



HAL
open science

Efficacité d'une Excitation Bifréquentielle en Thrombolyse Purement Ultrasonore

Izella Saletes, Bruno Gilles, Jean-Christophe Bera

► **To cite this version:**

Izella Saletes, Bruno Gilles, Jean-Christophe Bera. Efficacité d'une Excitation Bifréquentielle en Thrombolyse Purement Ultrasonore. 10ème Congrès Français d'Acoustique, Apr 2010, Lyon, France. hal-00539674

HAL Id: hal-00539674

<https://hal.science/hal-00539674v1>

Submitted on 24 Nov 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

10ème Congrès Français d'Acoustique

Lyon, 12-16 Avril 2010

Efficacité d'une Excitation Bifréquentielle en Thrombolyse Purement Ultrasonore

Izella Saletes^{1,2}, Bruno Gilles^{1,2}, Jean-christophe Bera^{1,2}

¹ Inserm, U556, Lyon, F-69003, France ; Université de Lyon, F-69003, France

² Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France

{izella.saletes,bruno.gilles,jean-christophe.bera}@inserm.fr

Bon nombre d'études ont montré que la cavitation inertielle jouait un rôle important en thérapie ultrasonore. Ainsi, dans l'optique d'une application potentielle à la thrombolyse ultrasonore, l'implosion de bulles de cavitation peut aboutir à la lyse d'un caillot sanguin sans ajout d'agents thrombolytiques. Dans une précédente étude, nous avons montré que l'utilisation d'une excitation bifréquentielle, constituée de deux fréquences proches (535 kHz et 565 kHz) émises à l'aide d'un seul transducteur piézoélectrique focalisé, permet de réduire le seuil d'apparition de la cavitation inertielle et d'en augmenter l'activité. Dans le cadre d'une application à la thrombolyse ultrasonore cela permettrait de réduire les puissances à utiliser et donc de limiter les échauffements des tissus sains environnants, tout en stimulant les effets mécaniques sur les caillots. La présente étude vise à étudier l'efficacité thrombolytique d'une excitation pulsée bifréquentielle, sur un modèle de caillots sanguins *in vitro*. Les caillots ont un poids moyen de 750 mg. Le signal d'excitation est une séquence de tirs pulsés de 27 ms avec un rapport cyclique de 1 :10. Les intensités (I_{sppa}) utilisées vont de 500 W/cm² à 1700 W/cm². L'efficacité thrombolytique est évaluée par le rapport des poids du caillot après et avant insonification. L'efficacité thrombolytique de l'excitation bifréquentielle est comparée à celle obtenue avec une excitation monofréquentielle (550 kHz) de même intensité dans les mêmes conditions expérimentales. Les résultats obtenus montrent que l'excitation bifréquentielle permet de réduire en moyenne de moitié la puissance nécessaire à la thrombolyse : 1500 W/cm² sont nécessaires en monofréquentiel pour atteindre 80 % d'efficacité thrombolytique, alors que 800 W/cm² suffisent en excitation bifréquentielle.

1 Introduction

Depuis les années 1990, de nombreuses études se sont consacrées à l'utilisation des ultrasons pour dissoudre des caillots sanguins. D'abord à l'aide de catheter [1], puis avec des transducteurs focalisés extra-corporel. Plusieurs techniques sont alors étudiées : les ultrasons sont émis à faible intensité, en complément d'agents fibrinolytiques afin d'augmenter l'efficacité de ces derniers [2] ; les ultrasons sont utilisés seuls à forte intensité [3–6]. Dans les deux cas il semble que c'est la cavitation ultrasonore qui est à l'origine de l'efficacité des ultrasons sur la thrombolyse. Dans le cas de la thrombolyse purement ultrasonore, c'est le régime de cavitation inertielle qui permet de lyser les caillots : l'implosion des bulles au contact du thrombus casse le réseau de fibrine. Le problème réside dans le fait que les intensités nécessaires à une activité de cavitation inertielle importante sont élevées et peuvent créer des lésions thermiques dans les tissus voisins. Dans une étude précédente [7] nous avons montré qu'une excitation bifréquentielle composée de deux hautes fréquences proches pouvait permettre dans certain cas de diminuer par deux la puissance nécessaire à initier la cavitation inertielle. L'étude présentée ici vise à examiner l'efficacité thrombolytique d'une telle excitation sur un modèle de caillot sanguin *in vitro*.

2 Matériel et Méthode

2.1 Dispositif expérimental

Le dispositif utilisé vise à utiliser un signal ultrasonore focalisé afin de dissoudre un échantillon de sang coagulé. Le dispositif expérimental mis en place est présenté sur la figure 1. Il consiste en une double-cuve qui confine les échantillons sanguins pour des raisons de sécurité liées à l'utilisation produits issus du corps humain. La plus grande cuve (520 × 270 × 230 mm (L × l × H)), dans laquelle est immergé un transducteur piézoélectrique focalisé (distance focale : 100 mm, diamètre d'ouverture : 100 mm), est remplie d'eau filtrée dégazée. La petite cuve (200 × 200 × 215 mm (L × l × H)) est remplie d'un liquide anti-cavitation [8] : solution de Polyvinylpyrrolidone diluée à 30 g.l⁻¹. Afin d'éviter les réflexions dues aux parois, deux fenêtres acoustiques de 150 mm de diamètre ont été percées à l'avant et à l'arrière de la petite cuve et un absorbant acoustique constitué d'un bloc de paraffine est placé au fond de la grande cuve. La fréquence de résonance de l'ensemble du dispositif d'émission, comprenant un générateur, un amplificateur de puissance et le transducteur, est de 550 kHz. À la fréquence de résonance, le volume focal à -3 dB est long de 20 mm et large de 3 mm. Une telle fréquence se justifie par le fait qu'elle offre un bon com-

promis entre la taille de la zone focale qui doit être aussi faible que possible, et l'atténuation de l'onde dans les tissus biologiques, qui doit rester la plus faible possible pour limiter les effets thermiques de l'onde dans le cadre de l'application à la thrombolyse ultrasonore envisagée.

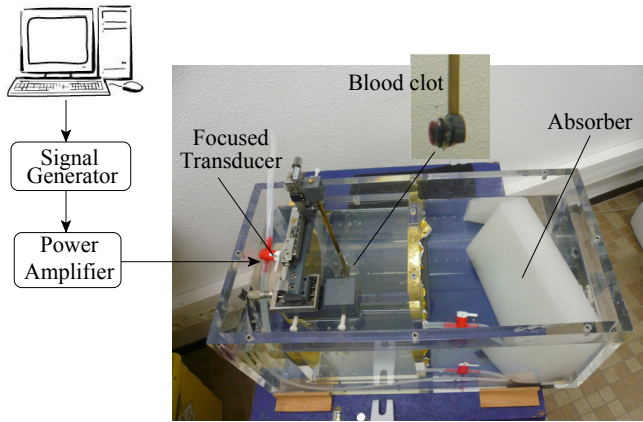


FIG. 1: Dispositif expérimental.

2.2 Paramètres de tirs

Les expériences de destruction de caillot sanguin présentées ici ont pour but de comparer l'efficacité thrombolytique d'un signal bifréquentiel à celle d'un signal monofréquentiel. Les différents paramètres de tir seront toujours identiques dans les deux cas. Les tirs consistent en des excitations pulsées de 27 ms avec un rapport cyclique de 10% pendant 5 min. Avant chaque séquence de tirs, monofréquentiel ou bifréquentiel, un tir d'amorçage est effectué pour initier la cavitation, ce tir dure 18 ms et correspond à une intensité acoustique au foyer de 2200 W/cm^2 .

- Les pulses *monofréquentiels* sont constitués de sinus purs de fréquence $f_0 = 550 \text{ kHz}$.
- Les pluses *bifréquentiels* sont constitués d'un train d'ondes correspondant à la somme de deux composantes sinusoïdales de fréquences légèrement différentes $f_1 = 535 \text{ kHz}$ et $f_2 = 565 \text{ kHz}$ de mêmes amplitudes de pression.

2.3 Modèle de caillot sanguin in vitro

Le sang est prélevé par l'Établissement Français du Sang (EFS), puis conditionné et stocké à $+4^\circ\text{C}$ en attendant les résultats du contrôle sérologique. Afin de rapprocher le plus possible les conditions expérimentales à l'application visée, la coagulation se fait à 37°C ; le sang, les solutions ainsi que tout le matériel utilisés lors du processus de coagulation sont mis à incuber à 37°C . 100 ml de sang sont mélangés à 4 ml de CaCl_2 et 5 UNIH de thrombine humaine, laquelle est stabilisée avec une solution d'albumine bovine (diluée dans du sérum physiologique à 1%). Le mélange est pipeté dans une boîte de Petri (volume : 100 ml) et le tout est incubé à 37°C pendant 5 min, puis conservé à $+4^\circ\text{C}$ en attendant leur utilisation.

2.4 Procédure expérimentale

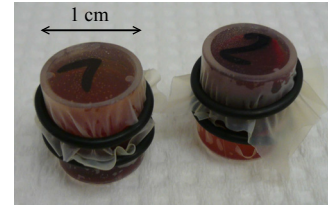


FIG. 2: Exemple de caillots dans leur nacelle.

A partir d'une boîte de Petri remplie de sang coagulé, on extrait à l'emporte-pièce ($\varnothing 14 \text{ mm}$) des petits cylindres d'environ 10 mm de hauteur. Lorsque le sang total coagule, une partie du plasma contenu dans le sang est évacué vers l'extérieur du réseau de fibrine. Il y a donc une couche de plasma liquide surnageant sur le sang coagulé; ce plasma est prélevé à l'aide d'une seringue pour une utilisation ultérieure éventuelle (voir §3.2). Le caillot ainsi préparé a la forme d'un cylindre de $\varnothing 10 \text{ mm}$ sur une hauteur de 10 mm; il est placé dans la nacelle dont le volume est complété par du sérum physiologique ou du plasma sanguin selon les essais. La nacelle est ensuite fixée sur un support pour être immergée dans la cuve au voisinage du foyer du transducteur.

2.4.1 Estimation de l'efficacité thrombolytique

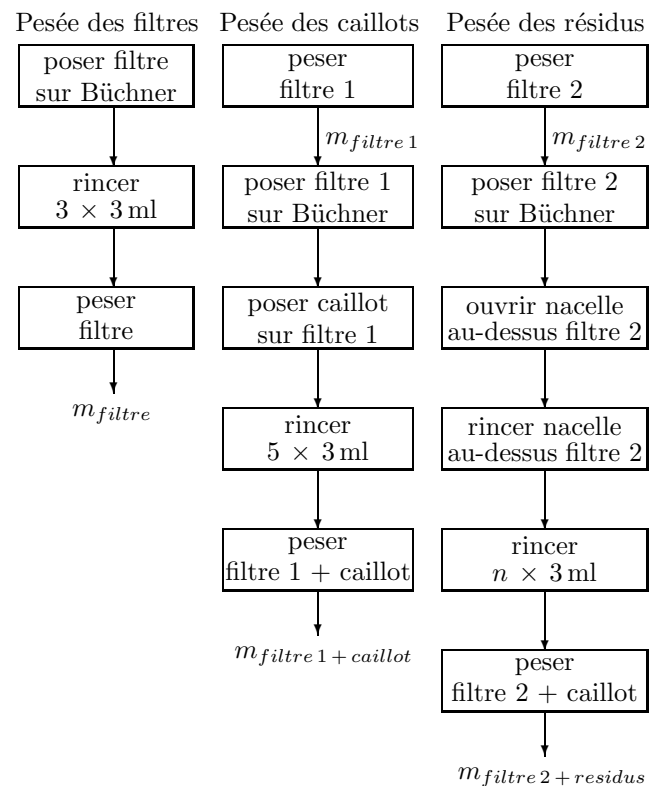


FIG. 3: Étapes des différentes pesées.

L'efficacité thrombolytique est évaluée par perte de poids après insonification, les caillots sont donc pesés avant et après les tirs ultrasonores. Les résidus d'après tir sont filtrés à $25 \mu\text{m}$ pour ne garder que ceux trop gros pour être éliminés par la circulation. Chaque filtre est

pesé après avoir été rincé au sérum physiologique puis essoré par aspiration sur un filtre Büchner. Le caillot qui vient d'être découpé est lui aussi rincé sur un filtre $25\ \mu\text{m}$ puis l'ensemble filtre-caillot est pesé. Après le tir ultrasonore, la nacelle est vidée et rincée au sérum physiologique sur un nouveau filtre préalablement pesé, l'ensemble filtre-résidus est alors pesé. Les étapes de pesée des filtres, caillots et résidus sont résumées sur le schéma de la figure 3. On obtient l'efficacité du tir en calculant le pourcentage de matière restante E_{th} :

$$E_{th} = \frac{m_{residus}}{m_{caillot}} \times 100$$

$$m_{residus} = m_{filtre\ 2 + residus} - m_{filtre\ 2}$$

$$m_{caillot} = m_{filtre\ 1 + caillot} - m_{filtre\ 1}$$

2.4.2 Déroulement des mesures

Afin d'avoir une approche statistique de l'efficacité thrombolytique du signal bifréquentiel, entre 5 et 7 essais de thrombolyse ont été effectués pour chaque type d'excitation et pour chaque intensité. Deux campagnes de mesures ont été réalisées, l'une utilisant des caillots immergés dans du sérum physiologique, l'autre des caillots immergés dans du plasma sanguin. Pour ce qui est des résultats présentés ici, le sang utilisé a été prélevé sur 8 personnes différentes (4 pour chaque campagne) et la totalité des tirs s'est déroulée sur 20 jours (10 jours par campagne). Pour l'ensemble du jeu d'expériences réalisé dans du sérum physiologique, le poids moyen des caillots est de $724 \pm 120\ \text{mg}$. Pour celui réalisé dans du plasma, il est de $838 \pm 73\ \text{mg}$. Pour chaque série d'expérience réalisée un même jour, 2 ou 3 caillots suivaient le même protocole que tous les autres sans être insonifiés, afin de servir de témoin. Le pourcentage de thrombolyse observé sur les témoins correspond aux pertes de masse du caillot liées au fait d'avoir baigné dans le liquide d'immersion et aux manipulations des différentes étapes du protocole.

3 Résultats

Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme sur les figures 4 à 6. La hauteur des barres représente l'efficacité thrombolytique en % et les barres d'erreurs l'écart-type de chaque réalisation. Le nombre inscrit au-dessus correspond au nombre d'échantillons testés pour chaque intensité. Pour les figures 4 et 5, les barres bleu clair correspondent à un tir monofréquentiel, les rouge foncé à un bifréquentiel. Le trait gris représente la perte de poids moyenne des caillots témoins (12%). Compte tenu des résultats obtenus sur les témoins, on considère que les tirs ultrasonores ont une influence thrombolytique pour des résultats supérieurs à 20 %.

3.1 Liquide d'immersion : sérum physiologique

Pour les tirs monofréquentiels, il n'y a pas ou très peu de thrombolyse pour des intensités inférieures à $1000\ \text{W}/\text{cm}^2$, ensuite l'efficacité thrombolytique augmente régulièrement pour atteindre un maximum de $95\% \pm 8\%$ à $1500\ \text{W}/\text{cm}^2$.

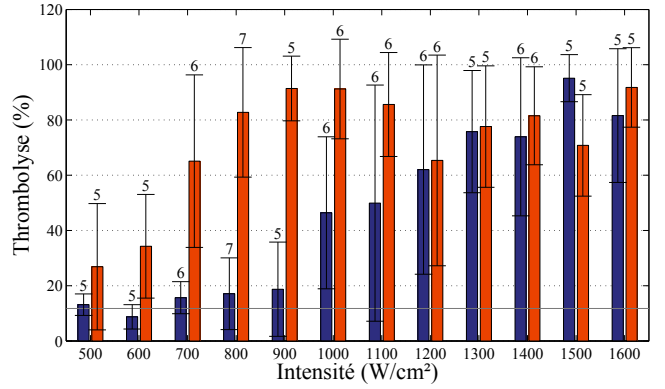


FIG. 4: Comparaison de l'efficacité thrombolytique des deux types d'excitation pour différentes intensités (I_{sppa}) pour des caillots immergés dans du sérum physiologique. En bleu clair : un tir monofréquentiel ; en rouge foncé : un tir bifréquentiel. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type et le nombre d'échantillons pour chaque réalisation est indiqué au-dessus de chaque barre. Le trait gris représente la perte de poids moyenne des témoins (non insonifiés).

Le signal bifréquentiel a un effet thrombolytique dès $500\ \text{W}/\text{cm}^2$ et atteint un maximum de $91\% \pm 10\%$ pour une intensité $I_{sppa} = 900\ \text{W}/\text{cm}^2$. Après ce pic d'activité, l'efficacité thrombolytique de l'excitation bifréquentielle diminue et devient plus variable tout en restant supérieure à 70 %. Nous observons également qu'à des intensités de $800\ \text{W}/\text{cm}^2$ et $900\ \text{W}/\text{cm}^2$, la quasi totalité du caillot est désagrégée avec la séquence de tirs bifréquentielle alors que l'on n'a aucun effet avec la séquence monofréquentielle. On peut exprimer ces résultats en termes d'intensités moyennées sur l'ensemble du signal d'émission (I_{spta} : *spatial peak time average*), unité classiquement utilisées en thérapie ultrasonore car plus directement reliée à l'échauffement moyen dans les tissus : on atteint 80 % de thrombolyse avec une intensité $I_{spta\ mono} = 150\ \text{W}/\text{cm}^2$ en monofréquentiel contre $I_{spta\ bi} = 80\ \text{W}/\text{cm}^2$ en bifréquentiel.

Par l'utilisation d'une excitation bifréquentielle on diminue donc environ par 2 la puissance nécessaire pour lyser 80 % d'un caillot de $1,5\ \text{cm}^3$ en 5 minutes et sans déplacer ce dernier. L'objectif de ces travaux étant d'obtenir une efficacité thrombolytique maximum avec une intensité minimum, le signal bifréquentiel s'avère être une piste prometteuse.

3.2 Liquide d'immersion : plasma sanguin

Comme pour les essais dans du sérum physiologique, l'efficacité thrombolytique du signal bifréquentiel est plus importante que celle du signal monofréquentiel aux plus faibles intensités. On atteint un maximum d'efficacité de $86\% \pm 17\%$, dans le cas monofréquentiel, avec une intensité $I_{sppa\ mono} = 1200\ \text{W}/\text{cm}^2$. Dans le cas bifréquentiel, il faut une intensité $I_{sppa\ bi} = 700\ \text{W}/\text{cm}^2$ pour atteindre un maximum de $80\% \pm 17\%$.

En termes d'intensités I_{spta} : on atteint 60 % de thrombolyse avec des intensités

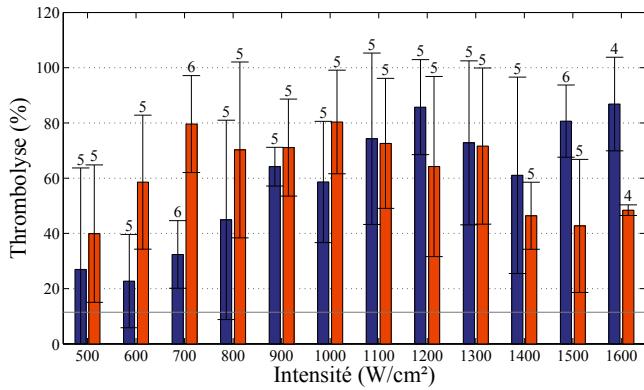


FIG. 5: Comparaison de l'efficacité thrombolytique des deux types d'excitation pour différentes intensités (I_{sppa}) pour des caillots immergés dans du plasma sanguin. En bleu : un tir monofréquentiel ; en rouge : un tir bifréquentiel. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type et le nombre d'échantillons pour chaque réalisation est indiqué au-dessus de chaque barre. Le trait gris représente la perte de poids moyenne des témoins (non insonifiés).

$I_{spta\ mono} = 110\text{ W/cm}^2$ et de $I_{sppa\ bi} = 60\text{ W/cm}^2$ avec des excitations mono- et bi-fréquentiel respectivement. Là encore, on diminue environ par 2 la puissance nécessaire pour lyser la même quantité de caillot avec un signal bifréquentiel.

4 Discussion

Pour les deux types de liquides utilisés, on constate qu'une fois atteint le maximum d'efficacité, si l'intensité est encore augmentée, cette efficacité est moins importante et significativement plus aléatoire. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène :

- L'écrantage : à ces intensités, les bulles de cavitation produites à l'avant du caillot, à l'intérieur de la nacelle, peuvent écranter partiellement le signal, limitant ainsi de manière irrégulière l'efficacité de la thrombolyse.
- Le chauffage : les intensités atteignent un niveau entraînant une hausse de température telle qu'elle change les propriétés du caillot. Le sang coagulé par chauffage n'a pas la même texture qu'un caillot formé par action de la fibrine : le caillot est plus élastique et plus résistant. Lors des essais à fortes intensités, certains caillots insonifiés présentaient une différence de couleur et de texture laissant supposer que les températures induites par le champ ultrasonore avaient *cuit* le caillot.

Les résultats obtenus dans le plasma montrent une décroissance d'efficacité plus marquée que pour ceux obtenus dans le sérum physiologique. Le plasma étant plus visqueux, le caillot partiellement désagrégé ne bouge pas dans la nacelle, malgré les courants induits par l'onde acoustique. Les parties se situant à l'arrière du caillot, dans la nacelle, sont fortement pénalisées par l'écrantage. De plus, nous avons observé très peu d'ef-

fet de chauffage (aspect du caillot) durant les essais dans le plasma, ce qui est compatible avec l'hypothèse de l'écrantage qui atténue l'onde avant d'atteindre le caillot.

Sur la figure 6, les mêmes données sont présentées mais en comparant, pour une excitation bifréquentielle, l'efficacité thrombolytique en fonction du liquide d'immersion. Les barres bleu clair correspondent aux tirs dans du sérum physiologique, les orangées à ceux dans du plasma sanguin. Pour des intensités I_{sppa} de 500, 600 et 700 W/cm^2 , le pourcentage de lyse aurait tendance à être plus important pour les caillots immergés dans du plasma sanguin que pour ceux immergés dans du sérum physiologique. Cette observation est très encourageante pour l'application à la thrombolyse puisque le plasma sanguin se rapproche plus des conditions réelles de caillot in-vivo que le sérum physiologique.

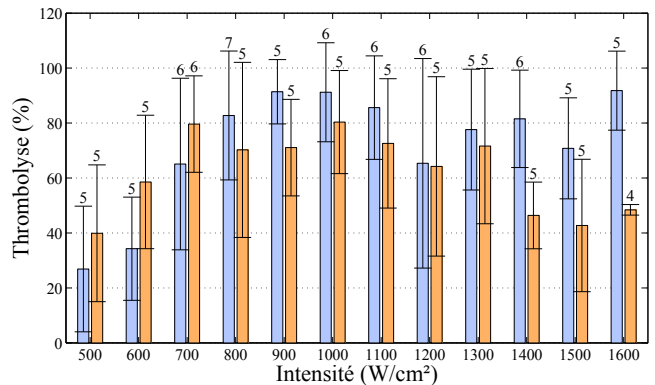


FIG. 6: Efficacité thrombolytique du signal bifréquentiel selon que le caillot est immergé : barres bleu clair dans du sérum physiologique, barres orangées dans du plasma sanguin. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type et le nombre d'échantillons pour chaque réalisation est indiqué au-dessus de chaque barre.

Par contre pour des intensités plus élevées, on ne dépasse jamais les 80 %, en moyenne, dans le plasma sanguin, alors qu'on atteint 91 % dans le sérum physiologique. Cependant, si l'on observe l'état des caillots après insonification pour les deux types de liquide d'immersion, on s'aperçoit que les caillots immergés dans du plasma sont *troués* alors que ceux immergés dans du sérum physiologique ne présentent pas de forme spéciales. Les photos de la figure 7 montrent des exemples de caillot *après tir* dans le cas du plasma sanguin : la photo 7.a représente un caillot témoin, donc entier ; les photos 7.b et 7.c correspondent respectivement à des lyses de 62 % et 41 % ; la photo 7.d montre un résultat de 100 %. On rappelle que le caillot initial a un diamètre de $\varnothing 14\text{ mm}$, alors que le diamètre du volume focal du transducteur à -3 dB est de $\varnothing 3\text{ mm}$. Le plasma est beaucoup plus visqueux que le sérum physiologique (cf tableau 1). Il y a donc moins de brassage dû aux courants induits par le champ ultrasonore et la cavitation, le caillot reste donc en place et est percé d'un trou correspondant aux dimensions du volume focal du transducteur. On obtient donc une meilleure sélectivité spatiale dans le plasma sanguin que dans le sérum phy-

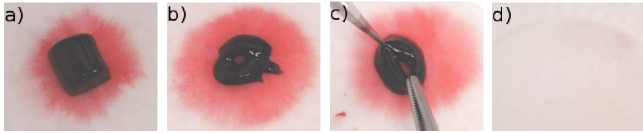


FIG. 7: Quelques exemples de caillots après insonification dans du plasma sanguin : a) caillot intact (témoin), b) et c) caillot troué ($E_{th6} = 62\%$ et $E_{th10} = 41\%$) et d) caillot entièrement lysé ($E_{th} = 100\%$).

milieu	Viscosité η 10^{-3}Pa.s
eau	1,0
serum φ	1,0
plasma sanguin	1,6 à 2,0
sang total	4,0 à 6,0

TAB. 1: Valeurs des viscosités de l'eau, du sérum physiologique, du plasma sanguin et du sang.

siologique, au prix d'une plus faible efficacité maximale liée à la taille très importante de nos caillots.

Par ailleurs, un tir d'amorçage est nécessaire en bifréquentiel pour initier la cavitation, ce qui peut s'expliquer par le fait que les caillots sont très peu réfléchissants. En effet, dans un scénario où la pression de radiation est responsable de la combinaison non linéaire des deux hautes fréquences, ce tir d'amorçage va permettre de produire des bulles favorisant la pression de radiation et augmentant donc la basse fréquence produite.

5 Conclusion

L'efficacité thrombolytique d'une excitation bifréquentielle composée de deux hautes fréquences proches a été testée sur des modèles de caillots sanguin in vitro et comparée, dans les mêmes conditions expérimentales, à l'efficacité thrombolytique d'une excitation monofréquentielle de même intensité. Les résultats présentés ici montrent que l'excitation monofréquentielle permet effectivement de diminuer de plus de 40% l'intensité acoustique nécessaire pour atteindre in vitro une lyse totale d'un caillot sanguin, d'environ $1,5\text{ cm}^3$, en 5 minutes. L'utilisation d'une excitation bifréquentielle permet donc, avec un seul transducteur, de largement réduire l'intensité nécessaire pour lyser un thrombus sans aucun agent thrombolytique. Par ailleurs, les expériences réalisées dans du plasma sanguin montrent que la thrombolyse requiert des puissances comparables, voire légèrement inférieures. De plus, la plus forte viscosité du plasma réduit le mélange occasionné par les tirs ultrasonores, et permet donc un meilleur contrôle spatial de l'action thrombolytique.

Remerciements

Cette étude a été soutenue par l'ANR dans le cadre du projet CAVITHERAPUS ANR-06-BLAN-0405.

Références

- [1] Shaul Atar, Huai Luo, Tomoo Nagai, and Robert J. Siegel. Ultrasonic thrombolysis : catheter-delivered and transcutaneous applications. *European Journal of Ultrasound*, 9 :39–54, 1999.
- [2] R. Kornowski, R. S. Meltzer, A. Chernine, Z. Vered, and A. Battler. Does external ultrasound accelerate thrombolysis? results from a rabbit model. *Circulation*, 89(1) :339–344, 1994.
- [3] T. R. Porter, R. F. LeVeen, R. Fox, A. Kricsfeld, and F. Xie. Thrombolytic enhancement with perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin microbubbles. *Am Heart J*, 132(5) :964–968, 1996.
- [4] Y. Birnbaum, H. Luo, T. Nagai, M. C. Fishbein, T. M. Peterson, S. Li, D. Kricsfeld, T. R. Porter, and R. J. Siegel. Noninvasive in vivo clot dissolution without a thrombolytic drug : recanalization of thrombosed iliofemoral arteries by transcutaneous ultrasound combined with intravenous infusion of microbubbles. *Circulation*, 97(2) :130–134, 1998.
- [5] U. Rosenschein, V. Furman, E. Kerner, I. Fabian, J. Bernheim, and Y. Eshel. Ultrasound imaging-guided noninvasive ultrasound thrombolysis : preclinical results. *Circulation*, 102(2) :238–245, 2000.
- [6] S. Schäfer, S. Kliner, L. Klinghammer, H. Kaarmann, I. Lucic, U. Nixdorff, U. Rosenschein, W. G. Daniel, and F. A. Flachskampf. Influence of ultrasound operating parameters on ultrasound-induced thrombolysis in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 31(6) :841–847, 2005.
- [7] I. Saletes, B. Gilles, and J.C. Bera. Cavitation ultrasonore générée par une excitation bifréquentielle. In *Article du 19^{ème} Congrès Français de Mécanique*, 2009.
- [8] E. Blanc and J Godo. Milieu de couplage pour ultrasons de puissance. *European Patent*, EP 1 038 551 B1, 2000.