

CFA/VISHNO 2016

Suivi en temps réel de l'activité de cavitation stable et inertielle d'un nuage de bulles

C. Cornu, C. Inserra et J.-C. Béra

LabTAU, INSERM U1032, 151 cours Albert Thomas, 69424 Lyon, France
corentin.cornu@inserm.fr



LE MANS

Cette étude expérimentale porte sur le suivi de l'activité de cavitation stable et inertielle d'un nuage de bulles. Un puits de culture est insonifié par deux transducteurs (fréquence 425 kHz), et un hydrophone placé en paroi permet de quantifier l'activité de cavitation du nuage, à l'aide des indicateurs de bruit large bande acoustique (régime de cavitation inertielle) et du sous-harmonique de la fréquence fondamentale (régime de cavitation stable). Le suivi temps réel est réalisé au moyen d'une carte FPGA (Field Programable Gate Array) qui permet d'écouter les signatures acoustiques avec un cadencement inférieur à 1 ms. Il est montré qu'il est possible de générer de la cavitation stable sans présence d'implosions de bulles et cela permet d'envisager les processus de contrôle temps réel de cavitation à mettre en place pour différencier chaque régime.

1 Introduction

La cavitation inertielle est liée à une activité violente d'un nuage de bulles, car elle correspond à l'implosion de bulles qui génère une action mécanique intense au sein du milieu. Le phénomène de cavitation ultrasonore est un phénomène peu reproductible et extrêmement sensible aux conditions initiales (notamment la présence de bulles, de gaz dissous, d'impuretés). Ainsi, pour obtenir une activité de cavitation constante au cours du temps, la régulation temporelle et spatiale de l'activité de cavitation inertielle a été implémentée au laboratoire [1] pour des essais de sonothrombolyse [2], d'histotripsie mais aussi de sonoporation cellulaire [3]. Le contrôle de la cavitation inertielle a permis de mettre en évidence une forte corrélation entre le taux de sonoporation et le niveau d'activité de cavitation inertielle, mais celle-ci est aussi à l'origine d'une importante mortalité cellulaire.

La cavitation stable correspond à une oscillation faiblement non-linéaire du nuage de bulles sans implosions des bulles. Dans le but de pouvoir déterminer si un processus de sonoporation peut avoir lieu sous le seul effet de la cavitation non-inertielle, il est nécessaire de contrôler le phénomène de cavitation stable comme cela a été réalisé pour la cavitation inertielle. Ainsi, l'action mécanique de la cavitation stable régulée pourra être testée pour diverses applications thérapeutiques et les effets biologiques de chaque régime de cavitation pourront être identifiés et distingués.

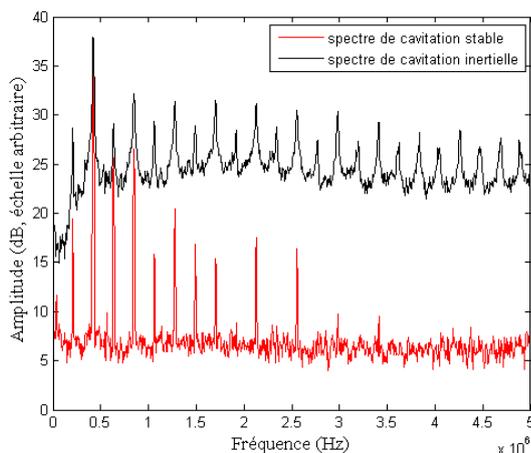


FIGURE 1 – Exemple de spectres de pression obtenus grâce au dispositif expérimental

A titre d'exemple, la figure 1 montre deux spectres expérimentaux issus de l'écoute passive de l'activité de cavitation au sein du milieu. Outre la composante fondamentale et ses harmoniques, le premier spectre mesuré

présente une composante spectrale sous-harmonique $f_0/2$ et des composantes ultra-harmonique ($3f_0/2$, $5f_0/2$, ...); le deuxième spectre présente un niveau de bruit large bande d'environ 25 dB. Le présence du sous-harmonique et le bruit large bande sont deux indicateurs caractéristiques des activités de cavitation stable et inertielle. Le sous-harmonique est un bon indicateur de cavitation stable pour deux raisons. Tout d'abord, la non-linéarité de doublement de période ne peut être causée que par l'oscillation des bulles : contrairement à la non-linéarité de distorsion harmonique, elle permet d'attester de la présence de bulles qui oscillent dans le milieu et elle ne peut pas être due à la propagation et au milieu. Ensuite, Prosperetti [4] et Katiyar [5] ont montré qu'il existait un seuil d'apparition du sous-harmonique en fonction de la pression d'excitation et du rayon de la bulle. Ainsi, la distinction entre présence et absence du sous-harmonique existe, elle est théoriquement démontrée et non arbitrairement définie. Le bruit large bande est quant à lui un indicateur reconnu comme caractéristique de l'implosion des bulles au cours d'un tir ultrasonore [6].

Dans un premier temps, l'objectif est d'observer l'apparition du sous-harmonique grâce au dispositif expérimental en fonction du temps. Le suivi de la cavitation stable nous permettra de répondre à deux interrogations : quels paramètres doit-on prendre en compte pour mettre en oeuvre un contrôle de la cavitation stable et comment se comporte qualitativement la cavitation stable en régime pulsé.

2 Matériel et méthodes

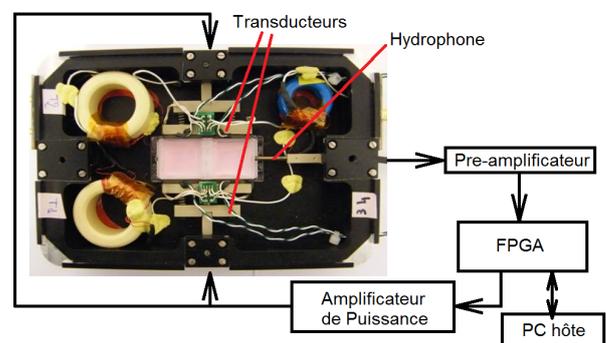


FIGURE 2 – Schéma de la chaîne de mesure avec le dispositif expérimental de transduction ultrasonore

L'ensemble des essais expérimentaux a été réalisé à l'aide d'un dispositif ultrasonore dédié à l'observation au microscope de la sonoporation cellulaire. Ce dispositif présente l'avantage d'incorporer l'ensemble de la chaîne ultrasonore d'émission et de mesure (transducteur et hydrophone) au sein d'une platine de microscopie pour

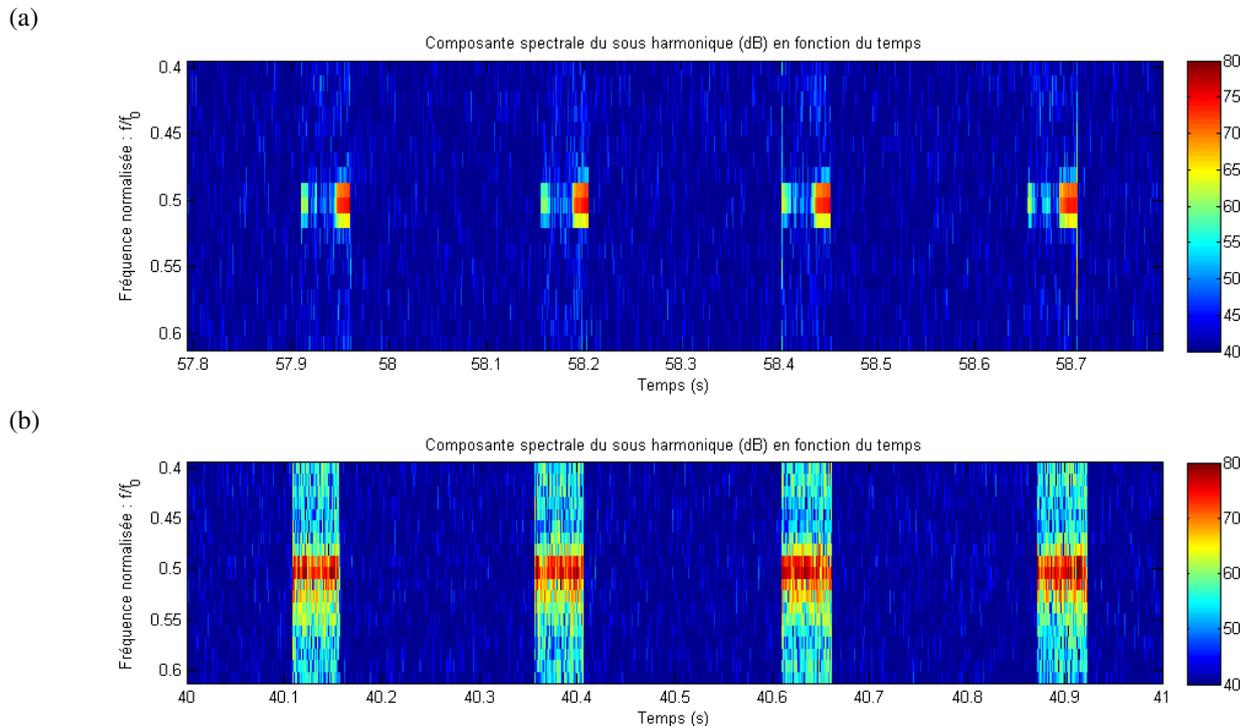


FIGURE 3 – Composantes spectrales autour de la composante sous-harmonique $f_0/2$ en fonction du temps - (a) 4 pulses pour un tir à 500 mV - (b) 4 pulses pour un tir à 900 mV

permettre des visualisations en temps réel d'interaction entre bulles et cellules durant un tir ultrasonore. Au centre de la platine est situé un puits de culture cellulaire (*Labtek (Thermo Scientific Nunc, Rochester, NY, USA)*; dimensions : $20 \times 20 \text{ mm}^2$, volume : 2 mL) pouvant contenir de l'eau, du milieu cellulaire ou des cellules en milieu. Pour insonifier le milieu, deux transducteurs plans (barettes piezoélectriques *Ferroperm PZ 26 (Ferroperm, Kviss9 2 gaard, Denmark)*; fréquence de résonance : 426.5 kHz; dimensions : $18 \times 3 \text{ mm}^2$) sont placés au contact du puits sur 2 parois opposés. Un gel de couplage échographique (*Aquasonic; Fisher ThermoScientific*) est déposé entre les transducteurs et le puits avant le tir pour faciliter la transmission de l'énergie et éviter une élévation de température (par réflexion d'onde) des transducteurs. Les transducteurs fonctionnent à la fréquence $f_0 = 426.5 \text{ kHz}$, fréquence pour laquelle ils ont été adaptés électriquement. Cette adaptation, réalisée avec un système bobine-ferrite, est inclus dans la platine. Sur une paroi libre du puit de culture, un hydrophone (*HNR-0500; Onda, Sunnyvale, CA, USA*) peu directif est placé pour écouter le bruit de cavitation généré au sein du milieu.

Concernant la génération des signaux et l'acquisition des données, l'ensemble du dispositif est piloté par un système FPGA (*Field-Programmable Gate Array; PXIe-7965R card; National Instrument, Austin, TX, USA*) avec une interface *Labview*. Le signal ultrasonore d'excitation est généré (tension de sortie entre 0 et 1 Volts) avant d'être amplifié par un amplificateur de puissance (24 V, 4.8 A, 50 MHz; *AR-Kalmus, Bothell, WA, USA*). L'interface *Labview* permet de configurer les paramètres acoustiques du signal : mode continu ou pulsé, durée du pulse, rapport cyclique et temps total de tir. Ensuite, le système FPGA permet l'acquisition des signaux issus de l'hydrophone et d'effectuer leur transformée de Fourier avec une fréquence d'échantillonnage ($f_e = 10 \text{ MHz}$) et un nombre de points ($N = 2048$) assez grand pour éviter le recouvrement des

spectres. L'interface permet une acquisition des indices de cavitation stable (CS) et de cavitation inertielle (CI) toutes les 250 μs pendant toute la durée du tir ultrasonore.

3 Résultats

3.1 Suivi de la cavitation stable et inertielle

La figure 3 montre l'évolution du spectre autour de la composante sous-harmonique $f_0/2$ en fonction du temps sur 4 pulses successifs pendant un tir pulsé (durée de cycle de 250 ms; rapport cyclique 0.2) de 60 secondes dans de l'eau non dégazée. La fenêtre fréquentielle est normalisée pour la représentation par rapport à la fréquence d'excitation f_0 : $[0.4 \ 0.6]f_0$ et la fréquence centrale observée correspond à la sous-harmonique ($f_0/2 = 213 \text{ kHz}$). La dynamique d'amplitude est comprise entre 40 dB et 80 dB, 40 dB correspondant au niveau moyen du bruit électronique mesuré par l'hydrophone. L'avantage de cette représentation est qu'elle permet de montrer sur un même graphe la présence du sous-harmonique (indice CS) et de son facteur de qualité (largeur du pic) mais aussi la présence du bruit large bande (indice CI).

La figure 3(a) correspond au suivi de l'activité de cavitation pour une amplitude de tension avant amplification de 500 mV, ce qui correspond à une intensité moyenne, au regard de la tension de sortie nécessaire pour déclencher la cavitation inertielle. Premièrement, le bruit large bande est absent hors et à l'intérieur des salves ultrasonores et un pic uniquement centré sur la valeur du sous-harmonique apparaît. Notons qu'à au début du troisième pulse et à la fin du dernier pulse, un pic plus large et très bref d'activité fréquentielle est visible à cause d'un effet de bord dû à la discontinuité entre période d'excitation et période de repos. Dans ce cas de figure, la cavitation est purement

stable et il semble correct de considérer la valeur maximale de cette fenêtre fréquentielle comme bon indicateur pour quantifier l'activité de cavitation stable. La figure 3(b) montre une autre portion du spectre pendant un tir à 900 mV, ce qui correspond à une intensité forte pour laquelle la cavitation inertielle se déclenche toujours. Dans ce cas de figure, un bruit large bande est visible au sein de chaque pulse et la plus grande amplitude est toujours centrée sur le sous-harmonique. Ainsi, il est possible d'affirmer que l'activité de cavitation inertielle est caractérisée par une augmentation du niveau de bruit large bande mais aussi par un niveau important de cavitation stable.

La figure 4 montre l'activité de cavitation stable et inertielle en fonction du temps pour des tirs pulsés de 60 secondes et pour différentes amplitudes de tension : $U = [200; 400; 600; 800]$ mV. Pour une meilleure lisibilité, les valeurs de CS et CI sont représentées sous la forme d'une aire centrée sur leur valeur moyennée sur chaque salve de 50 ms avec une barre d'erreur correspondant à l'écart-type. Notons que les valeurs obtenues entre les salves ultrasonores ne sont pas représentées. A droite de chaque courbe temporelle est tracé l'histogramme des valeurs de CS et CI, qui permet de quantifier la dispersion des valeurs sur tout le tir.

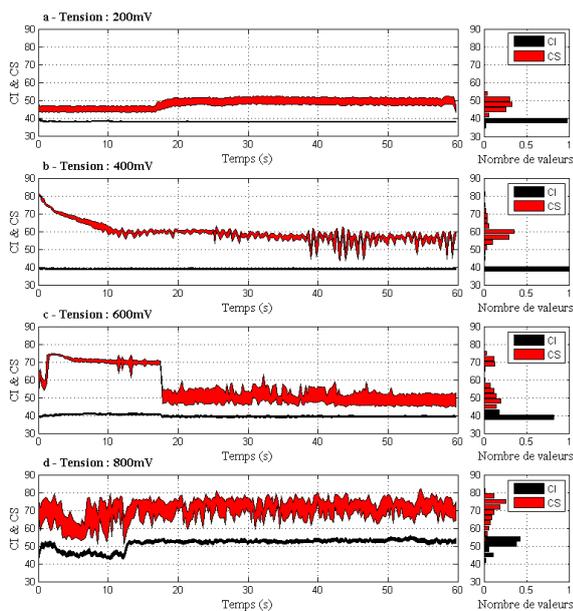


FIGURE 4 – Évolution des indicateurs CI et de CS en fonction du temps - Histogramme des valeurs pour 4 intensités

Pour une intensité faible, à 200 mV (figure 4(a)), l'indice de cavitation stable stagne à environ 45 dB puis une légère augmentation vers un niveau de 50 dB est visible à partir de 15 secondes de tir. A 400 mV (figure 4(b)), la cavitation est initiée dès le début du tir à un niveau de 80 dB, puis l'activité diminue progressivement vers un niveau centré sur 60 dB avec un comportement moins stable à la fin du tir. A 600 mV (fig. 4(c)), un plateau stable de la valeur de CS à environ 70 dB est visible pendant 15 secondes puis l'activité de cavitation stable descend brusquement à 50 dB avec une plus grande variabilité. Pour les trois premiers tirs, le niveau de cavitation inertielle reste centrée autour de 40

dB et ne varie pas au sein de chaque pulse. A 800 mV, ce qui correspond à une intensité importante, en figure 4(d), on observe d'une part un niveau de cavitation stable avec une grande variabilité par pulse et globalement centré autour de 75 dB, et d'autre part un bruit large bande se stabilisant à 50 dB après 10 secondes de tir avec peu de variation inter-pulse.

Ces 4 figures montrent 3 configurations : un niveau de sous-harmonique trop faible pour attester si la cavitation stable est présente ou non (en figure 4(a)), une cavitation stable initiée avec niveau de CS fort au début du tir puis qui diminue en fonction du temps (les figures 4(b) et 4(c)), et enfin une cavitation inertielle déclenchée pendant tout le tir avec un fort niveau de CS et de CI (en figure 4(d)).

3.2 Activité de cavitation stable dans un pulse

Il peut exister une variabilité importante de l'activité de cavitation stable avec le dispositif au sein d'un pulse de 50 ms. La figure 5 montre l'évolution en fonction du temps du CS d'une part, et du CS moyenné pulse à pulse d'autre part. Le graphe de droite montre l'histogramme de toutes les valeurs de CS et des valeurs de CS moyennées pour le tir de 500 mV avant amplification.

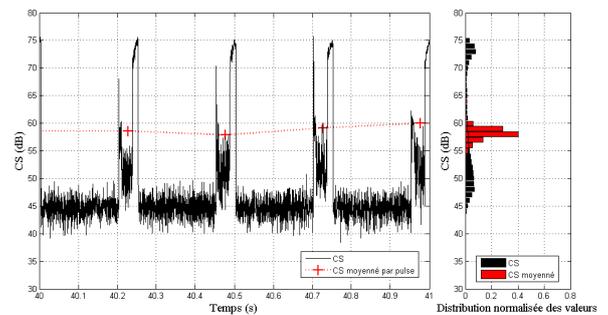


FIGURE 5 – Évolution des indicateurs CS instantané et CS moyenné par pulse en fonction du temps pour 4 salves ultrasonores - Histogramme des CS moyennés et non-moyennés

Le signal de CS présenté en figure 5 montre 4 salves de 50 ms espacées de 200 ms extraite du tir ultrasonore de 60 secondes. Les pulses ont un comportement similaire. Au début du pulse, le niveau de CS est fort et décroît vite. Ensuite, pendant plus de la moitié du temps de pulse, le CS oscille autour d'un niveau centré à 50 dB, puis, à la fin du pulse, il atteint un niveau centré sur 73 dB. L'histogramme confirme que pour tous les points relevés pendant le tir, le CS oscille entre deux groupes de valeurs, un centré sur 50 dB et un centré sur environ 73 dB. Il est important de rappeler qu'au vu de la vitesse de cadencement des acquisitions spectrales (environ toutes les 250 μ s), il est possible de sonder l'activité de cavitation stable environ 200 fois au sein d'un pulse de 50 ms de durée.

3.3 Distinction entre les deux régimes

La figure 6 représente la corrélation entre l'indicateur CS et l'indicateur CI et chaque point tracé sur le graphe correspond à un spectre mesuré. Deux histogrammes complètent la figure centrale en permettant de quantifier la répartition des valeurs des deux indicateurs. Les points représentés correspondent aux valeurs de CS et CI obtenues

durant les pulses et pour toute la gamme d'intensité ultrasonore étudiée : $U = [200 ; 400 ; 600 ; 800]$ mV.

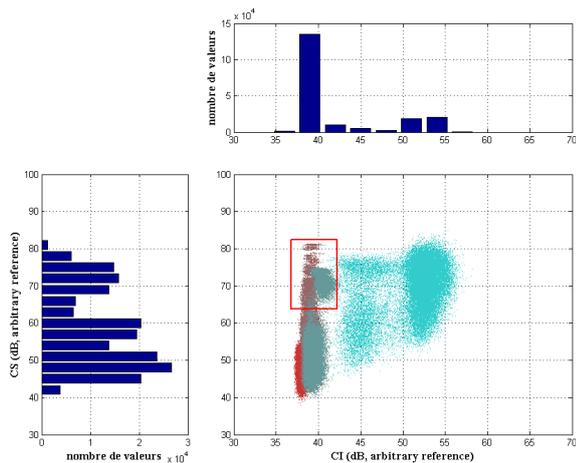


FIGURE 6 – Indicateur de cavitation stable en fonction de l'indicateur de cavitation inertielle - Histogrammes des indicateurs pour des tirs de [200, 400, 600 et 800] mV

L'objectif est d'identifier une zone de contrôle, pour laquelle la cavitation est purement stable. La figure permet d'identifier une zone pour laquelle le niveau de CS est fort (CS \sim 70/80 dB), de manière à être sûr de l'oscillation du nuage, et pour laquelle le niveau de CI est suffisamment faible (CI < 45) pour être sûr de l'absence de l'implosion des bulles. Les points compris dans cette zone correspondent à des tirs d'amplitude moyenne 400 mV et 600 mV.

4 Discussion

Premièrement, le suivi de la cavitation stable sur 60 secondes permet de confirmer un résultat connu : le phénomène de cavitation est instable au cours du temps et il est nécessaire de réguler le phénomène si l'on souhaite obtenir une émission constante de sous-harmonique au cours du temps. D'autre part, l'étude de l'instabilité de la cavitation stable au sein d'un même pulse montre que, dans notre configuration, c'est-à-dire avec des salves d'excitation de 50 ms, la régulation ne peut pas se faire de pulse à pulse mais doit s'effectuer avec un cadencement plus rapide.

Deux stratégies de régulation peuvent être envisagées. La première méthode consisterait à moduler l'amplitude de l'excitation ultrasonore à l'aide d'une boucle de rétroaction pour atteindre une valeur de consigne de CS. Cette méthode de régulation est simple à mettre en oeuvre mais ne prend pas en compte l'apparition du bruit large bande. Avec cette stratégie, la cavitation stable serait contrôlée quelle que soit l'activité de cavitation inertielle, donc avec de potentielles implosions de bulles pouvant mener à des dégâts cellulaires au cours du tir.

La deuxième méthode consiste à viser la zone de contrôle présentée en partie 3.3, de manière à maximiser l'activité de cavitation stable et minimiser l'activité de cavitation inertielle. Ce type de contrôle nécessiterait une boucle de rétroaction plus complexe, c'est-à-dire d'implémenter une régulation à deux paramètres. Cependant, avec cette méthode, le régime de cavitation stable pourrait être

discriminé du régime de cavitation inertielle, et on pourrait s'assurer de l'absence de l'implosion des bulles.

D'autre part, le suivi de l'activité de cavitation stable peut être aussi intéressant pour comprendre la dynamique d'un nuage de cavitation stable. Par exemple, certaines expériences de suivi ont montré que l'activité de cavitation stable disparaissait, progressivement ou non, en fonction du temps. Observer la dynamique spatio-temporelle d'un nuage de bulles est complexe : outre les aspects spatiaux, l'échelle caractéristique acoustique d'oscillation de bulles de rayon résonant $7 \mu\text{m}$ pour une excitation à la fréquence 426.5 kHz est de l'ordre de la μs . Ainsi, en relevant une information acoustique toutes les 125 périodes acoustiques environ, il est envisageable de mieux appréhender la dynamique du nuage par l'intermédiaire de l'évolution des indicateurs CS et CI. Alors que l'indicateur CI permet de relever des implosions de bulles et donc de quantifier la variation temporelle de leur nombre par processus de fragmentation [7], les variations d'activité du sous-harmonique peuvent traduire les variations d'amplitudes d'oscillation faiblement non-linéaires des bulles dans le nuage avec ou sans variation de leur nombre.

Le suivi effectué dans de l'eau non-dégazée et avec une population inconnue de bulles dans le milieu ne permet pas d'appréhender la dynamique du nuage et son évolution en fonction du temps. Cependant, si l'on maîtrisait la population de bulles dans le milieu, on pourrait distinguer les variations dues à la disparition des bulles de celles dues à l'oscillation stable du nuage. Ainsi, utiliser des bulles encapsulées (agents de contraste) dans de l'eau dégazée pourrait permettre de quantifier l'activité de cavitation stable avec une population de bulle connue et mesurable.

5 Conclusion

Le suivi temps-réel des deux signatures acoustiques de cavitation stable et inertielle a été implémenté dans un dispositif ultrasonore destiné à la sonoporation cellulaire. Le suivi à cadencement rapide ($250 \mu\text{s}$) a permis de mettre en évidence les importantes fluctuations d'activité de cavitation stable au sein d'un pulse ultrasonore et entre des pulses successifs. A l'échelle d'un tir ultrasonore long (60 s), il est ainsi montré que l'information intégrée sur la durée du tir ne permet pas de rendre compte de la disparité des activités de cavitation rencontrées. Pour assurer un régime de cavitation stable, le contrôle temps réel de l'activité de cavitation d'un nuage est nécessaire. Pour cela, une zone d'amplitude acoustique à viser a été identifiée.

Remerciements

Ce travail a été supporté par l'Agence Nationale de la Recherche ANR (projet "CARIBBOU", ANR-15-CE19-0003) et a été conduit dans le cadre du LabEx CeLyA ("Centre Lyonnais d'Acoustique", ANR-10-LABX-0060/ANR-11-IDEX-0007).

Références

- [1] Cyril Desjoux, Adrien Poizat, Bruno Gilles, Claude Insera, and Jean-Christophe Bera. Control of inertial

- acoustic cavitation in pulsed sonication using a real-time feedback loop system. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 134(2) :1640–1646, 2013.
- [2] Izella Saletes, Bruno Gilles, and Jean-Christophe Bera. Promoting inertial cavitation by nonlinear frequency mixing in a bifrequency focused ultrasound beam. *Ultrasonics*, 51(1) :94 – 101, 2011.
- [3] Pauline Muleki Seya, Manuela Fouqueray, Jacqueline Ngo, Adrien Poizat, Claude Inserra, and Jean-Christophe Bera. Sonoporation of adherent cells under regulated ultrasound cavitation conditions. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 41(4) :1008–1019, 2014.
- [4] Andrea Prosperetti. A general derivation of the subharmonic threshold for non-linear bubble oscillations. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 133(6) :3719–3726, 2013.
- [5] Amit Katiyar and Kausik Sarkar. Excitation threshold for subharmonic generation from contrast microbubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 130(5) :3137–3147, 2011.
- [6] Kyuichi Yasui, Toru Tuziuti, Judy Lee, Teruyuki Kozuka, Atsuya Towata, and Yasuo Iida. Numerical simulations of acoustic cavitation noise with the temporal fluctuation in the number of bubbles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(2) :460–472, February 2010.
- [7] Pauline Muleki Seya, Cyril Desjouy, Jean-Christophe Bera, and Claude Inserra. Hysteresis of inertial cavitation activity induced by fluctuating bubble size distribution. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27 :262 – 267, 2015.