

10ème Congrès Français d'Acoustique

Lyon, 12-16 Avril 2010

Caractérisation d'un processus de régulation de la cavitation acoustique

A.Sabraoui, C.Inserra, J.-C Bera, J.-L Mestas

INSERM, U556, Lyon F-69003, France; Université de Lyon 1, Lyon F-69003, France
abbas.sabraoui@inserm.fr

La cavitation acoustique apparaît comme un phénomène stochastique, un niveau d'insonification fixé ne donnant pas lieu à une activité de cavitation reproductible ni régulière. Lors d'une insonification, des collapsus inertiels de bulles peuvent apparaître de manière intermittente, se traduisant sur les spectres du signal de réception par un bruit de fond, qui est un bon indicateur de la cavitation inertielle. Basée sur cet indicateur, est proposée une méthode de contrôle dynamique du niveau de cavitation dans un milieu placé dans un champ ultrasonore stationnaire. Cette méthode consiste à maintenir un indice de cavitation CI, image de l'intensité de cavitation dans le milieu insonifié, au niveau de celui désiré, par une boucle de rétroaction modulant l'intensité ultrasonore dans la plage comprise entre 0.12 et 3.44 W/cm². Le dispositif expérimental est constitué d'un transducteur ultrasonore piézoélectrique plan (diamètre 20 mm, fréquence 445 KHz), et d'un hydrophone récepteur du signal acoustique diffusé par les bulles de cavitation. L'apport d'un tel processus de contrôle est évalué par l'émission acoustique de la cavitation induite dans le milieu irradié et par la production de radicaux hydroxyles issus de la sonolyse du milieu. Le système de régulation permet de reproduire des indices de cavitation avec une variabilité inférieure à 3 % dans la plage des puissances appliquées, alors que, sans le contrôle de l'activité de la cavitation, cette variabilité peut atteindre 40 % sur une certaine plage d'excitation ultrasonore. Ce générateur de cavitation régulé permet donc de reproduire précisément les niveaux de cavitation et cela indépendamment de faibles variations des conditions extérieures comme la température et la pression atmosphérique.

1 Introduction

La thérapie par ultrasons est l'objet d'un intérêt croissant, à la fois du point de vue des applications cliniques et de la recherche fondamentale. Les ultrasons sont à la base d'outils prometteurs pour les traitements non-invasifs tels que les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) [1, 2], la lithotritie par ondes de choc [3, 4] et le transfert de drogues et de gènes [5]. Dans ces applications, le phénomène de la cavitation peut jouer un rôle important, complémentaire aux effets thermiques, voire principal dans la sonoporation [6]. La cavitation est la formation spontanée et excitation de bulles de gaz de quelques micromètres dans un milieu, soumis à une onde acoustique. Les microbulles peuvent présenter deux types de cavitation [7]. En cavitation dite stable, les bulles peuvent osciller de manière non-linéaire autour de leur rayon d'équilibre pendant plusieurs cycles de l'onde acoustique. Ces oscillations sont caractérisées par l'émission des sous-harmoniques de la fréquence fondamentale d'excitation. Par opposition, la cavitation est dite inertielle lorsque les bulles croissent rapidement (jusqu'à plusieurs fois leur rayon d'équilibre) puis implosent violemment, et ceci parfois en moins d'une période acoustique. Dans ce dernier régime, des effets mécaniques et thermodynamiques induits par l'implosion des bulles (onde de choc [8], microstreaming [9], microjet [10]), sont aussi à l'origine de la production de lumière (sonoluminescence) [11], de la sonolyse de l'eau [12,13]. Une des conséquences de l'implosion de bulles est l'émission acoustique d'un bruit large bande [14], qui peut être utilisée pour détecter et suivre les événements de la cavitation inertielle. Dans les applications thérapeutiques, comme la délivrance ciblée de médicaments, les

mécanismes de sonoporation cellulaire sont encore mal définis. Cependant tous les auteurs s'accordent à dire que la cavitation inertielle est l'élément clé à l'origine de ces effets [15, 16, 17]. Généralement, l'intensité acoustique appliquée est utilisée comme critère de sonoporation cellulaire. Cependant, à cause du caractère instationnaire de l'initiation et du maintien de la cavitation [18], le contrôle de ce paramètre en s'appuyant sur un critère de niveau de cavitation peut être d'un plus grand intérêt en ce qui concerne la reproductibilité, la répétabilité et la stabilité de l'activité de cavitation dans le temps. Des travaux antérieurs ont montré que la transfection et la cytotoxicité sont fortement corrélées avec un indicateur du niveau de cavitation basé sur le bruit large bande [19]. Le système de régulation proposé s'appuie sur cet indicateur et assure le maintien du niveau de cavitation par l'ajustement temps réel de la puissance d'excitation du transducteur.

Cette étude propose d'évaluer l'impact du processus de régulation avec le même système ultrasonore par une comparaison de l'activité de cavitation selon les deux modes de contrôle, par l'intensité appliquée et par le niveau de cavitation. Pour compléter cette comparaison, les effets de sonolyse sont évalués selon les mêmes critères.

2 Matériels et méthodes

Un transducteur piézo-électrique plan (fréquence : 445 kHz ; diamètre : 20 mm) est immergé dans un bain d'eau dégazé (cuve de 20 litres; concentration d'oxygène dans l'eau $\approx$ 3 mg/L; température ambiante comprise entre 18 et 25°C). Le transducteur est positionné tel que son axe acoustique soit vertical (**fig.1**) avec une hauteur d'eau de

14 mm au dessus de sa surface.

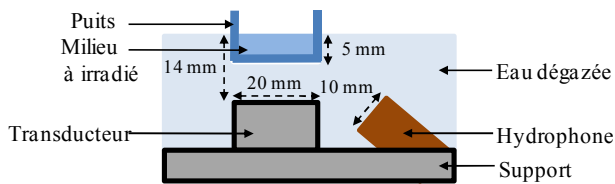


Figure 1 : Schéma du dispositif expérimental.

Le transducteur, adapté électriquement à 50 Ω est excité par un signal sinusoïdal continu issu d'un générateur de fonction (HP33120 Agilent), amplifié successivement par 2 amplificateurs, l'un à gain variable (-10 à 30 dB ; AD603, Analog Device) et l'autre de puissance (50 dB ,200 W ; Adece). Les puissances électriques appliquées sont comprises entre -12 et 3 dBm et ces limites correspondent à des intensités acoustiques (I_a) respectives de 0,12 et 3,44 W/cm². Les pressions acoustiques associées sont 0,01 et 0,63 MPa. Les milieux à exposer sont placés dans des puits d'une plaque de culture en polystyrène (12 puits BD sciences ; diamètre : 20 mm). Chaque puits est disposé au dessus du transducteur dans son champ proche (**fig. 1**). Sa position verticale est positionnée précisément tel que la surface de liquide soit sur un nœud du champ d'onde stationnaire créée dans le milieu irradié [20].

Latéralement au transducteur est fixé un hydrophone (bande passante : 10 MHz). Il permet l'écoute du bruit de cavitation dans le milieu exposé. Le signal de réception est amplifié (20 dB, NF Electronic Instruments® BX31), numérisé (carte d'acquisition PXI-5620, résolution 14 bits, fréquence d'échantillonnage 64 MHz, National Instruments®), transféré sur le ordinateur (PC + Labview®), puis traité. Ce traitement consiste, dans un premier temps, à déterminer le spectre instantané dans la bande de 0,1 à 7.1 MHz, puis de caractériser le niveau moyen correspondant à un indice de cavitation CI_{NR}^i instantané (indice i) et non référencé (indice NR), calculé comme la moyenne arithmétique de l'ensemble des amplitudes fréquentielles en dB (**448 points ; fig. 2**). L'indice de cavitation instantané CI^i est déterminé par la relation $CI^i = CI_{NR}^i - CI_R$ dans laquelle CI_R est défini comme suit : avant chaque expérimentation, un indice CI_R de référence est obtenu par une procédure d'étalonnage du dispositif de traitement correspond à la valeur moyenne de 1000 CI_R^i instantanés obtenus lorsque le signal d'excitation est inhibé.

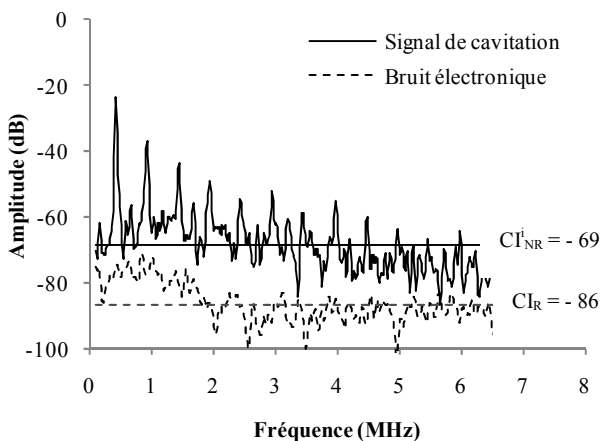


Figure 2 : Un exemple de spectre de réception est présenté ($I_a = 1,5 \text{ W/cm}^2$) avec son indice de cavitation associé $CI^i = CI_{NR}^i - CI_R = 17$.

Le même ordinateur permet le contrôle du dispositif en fixant le gain de l'amplificateur à gain variable (AGV) à la valeur désirée dans le cas de la boucle ouverte (BO) et en modulant le gain pour la boucle fermée (BF) avec un cadencement de 5 ms. Ainsi le programme prend deux aspects (**fig.3**) correspondant au mode de fonctionnement choisi.

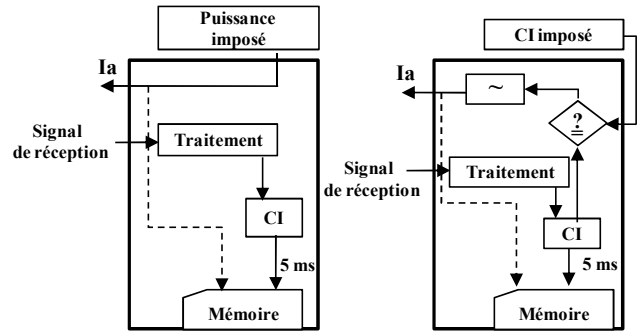


Figure 3 : Schéma simplifié du fonctionnement en boucle ouverte et en boucle fermée (cadencement de boucle de 5 ms)

Dans le cas de la boucle ouverte, les CI^i sont directement mémorisés au cours du temps pour un gain de l'AGV constant fixant ainsi l'intensité acoustique I_a appliquée. En boucle fermée, à chaque cadencement, les CI^i sont systématiquement comparés à la consigne CI et le gain de l'AGV est corrigé en fonction de différence entre ces deux valeurs pour assurer un niveau de cavitation stable.

Caractérisation chimique

Le processus de cavitation inertielle, source de la sonolyse du milieu, peut être évalué par le dosage des radicaux hydroxyles. En effet, la sonolyse de l'eau conduit à la formation des radicaux libres suivant l'équation :



Diverses techniques sont utilisées pour détecter la production de $\text{OH}\bullet$, telles que l'iodométrie [21], le dosimètre de Fricke [22] et l'acide téréphtalique (TA) [23]. Le dosage de $\text{OH}\bullet$ par l'acide téréphtalique présente une meilleure sensibilité [24] en raison de sa réaction très rapide avec les $\text{OH}\bullet$ pour générer de l'acide hydroxytéréphtalique (HTA). Le HTA a la particularité d'être fluorescent (longueur d'onde d'émission : 424 nm) lorsqu'il est excité par une source de lumière de longueur d'onde 314 nm. Le taux de fluorescence relevé reflète le taux de $\text{OH}\bullet$ produits et de ce fait permet d'évaluer le niveau de cavitation appliqué dans les milieux pour une durée d'irradiation donnée [23].

Pour ce faire, les échantillons de 2 ml à irradier sont composés de solution de 2mM de TA provenant d'une solution mère de 20 mM (PH=7.3 Radiomètre Copenhague _ 210 PHM standard pH-mètre ; Conservation à 4 °C à l'abri de la lumière). Pour déterminer la concentration de HTA dans les milieux irradiés, les mesures de fluorescence sont réalisées par un spectrofluorimètre (SFM 25 ; Kontron ; Tension : 500 Volts, plage de mesure : de 2 à 200 %, Taux de fluorescence de 1 μM de HTA : 37 %).

3 Résultats

La caractérisation d'un processus de régulation de la cavitation est évaluée sur le même dispositif ultrasonore, d'une part, par la mesure de signaux acoustiques produits par l'activité de la cavitation dans le milieu irradié et, d'autre part, par le dosage de $\text{OH}\bullet$ dans 2 ml d'acide téréphthalique.

3.1 Mesures acoustiques

Quatre séries de mesures indépendantes ont été réalisées en boucle ouverte et en boucle fermée, attachées à des conditions expérimentales changeantes (température ambiante et pression atmosphérique). Chaque série est composée de deux irradiations d'une minute par condition d'irradiation au nombre de 8 en boucle ouverte et 9 en boucle fermée. L'ensemble de ces données vont permettre d'évaluer la reproductibilité de l'irradiation, sa stabilité dans le temps et sa répétabilité selon les conditions extérieures.

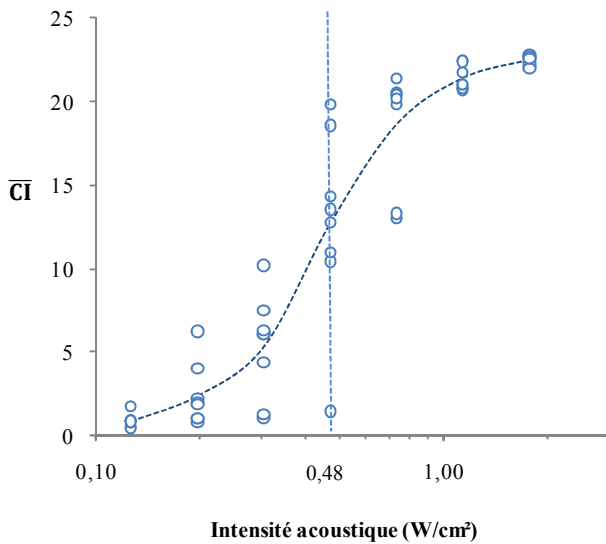


Figure 4 : Système en boucle ouverte : évolution des $\overline{CI}$ en fonction de I_a . En pointillé, la ligne moyenne des mesures effectuées pour chaque intensité.

En boucle ouverte (**fig.4**), $\overline{CI}$ croît de manière monotone en fonction de l'intensité. Trois zones se distinguent :

- Pour les faibles intensités [$\leq 0,12 \text{ W}/\text{cm}^2$], les $\overline{CI}$ restent faibles et concentrés ($\overline{CI} \approx 2$).
- pour les intensités comprises entre 0,2 et $1,2 \text{ W}/\text{cm}^2$, les valeurs de $\overline{CI}$ sont très dispersées avec un écart maximal relevé pour l'intensité $I_a = 0,48 \text{ W}/\text{cm}^2$ ($\overline{CI}$ varie entre 2 et 20).
- Enfin pour les intensités supérieures à $1,2 \text{ W}/\text{cm}^2$, les $\overline{CI}$ convergent vers une valeur limite de 22.

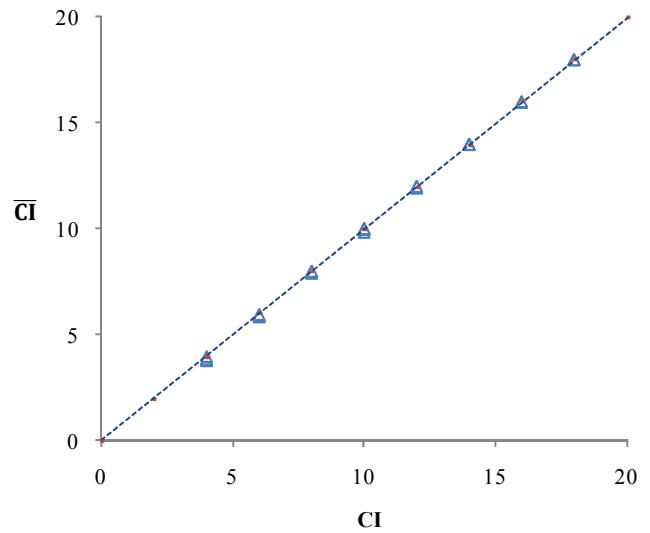


Figure 5 : Système en boucle fermée : Evolution des $\overline{CI}$ en fonction des CI imposés. En pointillé, la fonction linéaire $\overline{CI} = CI$

En boucle fermée (**fig5**), $\overline{CI}$ (calculé sur 8 mesures) présente une égalité quasi-parfaite avec le CI imposé. Un écart maximal de 0,2 est relevé pour $CI = 4$.

3.2 Dosage des radicaux hydroxyles

Trois séries de mesures indépendantes ont été réalisées en boucle ouverte et en boucle fermée. Chaque série est composée d'une irradiation d'une minute de 2 ml de 2 mM de TA. Les figures 6 et 7 représentent le taux de fluorescence de HTA produite, en fonction de l'intensité en BO et du CI en BF, respectivement.

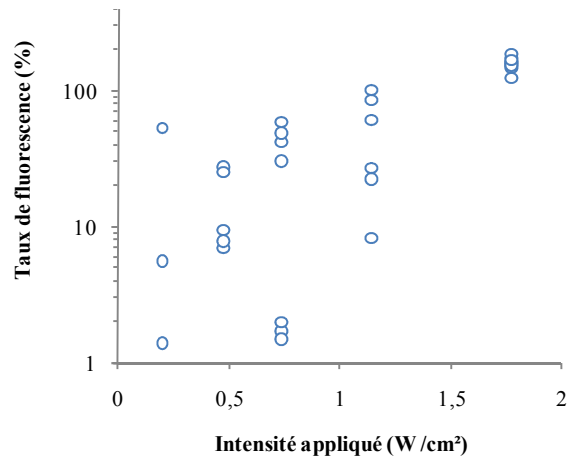


Figure 6 : Variation du taux de fluorescence de HTA en fonction de I_a pour le système en boucle ouverte.

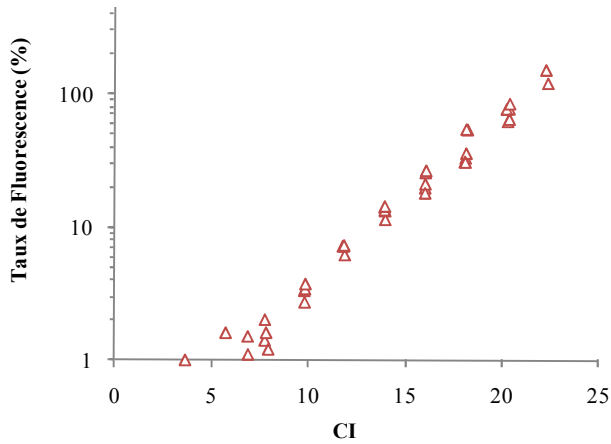


Figure 7: Variation du taux de fluorescence de HTA en fonction du CI imposé pour le système en boucle fermée.

En boucle ouverte (BO) (**fig.6**), l'évolution de la concentration de HTA présente deux zones :

- pour les intensités inférieures à $1,2 \text{ W/cm}^2$, une forte dispersion des valeurs est observée, (le taux de fluorescence varie entre 2 et 100). Notons entre autre qu'un même niveau de fluorescence peut être obtenue pour des intensités éloignées (par exemple un taux de 50 % pour $I_a=0,2 \text{ W/cm}^2$ et $I_a=0,72 \text{ W/cm}^2$) ou des écarts extrêmes de fluorescence pour une même intensité ultrasonore (par exemple : $I_a=0,72 \text{ W/cm}^2$, le taux de fluorescence varie entre 2% et 60%).
- Pour les intensités supérieures à $1,2 \text{ W/cm}^2$ les valeurs convergent vers un niveau moyen de 180 %.

En boucle fermée (**fig.7**), les taux de fluorescence sont globalement reproductibles pour un même CI. Très faibles pour les CI inférieures à 10, elles croissent selon une loi de type exponentielle, jusqu'à 180 % pour une consigne de CI = 22. Une très forte corrélation est observée entre le taux de fluorescence et le CI (coefficient de détermination $r^2 = 0,97$).

4 Discussion

L'indice de cavitation proposé, CI, permet de mieux prendre en compte le bruit large bande associé à la cavitation inertielle au profit des raies fréquentielles associées à la fréquence de la source ultrasonore.

En boucle ouverte, pour les faibles intensités ($\leq 0,12 \text{ W/cm}^2$), les $\overline{\text{CI}}$ restent faibles et concentrés ($\overline{\text{CI}} \approx 2$) (**fig4**) ; Le spectre du signal de cavitation ne laisse apparaître dans ces conditions que la raie à $f_0 = 445 \text{ kHz}$. D'autre part, (**fig. 6**), le taux de fluorescence reste en dessous du seuil de sensibilité de spectrofluorimètre et ne permet pas de détecter la moindre production de $\text{OH}\cdot$. L'intensité appliquée n'est donc pas suffisante pour initier et entretenir le phénomène de cavitation.

Pour les intensités comprises entre $0,2$ et $1,2 \text{ W/cm}^2$, les valeurs de $\overline{\text{CI}}$ sont dispersées et varient entre 2 et 20 ; l'analyse spectrale des signaux de cavitation a montré que les amplitudes des harmoniques et sous-harmoniques et plus globalement le bruit large bande varient énormément d'une mesure à l'autre. Rappelons que les faibles intensités ne suffisent pas à assurer une initiation systématique du phénomène de cavitation. Plusieurs paramètres tels que la

température, la densité du milieu, la viscosité, la pression atmosphérique, le taux de gaz dissout dans le milieu et la tension de surface, influent largement sur la dynamique des bulles et sur les types de cavitation produite. Les résultats présentés dans cette étude sont issus d'expériences réalisées à densité, viscosité et tension de surface fixes. Les autres paramètres sont non contrôlables et peuvent expliquer la dispersion des valeurs de $\overline{\text{CI}}$ obtenues. De plus, la variabilité de $\overline{\text{CI}}$ dans cette gamme d'intensité est importante et peut atteindre des valeurs de 5 à 6. Cette grande dispersion se retrouve sur les taux de fluorescence mesurés. Par exemple une même intensité appliquée de $0,8 \text{ W/cm}^2$ peut induire un taux fluorescence soit de 2 %, soit de 60 %. Un même taux de fluorescence peut aussi être obtenu pour des intensités très éloignées (par exemple, un taux de fluorescence de 55 % est obtenu pour $I_a = 0,2 \text{ W/cm}^2$ et $I_a = 0,8 \text{ W/cm}^2$). Dans cette gamme d'intensité ($0,2$ à $1,2 \text{ W/cm}^2$), la cavitation exhibe un caractère aléatoire de son initiation et de son entretien.

Enfin, pour les intensités supérieures à $1,2 \text{ W/cm}^2$, les $\overline{\text{CI}}$ paraissent reproductibles, et convergent vers $\overline{\text{CI}}=22$. L'analyse spectrale montre une augmentation du niveau des harmoniques et sous-harmoniques et surtout du niveau de bruit large bande : la cavitation inertielle est alors prépondérante. Ceci est confirmé par la faible variabilité des $\overline{\text{CI}}$ ($< 1,3$). De même, les taux de fluorescence sont relativement élevés et concentrés autour d'une valeur moyenne de 180%.

Au vu de l'ensemble des résultats en boucle ouverte, l'intensité acoustique n'est pas un critère satisfaisant du contrôle, de l'initiation, et de l'entretien du phénomène de cavitation.

En boucle fermée, la régulation permet d'appliquer des CI compris entre 4 et 20 qui coïncident parfaitement avec les $\overline{\text{CI}}$ correspondants. (**fig.5 et 7**).

Pour les faibles CI (généralement liés aux faibles intensités), la cavitation stable paraît prépondérante dans le milieu, et, comme son initiation est fortement aléatoire, le système de régulation applique une intensité acoustique suffisante pour initier le phénomène. Une fois le niveau de cavitation atteint, il s'ensuit une diminution de l'intensité acoustique appliquée pour « calquer » le niveau de cavitation requis. En régime permanent, l'analyse spectrale du signal de cavitation a montré que le niveau de bruit large bande est quasiment nul. Dans ces conditions d'irradiation, le taux de fluorescence de HTA produit (**fig.7**) est indétectable par le dispositif de mesure. Dans cette gamme, la cavitation inertielle dans le milieu peut être considéré comme inopérante, voire inexistante.

Pour les CI supérieures à 10, les mesures sont toujours reproductibles (**fig.5**). L'analyse spectrale du signal de cavitation a montré que le niveau de bruit large bande augmente en fonction du CI imposé, comme le taux de fluorescence relevé. La cavitation inertielle est donc prépondérante dans le milieu. Ces premiers résultats confirment l'indice de cavitation CI comme critère de contrôle du niveau de cavitation. Le taux de fluorescence évolue de manière exponentielle en fonction du CI avec un coefficient de détermination de $r^2 = 0,97$. Cette très forte corrélation assure la fiabilité de CI comme un critère de contrôle du niveau de cavitation. Ainsi, le système de régulation, qui s'appuie sur ce critère, permet une répétabilité et une reproductibilité des effets induits et sa

fiabilité laisse espérer son implication dans des applications biologiques comme moyen de sonoporation cellulaire.

4 Conclusion

Un système de régulation de cavitation ultrasonore basé sur un indice acoustique de cavitation a été mis en œuvre. Les avantages d'un tel système sont : un suivi en temps réel du niveau de cavitation durant l'irradiation, des informations quasi-instantanées sur les composantes spectrales caractéristiques de la cavitation, une meilleure reproductibilité et stabilité du niveau de cavitation surtout pour les intensités acoustiques inférieures à 1 W/cm². Ce système apparaît donc comme un outil très intéressant pour des expérimentations de transfection où le niveau de cavitation est déterminant pour avoir un meilleur contrôle des effets induits (mortalité et taux de transfection). Lors de nos essais préliminaires sur cellules vivantes, une bonne corrélation entre les CI et la mortalité cellulaire a été obtenue [25].

Remerciements

Le financement du dispositif a été supporté par l'Association Française de Myopathie AFM (contrat # 9594) et les essais expérimentaux ont été subventionnés par l'Agence Nationale de Recherche (ANR06-BLAN0405). Les auteurs remercient J.P. Steghens et ses collaborateurs du laboratoire de biochimie de L'hôpital Edouard Herriot de Lyon et J.-M. Lancelin et ses collaborateurs du laboratoire de RMNBio de l'université Lyon1 pour leurs soutiens et aides techniques.

Références

- [1] Miller DL., Song J., "Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound in vivo", *Ultrasound Med. Biol.*, 29(6):887-93 (2003).
- [2] Gelet A., Chapelon JY., Bouvier R., Rouvière O., Lyonnet D., Dubernard JM., "Transrectal high intensity focused ultrasound for the treatment of localized prostate cancer: factors influencing the outcome", *European Urology*, 40(2):124-9 (2001).
- [3] Ponchon T., Martin X., Mestas JL., Cathignol D., Lambert R., "Extracorporeal lithotripsy of gallstones", *Lancet*, 22;2(8556):448 (1987).
- [4] Ponchon T., Martin X., Barkun A., Mestas JL., Chavaillon A., Boustière C., "Extracorporeal lithotripsy of bile duct stones using ultrasonography for stone localization", *J. Urol. (Paris)*, 91(5):247-50 (1985).
- [5] Pitt WG., Hussein GA., Staples BJ., "Ultrasonic drug delivery--a general review", *Expert Opin. Drug Deliv*, 1(1):37-56 (2004).
- [6] Bailey M.R., Khokholova V.A., Sapozhnikov O.A., Kargl S.G., Crum L.A., "Physical mechanisms of the therapeutic effect of ultrasound", *Acoustical Physics*, 49(4):369-388 (2003).
- [7] Leighton T.G., *The Acoustic Bubble*, Academic Press, London, UK, 1994.
- [8] Tu J., Matula T.J., Bailey M.R., Crum L.A., "Evaluation of a shock wave induced cavitation activity both in vitro and in vivo", *Phys. Med. Biol.*, 52(19):5933-44 (2007).
- [9] Collis J., Manasseh R., Liovic P., Tho P., Ooi A., Petkovic K., Zhu. Y., "Cavitation microstreaming and stress fields created by microbubbles", *Ultrasonics*, 50(2):273-9 (2010).
- [10] Brujan E.A., "The role of cavitation microjets in the therapeutic applications of ultrasound", *Ultrasound Med. Biol.*, 30(3):381-7 (2004).
- [11] Suslick K.S., Doktycz S.J., Flint E.B., "On the origin of sonoluminescence and sonochemistry", *Ultrasonics*, 28(5):280-90 (1990).
- [12] Riesz P., Berdahl D., Christman C.L., "Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions", *Environ. Health Perspect.*, 64:233-52 (1985).
- [13] Gertraud M., Armin T., Rü L., Schuchmann H.P., Schulz D., Mues A., Sonntag C., "OH-radical formation by ultrasound in aqueous solution – Part II: Terephthalate and Fricke dosimetry and the influence of various conditions on the sonolytic yield", *Ultrasonics Sonochemistry*, 5: 41–52(1998).
- [14] Frohly J., Labouret S., Bruneel C., Looten-Baquet I I, Torguet R., "Ultrasonic cavitation monitoring by acoustic noise power measurement", *J. Acoust. Soc. Am.*, 108(5 Pt 1):2012-20 (2000).
- [15] El Maalouf J., Béra JC., Alberti L., Cathignol D., Mestas J.-L., "In vitro sonodynamic cytotoxicity in regulated cavitation conditions", *Ultrasonics*, 49(2):238-43 (2009).
- [16] Reslan L., Mestas J.-L., Herveau S., Béra JC., Dumontet C., "Transfection of cells in suspension by ultrasound cavitation ", *J. Control Release* ;142(2):251-258. (2010).
- [17] Hallow DM., Mahajan AD., McCutchen TE., Prausnitz MR., "Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects", *Ultrasound Med. Biol.*, 32(7):1111-22 (2006).
- [18] Young F. R., *Cavitation*, Imperial College Press, London, UK, (1999).
- [19] Mestas J.-L., Alberti L., Chesnais S., Lafon C., Blay J.-Y., Cathignol D., "Initiate and Maintain Cavitation by Combining High Amplitude Bursts and Continuous Ultrasound Exposure in Culture Medium", *Proceeding ISTU5 Boston* (2005)
- [20] Mestas J.-L., Cathignol D., "Capteur de pression pour le contrôle de générateurs d'ondes de choc électrohydraulique", *Colloque de physique*, 51(2):1287–1290, (1990).
- [21] Kratochvíl B., Mornstein V., "Use of chemical dosimetry for comparison of ultrasound and ionizing radiation effects on cavitation", *Physiol. Res.*, 56 Suppl 1:S77-84 (2007).
- [22] Gareth J.P., Emma J.L., "The use of dosimeter to measure radical production", *Ultrasonics*, vol 31 No

6 (1993).

- [23] Villeneuve L., Alberti L., Steghens J.P., Lancelin JM., Mestas J.-L., "Assay of hydroxyl radicals generated by focused ultrasound", *Ultrasonics Sonochem.*, 16(3):339-44 (2009).
- [24] Lida Y., Yasui K., Tuziuti T., Sivakumar M., "Sonochemistry and its dosimetry", *Microchemical Journal* 80(2):159-164 (2005).
- [25] Mestas J.-L., El-Maalouf J., Reslan L., Inserra C., Gilles B., Bera J.-C., "Générateur de cavitation reproductible : exemples d'application biologique in-vitro", *Proceeding CFA* (2010).