

# Quantification par mesures optiques des fragments libérés lors de la thrombolyse ultrasonore

M. DHAHBI<sup>a,b</sup>, M. BEN CHIEKH<sup>b</sup>, B. GILLES<sup>a</sup>, J.C. BERA<sup>a</sup>, A. JEMNI<sup>b</sup>

a. INSERM, U1032, LYON, F-69003 (FRANCE) ; Université de Lyon, LYON, F-69003 (FRANCE)

b. LESTE, ENIM ; Université de Monastir, 5000 Monastir (TUNISIE)

## Résumé :

*L'utilisation des ultrasons pour des applications thérapeutiques et diagnostiques est devenue fréquente. Il a été montré que l'utilisation d'ondes acoustiques focalisées permet de détruire des caillots de sang sans utiliser d'agent thrombolytique. Cependant, la technique se heurte à un certain nombre d'obstacles ou d'inconnues, tels que la taille des fragments libérés dans la circulation lors du processus. Dans ce cadre, nous nous proposons d'étudier et de quantifier, grâce à une technique optique basée sur le traitement d'images, la distribution de tailles de fragments libérés. Des expériences in-vitro ont été effectuées en utilisant des cibles de sang humain coagulé et placées dans une section d'essai siège d'un écoulement pulsé. Les visualisations montrent qu'à partir de certaines intensités acoustiques, il est possible de percer le caillot et qu'on libère des fragments dont la distribution de tailles dépend de l'intensité d'excitation et du temps de séjours des résidus dans le champ ultrasonore.*

## Abstract :

*The use of ultrasound for therapeutic and diagnostic applications has become common. Recently, it has been shown that the high intensity focused ultrasound (HIFU) can destroy blood clots. In this context, we propose to study and quantify, using an optical technique based on image processing, the size distribution of fragments released during the ultrasound thrombolysis. In-vitro experiments were performed using human blood clots placed in a test-section in presence of pulsatile flow. Visualizations show that inertial cavitation is an efficient tool for the destruction of blood clots. Post-processing provides the size distribution of the released fragments. It mainly depends on the applied acoustic intensity and on the residence time of these clots debris in the ultrasonic field.*

**Mots clefs :** thrombolyse, ultrasons, cavitation, caillot sanguin, mesure optique

## 1 Introduction

Les ultrasons constituent un moyen efficace de stimuler l'action des agents thrombolytiques pharmacologiques, et pourraient à terme jouer un rôle dans le traitement des ischémies en limitant les complications associées à ces produits (forts risques hémorragiques, temps de désobstruction des vaisseaux, etc.) [1,2]. Plusieurs travaux ont montré qu'il est même possible d'obtenir la désagrégation des caillots sanguins par voie extracorporelle en l'absence d'agents thrombolytiques en utilisant des transducteurs ultrasonores focalisés [3,4,5]. Cependant, les fragments de caillot libérés peuvent obstruer des vaisseaux en aval de la zone de tir et provoquer des embolies. Ce problème a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche pour caractériser les distributions de tailles des fragments de caillot obtenus après tir ultrasonore en milieu confiné : les méthodes de caractérisation utilisées s'appuient sur des filtrations successives ou sur des compteurs mesurant les modifications d'impédance électrique dues à la présence de particules dans un électrolyte [5-6].

Dans ce contexte, nous proposons dans cette étude, d'utiliser une méthode optique, qui permet en outre d'effectuer des mesures en présence d'un écoulement pulsé tel que l'écoulement sanguin. À l'aide d'une caméra rapide ainsi que d'un programme de traitement d'images développé sous Matlab, nous avons étudié une méthode pour caractériser la taille des débris détachés d'un caillot sanguin au cours d'un traitement par

thrombolyse ultrasonore. Nous présentons quelques résultats préliminaires illustrant l'effet de l'intensité acoustique sur la distribution de tailles des fragments libérés et l'effet de la présence de l'écoulement pendant les tirs ultrasonores.

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Matériel

Le dispositif expérimental présenté sur la figure 1 vise à produire, à l'aide d'un transducteur focalisé et excité par un signal électrique sinusoïdal à une fréquence  $f_0=550$  kHz, des bulles de cavitation sur un caillot sanguin. Ce caillot est placé dans une nacelle en polystyrène (impédance acoustique de  $2,52 \cdot 10^6 \text{ kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) de longueur 45 mm et de section carrée (10 mm de côté) dans sa partie supérieure, où le caillot est placé. Dans sa partie inférieure, sa section est resserrée dans l'une des dimensions transverses, et offre donc une fenêtre de visualisation de plus faible épaisseur en aval du caillot. Le tout est immergé dans une cuve remplie d'eau filtrée et dégazée. Un écoulement pulsé de chlorure de sodium (NaCl) est imposé en circuit fermé à l'aide d'une pompe péristaltique délivrant un débit moyen de  $0,88 \text{ ml.s}^{-1}$ . Le caillot sanguin est préparé par coagulation de sang humain obtenu de donneurs sains volontaires et anonymes dans le cadre d'une convention établie avec l'Établissement Français du Sang. La coagulation s'effectue à  $37^\circ\text{C}$  en utilisant une solution de 4mM de  $\text{CaCl}_2$  et de 5 UNIH de thrombine humaine. Une fois le sang coagulé, un caillot de dimensions approximatives  $30 \times 10 \times 7 \text{ mm}$  ( $L \times l \times e$ ) est découpé au scalpel et fixé dans la partie de section carrée de la nacelle. Le positionnement de la nacelle au foyer se fait à l'aide de platines de positionnement 3D motorisées.

Nous utilisons un dispositif optique en mode ombroscopie afin de visualiser et d'enregistrer les débris détachés du caillot sanguin. Ce dispositif est composé d'une caméra rapide de model Phantom V12.1 et d'un système d'éclairage par lumière blanche.

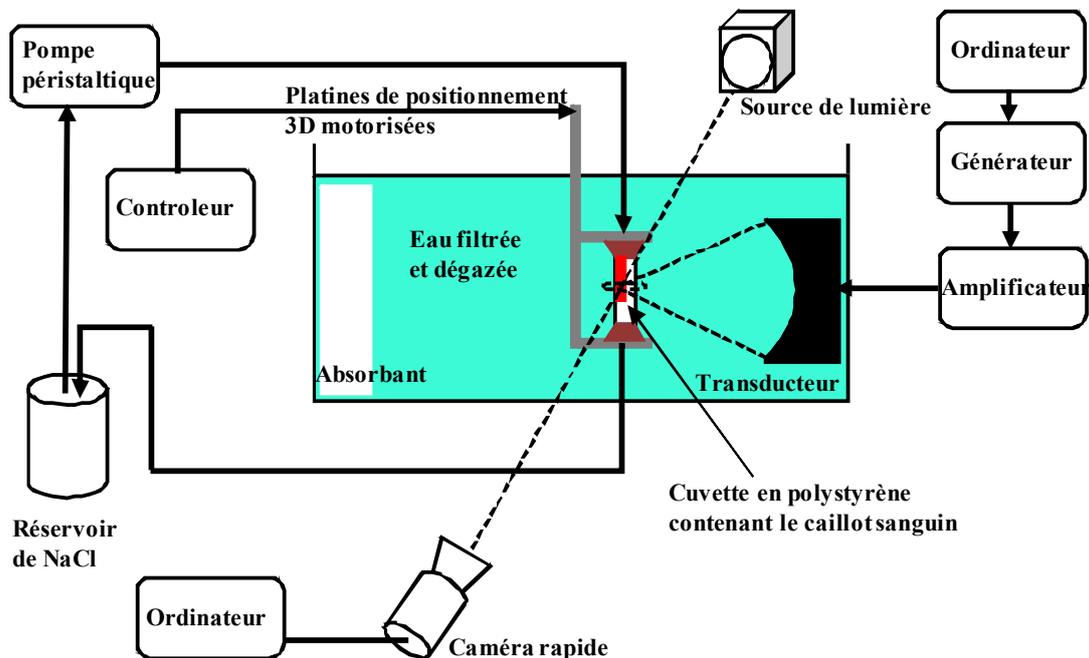


FIG. 1 – Schéma du dispositif expérimental considéré

### 2.2 Méthodes

Pour caractériser la distribution des tailles des résidus libérés, des vidéos ont été enregistrées puis traitées sous Matlab. La durée d'enregistrement est de 30 s à la fréquence de 24 i/s à la résolution de  $1280 \times 800$  pixels. Pour la mesure des fragments de caillot, le temps d'exposition pour chaque image est de  $100 \mu\text{s}$ , la résolution spatiale est de  $10 \mu\text{m}$  et la zone visualisée cadre la zone de nacelle de plus faible épaisseur, juste en aval du caillot. A travers une zone d'observation appliquée pour chacune des images, nous avons recensé les fragments en utilisant une technique de détection de contour. L'aire et par conséquent la taille moyenne de chaque contour sont également déterminées.

Les tirs ultrasonores, présentés sur la figure 2, consistent en des excitations pulsées de 27 ms avec un rapport cyclique de 10% pour ne pas endommager la paroi par dépôt thermique (les intensités données par la suite correspondent toutes à des valeurs moyennées sur chaque salve). Avant chaque séquence de tir, un tir d'amorçage est effectué pour initier la cavitation. L'amorçage dure 18 ms à une intensité acoustique au foyer  $I=2200 \text{ W.cm}^{-2}$ .

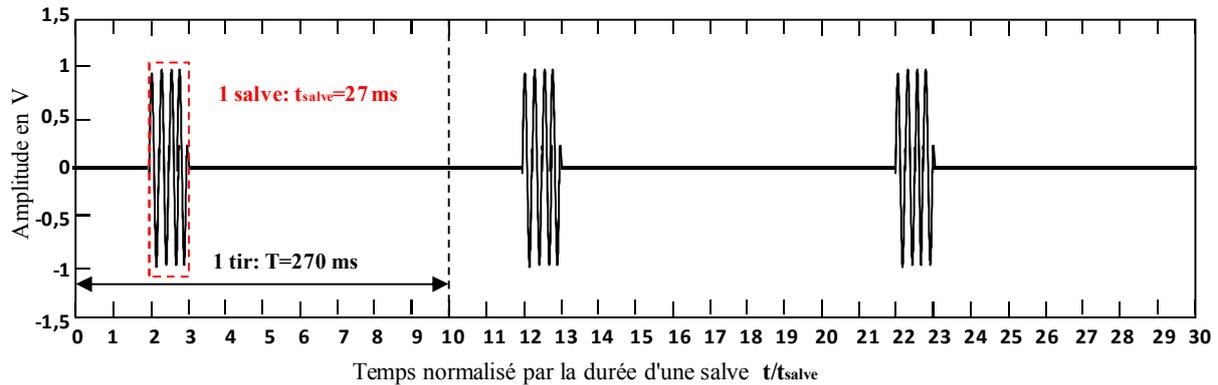


FIG. 2 – Séquence de tirs ultrasonores pulsés. Le temps est normalisé par la durée d'une salve.

Différentes séquences de tirs ultrasonores ont été effectuées :

- En premier lieu, un positionnement fin de la nacelle est effectué en l'absence de caillot, à l'aide d'excitations d'intensité acoustique  $I=1100 \text{ W.cm}^{-2}$ . L'objectif est de localiser l'activité de cavitation à l'intérieur de la nacelle.
- Un caillot est ensuite fixé à l'intérieur de la nacelle, et la thrombolyse est réalisée en présence d'écoulement à des intensités acoustiques de 600, 800, 1200 et  $2000 \text{ W.cm}^{-2}$  et pour une durée de tir de 30 s au cours de laquelle la distribution de tailles des résidus est mesurée.
- Enfin, la thrombolyse est réalisée en l'absence d'écoulement à une intensité acoustique  $I=1500 \text{ W.cm}^{-2}$  émise pendant 10 s. L'écoulement est ensuite rétabli pour filmer les résidus libérés et caractériser leur distribution de tailles.

### 3 Résultats et discussion

#### 3.1 Thrombolyse de caillot sanguin in vitro

La cavitation décrit la naissance, la croissance, puis l'implosion de bulles de gaz et de vapeur dans un liquide soumis à une dépression. Une onde ultrasonore de forte intensité soumet le milieu de propagation à une succession de fortes dépressions transitoires qui sont donc susceptibles de générer la cavitation. L'efficacité de la thrombolyse est intimement liée à la présence de cavitation au voisinage du caillot. Une première étape consiste donc à positionner la nacelle sans caillot sanguin de telle sorte que le nuage de cavitation créé au voisinage du foyer du transducteur focalisé se développe à l'intérieur de la nacelle. Sur la figure 3, nous avons présenté une séquence obtenue à l'aide de la caméra rapide pour une cadence d'acquisition de 21100i/s (ouverture  $10 \mu\text{s}$ ), illustrant le développement et la croissance d'un nuage de bulles à l'intérieur de la section d'essai en l'absence du caillot, pour une intensité de  $400 \text{ W.cm}^{-2}$  environ.

Une fois le caillot mis en place, la thrombolyse est observée au niveau de la zone focale du transducteur lorsque l'intensité acoustique est suffisante. Pour des salves d'intensité  $I=1100 \text{ W.cm}^{-2}$ , un trou d'environ 3,5 mm de diamètre est créé. La dispersion sur ce diamètre reste inférieure à 1 mm lorsque l'expérience est répétée. La zone lysée apparaît d'abord en surface et se développe ensuite en profondeur pour aboutir au percement du caillot, comme on peut le voir sur la figure 4. Pour un caillot de 7 mm d'épaisseur, à cette intensité, le percement est obtenu en environ 110 s.

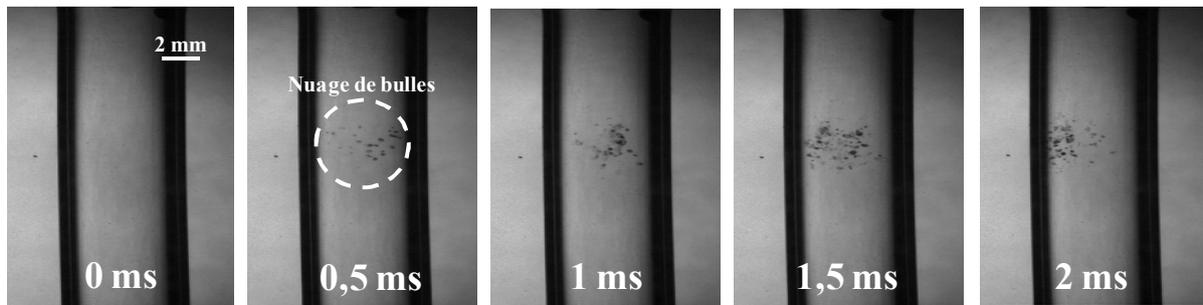


FIG. 3 – Séquence illustrant le développement et la croissance d'un nuage de bulles à l'intérieur de la nacelle en fonction du temps



FIG. 4 – Photos d'un caillot sanguin avant et après une séquence de tirs pour une intensité  $I=1100 \text{ W.cm}^{-2}$  pendant une durée de 110 s.

## 3.2 Caractérisation de la distribution de taille des résidus libérés

### 3.2.1 Mesure des résidus en fonction de l'intensité acoustique

Plusieurs essais ont été réalisés afin de déterminer la distribution des tailles des résidus libérés en faisant varier l'intensité de 600 à 2000  $\text{W.cm}^{-2}$ . La figure 5, montre un échantillon de séquence d'images acquises sous une excitation ultrasonore d'intensité  $I=1200 \text{ W.cm}^{-2}$ . Sur ces images on observe des nuages diffus et des gros fragments libérés. Les nuages diffus représentent des fragments de tailles extrêmement faibles ( $<10 \mu\text{m}$ ). Ces fragments qui sont suffisamment petits pour ne présenter aucun risque d'embolie secondaire. Ils ne sont pas pris en compte par la suite.

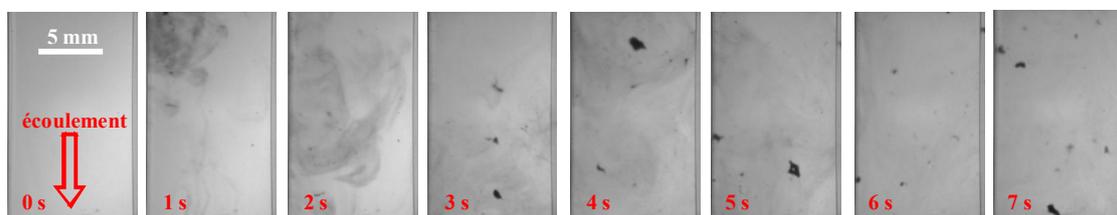


FIG. 5 – Images des fragments libérés lors d'une séquence de tirs pour une intensité  $I=1200 \text{ W.cm}^{-2}$ . Les photos sont présentées en fonction du temps de tir.

Les enregistrements complets (911 images), pris pendant les différents essais effectués, sont binarisés et traités. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogrammes sur la figure 6 pour différentes intensités (a) 600 (b) 800 (c) 1200 et (d) 2000  $\text{W.cm}^{-2}$ . On constate que la taille des fragments libérés évolue en fonction de l'intensité acoustique appliquée. En augmentant l'intensité de tir, la probabilité de libérer des fragments de taille plus importante augmente. Par exemple, si on multiplie l'intensité par un facteur 2 (de 600 à 1200  $\text{W.cm}^{-2}$ ), le nombre de résidus de taille supérieure à 10  $\mu\text{m}$  croît de manière importante, et la taille maximale des fragments passe de 0,1 à 0,43 mm environ.

Pour une intensité  $I=2000 \text{ W.cm}^{-2}$ , l'onde ultrasonore et la dynamique du nuage de cavitation induisent des écoulements déplaçant le caillot par rapport à la zone focale du transducteur. L'action de la cavitation se

déplace donc par rapport au caillot, et au lieu de trouver le caillot, on en réalise une découpe. Nous avons alors visualisé la libération d'un fragment de taille supérieure à 7 mm non présenté sur la figure 6(d), ce qui illustre le danger et le risque d'embolie provoqués par les fortes intensités acoustiques. Il ressort de ces constatations qu'il faut trouver un compromis entre l'intensité d'excitation et la taille maximale des résidus libérés, visant d'une part à assurer l'efficacité de la technique de traitement par thrombolyse ultrasonore et d'autre part à garantir l'absence de risque d'embolie pouvant être créée en aval.

### 3.2.2 Effet de l'écoulement

Des expériences complémentaires consistent à comparer la distribution des tailles de fragments en présence et en absence d'un écoulement durant la période le tir. Nous avons réalisé ces essais pour une intensité acoustique  $I=1500 \text{ W.cm}^{-2}$ . Les résultats sont présentés sur les deux histogrammes sur la figure 7. On constate que le nombre de résidus est multiplié par un facteur 2 dans le cas où il n'y a pas d'écoulement au cours des tirs ultrasonores. Cependant, la taille maximale est divisée par un rapport plus que 2. En effet, en absence d'écoulement, la taille maximale des fragments libérés est de l'ordre de 0,14 mm au lieu de 0,36 mm en présence de l'écoulement. Ceci s'explique par le fait que les fragments libérés ont été maintenus dans la zone focale durant les séquences de tirs. Par conséquent, les résidus de grande taille peuvent être dégradés en petits fragments.

D'après ces résultats, pour limiter la taille des fragments libérés, il serait vraisemblablement intéressant de limiter l'écoulement sanguin pendant les séquences de tirs ultrasonores. En tout état de cause, l'efficacité de la thrombolyse ultrasonore en termes de taille de résidus dépend du temps de séjour de ces résidus dans le champ acoustique.

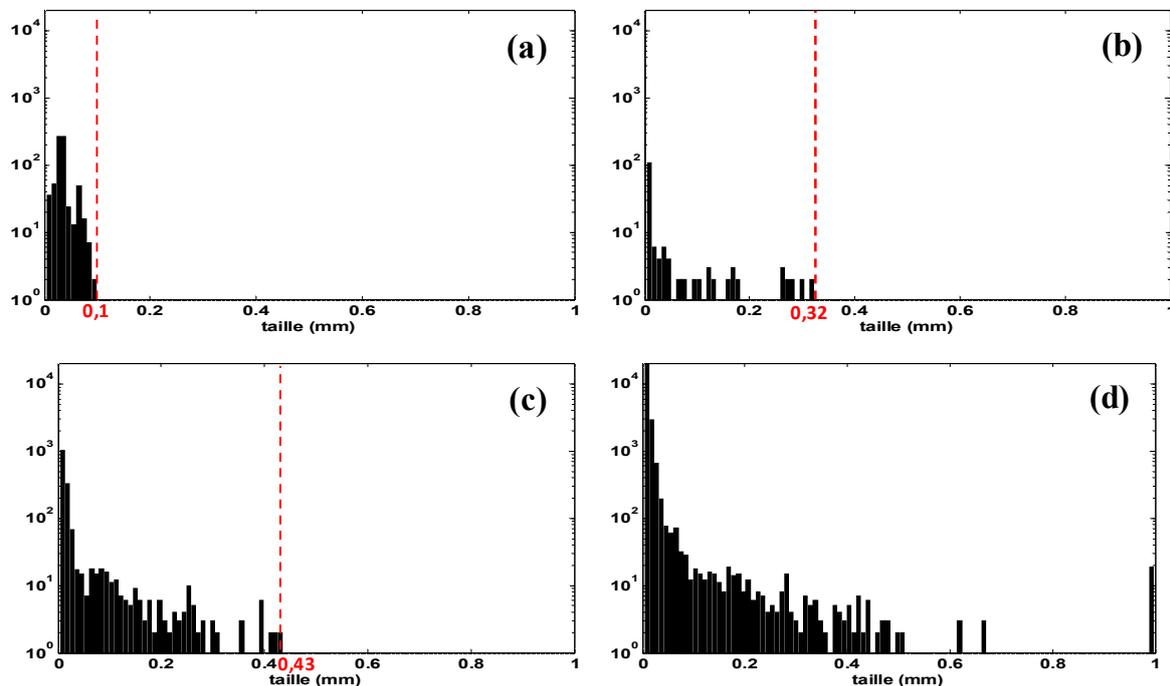


FIG. 6 – Distribution des tailles caractéristiques des fragments libérés pendant une séquence de tirs de 30 s en présence d'un écoulement pour une intensité d'excitation (a)  $I=600 \text{ W.cm}^{-2}$  ; (b)  $I=800 \text{ W.cm}^{-2}$  ; (c)  $I=1200 \text{ W.cm}^{-2}$  ; (d)  $I=2000 \text{ W.cm}^{-2}$ . Les traits interrompus colorés en rouge indiquent la taille maximale des résidus libérés

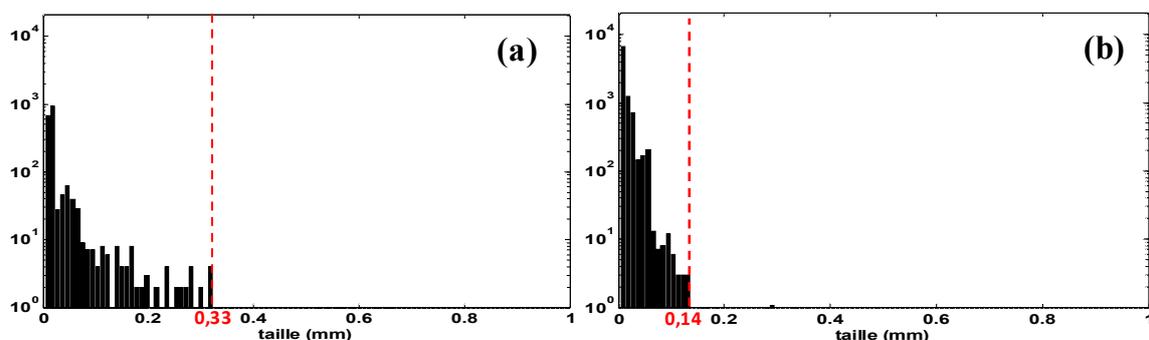


FIG. 7 – Distribution des tailles caractéristiques des fragments libérés pendant une séquence de tirs de 10 s pour une intensité  $I=1500 \text{ W.cm}^{-2}$  (a) en présence d'un écoulement et (b) et sans écoulement. Les traits interrompus colorés en rouge indiquent la taille maximale des résidus libérés

## 4 Conclusion

L'objectif de cette étude était de mettre en place une technique permettant de caractériser la distribution des tailles de fragments libérés lors d'essais de thrombolyse ultrasonore réalisés in vitro. Dans une première étape, nous avons mis en œuvre un dispositif expérimental capable de réaliser les essais de thrombolyse de caillot sanguin et de visualiser les résidus qui se détachent de la cible lors des séquences de tirs. A l'aide d'une technique de traitement d'images, nous avons pu obtenir quelques résultats préliminaires concernant les distributions de tailles des fragments libérés. Pour des intensités d'excitation allant de  $I_{\text{sppa}} = 600$  à  $I_{\text{sppa}} = 2000 \text{ W.cm}^{-2}$ , les résultats montrent que le nombre et la taille maximale des résidus augmentent avec l'intensité acoustique. Un compromis entre la taille des résidus et l'intensité d'excitation doit donc être établi. Nous avons également montré que pour avoir des fragments de taille fine en aval, il est intéressant d'augmenter le temps de séjour des résidus dans le champ ultrasonore, notamment en réduisant l'écoulement sanguin pendant les séquences de tir ultrasonore.

*Cette étude a été soutenue par le programme de coopération Franco-tunisien (INSERM/DGRST Ref. 10/M 02) ainsi que le programme des bourses d'alternance du Ministère de l'Enseignement et de la Recherche scientifique en Tunisie (session 2011).*

## References

- [1] Atar S. and Rosenschein U., Perspectives on the role of ultrasonic devices in thrombolysis. *J. Thromb. Thrombolysis*, 17(2):107–14, 2004.
- [2] Kaul S., Sonothrombolysis: A Universally Applicable and Better Way to Treat Acute Myocardial Infarction and Stroke? Who Is Going to Fund the Research? *Circulation*, 119(10):1358, 2009.
- [3] Rosenschein U., Furman V., Kerner E., Fabian I. Bernheim J., Eshel Y., Ultrasound imaging-guided noninvasive ultrasound thrombolysis: preclinical results, *Circulation*, 102(2), 238-245, 2000.
- [4] Saletes I., Gilles B., Béra J.C., Enhancement of purely ultrasound thrombolysis efficiency using a bifrequency excitation, 9th International Symposium on Therapeutic Ultrasound, AIP Conf. Proc. 1215: 19-22 2010.
- [5] Maxwell A., Cain C., Duryea A., Yuan L., Gurm H., and Xu Z., Noninvasive Thrombolysis Using Pulsed Ultrasound Cavitation Therapy-Histotripsy. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 35(12), 1982-1994, 2009.
- [6] Ariani M., Fishbein M.C., Chae J.S., Sadeghi H., Don Michael A., Dubin S. B., Siegel R.J., Dissolution of Peripheral Arterial Thrombi by Ultrasound, *Circulation*, 84(4), 1680-1688, 1991.