

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 426**

51 Int. Cl.:

G02B 21/00 (2006.01)

G02B 21/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2005 E 05812037 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 1817620**

54 Título: **Sistema y procedimiento de diagnóstico por imagen microscópica multifotónica fibrada de una muestra**

30 Prioridad:

22.10.2004 FR 0411313

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.02.2013

73 Titular/es:

MAUNA KEA TECHNOLOGIES (33.3%)

9, rue d'Enghien

75010 Paris, FR;

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y**

UNIVERSITÉ DE LIMOGES (33.3%)

72 Inventor/es:

VIELLEROBE, BERTRAND;

LACOMBE, FRANCOIS;

LOISEAU, ALEXANDRE;

LOURADOUR, FRÉDÉRIC;

LELEK, MICHAËL y

BARTHELEMY, ALAIN

74 Agente/Representante:

DÍAZ NUÑEZ, Joaquín

ES 2 396 426 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema y procedimiento de diagnóstico por imagen microscópica multifotónica fibrada de una muestra

- 5 **[0001]** La invención presente se refiere a un sistema y un procedimiento para realizar una imagen microscópica multifotónica fibrada de una muestra, para una utilización en endoscopia o en microscopia de fluorescencia. El campo de aplicación al que se aspira es más particularmente el del diagnóstico por imagen in vivo e in situ.
- 10 **[0002]** En diagnóstico por imagen de fluorescencia confocal convencional, un fotón excita a una molécula. La desexcitación de esta última provoca la radiación de un fotón fluorescente. La energía del fotón excitador corresponde exactamente a la cantidad de energía necesaria para llevar a la molécula a un estado excitado determinado. La fuente utilizada es un láser que emite fotones excitadores en el visible (entre aproximadamente 400 nm y 650 nm). En microscopia multifotónica, es decir microscopia por fluorescencia no lineal, y más particularmente en microscopia bifotónica, la cantidad de energía necesaria para la transición es aportada, no por un
- 15 fotón excitador, sino por dos fotones (o más en diagnóstico por imagen multifotónica), cada uno presentando una energía dos veces (o más) inferior a la del fotón excitador convencional. En efecto, utilizamos fotones excitadores en el infrarrojo próximo (700 nm a 1000 nm) que son menos energéticos que los fotones excitadores en el caso convencional. No obstante, el fotón fluorescente emitido por la molécula es idéntico al emitido en el caso convencional.
- 20 **[0003]** En microscopia bifotónica (o multifotónica) los mecanismos que implican dos (o más) fotones tienen una eficacia que es proporcional al cuadrado (o más) de la intensidad instantánea de la fuente de excitación. Una gran eficacia de excitación sólo puede ser alcanzada gracias a fuertes restricciones espaciales y temporales. La restricción espacial implica un buen enfoque del haz excitador en el tejido, sea una fuerte densidad espacial de los
- 25 fotones en el volumen focal de irradiación. La microscopia bifotónica presenta pues una ventaja superior que es su confocalidad natural ya que toda la fluorescencia detectada sólo proviene del volumen elemental excitado en profundidad. La fluorescencia emitida no es una integral del volumen comprendido entre la superficie de la muestra y el volumen elemental excitado; esto permite particularmente limitar cualquier problema de fotoblanqueo de los fluoróforos situados entre la superficie y el plano de enfoque. La restricción temporal implica una fuente láser que genera impulsos ultra cortos y muy intensos, sea una fuerte densidad temporal de los fotones en el volumen focal de irradiación.
- 30 **[0004]** Por otro lado, frente a las normas de irradiación la microscopia bifotónica es importante porque el infrarrojo próximo engendra menos interacción de los fotones con la materia, y una excitación pulsada con pulsos ultracortos reduce considerablemente los problemas vinculados a la fototoxicidad.
- 35 **[0005]** Un inconveniente en microscopia lineal de fluorescencia fibrada reside en el hecho de que la distancia de penetración del haz excitador en la muestra es débil, inferior a una centena de micrómetros. Un aumento de la potencia de estos haces para mejorar la distancia de penetración provocaría ciertamente daños fisiológicos, particularmente por el hecho de que generalmente está en régimen casi-continuo. Así, órganos dispuestos más profundamente en la muestra no son accesibles. La microscopia bifotónica permite paliar este inconveniente ya que permite una distancia de penetración teórica superior a 400 micrómetros. En efecto, los fotones de excitación, situados en el infrarrojo próximo, son menos energéticos individualmente, poco absorbidos por el tejido que está esencialmente compuesto por agua y por tanto poco destructores en comparación con los utilizados en fluorescencia
- 40 lineal.
- 45 **[0006]** Los sistemas de microscopia bifotónica corrientemente utilizados son microscopios de mesa como por ejemplo un microscopio vertical constituido por una placa óptica en altura que lleva dispositivos de barrido y de detección para la constitución de imágenes. Dicho sistema de obtención no puede aplicarse particularmente a la endoscopia in vivo in situ. En efecto, un microscopio de mesa es a menudo embarazoso, utiliza objetivos clásicos para la iluminación y la captura de la señal, supone tener al animal bajo el objetivo, y requiere mucho tiempo de integración (garantía de una gran sensibilidad).
- 50 **[0007]** Conocemos el documento GB2338568, de Optiscan, "Two-photon endoscope or microscope method and apparatus" que propone un dispositivo de microscopia bifotónica. Este dispositivo utiliza una sola fibra óptica para transportar los impulsos del láser hacia la muestra. Con el fin de limitar el fenómeno de dispersión lineal y no lineal de los impulsos en la fibra óptica, se divulgan medios de compensación particularmente por prismas.
- 55 **[0008]** El documento US6369928, de Optical Biopsy Technologies, describe un microscopio de barrido de fluorescencia bifotónica para la obtención de una imagen microscópica. Este microscopio contiene por lo menos dos fibras ópticas: cada una utilizada como fuente y también como receptor del haz de fluorescencia obtenido por iluminación de la otra fibra óptica. En particular, dos características de este sistema constituyen restricciones para una miniaturización: 1) el barrido se hace del lado distal de las fibras, es decir entre las fibras y la muestra; 2) ambos haces incidentes respetan un ángulo de incidencia en la muestra, por tanto una separación entre las fibras.
- 60
- 65

- 5 [0009] El documento JP 2003 344777 describe un dispositivo de diagnóstico por imagen que consta de un microscopio multifotónico y una guía de imagen constituida por una pluralidad de fibras ópticas.
- [0010] El documento US 6 249 630 B1 describe un dispositivo para proporcionar a un aparato óptico pulsos ópticos, dicho dispositivo es capaz de compensar efectos de dispersión.
- 10 [0011] El documento " Distortion-free delivery of nanojoule femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser through a hollow-core photonic crystal fiber ", publicado en la revista "Optics Letters" vol. 29, N° 11, página 1285, describe una fibra óptica no dispersiva.
- [0012] El documento titulado "Reverse Propagation of femtosecond pulses in optical fibers" de Tsong y col. (Optics letters, vol. 28, p. 1873 a 1875) se refiere a un método numérico de cálculo de forma de pulso en la entrada de un sistema óptico para obtener otra forma de pulso derivado en la salida de este sistema óptico.
- 15 [0013] La invención presente tiene por objeto un nuevo sistema de microscopia multifotónico miniaturizado particularmente para una aplicación en endoscopia. Otro objetivo de la invención es un nuevo sistema de microscopia multifotónico que permite la obtención de una imagen en profundidad de la muestra.
- 20 [0014] Se alcanza por lo menos uno de los objetivos mencionados anteriormente con un sistema de diagnóstico por imagen multifotónico de fibra según la reivindicación 1.
- [0015] Preferentemente, para alcanzar profundidades importantes, el sistema consta de una cabeza óptica para enfocar el haz láser de excitación saliente de la guía de imagen en la muestra.
- 25 [0016] Preferentemente, las dimensiones de la cabeza óptica y de la guía de imagen deben ser suficientes para que puedan deslizarse fácilmente en un canal operador.
- [0017] El sistema según la invención permite la realización de una imagen de fluorescencia in vivo, in situ, desviada con una resolución microscópica. La guía de imagen o "fiber bundle" en lengua inglesa presenta una flexibilidad y un tamaño que permite una aplicación en endoscopia particularmente por inserción en un canal operador.
- 30 [0018] Según una característica ventajosa de la invención, pueden contemplarse diferentes medios de compensación, como por ejemplo:
- 35 - Una única fibra óptica que permite optimizar la respuesta de la guía de imagen, esta única fibra óptica que está asociada a una línea dispersiva que contiene por lo menos dos prismas o dos redes de difracción, de tal modo que los desfases introducidos por esta única fibra óptica y la guía de imagen son compensados por el desfase provocado por la línea dispersiva;
- 40 [0019] Estos dispositivos de compensación también pueden servir para compensar dispersiones producidas por otro elemento (cabeza óptica, lentes, espejos, etc.) del sistema.
- 45 [0020] Según la invención, prevemos medios de inyección dispuestos del lado próximo a la guía de imagen y que permiten enfocar por turno el haz láser de excitación en una fibra determinada de la guía de imagen. También prevemos primeros medios de detección para detectar una señal de fluorescencia que proviene de la muestra. Según una característica ventajosa, también podemos prever segundos medios de detección para detectar una señal de generación de segundo armónico (SHG para "Second Harmonic Generation" en lengua inglesa) que proviene de la muestra. La complementariedad entre las propiedades de fluorescencia bifotónica y de generación de segundo armónico permite acceder particularmente a informaciones locales sobre las órdenes moleculares (simetría, organización) y su interacción con su entorno próximo.
- 50 [0021] Para que las señales que provengan de la muestra alcancen estos medios de detección, el sistema consta además de un filtro dicroico adaptado para dejar pasar sólo las señales de fluorescencia y de segundo armónico hacia los detectores. En particular, este filtro dicroico está dispuesto entre los medios de barrido y la guía de imagen. Así, las señales que provienen de la muestra no vuelven a pasar por los medios de barrido. De la misma manera, no es necesario disponer de un orificio de filtrado delante de cada detector. En este caso, aprovechamos el hecho de que la microscopia multifotónica presenta una confocalidad natural.
- 55 [0022] El sistema también puede constar de un filtro dicroico sintonizable apto para separar la señal de fluorescencia de la señal de generación de segundo armónico que proviene de la muestra.
- 60 [0023] De modo general el sistema contiene una unidad de tratamiento que dirige el conjunto de los elementos, particularmente la sincronización entre los medios de excitación y los medios de detección. Esta unidad realiza un tratamiento de imagen que puede estar basado por ejemplo en el descrito en el documento WO 2004/008952, de Mauna Kea Technologies. Podemos por ejemplo ordenar un barrido lento de la muestra para realizar imágenes de
- 65

alta calidad integrando un gran número de fotones durante un tiempo largo. No obstante, según un modo ventajoso de realización de la invención, los medios de barrido barren la muestra a una velocidad que corresponde a la obtención de un número de imágenes por segundo suficiente para una utilización en tiempo real. Como complemento, los medios de detección detectan la señal de fluorescencia a una frecuencia de detección correspondiente a una frecuencia mínima de muestreo de las fibras una a una. Más concretamente, el respeto del muestreo de las fibras (según el criterio de Shannon) permite obtener una imagen punto a punto correspondiendo bien a cada fibra. Esto permite no perder información tomando muestras del conjunto de las fibras una a una respetando un número medio mínimo de imágenes por segundo, a saber en la práctica por lo menos 12 imágenes por segundo para un modo máximo de 896 x 640 píxeles. La elección de la frecuencia de detección (ancho de banda del detector) en función de este muestreo mínimo permite luego para cada fibra detectar el mayor número posible de fotones de fluorescencia. Así, según un modo de realización posible, aplicando una guía de imagen de cerca de 30.000 fibras ópticas flexibles, la frecuencia de muestreo y el ancho de banda del sistema de detección (un fotodiodo de avalancha o equivalente) son fijadas sensiblemente a 1,5 MHz, correspondiendo aproximadamente a 12 píxeles por fibra, permitiendo entonces obtener por lo menos las 12 imágenes/s en modo máximo de 896 x 640 píxeles. En la práctica, la desviación del haz se ajusta determinando una frecuencia de barrido rápido de un espejo resonante "línea" y una frecuencia lenta de barrido de un espejo galvanométrico "trama". Esto permite un barrido rápido apropiado de las fibras para obtener una imagen en tiempo real.

[0024] Los espejos galvanométricos pueden también tener frecuencias de barrido adaptadas para una obtención lenta; en este caso, el fotodetector presenta un ancho de banda adaptado a la velocidad de obtención lenta.

[0025] Según la invención, los medios de barrido también pueden barrer la muestra sobre una línea en un plano bajo el nivel de la superficie para realizar un barrido lineal ("linescanning" en lengua inglesa). Podemos así medir intensidades o velocidades de ciertos elementos observados.

[0026] El láser pulsado puede ser un láser femtosegundo o un láser picosegundo. La elección de un tipo de láser depende del tipo (en términos de sensibilidad particularmente) de fluorescencia dirigida. Por ejemplo, un láser picosegundo presenta pulsos más largos, por tanto un láser útil a priori para fluoróforos de alto rendimiento. De hecho, podemos por ejemplo utilizar anchuras de pulso comprendidas entre 10 picosegundos y 10 femtosegundos.

[0027] Por otro lado, según la invención, el láser pulsado y los medios de compensación son sintonizables en longitud de onda. Podemos entonces utilizar un láser cuya longitud de onda puede variar entre 700 nm y 1000 nm, preferentemente entre 800 nm y 870 nm, lo que ya permitiría detectar un gran número de fluoróforos. A cada longitud de onda del láser, adaptamos la compensación.

[0028] Según otro aspecto de la invención, se propone un procedimiento de diagnóstico por imagen según la reivindicación 18.

[0029] Ventajosamente, detectamos el conjunto de la señal de fluorescencia saliente de la guía de imagen. Así no se desbarre y no filtramos la señal de fluorescencia antes de la detección por un fotodetector.

[0030] En una variante de la invención sin cabeza óptica, la guía de imagen está constituida por varios millares de fibras ópticas cuyos extremos distales están destinados a ser colocados al descubierto directamente en contacto con la superficie de la muestra, cada fibra está adaptada para producir un haz divergente susceptible de excitar un microvolumen de la muestra situada en la superficie hasta una profundidad máxima que depende particularmente del diámetro del núcleo de las fibras ópticas. Sobre los diez primeros micrómetros por ejemplo, el haz todavía presenta un diámetro que es sensiblemente idéntico al diámetro del núcleo de la fibra óptica. Para una guía de imagen llamada sonda "S", el diámetro de las fibras ópticas utilizadas es bastante pequeño, por ejemplo 1 micrómetro, para que se dé el fenómeno multifotónico.

[0031] Esta variante se diferencia por tanto de la variante con cabeza óptica en que ésta no prevé el barrido de una señal que se enfoca en la salida de cada fibra sino el barrido de una señal divergente en la salida de cada fibra. El no enfoque de la señal en la salida de fibra permite conseguir imágenes de un volumen situado justo bajo la superficie del tejido que son explotables e interesantes desde un punto de vista médico particularmente. Estas imágenes no son "confocales" porque no provienen de un plano de corte por debajo del nivel de la superficie barrido punto por punto, sino que, no obstante, a estas imágenes se les pueden calificar de "imágenes de alta resolución" porque provienen del barrido por turno de microvolúmenes situados directamente bajo la superficie.

[0032] Una de las ventajas de dicha variante reside en el hecho de que para una aplicación endoscópica, el diámetro de la sonda endoscópica puede ser muy pequeño dependiendo únicamente del diámetro de la guía de imagen y por tanto de su número de fibras ópticas. Esto permite contemplar ciertos ámbitos de aplicación, por ejemplo el campo de la neurología, donde el tamaño de la sonda endoscópica es un factor crítico resolviendo problemas inherentes a la miniaturización de la cabeza óptica de enfoque.

5 [0033] El sistema puede constar de medios de filtrado y de detección para disociar respectivamente y detectar varias señales de fluorescencia emitidas por varios fluoróforos que están presentes en la muestra y que son excitados por el haz láser de excitación. En efecto, idealmente generamos un haz láser pulsado cuya longitud de onda ha sido determinada para excitar un fluoróforo determinado. Sin embargo, otros fluoróforos pueden ser sensibles a esta longitud de onda, y, por tanto, también emitir señales de fluorescencia. Podemos también introducir deliberadamente fluoróforos y utilizar una longitud de onda del haz láser susceptible de excitar simultáneamente estos fluoróforos. Preferentemente, las señales de fluorescencia presentan longitudes de onda suficientemente alejadas las unas de las otras para que sean disociables por filtración. El sistema consta de medios de tratamiento para elaborar una imagen final que consta de zonas coloreadas en función de las señales de fluorescencia de los fluoróforos. Por lo tanto, el sistema se adapta para realizar multimarcación por vía de detección. Los medios de filtrado pueden constar de un filtro paso-banda sintonizable que deja pasar secuencialmente las diferentes señales de fluorescencia hacia un detector común. Los medios de filtrado pueden también constar de un separador capaz de enviar, en función de la longitud de onda, cada señal de fluorescencia hacia un detector diferente.

15 [0034] También según otra característica ventajosa, el sistema puede constar además de un espectrómetro capaz de elaborar un espectro a partir de una parte de la señal que proviene de la muestra. Este espectrómetro puede estar asociado a un obturador que dirige una parte de la señal que proviene de la muestra hacia el espectrómetro en los instantes predeterminados que corresponden con los instantes en los que la señal de excitación barre una zona de interés. De otro modo, podemos así ordenar el láser pulsado para que sólo se iluminen las zonas de interés. El espectro elaborado es, a continuación, tratado en los medios de tratamiento. La parte de la señal desviada hacia el espectrómetro es preferentemente inferior al 10 % de la señal útil.

20 [0035] Otras ventajas y características de la invención aparecerán en el examen de la descripción detallada de un modo de ejecución en absoluto limitativo, y los dibujos adjuntos, en los que:

- 25
- La figura 1 es una vista esquemática del sistema de obtención según la invención;
 - La figura 2 es una vista esquemática de la parte superior de un sistema dotado de una compensación a base de redes de difracción;
 - 30 - La figura 3 es una vista esquemática de la parte superior de un sistema dotado de una compensación a base de prismas;
 - La figura 4 es una vista esquemática de la parte superior de un sistema dotado de una compensación a base de cuatro redes de difracción;
 - La figura 5 es una vista esquemática de la parte superior de un sistema dotado de una compensación a base de cuatro prismas;
 - 35 - La figura 6 ilustra un sistema equivalente al descrito en la figura 2 con, además, una máscara de fase y una máscara de amplitud que actúa en forma del impulso en fase y en amplitud;
 - La figura 7 ilustra un sistema equivalente al descrito en la figura 3 con, además, una máscara de fase y una máscara de amplitud que actúa en forma del impulso en fase y en amplitud;
 - 40 - La figura 8 ilustra un sistema según la invención equivalente al descrito en la figura 2 con, además, un trozo dispersivo de fibra óptica;
 - La figura 9 ilustra un sistema según la invención equivalente al descrito en la figura 3 con, además, un trozo dispersivo de fibra óptica;
 - La figura 10 ilustra un sistema según la invención equivalente al descrito en la figura 4 con, además, un trozo dispersivo de fibra óptica;
 - 45 - La figura 11 ilustra un sistema según la invención equivalente al descrito en la figura 5 con, además, un trozo dispersivo de fibra óptica;
 - La figura 12 es una vista esquemática de la parte superior de un sistema dotado de una compensación a base de fibra óptica de dispersión anormal;
 - La figura 13 es una vista esquemática de la parte superior de un sistema en el cual el sistema de barrido y el dispositivo de compensación son combinados; y
 - 50 - La figura 14 ilustra un sistema según la invención equivalente al descrito en la figura 13 con, además, un trozo dispersivo de fibra óptica.

55 [0036] En la figura 1 distinguimos una muestra 10 que puede ser un tejido biológico o un cultivo celular. En general, la fluorescencia observada puede provenir de un compuesto exógeno (normalmente un marcador administrado) o de un compuesto endógeno que está o bien fabricado por células (marcador de tipo transgénico) de un tejido biológico, o naturalmente presente en las células (autofluorescencia).

60 [0037] La absorción no lineal de dos fotones requiere una densidad muy fuerte de energía en un volumen reducido. Para hacerlo, utilizamos un láser pulsado 2 en régimen femtosegundo con anchuras de pulsos de 100 fs. Se trata de un láser titanio-zafiro bombeado por un láser sólido de 1 a 532 nm. La cadencia de repetición del láser 2 es de unos 80 MHz con una potencia media del orden de 1 vatio. La longitud de onda del haz de excitación saliente del láser 2 puede ser ajustada entre 700 y 1000 nm, infrarrojo cercano, preferentemente entre 800 nm y 870 nm. De hecho, el rendimiento del sistema depende esencialmente de las características de la fuente: potencia de cresta y anchura de los pulsos deseadas particularmente en la salida de la guía de imagen.

- 5 **[0038]** En la salida del láser 2, está colocado un aislador de Faraday 21 para evitar que las reflexiones parásitas regresen hacia la cavidad del láser 2. El aislador 21 eventualmente va seguido, cuando sea necesario, de un dispositivo 3 de presentación y de inyección del haz láser de excitación. Este dispositivo 3 está constituido por un sistema óptico afocal de aumento diferente de 1, que consta de lentes que permiten modificar el diámetro del haz láser. El aumento se calcula de modo que el diámetro del haz láser se adapta a medios de inyección previstos para dirigir este haz láser en medios de compensación 4. Estos medios de compensación se ajustan en posición y en ángulo en función de la longitud de onda del haz de excitación.
- 10 **[0039]** De modo general, los medios de compensación 4 tienen como función precompensar la ampliación de los impulsos de excitación en las fibras ópticas de la guía de imagen 8. Esta ampliación temporal se debe a la dispersión cromática lineal y a los efectos no lineales de las fibras ópticas (automodulación de fase que provoca un ensanchamiento espectral). El sistema permite obtener una anchura de pulso en la salida de la guía de imagen 8 de algunas centenas de femtosegundos con una potencia media de algunas decenas de milivatios.
- 15 **[0040]** Los medios de barrido 5 recuperan, a continuación, los impulsos de excitación así precompensados. Según el ejemplo escogido y representado en la figura 1, estos medios constan de un espejo M1 resonante de 4 KHz que sirve para desviar el haz horizontalmente y por lo tanto para realizar las líneas de la imagen, de un espejo M2 galvanométrico a 15 Hz, en general entre 10 y 40 Hz, que sirve para desviar el haz verticalmente y por lo tanto para realizar la trama de la imagen; y de dos sistemas afocales de aumento unitario, AF1 situado entre los dos espejos y AF2 situado después del espejo M2, estos sistemas afocales se utilizan para conjugar los planos de rotación de los dos espejos M1 y M2 con el plano de inyección en una de las fibras. Según la invención, la velocidad de barrido se determina para permitir una observación de los tejidos in vivo in situ. Para eso, el barrido debe ser suficientemente rápido para que haya por lo menos 12 imágenes/s fijadas en la pantalla para un modo de visualización de 896 x 640 píxeles que correspondan al modo más lento. Para los modos de visualización que tengan menos píxeles, el número de imágenes adquiridas por segundo será, de este modo, siempre superior a 12 imágenes/s. Como variante, los medios de barrido pueden constar particularmente de un espejo rotativo, componentes integrados de tipo MEMs (espejos de barrido X e Y), o un sistema acusto-óptico.
- 20 **[0041]** Los espejos M1 y M2 pueden ser también dos espejos galvanométricos cuyas frecuencias de barrido son tales que se utilizan menos de diez imágenes por segundo, por ejemplo de 1 a 3 imágenes por segundo. En este caso, el ancho de banda del fotodetector asociado se adapta a la velocidad de obtención impuesta por los espejos galvanométricos. El tiempo de integración puede ser largo para aumentar la sensibilidad del sistema.
- 25 **[0042]** El haz de excitación desviado en la salida de los medios de barrido 5 es dirigido hacia los medios ópticos 7 con el fin de ser inyectado en una de las fibras de la guía de imagen 8. El filtro dicróico 6 dispuesto entre los medios de barrido 5 y los medios de inyección 7 queda transparente al haz de excitación. Los medios de inyección 7 están constituidos aquí por dos conjuntos ópticos E1 y E2. El primer conjunto óptico E1 permite corregir en parte las aberraciones ópticas en el borde de campo de los medios de barrido 5, la inyección es optimizada así en el conjunto del campo óptico, tanto en el centro como en el borde. El segundo conjunto óptico E2 está destinado a realizar la inyección propiamente dicha. Su focal y su abertura numérica han sido escogidas para optimizar el índice de inyección en las fibras ópticas de la guía 8. Según un modo de realización que permite obtener el criterio de acromaticidad, el primer conjunto E1 está constituido por un doblete de lentes, y el segundo conjunto E2 de dos dobletes de lentes seguido por una lente situada cerca de la guía de imagen. Como variante, esta óptica de inyección podría estar constituida por cualquier otro tipo de ópticas estándares, como por ejemplo dos tripletes, o por lentes de gradiente de índice (con una corrección del cromatismo por elementos ópticos difractivos) o bien de un objetivo de microscopio.
- 30 **[0043]** La guía de imagen 8 está constituida por un número muy grande de fibras ópticas flexibles, por ejemplo 30.000 fibras en silicio dopado con germanio, cada una monomodo, de 2 μm de diámetro, de abertura numérica de 0,23 y espaciada por 3,8 μm con relación a su vecina. La sección transversal de la guía es del orden de 0,8 mm. En la práctica, podemos utilizar o bien el conjunto de las fibras de la guía de imagen, o un subconjunto escogido por estas fibras, por ejemplo centrado. Como variante, la guía de imagen puede contener fibras multimodos de 1,9 μm de diámetro, de abertura numérica de 0,42 y espaciada por 3,3 μm para una sección transversal de la guía del orden de 0,65 mm.
- 35 **[0044]** El extremo distal de la fibra óptica está conectado a una cabeza óptica 9 que enfoca el haz láser de excitación en la muestra 10 en un volumen elemental. Este volumen o punto elemental está situado a una profundidad determinada que se encuentra a algunas centenas de μm de la superficie de la muestra en contacto con la cual se debe colocar la cabeza óptica 9. Esta profundidad puede ser por ejemplo de 200 μm . La cabeza óptica 9 permite por tanto enfocar el flujo saliente de la guía de imagen en la muestra, pero igualmente recoger el flujo de fluorescencia que vuelve de la muestra. La cabeza óptica 9 posee un aumento de 2,4 y una abertura numérica en la muestra de 0,5. Al presentar naturalmente el microscopio bifotónico un carácter confocal, no es necesario filtrar la señal de fluorescencia captada por el fotodetector: todos los diferentes flujos de esta señal son enviados hacia el fotodetector, lo que mejora la sensibilidad del sistema. Con estos valores de aumento y de abertura numérica, la

5 resolución axial es del orden de 15 μm y la resolución lateral del orden de 2 μm . La abertura numérica se escoge también para optimizar el número de fotones recuperados que debe ser el mayor posible. La cabeza óptica puede estar constituida por ópticas clásicas (doblete, triplete, esférica) y/o por lentes de gradiente de índice (GRIN). En funcionamiento, la cabeza óptica está particularmente destinada a estar en contacto con la muestra 10. De manera óptima, la cabeza óptica contiene ópticas refractivas con un aumento de 4 y una abertura numérica de 1. Esta cabeza óptica es de tipo de inmersión en el agua y no acromática.

10 **[0045]** La señal de fluorescencia atraviesa por tanto la guía de imagen 8, los medios de inyección 7 y luego se refleja sobre el filtro dicroico 6 que dirige esta señal de fluorescencia hacia un detector de fluorescencia 12 a través de un filtro 11 de rechazo coloreado y una lente de enfoque E3.

15 **[0046]** El filtro dicroico 6 posee una eficacia de transmisión del 98 al 99 % en la longitud de onda de excitación y refleja por tanto las otras longitudes de onda. La señal de fluorescencia, procedente de la muestra a través de la cabeza óptica y la guía de imagen, es así enviada hacia la vía de detección. El filtro de rechazo 11 permite eliminar totalmente del 1 al 2 % de las reflexiones parásitas a la longitud de onda de excitación y que, sin embargo, pasan hacia la vía de detección.

20 **[0047]** El detector 12 presenta una sensibilidad máxima a la longitud de onda de fluorescencia estudiada. Podemos utilizar por ejemplo un fotodiodo de avalancha (APD) o bien un fotomultiplicador. Por otro lado, según la invención, el ancho de banda se escoge para optimizar el tiempo de integración de la señal de fluorescencia. Ésta es de 1,5 MHz en tiempo real, lo que corresponde a la frecuencia mínima de muestreo de la guía de imagen con un tiempo de integración optimizado en cada píxel.

25 **[0048]** El sistema según la invención presente es particularmente notable por el hecho de que permite asociar con la microscopia multifotónica la microscopia de generación de segundo armónico. Se trata de detectar la señal de generación de segundo armónico emitido al mismo tiempo que la señal de fluorescencia por la muestra. Para hacerlo, prevemos un filtro dicroico sintonizable 13 u otro dispositivo colocado entre el filtro dicroico 6 y el filtro de rechazo 11 que permite separar la señal de generación de segundo armónico de la señal de fluorescencia. Un detector SHG 14 recoge esta señal de generación de segundo armónico.

30 **[0049]** Los medios electrónicos e informáticos 16 (como un microordenador) de dirección, de análisis y de tratamiento numérico de la señal detectada y de visualización constan de las tarjetas siguientes:

- 35 - una tarjeta de sincronización 17 que tiene como funciones:
 - ordenar de manera sincronizada el barrido, es decir el movimiento de los espejos línea M1 y trama M2;
 - ordenar de manera sincronizada con las imágenes de fluorescencia, el análisis de los datos procedentes del detector SHG 14;
 - conocer en cualquier momento la posición del punto luminoso láser así barrido;
 40 - administrar todas las demás tarjetas a través de un mismo microcontrolador que puede ser dirigido; y
 - dirigir los medios de precompensación para administrar la sintonización en longitud de onda del sistema;
 - una tarjeta detectora 15 que consta, para cada vía de detección, de un circuito analógico que realiza particularmente una adaptación de impedancia, un amplificador, un convertidor analógico digital y un componente lógico programable (por ejemplo un circuito FPGA) que pone en marcha la señal.

45 **[0050]** El microordenador 16 también consta de una tarjeta de obtención digital (no representada) que permite tratar un flujo de datos numéricos de frecuencia variable y mostrarlo en una pantalla mediante una tarjeta gráfica (no representada).

50 **[0051]** A modo de ejemplo no limitativo, el tratamiento de imagen aplicado en la invención presente puede ser una adaptación sin esfuerzo del tratamiento de imagen como el que se describe particularmente en el documento WO 2004/008952 y/o el documento WO 2004/010377.

55 **[0052]** En cuanto al caso de una guía de imagen sin cabeza óptica, el funcionamiento del equipo es el mismo que el que se describe anteriormente a excepción de lo que sigue: en la salida de la guía, la luz divergente que emerge de la fibra inyectada es difundida en la muestra y la señal de fluorescencia se recoge en un microvolumen situado entre la superficie y una profundidad de algunos μm (según el diámetro del núcleo de las fibras y su ON). Gracias al barrido, la muestra se ilumina microvolumen por microvolumen. A cada instante, el microvolumen excitado en el tejido emite entonces una señal de fluorescencia que tiene la particularidad de ser desplazada hacia longitudes de onda más pequeñas. Esta señal de fluorescencia es captada por la guía de imagen, luego sigue el camino inverso del haz de excitación hasta el filtro dicroico 6 que va a transmitir la señal de fluorescencia hacia la vía de detección. Las señales detectadas, unas tras otras, son particularmente tratadas en tiempo real gracias al mismo tratamiento de imagen que se describe anteriormente en referencia a la figura 1 para permitir la reconstrucción de una imagen en tiempo real visible en la pantalla.

[0053] Las figuras 2 a 14 (de la 8 a la 11 y 14 según la invención) ilustran algunos ejemplos de dispositivos de precompensación. La precompensación consiste en preparar el impulso láser ultra breve confiriéndole la anchura espectral y la modulación de fase que provocarán su compresión temporal óptima a la salida de la guía de imagen 8. La técnica empleada tiene por objeto compensar la dispersión de velocidad de grupo del conjunto del sistema y compensar también los efectos no lineales inevitables sufridos por el impulso luminoso en el momento de su propagación en la guía de imagen 8. El principio de precompensación contemplado está conforme con lo publicado por S.W. Clark, F.O. Ilday, y F.W. Wise, "Fiber delivery of femtosecond pulses from a Ti:sapphire laser", Optics Letters Vol. 26, NÚM. 17, 1 de septiembre de 2001.

[0054] Normalmente, la precompensación según la invención consta de dos partes: un trozo de fibra óptica seguido por una línea dispersiva de redes de difracción.

- El trozo de fibra óptica constituido por una única fibra óptica: la única fibra óptica utilizada es monomodo para la longitud de onda láser. La longitud del trozo es próxima a la de la guía de imagen 8 multinúcleo. Esta longitud se optimiza con arreglo a otros parámetros del sistema tales como por ejemplo la longitud de la guía de imagen, la longitud de onda del haz láser, la potencia y la anchura de pulsos en la entrada y en la salida de la guía de imagen... El diámetro del modo de esta fibra es superior al diámetro del modo de los núcleos de la guía de imagen con el fin de equilibrar los efectos no lineales encontrados en las dos partes de la precompensación. Utilizamos así una fibra óptica de superficie ancha de modo (large mode area (LMA)) o que pertenezca a la nueva generación de fibras ópticas de revestimiento estructurado aire-silicio. Este trozo de fibra monomodo se caracteriza por un cierto índice de dispersión de velocidad de grupo normal (principalmente del orden 2 y 3) y por la aparición de efectos no lineales de ensanchamiento espectral (sobre todo en los primeros milímetros del trozo) que se controlan a través del diámetro de modo. Este trozo, constituido por una única fibra óptica, aporta un desfase a los impulsos láseres excitadores. Este desfase sirve para la precompensación de la dispersión en la guía de imagen principal 8, pero también puede servir para compensar cualquier otra dispersión provocada por el resto del sistema como la cabeza óptica por ejemplo.

- La línea dispersiva de redes de difracción: esta parte contiene dos redes de difracción, que funcionan en reflexión, planas, con gran eficacia, asociadas a un espejo plano de devolución totalmente reflejante. Las redes de difracción se encaran y están dispuestas paralelamente algunos centímetros una de la otra. El haz láser golpea sucesivamente estas dos redes en incidencia oblicua antes de alcanzar el espejo plano que devuelve la luz aproximadamente sobre sí misma. El haz láser golpea así cuatro veces las redes antes de volver a salir de la línea dispersiva. El fin de esta línea dispersiva es introducir un gran índice de dispersión de velocidad anormal de grupo en el sistema. Esto vuelve a retrasar los fotones más rojos del espectro láser lo que corresponde al comportamiento inverso de lo que pasa a la vez en el trozo de fibra monomodo anteriormente citado pero igualmente en la guía de imagen. Este dispositivo conocido bajo el nombre de "línea Treacy" es muy utilizado en los sistemas de amplificación de deriva de frecuencia de las cadenas láseres femtosegundos donde desempeña, por tanto, el papel de compresor de impulso en el extremo de la cadena. La línea dispersiva se caracteriza por un cierto índice de dispersión de velocidad de grupo anormal (principalmente del orden de 2 y 3) que depende del paso de las redes, de la distancia interredes y del ángulo de incidencia sobre estas redes.

[0055] Las figuras 2 a 14 son esquemas simplificados del sistema (figuras 8, 9, 10, 11, 14 según la invención) en el cual el dispositivo de precompensación 4 se ha detallado. Por razones de claridad, el dispositivo 3 no aparece. Los mismos elementos de la figura 1 se repiten en las figuras 2 a 14 con las mismas referencias. Volvemos a encontrarnos con el láser 2, el sistema de barrido 5, el filtro dicróico 6 que transmite el haz excitador hacia la muestra y que devuelve la señal de fluorescencia hacia el detector 12. Las figuras 2 a 7 ilustran dispositivos de compensación básicos que no contienen un primer trozo. El haz saliente del aislador de Faraday 21 se dirige directamente hacia una línea dispersiva de redes de difracción o de prismas. En la figura 2, esta línea contiene dos redes de difracción 23, 24 y un espejo 25. El trayecto del haz láser en la línea dispersiva es el siguiente: reflexión en la primera red de difracción 23 hacia la segunda red de difracción 24, reflexión en la segunda red de difracción 24 hacia el espejo 25 donde está totalmente reflejado hacia la segunda red 24 y luego la primera red 23. El impulso 19 saliente de la línea dispersiva es más largo que el 18 saliente del láser 2. El haz que proviene de la red de difracción 23 refleja a continuación en el espejo 22 hacia el sistema de barrido 5 luego hacia la guía de imagen 8. Las figuras 2 a 14 son vistas de la parte superior; en particular en las figuras 2, 3, 6-9, el haz láser que parte del láser 2 hacia la red 23 pasa por encima del espejo 22 sin atravesarlo. En cambio, el haz láser desde la red 23 hacia el sistema de barrido refleja en el espejo 22. Este espejo 22 puede ser reemplazado por un separador que deja pasar el haz excitador del láser hacia la línea dispersiva y refleja el haz excitador de la línea dispersiva hacia el sistema de barrido, siendo, pues, alineados ambos haces. Pero, en este último caso, las pérdidas provocadas por los separadores son importantes (sólo se utiliza el 25 % de la señal incidente).

[0056] La dispersión lineal y los efectos no lineales en la guía de imagen 8 modifican el perfil temporal y espectral del impulso de excitación que vuelve a ser sensiblemente idéntico al perfil 18 del impulso saliente del láser 2. La línea dispersiva causa un desfase de $-\Delta\phi$ para compensar aproximadamente el desfase $+\Delta\phi$ causado por la guía de

imagen 8. En la figura 3, las dos redes de difracción son reemplazadas por dos prismas 26 y 27, el trayecto del haz láser excitador es idéntico.

5 [0057] En las figuras 4 y 5, la línea dispersiva y el espejo 22 son reemplazados respectivamente por cuatro redes de difracción para la figura 4 y cuatro prismas para la figura 5. El haz láser excitador se refleja sucesivamente en las cuatro redes de difracción 28, 29, 30 y 31 (prismas 32, 33, 34 y 35).

10 [0058] Las figuras 6 y 7 corresponden a las figuras 2 y 3 en las cuales ha sido introducida una máscara de fase y de amplitud 36 por encima del espejo 25. Esta máscara permite mejorar el rendimiento de la precompensación precisamente ajustando la forma de pulso con respecto a la dispersión de la guía de imagen. Puede estar constituido por el conjunto de diferentes láminas de vidrio que actúan en la fase espectral y de un filtro variable de manera transversal y que actúa en la amplitud espectral.

15 [0059] Las figuras 8 a 11 según la invención corresponden respectivamente a las figuras 2 a 5 pero además con un trozo 37 dispuesto o bien por encima del espejo 22 (figuras 2 y 3) o por encima de las cuatro redes de difracción (figura 4) o los cuatro prismas (figura 5).

[0060] Este trozo puede estar constituido por una única fibra óptica.

20 [0061] Esta única fibra óptica provoca un desfase positivo $+\Delta\phi_1$. La guía de imagen 8 también provoca un desfase positivo $+\Delta\phi_2$. Así, la línea dispersiva (figuras 8 a 11) provoca un desfase negativo de $-(\Delta\phi_1 + \Delta\phi_2)$.

25 [0062] Como se ve en la figura 12, la etapa de precompensación puede también obtenerse con la ayuda de un único trozo 38 de fibra óptica de dispersión anormal a la longitud de onda láser. Esta fibra específica presenta una dispersión nula a longitudes de onda más cortas que la de la longitud de onda láser. Esto se obtiene mediante el empleo de un trozo de fibra de nueva generación de longitud optimizada que presenta una de las estructuras siguientes: - fibra binúcleos concéntricos, fibra de revestimiento estructurado aire-silicio, fibra fotónica de núcleo hueco y de revestimiento estructurado aire silicio, fibra fotónica de núcleo hueco y de revestimiento de Bragg. Este trozo de fibra precompensadora se caracteriza también por un diámetro de modo que es optimizado con el fin de tener en cuenta los efectos no lineales asociados a la propagación en esta guía de onda.

30 [0063] Como variante de lo que precede, la precompensación puede ser integrada en el sistema de barrido, como podemos ver en las figuras 13 y 14. En efecto, cualquiera de los dispositivos de compensación descritos en las figuras 2 a 11 puede insertarse en un camino óptico en el sistema de barrido 5.

35 [0064] Las ventajas de un microscopio a base de una guía de imagen son la compacidad y la flexibilidad, lo que permite una utilización en endoscopia por inserción de dicha guía de imagen en el tejido. Finalmente, la asociación de la microscopia multifotónica con una microscopia fibrada por guía de imagen permite una obtención de imagen de fluorescencia de órgano situada en profundidad de la muestra observada. Prácticamente, el sistema puede ser de tipo adaptable, es decir diseñado sin la fuente láser y, de este modo, puede interconectarse con fuentes láseres preexistentes en laboratorios.

40 [0065] Las numerosas aplicaciones, en particular aquellas en las que se requieren procedimientos no o poco invasivos son por ejemplo la endoscopia uretral cuando una sonda óptica con un diámetro inferior a 1 mm es insertada en una vejiga por ejemplo; la colonoscopia del animal pequeño; la visualización de la córnea y de la retina; la visualización de las fibras musculares y de los nervios; la microcirculación de los leucocitos y del flujo sanguíneo; la arquitectura vascular y renal; las membranas de hepatocitos; y la neurobiología in situ para la visualización de las estructuras cerebrales profundas de un animal pequeño vivo por ejemplo o aplicaciones clínicas potenciales para el hombre.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de diagnóstico por imagen multifotónica fibrada de una muestra (10), este sistema consta de:
- 5 - un láser (2) pulsado para generar un haz láser de excitación multifotónica,
 - una guía de imagen (8) constituida por una pluralidad de fibras ópticas, que permiten iluminar la muestra (10) por un barrido punto por punto, y
 - medios de barrido (5) para dirigir por turno el haz láser de excitación en una fibra de la guía de imagen (8),
- Sistema **caracterizado porque** consta además de:
- 10 - medios de compensación (4) para compensar efectos de dispersión de velocidad de grupo y efectos no lineales de los impulsos de excitación en la guía de imagen (8), estos medios están dispuestos entre el láser pulsado (2) y la guía de imagen (8) la dispersión lineal y los efectos no lineales en la guía de imagen (8) modifican el perfil temporal y espectral del impulso de excitación que vuelve a ser sensiblemente idéntico al perfil (18) del impulso saliente del láser, de modo que
- 15 los medios de compensación que constan de un trozo de fibra óptica seguido por una línea dispersiva, el trozo de fibra óptica está constituido por una única fibra óptica monomodo, el diámetro del modo de esta fibra monomodo es superior al diámetro del modo de los núcleos de la guía de imagen, este trozo de fibra está dispuesto para hacer aparecer efectos no lineales de ensanchamiento espectral, la línea dispersiva está dispuesta para introducir un índice de dispersión de velocidad anormal de grupo, retrasando los fotones más rojos del espectro láser de modo que el impulso (19) saliente de la línea dispersiva sea más largo que el del (18) saliente del láser.
- 20
2. Sistema según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la línea dispersiva contiene por lo menos dos prismas (26, 27; 32, 33, 34, 35).
- 25
3. Sistema según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la línea dispersiva contiene por lo menos dos redes de difracción (23, 24; 28, 29, 30, 31).
- 30
4. Sistema según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la línea dispersiva contiene por lo menos dos prismas (26, 27; 32, 33, 34, 35), la única fibra óptica monomodo (37) está asociada con la línea dispersiva de tal modo que los desfases provocados por esta única fibra óptica (37) y la guía de imagen (8) se compensen por el desfase provocado por la línea dispersiva.
- 35
5. Sistema según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la línea dispersiva contiene por lo menos dos redes de difracción (23, 24; 28, 29, 30, 31), la única fibra óptica monomodo (37) está asociada a la línea dispersiva de tal modo que los desfases provocados por esta única fibra óptica (37) y la guía de imagen (8) se compensan por el desfase provocado por la línea dispersiva.
- 40
6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la línea dispersiva es acabada por un espejo por encima del cual está dispuesta una máscara de fase y de amplitud (36).
- 45
7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** los medios de compensación (4) están integrados en los medios de barrido (5).
- 50
8. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el láser pulsado (2) y los medios de compensación (4) son sintonizables en longitud de onda.
- 55
9. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** consta además de medios de inyección dispuestos en el lado próximo de la guía de imagen (8) y que permiten enfocar por turno el haz láser de excitación en una fibra determinada de la guía de imagen (8).
- 60
10. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** consta además de primeros medios de detección para detectar una señal de fluorescencia que proviene de la muestra (10).
- 65
11. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** consta además de un filtro dicroico apto que dirige las señales procedentes de la muestra (10) hacia medios de detección.
12. Sistema según la reivindicación 11, **caracterizado porque** dicho filtro dicroico está dispuesto entre los medios de barrido (5) y la guía de imagen (8).
13. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el láser pulsado (2) es un láser femtosegundo.
14. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** el láser pulsado (2) es un láser picosegundo.

15. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la guía de imagen (8) está compuesta por una pluralidad de fibras ópticas monomodos ordenadas.
- 5 16. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** consta de una cabeza óptica (9) para enfocar el haz láser de excitación saliente de la guía de imagen (8) en la muestra (10).
- 10 17. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** la guía de imagen (8) está constituida por varios millares de fibras ópticas y no tiene cabeza óptica, de modo que los extremos distales de la guía de imagen (8) están dispuestos para colocarse al descubierto directamente en contacto con la superficie de la muestra (10).
- 15 18. Procedimiento de diagnóstico por imagen multifotónica fibrada de una muestra (10), en el cual se genera un haz láser de excitación multifotónico por un láser pulsado (2), que consta de las etapas siguientes:
- 20 - se barre la muestra (10) dirigiendo por turno el haz láser de excitación en una fibra de una guía de imagen (8) constituida por una pluralidad de fibras ópticas,
- se ilumina la muestra (10) por un barrido punto por punto a partir del haz láser de excitación que proviene de la guía de imagen (8), y
- se detecta una señal de fluorescencia emitida por la muestra (10)
caracterizado porque consta además de las etapas siguientes:
- 25 - se hace pasar el haz láser de excitación por medios de compensación (4) dispuestos entre el láser pulsado (2) y la guía de imagen (8) para compensar efectos de dispersión de velocidad de grupo y efectos no lineales de los impulsos de excitación en la guía de imagen (8), la dispersión lineal y los efectos no lineales en la guía de imagen (8) modificando el perfil temporal y espectral del impulso de excitación que vuelve a ser sensiblemente idéntico al perfil (18) del impulso saliente del láser, los medios de compensación constan de un trozo de fibra óptica seguido por una línea dispersiva, el trozo de fibra óptica está constituido por una única fibra óptica monomodo, el diámetro del modo de esta fibra monomodo es superior al diámetro del modo de los núcleos de la guía de imagen, este trozo de fibra hace aparecer efectos no lineales de ensanchamiento espectral, la línea dispersiva introduce un índice de dispersión de velocidad anormal de grupo, retrasando los fotones más rojos del espectro láser de modo que el impulso (19) saliente de la línea dispersiva sea más largo que el del (18) saliente del láser.
- 30
- 35 19. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado porque** se detecta el conjunto de la señal de fluorescencia saliente de la guía de imagen (8).

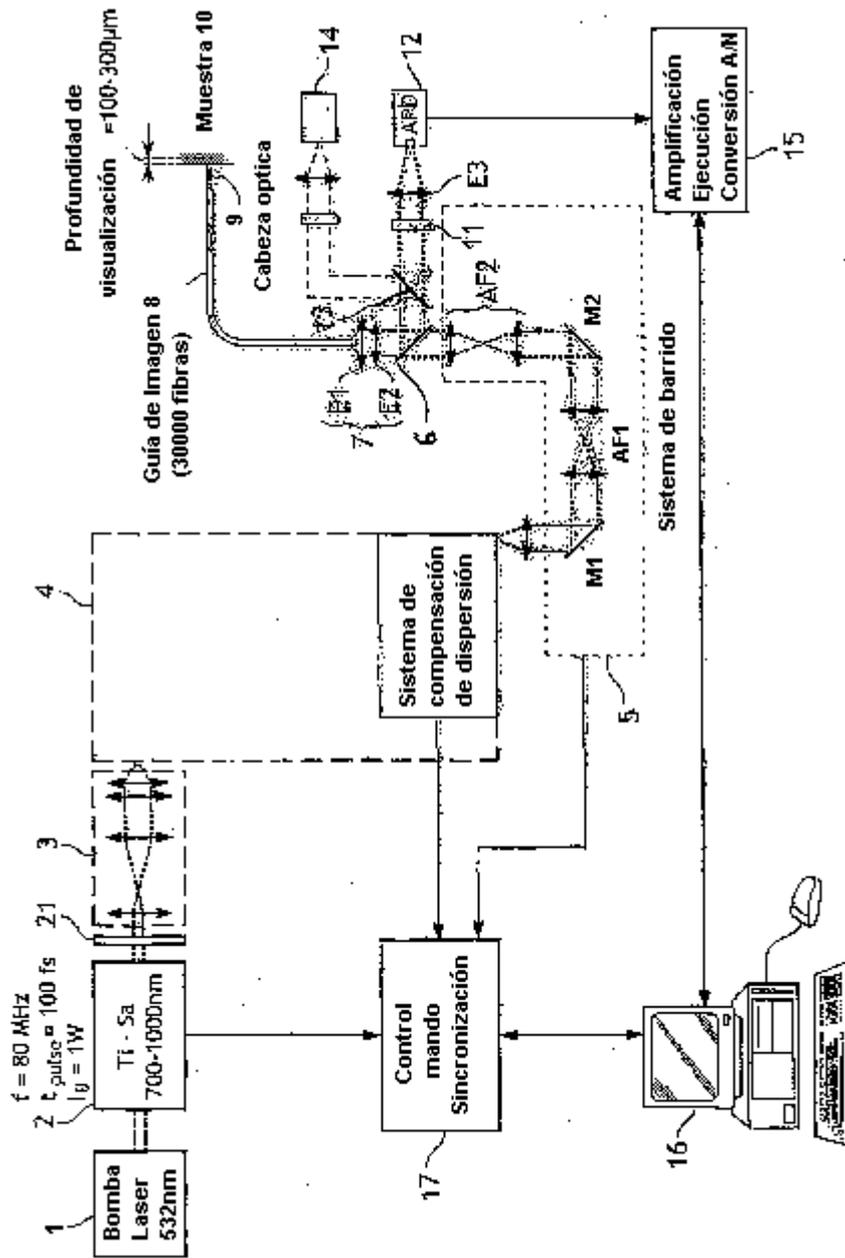


FIG. 1

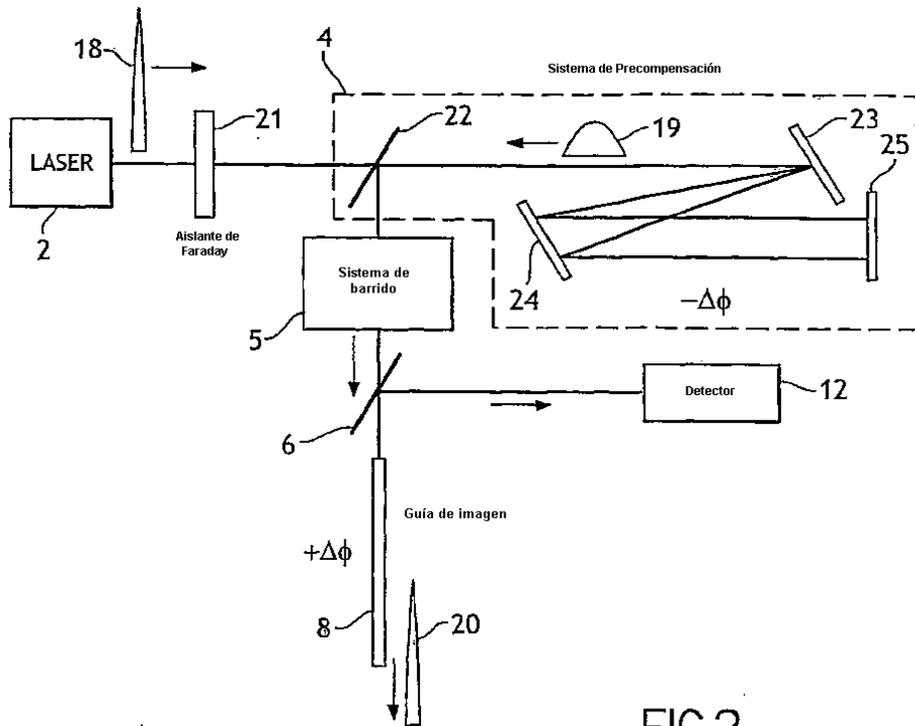


FIG.2

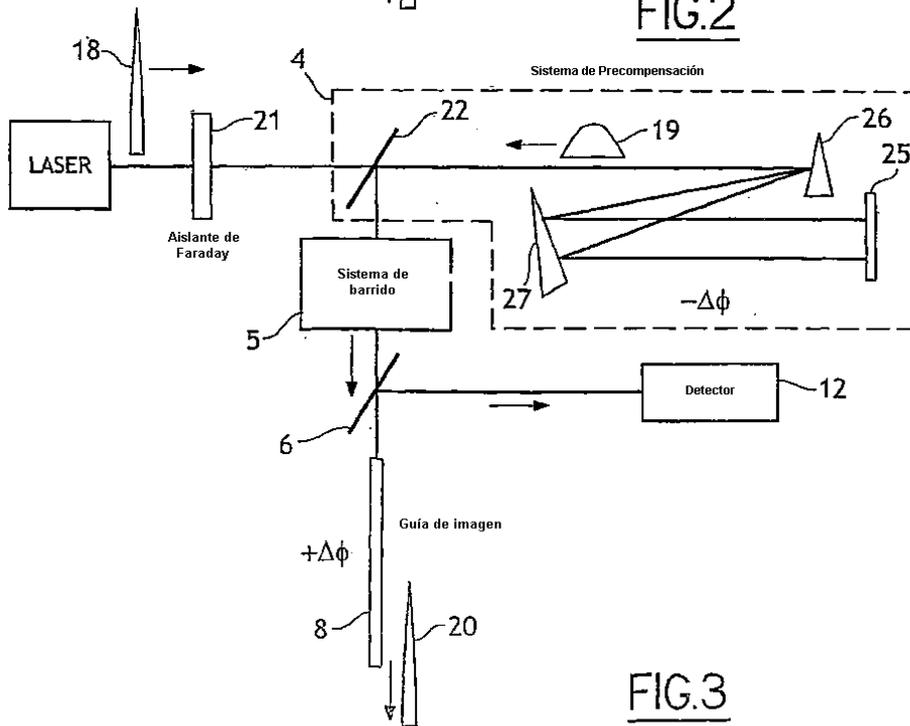


FIG.3

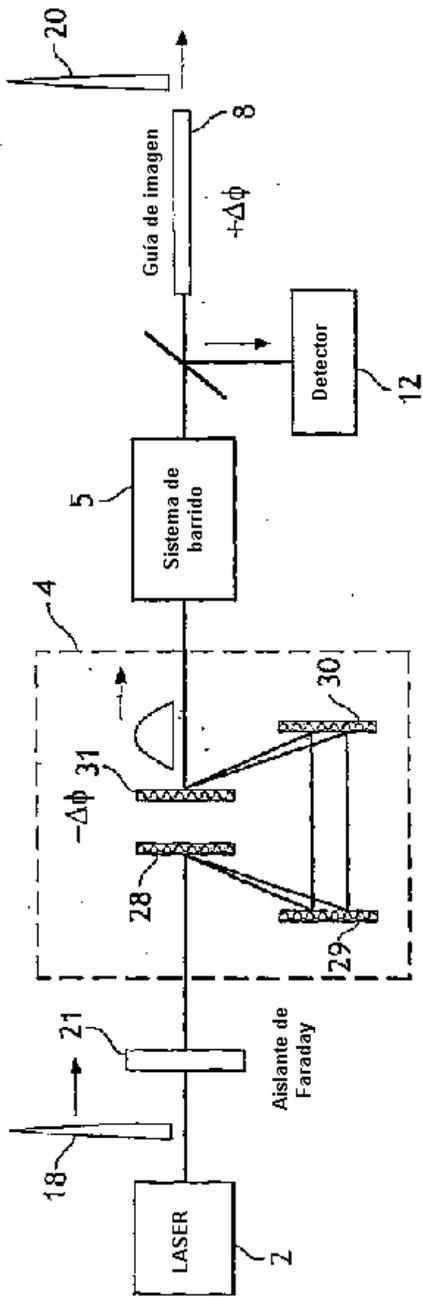


FIG.4

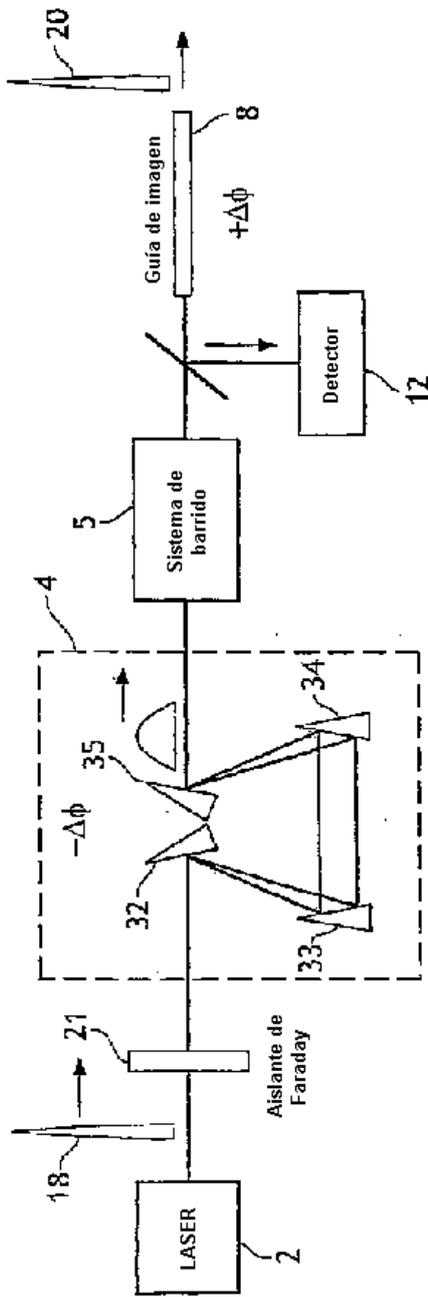


FIG.5

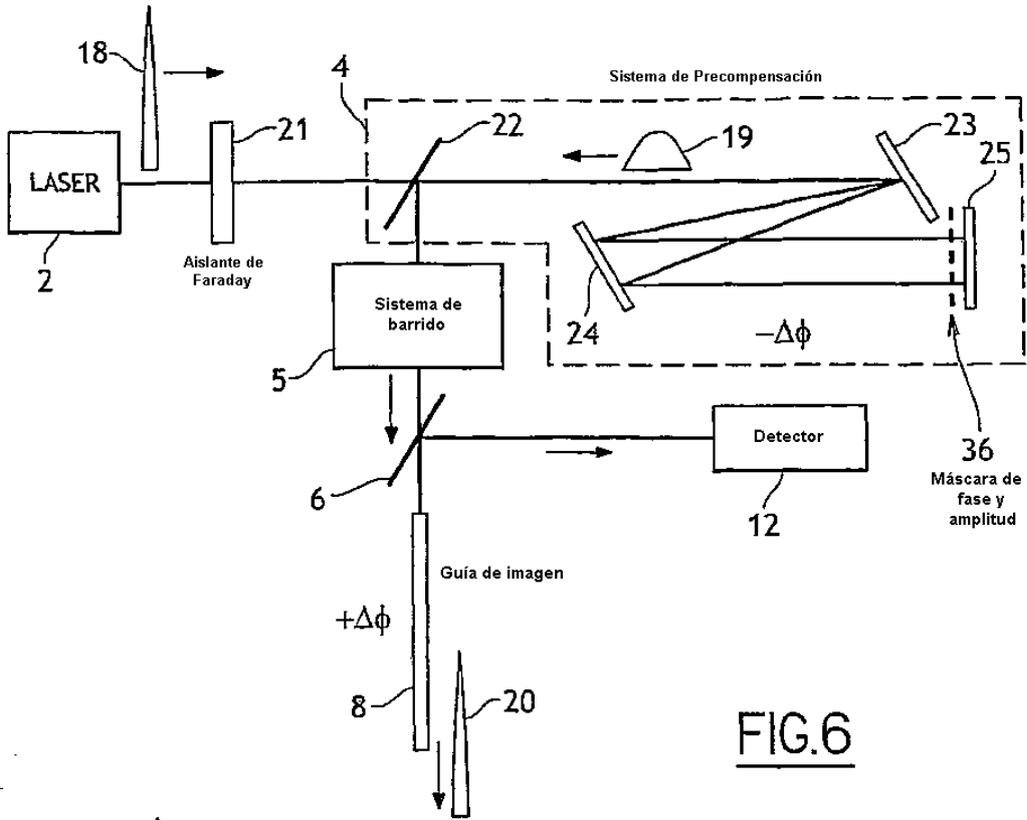


FIG. 6

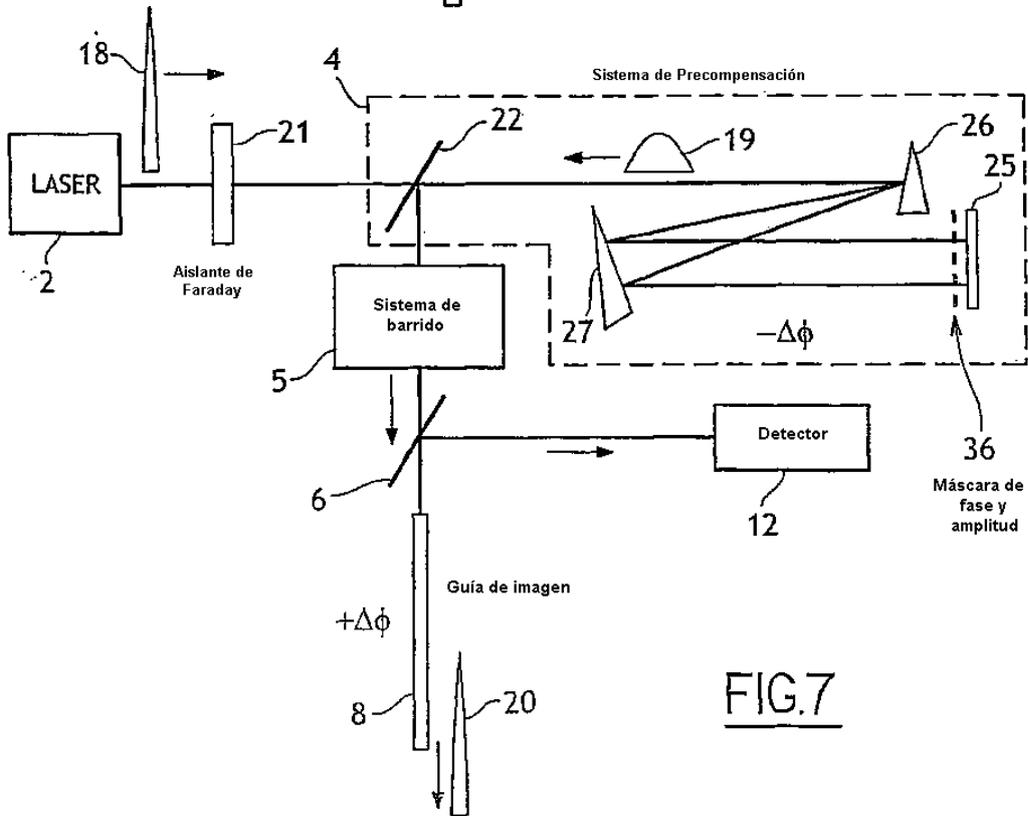
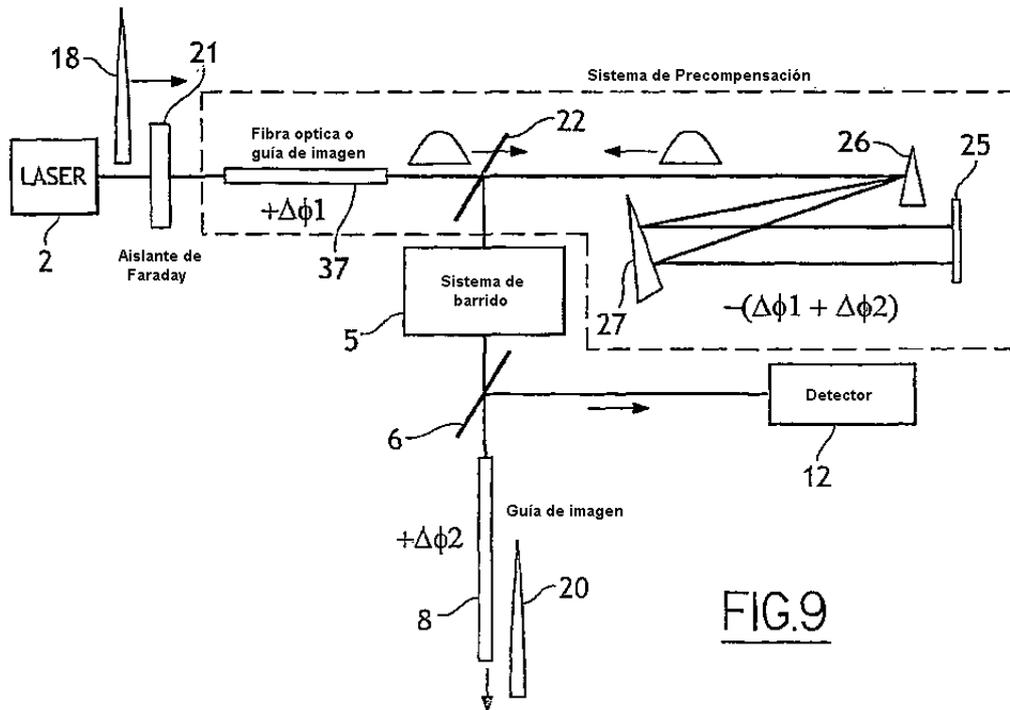
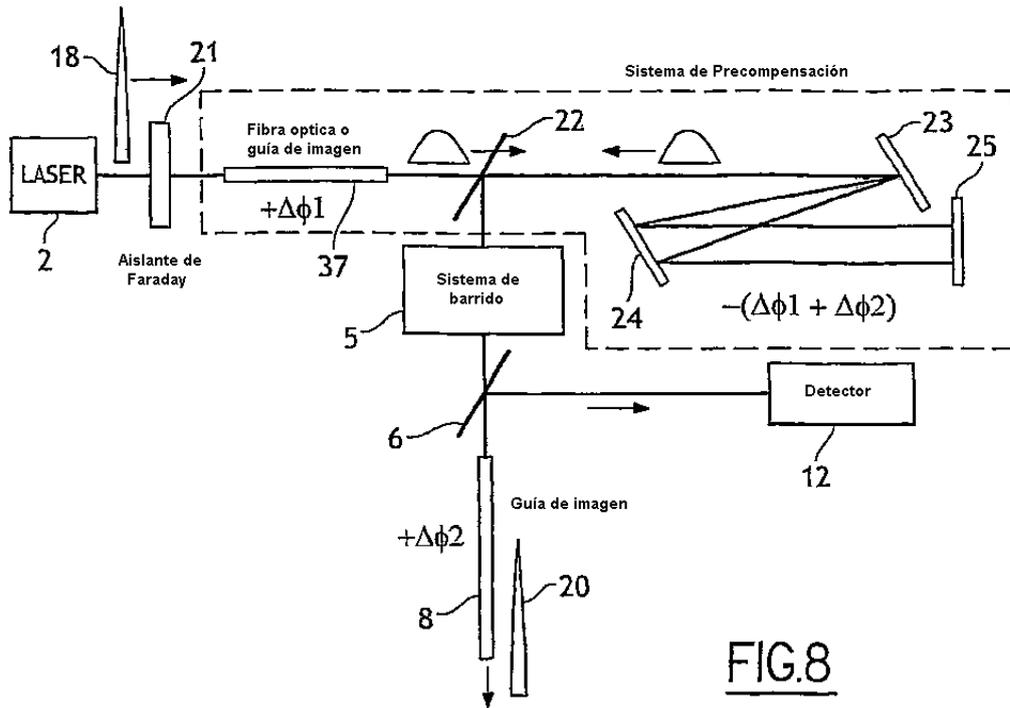


FIG. 7



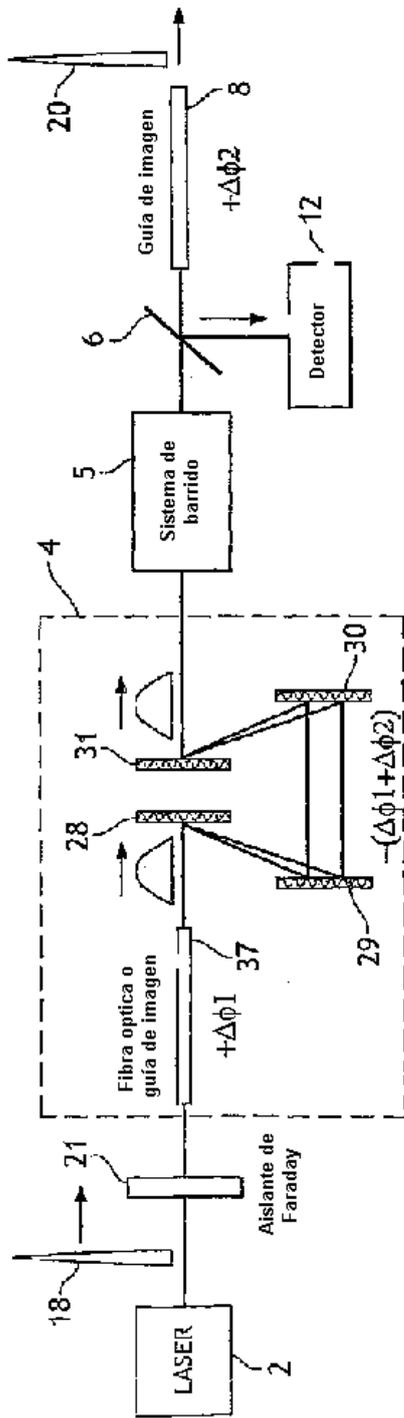


FIG.10

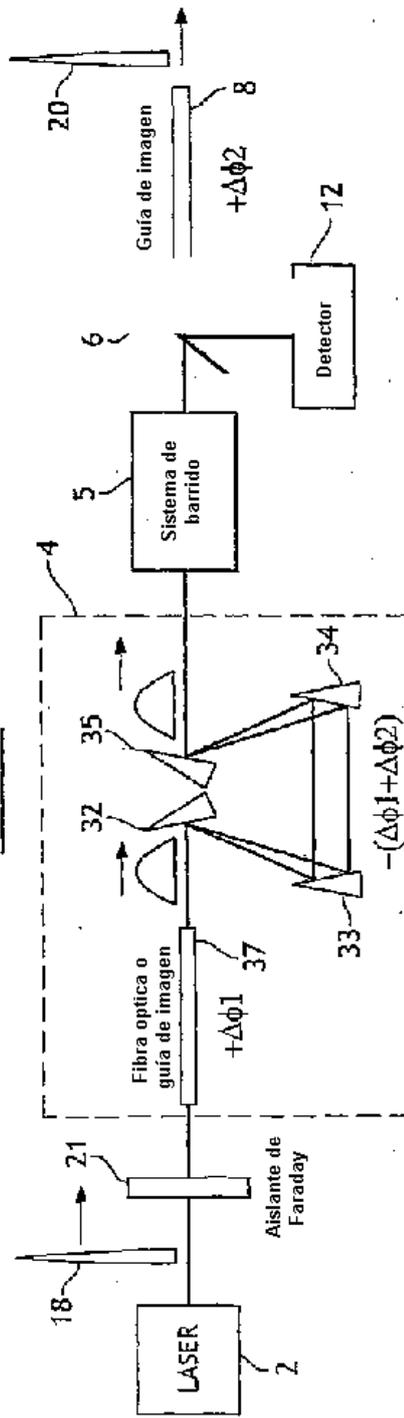


FIG.11

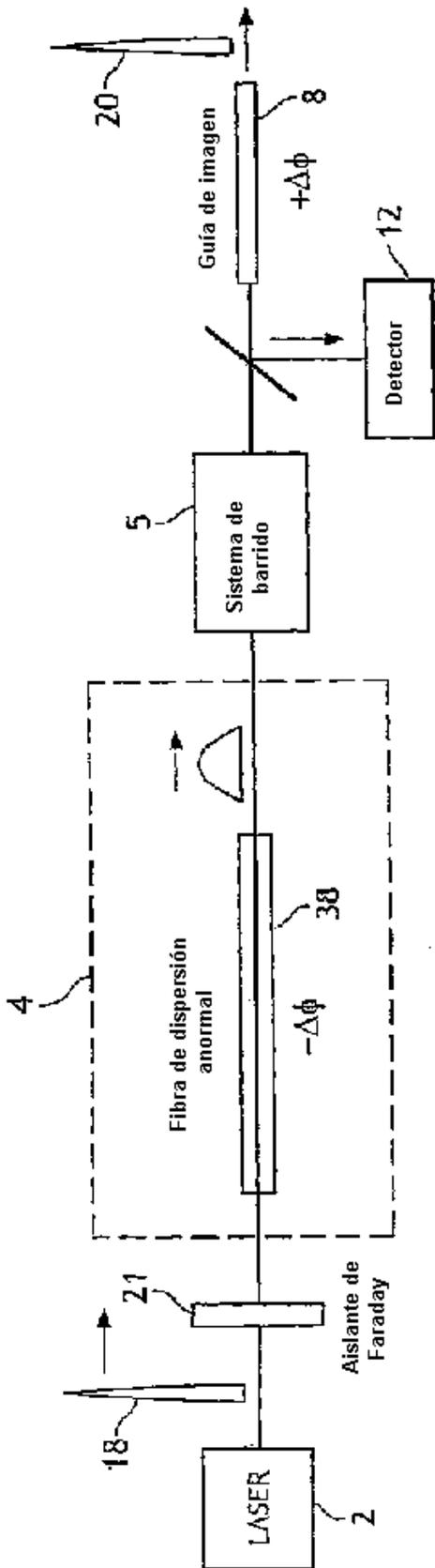


FIG.12

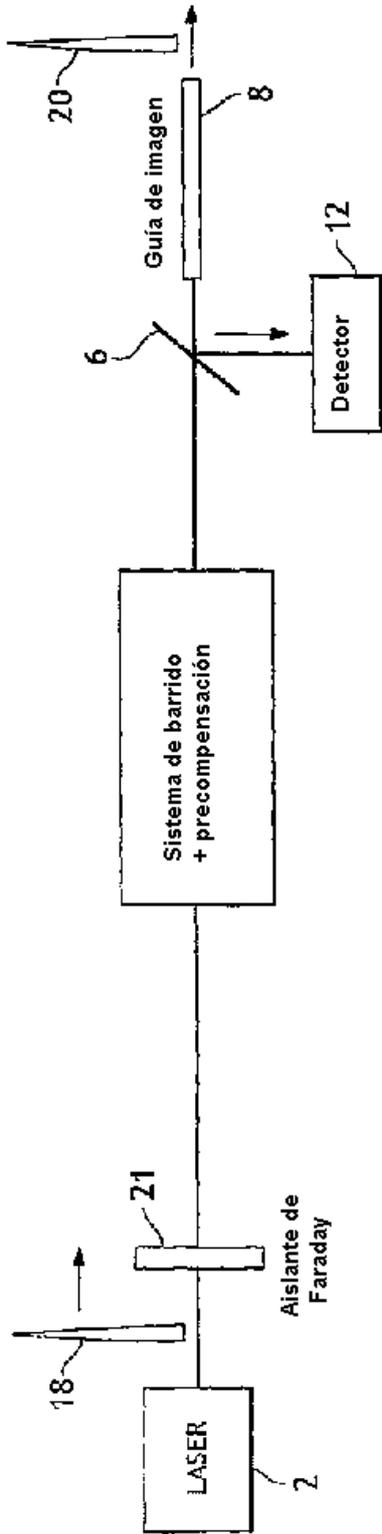


FIG.13

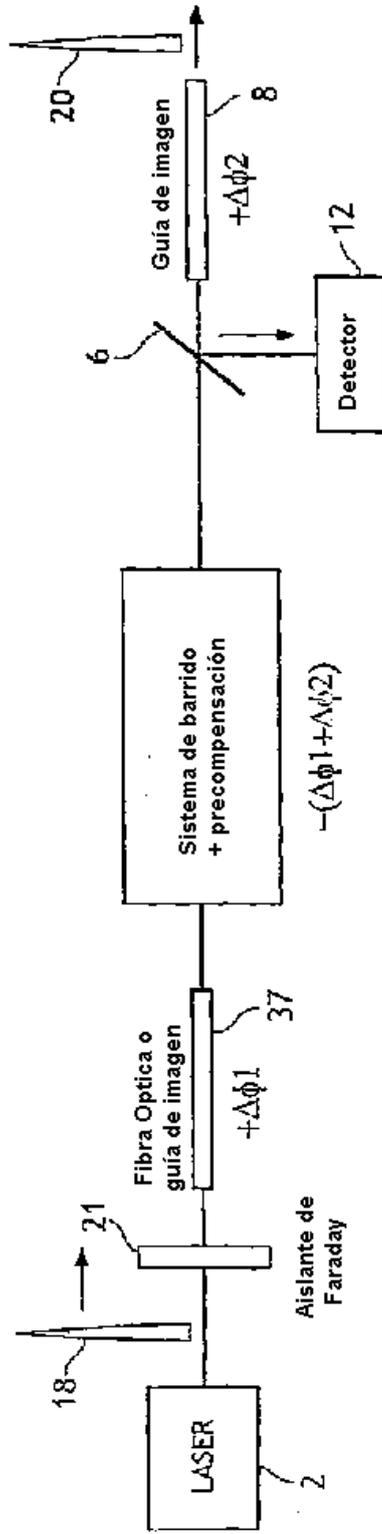


FIG.14