

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 433**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

G02B 5/00 (2006.01)

G02B 21/00 (2006.01)

G02B 23/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2005 E 05777324 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1766373**

54 Título: **Procedimiento y sistema de diagnóstico por imagen microscópica de fluorescencia de fibras de multimarco**

30 Prioridad:

14.06.2004 FR 0406396

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

03.05.2013

73 Titular/es:

**MAUNA KEA TECHNOLOGIES (100.0%)
9, RUE D'ENGHIEN
75010 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

**VIELLEROBE, BERTRAND;
JEAN, FLORENCE;
BOURG-HECKLY, GENEVIÈVE y
LOISEAU, ALEXANDRE**

74 Agente/Representante:

DÍAZ NUÑEZ, Joaquín

ES 2 402 433 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

Procedimiento y sistema de diagnóstico por imagen microscópica de fluorescencia de fibras de multimarcado

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento y un sistema para realizar una imagen microscópica fibrada de fluorescencia de una muestra. El campo de aplicación aludido es más particularmente el del diagnóstico por imagen *in vivo* e *in situ*.
- 10 **[0002]** La fluorescencia observada puede provenir de un compuesto exógeno (normalmente un marcador administrado) o un compuesto producido por células (de tipo marcador transgénico) de un tejido biológico.
- 15 **[0003]** Se conoce el documento US6148227 que describe un sistema de autofluorescencia de los tejidos. Un haz luminoso excita un fluoróforo endógeno del tejido. La señal emitida se separa en una señal roja y en una señal verde. Después, estas señales se tratan de modo electrónico para obtener una imagen bicolor. El documento US6343228 describe un sistema de diagnóstico por imagen de fluorescencia en el que la imagen de fluorescencia se normaliza a partir de una imagen de reflectancia. El sistema comprende una primera vía para excitar el fluoróforo endógeno del tejido y una segunda vía para recuperar la señal emitida por fluorescencia y reflectancia. El documento WO 0043552 describe un circuito integrado, llamado "biochip", que tiene por objeto detectar varios compuestos químicos. Este biochip comprende numerosos detectores que incluyen un detector de fluorescencia. Un láser o un diodo emisor de luz emite un haz luminoso para excitar un elemento diana que, en respuesta, genera una señal de modo inherente o por inyección de un marcador apropiado. La señal emitida puede ser una señal de fluorescencia, de fosforescencia o de difusión Raman. Los caminos ópticos entre el flujo incidente y la señal emitida por el elemento diana son diferentes.
- 20 **[0004]** El inconveniente de la técnica anterior que se ha descrito anteriormente, es que ninguno de estos tres documentos permite realizar particularmente una imagen confocal fibrada ni una imagen fibrada de alta resolución.
- 25 **[0005]** La presente invención se refiere particularmente a un sistema de diagnóstico por imagen microscópica fibrada en el cual se explora una muestra por medio de una señal de excitación a través de un camino óptico, y se detecta la señal de fluorescencia procedente de dicha muestra, al tomar la señal de excitación y la señal de fluorescencia el mismo camino óptico. Por el contrario, al microscopio llamado de sobremesa, el sistema de diagnóstico por imagen microscópica, en particular en el campo de la endoscopia según un objetivo de aplicación de la presente invención, permite obtener una imagen desfasada que conserva una resolución microscópica.
- 30 **[0006]** Finalmente, puede mencionarse el documento WO 2004/008952 de la técnica anterior relevante, que propone un procedimiento para realizar una imagen confocal de fluorescencia *in vivo in situ*, para optimizar la calidad de cada imagen y obtener una excelente resolución lateral y axial. Según un primer aspecto de este procedimiento para la realización de una imagen confocal, se utiliza una guía de imagen hecha de varios millares de fibras ópticas y que consisten en explorar punto por punto en un plano, en particular subsuperficial, de una muestra, cada punto correspondiente a una señal de excitación emitida por una fuente continua, desviada e inyectada en una de las fibras ópticas del haz luego enfocado, particularmente con la ayuda de un cabezal óptico, a la salida de la fibra en el plano, emitiendo cada punto a cambio una señal de fluorescencia recogida por la fibra óptica, después detectada y digitalizada para formar un elemento de imagen. El carácter confocal se obtiene utilizando el cabezal óptico para enfocar el haz en la muestra, y utilizando como orificio de filtración espacial la misma fibra óptica para transportar la señal de excitación y la señal de fluorescencia emitida en reacción.
- 35 **[0007]** Según un segundo aspecto de este procedimiento para la realización de una imagen de fluorescencia de alta resolución, no confocal, con relación al primer aspecto, se coloca aquí el extremo desnudo de las fibras directamente en contacto de la superficie de la muestra que hay que tratar con imágenes, siendo cada fibra capaz para producir un haz divergente susceptible de excitar un microvolumen de la muestra situada de la superficie hasta una profundidad máxima dependiente particularmente del diámetro del núcleo de las fibras ópticas. Las imágenes obtenidas no son "confocales" porque no provienen de un plano planigráfico subsuperficial explorado punto por punto. Sin embargo, pueden cualificarse como imágenes "altamente resueltas" ya que se producen mediante la exploración por turnos de microvolúmenes situados directamente bajo la superficie y de una filtración espacial de la señal de fluorescencia emitida por cada microvolumen por la misma fibra que la que ha servido para la excitación.
- 40 **[0008]** En cada caso, para los dos aspectos, se desvía la señal de excitación a una velocidad correspondiente a la adquisición de varias imágenes por segundo que basta para una utilización en tiempo real y se detecta la señal de fluorescencia a una frecuencia de detección correspondiente a una frecuencia mínima de muestreo de las fibras una a una. El respeto de la preparación de muestras de las fibras (según el criterio de Shannon) permite obtener una imagen punto por punto correspondiendo bien a cada fibra. Esto permite no perder información preparando muestras del conjunto de las fibras una a una respetando un número medio mínimo de imágenes por segundo, a saber en la práctica al menos 12 imágenes por segundos para un modo máximo de 896 x 640 píxeles. La elección de la frecuencia de detección (banda concurrida del detector) con arreglo a esta preparación de muestras mínima permite luego para cada fibra detectar el número más grande posible de fotones de fluorescencia. Así, según un modo de
- 45
50
55
60
65

realización posible, aplicando una guía de imagen de cerca de 30.000 fibras ópticas flexibles, la frecuencia de preparación de muestras y la banda concurrída del sistema de detección (fotodiodo de avalancha o equivalente) son fijadas sensiblemente sobre 1,5 MHz, que corresponde aproximadamente a 12 píxeles por fibra, permitiendo entonces obtener al menos las 12 imágenes/s. en modo máximo 896 x 640 píxeles. En la práctica, la desviación del haz se ajusta determinando una frecuencia de resonancia rápida de un espejo resonante "línea" y una frecuencia de resonancia lenta de un espejo galvanométrico "trama". Esto permite un barrido rápido apropiado de las fibras para obtener una imagen en tiempo real.

[0009] El artículo «multiespectral imaging with a confocal microendoscope», Andrew R. Rouse and Arthur F. Gmitro, Optics Letters, Vol. 25, Núm. 23, 1 de diciembre de 2000, páginas 1708-1710, divulga un procedimiento para realizar una imagen multiespectral microscópica fibrada de fluorescencia de una muestra.

[0010] La presente invención tiene por objeto enriquecer en información las imágenes obtenidas por un sistema de diagnóstico por imagen confocal de fluorescencia. Otro fin de la invención es el control de la evolución del comportamiento de elementos bien identificados.

[0011] Se alcanza al menos uno de los fines precitados con un procedimiento según la reivindicación 1.

[0012] La señal de excitación puede derivarse de varias otras señales de longitudes de ondas diferentes.

[0013] La presente invención permite así realizar una multimarcación, es decir que se detecta en la muestra que puede ser un tejido humano o animal, al menos dos fluoróforos, es decir colorantes o marcadores. Cada fluoróforo emite una señal de una longitud de onda determinada cuando es excitado por un haz luminoso adecuado. Preferentemente, las señales de fluorescencia emitidas al menos por los dichos dos fluoróforos presentan longitudes de onda bastante alejadas una de la otra de modo que estas señales de fluorescencia sean disociables por filtración espectral. No obstante cuando las señales de fluorescencia emitidas al menos por dichos dos fluoróforos presentan bandas de longitudes de onda que se superponen totalmente o en parte, la discriminación puede hacerse, como se verá a continuación, por emisión secuencial, detección fina por filtración en caso de solapamiento o detección secuencial en caso de superposición total.

[0014] Con el procedimiento según la invención, cada fluoróforo inyectado puede marcar un elemento preciso. Este fluoróforo puede administrarse de forma eficaz (fluoróforo exógeno) o puede estar presente en la muestra. El último caso comprende por ejemplo cualquier animal transgénico que expresa uno o más fluoróforos. Por lo tanto, la imagen obtenida pone de manifiesto estos diferentes elementos con colores diferentes. Estos colores pueden ser arbitrarios, es decir "falsos" colores o incluso colores que corresponden de forma eficaz a las longitudes de onda de las señales de fluorescencia emitidas por los fluoróforos. Haciendo visible la imagen, particularmente en tiempo real, se puede seguir la evolución de los elementos. Por ejemplo, se pueden aplicar estímulos para hacer visible la reacción de cada elemento. El multimarcado permite obtener una imagen que distingue claramente, por colores diferentes, los diferentes elementos marcados. La imagen final puede contener tantos colores como fluoróforos inyectados. Así, un primer fluoróforo puede tener un papel morfológico o espacial, es decir marcar la arquitectura celular por ejemplo, poner en evidencia el esqueleto, el recipiente. Un segundo fluoróforo puede tener un papel funcional como marcar las proteínas o los iones para supervisar su actividad, y así hacer un seguimiento del recipiente. En calidad de ejemplo, es posible ver la actividad del calcio, marcado por el primer fluoróforo, en neuronas marcadas por el segundo fluoróforo. Por ejemplo, es posible determinar fácilmente el índice nucleoplásmico (superficie de núcleo con respecto a una superficie celular) marcando uno y otro con dos fluoróforos según la invención. Un experto en la técnica comprenderá fácilmente que cada fluoróforo puede tener un papel funcional, morfológico, etc.

[0015] La presente invención puede tener numerosas aplicaciones, en particular allí dónde se requieren procedimientos no invasivos o poco invasivos. Por ejemplo, estas aplicaciones son la endoscopia uretral cuando se inserta una sonda óptica con un diámetro inferior a 1 mm en una vejiga, por ejemplo; la colonoscopia del animales pequeños; 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.

[0016] Según una realización ventajosa de la invención, se excitan simultáneamente dichos al menos dos fluoróforos. Además, cuando se detectan simultáneamente las señales de fluorescencia de dichos al menos dos fluoróforos, se puede así trabajar en tiempo real, por ejemplo, con doce imágenes por segundo. Por lo tanto, la presente invención permite una adquisición *in vivo* e *in situ*.

[0017] Como alternativa, se pueden excitar secuencialmente dichos al menos dos fluoróforos. Los fluoróforos son pues excitados unos tras otros. En el caso en el que se inyectan dos fluoróforos y se utiliza un sistema de adquisición de imágenes en tiempo real de doce imágenes por segundo, se obtiene una imagen final a una velocidad de seis imágenes por segundo.

- [0018] También es posible detectar secuencialmente las señales de fluorescencia de dichos al menos dos fluoróforos.
- 5 [0019] Por lo tanto, se entiende que la puesta en práctica preferida se base en emisiones simultáneas para detecciones simultáneas con el fin de obtener una imagen final en tiempo real. En calidad de ejemplo, se pueden utilizar dos emisores láser que emiten en dos longitudes de onda diferentes para excitar dos fluoróforos que también emiten en dos longitudes de onda diferentes.
- 10 [0020] Ventajosamente, en cada caso, la muestra se explora a una velocidad que corresponde a la adquisición de varias imágenes por segundo suficiente para una utilización en tiempo real. Además, se detectan las señales de fluorescencia a una frecuencia de detección correspondiente a una frecuencia mínima de muestreo de las fibras una a una. La exploración permanece a la velocidad en tiempo real, ésta es la producción de la imagen final que depende del modo de detección: simultánea o secuencial.
- 15 [0021] Preferentemente, para elaborar dicha imagen final, se elaboran primero tantas imágenes primarias como señales de fluorescencia detectadas, se colorea cada imagen primaria que sigue un color afectado por el fluoróforo correspondiente, después se superponen las dichas imágenes primarias para constituir la imagen final. La etapa de superposición puede también ser una fusión o transparencia 50/50.
- 20 [0022] Según la invención, se adquiere un espectro (intensidad en función de la longitud de onda) de cada imagen a partir de una parte de la señal que proviene de la muestra a través del camino óptico.
- 25 [0023] De acuerdo con una variante y para una imagen determinada, se adquiere además un espectro únicamente de una zona de interés a partir de una parte de la señal que proviene de la muestra a través del camino óptico. El análisis espectral de una zona determinada en el tiempo aporta una información pertinente suplementaria a la imagen final. Por lo tanto, es posible supervisar y determinar de modo exhaustivo la evolución de los elementos marcados así como su reacción frente a estímulos.
- 30 [0024] En la práctica, para la realización del espectro, se toma aproximadamente el veinte por ciento de la señal que proviene de la muestra para no comprometer la calidad de las imágenes.
- [0025] Según la invención, se determinan las dichas zonas de intereses, previamente a la adquisición de dicho espectro, realizando una primera fase de adquisición de imagen, definiendo luego las dichas zonas de interés sobre la imagen obtenida.
- 35 [0026] Además, para adquirir el espectro únicamente sobre zonas de intereses de una imagen, se puede utilizar un conmutador, comúnmente denominado "obturador", dirigiendo una parte de la señal que proviene de la muestra hacia un espectrómetro en los instantes predeterminados correspondientes a los instantes en que la señal de excitación explora dicha zona de interés. Se pueden utilizar otros conmutadores rápidos como un espejo controlado o un deflector acústico-óptico.
- 40 [0027] Se puede utilizar también un láser pulsado de alta frecuencia para emitir la señal de excitación, que se activa únicamente para la exploración de dicha zona de interés.
- 45 [0028] La presente invención también tiene por objeto un sistema según la reivindicación 8.
- [0029] Preferentemente, el sistema según la invención utiliza como base, el aparato como el que se describe en el documento WO 2004/008952 de Mauna Kea Technologies.
- 50 [0030] La exploración de la señal de excitación puede hacerse en un plano subsuperficial, superficial o en un volumen de la muestra.
- [0031] Los medios de excitación pueden comprender un emisor, tal como, por ejemplo, un láser, apto para excitar simultáneamente dichos al menos dos fluoróforos. En efecto existen dispositivos láser, que emiten particularmente en 405 nm, que son capaces de excitar dos fluoróforos a la vez. En este caso, a la recepción, se puede disponer de un fotodetector que detecta las señales de fluorescencia de modo secuencial, o dos fotodetectores (tantos fotodetectores como fluoróforos) que detectan simultáneamente las señales de fluorescencia cuando estos últimos son espectralmente disociables.
- 55 [0032] Preferentemente, los medios de excitación comprenden al menos dos emisores (dos láseres particularmente), que excitan, simultáneamente o secuencialmente, dichos al menos dos fluoróforos. En este caso, cada emisor es apto para excitar preferentemente un único fluoróforo.
- 60

- 5 **[0033]** Idealmente se dispone de tantos emisores de radio como detectores con el fin de excitar y detectar de modo simultáneo y de elaborar una imagen en tiempo real (doce imágenes por segundo).
- 10 **[0034]** Los dos emisores de señales de excitación son ventajosamente dos láseres que emiten respectivamente en 488 nm y 635 nm, reaccionando los dos fluoróforos en la muestra respectivamente a estas dos longitudes de onda.
- 15 **[0035]** En otra realización, los medios de detección pueden comprender un receptor, tal como un fotodetector en particular, combinado con un medio de filtración, un filtro paso-banda sintonizable por ejemplo, que deja pasar secuencialmente cada una de las señales de fluorescencia emitida al menos por dichos dos fluoróforos.
- 20 **[0036]** Pero, preferentemente, los medios de detección comprenden más bien al menos dos receptores combinados con un separador, tal como un filtro dicróico que es apto para enviar, en función de la longitud de onda, cada señal de fluorescencia hacia un receptor determinado
- 25 **[0037]** En un modo de detección multivías, se pueden utilizar varios filtros paso-banda sintonizables y/o varios filtros dicróicos sintonizables. De forma análoga durante la emisión, se puede utilizar un solo láser que emite a varias longitudes de ondas de forma simultánea.
- 30 **[0038]** Ventajosamente, los medios de exploración exploran la muestra a una velocidad que corresponde a la adquisición de varias imágenes por segundo suficiente para una utilización en tiempo real. Además, los medios de detección detectan las señales de fluorescencia a una frecuencia de detección correspondiente a una frecuencia mínima de muestreo de las fibras una a una.
- 35 **[0039]** Según una realización preferida, la guía de imagen está constituida por varios millares de fibras ópticas, estando esta guía precedida por los medios de exploración y seguida de un cabezal óptico para enfocar la señal de excitación en la muestra.
- 40 **[0040]** Según una variante de realización, la guía de imagen puede estar constituida por una fibra óptica, estando los medios de exploración integrados en el cabezal óptico situado entre la guía de imagen y la muestra.
- 45 **[0041]** Según otra variante de realización, la guía de imagen puede estar constituida por varios millares de fibras ópticas cuyos extremos distales están destinados a colocarse desnudos directamente en contacto con la superficie de la muestra. En este caso, cada fibra está adaptada para producir un haz divergente susceptible de excitar un microvolumen de la muestra situada desde la superficie hasta una profundidad máxima dependiente particularmente del diámetro del núcleo de las fibras ópticas.
- 50 **[0042]** El sistema puede comprender además un espectrómetro apto para elaborar un espectro a partir de una parte de la señal que proviene de la muestra. Por lo tanto, se produce un acoplamiento entre un sistema de diagnóstico por imagen de fluorescencia, particularmente confocal, fibrada y una vía de análisis espectroscópico. Este espectrómetro puede combinarse con un obturador que dirige una parte de la señal que proviene de la muestra hacia el espectrómetro en los instantes predeterminados que corresponden a los instantes en que la señal de excitación explora una zona de interés. Como alternativa, para adquirir el espectro únicamente sobre una zona de interés de una imagen, los medios de excitación pueden comprender al menos un láser pulsado de alta frecuencia, estando este láser pulsado activado únicamente en el momento de la exploración de dicha zona de interés. Se observa que la espectroscopia también es confocal cuando se utiliza un sistema de adquisición de imagen confocal. También es de alta resolución, no confocal, cuando se utiliza un sistema de adquisición de imagen de alta resolución no confocal.
- 55 **[0043]** Según la invención, la unidad de tratamiento comprende medios de sincronización de los medios de excitación y medios de recepción.
- 60 **[0044]** Según la invención, el tratamiento de imagen realizado después sobre el flujo detectado se optimiza con el fin de obtener una imagen de muy buena calidad a partir del flujo limitado de fotones detectado. Esta optimización se realiza de la siguiente manera.
- [0045]** Se realiza una serie de etapas anteriores a la adquisición de imágenes en tiempo real:
- Una etapa de detección del emplazamiento de cada fibra de un conjunto escogido de fibras destinadas a ser utilizadas (el conjunto de la guía de imagen o un subconjunto escogido); esta etapa se tiene que realizar al menos cada vez que cambie la guía de imagen;
 - Una etapa de calibrado de la velocidad de inyección en cada fibra, es decir, de definición de una velocidad de inyección específica para cada fibra; y
 - Una etapa de detección de la imagen de fondo (sin muestra).

[0046] Durante el funcionamiento, la optimización del tratamiento de la imagen comprende particularmente las etapas que, después de la digitalización de la señal detectada, consisten en:

- 5 - Definir el flujo real recogido por cada fibra, es decir, que proviene sólo de la muestra, después de la corrección en función de la velocidad de inyección específica para la fibra y de la sustracción de la imagen del fondo, para obtener una señal corregida;
- Después realizar una reconstrucción de la imagen a partir de esta señal corregida, en particular con el fin de transformar una imagen que presenta un mosaico de fibras en una imagen sin fibras aparentes.

10 **[0047]** Según la invención, estas dos últimas etapas se realizan ventajosamente en tiempo real. En cuanto a la corrección de la señal, ésta puede hacerse en tiempo real gracias a un tratamiento adaptado a la estructura de la señal observada y un algoritmo optimizado. En cuanto a la reconstrucción de la imagen, puede hacerse gracias a la elección de un número de operaciones por píxel que pueden realizarse en tiempo real haciendo posible obtener el resultado deseado en cuando a calidad de imagen. Una filtración por el paso bajo Gaussiano representa un buen
15 compromiso entre la complejidad del tratamiento, la calidad del resultado y el tiempo de cálculo.

[0048] Otras ventajas y características de la invención serán evidentes al examinar la descripción detallada de una realización que no es de ninguna manera limitante, y los dibujos adjuntos, en los que:

- 20 - La figura 1 es una vista esquemática del sistema de adquisición según la invención;
- La figura 2 es una vista esquemática que ilustra la elaboración de una imagen final según la invención a partir de dos imágenes primarias que muestran cada uno de los elementos coloreados por un fluoróforo determinado;
- La figura 3 también es una vista esquemática que ilustra la elaboración de otra imagen final según la invención a partir de otras dos imágenes primarias que muestran cada uno de los elementos coloreados por un fluoróforo
25 determinado; y
- La figura 4 es una vista esquemática de un conmutador acústico-óptico.

[0049] A continuación, se describirá, de modo no limitante, el sistema según la invención para la realización de imagen confocal de alta definición en el caso de dos fluoróforos presentes en la muestra. Esta última puede ser un
30 tejido biológico o un cultivo celular.

[0050] El sistema comprende dos vías de excitación y dos vías de detección para realizar eficazmente imágenes en tiempo real. Para cada vía, la fuente luminosa 1, 2 es un láser que emite a una longitud de onda de excitación que permite excitar un fluoróforo determinado, por ejemplo 488 nm y 635 nm respectivamente. Cada fuente luminosa es
35 apta para excitar un fluoróforo. Para optimizar la inyección en una de las fibras de la guía de imagen 6, el haz de excitación es circular para poder inyectar una fibra de sección igualmente circular y, para optimizar el índice de inyección, el láser es preferentemente monomodo longitudinal para presentar el mejor frente de onda posible para la inyección en una fibra óptica débilmente multimodo. La potencia disponible en la salida del láser es de al menos 20 mW. Para la adquisición de imágenes, el láser puede emitir de manera continua y estable (el ruido más débil posible, <el 1%). A modo de ejemplo, se puede utilizar un láser de pozo cuántico (VCSEL), un láser sólido bombeado por diodos, un diodo láser o un láser de gas, tal como un láser de gas de argón. En este caso y como se verá más adelante, cada láser puede ser utilizado en modo pulsado a una frecuencia superior a 100 MHz, para realizar
40 espectroscopías únicamente sobre zonas de interés.

[0051] En la salida de la fuente 1, 2, están colocados los medios "expansores" 3, 4 para conformar el haz láser de excitación. Están constituidos por un sistema de aumento óptico afocal diferente de 1, que comprendiendo lentes que permiten la modificación del diámetro del haz láser. El aumento se calcula de tal manera que el diámetro del haz se adapte a los medios de inyección 10 en una fibra.

[0052] Después, el haz láser de excitación conformado se dirige hacia los medios 5, 6 previstos para separar las longitudes de ondas de excitación y de fluorescencia. Se trata por ejemplo de un filtro dicróico que tiene una eficacia de transmisión del 98 al 99% a la longitud de onda de excitación y que refleja pues sensiblemente otras longitudes de onda. La señal de fluorescencia, tomando de regreso el mismo camino óptico que la señal de excitación, será así
50 enviada hacia la trayectoria de detección 15, 18. Los medios de rechazo 11, 12, colocados sobre la trayectoria de detección sirven para eliminar totalmente el 1 al 2% de reflexiones parásitas a la longitud de onda de excitación de 488 nm y 635 nm respectivamente, que pasan hacia la trayectoria de detección (por ejemplo dos filtros de rechazo a 488 nm y 635 nm respectivamente).

[0053] Después, los medios de exploración 7 recogen el haz de excitación. Según el ejemplo escogido y representado en la figura 1, estos medios comprenden un espejo resonante M1 a 4 KHz para desviar el haz horizontalmente y, por lo tanto, para realizar las líneas de la imagen, un espejo galvanométrico M2 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 dos sistemas afocales de aumento unitario, AF1 situado entre los dos espejos y AF2 situado después del
60 espejo M2, usándose estos sistemas afocales 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 exploración se determina para permitir

una observación de los tejidos *in vivo in situ*. Para este fin, la exploración debe ser lo suficientemente rápida para que haya al menos 12 imágenes/s mostradas en la pantalla para un modo de visualización de 896 x 640 píxeles correspondiente al modo más lento. Para los modos de visualización que tengan menos píxeles, el número de imágenes adquiridas por segundo será así siempre superior a 12 imágenes/s. En una variante, los medios de exploración pueden comprender particularmente un espejo giratorio, componentes integrados de tipo MEM (espejos de exploración X y Y), o un sistema acústico-óptico.

[0054] El haz de excitación desviado en la salida de los medios de exploración se dirige hacia los medios ópticos 10 con el fin de inyectarse en una de las fibras de la guía de imagen 8. Estos medios 10 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 exploración 7, optimizando así la inyección sobre 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 longitud focal y su apertura numérica se han escogido para optimizar el índice de inyección en las fibras ópticas de la guía 8. Según una realización que permite obtener el criterio de acromaticidad, el primer conjunto E1 está constituido por un doblete de lentes, y el segundo conjunto E2 por dos dobletes de lentes seguido de una lente situada cerca de la guía de imagen. En una variante, esta óptica de inyección puede constituirse por cualquier otro tipo de ópticas convencionales, tales como, por ejemplo, dos tripletes, o por lentes de índice de gradiente (con una corrección del cromatismo por elementos ópticos difractivos) o por una lente de microscopio (que, sin embargo, tiene un coste mayor).

[0055] La guía de imagen 8 está constituida por un gran número de fibras ópticas flexibles, por ejemplo 30.000 fibras de 2 μm de diámetro y separadas a intervalos de 3,3 μm . En la práctica, se puede utilizar tanto el conjunto de fibras de guía de imagen, o un subconjunto seleccionado entre estas fibras, por ejemplo centrado.

[0056] En la salida de la fibra óptica, el haz láser de excitación se enfoca por el cabezal óptico 9 en la muestra 26 en un punto situado a una profundidad determinada situada entre algunas decenas de μm y unas centenas de μm , con relación a la superficie de la muestra al contacto de la cual está destinada a estar colocado el cabezal óptico 9. Esta profundidad puede ser por ejemplo de 40 μm . Por lo tanto, el cabezal óptico permite enfocar el flujo saliente de la guía de imagen en la muestra, pero igualmente recoger el flujo de fluorescencia que regresa de la muestra. El cabezal óptico tiene un aumento de 2,4 y una apertura numérica sobre la muestra de 0,5. Estos dos parámetros se seleccionan de manera que la señal de vuelta se haga únicamente en la fibra óptica que haya transmitido la señal de excitación y no en fibras adyacentes y conservar así la filtración confocal con ayuda de una fibra. Con estos valores de aumento y de apertura numérica, la resolución axial es del orden de 15 μm y la resolución lateral del orden de 2 μm . La apertura numérica se selecciona de tal manera que se optimice el número de fotones recuperados que debe ser lo más grande posible. El cabezal óptico puede estar constituido por ópticas clásicas (doblete, triplete, esférica) y/o por lentes de índice de gradiente (GRIN) que presenta una calidad óptica y un cromatismo adaptados a la confocalidad, es decir minimizando las aberraciones ópticas, que entrañarían sino particularmente degradaciones sobre la profundidad de campo y por consiguiente sobre la resolución axial del equipo. Durante el funcionamiento, el cabezal óptico está destinado a ponerse en contacto con la muestra 26. La expresión de la fluorescencia se realiza por un fluoróforo que se inyecta (fluorescencia sistémica), o por un fluoróforo fabricado por la misma célula por modificación de un gen (fluorescencia transgénica). En este caso, los dos fluoróforos son inyectados y reemiten fotones sobre una banda espectral de anchura comprendida entre 50 y 200 nm, en particular 100 nm.

[0057] Sobre la trayectoria de detección, en la salida del filtro de rechazo 11, 12, las dos señales de fluorescencia se separan, por selección de longitudes de onda, usando un filtro dicróico 14. Después, cada señal de fluorescencia se enfoca por los medios 17, 20 respectivamente, constituidos por ejemplo por una lente de detección, en un orificio de filtración de los medios de filtración espacial 16, 19 respectivamente. La longitud focal de la lente de detección se calcula de tal manera que la señal de fluorescencia que proviene de una fibra sea del mismo tamaño o ligeramente inferior a la del orificio de filtración. Este último permite conservar la luz de fluorescencia que sólo proviene de la fibra iluminada por el haz incidente. Permite rechazar la luz que habría podido acoplarse en las fibras adyacentes a la que se ilumina. El tamaño del orificio se calcula de tal forma que la imagen de una fibra se muestre allí perfectamente. En este caso, es de 20 μm .

[0058] Los filtros utilizados presentan un ancho de banda lo suficientemente selectivo para poder separar las señales de fluorescencia y lo suficientemente grande para captar un máximo de fotones necesario para una adquisición en tiempo real.

[0059] Los medios de detección 15, 18 tienen una sensibilidad máxima en las longitudes de onda de fluorescencia estudiadas. Por ejemplo, se puede utilizar un fotodiodo de avalancha (APD) o un fotomultiplicador. Por otro lado, según la invención, el ancho de banda se selecciona para optimizar el tiempo de integración de la señal de fluorescencia. Es de 1,5 MHz, lo que corresponde a la frecuencia mínima de muestreo de la guía de imagen con un tiempo de integración optimizado en cada píxel.

[0060] Los medios electrónicos e informáticos 25 (tales como un microordenador) para el control, análisis y tratamiento digital de la señal detectada y para su visualización comprenden las siguientes tarjetas:

- Una tarjeta de sincronización 24, cuyas funciones son:

- 5 - controlar de manera sincronizada la exploración, es decir el movimiento de los espejos línea M1 y trama M2;
- controlar de manera sincronizada con las imágenes de fluorescencia el análisis espectral de los datos procedentes de un espectrómetro 22;
- conocer en cualquier momento la posición del punto luminoso láser explorado de esta manera; y
- gestionar todas las demás tarjetas por medio de un microcontrolador que puede controlarse;
- 10 - una tarjeta detector 23 que comprende para cada trayectoria de detección un circuito analógico que realiza particularmente una adaptación de impedancia, un amplificador, un conversor analógico-digital y después un componente lógico programable (por ejemplo un circuito FPGA) que conforma la señal.

15 **[0061]** El microordenador 25 también comprende una tarjeta de adquisición digital (no representada) que permite tratar un flujo de datos numéricos a frecuencia variable y fijarlo sobre una pantalla por medio de una tarjeta gráfica (no representada).

20 **[0062]** El sistema según la presente invención permite realizar un tratamiento de imagen tal como se describe particularmente en el documento WO 2004/008952 y/o el documento WO 2004/010377. Este tratamiento de imagen permite obtener simultáneamente en tiempo real para cada trayectoria de detección, una imagen primaria 27, 28 que muestra sustancias marcadas, véase la figura 2. Las imágenes 27, 28 y 29 corresponden a un tejido glandular tomado por biopsia. Más precisamente, este tejido procedente de un tiroides humano. Estas imágenes muestran criptas glandulares. Por lo tanto, la presente invención, con el sistema de la figura 1, permite la adquisición simultánea de dos imágenes en dos bandas de longitudes de onda diferentes.

25 **[0063]** La imagen primaria 27 pone de manifiesto manchas de formas circulares y de color azul. Se escoge el color azul de modo arbitrario. Estas manchas corresponden a las señales de fluorescencia emitidas por el primer fluoróforo llamado To-pro-3 y que es apto para excitarse por un haz láser a 635 nm. Se trata de un agente de intercalado del ADN. Este fluoróforo permite identificar el núcleo de una célula a causa de la presencia de ADN en los núcleos.

30 **[0064]** La imagen primaria 28 pone de manifiesto arquitectura de color arbitrario rojo, que define zonas espaciales muy particulares. Estas zonas corresponden a las señales de fluorescencia emitidas por el segundo fluoróforo llamado DiA y quien es apto para excitarse por un haz láser a 488 nm. Este fluoróforo tiene una afinidad muy fuerte con los lípidos (ácidos grasos) contenidos en las membranas citoplásmicas de las células. Las zonas visibles en las imágenes corresponden pues a las membranas visibles en el campo de la imagen. Según la invención, las dos imágenes primarias son luego sobrepuestas para formar una imagen final 29 mostrando en la figura 2, tanto los elementos azules como los rojos. Esto permite delimitar mejor los núcleos azules en el interior de las membranas rojas.

35 **[0065]** De la misma manera, en la figura 3, las imágenes 33, 34 y 35 representan un tejido malpighiano que proviene de un cuello uterino. En la imagen 33, las manchas visibles, coloreadas en azul, corresponden al ADN de los núcleos celulares. El marcador utilizado es el POPO-1 excitado a 405 nm. En la figura 34, la estructura de "nido de abeja", coloreada en rojo, corresponde a las membranas nuclear y citoplásmica. El marcador utilizado es el DiA excitado a 488 nm. En la imagen 35, se observa la superposición de las dos imágenes 33 y 34. Se distinguen bien los núcleos en el seno de su membrana citoplásmica.

40 **[0066]** Ventajosamente, las trayectorias de adquisición de imágenes de fluorescencia se acoplan a una trayectoria espectral. El espectrómetro 22 en la figura 1 permite realizar un análisis espectral de toda o parte de una imagen.

45 **[0067]** El control temporal y espectral de una señal de fluorescencia puede dar información muy importante sobre la actividad bioquímica funcional de un tejido biológico. En efecto, los fluoróforos utilizados para realizar una o varias imágenes de fluorescencia son muy sensibles a su entorno cercano (podemos particularmente escoger fluoróforos "inteligentes" que reaccionan particularmente a cambios de su entorno inmediato o que interaccionan específicamente con especies moleculares muy particulares). El nivel de su fluorescencia (intensidad) y la forma de su fluorescencia (espectro) varían en función de los cambios que se producen en el medio cercano. El estudio en el tiempo de la intensidad y del espectro de la fluorescencia informa pues sobre la dinámica del medio biológico. En este caso, el control de la acción de un medicamento o el control de la actividad metabólica o incluso el control de la acción de un estrés exterior (cambio de pH, de temperatura, de actividad enzimática) pueden ser registrados gracias al análisis espectral y temporal de la fluorescencia. La ventaja de dicho acoplamiento se sitúa particularmente al nivel del análisis más fino de la fluorescencia. Pueden preverse varios casos de análisis:

- 50 - el control temporal y espectral de la fluorescencia de una imagen: en este caso, el análisis espectral se aplica a toda la imagen. Es un primer análisis bastante ordinario de la zona observada en su conjunto;

- el control temporal y espectral de la fluorescencia de una zona de interés de una imagen: este caso, mucho más interesante, representa el análisis de una zona particular de la imagen. Hay que hacer por tanto un análisis previo de la imagen confocal de fluorescencia para determinar las dichas zonas "de interés" y después hacer el análisis espectral de estas zonas. Existe por lo tanto la necesidad de sincronizar el análisis por la imagen y el análisis espectral; y

- el control temporal y espectral de la autofluorescencia de una imagen: en este último caso, se trata del análisis de la autofluorescencia del tejido. En este caso particular, se utiliza un láser en el azul. Además, la fluorescencia inducida por fluoróforos exógenos no debe impedir la detección de la autofluorescencia (que es bastante débil). La autofluorescencia corresponde al flujo que proviene de compuestos naturalmente fluorescentes, tales como la flavina, NADH, porfirina, etc. presentes en los tejidos vivos.

[0068] En el segundo caso en particular, tiene lugar el análisis de las imágenes (adquisición, tratamiento, identificación de las zonas de interés), para sincronizar la trayectoria espectroscopia con el paso sobre las zonas de interés y finalmente para analizar el espectro correspondiente. La aplicación del acoplamiento en este segundo caso se prevé según dos variantes: un modo con láser pulsado y un modo con conmutador rápido.

[0069] La figura 1 presenta el caso de la utilización de láseres pulsados para excitar la muestra y así obtener una imagen y un espectro de una imagen entera o de una(s) zona(s) de interés. El hecho de utilizar un láser pulsado permite librarse de pérdidas suplementarias introducidas por la adición de un componente sobre la vía de espectroscopia como veremos en el modo de conmutación rápida. Un divisor de haz 13 retiene el veinte por ciento del flujo luminoso que proviene de los filtros de rechazo 11, 12. Después, el flujo muestreado se introduce en una fibra óptica 21 que se suministra al espectrómetro 22.

[0070] En este caso, por lo tanto, es suficiente conmutar el láser únicamente sobre las zonas denominadas de interés y detectar el espectro asociado a estas zonas. Se trata de una simple sincronización sobre la iluminación del tejido que puede realizarse simplemente por medios informáticos. Esta solución es la más simple de poner en práctica.

[0071] El modo de conmutación rápida preconiza la utilización de un sistema de filtración muy rápida colocado en la entrada del espectroscopio (véase la figura 4). Entonces, es posible hacer pasar el flujo de fluorescencia hacia el espectroscopio cuando la posición de la exploración láser corresponde al paso sobre las zonas de interés en tiempos muy cortos. Idealmente, el dispositivo debe conmutar a cada fibra, es decir, un tiempo de 1 μ s (se explora una línea de fibra a la velocidad de 1 μ s/fibra). En la práctica, se integra el flujo de un núcleo (5 μ m a nivel del tejido), por ejemplo, lo que corresponde a un tiempo de integración de algunos μ s como máximo. Como se observa en la figura 4, los componentes de esta trayectoria de espectroscopia son los siguientes:

- el divisor de haz 13 de coeficiente de transmisión del 80% para la trayectoria de diagnóstico por imagen y un coeficiente de reflexión del 20% para la trayectoria de espectroscopia, con el fin de no reducir demasiado el flujo necesario para formar una imagen;
- un dispositivo 31 suficientemente rápido para conmutar a cada fibra explorada o sobre una(s) zona(s) de interés, previamente definida(s). Puede ser mecánico, acústico-óptico (31), un espejo, etc.;
- un doblete acromático 30 con una longitud focal 100 mm con el fin de enfocar el haz en la fibra óptica;
- una fibra óptica 21, de diámetro de núcleo de 50 ó 100 μ m en función de la resolución deseada, con una apertura numérica de 0,22; y
- un espectroscopio 22, cuyas características son las siguientes: en primer lugar, un detector compuesto por un CCD lineal (2048 píxeles) o un CCD matriz, por ejemplo, con un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 200 nm y 1100 nm, con una sensibilidad de 86 fotones/conteo ($2,9 \times 10^{-17}$ W/conteo) y con una proporción de señal-ruido de 250:1. En segundo lugar, una red de difracción de 600 líneas/mm, con una eficacia superior al 30%, de una resolución comprendida entre 0,3 nm y 10,0 nm FWHM y finalmente con una anchura de ranura de 200 μ m.

[0072] Se prevén varios dispositivos de conmutación rápida:

1) un "obturador" mecánico: se trata de una placa que se pone en movimiento por una pletina de traslación motorizada con el fin de dejar pasar el haz cuando se explora una zona de interés. La pletina de traslación debe tener una resolución de algunas décimas de micrómetros, accionándose por un motor paso a paso o un motor de corriente continua, un recorrido de algunos milímetros. Su velocidad de reacción depende del tamaño de la zona de interés, es preferentemente muy importante.

2) un espejo: otro dispositivo de conmutación consiste en desviar el haz cuando la exploración está fuera de una zona de interés, para rechazar la señal "fuera de zona de interés". Para este fin, se utiliza un espejo, colocado a continuación del divisor de haz, y que tiene un tiempo de respuesta del orden del microsegundo para un ángulo de algunos miliradianes como mínimo, y un alto índice de reflexión. Por lo tanto, la trayectoria espectroscópica ya no funciona en transmisión sino en reflexión.

3) Un deflector acústico-óptico de acuerdo con la figura 4. Los componentes necesarios para esta configuración son: un sistema afocal 30 con aumento de 1/3 que comprende dos dobletes acromáticos con

5 el fin de reducir el tamaño del haz para entrar en el deflector 31 cuya abertura es de 2 mm. Este deflector funciona en el intervalo espectral de 400-800 nm con un tiempo de respuesta inferior a un microsegundo (para conmutar a cada fibra si es posible). La eficacia de deflexión es del 90 % y las pérdidas estáticas se minimizan (<10%) con el fin de no tener pérdidas en la transmisión demasiado grandes y un ángulo de deflexión de algunos miliradianes. Finalmente, la óptica de enfoque 32 se coloca en la dirección de deflexión (orden 1), ya que la eficacia de deflexión es del 90% (hay todavía un 10% del flujo en la dirección de la orden 0).

10 **[0073]** En cada caso hipotético (solución con "obturador" o solución con láser pulsado), es posible prever complementos informáticos (automáticos) capaces de trazar la disminución de un pico de fluorescencia en función del tiempo o la evolución de la proporción entre dos picos de fluorescencia en el tiempo y el espacio. Son módulos técnicos producidos a la medida con arreglo a las necesidades de los usuarios.

15 **[0074]** La elección de las zonas de interés se hace por el usuario, o de manera automática.

20 **[0075]** Por supuesto, la invención no se limita a los ejemplos que se acaban de describir y pueden aportarse numerosos ejemplos a estos ejemplos sin salirse del alcance de la invención. Es posible prever la producción de imagen de alta resolución, no confocal, por medio de una guía constituida por varios millares de fibras ópticas cuyos extremos distales tienen por objeto colocarse desnudos directamente en contacto con la superficie de la muestra. En este caso, es posible usarse en particular las enseñanzas del documento WO 2004/008952 adaptadas según la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para realizar una imagen microscópica fibrada de fluorescencia de una muestra, en la que:

- 5 - la muestra se explora por medio de una señal de excitación a través de un camino óptico que comprende al menos una fibra óptica,
- se detecta la señal de fluorescencia procedente de dicha muestra, la señal de excitación y la señal de fluorescencia que toma este mismo camino óptico;
- 10 - se excitan, a través del camino óptico, al menos dos fluoróforos contenidos en la muestra,
- se detecta, a través del camino óptico, la señal de fluorescencia de cada uno de dichos al menos dos fluoróforos, y
- se elabora una imagen final que contiene zonas coloreadas en función de dichos al menos dos fluoróforos,

15 **caracterizado porque** se adquiere además un espectro de cada imagen a partir de una parte de la señal que proviene de la muestra a través del camino óptico.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** se excitan simultáneamente dichos al menos dos fluoróforos.

20 3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** se excitan secuencialmente dichos al menos dos fluoróforos.

4. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado porque** se detectan simultáneamente las señales de fluorescencia de dichos al menos dos fluoróforos.

25 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** se detectan secuencialmente las señales de fluorescencia de dichos al menos dos fluoróforos.

30 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se explora la muestra a una velocidad que corresponde a la adquisición de varias imágenes por segundo que basta para una utilización en tiempo real y **porque** se detectan las señales de fluorescencia a una frecuencia de detección que corresponde a una frecuencia mínima de muestreo de las fibras una a una.

35 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** para elaborar dicha imagen final, se elaboran primero tantas imágenes primarias como señales de fluorescencia detectadas, se colorea cada imagen primaria de acuerdo con un color asignado al fluoróforo correspondiente, después se superponen dichas imágenes primarias para constituir la imagen final.

40 8. Sistema para realizar una imagen microscópica fibrada de fluorescencia de una muestra (26), comprendiendo este sistema:

- una unidad de tratamiento (23, 24, 25),
- un camino óptico (7, 8) que contiene al menos medios (7) para explorar la señal de excitación en la muestra, una guía de imagen (8) que comprende al menos una fibra óptica para transportar la señal de excitación hacia la muestra y para recoger una señal de fluorescencia procedente de dicha muestra, la señal de excitación y la señal de fluorescencia toman el mismo camino óptico;
- 45 - medios de excitación (1, 2) para excitar, a través del camino óptico, al menos dos fluoróforos contenidos en la muestra,
- medios de detección (15, 18) para detectar, a través del camino óptico, la señal de fluorescencia de cada uno de dichos al menos dos fluoróforos, y
- 50 - medios de tratamiento (25) en el interior de la unidad de tratamiento para elaborar una imagen final que comprende zonas coloreadas en función de dichos al menos dos fluoróforos,

55 **caracterizado porque** los medios de excitación comprenden al menos dos emisores, excitando cada uno de dichos al menos dos fluoróforos.

9. Sistema según la reivindicación 8, **caracterizado porque** las señales de fluorescencia emitidas por dichos al menos dos fluoróforos presentan longitudes de onda bastante alejadas una de la otra para que las señales de fluorescencia sean disociables por filtración.

60 10. Sistema según la reivindicación 8 ó 9, **caracterizado porque** los dos emisores de señales de excitación son dos láseres que emiten respectivamente en 488 nm y 635 nm, reaccionando respectivamente los dos fluoróforos en la muestra a estas dos longitudes de onda.

- 5 **11.** Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado porque** los medios de detección comprenden un receptor combinado con un medio de filtración sintonizable, tal como un filtro pasa-banda sintonizable, que deja pasar secuencialmente cada una de las señales de fluorescencia emitida por dichos al menos dos fluoróforos.
- 12.** Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado porque** los medios de detección incluyen al menos dos receptores combinados con un separador (14) que es apto para enviar, en función de la longitud de onda, cada señal de fluorescencia hacia un receptor determinado.
- 10 **13.** Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, **caracterizado porque** los medios de exploración exploran la muestra a una velocidad que corresponde a la adquisición de varias imágenes por segundo que basta para una utilización en tiempo real y **porque** los medios de detección detectan las señales de fluorescencia a una frecuencia de detección que corresponde a una frecuencia mínima de muestreo de las fibras una a una.
- 15 **14.** Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, **caracterizado porque** la guía de imagen está constituida por varios millares de fibras ópticas, estando esta guía precedida por los medios de exploración y seguida de un cabezal óptico para enfocar la señal de excitación en la muestra.
- 20 **15.** Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, **caracterizado porque** la guía de imagen está constituida por una fibra óptica, estando los medios de exploración integrados en un cabezal óptico situado entre la guía de imagen y la muestra.
- 25 **16.** Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, **caracterizado porque** la guía de imagen está constituida por varios millares de fibras ópticas cuyos extremos distales tienen como objeto colocarse directamente desnudos en contacto con la superficie de la muestra.
- 17.** Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, **caracterizado porque** comprende además un espectrómetro que es capaz de producir un espectro usando una parte de la señal que proviene de la muestra.
- 30 **18.** Sistema según la reivindicación 17, **caracterizado porque** el espectrómetro se combina con un obturador que dirige una parte de la señal que proviene de la muestra hacia el espectrómetro en los instantes predeterminados correspondientes a los instantes en que la señal de excitación explora una zona de interés.
- 35 **19.** Sistema según la reivindicación 17, **caracterizado porque**, para adquirir el espectro únicamente sobre una zona de interés de una imagen, los medios de excitación incluyen al menos un láser pulsado de alta frecuencia, estado este láser pulsado activado únicamente en el momento de la exploración de dicha zona de interés.
- 20.** Sistema según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 19, **caracterizado porque** la unidad de tratamiento comprende medios para la sincronización de los medios de excitación y los medios de recepción.

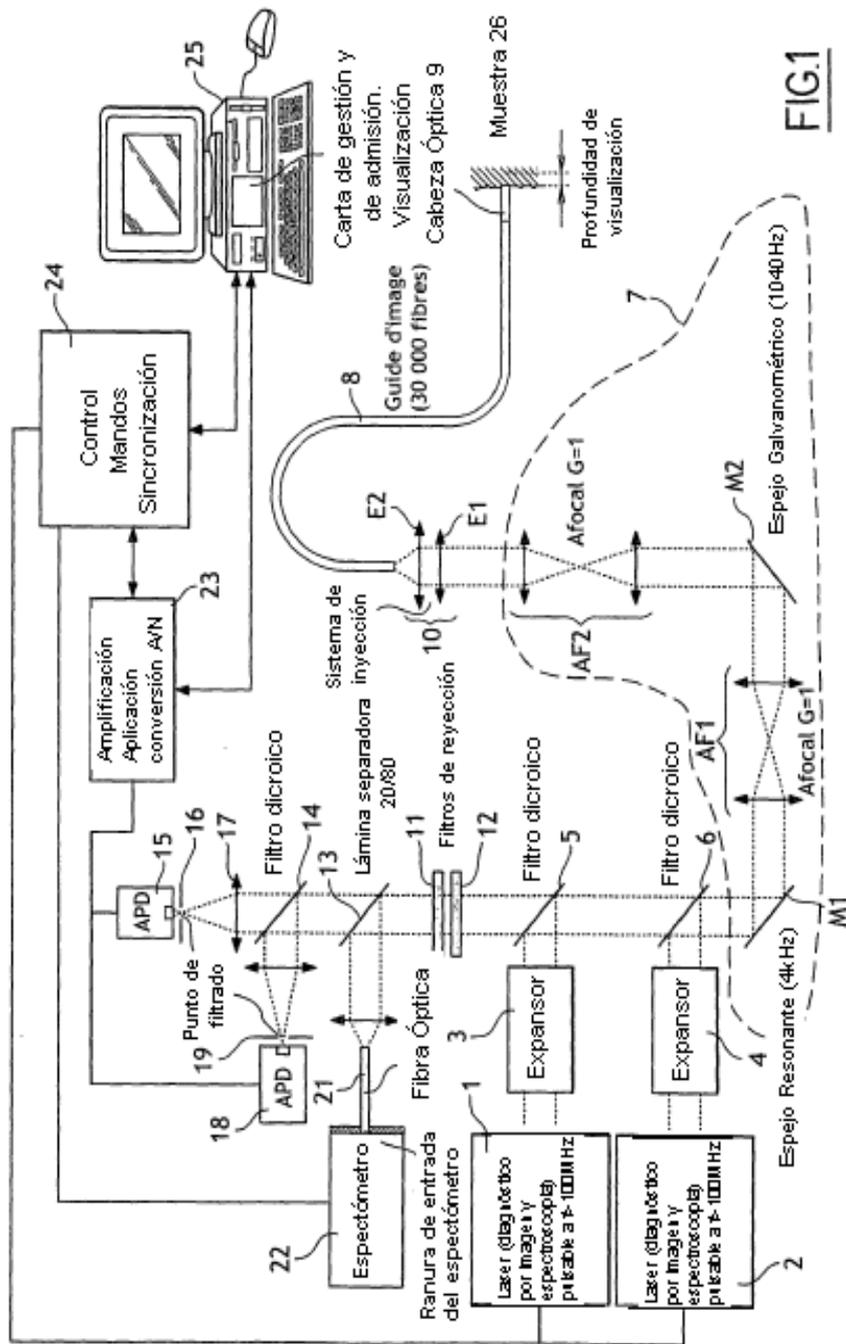


FIG.1

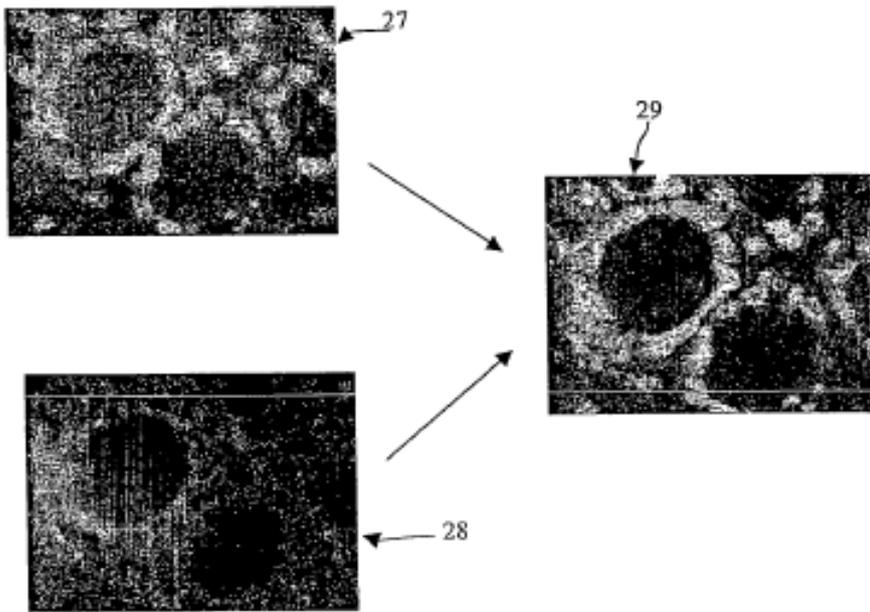


FIG.2

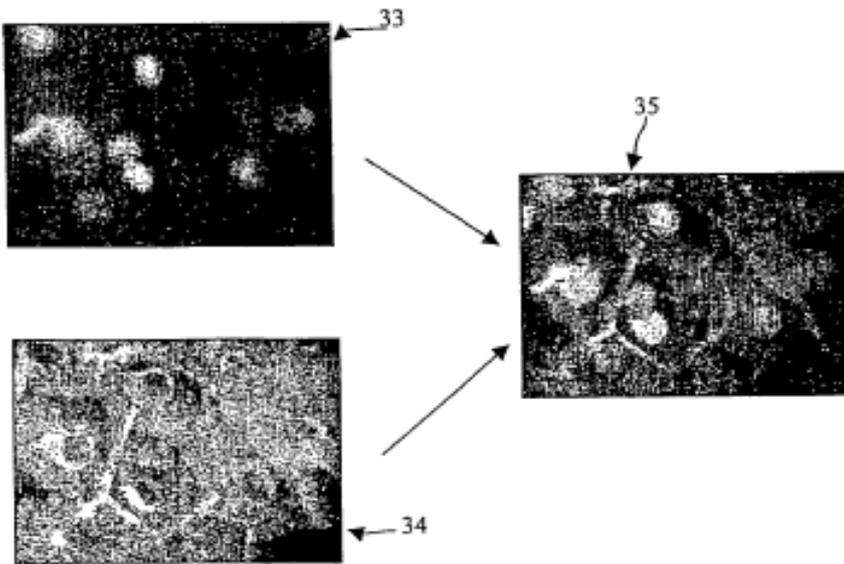


FIG.3

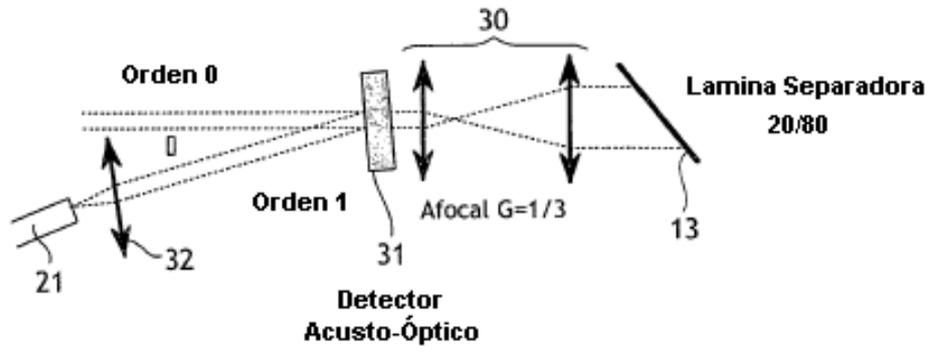


FIG.4