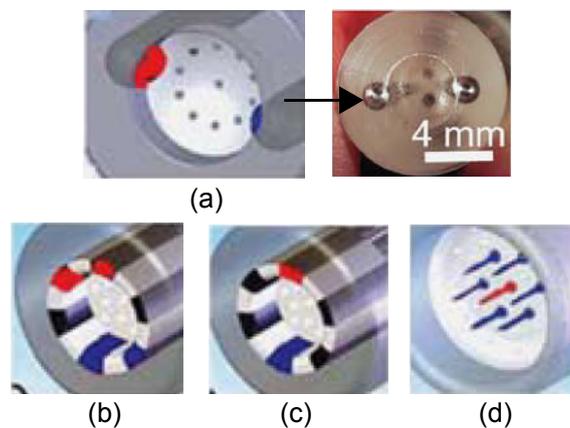


Figure A.2 – Différentes configurations d'électrodes. La différence de potentiel est appliquée entre les électrodes bleues et rouges. D'après [98].

de répétition de 5 à 7 impulsions par seconde ont permis d'éliminer tous les mélanomes traités en un unique traitement.

Le même groupe a conçu un système baptisé NanoBlate[®] System (BioElectroMed, CA, USA) pour l'ablation de tissus. Le système automatise l'envoi d'impulsions de 100 ns et d'intensité allant jusqu'à plusieurs dizaines de kilovolts par centimètre. Ils ont par ailleurs développé un système endoscopique dont le but serait d'offrir un traitement du cancer du pancréas ne nécessitant pas d'intervention chirurgicale. Ce système dit « EndoPulse » est basé sur un endoscope auquel est ajouté un réseau d'électrodes à pics. Ce réseau est déployé uniquement lorsque le système atteint la tumeur.

Annexe B

Méthode de dimensionnement d'une cellule TEM

Pour s'assurer qu'une ligne transmission (cas de la cellule TEM) transmet de manière optimale les impulsions souhaitées, l'impédance caractéristique de la ligne doit égaler l'impédance nominale des systèmes connectés aux deux extrémités.

Ci-après sont développées les formules analytiques reliant les dimensions transversales d'une ligne de transmission à son impédance caractéristique. Nous traitons tout d'abord le cas général puis nous l'appliquons à la cellule TEM.

Pour une ligne de transmission supposée sans pertes, l'impédance caractéristique Z_c est liée à la capacité linéique C (F/m) et l'inductance linéique L (H/m) de la ligne par :

$$Z_c = \sqrt{\frac{L}{C}} \quad (\Omega). \quad (\text{B.1})$$

Quant à la vitesse de phase v_p (m/s) de l'onde électromagnétique se propageant dans la ligne, elle est dictée par :

$$v_p = \frac{1}{\sqrt{L \cdot C}} \quad (\text{B.2})$$

$$= \sqrt{\frac{\epsilon}{\mu}}, \quad (\text{B.3})$$

où ϵ et μ sont respectivement la permittivité et la perméabilité magnétique du diélectrique (qui est l'air dans la cellule TEM). Ainsi, Z_c peut être exprimée par :

$$Z_c = \frac{\eta \cdot \epsilon}{C} \quad (\text{B.4})$$

où

$$\eta = \sqrt{\frac{\epsilon}{\mu}} \quad (= 120\pi \approx 377 \text{ pour le vide}). \quad (\text{B.5})$$

Étant données ϵ et μ , la connaissance de la capacité linéique permet donc de déterminer l'impédance caractéristique de la ligne de transmission. Z_c est le plus souvent exprimée en fonction de C plutôt que de L car déterminer C est plus aisé [280].

Différents modèles analytiques ont été développés pour déterminer la capacité linéique d'une cellule TEM de géométrie donnée. Ces modèles diffèrent par les approximations réalisées (septum de hauteur nulle ou non nulle), les hypothèses émises (septum positionné symétriquement ou non par rapport aux parois) et finalement pas leur domaine de validité (conditions sur la géométrie) [281].

Le principe des calculs consiste à résoudre la loi de Gauss pour les champs électriques sous sa forme intégrale. Sous cette forme, l'expression de la loi de Gauss est donnée par :

$$\oiint_S \vec{E} \cdot d\vec{S} = \frac{q_{enc}}{\epsilon_0}. \quad (\text{B.6})$$

Physiquement, cette loi signifie que le flux (en V·m) du champ électrique passant au travers d'une surface fermée S (terme de gauche) est proportionnel à la charge totale q_{enc} (C) contenue à l'intérieur de cette surface.

Sachant que les charges Q (C) emmagasinées dans un condensateur sont liées à la capacité C (F) du condensateur et à la différence de potentiel U (V) appliquée à ses bornes selon :

$$Q = C \cdot U, \quad (\text{B.7})$$

la connaissance de q_{enc} , pour un champ électrique donné, donne accès à la capacité équivalente de la structure considérée et donc à son impédance caractéristique Z_c . Les méthodes de résolution analytique de la loi de Gauss étant complexes, seuls les résultats sont repris ici. Les variables a , b , t , w mentionnées par la suite sont celles définies au Chapitre 2 Figure 2.29b. Elles sont exprimées en mètre.

Pour un septum placé symétriquement par rapport aux parois extérieures et de hauteur petite par rapport aux distances inter-plaques, Crawford approche la capacité linéique C (F/m) par [177] :

$$C = 4 \cdot \epsilon_0 \frac{w}{b-t} + C_f, \quad (\text{B.8})$$

où C_f (F/m) est la capacité liée aux effets de bord comme illustrée Figure B.1 (en anglais « fringing capacitance »).

Pour $(a-w)/(2b) \leq 0.4$, Malaric et co-auteurs exprime C_f selon [282] :

$$C_f = \epsilon_0 \cdot \frac{2b}{\pi(b-t)} \cdot \log \left(1 + \coth \left(\frac{\pi a - w}{2} \frac{a-w}{b-t} \right) \right) + \frac{t}{a-w}. \quad (\text{B.9})$$

Pour une hauteur de septum considérée nulle, une structure symétrique et $b/a < 0.35$,

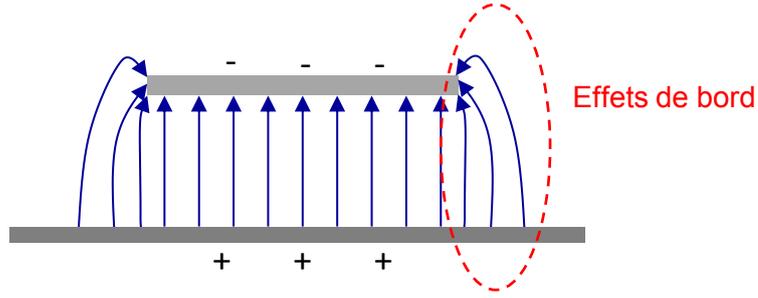


Figure B.1 – Illustration des effets de bord entre deux conducteurs électriques (rectangle gris) de largeur différente. Les lignes bleues représentent les lignes de champ électrique.

Tippet et Chang ont montré que la capacité linéique C peut être approximée par [281] :

$$C = 4 \cdot \epsilon_0 \cdot \left(\frac{w}{b} + \frac{2}{\pi} \log \left(1 + \coth \left(\frac{\pi \cdot a}{2 \cdot b} \right) \right) \right). \quad (\text{B.10})$$

Dans une autre publication, Crawford et co-auteurs ont proposé l'approximation suivante [283] :

$$C = 4 \cdot \epsilon_0 \cdot \left(\frac{a}{b} + \frac{2}{\pi} \log \left(\sinh \left(\frac{\pi(a-b)}{2 \cdot b} \right) \right) \right) - \Delta C, \quad (\text{B.11})$$

où ΔC est négligeable pour $g \gg w$.

Pour des structures dissymétriques, l'impédance caractéristique est préférentiellement calculée par des méthodes de calcul numérique telles que la méthode des différences finies à 2 dimensions. Le principe consiste à modéliser la section transversale de la cellule TEM selon un maillage de pas $(\Delta y, \Delta z)$ approprié. Un potentiel fixe $V_- = 0$ V est imposé aux nœuds du maillage représentant les plaques métalliques inférieure et supérieure tandis qu'un potentiel fixe $V_+ \neq V_-$ est imposé aux nœuds modélisant le septum. La résolution par différences finies de la loi de Gauss sous forme différentielle donne accès au champ électrique \vec{E} au centre des mailles. La méthode des différences finies est plus amplement détaillée en Annexe C. Ensuite, partant de la loi de Gauss sous forme différentielle, \vec{E} est lié à la densité de charge surfacique ρ (C/m²) par :

$$\oiint_S \nabla \cdot \vec{E} \, dS = \oiint_S \frac{\rho}{\epsilon_0} \, dS. \quad (\text{B.12})$$

Par application du théorème de Green, nous obtenons alors :

$$\oiint_S \nabla \cdot \vec{E} \, dS = \oint_c \vec{E} \cdot d\vec{n}, \quad (\text{B.13})$$

où c est un contour fermé incluant la surface d'intérêt (contour parcouru dans le sens inverse des aiguilles d'une montre), et \vec{n} est un vecteur unitaire normal au contour. Dans

le cas qui nous intéresse, la surface d'intérêt est la plaque centrale puisque c'est elle qui contient toutes les charges. Par souci de simplicité, la forme du contour est choisie rectangulaire. En combinant les équations (B.12) et (B.13), la charge totale Q incluse dans le contour peut s'exprimer par :

$$\oint_c \vec{E} \cdot d\vec{n} = Q. \quad (\text{B.14})$$

La valeur de la capacité équivalente de la section modélisée est finalement obtenue en appliquant l'équation (B.7).

En expérimentation, tous nos dispositifs présentent une impédance nominale de 50Ω . Les dimensions transversales de nos cellules TEM sont donc choisies de sorte que $Z_c = 50 \Omega$. En pratique, nous commençons par imposer la hauteur de la cellule TEM, à savoir b . La hauteur des plaques est fixée à $t = 1 \text{ mm}$ par le fabricant. À partir des formules analytiques, nous déduisons un couple (w, a) de valeurs pour la largeur des plaques. Pour affiner les valeurs, la géométrie est ensuite injectée dans le code aux différences finies. Le code est réitéré tant que l'impédance caractéristique calculée n'est pas égale à l'impédance voulue. S'agissant de la longueur totale des cellules TEM, elle est limitée par celle de la platine du microscope sur laquelle la cellule TEM est destinée à être posée. La longueur des zones de transition est typiquement choisie comme la moitié de la longueur de la zone centrale.

Annexe C

Méthode de résolution numérique de l'équation de Poisson en 3D

Dans cette annexe est détaillée la méthode que nous avons implémentée pour le calcul des potentiels, champs électriques et gradients de champ électrique au sein de notre volume à trois dimensions dont les densités de charge sont connues. La méthode décrite consiste en la résolution numérique de l'équation de Poisson par implémentation de la méthode des différences finies. Le choix de cette technique s'explique par sa relative simplicité de mise en œuvre et sa popularité pour la résolution approchée des équations aux dérivées partielles. Les explications à suivre s'appuient sur le système de la Figure C.1.

Nous rappelons que l'équation de Poisson s'écrit sous la forme :

$$\Delta V(x, y, z) = -\frac{\rho(x, y, z)}{\epsilon_0}, \quad (\text{C.1})$$

où

$$\Delta V(x, y, z) = \frac{\partial^2 V(x, y, z)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V(x, y, z)}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 V(x, y, z)}{\partial z^2}, \quad (\text{C.2})$$

et où V (en volt) est le potentiel électrostatique, ρ (en C/m³) la densité de charges ponctuelles et ϵ_0 la permittivité du vide.

La méthode des différences finies consiste à développer les dérivées partielles en série de Taylor d'ordre 2. L'équation de Poisson devient alors :

$$\frac{V^{x+dx} - 2V + V^{x-dx}}{dx^2} + \frac{V^{y+dy} - 2V + V^{y-dy}}{dy^2} + \frac{V^{z+dz} - 2V + V^{z-dz}}{dz^2} = -\frac{\rho(x, y, z)}{\epsilon_0}, \quad (\text{C.3})$$

où dx , dy et dz sont les pas de discrétisation selon respectivement \vec{x} , \vec{y} et \vec{z} et V , V^{x+dx} , V^{y+dy} , V^{z+dz} sont les potentiels électriques respectivement aux points (x, y, z) , $(x + dx, y, z)$, $(x, y + dy, z)$ et $(x, y, z + dz)$.

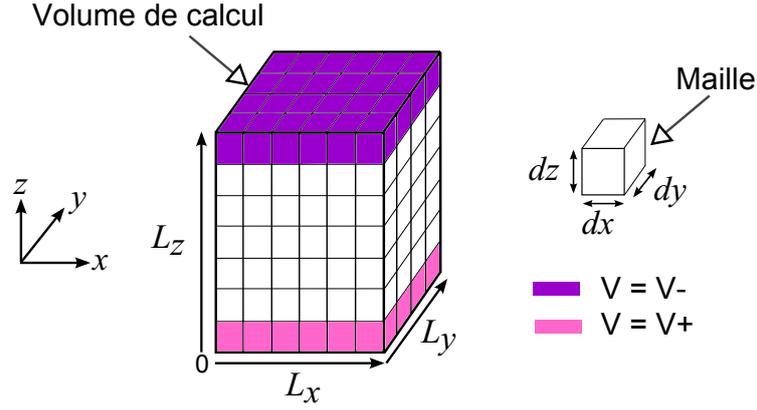


Figure C.1 – Volume de calcul et discrétisation associée.

Après développement, nous obtenons :

$$V = \frac{(V^{x+dx} + V^{x-dx}) \cdot dy^2 dz^2 + (V^{y+dy} + V^{y-dy}) \cdot dx^2 dz^2 + (V^{z+dz} + V^{z-dz}) \cdot dx^2 dy^2}{2(dy^2 dz^2 + dx^2 dz^2 + dx^2 dy^2)} + \frac{dx^2 dy^2 dz^2}{2 \cdot (dy^2 dz^2 + dx^2 dz^2 + dx^2 dy^2)} \frac{\rho(x, y, z)}{\epsilon_0}. \quad (\text{C.4})$$

Pour le système que nous étudions, les conditions aux limites étaient du type Dirichlet aux deux faces où étaient virtuellement appliqués les potentiels ($V = V_+$ en $z = 0$ et $V = V_-$ en $z = L_z$). Aux autres faces aux frontières du système étaient imposées les conditions aux limites de Neumann, qui simulent l'espace libre infini ($\delta V/\delta x = 0$ pour les faces à x constant, $\delta V/\delta y = 0$ pour celles à y constant et $\Delta V/\Delta z = 0$ pour celles à z constant).

Pour résoudre (de manière approchée) l'équation (C.4) associée aux conditions aux limites, nous faisons appel à un algorithme itératif. À partir de la condition initiale choisie (potentiels nuls à l'intérieur du domaine) puis des solutions calculées à l'étape précédente, l'algorithme était réitéré jusqu'à satisfaction du critère de convergence défini. Pour accélérer la rapidité de convergence et donc le temps d'exécution des calculs, la méthode de sur-relaxation successive rouge-noir (ou Red-Black SOR pour Successive over relaxation) a été intégrée à l'algorithme. Par souci de clarté, le principe de cette méthode est expliqué ci-dessous pour un cas général en 2D ; le cas 3D est analogue.

Prenons l'espace maillé de la Figure C.2. Chaque nœud est identifié par un couple d'indices entiers (i, j) . La démarche « rouge-noir » consiste à se représenter le maillage comme un échiquier. À chaque itération, les potentiels aux nœuds rouges (carrés) sont calculés séparément des potentiels aux nœuds noirs (ronds). Le calcul des potentiels aux points noirs et rouges reste toutefois imbriqué puisque le potentiel au nœud (i, j) dépend des potentiels de ses quatre voisins les plus proches, à savoir les nœuds en $(i - 1, j)$, $(i + 1, j)$, $(i, j - 1)$ et $(i, j + 1)$ qui sont de l'autre couleur.

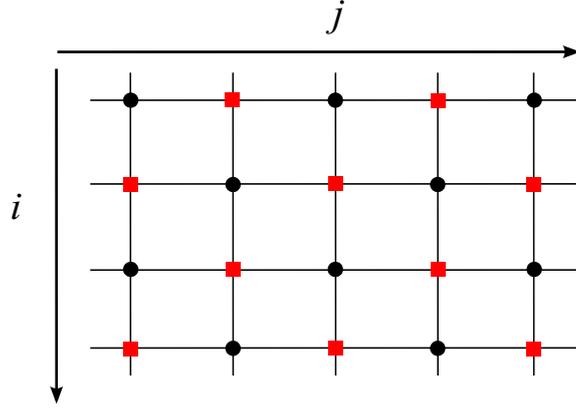


Figure C.2 – Maillage rectangulaire à 2 dimensions suivant la méthode rouge-noir.

Le principe de la sur-relaxation consiste pour sa part à calculer les potentiels à l'itération $n + 1$ non plus uniquement à partir des potentiels de ses voisins mais comme une combinaison linéaire de ces derniers et du potentiel au même nœud à l'itération n . Les potentiels V^{n+1} à l'itération $n + 1$ s'écrivent alors :

$$V^{n+1} = \alpha V_*^{n+1} + (1 - \alpha)V^n, \quad (\text{C.5})$$

où α ($1 < \alpha < 2$) est appelé le facteur de sur-relaxation et V_*^{n+1} serait la valeur de V^{n+1} calculée uniquement à partir de ses 4 voisins (c'est-à-dire sans sur-relaxation). Le choix de la valeur α est critique puisqu'elle peut conditionner la convergence de l'algorithme. Dans le code développé, la valeur de α était fixée à 1.9 (choix empirique).

Une fois la convergence de l'algorithme atteinte, les composantes de \vec{E} étaient définies au milieu des arêtes des mailles par :

$$E_{xx}(i + \frac{1}{2}, j, k) = -\frac{V(i + 1, j, k) - V(i, j, k)}{\Delta x} \quad (\text{C.6})$$

$$E_{yy}(i, j + \frac{1}{2}, k) = -\frac{V(i, j + 1, k) - V(i, j, k)}{\Delta y} \quad (\text{C.7})$$

$$E_{zz}(i, j, k + \frac{1}{2}) = -\frac{V(i, j, k + 1) - V(i, j, k)}{\Delta z}. \quad (\text{C.8})$$

La figure C.3 illustre la position du point de calcul des composantes E_{xx} , E_{yy} et E_{zz} par rapport aux nœuds du maillage.

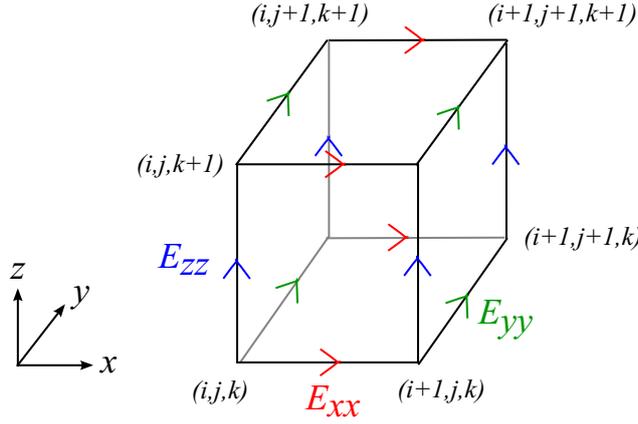


Figure C.3 – Position de calcul des composantes E_{xx} , E_{yy} et E_{zz} par rapport au maillage défini pour le calcul des potentiels.

Toutes les composantes étaient ensuite ramenées en un même point (le centre des mailles). Ces nouvelles composantes (E_x , E_y , E_z) étaient données par :

$$E_x\left(i + \frac{1}{2}, j + \frac{1}{2}, k + \frac{1}{2}\right) = \frac{1}{4} \left(E_{xx}\left(i + \frac{1}{2}, j, k\right) + E_{xx}\left(i + \frac{1}{2}, j + 1, k\right) \right) \\ + \frac{1}{4} \left(E_{xx}\left(i + \frac{1}{2}, j, k + 1\right) + E_{xx}\left(i + \frac{1}{2}, j + 1, k + 1\right) \right) \quad (\text{C.9})$$

$$E_y\left(i + \frac{1}{2}, j + \frac{1}{2}, k + \frac{1}{2}\right) = \frac{1}{4} \left(E_{yy}\left(i, j + \frac{1}{2}, k\right) + E_{yy}\left(i + 1, j + \frac{1}{2}, k\right) \right) \\ + \frac{1}{4} \left(E_{yy}\left(i, j + \frac{1}{2}, k + 1\right) + E_{yy}\left(i + 1, j + \frac{1}{2}, k + 1\right) \right) \quad (\text{C.10})$$

$$E_z\left(i + \frac{1}{2}, j + \frac{1}{2}, k + \frac{1}{2}\right) = \frac{1}{4} \left(E_{zz}\left(i, j, k + \frac{1}{2}\right) + E_{zz}\left(i + 1, j, k + \frac{1}{2}\right) \right) \\ + \frac{1}{4} \left(E_{zz}\left(i, j + 1, k + \frac{1}{2}\right) + E_{zz}\left(i + 1, j + 1, k + \frac{1}{2}\right) \right). \quad (\text{C.11})$$

La norme du champ électrique au centre des mailles était ensuite calculée selon :

$$\left| E\left(i + \frac{1}{2}, j + \frac{1}{2}, k + \frac{1}{2}\right) \right| = \left(E_x^2 + E_y^2 + E_z^2 \right)^{1/2}. \quad (\text{C.12})$$

Partant du même principe, les composantes de $\vec{\nabla}E$ étaient déterminées par :

$$\left(\vec{\nabla}E \right)_x\left(i + 1, j + 1, k + 1\right) = \\ \frac{1}{4} \left(\left(\vec{\nabla}E \right)_{xx}\left(i + 1, j + \frac{1}{2}, k + \frac{1}{2}\right) + \left(\vec{\nabla}E \right)_{xx}\left(i + 1, j + \frac{3}{2}, k + \frac{1}{2}\right) \right) \\ + \frac{1}{4} \left(\left(\vec{\nabla}E \right)_{xx}\left(i + 1, j + \frac{1}{2}, k + \frac{3}{2}\right) + \left(\vec{\nabla}E \right)_{xx}\left(i + 1, j + \frac{3}{2}, k + \frac{3}{2}\right) \right) \quad (\text{C.13})$$

$$\begin{aligned}
(\vec{\nabla}E)_y(i+1, j+1, k+1) &= \\
&\frac{1}{4} \left((\vec{\nabla}E)_{yy}(i+\frac{1}{2}, j+1, k+\frac{1}{2}) + (\vec{\nabla}E)_{yy}(i+\frac{3}{2}, j+1, k+\frac{1}{2}) \right) \\
&+ \frac{1}{4} \left((\vec{\nabla}E)_{yy}(i+\frac{1}{2}, j+1, k+\frac{3}{2}) + (\vec{\nabla}E)_{yy}(i+\frac{1}{2}, j+1, k+\frac{3}{2}) \right) \quad (C.14)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
(\vec{\nabla}E)_z(i+1, j+1, k+1) &= \\
&+ \frac{1}{4} \left((\vec{\nabla}E)_{zz}(i+\frac{1}{2}, j+\frac{1}{2}, k+1) + (\vec{\nabla}E)_{zz}(i+\frac{3}{2}, j+\frac{1}{2}, k+1) \right) \\
&+ \frac{1}{4} \left((\vec{\nabla}E)_{zz}(i+\frac{1}{2}, j+\frac{3}{2}, k+1) + (\vec{\nabla}E)_{zz}(i+\frac{3}{2}, j+\frac{3}{2}, k+1) \right) \quad (C.15)
\end{aligned}$$

où

$$(\vec{\nabla}E)_{xx}(i+1, j+\frac{1}{2}, k+\frac{1}{2}) = \frac{E_x(i+\frac{3}{2}, j+\frac{1}{2}, k+\frac{1}{2}) - E_x(i+\frac{1}{2}, j+\frac{1}{2}, k+\frac{1}{2})}{\Delta x} \quad (C.16)$$

$$(\vec{\nabla}E)_{yy}(i+\frac{1}{2}, j+1, k+\frac{1}{2}) = \frac{E_y(i+\frac{1}{2}, j+\frac{3}{2}, k+\frac{1}{2}) - E_y(i+\frac{1}{2}, j+\frac{1}{2}, k+\frac{1}{2})}{\Delta y} \quad (C.17)$$

$$(\vec{\nabla}E)_{zz}(i+\frac{1}{2}, j+\frac{1}{2}, k+1) = \frac{E_z(i+\frac{1}{2}, j+\frac{1}{2}, k+\frac{3}{2}) - E_z(i+\frac{1}{2}, j+\frac{1}{2}, k+\frac{1}{2})}{\Delta z}. \quad (C.18)$$

Bibliographie

- [1] K. H. Schoenbach, R. Nuccitelli, et S. J. Beebe, “Extreme voltage could be a surprisingly delicate tool in the fight against cancer,” *Spectrum, IEEE*, vol. 43, no. 8, p. 20–26, 2006.
- [2] M. Kenaan, “Développement d’applicateurs pour étudier le comportement des cellules biologiques soumises à des impulsions électromagnétiques ultracourtes,” Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://epublications.unilim.fr/theses/2010/kenaan-mohamad/kenaan-mohamad.pdf>
- [3] S. El Amari, “Développement et caractérisation de générateur optoélectronique d’impulsions de champ électrique nanoseconde et subnanoseconde de forte intensité : application au domaine biomédical,” Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://epublications.unilim.fr/theses/2011/el-amari-saad/el-amari-saad.pdf>
- [4] A. De Angelis, “Electro-optical pump-probe system suitable for the investigation of electroporated biological cells,” Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://epublications.unilim.fr/theses/2012/de-angelis-annalisa/de-angelis-annalisa.pdf>
- [5] T. Vu, “Contribution à la modélisation du comportement électromagnétique de milieux biologiques exposés à des impulsions de champ électrique nanosecondes,” Thèse de doctorat, XLIM - Université de Limoges, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://epublications.unilim.fr/theses/2012/vu-thi-dan-thao/vu-thi-dan-thao.pdf>
- [6] P. Mazur et B. Nijboer, “On the statistical mechanics of matter in an electromagnetic field. i : Derivation of the maxwell equations from electron theory,” *Physica*, vol. 19, no. 1, p. 971–986, 1953.
- [7] S. Liao, D. Peter, et J. Belcher, *Introduction to Electricity and Magnetism : MIT 8.02 Course Notes*, ser. ISBN-10 0536812071. Pearson, 2011.
- [8] J. Thuéry, *Les micro-ondes et leurs effets sur la matière : applications industrielles, agro-alimentaires et médicales*. CDIUPA, 1989.
- [9] Spectre électromagnétique et émissions de quelques équipements électriques. <http://www.inrs.fr/accueil/risques/phenomene-physique/champ-electromagnetique.html>. INRS (mai 2013).

-
- [10] J. Baker-Jarvis et S. Kim, “The interaction of radio-frequency fields with dielectric materials at macroscopic to mesoscopic scales,” *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, vol. 117, p. 1–60, 2012.
- [11] Agilent, “Basics of measuring the dielectric properties of materials. Application note,” Agilent Technologies, Rapport Technique, 2006.
- [12] Animal cell. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/Animal_Cell.svg. Wikipedia (mai 2013).
- [13] A details diagramm of the cell membrane. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/99/Cell_membrane_detailed_diagram_fr.svg. Wikipedia (mai 2013).
- [14] M. Edidin, “Lipids on the frontier : a century of cell-membrane bilayers,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 5, p. 414–418, May 2003.
- [15] S. J. Singer et G. L. Nicolson, “The fluid mosaic model of the structure of cell membranes,” *Science*, vol. 175, no. 4023, p. 720–731, Feb 1972.
- [16] F. Fogolari, A. Brigo, et H. Molinari, “The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics : a tool for structural biology,” *J. Mol. Recognit.*, vol. 15, no. 6, p. 377–392, 2002.
- [17] Popc. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine.svg>. Wikipedia (mai 2013).
- [18] Illustration of a eukaryotic cell membrane. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3a/Cell_membrane_detailed_diagram_4.svg. Wikipedia (mai 2013).
- [19] Les traitements. <http://www.e-cancer.fr/soins/les-traitements>. Institut national du cancer - Agence nationale sanitaire et scientifique en cancérologie.
- [20] Quels traitements utilise-t-on pour traiter le cancer. <http://www.canceropole-grandouest.com/fr/quels-traitements>. Cancéropôle Grand-Ouest.
- [21] A. Albertine, . Jougla, M. Eb, et G. Rey, “L’évolution de la mortalité et des causes de décès entre 1990 et 2009,” *Actualité et dossier en santé publique*, vol. 80, p. 24–28, septembre 2012.
- [22] R. Joshi et Q. Hu, “Case for applying subnanosecond high-intensity, electrical pulses to biological cells,” *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 58, no. 10, p. 2860–2866, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2011.2161478>
- [23] K. H. Schoenbach, B. Hargrave, R. Joshi, J. Kolb, R. Nuccitelli, C. Osgood, A. Pakhomov, M. Stacey, R. Swanson, J. White, S. Xiao, J. Zhang, S. Beebe, P. Blackmore, et E. Buescher, “Bioelectric effects of intense nanosecond pulses,” *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 14, no. 5, p. 1088–1109, 2007. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TDEL.2007.4339468>

- [24] J.-L. Lorrain et D. Raoul. (2002, novembre) L'incidence éventuelle de la téléphonie mobile sur la santé. chapitre ii - état des lieux en matière de recherche. <http://www.senat.fr/rap/r02-052/r02-0527.html>. Travaux parlementaires.
- [25] A. Duchêne et J. Joussot-Dubien, *Les effets biologiques des rayonnements non ionisants*. Flammarion Médecine-Sciences, 2001.
- [26] F. Gaudaire, *Au coeur des ondes : Les champs électromagnétiques en question*. Dunod, 2013.
- [27] P. Vecchia, R. Matthes, G. Ziegelberger, J. Lin, R. Saunders, et A. Swerdlow, "Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 khz-300 GHz)," *International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection*, 2009.
- [28] P. Rossignol. Méthodologie des essais cliniques de phase III. http://www.assim.refer.org/raisil/page86/files/page86_blog_entry0-cours-essai-clinique-phase-iii-2010-rossignol-maste.pdf.
- [29] B. Valeur *et al.*, *Molecular fluorescence : principles and applications*. Wiley-Vch, 2012.
- [30] A. D. Angelis, A. Labruière, V. Couderc, P. Leproux, A. Tonello, H. Segawa, M. Okuno, H. Kano, D. Arnaud-Cormos, P. Lévèque, et H. o Hamaguchi, "Time-frequency resolved analysis of a nanosecond supercontinuum source dedicated to multiplex cars application," *Opt. Express*, vol. 20, no. 28, p. 29 705–29 716, Dec 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-20-28-29705>
- [31] A. Silve, N. Dorval, T. Schmid, L. Mir, et B. Attal-Tretout, "A wide-field arrangement for single-shot cars imaging of living cells," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 43, no. 5, p. 644–650, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1002/jrs.4051>
- [32] H. Doevenspeck, "Influencing cells and cell walls by electrostatic impulses," *Fleischwirtschaft*, vol. 13, no. 12, p. 968–987, 1961.
- [33] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, et P. H. Hofschneider, "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields," *EMBO J.*, vol. 1, no. 7, p. 841–845, 1982.
- [34] K. Schoenbach, F. Peterkin, I. Alden, R.W., et S. Beebe, "The effect of pulsed electric fields on biological cells : experiments and applications," *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 25, no. 2, p. 284–292, 1997. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/27.602501>
- [35] I. C. Biophysics, "Cliniporator leading clinical electroporation, a simple solution for challenging situation," May 2010. [En ligne]. Disponible sur : http://www.igeamedical.com/sites/default/files/prodotti/cliniporator/files_allegati/cliniporatordepliant.pdf

- [36] D. Miklavčič, G. Pucihar, A. Lebar, J. Krmelj, et L. Towhidi, *The Pulse Intensity-duration dependency for Cell Membrane Electroporation*. In *Advanced electroporation techniques in biology and medicine*, 2010.
- [37] J. M. Escoffre, B. Nikolova, L. Mallet, J. Henri, C. Favard, M. Golzio, J. Teissie, I. Tsoneva, et M. P. Rols, “New insights in the gene electrotransfer process : evidence for the involvement of the plasmid DNA topology,” *Curr Gene Ther*, vol. 12, no. 5, p. 417–422, Oct 2012.
- [38] B. Poddevin, S. Orłowski, J. B. Jr, et L. Mir, “Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 42, Supplement 1, no. 0, p. S67 – S75, 1991. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000629529190394K>
- [39] M. Marty, G. Sersa, J.-R. Garbay, J. Gehl, C. G. Collins, M. Snoj, V. Billard, P. F. Geertsen, J. O. Larkin, D. Miklavcic *et al.*, “Electrochemotherapy - an easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases : Results of {ESOPE} (european standard operating procedures of electrochemotherapy) study,” *European Journal of Cancer Supplements*, vol. 4, no. 11, p. 3 – 13, 2006, electrochemotherapy. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359634906001868>
- [40] G. Sersa, M. Cemazar, et D. Miklavčič, “Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice,” *Cancer Res.*, vol. 55, no. 15, p. 3450–3455, Aug 1995.
- [41] S. T. Kee, J. Gehl, et E. W. Lee, *Clinical aspects of electroporation*, ser. ISBN 9781441983626. New York : Springer, 2011.
- [42] G. Sersa, D. Miklavčič, M. Cemazar, Z. Rudolf, G. Pucihar, et M. Snoj, “Electrochemotherapy in treatment of tumours,” *Eur J Surg Oncol*, vol. 34, no. 2, p. 232–240, Feb 2008.
- [43] U. Zimmermann et J. Vienken, “Electric field-induced cell-to-cell fusion,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 67, no. 1, p. 165–182, 1982. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/BF01868659>
- [44] A. I. Railkin, T. A. Ganf, et O. G. Manylov, “Marine biofouling colonization processes and defenses,” *Biofouling*, vol. 20, no. 2, p. 129–131, 2004.
- [45] A.-G. Amr et K. Schoenbach, “Biofouling prevention with pulsed electric fields,” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 28, no. 1, p. 115–121, 2000. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/27.842878>
- [46] K. H. Schoenbach, S. Katsuki, R. H. Stark, E. Buescher, et S. Beebe, “Bioelectrics-new applications for pulsed power technology,” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 30, no. 1, p. 293–300, 2002. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2002.1003873>

- [47] B. Rubinsky, *Irreversible electroporation*, ser. ISBN-13 : 978-3642054198. Springer, 2010.
- [48] B. Al-Sakere, F. André, C. Bernat, E. Connault, P. Opolon, R. V. Davalos, B. Rubinsky, et L. M. Mir, “Tumor ablation with irreversible electroporation,” *PLoS ONE*, vol. 2, no. 11, p. e1135, 11 2007. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.plos.org/10.1371%2Fjournal.pone.0001135>
- [49] P. A. Garcia, T. Pancotto, J. H. Rossmeisl, N. Henao-Guerrero, N. R. Gustafson, G. B. Daniel, J. L. Robertson, T. L. Ellis, et R. V. Davalos, “Non-thermal irreversible electroporation (N-TIRE) and adjuvant fractionated radiotherapeutic multimodal therapy for intracranial malignant glioma in a canine patient,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 10, no. 1, p. 73–83, Feb 2011.
- [50] Les nouvelles technologies dans l’alimentaire (2000). Institut Supérieur des Métiers.
- [51] V. Heinz, I. Alvarez, A. Angersbach, et D. Knorr, “Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields - basic concepts for process design,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 12, no. 3 - 4, p. 103 – 111, 2001. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224401000644>
- [52] H. Vega-Mercado, O. Martin-Belloso, B.-L. Qin, F.-U. Chang, M. M. Gongora-Nieto, G. V. Barbosa-Canovas, et B. G. Swanson, “Non-thermal food preservation : Pulsed electric fields,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 8, no. 5, p. 151 – 157, 1997, molecular and Microbial Polymer Imprinting Technology. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224497010169>
- [53] G. Saulis, “Electroporation of cell membranes : The fundamental effects of pulsed electric fields in food processing,” *Food Engineering Reviews*, vol. 2, no. 2, p. 52–73, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s12393-010-9023-3>
- [54] E. Puértolas, N. López, S. Condón, I. Álvarez, et J. Raso, “Potential applications of PEF to improve red wine quality,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 21, no. 5, p. 247–255, 2010.
- [55] B. Petit, M. Ritz, et M. Federight, “Nouveaux traitements physiques de conservation des aliments : revue bibliographique,” *Revue Méd. Vét.*, vol. 153, no. 10, p. 653–664, 2002.
- [56] S. Haberl, D. Miklavcic, G. Sersa, W. Frey, et B. Rubinsky, “Cell membrane electroporation-Part 2 : the applications,” *Electrical Insulation Magazine, IEEE*, vol. 29, no. 1, p. 29–37, 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/MEI.2013.6410537>
- [57] M. Kanduser et D. Miklavcic, “Electroporation in biological cell and tissue : An overview,” dans *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials*, ser. Food Engineering Series. Springer New York, 2009, p. 1–37. [En ligne]. Disponible sur : http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-79374-0_1

- [58] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, et A. R. Currie, "Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics," *Br. J. Cancer*, vol. 26, no. 4, p. 239–257, Aug 1972.
- [59] S. J. Beebe, P. M. Fox, L. J. Rec, E. L. Willis, et K. H. Schoenbach, "Nanosecond, high-intensity pulsed electric fields induce apoptosis in human cells," *FASEB J.*, vol. 17, no. 11, p. 1493–1495, Aug 2003.
- [60] K. D'Herde, A. Diez-Fraile, et T. Lammens, "Apoptotic, autophagic and necrotic cell death types in pathophysiological conditions : morphological and histological aspects," dans *Phagocytosis of Dying Cells : From Molecular Mechanisms to Human Diseases*. Springer, 2009, p. 33–62.
- [61] S. J. Beebe, P. M. Fox, L. J. 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, no. 1, p. 286–292, 2002. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2002.1003872>
- [62] S. J. Beebe, N. M. Sain, et W. Ren, "Induction of cell death mechanisms and apoptosis by nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs)," *Cells*, vol. 2, no. 1, p. 136–162, 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.mdpi.com/2073-4409/2/1/136>
- [63] 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, no. 2, p. 286 – 295, 2003. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X03017601>
- [64] 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, no. 5, p. 1168 – 1175, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273609000364>
- [65] J. A. White, P. F. Blackmore, K. H. Schoenbach, et S. J. Beebe, "Stimulation of capacitative calcium entry in HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 22, p. 22 964–22 972, May 2004.
- [66] S. J. Beebe, P. F. Blackmore, J. White, R. P. Joshi, et K. H. Schoenbach, "Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms," *Physiol Meas*, vol. 25, no. 4, p. 1077–1093, Aug 2004.
- [67] S. Wang, J. Chen, M. T. Chen, P. T. Vernier, M. A. Gundersen, et M. Valderrabano, "Cardiac myocyte excitation by ultrashort high-field pulses," *Biophys. J.*, vol. 96, no. 4, p. 1640–1648, Feb 2009.
- [68] R. Sundararajan, "Nanosecond electroporation : Another look," *Molecular Biotechnology*, vol. 41, no. 1, p. 69–82, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-008-9107-y>

- [69] W. Ren et S. J. Beebe, “An apoptosis targeted stimulus with nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) in e4 squamous cell carcinoma,” *Apoptosis*, vol. 16, no. 4, p. 382–393, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-010-0572-y>
- [70] I. Semenov, S. Xiao, et A. G. Pakhomov, “Primary pathways of intracellular Ca(2+) mobilization by nanosecond pulsed electric field,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1828, no. 3, p. 981–989, Mar 2013.
- [71] T. Batista Napotnik, Y. H. Wu, M. A. Gundersen, D. Miklavčič, et P. T. Vernier, “Nanosecond electric pulses cause mitochondrial membrane permeabilization in Jurkat cells,” *Bioelectromagnetics*, vol. 33, no. 3, p. 257–264, Apr 2012.
- [72] K. H. Schoenbach, S. J. Beebe, et E. S. Buescher, “Intracellular effect of ultrashort electrical pulses,” *Bioelectromagnetics*, vol. 22, no. 6, p. 440–448, Sep 2001.
- [73] K. Walker, O. N. Pakhomova, J. Kolb, K. H. Schoenbach, B. E. Stuck, M. R. Murphy, et A. G. Pakhomov, “Oxygen enhances lethal effect of high-intensity, ultrashort electrical pulses,” *Bioelectromagnetics*, vol. 27, no. 3, p. 221–225, 2006. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1002/bem.20200>
- [74] B. Gabriel et J. Teissie, “Generation of reactive-oxygen species induced by electropermeabilization of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 223, no. 1, p. 25–33, Jul 1994.
- [75] T. P. 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, no. 1-3, p. 1–3, août 2004. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.021>
- [76] P. T. Vernier, Y. Sun, J. Wang, M. M. Thu, E. Garon, M. Valderrabano, L. Marcu, H. P. Koeffler, et M. A. Gundersen, “Nanoelectropulse intracellular perturbation and electropermeabilization technology : phospholipid translocation, calcium bursts, chromatin rearrangement, cardiomyocyte activation, and tumor cell sensitivity,” dans *Engineering in Medicine and Biology Society, 2005. IEEE-EMBS 2005. 27th Annual International Conference of the. IEEE*, 2006, p. 5850–5853.
- [77] P. T. Vernier, Y. Sun, et M. A. Gundersen, “Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization,” *BMC Cell Biology*, vol. 7, no. 1, p. 1–16, 2006. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-7-37>
- [78] A. G. Pakhomov, A. M. Bowman, B. L. Ibey, F. M. Andre, O. N. Pakhomova, et K. H. Schoenbach, “Lipid nanopores can form a stable, ion channel-like conduction pathway in cell membrane,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 385, no. 2, p. 181 – 186, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X09009565>
- [79] D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, Y.-H. Wu, J. Sanders, M. Gundersen, et P. Vernier, “Microchamber setup characterization for nanosecond pulsed electric field exposure,”

- Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 58, no. 6, p. 1656–1662, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2011.2108298>
- [80] A. Silve, I. Leray, et L. M. Mir, “Demonstration of cell membrane permeabilization to medium-sized molecules caused by a single 10 ns electric pulse,” *Bioelectrochemistry*, vol. 87, no. 0, p. 260 – 264, 2012, international Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 21e BES. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539411001435>
- [81] P. Kramar, D. Miklavčič, M. Kotulska, et A. M. Lebar, “Chapter two-voltage- and current-clamp methods for determination of planar lipid bilayer properties,” *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, vol. 11, p. 29–69, 2010.
- [82] J. Teulon, “Le patch-clamp en bref,” *M/S : médecine sciences*, vol. 20, no. 5, 2004.
- [83] K. H. Schoenbach, R. Joshi, S. Beebe, et C. Baum, “A scaling law for membrane permeabilization with nanopulses,” *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 16, no. 5, p. 1224–1235, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TDEI.2009.5293932>
- [84] B. L. Ibey, A. G. Pakhomov, B. W. Gregory, V. A. Khorokhorina, C. C. Roth, M. A. Rassokhin, J. A. Bernhard, G. J. Wilmink, et O. N. Pakhomova, “Selective cytotoxicity of intense nanosecond-duration electric pulses in mammalian cells,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1800, no. 11, p. 1210–1219, Nov 2010.
- [85] 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, no. 2, p. 92–99, 2009.
- [86] B. L. Ibey, C. C. Roth, A. G. Pakhomov, J. A. Bernhard, G. J. Wilmink, et O. N. Pakhomova, “Dose-dependent thresholds of 10-ns electric pulse induced plasma membrane disruption and cytotoxicity in multiple cell lines,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 1, p. e15642, 01 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015642>
- [87] P. S. Hair, K. H. Schoenbach, et E. S. Buescher, “Sub-microsecond, intense pulsed electric field applications to cells show specificity of effects,” *Bioelectrochemistry*, vol. 61, no. 1-2, p. 65–72, Oct 2003.
- [88] M. Stacey, J. Stickley, P. Fox, V. Statler, K. H. Schoenbach, S. J. 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, no. 1 - 2, p. 65 – 75, 2003. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571803002328>
- [89] E. B. Garon, D. Sawcer, P. T. Vernier, T. Tang, Y. Sun, L. Marcu, M. A. Gundersen, et H. P. Koeffler, “In vitro and in vivo evaluation and a case report of intense

- nanosecond pulsed electric field as a local therapy for human malignancies,” *Int. J. Cancer*, vol. 121, no. 3, p. 675–682, Aug 2007.
- [90] 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, no. 8, p. 655–663, 2007. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1002/bem.20354>
- [91] X. H. Chen, S. J. Beebe, et S. S. Zheng, “Tumor ablation with nanosecond pulsed electric fields,” *HBPD INT*, vol. 11, no. 2, p. 122–124, Apr 2012.
- [92] N. Chen, L. G. Allen, G. Chen, Y. Jing, Y. Deng, R. J. Swanson, J. F. Kolb, B. S.J., J. R. P., et S. K. H., “Nanosecond electric pulses penetrate the nucleus and enhance speckle formation,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 364, no. 2, p. 220 – 225, 2007. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X07021006>
- [93] L. I. Bennett, D. G. Mixon, J. A. Payne, A. Bowman, K. Sickendick, G. J. Wilmink, W. P. Roach, et P. A. G., “Plasma membrane permeabilization by trains of ultrashort electric pulses,” *Bioelectrochemistry*, vol. 79, no. 1, p. 114 – 121, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539410000137>
- [94] K. Müller, V. Sukhorukov, et U. Zimmermann, “Reversible electropermeabilization of mammalian cells by high-intensity, ultra-short pulses of submicrosecond duration,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 184, no. 2, p. 161–170, 2001. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-001-0084-3>
- [95] S. J. Beebe, J. White, P. F. Blackmore, Y. Deng, K. Somers, et K. H. Schoenbach, “Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues,” *DNA and cell biology*, vol. 22, no. 12, p. 785–796, 2003. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1089/104454903322624993>
- [96] S. J. Beebe, Y.-J. Chen, N. M. Sain, K. H. Schoenbach, et S. Xiao, “Transient features in nanosecond pulsed electric fields differentially modulate mitochondria and viability,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, p. e51349, 12 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051349>
- [97] N. Jiang et B. Y. Cooper, “Frequency-dependent interaction of ultrashort e-fields with nociceptor membranes and proteins,” *Bioelectromagnetics*, vol. 32, no. 2, p. 148–163, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1002/bem.20620>
- [98] R. Nuccitelli, K. Tran, S. Sheikh, B. Athos, M. Kreis, et P. Nuccitelli, “Optimized nanosecond pulsed electric field therapy can cause murine malignant melanomas to self-destruct with a single treatment,” *International Journal of Cancer*, vol. 127, no. 7, p. 1727–1736, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.25364>

- [99] O. N. Pakhomova, B. W. Gregory, V. A. Khorokhorina, A. M. Bowman, S. Xiao, et A. G. Pakhomov, “Electroporation-induced electrosensitization,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 2, p. e17100, 02 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017100>
- [100] S. J. Beebe, “Bioelectrics in basic science and medicine : Impact of electric fields on cellular structures and functions,” *J. Nanomed. Nanotechol.*, vol. 4, no. 163, 2013.
- [101] G. Long, P. Shires, D. Plescia, S. Beebe, J. Kolb, et K. Schoenbach, “Targeted tissue ablation with nanosecond pulses,” *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 58, no. 8, p. 2161–2167, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2011.2113183>
- [102] R. Nuccitelli, X. Chen, A. G. Pakhomov, W. H. Baldwin, S. Sheikh, J. L. Pomicter, W. Ren, C. Osgood, R. J. Swanson, J. F. Kolb, S. J. Beebe, et K. H. Schoenbach, “A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor’s blood supply and causes complete remission without recurrence,” *Int. J. Cancer*, vol. 125, no. 2, p. 438–445, Jul 2009.
- [103] M. Breton et L. M. Mir, “Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments,” *Bioelectromagnetics*, vol. 33, no. 2, p. 106–123, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1002/bem.20692>
- [104] E. Cabuy, “Pulsed electric fields in cancer treatment,” *Reliable Cancer Therapies. Energy-based therapies*, vol. 5, p. 1–30, 2012.
- [105] B. Hargrave, P. Blackmore, S. Beebe, K. H. Schoenbach *et al.*, “Activation and aggregation of human platelets and formation of platelet gels by nanoseconde pulsed electric fields,” Brevet, mai, 2010, WO Patent 2,010,057,021.
- [106] J. Zhang, P. F. Blackmore, B. Y. Hargrave, S. Xiao, S. J. Beebe, et K. H. Schoenbach, “Nanosecond pulse electric field (nanopulse) : A novel non-ligand agonist for platelet activation,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 471, no. 2, p. 240 – 248, 2008. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986107006005>
- [107] Chapitre 3 - L’homéostasie. <http://www.fsr.ac.ma/cours/biologie/bouamoud/Chap3.pdf>. Faculté des Sciences Rabat.
- [108] C. Gusbeth, W. Frey, H. Volkmann, T. Schwartz, et H. Bluhm, “Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater,” *Chemosphere*, vol. 75, no. 2, p. 228–233, Apr 2009.
- [109] J. Villemejeane et L. M. Mir, “Physical methods of nucleic acid transfer : general concepts and applications,” *British Journal of Pharmacology*, vol. 157, no. 2, p. 207–219, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00032.x>
- [110] Thérapie génique. <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-hematologie-pneumologie/dossiers-d-information/therapie-genique>. INSERM.

- [111] K. H. Schoenbach, S. Xiao, R. P. Joshi, J. Camp, T. Heeren, J. Kolb, et S. Beebe, “The effect of intense subnanosecond electrical pulses on biological cells,” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 36, no. 2, p. 414–422, 2008. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2008.918786>
- [112] S. Xiao, G. Siqui, V. Nesin, R. Heller, et K. Schoenbach, “Subnanosecond electric pulses cause membrane permeabilization and cell death,” *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 58, no. 5, p. 1239–1245, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2011.2112360>
- [113] Y. Y. Hua, X. S. Wang, Y. Zhang, C. G. Yao, X. M. Zhang, et Z. A. Xiong, “Intense picosecond pulsed electric fields induce apoptosis through a mitochondrial-mediated pathway in HeLa cells,” *Mol Med Rep*, vol. 5, no. 4, p. 981–987, Apr 2012.
- [114] W. J. Chen, Z. A. Xiong, M. Zhang, C. G. Yao, Z. Y. Zhao, Y. Y. Hua, et W. Zhou, “Picosecond pulsed electric fields induce apoptosis in HeLa cells via the endoplasmic reticulum stress and caspase-dependent signaling pathways,” *Int. J. Oncol.*, vol. 42, no. 3, p. 963–970, Mar 2013.
- [115] J. Camp, Y. Jing, J. Zhuang, J. Kolb, S. Beebe, J. Song, R. Joshi, S. Xiao, et K. Schoenbach, “Cell death induced by subnanosecond pulsed electric fields at elevated temperatures,” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 40, no. 10, p. 2334–2347, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2012.2208202>
- [116] K. H. Schoenbach, R. Joshi, J. Kolb, N. Chen, M. Stacey, P. Blackmore, E. Buescher, et S. Beebe, “Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells,” *Proceedings of the IEEE*, vol. 92, no. 7, p. 1122–1137, 2004. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/JPROC.2004.829009>
- [117] T. Kotnik et D. Miklavčič, “Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields,” *Biophysical Journal*, vol. 90, no. 2, p. 480 – 491, 2006. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349506722287>
- [118] T. D. T. Vu, S. Kohler, C. Merla, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “FDTD-based microdosimetry for high-intensity nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) application,” dans *Microwave Symposium Digest (MTT), 2012 IEEE MTT-S International*. IEEE, 2012, p. 1–3. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/MWSYM.2012.6259762>
- [119] S. A. Freeman, M. A. Wang, et J. C. Weaver, “Theory of electroporation of planar bilayer membranes : predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation,” *Biophys. J.*, vol. 67, no. 1, p. 42–56, Jul 1994.
- [120] 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,” *Biophys. J.*, vol. 95, no. 4, p. 1547–1563, Aug 2008.

- [121] E. Salimi, G. Bridges, et D. Thomson, “The effect of dielectric relaxation in nanosecond pulse electroporation of biological cells,” dans *Antenna Technology and Applied Electromagnetics the American Electromagnetics Conference (ANTEM-AMEREM), 2010 14th International Symposium on*, 2010, p. 1–4.
- [122] J. C. Weaver et Y. A. Chizmadzhev, “Theory of electroporation : A review,” *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 41, no. 2, p. 135 – 160, 1996. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0302459896050623>
- [123] Z. Vasilkoski, A. T. Esser, T. R. Gowrishankar, et J. C. Weaver, “Membrane electroporation : The absolute rate equation and nanosecond time scale pore creation,” *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, vol. 74, no. 2 Pt 1, p. 021904, Aug 2006.
- [124] C. Merla, A. Paffi, F. Apollonio, P. Leveque, G. d’Inzeo, et M. Liberti, “Microdosimetry for nanosecond pulsed electric field applications : A parametric study for a single cell,” *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 58, no. 5, p. 1294–1302, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2010.2104150>
- [125] M. L. Fernandez, G. Marshall, F. Sagues, et R. Reigada, “Structural and kinetic molecular dynamics study of electroporation in cholesterol-containing bilayers,” *J Phys Chem B*, vol. 114, no. 20, p. 6855–6865, May 2010.
- [126] D. P. Tieleman, “The molecular basis of electroporation,” *BMC Biochemistry*, vol. 5, no. 1, p. 1–12, 2004. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2091-5-10>
- [127] M. Tarek, “Membrane electroporation : A molecular dynamics simulation,” *Biophysical Journal*, vol. 88, no. 6, p. 4045 – 4053, 2005. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000634950573455X>
- [128] R. A. Bockmann, B. L. de Groot, S. Kakorin, E. Neumann, et H. Grubmuller, “Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations,” *Biophys. J.*, vol. 95, no. 4, p. 1837–1850, Aug 2008.
- [129] Z. A. Levine et P. T. Vernier, “Life cycle of an electropore : Field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 236, no. 1, p. 27–36, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-010-9277-y>
- [130] T. Kotnik, P. Kramar, G. Pucihar, D. Miklavčič, et M. Tarek, “Cell membrane electroporation - Part 1 : The phenomenon,” *Electrical Insulation Magazine, IEEE*, vol. 28, no. 5, p. 14–23, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/MEI.2012.6268438>

- [131] T. Kotnik, G. Pucihar, et D. Miklavčič, “Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 236, no. 1, p. 3–13, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-010-9279-9>
- [132] T. Kotnik, L. M. Mir, K. Flisar, M. Puc, et D. Miklavčič, “Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses : Part I. increased efficiency of permeabilization,” *Bioelectrochemistry*, vol. 54, no. 1, p. 83 – 90, 2001. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539401001141>
- [133] T. Kotnik, G. Pucihar, M. Rebersek, D. Miklavčič, et L. M. Mir, “Role of pulse shape in cell membrane electropermeabilization,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1614, no. 2, p. 193–200, Aug 2003.
- [134] M. Fox, D. Esveld, A. Valero, R. Lutge, H. Mastwijk, P. Bartels, A. Berg, et R. Boom, “Electroporation of cells in microfluidic devices : a review,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 385, no. 3, p. 474–485, 2006. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-0327-3>
- [135] B. Vergne, “Synthèse d’ondes électriques picosecondes de puissance par commutation optoélectronique - Application aux radars à bande spectrale ultralarge,” Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2006.
- [136] C. H. Lee, “Optical control of semiconductor closing and opening switches,” *Electron Devices, IEEE Transactions on*, vol. 37, no. 12, p. 2426–2438, 1990. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/16.64515>
- [137] J. Yuan, W. Xie, H. Liu, J. Liu, H. Li, X. Wang, et W. Jiang, “High-power semi-insulating GaAs photoconductive semiconductor switch employing extrinsic photoconductivity,” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 37, no. 10, p. 1959–1963, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2009.2022013>
- [138] A. De Angelis, J. Kolb, L. Zeni, et K. Schoenbach, “Kilovolt blumlein pulse generator with variable pulse duration and polarity,” *Review of Scientific Instruments*, vol. 79, no. 4, p. 044 301–044 301–4, 2008. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1063/1.2901609>
- [139] 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,” *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 56, no. 11, p. 2642–2648, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2009.2027422>
- [140] S. Romeo, M. Sarti, M. Scarfi, et L. Zeni, “Modified blumlein pulse-forming networks for bioelectrical applications,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 236, no. 1, p. 55–60, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-010-9273-2>

- [141] T. Heeren, J. Camp, J. Kolb, K. Schoenbach, S. Katsuki, et H. Akiyama, “250 kv sub-nanosecond pulse generator with adjustable pulse-width,” *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 14, no. 4, p. 884–888, 2007. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TDEI.2007.4286520>
- [142] T. Tao, F. Wang, A. Kuthi, et M. Gunderson, “Diode opening switch based nanosecond high voltage pulse generators for biological and medical applications,” *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 14, no. 4, p. 878–883, 2007. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TDEI.2007.4286519>
- [143] M. Akiyama, T. Sakugawa, S. Hosseini, E. Shiraishi, T. Kiyama, et H. Akiyama, “High-performance pulsed-power generator controlled by FPGA,” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 38, no. 10, p. 2588–2592, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2010.2042463>
- [144] J. Sanders, A. Kuthi, Y.-H. Wu, P. Vernier, et M. Gunderson, “A linear, single-stage, nanosecond pulse generator for delivering intense electric fields to biological loads,” *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 16, no. 4, p. 1048–1054, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TDEI.2009.5211853>
- [145] G. Loubriel, F. Zutavern, A. Baca, H. Hjalmanson, T. Plut, W. Helgeson, M. O’Malley, M. Ruebush, et D. Brown, “Photoconductive semiconductor switches,” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 25, no. 2, p. 124–130, 1997. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/27.602482>
- [146] B. Vergne, V. Couderc, et P. Leveque, “A 30-khz monocycle generator using linear photoconductive switches and a microchip laser,” *Photonics Technology Letters, IEEE*, vol. 20, no. 24, p. 2132–2134, 2008. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/LPT.2008.2007132>
- [147] J. Thaxter et R. Bell, “Experimental 6-ghz frozen wave generator with fiber-optic feed,” *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*, vol. 43, no. 8, p. 1798–1804, 1995. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/22.402262>
- [148] 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,” *Photonics Technology Letters, IEEE*, vol. 22, no. 21, p. 1577–1579, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/LPT.2010.2073458>
- [149] C. Merla, S. El-Amari, M. Kenaan, M. Liberti, F. Apollonio, D. Arnaud-Cormos, V. Couderc, et P. Leveque, “A 10-ohm high-voltage nanosecond pulse generator,” *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*, vol. 58, no. 12, p. 4079–4085, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TMTT.2010.2086470>
- [150] E. B. Rosa, *The self and mutual inductances of linear conductors*. US Department of Commerce and Labor, Bureau of Standards, 1908.

- [151] R. Shevgaonkar, *Electromagnetic waves*. Tata McGraw-Hill Education, 2005.
- [152] L. Chusseau, *Paramètres S — Antenne*, 2005. [En ligne]. Disponible sur : http://www.ies.univ-montp2.fr/equipes/GEHF/IMG/pdf/CoursHyper_Impression.pdf
- [153] VMI, “15,000 v - 20,000 v rectifiers. x150fg, x200fg,” Voltage Multipliers, Inc., CA, USA, Rapport Technique.
- [154] 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,” *Photonics Technology Letters, IEEE*, vol. 23, no. 11, p. 673–675, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/LPT.2011.2122251>
- [155] S. Kohler, V. Couderc, R. O’Connor, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “A versatile high voltage nano- and sub-nanosecond pulse generator,” *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on*, vol. 20, no. 4, p. –, 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TDEI.2013.6571435>
- [156] S. Kohler, S. El Amari, V. Couderc, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Pulse generator for achieving powerful adjustable nanosecond pulsed electric fields (nspefs),” dans *European electromagnetics EuroEM 2012*, Juillet 2012.
- [157] S. Kohler, S. Amari, V. Couderc, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Flexible 50-ohm high-voltage nanosecond pulse generator,” dans *Power Modulator and High Voltage Conference (IPMHVC), 2012 IEEE International*, 2012, p. 195–197. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/IPMHVC.2012.6518712>
- [158] M. Kanaan, S. El Amari, A. Silve, C. Merla, L. Mir, V. Couderc, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Characterization of a 50- Ω ; exposure setup for high-voltage nanosecond pulsed electric field bioexperiments,” *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 58, no. 1, p. 207–214, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2010.2081670>
- [159] T. Yamazaki, A. Yamazaki, Y. Hibino, S. A. Chowdhury, Y. Yokote, Y. Kanda, S. Kunii, H. Sakagami, H. Nakajima, et J. Shimada, “Biological impact of contact with metals on cells,” *In Vivo*, vol. 20, no. 5, p. 605–611, 2006.
- [160] B. Rosenberg, L. Van Camp, et T. Krigas, “Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode,” *Nature*, vol. 205, no. 4972, p. 698–699, 1965.
- [161] T. Kotnik, D. Miklavčič, et L. Mir, “Cell membrane electropermeabilization by symmetrical bipolar rectangular pulses : Part II. reduced electrolytic contamination,” *Bioelectrochemistry*, vol. 54, no. 1, p. 91 – 95, 2001. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539401001153>
- [162] J. F. Kolb, S. Kono, et K. H. Schoenbach, “Nanosecond pulsed electric field generators for the study of subcellular effects,” *Bioelectromagnetics*, vol. 27, no. 3, p. 172–187, 2006. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1002/bem.20185>

- [163] S. P. GmbH, “Selecting the optimum electrode configuration,” Avril 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.science-products.com/Products/CatalogG/MPI-Electrodes/MPI.html>
- [164] M.-T. Chen, C. Jiang, P. T. Vernier, Y.-H. Wu, et M. A. Gundersen, “Two-dimensional nanosecond electric field mapping based on cell electropermeabilization,” *PMC Biophysics*, vol. 2, no. 1, p. 1–16, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1186/1757-5036-2-9>
- [165] Y. H. Wu, D. Arnaud-Cormos, M. Casciola, J. Sanders, P. Leveque, et P. Vernier, “Moveable wire electrode microchamber for nanosecond pulsed electric-field delivery,” *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 60, no. 2, p. 489–496, 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2012.2228650>
- [166] Y. Sun, P. Vernier, M. Behrend, L. Marcu, et M. Gundersen, “Electrode microchamber for noninvasive perturbation of mammalian cells with nanosecond pulsed electric fields,” *NanoBioscience, IEEE Transactions on*, vol. 4, no. 4, p. 277–283, 2005. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TNB.2005.859544>
- [167] W. Frey, J. A. White, R. O. Price, P. F. Blackmore, R. P. Joshi, R. Nuccitelli, S. J. Beebe, K. H. Schoenbach, et J. F. Kolb, “Plasma membrane voltage changes during nanosecond pulsed electric field exposure,” *Biophys. J.*, vol. 90, no. 10, p. 3608–3615, May 2006.
- [168] 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, no. 12, p. 4649 – 4655, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656631100176X>
- [169] C. Dalmay, J. Villemejeane, V. Joubert, O. F. cais, L. M. Mir, et B. L. Pioufle, “Design and realization of a microfluidic device devoted to the application of ultra-short pulses of electrical field to living cells,” *Sensors and Actuators B : Chemical*, vol. 160, no. 1, p. 1573 – 1580, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400511008112>
- [170] C. A. Balanis, *Antenna theory : analysis and design*, ser. ISBN : 0-471-66782-X, 3e, éd. Wiley-Interscience, 2005.
- [171] W. Wiesbeck, G. Adamiuk, et C. Sturm, “Basic properties and design principles of UWB antennas,” *Proceedings of the IEEE*, vol. 97, no. 2, p. 372–385, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/JPROC.2008.2008838>
- [172] A. Shlivinski, E. Heyman, et R. Kastner, “Antenna characterization in the time domain,” *Antennas and Propagation, IEEE Transactions on*, vol. 45, no. 7, p. 1140–1149, 1997. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/8.596907>

- [173] J. Kunisch et J. Pamp, “Considerations regarding the correlation between uwb antenna transmit and receive responses,” dans *Proc. URSI Int. Symp. Electromagn. Theory, Pisa, Italy*, 2004.
- [174] S. Altunc, “Subnanosecond pulsed-power generated electric fields for cancer treatment,” *IEEE Nuclear and Plasma Sciences Society, Special Article*, vol. 2009, p. 34–39, March.
- [175] S. Altunc, C. E. Baum, C. G. Christodoulou, E. Schamiloglu, et C. J. Buchenauer, “Focal waveforms for various source waveforms driving a prolate-spheroidal impulse radiating antenna (IRA),” *Radio Science*, vol. 43, no. 4, p. n/a–n/a, 2008. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1029/2007RS003775>
- [176] P. Kumar, C. Baum, S. Altunc, J. Buchenauer, S. Xiao, C. Christodoulou, E. Schamiloglu, et K. Schoenbach, “A hyperband antenna to launch and focus fast high-voltage pulses onto biological targets,” *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*, vol. 59, no. 4, p. 1090–1101, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TMTT.2011.2114110>
- [177] M. Crawford, “Generation of standard EM fields using TEM transmission cells,” *Electromagnetic Compatibility, IEEE Transactions on*, vol. EMC-16, no. 4, p. 189–195, 1974. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TEMC.1974.303364>
- [178] A. Collin, “Dosimétrie de systèmes d’exposition pour l’étude in vivo ou in vitro des interactions des ondes électromagnétiques décimétriques et centimétriques avec le vivant,” Thèse de doctorat, Université de Limoges, 2007. [En ligne]. Disponible sur : <http://epublications.unilim.fr/theses/2007/collin-alice/collin-alice.pdf>
- [179] S. Satav et V. Agarwal, “Do it yourself fabrication of an open TEM cell for EMC pre-compliance,” *IEEE EMC Society Newsletter*, no. 218, p. 66–71, 2008.
- [180] M. Ma, M. Kanda, M. Crawford, et E. B. Larsen, “A review of electromagnetic compatibility/interference measurement methodologies,” *Proceedings of the IEEE*, vol. 73, no. 3, p. 388–411, 1985. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/PROC.1985.13164>
- [181] H. Thyé, G. Armbrrecht, et M. Koch, “Pulse propagation in gigahertz transverse electromagnetic cells,” *Electromagnetic Compatibility, IEEE Transactions on*, vol. 51, no. 3, p. 592–603, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TEMC.2009.2018121>
- [182] Z. Ji, S. Hagness, J. Booske, S. Mathur, et M. Meltz, “FDTD analysis of a gigahertz TEM cell for ultra-wideband pulse exposure studies of biological specimens,” *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, vol. 53, no. 5, p. 780–789, 2006. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TBME.2005.863959>
- [183] N. Simicevic, “Three-dimensional FDTD simulation of biomaterial exposure to electromagnetic nanopulses,” *Physics in Medicine and Biology*, vol. 50, no. 21, p.

- 5041, 2005. [En ligne]. Disponible sur : <http://stacks.iop.org/0031-9155/50/i=21/a=007>
- [184] N. Simicevic et D. Haynie, “FDTD simulation of exposure of biological material to electromagnetic nanopulses,” *Physics in Medicine and Biology*, vol. 50, no. 2, p. 347, 2005. [En ligne]. Disponible sur : <http://stacks.iop.org/0031-9155/50/i=2/a=012>
- [185] British Standards Institute, “Integrated circuits. measurement of electromagnetic emissions, 150 kHz to 1 GHz. measurement of radiated emissions. TEM cell and wideband TEM cell method : B S I standards,” 2006.
- [186] F. Fiori et F. Musolino, “Measurement of integrated circuit conducted emissions by using a transverse electromagnetic mode (TEM) cell,” *Electromagnetic Compatibility, IEEE Transactions on*, vol. 43, no. 4, p. 622–628, 2001. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/15.974643>
- [187] K. Hu, H. Weng, D. Beetner, D. Pommerenke, et J. Drewniak, “Unbalanced currents in integrated circuits and their effect on TEM cell emissions,” *Electromagnetic Compatibility, IEEE Transactions on*, vol. 53, no. 3, p. 600–610, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TEM.2011.2118214>
- [188] V. Deniau, “Recherche des caractéristiques optimales d’un nouveau moyen d’essais électromagnétiques appliqué aux test d’équipements électroniques ambarqués sur véhicules,” Thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, 2003.
- [189] D. Ding, “How to test EMC in semiconductors,” *Electronic Engineering Times-Asia*, 2007.
- [190] R. P. O’Connor, S. D. Madison, P. Leveque, H. L. Roderick, et M. D. Bootman, “Exposure to GSM RF fields does not affect calcium homeostasis in human endothelial cells, rat pheocromocytoma cells or rat hippocampal neurons,” *PLoS ONE*, vol. 5, no. 7, p. e11828, juillet 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011828>
- [191] A. Paffi, F. Apollonio, G. A. Lovisolo, C. Marino, et M. Liberti, “Exposure systems for bioelectromagnetic investigations in the radiofrequency range : classification and emerging trends,” dans *Antennas and Propagation (EUCAP), Proceedings of the 5th European Conference on*. IEEE, 2011, p. 3159–3163.
- [192] E. D. Mantiply, *An automated TEM cell calibration system*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Radiation Programs, Nonionizing Radiation Branch, 1984.
- [193] M. G. Moiescu, P. Leveque, J. R. Bertrand, E. Kovacs, et L. M. Mir, “Microscopic observation of living cells during their exposure to modulated electromagnetic fields,” *Bioelectrochemistry*, vol. 74, no. 1, p. 9–15, Nov 2008.
- [194] C. Merla, N. Ticaud, D. Arnaud-Cormos, B. Veyret, et P. Leveque, “Real-time RF exposure setup based on a multiple electrode array (MEA) for electrophysiological recording of neuronal networks,” *Microwave Theory and Techniques, IEEE*

- Transactions on*, vol. 59, no. 3, p. 755–762, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TMTT.2010.2100404>
- [195] J. S. Seregelyi, R. Apps, et J. A. Walsh, “A TEM cell for electromagnetic pulse applications : Design considerations and mechanical details,” DTIC Document, Rapport Technique, 1995.
- [196] P. Sevat, “Design of a TEM cell EMP simulator,” DTIC Document, Rapport Technique, 1991.
- [197] S. Kohler, T. D. T. Vu, P. 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),” dans *Microwave Symposium Digest (MTT), 2012 IEEE MTT-S International*, 2012, p. 1–3. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/MWSYM.2012.6259503>
- [198] *Vocabulaire international de métrologie - Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM)*, 3è éd. JCGM, 2008.
- [199] D. C. Ince, L. Hatton, et J. Graham-Cumming, “The case for open computer programs,” *Nature*, vol. 482, no. 7386, p. 485–488, 2012.
- [200] *IEEE Recommended Practice for Determining the Peak Spatial-Average Specific Absorption Rate (SAR) in the Human Head From Wireless Communications Devices : Measurement Techniques*, Std., 2003.
- [201] K. Pokovic, T. Schmid, et N. Kuster, “Millimeter-resolution E-field probe for isotropic measurement in lossy media between 100 Mhz and 20 Ghz,” *Instrumentation and Measurement, IEEE Transactions on*, vol. 49, no. 4, p. 873–878, 2000. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/19.863941>
- [202] C. Person, F. Le Penneec, et J. Luc, “Design, modelisation and optimisation of high efficiency miniature E-field probes performed on 3D ceramic prisms for SAR evaluation,” *annals of telecommunications - annales des télécommunications*, vol. 63, no. 1-2, p. 43–53, 2008. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s12243-007-0004-3>
- [203] T. Onishi, K. Kiminami, et T. Iyama, “Novel specific absorption rate measurement techniques,” dans *Electromagnetic Compatibility and 19th International Zurich Symposium on Electromagnetic Compatibility, 2008. APEMC 2008. Asia-Pacific Symposium on*. IEEE, 2008, p. 120–123.
- [204] M. Bernier, G. Gaborit, L. Duvillaret, A. Paupert, et J.-L. Lasserre, “Electric field and temperature measurement using ultra wide bandwidth pigtailed electro-optic probes,” *Appl. Opt.*, vol. 47, no. 13, p. 2470–2476, May 2008. [En ligne]. Disponible sur : <http://ao.osa.org/abstract.cfm?URI=ao-47-13-2470>
- [205] H. Togo, N. Shimizu, et T. Nagatsuma, “Tip-on-fiber electro-optic probe for near-field measurement,” *NTT Tech Rev*, vol. 4, no. 1, p. 12–20, 2006.

- [206] H. Togo, N. Kukutsu, N. Shimizu, et T. Nagatsuma, “Sensitivity-stabilized fiber-mounted electrooptic probe for electric field mapping,” *Lightwave Technology, Journal of*, vol. 26, no. 15, p. 2700–2705, 2008. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/JLT.2008.927612>
- [207] D.-J. Lee et J. F. Whitaker, “An optical-fiber-scale electro-optic probe for minimally invasive high-frequency field sensing,” *Opt. Express*, vol. 16, no. 26, p. 21 587–21 597, Dec 2008. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=oe-16-26-21587>
- [208] A. Garzarella, S. B. Qadri, et D. H. Wu, “Optimal electro-optic sensor configuration for phase noise limited, remote field sensing applications,” *Applied Physics Letters*, vol. 94, no. 22, p. 221113, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://link.aip.org/link/?APL/94/221113/1>
- [209] K. Yang, L. P. B. Katehi, et J. Whitaker, “Electric field mapping system using an optical-fiber-based electrooptic probe,” *Microwave and Wireless Components Letters, IEEE*, vol. 11, no. 4, p. 164–166, 2001. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/7260.916331>
- [210] D. J. Lee, N. W. Kang, J. H. Choi, J. Kim, et J. F. Whitaker, “Recent advances in the design of electro-optic sensors for minimally destructive microwave field probing,” *Sensors (Basel)*, vol. 11, no. 1, p. 806–824, 2011.
- [211] L. Duvillaret, S. Rialland, et J.-L. Coutaz, “Electro-optic sensors for electric field measurements. II. Choice of the crystals and complete optimization of their orientation,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 19, no. 11, p. 2704–2715, Nov 2002. [En ligne]. Disponible sur : <http://josab.osa.org/abstract.cfm?URI=josab-19-11-2704>
- [212] Y. Gaeremynck, G. Gaborit, L. Duvillaret, M. Ruaro, et F. Lecoche, “Two electric-field components measurement using a 2-port pigtailed electro-optic sensor,” *Applied Physics Letters*, vol. 99, no. 14, p. 141102, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://link.aip.org/link/?APL/99/141102/1>
- [213] G. Gaborit, J.-L. Coutaz, et L. Duvillaret, “Vectorial electric field measurement using isotropic electro-optic crystals,” *Applied Physics Letters*, vol. 90, no. 24, p. 241118, 2007. [En ligne]. Disponible sur : <http://link.aip.org/link/?APL/90/241118/1>
- [214] L. Duvillaret, S. Rialland, et J.-L. Coutaz, “Electro-optic sensors for electric field measurements. I. Theoretical comparison among different modulation techniques,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 19, no. 11, p. 2692–2703, Nov 2002. [En ligne]. Disponible sur : <http://josab.osa.org/abstract.cfm?URI=josab-19-11-2692>
- [215] S. Euphrasie, S. Zhang, R. Butet, et P. Vairac, “Electro-optic sensor for specific absorption rate measurements,” *Applied Physics Letters*, vol. 102, no. 3, p. 033502, 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://link.aip.org/link/?APL/102/033502/1>

- [216] R. Zeng, B. Wang, B. Niu, et Z. Yu, “Development and application of integrated optical sensors for intense E-field measurement,” *Sensors (Basel)*, vol. 12, no. 8, p. 11 406–11 434, 2012.
- [217] M. Bernier, “Mesure vectorielle de champs électriques microondes et de température par transducteurs électro-optiques fibrés,” Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Grenoble, 2008.
- [218] G. Gaborit, “Caractérisation de champs électriques hyperfréquences par capteurs électro-optiques vectoriels fibrés,” Thèse de doctorat, Université de Savoie, 2005.
- [219] P. Jarrige, N. Ticaud, S. Kohler, R. O’Connor, L. Duvillaret, G. Gaborit, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Electrooptic probe adapted for bioelectromagnetic experimental investigations,” *Instrumentation and Measurement, IEEE Transactions on*, vol. 61, no. 7, p. 2051–2058, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TIM.2012.2183034>
- [220] N. Ticaud, S. Kohler, P. Jarrige, L. Duvillaret, G. Gaborit, R. O’Connor, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Specific absorption rate assessment using simultaneous electric field and temperature measurements,” *Antennas and Wireless Propagation Letters, IEEE*, vol. 11, p. 252–255, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/LAWP.2012.2189748>
- [221] U. Pliquet, E. A. Gift, et J. C. Weaver, “Determination of the electric field and anomalous heating caused by exponential pulses with aluminum electrodes in electroporation experiments,” *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 39, no. 1, p. 39 – 53, 1996. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0302459895050310>
- [222] M. Kenaan, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Dosimetry of an in vitro exposure system for fluorescence measurements during 2.45 ghz microwave exposure,” *International journal of microwave and wireless technologies*, vol. 3, p. 81–86, 2011.
- [223] M.-G. Moisescu, S. Kohler, N. Ticaud, I. M. Minodora, M. Kenaan, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, et T. Savopol, “Design and characterization of microwave exposure setups for fluorescence measurements on biological systems,” dans *BioEM2013, Joint Meeting of the BioElectroMagnetics Society and the European BioElectromagnetics Association*, 2013.
- [224] S. Kohler, P. Jarrige, N. Ticaud, R. P. O’Connor, L. Duvillaret, G. Gaborit, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Simultaneous high intensity ultrashort pulsed electric field and temperature measurements using a unique electro-optic probe,” *Microwave and Wireless Components Letters, IEEE*, vol. 22, no. 3, p. 153–155, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/LMWC.2012.2185840>
- [225] S. Kohler, N. Ticaud, P. Jarrige, L. Duvillaret, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Simultaneous temperature and vectorial electric field measurements with an electro-optic (eo) probe for bioelectromagnetic investigations,” dans *Proceeding of the 13th International Conference on Microwave and High Frequency Heating*, 2011.

- [226] S. Kohler, N. Ticaud, P. Jarrige, L. Duvillearet, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Simultaneous high-voltage nanosecond pulsed electric field and temperature measurements in an electroporation cuvette,” dans *2011 International Bioelectrics Symposium*, 2011.
- [227] S. Kohler, N. Ticaud, P. Jarrige, L. Duvillearet, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Vectorial electric field measurements with an electro-optic probe for bioelectromagnetic applications,” dans *EBEA 2011, 10th International Conference of the European BioElectromagnetics Association*, 2011.
- [228] Y. Kane, “Numerical solution of initial boundary value problems involving maxwell’s equations in isotropic media,” *Antennas and Propagation, IEEE Transactions on*, vol. 14, no. 3, p. 302–307, 1966. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TAP.1966.1138693>
- [229] A. Taflove et S. C. Hagness, *Computational electrodynamics : the finite-difference time-domain method*, 3è éd. Boston : Artech House, 2005.
- [230] P. Leveque, A. Reineix, et B. Jecko, “Modelling of dielectric losses in microstrip patch antennas : application of FDTD method,” *Electronics Letters*, vol. 28, no. 6, p. 539–541, 1992. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1049/el:19920340>
- [231] J.-P. Berenger, “A perfectly matched layer for the absorption of electromagnetic waves,” *Journal of Computational Physics*, vol. 114, no. 2, p. 185 – 200, 1994. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021999184711594>
- [232] M. Soueid, S. Kohler, R. O’Connor, P. Leveque, et D. Arnaud-Cormos, “Characterization of a tem cell-based setup for the exposure og biological suspensions to high-intensity nanosecond pulsed electric fields,” dans *PLUMEE 2013*, 2013.
- [233] S. Kohler, R. O’Connor, T. D. T. Vu, P. Leveque, et D. Arnaud-Cormos, “Experimental microdosimetry techniques for biological cells exposed to nanosecond pulsed electric fields using microfluorimetry,” *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*, vol. 61, no. 5, p. 2015–2022, 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TMTT.2013.2252917>
- [234] S. Kohler, R. O’Connor, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, “Electric field and temperature measurements for in vitro exposures to high-intensity nanosecond pulsed electric fields,” dans *BioEM2013, Joint Meeting of the BioElectroMagnetics Society and the European BioElectromagnetics Association*, Juin 2013.
- [235] K. R. Kase, B. E. Bjarngard, et F. H. Attix, “The dosimetry of ionizing radiation,” *American Journal of Clinical Oncology*, vol. 10, no. 1, p. 91, 1987.
- [236] D. Blanc et M. Terrissol, “Microdosimetry. A tool for radiation research,” *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 13, no. 1-4, p. 387–393, 1985.

- [237] A. Wambersie, P. Pihet, et H. Menzel (INVITED), “The role of microdosimetry in radiotherapy,” *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 31, no. 1-4, p. 421–432, 1990. [En ligne]. Disponible sur : <http://rpd.oxfordjournals.org/content/31/1-4/421.abstract>
- [238] M. Hibino, H. Itoh, et K. K. Jr, “Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential,” *Biophysical Journal*, vol. 64, no. 6, p. 1789 – 1800, 1993. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349593815509>
- [239] J. Song, R. P. Joshi, et K. H. Schoenbach, “Synergistic effects of local temperature enhancements on cellular responses in the context of high-intensity, ultrashort electric pulses,” *Medical & Biological Engineering & Computing*, vol. 49, no. 6, p. 713–718, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s11517-011-0745-z>
- [240] R. Croce, A. De Vita, V. Pierro, et I. Pinto, “A thermal model for pulsed EM field exposure effects in cells at nonthermal levels,” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 38, no. 2, p. 149–155, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2009.2038163>
- [241] T. Kotnik et D. Miklavčič, “Theoretical evaluation of the distributed power dissipation in biological cells exposed to electric fields,” *Bioelectromagnetics*, vol. 21, no. 5, p. 385–394, Jul 2000.
- [242] R. Nuccitelli, S. J. Beebe, et K. H. Schoenbach, “Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct,” Brevet 20 110 092 973, April, 2011. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.freepatentsonline.com/y2011/0092973.html>
- [243] A. Pakhomov, A. Phinney, J. Ashmore, K. Walker, J. Kolb, S. Kono, K. Schoenbach, et M. Murphy, “Characterization of the cytotoxic effect of high-intensity, 10-ns duration electrical pulses,” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 32, no. 4, p. 1579–1586, 2004. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TPS.2004.831773>
- [244] W. P. Roach, “Radio frequency radiation dosimetry handbook (no. AFRL-RH-BR-TR-2010-0065). Chapitre 3 - A practical guide to high-resolution thermometry and microdosimetry in pulsed electromagnetic fields,” Air Force Research Laboratory (TX, USA), Rapport Technique, 2009.
- [245] O. Zohar, M. Ikeda, H. Shinagawa, H. Inoue, H. Nakamura, D. Elbaum, D. L. Alkon, et T. Yoshioka, “Thermal imaging of receptor-activated heat production in single cells,” *Biophysical Journal*, vol. 74, no. 1, p. 82 – 89, 1998. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349598777690>
- [246] V. Zeeb, M. Suzuki, et S. Ishiwata, “A novel method of thermal activation and temperature measurement in the microscopic region around single living cells,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 139, no. 1, p. 69 – 77, 2004. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016502700400158X>

- [247] Y. Y. Chen et A. W. Wood, “Application of a temperature-dependent fluorescent dye (rhodamine b) to the measurement of radiofrequency radiation-induced temperature changes in biological samples,” *Bioelectromagnetics*, vol. 30, no. 7, p. 583–590, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1002/bem.20514>
- [248] F. Vetrone, R. Naccache, A. Zamarron, A. Juarranz de la Fuente, F. Sanz-Rodriguez, L. Martinez Maestro, E. Martin Rodriguez, D. Jaque, J. Garcia Sole, et J. A. Capobianco, “Temperature sensing using fluorescent nanothermometers,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 6, p. 3254–3258, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn100244a>
- [249] K. Okabe, N. Inada, C. Gota, Y. Harada, T. Funatsu, et S. Uchiyama, “Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy,” *Nature communications*, vol. 3, p. 705, 2012.
- [250] J. Sakakibara et R. J. Adrian, “Whole field measurement of temperature in water using two-color laser induced fluorescence,” *Experiments in Fluids*, vol. 26, no. 1-2, p. 7–15, 1999. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s003480050260>
- [251] L. Chopinet, C. Roduit, M.-P. Rols, et E. Dague, “Destabilization induced by electropermeabilization analyzed by atomic force microscopy,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1828, no. 9, p. 2223 – 2229, 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273613001880>
- [252] C. Lutz. (2013, May) How to move an atom. <http://ibmresearchnews.blogspot.fr/2013/05/how-to-move-atom.html>.
- [253] D. Andelman, “Electrostatic properties of membranes : the Poisson-Boltzmann theory,” *Handbook of biological physics*, vol. 1, p. 603–642, 1995.
- [254] N. A. Baker, “Poisson-Boltzmann methods for biomolecular electrostatics,” *Meth. Enzymol.*, vol. 383, p. 94–118, 2004.
- [255] R. Stote, A. Dejaegere, D. Kuznetsov, et L. Falquet. (1999, Octobre) Theory of molecular dynamics simulations. http://www.ch.embnet.org/MD_tutorial/. Swiss Institute of Bioinformatics.
- [256] C. Chipot, “Les méthodes numériques de la dynamique moléculaire,” *Université Henri Poincaré Nancy, UMR*, vol. 7565, novembre 2007.
- [257] E. Salonen. (2009, Novembre) Introduction into molecular dynamics. http://reaktiveplasmaen.ruhr-uni-bochum.de/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=86&Itemid=157. Université technologique d’Helsinki.
- [258] T. Darden, D. York, et L. Pedersen, “Particle mesh ewald : An N log (N) method for ewald sums in large systems,” *The Journal of chemical physics*, vol. 98, p. 10089, 1993. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1063/1.464397>
- [259] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, et L. G. Pedersen, “A smooth particle mesh Ewald method,” *The Journal of Chemical*

- Physics*, vol. 103, no. 19, p. 8577–8593, nov. 1995. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1063/1.470117>
- [260] H. C. Andersen, “Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 72, no. 4, p. 2384–2393, 1980. [En ligne]. Disponible sur : <http://link.aip.org/link/?JCP/72/2384/1>
- [261] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, et J. R. Haak, “Molecular dynamics with coupling to an external bath,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 81, no. 8, p. 3684–3690, 1984. [En ligne]. Disponible sur : <http://link.aip.org/link/?JCP/81/3684/1>
- [262] S. Nosé, “A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 81, p. 511, 1984.
- [263] W. Humphrey, A. Dalke, et K. Schulten, “VMD : visual molecular dynamics,” *J Mol Graph*, vol. 14, no. 1, p. 33–38, Feb 1996.
- [264] J.-H. Lin, N. A. Baker, et J. A. McCammon, “Bridging implicit and explicit solvent approaches for membrane electrostatics,” *Biophysical Journal*, vol. 83, no. 3, p. 1374 – 1379, 2002. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349502739088>
- [265] J. Gumbart, F. Khalili-Araghi, M. Sotomayor, et B. Roux, “Constant electric field simulations of the membrane potential illustrated with simple systems,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1818, no. 2, p. 294 – 302, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273611003361>
- [266] A. Aksimentiev et K. Schulten, “Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics : ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map,” *Biophys. J.*, vol. 88, no. 6, p. 3745–3761, Jun 2005.
- [267] L. Delemotte et M. Tarek, “Molecular dynamics simulations of lipid membrane electroporation,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 245, no. 9, p. 531–543, 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s00232-012-9434-6>
- [268] L. Delemotte, F. Dehez, W. Treptow, et M. Tarek, “Modeling membranes under a transmembrane potential,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 18, p. 5547–5550, 2008, pMID : 18412411. [En ligne]. Disponible sur : <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp710846y>
- [269] T. P. Vernier, M. J. Ziegler, Y. Sun, M. A. Gundersen, et P. D. Tieleman, “Nanopore-facilitated, voltage-driven phosphatidylserine translocation in lipid bilayers - in cells and in silico,” *Phys. Biol.*, vol. 3, no. 4, p. 233+, déc. 2006. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1088/1478-3975/3/4/001>
- [270] M. J. Ziegler et P. T. Vernier, “Interface water dynamics and porating electric fields for phospholipid bilayers,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112,

- no. 43, p. 13 588–13 596, 2008, PMID : 18837540. [En ligne]. Disponible sur : <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp8027726>
- [271] 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,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, no. 19, p. 6288–6289, 2006. [En ligne]. Disponible sur : <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja0588306>
- [272] Q. Hu, R. P. Joshi, et K. H. Schoenbach, “Simulations of nanopore formation and phosphatidylserine externalization in lipid membranes subjected to a high-intensity, ultrashort electric pulse,” *Phys. Rev. E*, vol. 72, p. 031902, Sep 2005. [En ligne]. Disponible sur : <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.72.031902>
- [273] 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 Stat Nonlin Soft Matter Phys*, vol. 71, p. 031914, Mar 2005.
- [274] M. Tokman, J. H. Lee, Z. A. Levine, M.-C. Ho, M. E. Colvin, et P. T. Vernier, “Electric field-driven water dipoles : Nanoscale architecture of electroporation,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4, p. e61111, 04 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061111>
- [275] P. T. Vernier et M. J. Ziegler, “Nanosecond field alignment of head group and water dipoles in electroporating phospholipid bilayers,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 111, no. 45, p. 12 993–12 996, 2007. [En ligne]. Disponible sur : <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp077148q>
- [276] I. Vorobyov, B. Bekker, et T. W. Allen, “Electrostatics of deformable lipid membranes,” *Biophysical Journal*, vol. 98, no. 12, p. 2904 – 2913, 2010. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349510004121>
- [277] S. Kohler, M.-C. Ho, Z. A. Levine, P. Leveque, D. Arnaud-Cormos, et P. T. Vernier, “Nanosopic cell membrane and pore profiles combining molecular dynamics and a 3d electromagnetic tool,” *Biophysical Journal*, vol. 104, no. 2, Supplement 1, p. 250a –, 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349512026549>
- [278] S. Kohler, M.-C. Ho, Z. Levine, P. Leveque, D. Arnaud-Cormos, et P. Vernier, “Toward the physical mechanisms of nanopulse-induced pore formation combining molecular dynamics and a 3d electromagnetic tool,” dans *BioEM2013, Joint Meeting of the BioElectroMagnetics Society and the European BioElectromagnetics Association*, Juin 2013.
- [279] A. A. Gurtovenko et I. Vattulainen, “Calculation of the electrostatic potential of lipid bilayers from molecular dynamics simulations : Methodological issues,”

- The Journal of Chemical Physics*, vol. 130, no. 21, p. 215107, 2009. [En ligne]. Disponible sur : <http://link.aip.org/link/?JCP/130/215107/1>
- [280] M. Xikui, “Analysis of the capacitance of rectangular shielded line with offset inner conductor,” *Journal of Electronics (China)*, vol. 6, no. 2, p. 140–147, 1989.
- [281] J. Tippet et D. Chang, “Characteristic impedance of a rectangular coaxial line with offset inner conductor,” *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*, vol. 26, no. 11, p. 876–883, 1978. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TMTT.1978.1129506>
- [282] K. Malaric et J. Bartolic, “Design of a TEM-cell with increased usable test area,” *Turk. J. Elec. Engin*, vol. 11, no. 2, p. 143–154, 2003.
- [283] M. Crawford, J. L. Workman, et C. L. Thomas, “Expanding the bandwidth of TEM cells for EMC measurements,” *Electromagnetic Compatibility, IEEE Transactions on*, vol. EMC-20, no. 3, p. 368–375, 1978. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TEMC.1978.303664>

Liste des publications et communications

A Revues internationales à comité de lecture

1. **S. Kohler**, V. Couderc, R. P. O'Connor, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « A Versatile High-Voltage Nano- and Sub-nanosecond Pulse Generator », *Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Trans. on*, Vol. 20, No. 4, p. 1201–1208, Août 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TDEI.2013.6571435>
2. **S. Kohler**, R. P. O'Connor, T. Vu, P. Leveque, et D. Arnaud-Cormos, « Experimental Microdosimetry Techniques for Biological Cells Exposed to Nanosecond Pulsed Electric Fields Using Microfluorimetry », *Microwave Theory and Techniques, IEEE Trans. on*, Vol. 61, No. 5, p. 2015–2022, Mai 2013. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TMTT.2013.2252917>
3. **S. Kohler**, P. Jarrige, N. Ticaud, R. P. O'Connor, L. Duvillaret, G. Gaborit, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Simultaneous high intensity ultrashort pulsed electric field and temperature measurements using a unique electro-optic probe », *Microwave and Wireless Components Letters, IEEE*, vol. 22, no.3, p. 153–155, Mars 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/LMWC.2012.2185840>
4. N. Ticaud, **S. Kohler**, P. Jarrige, L. Duvillaret, G. Gaborit, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Specific Absorption Rate Assessment Using Simultaneous Electric Field and Temperature Measurements », *Antennas and Wireless Propagation Letters, IEEE*, vol. 11, p. 252–255, Mars 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/LAWP.2012.2189748>
5. P. Jarrige, N. Ticaud, **S. Kohler**, R. P. O'Connor, L. Duvillaret, G. Gaborit, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Electro-Optic Probe Adapted for Bioelectromagnetic Experimental Investigations ». *Instrumentation and Measurement, IEEE Transactions on*, vol. 61, no. 7, p. 2051–2058, Juillet 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/TIM.2012.2183034>
6. P. Jarrige, G. Gaborit, L. Duvillaret, **S. Kohler**, N. Ticaud, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Electro-Optic Probe Devoted to Simultaneous Electric Field and

Temperature Measurement in Biological Media for Dosimetric Assessments ». *The Radio Science Bulletin*, vol. 342, p. 5–15, 2012.

Soumises

1. **S. Kohler**, N. Ticaud, M-Ga Moisescu, M. Minodora, T. Savopol, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Setup for Simultaneous Microwave Heating and Real-Time Spectrofluorometric Measurements in Biological Systems », *Instrumentation and Measurement, IEEE Transactions on*. Soumise en juillet 2013.
2. T.D.T. Vu, **S. Kohler**, R. P. O'Connor, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Microdosimetry for Realistic Biological Cells exposed to Nanosecond Pulsed Electric Fields », *Antennas and Wireless Propagation Letters, IEEE*. Soumise en septembre 2013.

B Communications Internationales (CICL) avec actes de colloque à comité de lecture - par ordre chronologique

1. P.T. Vernier, M.-C. Ho, **S. Kohler**, Z.A. Levine, et M. Tokman, « Water and Ions in the Electrostatic Landscape of a Charged Lipid Bilayer », *Bioelectrics 2013, 10th International Bioelectrics Symposium*, Karlsruhe, Allemagne, 16–19 sept. 2013.
2. **S. Kohler**, R. P. O'Connor, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Electric field and temperature measurements for in vitro exposures to high-intensity nanosecond pulsed electric fields », *BioEM2013, Joint Meeting of the BioElectroMagnetics Society and the European BioElectromagnetics Association*, Thessalonique, Grèce, 10–14 juin 2013. Session orale
3. **S. Kohler**, M.-C. Ho, Z.A. Levine, P. Leveque, D. Arnaud-Cormos, et P.T. Vernier, « Toward the physical mechanisms of nanopulse-induced pore formation combining Molecular Dynamics and a 3D electromagnetic tool », *BioEM2013, Joint Meeting of the BioElectroMagnetics Society and the European BioElectromagnetics Association*, Thessalonique, Grèce, 10–14 juin 2013.
4. M-Ga Moisescu, **S. Kohler**, N. Ticaud, I. M. Minodora, M. Kenaan, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, et T. Savopol, « Design and characterization of microwave exposure setups for fluorescence measurements on biological systems », *BioEM2013, Joint Meeting of the BioElectroMagnetics Society and the European BioElectromagnetics Association*, Thessalonique, Grèce, 10–14 juin 2013.
5. **S. Kohler**, M.-C. Ho, Z. A. Levine, P. Leveque, D. Arnaud-Cormos, et P. T. Vernier, « Nanoscopic Cell Membrane and Pore Profiles Combining Molecular Dynamics and a 3D Electromagnetic Tool », *57th Annual Meeting of the Biophysical-Society*, Philadelphie, USA, 2–6 fév. 2013. *Biophysical Journal*, vol. 104, p. 250a, 2013. [En

- ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.1408>. Session poster.
6. **S. Kohler**, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Experimental setup for exposure to tunable ultrashort high-intensity pulsed electric fields and real-time dosimetric measurements », *European electromagnetics EuroEM 2012*, Toulouse, France, 2–6 juillet 2012. Session orale.
 7. **S. Kohler**, S. El Amari, V. Couderc, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Pulse generator for achieving powerful adjustable nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) », *European electromagnetics EuroEM 2012*, Toulouse, France, 2–6 juillet 2012. Session poster.
 8. P. Jarrige, G. Gaborit, Y. Gaeremynck, L. Duvillaret, F. Lecoche, M. Ruaro, N. Ticaud, **S. Kohler**, D. Arnaud-Cormos, P. Leveque, and J.-L. Lasserre, « Electro-optics for non-invasive UWB electric field sensing », *European electromagnetics EuroEM 2012*, Toulouse, France, 2–6 juillet 2012.
 9. **S. Kohler**, T. D. T. Vu, P. T. Vernier, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Characterization of a TEM cell-based setup for the exposure of biological cell suspensions to high-intensity nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) », *Microwave Symposium Digest (MTT), 2012 IEEE MTT-S International*, Montréal, Canada, 17–22 juin 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/MWSYM.2012.6259503>. Session orale.
 10. T. D. T. Vu, **S. Kohler**, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « FDTD-based Microdosimetry for high-intensity Nanosecond Pulsed Electric Fields (nsPEFs) application », *Microwave Symposium Digest (MTT), 2012 IEEE MTT-S International*, Montréal, Canada, 17–22 juin 2012. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/MWSYM.2012.6259762>
 11. **S. Kohler**, S. El Amari, V. Couderc, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Flexible 50-ohm high-voltage nanosecond pulse generator », *Power Modulator and High Voltage Conference (IPMHVC), 2012 IEEE International*, San Diego, CA USA, 3–7 juin 2012. Session orale. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/IPMHVC.2012.6518712>
 12. **S. Kohler**, T. D. T. Vu, P. T. Vernier, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Open transverse electromagnetic (tem) cell as applicator of high-intensity nsPEFs and electro-optic measurements », *Power Modulator and High Voltage Conference (IPMHVC), 2012 IEEE International*, San Diego, CA USA, 3–7 juin 2012. Session poster. [En ligne]. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1109/IPMHVC.2012.6518857>
 13. **S. Kohler**, N. Ticaud, P. Jarrige, L. Duvillaret, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Simultaneous temperature and vectorial electric field measurements with an electro-optic (EO) probe for bioelectromagnetic investigations », *Proceeding of the*

13th International Conference on Microwave and High Frequency Heating, Toulouse, pp. 157–160, 5–8 Sept. 2011. Session orale.

14. **S. Kohler**, N. Ticaud, P. Jarrige, L. Duvillaret, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Simultaneous high-voltage nanosecond pulsed electric field and temperature measurements in an electroporation cuvette », *2011 International Bioelectrics Symposium*, Toulouse, 4–6 mai 2011. Session poster.
15. P. Jarrige, N. Ticaud, P. Leveque, L. Duvillaret, **S. Kohler**, G. Gaborit, et D. Arnaud-Cormos, « A Vectorial Electro-Optic Sensors for Microwave Dosimetric Applications », *29th PIERS, Progress In electromagnetics Research Symposium*, Marrakech, Maroc, 20–23 mars 2011.
16. **S. Kohler**, N. Ticaud, P. Jarrige, L. Duvillaret, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Vectorial Electric field measurements with an Electro-optic probe for bioelectromagnetic applications », *EBEA 2011, 10th International Conference of the European BioElectromagnetics Association*, Rome, Italie, 21–24 fév. 2011. Session orale.
17. N. Ticaud, **S. Kohler**, P. Jarrige, L. Duvillaret, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Specific Absorption Rate assessment using an Electro-Optic Probe », *10th International Conference of the European BioElectromagnetics Association*, Rome, Italie, 21–24 fév. 2011. Session poster.

C Séminaires - Workshop

1. **S. Kohler**, R. P. O'Connor, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Technique de dosimétrie expérimentale pour des exposition in vitro de cellules à des champs électriques pulsés nanosecondes de haute intensité », *Troisième colloque francophone PLUridisciplinaire sur les Matériaux, l'Environnement et l'Electronique (PLUMEE 2013)*, Bacau, Roumanie, 22–25 Mai 2013.
2. **S. Kohler**, « Experimental and numerical dosimetry for high-voltage nanosecond and subnanosecond pulse generators and delivery systems : Advances at XLIM », au Frank Reidy Research Center for Bioelectrics, Old Dominion University, Norfolk, VA 23529, USA, 1^{er} fév. 2013. Conférencier invitée.
3. **S. Kohler**, « Contribution au développement et à la caractérisation de dispositifs pour appliquer des impulsions électriques nano- et picosecondes à des cellules biologiques », *Workshop étudiant XLIM*, 27 sept. 2012. Prix de la meilleure présentation orale.
4. **S. Kohler**, N. Ticaud, P. Jarrige, L. Duvillaret, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « An electro-optic probe for the simultaneous measurement of temperature and high-voltage pulsed electric fields », *Electroporation based Technologies and Treatments - International scientific workshop and postgraduate course* (Ljubljana, Slovénie), 14–19 nov. 2011.

5. **S. Kohler**, N. Ticaud, P. Jarrige, L. Duvillaret, D. Arnaud-Cormos, et P. Leveque, « Mesure vectorielle de champ électrique à l'aide d'une sonde électro-optique pour des applications en bioélectromagnétisme », *Deuxième colloque francophone PLUridisciplinaire sur les Matériaux, l'Environnement et l'Electronique (PLUMEE 2011)*, Limoges, France, 30 mai–1 juin 2011.

Contribution au développement et à la dosimétrie multi-échelles de dispositifs pour l'exposition de cellules biologiques à des impulsions électriques nanosecondes et subnanosecondes de haute intensité

Résumé : Pour des intensités de champ électrique suffisantes, des études expérimentales réalisées *in vitro* ont montré que les effets biologiques des impulsions microsecondes sont localisés à la membrane externe, tandis que ceux des impulsions nanosecondes se manifestent à la fois à la membrane externe et aux membranes intracellulaires. Les mécanismes bio-physiques à l'origine des effets observés ne sont toutefois pas encore élucidés. Des études numériques ont par ailleurs suggéré qu'en diminuant la durée des impulsions au régime subnanoseconde, il deviendrait possible d'induire des effets biologiques à l'intérieur même des organelles intracellulaires.

Dans cette thèse, nous proposons et étudions un système d'exposition ainsi que des techniques de dosimétrie expérimentale et numérique en vue d'explorer *in vitro* les effets biologiques d'intenses champs électriques pulsés nanosecondes et subnanosecondes. Nous montrons la capacité d'un générateur innovant, basé sur une structure coaxiale, à fournir les impulsions de tension requises. Nous proposons ensuite des cellules transverses électromagnétiques pour délivrer les impulsions à des cellules biologiques contenues dans une boîte en plastique. Pour la macrodosimétrie à l'intérieur des échantillons, un prototype de sonde électro-optique est caractérisé puis mis à profit. Nous montrons également que le système d'exposition étudié est adapté pour des mesures de température intracellulaire par microfluorimétrie. Enfin, nous proposons et démontrons un outil numérique pour des études dosimétriques à l'échelle atomique. La méthode développée combine des résultats de dynamique moléculaire à un code de modélisation électrostatique implémentant la méthode des différences finies en trois dimensions.

Mots-clés : Bioélectromagnétisme; champs électriques pulsés nanosecondes (nsPEFs); haute tension; système d'exposition; dosimétrie; mesure électro-optique; différences finies; électroporation.

Contribution to the development and multiscale dosimetry of systems for exposing biological cells to intense nanosecond and subnanosecond pulsed electric fields

Abstract : For sufficiently high intensities, *in vitro* experimental studies have shown that the biological effects of microsecond pulses are located at the plasma membrane, while those of nanosecond pulses may as well occur at intracellular membranes. The biophysical mechanisms underlying the observed biological effects are not yet clear. In addition, numerical studies have suggested that electric pulses with subnanosecond duration may be able to trigger biological effects directly inside the intracellular organelles.

In this work, we propose and study an *in vitro* exposure system as well as experimental and numerical dosimetry techniques with the purpose of investigating the effects of intense nanosecond and subnanosecond pulsed electric fields. We show the ability of a novel generator based on a coaxial structure to produce the expected pulses. We then propose the use of transverse electromagnetic (TEM) cells to deliver the pulses to biological cells contained in a plastic dish. An electro-optic probe is characterized and validated for macrodosimetric measurements inside the cell culture medium. We also show that the TEM cell-based setup is adapted for intracellular measurements using microfluorimetry techniques. Lastly, we report a numerical tool for dosimetric studies at atomic scale. The method that has been developed combines results of molecular dynamics simulations to a quasi-electrostatic approach using a 3D finite-difference-method code.

Keywords : Bioelectromagnetism; nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs); high voltage; exposure system; dosimetry; electro-optic measurement, finite difference; electroporation.