

Mesure précise du champ électrique dans un procédé d'inhibition de croissance cellulaire par voie électromagnétique

M. Vindret¹, P. Xavier¹, G. Gaborit^{1,3}, E. Chamberod¹, D. Raully¹, A. Outana¹, et J.M.F. Martins²

¹IMEP-LAHC, Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, 38000 Grenoble - Univ. Savoie Mont Blanc, 74000 Annecy, France

²IGE, Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, IRD, 38000 Grenoble, France

³KAPTEOS, bâtiment CLEANSPACE, 354 Voie Magellan, 73800 Sainte Hélène du Lac, France
mederic.vindret@minatec.grenoble-inp.fr

Résumé — L'application d'un champ électrique ou de courants électriques dans la gamme de fréquences du MHz à quelques dizaines de MHz est une technique maintenant bien établie pour l'inhibition de la croissance de cellules biologiques, par exemple dans le domaine de l'oncologie en utilisant l'effet bioélectrique ou dans le secteur de la décontamination de l'eau. La mesure précise du champ réellement appliqué est un point crucial qui nécessite une sonde adaptée et non perturbatrice. C'est le cas de la sonde électro-optique, dont l'utilisation avec de l'eau et un milieu de culture ensemencé ou non de bactéries, est ici présentée et modélisée.

I. INTRODUCTION

L'application d'un champ électrique ou de courants électriques de fréquences inférieures à quelques dizaines de MHz est une technique bien établie pour l'inhibition de la croissance de cellules biologiques dans le domaine de l'oncologie [1] en utilisant l'effet bioélectrique connu depuis de nombreuses années [2] ou dans le secteur de la décontamination de l'eau.

Ainsi, de 2011 à 2015, le projet de recherche APEL BIO du Ministère de l'Industrie dans le cadre du programme ECO-INDUSTRIES a mené au dépôt d'un brevet pour un nouveau procédé d'inhibition de la croissance bactérienne dans des milieux liquides [3]. La figure 1 montre la capacité d'inhibition de la croissance bactérienne obtenue avec ce procédé sur la bactérie standard *Escherichia coli* pour différentes conditions expérimentales (avec ou sans tension de bruit, avec ou sans biocide végétal dosé en limite de toxicité). Cette capacité est calculée en normalisant la concentration en bactéries (exprimée en UFC par ml) mesurée au bout d'un temps t par la concentration obtenue au bout du même laps de temps sans traitement particulier.

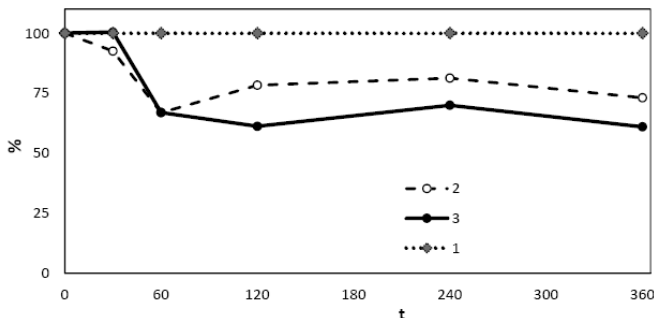


Fig. 1. Capacité d'inhibition de la croissance bactérienne (*E. coli*) exprimée en % en fonction du temps en minutes en un milieu de culture Luria Bertani (LB): 1- Pas de biocide, pas de tension électrique (référence), 2- Pas de biocide, mais tension de bruit appliquée 3- Biocide végétal et tension de bruit appliquée^[3]

Ce procédé consiste à appliquer une tension de bruit large bande (typiquement de 10 kHz à 20 MHz) sur deux électrodes en acier inoxydable situées de part et d'autre du milieu biologique à traiter. Dans cette configuration, la topologie des lignes de champ électrique étant très bien connue, le protocole de décontamination est parfaitement maîtrisé et reproductible. La mesure précise du champ appliqué, dont l'amplitude est faible (quelques $V.cm^{-1}$), est cruciale et nécessite une sonde diélectriquement adaptée au milieu biologique, ne présentant pas de parties métalliques afin de ne pas perturber les lignes de champ électrique.

II. DISPOSITIF DE TEST

La sonde électro-optique répond à ces contraintes. Son principe de fonctionnement est tout d'abord rappelé puis son utilisation expérimentale est évaluée.

A. Principe de mesure

Le fonctionnement de la sonde fabriquée par l'entreprise Kapteos est basé sur l'effet Pockels : l'application d'un champ électrique sur un cristal électro-optique BSO a pour effet de modifier ses indices propres, ce qui entraîne une modulation de l'état de polarisation du faisceau laser venant sonder les axes diélectriques propres du cristal :

$$\Delta\Phi = \frac{4\pi\Delta n}{\lambda} L \quad (1)$$

où L est la longueur du cristal traversée par l'onde optique et λ la longueur d'onde d'émission du faisceau laser.

Le point de fonctionnement optimal du système, paramètre d'analyse de la polarisation modulée (Fig.2), garantissant conjointement la plus grande sensibilité de la sonde ainsi que la linéarité de sa réponse avec la plus grande dynamique possible, est obtenu lorsque le faisceau laser sonde de façon équilibrée les axes diélectriques propres du cristal. Ce critère d'efficacité correspond à un arrangement optique spécifique déjà présenté dans [4].

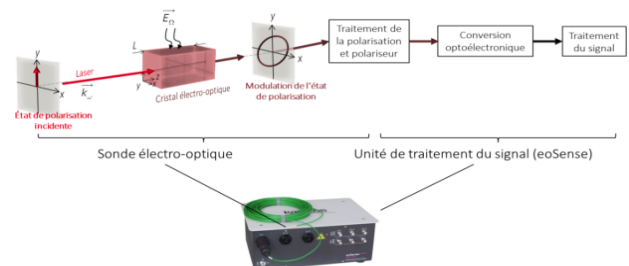


Fig. 2. Schéma du système KAPTEOS dédié à la mesure du champ électrique (modèle dédié à la bande 30 Hz – 30 MHz).

La biréfringence naturelle du cristal étant nulle, ce point de fonctionnement est stable. La précision de la mesure et sa stabilité s'avèrent indépendantes de la température.

Le cristal et l'arrangement optique intra sonde sont enrobés d'une structure diélectrique multicouche assurant conjointement l'intégrité mécanique du capteur et l'adaptation de permittivité au milieu environnant. La permittivité relative effective de la sonde est proche des valeurs des permittivités des milieux biologiques dans le domaine RF. Cette adaptation de permittivité garantit à la fois une faible perturbation de la sonde sur le champ électrique à mesurer dans le milieu biologique et une pénétration optimale de ce dernier au sein du cristal.

B. Conditions expérimentales

Une sonde électro-optique Kapteos a été placée verticalement à mi-distance entre deux électrodes en acier inoxydable séparées de 1 cm, elles-mêmes placées dans un récipient contenant le milieu biologique de test (Fig.3).

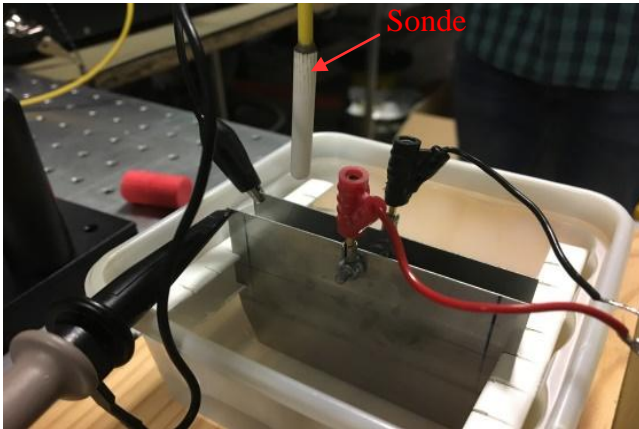


Fig. 3. Dispositif expérimental permettant d'appliquer le champ électrique dans le milieu biologique (sonde volontairement déplacée vers le haut pour les besoins de la photographie).

Un générateur haute fréquence (prototype non commercial) utilisant une DDS AD9850 permet d'appliquer sur les électrodes une tension d'excitation alternative de fréquence et d'amplitude réglables. Le signal électro-optique délivré par la sonde est mesuré par un analyseur de spectre Anritsu MS2720T avec les paramètres de mesure suivants : RBW = 10 Hz, SPAN = 300 Hz. Dans ces conditions, le plancher de bruit est de -132 dBm.

La linéarité de la sonde a été vérifiée expérimentalement dans l'eau distillée à 178 kHz et 20 MHz. La puissance mesurée à ces fréquences par l'analyseur de spectre a été tracée en fonction de l'amplitude de la tension d'excitation (Fig.4). On observe une très bonne linéarité de la sonde.

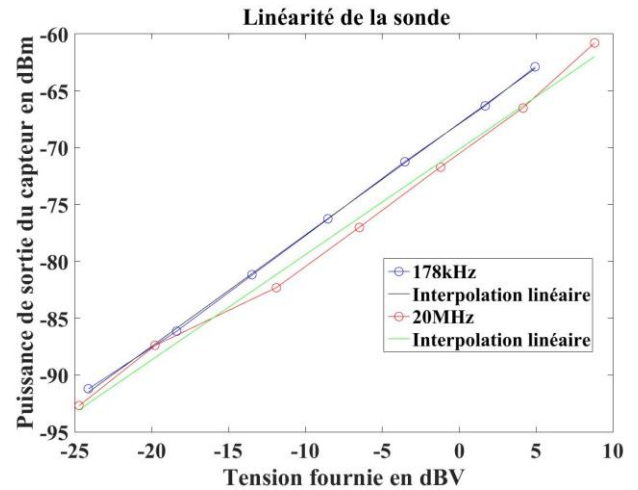


Fig. 4. Puissance mesurée par la sonde en fonction de l'amplitude de la tension appliquée aux fréquences 178kHz et 20 MHz dans l'eau distillée.

III. MODELISATION NUMERIQUE

Une modélisation électromagnétique sous COMSOL Multiphysics™ de la sonde Kapteos complète a été effectuée en tenant compte des matériaux qui la composent et de leurs géométries. Ceci a permis de déterminer le champ électrique perçu par le cristal électro-optique pour différents milieux.

A. Calcul du champ dans le cristal électro-optique dans la condition de référence

Soit S la puissance lue sur l'analyseur de spectre. Lors d'une mesure où une tension V est appliquée aux bornes des deux électrodes planes parallèles, séparées d'une distance d , on a,

$$S = K_{EO} \cdot E_{cryst}^2 \quad (2)$$

et

$$E_O = V / d \quad (3)$$

où K_{EO} est un coefficient dépendant du dispositif électro-optique et de l'électronique associée, E_{cryst} est le champ électrique en $V.m^{-1}$ existant au cœur du cristal électro-optique et E_O est le champ électrique théorique existant dans le milieu en l'absence de sonde ou à grande distance de celle-ci.

La condition de référence choisie correspond au cas purement diélectrique où le milieu est de l'eau distillée. Pour rappel, un milieu homogène, linéaire et isotrope a pour constante diélectrique complexe,

$$\bar{\epsilon} = \epsilon_0 \times \left(\epsilon_r - j \frac{\sigma}{\epsilon_0 \omega} \right) \quad (4)$$

où $\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} F.m^{-1}$ est la permittivité du vide, ϵ_r la permittivité relative et σ la conductivité du milieu. Dans la bande de fréquence étudiée, il est possible [5] de considérer que la permittivité relative de ce milieu est constante, égale à 80 à 20°C. De même, sa conductivité σ est nulle.

Pour une tension V appliquée sur les électrodes de 1 V donc un champ théorique E_O de $100 V.m^{-1}$, la valeur de E_{cryst} déterminée par COMSOL vaut $105,7 V.m^{-1}$. On pourrait s'étonner que cette valeur soit supérieure à celle du

champ théorique. Cependant, qualitativement, si on remplace la sonde complète, comprenant le cristal, le matériau entourant celui-ci, et le packaging extérieur, par un cylindre équivalent de permittivité relative équivalente ε_s , on obtient, lorsqu'on plonge la sonde dans un milieu de permittivité ε_r et avec des électrodes éloignées,

$$E_{cryst} = \frac{2\varepsilon_r}{\varepsilon_r + \varepsilon_s} \cdot E_0 \quad (5)$$

Ce champ calculé avec une approche quasi-statique (les dimensions de la cellule de mesure étant constamment petites par rapport à la longueur d'onde) est uniforme et indépendant du rayon du cylindre équivalent. L'équation (5) montre qu'il est effectivement supérieur au champ théorique E_0 lorsque ε_s est inférieur à ε_r .

La figure 5 illustre les lignes de champ tracées sous COMSOL dans les conditions indiquées dans ce paragraphe à la fréquence de 178 kHz.

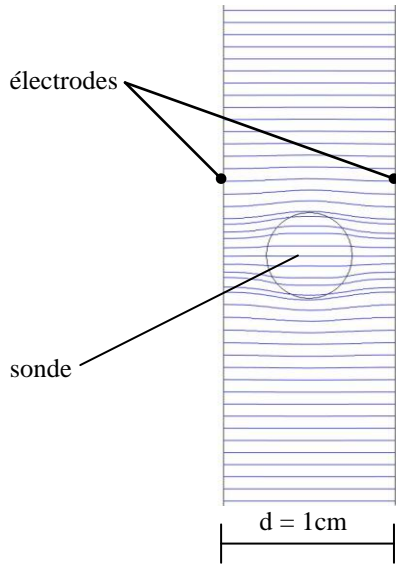


Fig. 5. Simulation sur COMSOL Multiphysics des lignes de champ électrique dans le plan perpendiculaire à la sonde electro-optique cylindrique équivalente plongée dans l'eau distillée pour une fréquence de 178 kHz.

B. Sensibilité de la mesure aux propriétés du milieu

Compte tenu de l'approche qualitative décrite plus haut, il apparaît que la permittivité relative du milieu affecte la valeur du champ perçue au centre du cristal. De ce fait, une étude de sensibilité de la valeur de E_{cryst} a été menée dans une gamme réaliste de permittivités de milieux biologiques. On définit l'erreur relative induite par cet effet par,

$$err_\varepsilon = \frac{E_{cryst}(ref) - E_{cryst}}{E_{cryst}(ref)} \cdot 100 \quad (6)$$

où $E_{cryst}(ref)$ est le champ perçue par le cristal dans la condition de référence.

La figure 6 montre l'évolution de cette erreur déduite des simulations sous COMSOL lorsque la permittivité du milieu varie entre 60 et 80. Cette erreur ne dépasse donc pas quelques pourcents.

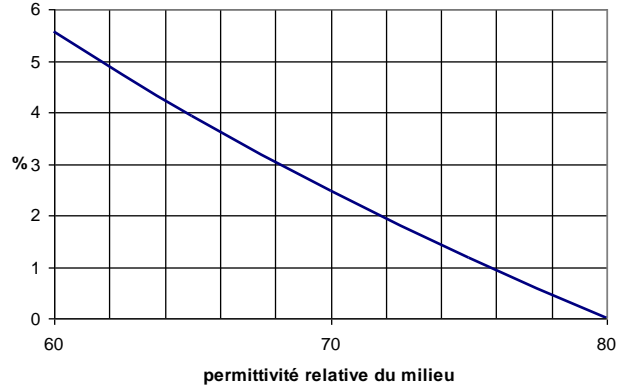


Fig. 6. Evolution de l'erreur relative err_ε déduite des simulations sous COMSOL lorsque la permittivité relative du milieu varie entre 60 et 80.

De même, il est prévisible que la conductivité du milieu affecte elle aussi la valeur du champ perçue au centre du cristal.

Ainsi, une étude de sensibilité de la valeur de E_{cryst} a également été menée dans une gamme réaliste de conductivités de milieux biologiques. En effet, ces milieux comportent des ions qui participent à la conduction. Il est à noter au passage que la fréquence la plus basse dans cette étude est supérieure à 100 kHz. De ce fait, le phénomène de polarisation d'interface au niveau des électrodes métalliques, qui est à l'origine d'une impédance difficile à modéliser, n'intervient pas du tout.

On définit l'erreur relative induite par la conductivité par,

$$err_\sigma = \frac{E_{cryst}(ref) - E_{cryst}}{E_{cryst}(ref)} \cdot 100 \quad (7)$$

Les simulations sous COMSOL lorsque la conductivité du milieu varie entre 0,3 et 1,3 S.m⁻¹ indiquent que la valeur du champ dans le cristal pour une tension V de 1 V est systématiquement de 128,5 V.m⁻¹ dans la gamme de fréquences étudiées, c'est-à-dire une erreur relative err_σ de 21,6%. L'origine de cet écart s'explique par le fait que la fréquence de coupure $\sigma/(2\pi\varepsilon_0\varepsilon_r)$ intrinsèque au milieu vaut 67 MHz au minimum dans la gamme de conductivités testées. Ainsi, en dessous de cette fréquence, le milieu peut être vu de manière approchée comme une résistance équivalente et, par voie de conséquence, la tension électrique appliquée se concentre sur le cylindre diélectrique (du moins dans la direction perpendiculaire à l'axe du cylindre), c'est-à-dire sur une distance plus faible, d'où un champ électrique d'intensité plus grande. Cette erreur peut facilement être corrigée parce qu'elle est systématique.

Sachant cela, il est possible de se ramener à la valeur du champ perçue par le cristal dans notre condition de référence, quelle que soit la valeur de la permittivité relative et de la conductivité dans des gammes réalistes de milieux biologiques.

IV. RESULTATS DE MESURE ET DISCUSSION

La sonde a été testée expérimentalement dans plusieurs milieux liquides différents de l'eau distillée : le sérum physiologique, le milieu nutritif LB et enfin du LB en présence de bactéries. Les mesures ont été réalisées à deux fréquences extrêmes, 178 kHz et 20 MHz. Une tension V a été appliquée aux bornes des électrodes. Le champ appliqué dans le milieu ($E_0 = V/d$) avec $d = 1$ cm a ainsi été facilement déduit. Les résultats des mesures sont indiqués sur la figure 7.

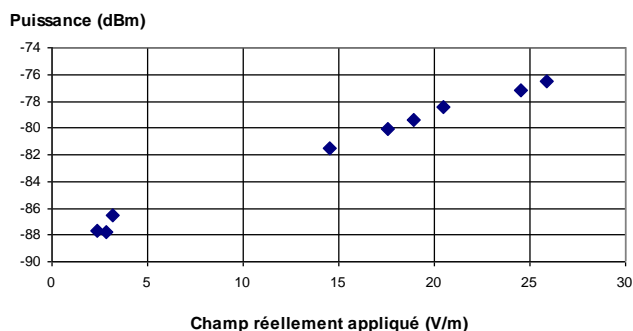


Fig. 7. Mesure de la puissance en sortie de la sonde Kapteos en fonction du champ électrique réellement appliqué.

En utilisant la formule indiquée en (2) avec les données de la figure 4 et la correction déduite de la simulation COMSOL suggérée par l'équation (5), on détermine $K_{EO} = 1,53 \times 10^{-14} \text{ W.V}^{-2}.\text{m}^2$.

Le champ électrique dans le cristal a été mesuré avec la sonde pour une tension appliquée V de 0,26 V efficace à 178 kHz dans un milieu nutritif LB comportant des bactéries *Escherichia coli* à une concentration proche de 10^8 bactéries par mL. La puissance correspondante affichée par l'analyseur de spectre a été de $-76,5$ dBm soit 22,3 pW. On a pu d'ailleurs remarquer expérimentalement que cette valeur était indépendante de la fréquence. Ainsi, le champ électrique apparent E_{crist} est environ de 38 V.m^{-1} .

Or le milieu nutritif LB (constitué essentiellement d'eau physiologique) a une constante diélectrique égale à 80 et une conductivité égale à $1,3 \text{ S.m}^{-1}$ à 20°C . Ceci a d'ailleurs été vérifié expérimentalement en mesurant l'impédance du milieu avec un montage potentiométrique. Il faut donc appliquer la correction due à la conductivité du milieu indiquée dans la partie III-B, ainsi que le facteur correctif pour passer de E_{crist} à E_0 . La valeur du champ électrique déduite après correction est de $29,6 \text{ V.m}^{-1}$. Cette valeur, compte tenu de l'incertitude sur la distance d qui peut être de l'ordre de 10% dans le dispositif utilisé lors de cette expérience, peut donc être considérée comme un excellent résultat de mesure de la valeur de E_0 qui est égale à $V/d = 26 \text{ V.m}^{-1}$.

V. CONCLUSION

L'objectif de ce travail était d'évaluer si la sonde Kapteos pouvait être utilisée dans des applications d'inhibition de croissance des bactéries par voie électromagnétique (projet MICROBELEC) pour de faibles valeurs de champs électriques et pour des fréquences relativement basses par rapport aux radiofréquences (MHz). Cette sonde est en effet adaptée aux mesures de champ électrique dans les milieux biologiques de par sa

permittivité proche des constantes diélectriques de ces derniers.

Il a été montré en utilisant une modélisation de la sonde complète sous COMSOL Multiphysics qu'il était possible de quantifier l'ordre de grandeur des écarts apportés par les propriétés du milieu par rapport à la mesure dans des conditions de référence (eau distillée). La permittivité du milieu biologique apporte une faible modification du champ perçu par la sonde et la conductivité du milieu est la source d'un écart certes important, mais constant et systématique, donc aisément corrigé. Ainsi la sonde Kapteos est un outil fiable, permettant des mesures de champ électrique reproductibles dans différents milieux biologiques et suffisamment sensible aux valeurs de champs électriques faibles utilisés dans nos procédés.

Il paraît alors envisageable, après une caractérisation et une campagne de mesure plus conséquente, de pouvoir mesurer le champ électrique encore plus précisément dans n'importe quelle solution biologique sans fortement fausser la topologie des lignes de champ comme le ferait une sonde comportant des parties métalliques.

REFERENCES

- [1] M. Giladi *et al.*, « Microbial Growth Inhibition by Alternating Electric Fields », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, n° 10, p. 3517-3522, janv. 2008.
- [2] S. A. Blenkinsopp, A. E. Khoury, et J. W. Costerton, « Electrical enhancement of biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. », *Applied and environmental microbiology*, vol. 58, n° 11, p. 3770-3773, 1992.
- [3] Xavier P., Chamberod E., Rauly D., Angelidis J., Bel Bachir H., Martins J., Vince E., Pain X. Procédé d'inhibition du développement de microorganismes. WO2016193583A1. 2 décembre 2016
- [4] Bernier, M. et al., « Electric Field and temperature measurement using ultra wide bandwidth pigtailed electro-optic probes », *Applied Optics*, vol. 47, pp. 2470-2476, 2008.
- [5] W. J. Ellison, K. Lamkaouchi, et J.-M. Moreau, « Water: a dielectric reference », *Journal of Molecular Liquids*, vol. 68, n° 2, p. 171-279, avr. 1996.