

IMAGERIE LIBS : AUX PORTES DE LA CLINIQUE

Vincent MOTTO-ROS^{1,*}, Marine LEPRINCE^{1,2}, Ludovic DUPONCHEL³, Lucie SANCEY²,
Vincent BONNETERRE⁴, Christophe DUJARDIN¹, Frédéric PELASCINI⁵, Benoit BUSSER^{2,4}

¹ Institut Lumière Matière, UMR 5306, Univ. Lyon 1, CNRS, 69622 Villeurbanne, France

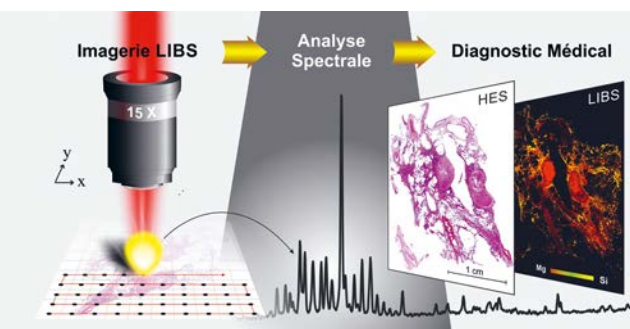
² Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209, CNRS, UMR 5309, 38700 Grenoble, France

³ † Univ. Lille, CNRS, UMR 8516 – LASIR – Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman, 59000 Lille, France

⁴ Grenoble Alpes University Hospital, 38700, Grenoble, France

⁵ Cetim Grand Est, 67402 Illkirch-Graffenstaden, France

*vincent.motto-ros@univ-lyon1.fr



L'étude de la dérégulation des métaux au sein des tissus biologiques intéresse de plus en plus le monde médical car une répartition anormale des métaux est une information importante qui peut contribuer au diagnostic clinique, et orienter le choix du traitement pour de nombreuses pathologies. En tant que méthode d'analyse élémentaire « tout optique », l'imagerie LIBS (laser-induced breakdown spectroscopy) est un candidat idéal pour étudier la composition élémentaire des tissus humains.

<https://doi.org/10.1051/photon/202010334>

Article publié en accès libre sous les conditions définies par la licence Creative Commons Attribution License CC-BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), qui autorise sans restrictions l'utilisation, la diffusion, et la reproduction sur quelque support que ce soit, sous réserve de citation correcte de la publication originale.

Depuis quelques années, l'application de la LIBS à l'imagerie élémentaire connaît un essor grandissant. L'amélioration récente de ses performances rend cette technologie de plus en plus attractive pour un grand nombre de champs applicatifs, couvrant les domaines de l'analyse des matériaux géologiques, de l'industrie au biomédical [1]. Ce type d'analyse résolue spatialement n'est pourtant pas nouveau. Les travaux ayant montré les premières cartographies élémentaires ont été publiés dans les années 1990. En France, l'imagerie LIBS a été portée au début des années 2000 par le groupe de Patrick Mauchien du CEA,

en démontrant notamment la possibilité d'atteindre une résolution à l'échelle du micromètre pour l'analyse de matériaux nucléaires. Au début des années 2010, la mise sur le marché de nouveaux détecteurs intensifiés, plus rapides et plus sensibles, a fortement contribué aux avancées récentes de cette approche, lui ouvrant le champ très convoité des applications biomédicales [2].

Cette technologie d'imagerie permet d'atteindre des résolutions micrométriques avec des sensibilités de l'ordre du ppm (partie par million). Elle offre par ailleurs des caractéristiques uniques. Contrairement aux méthodes plus conventionnelles telles que la spectrométrie de

fluorescence X en synchrotron (micro-XRF), la microsonde de Castaing ou l'ablation laser couplée à la spectrométrie de masse (LA-ICP-MS), une approche « toute optique » est directement compatible avec la microscopie optique et donc avec les méthodes d'observation traditionnelles des tissus biologiques. Elle fonctionne par ailleurs en conditions ambiantes, n'a aucune difficulté à détecter des éléments légers et présente une mise en œuvre beaucoup plus simple que toutes les autres approches d'analyses élémentaires. Dans cet article, nous proposons un état des lieux de nos travaux dédiés aux développements instrumentaux de l'imagerie LIBS et à l'analyse d'échantillons médicaux.

PRINCIPE ET INSTRUMENTATION

Le système d'imagerie LIBS que nous avons développé repose sur un montage de type microscope (cf. Fig. 1). Cet appareil comprend une ligne d'injection laser, différentes caméras de contrôle (surface de l'échantillon, plasma) et éclairages (lumière blanche, pointeur laser), une voie d'imagerie champ large permettant une visualisation optique haute définition, ainsi que plusieurs lignes de collections optiques connectées à des spectromètres par l'intermédiaire de fibres optiques [3]. Le laser utilisé est un laser Nd:YAG nanoseconde fonctionnant dans la longueur d'onde fondamentale (1064 nm) avec une fréquence de 100 Hz (Centurion, Lumibird). L'énergie utilisée par impulsion est typiquement de l'ordre de 1 mJ. Le système est équipé de plusieurs spectromètres Czerny-Turner couplés à des caméras ICCD (Istar, technologie Andor) ainsi que des spectromètres compacts (HR2000+, Ocean Insight), qui peuvent être utilisés simultanément. Le faisceau laser est focalisé à l'aide d'un objectif réflectif de grossissement $\times 15$. Pour toutes les expériences d'imagerie, le plasma induit par laser est généré en continu tout en balayant la surface de l'échantillon. Le balayage est effectué ligne par ligne en utilisant une platine motorisée. La cadence d'acquisition est ainsi équivalente

à la fréquence du laser (*i.e.* 100 Hz) et une image de 1 mégapixel peut être obtenue en moins de 3 heures [4]. Les analyses sont réalisées à température et pression ambiantes dans l'air ou dans une atmosphère d'argon. Enfin, l'ensemble de l'instrument est contrôlé par un logiciel développé par notre laboratoire, permettant de réaliser des séquences de balayage automatique avec un asservissement de la focalisation du faisceau.

RÉSOLUTION ET SENSIBILITÉ

En imagerie LIBS, les performances accessibles (*i.e.* résolution spatiale et limites de détection) sont fortement liées aux processus d'ablation laser. Pour assurer la meilleure répétabilité possible, il est important d'éviter tout recouvrement entre tirs lasers consécutifs. La limite de résolution est *i.e.* ainsi régie par les dommages induits par le laser (*i.e.* taille du cratère), tandis que les limites de détection (LDD) dépendent à la fois de la masse de matière vaporisée (*i.e.* volume du cratère) et de la capacité d'excitation de l'impulsion laser. Il y a donc un compromis à faire entre ces deux paramètres. Afin de donner la priorité à la sensibilité, nous travaillons préférentiellement avec des tailles de cratère de l'ordre de ●●●

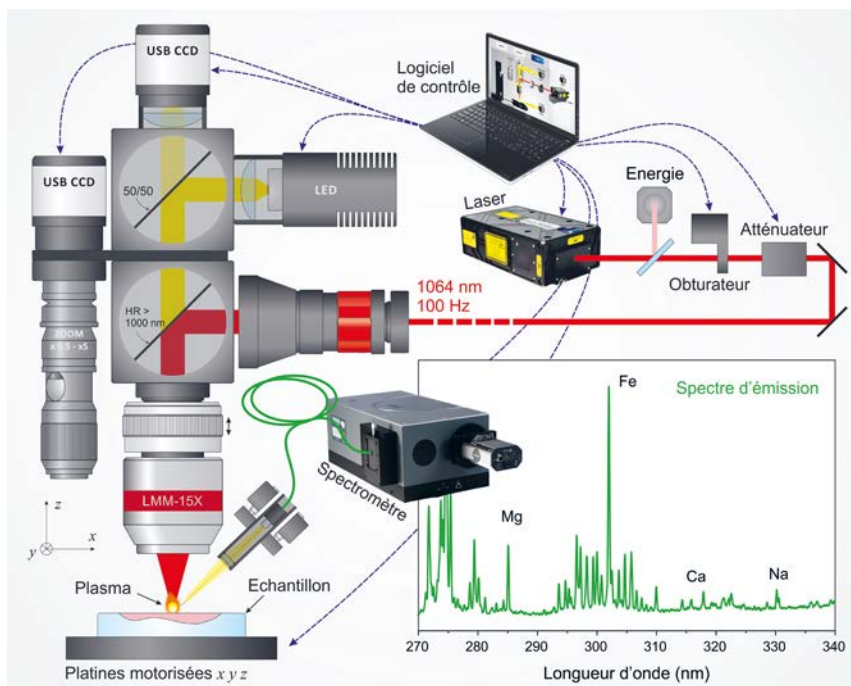


Figure 1. Vue schématique du montage d'imagerie LIBS.

DES LASERS NANOSECONDES POUR TOUTES VOS APPLICATIONS LIBS !

Une large gamme de lasers YAG pulsés, du mJ au J, pompés par diodes ou pompés par lampes

Plusieurs longueurs d'onde pour s'adapter à tous les matériaux	1064 nm
	532 nm
	355 nm
	266 nm
	1.57 μm



Compacité, robustesse et refroidissement par air pour l'intégration dans les instruments LIBS



Une forte densité de puissance crête pour faciliter la création du plasma



Des cadences du Hz à la centaine de Hz pour optimiser la vitesse d'acquisition

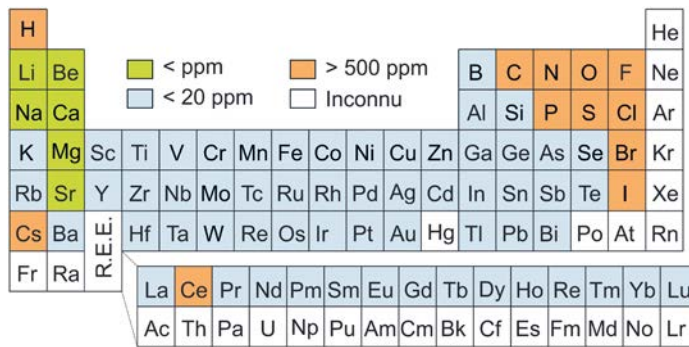
Et des diodes laser, qualifiées spatiales, pour l'intégration dans vos propres sources



VOUS AVEZ UN PROJET LIBS ? CONTACTEZ-NOUS !

www.lumibird.com
LE SPÉCIALISTE
DES TECHNOLOGIES LASER

Figure 2. Valeurs estimées des limites de détection (LDD) relatives exprimées en ppm et obtenues en configuration mono-tir.



10 μm . Il est important de mentionner que l'ablation laser s'accompagne de différents mécanismes, tels que la formation d'ondes de choc et la diffusion thermique, qui peuvent entraîner une détérioration de l'échantillon encore plus importante que l'ablation elle-même. Ces effets sont d'ailleurs plus importants sur des matériaux mous tels que les échantillons médicaux, généralement inclus en paraffine. Dans ce sens, la résolution ultime d'analyse pour de tels échantillons se situe plutôt autour de 20 μm . La figure 2 montre la plage accessible typique des LDD obtenues dans ces conditions. Comme on peut le voir, les LDD inférieures à 1 ppm sont généralement atteintes pour les métaux alcalins et les alcalino-terreux. La sensibilité reste intéressante pour les autres métaux, avec des LDD supérieures à 20 ppm, mais se dégrade fortement pour les éléments organiques et les halogènes. Ces LDD

relatives sont obtenues en configuration mono-tir et à partir d'une masse ablatée de l'ordre de la fraction de nanogramme. Exprimées en limites de détection absolues, des valeurs généralement inférieures au femto-gramme peuvent être ainsi atteintes.

APPLICATIONS BIOMÉDICALES

Nos premiers travaux sur les tissus biologiques ont été réalisés dans le but de visualiser la distribution tissulaire de nanoparticules préalablement administrées à des animaux [3]. Ces travaux ont été décrits dans plusieurs articles concernant des études précliniques (Fig. 3(a,b)), où l'imagerie LIBS a été utilisée en complément de techniques plus conventionnelles telles que la TEM (microscopie électronique à transmission) ou la microscopie de fluorescence [5] pour la possibilité d'observation des éléments à l'échelle de l'organe entier. Plus récemment, nous avons commencé à explorer le

potentiel de cette approche pour répondre à un besoin médical [6]. En clinique, la possibilité de coupler l'imagerie élémentaire à l'imagerie tissulaire conventionnelle pourrait révolutionner l'approche diagnostique. En effet, par manque d'outils, les anatomo-pathologistes ne recherchent généralement pas la présence de métaux dans les biopsies tissulaires des patients. Un cas d'école, illustré sur la figure 3a, montre la présence anormale d'aluminium dans un granulome cutané survenu au site d'injection, chez un jeune patient après une vaccination. D'autres exemples montrant la distribution hétérogène d'éléments endogènes pour différents types de tumeurs cutanées sont illustrés par la figure 3d.

Dans un dernier exemple illustré par la figure 4, nous montrons la possibilité offerte par l'imagerie LIBS de caractériser la composition élémentaire de tissus pulmonaires de patients exposés à différentes poussières métalliques et/ou minérales. De plus, cette analyse a permis de reclasser une maladie pulmonaire idiopathique en une maladie d'origine professionnelle, attribuée à une ancienne exposition à la silice. Récemment, nous avons analysé une vingtaine de biopsies pulmonaires, en mettant en évidence un certains nombres d'éléments chimiques exogènes anormaux, comme le silicium, le titane, le chrome ou encore le

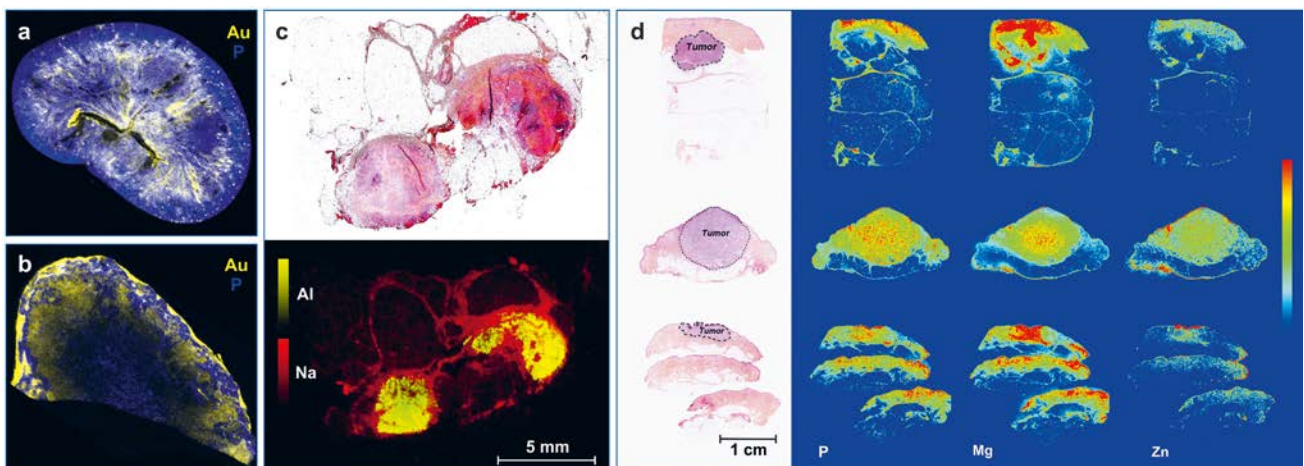


Figure 3. (a) Image de la distribution de nanoparticules d'or dans un rein et (b) dans une tumeur après injection intraveineuse chez le rongeur. (c) Analyse histologique et images élémentaires associées d'un granulome à corps étranger chez un patient du CHUGA. (d) Exemples de résultats obtenus sur différents types de tumeurs.

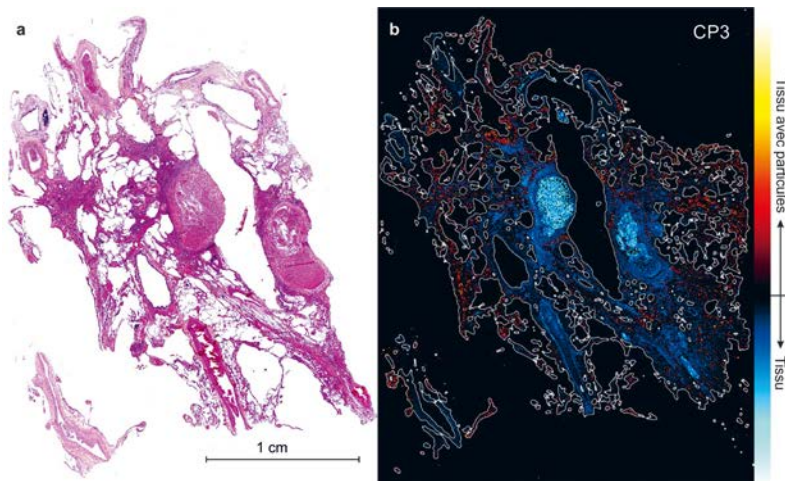
zirconium. La quantité d'information collectée sur ces types d'échantillons est cependant très importante et nous travaillons au développement d'outils statistiques multivariés voire même des méthodes d'apprentissage profond (deep learning) en intelligence artificielle pour optimiser nos capacités d'analyse élémentaire tissulaire. À terme, ces méthodes statistiques devraient permettre de faciliter le traitement des données spectrales ainsi que l'interprétation des images obtenues, ce qui permettra de lever l'un des derniers verrous avant la possible implémentation d'instruments LIBS au sein des hôpitaux, comme outil d'aide au diagnostic clinique.

CONCLUSION

L'imagerie LIBS est aujourd'hui un outil d'analyse robuste. Nous croyons fortement que cette approche pourrait devenir un outil puissant de diagnostic fournissant aux cliniciens de nouvelles sources d'informations pour mieux comprendre l'origine et le développement des pathologies

liées à l'exposition à des métaux (maladies respiratoires, dermatologiques, cancers, etc.). Cependant, pour se conformer aux contraintes de la recherche clinique, les atouts de l'imagerie LIBS ne seront vraiment démontrés qu'après l'analyse de centaines d'échantillons. Aussi, nous avons lancé une première étude clinique dans le domaine des maladies pulmonaires [7]. Les échantillons ont été collectés dans différents hôpitaux et sont en cours d'analyse. Nous travaillons en parallèle à la mise en place de méthodes statistiques pour pouvoir interpréter les grandes quantités d'informations collectées. ●

Figure 4. Exemple d'analyse d'un échantillon de poumon humain, obtenu à partir d'un patient ayant subi une transplantation pulmonaire pour emphysème. (a) Image histologique du poumon. (b) Images de la distribution des particules obtenues grâce à une analyse en composantes principales.



RÉFÉRENCES

- [1] L. Jolivet *et al.*, *Spectrochim. Act. B* **151**, 41 (2019)
- [2] B. Busser *et al.*, *Coord. Chem. Rev.* **358**, 70 (2018)
- [3] L. Sancey *et al.*, *Sci. Rep.* **4**, 6065 (2014)
- [4] J. Caceres *et al.*, *Sci. Rep.* **7**, 5080 (2017)
- [5] L. Sancey *et al.*, *ACS Nano* **9**, 2477 (2015)
- [6] B. Busser *et al.*, *Mod. Pathol.* **152**, 1 (2017)
- [7] MEDICO-LIBS clinical trial is registered in the clinicaltrials.gov website (NCT03901196)



**LA FLEXIBILITÉ ET L'EXPERTISE
AU SERVICE DE L'INNOVATION**

**OPTO
ÉLECTRONIQUE**

SOLUTIONS SPÉCIFIQUES / PRODUITS STANDARDS /
SERVICE SUR MESURE / POUR PETITES À GRANDES SÉRIES

EMETTEURS UV-VIS-IR
LEDs et Power LEDs / Sources lumineuses à LED ou Xénon
Diodes lasers / Lampes flash Xénon / Corps noirs miniatures

DÉTECTEURS UV-VIS-IR
Pyrodecteurs / Thermopiles / Imageurs thermiques
Photodiodes PIN et APD / Si, InGaAs / Barettes, quad
SPCM, CPM, Compteurs de photons

**APPLICATIONS : INDUSTRIELLES, AÉRONAUTIQUES, GRAND
PUBLIC, MÉDICALES, SCIENTIFIQUES, DÉFENSE, AUTOMOBILE**

Société HTDS - info@htds.fr - www.htds.fr - Tel : +33 (0)1 64 86 28 28



Hi-Tech Detection Systems

