

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 304**

51 Int. Cl.:

G02B 21/06 (2006.01)

G02B 26/06 (2006.01)

G02B 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2011 E 11799763 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2643728**

54 Título: **Procedimiento y sistema de calibración de un modulador óptico espacial en un microscopio óptico**

30 Prioridad:

22.11.2010 FR 1059590

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

22.05.2015

73 Titular/es:

**ECOLE POLYTECHNIQUE (100.0%)
Route de Saclay
91120 Palaiseau, FR**

72 Inventor/es:

**DEBARRE, DELPHINE;
VIEILLE, THIBAUT;
BEAUREPAIRE, EMMANUEL y
MARTIN, JEAN-LOUIS**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 536 304 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 calibración de un modulador óptico espacial en un microscopio óptico.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento y a un sistema de calibración de un dispositivo óptico con modulador óptico espacial. Más precisamente, la invención se refiere a un procedimiento y a un dispositivo para calibrar la influencia de un modulador óptico espacial colocado en o aguas arriba de un microscopio óptico, sobre la calidad de las imágenes obtenidas en este microscopio.

Estado de la técnica

El desarrollo de nuevas técnicas de formación de imágenes en microscopía óptica (microscopía confocal, por iluminación estructurada, microscopía de fluorescencia de barrido, de depleción por emisión estimulada (STED), técnicas de óptica no lineal, etc.) y de nuevas aplicaciones en formación de imágenes biológicas o biomédicas, necesita unos microscopios ópticos que producen unas imágenes de excelente calidad. La microscopía de objetos planos o situados en el aire da generalmente unas imágenes de resolución muy alta. Sin embargo, la microscopía óptica de muestras biológicas gruesas encuentra problemas de aberraciones ópticas que limitan la resolución espacial de las imágenes. Estas aberraciones ópticas pueden proceder del objetivo del microscopio, de una desadaptación de índice entre el objetivo, el medio de inmersión y la muestra o también de la naturaleza de la muestra en sí, que puede presentar unas variaciones internas locales de índice de refracción.

La utilización de moduladores ópticos espaciales en un microscopio ya se ha propuesto para modular espacialmente un haz óptico de amplitud y/o de fase o para corregir las aberraciones ópticas. De manera general, un modulador óptico espacial es un dispositivo que permite modular el perfil espacial del campo incidente de amplitud y/o de fase. Entre los moduladores ópticos espaciales se encuentran en particular los espejos deformables provistos de accionadores así como de moduladores espaciales de luz (SL) o Spatial Light Modulator) de cristales líquidos. En la continuación de la descripción, se entiende por modulador óptico espacial un componente óptico que comprende una pluralidad de elementos unidos a unos medios de mando para modular la amplitud y/o la fase de un haz luminoso. Las diferentes tecnologías de modulación óptica espacial permiten funcionar en reflexión o en transmisión con unos rendimientos variables en términos de resolución espacial, tiempo de respuesta y respuesta en longitud de onda. Por ejemplo, un modulador espacial de cristales líquidos permite modular un haz con una resolución espacial muy buena, pudiendo cada píxel ser mandado individualmente.

La utilización de un espejo cuya superficie puede ser deformada por unos accionadores encuentra aplicaciones en óptica activa para mejorar la calidad de las imágenes producidas por unos instrumentos ópticos y en óptica adaptativa para modular un frente de onda a una frecuencia temporal elevada. La óptica adaptativa se utiliza en particular en los grandes telescopios destinados a la observación en astronomía para corregir en tiempo real las deformaciones de la imagen inducidas por las turbulencias atmosféricas. En formación de imágenes microscópica, las aberraciones ópticas pueden variar de una muestra a otra, pero en la mayoría de las aplicaciones, la variación de las aberraciones en una imagen es relativamente lenta en función del tiempo. Sin embargo, en ciertas aplicaciones de microscopía, también puede ser necesario optimizar muy rápidamente la calidad de la imagen detectada. La óptica adaptativa se ha propuesto por lo tanto como una solución para compensar las aberraciones ópticas en un microscopio y mejorar los límites de resolución en formación de imágenes microscópica, en particular en aplicaciones de biología.

En un microscopio de óptica adaptativa, se utiliza generalmente un espejo deformable para inducir una modulación del frente de onda del haz luminoso excitador y eventualmente también una modulación de la señal recogida a través del objetivo del microscopio. Esta modulación se traduce por una variación del perfil de amplitud y de fase a la entrada del objetivo del microscopio, induciendo en sí mismo una variación de la respuesta de impulso excitadora (Point Spread Function o PSF) del microscopio. La PSF representa la respuesta de un sistema óptico a un punto de origen y describe cómo cada punto de un objeto es modificado por el sistema óptico para formar la imagen resultante observada en intensidad.

Según el tipo de muestra observado en microscopía, se desea poder aplicar las deformaciones precisas para compensar por ejemplo el astigmatismo o también un desenfoque del haz. Así, la publicación D. Débarre *et al.* "Image-based adaptive optics for two-photon microscopy", Optics Letters, Vol. 34, n° 16, p. 2495-2497 describe la mejora de imágenes de microscopía por la utilización de un espejo deformable mandado por unas funciones predefinidas del tipo combinaciones de modos de Zernike.

En el caso de un modulador espacial de cristales líquidos, el mando de cada píxel produce una modulación de fase *a priori* conocido píxel por píxel. Sin embargo, el posicionamiento exacto del SLM con respecto al haz es generalmente desconocido. Ahora bien, la influencia exacta de un modulador óptico espacial de amplitud y/o de fase sobre un haz óptico depende al mismo tiempo de la posición y del tamaño del haz óptico con respecto al modulador óptico espacial. Esta influencia no es generalmente conocida de antemano, ya sea en el plano focal de un

dispositivo óptico, es decir, cuando el haz óptico está enfocado, o bien en el plano de la pupila, en el que se extiende el haz óptico.

5 Ciertamente, existen unos procedimientos para calibrar, por ejemplo, un espejo deformable en un telescopio o en un microscopio.

10 Un primer grupo de técnicas de calibración está basado en el análisis de la fase del frente de onda en el plano de la pupila después de la reflexión sobre un espejo deformable. Una primera solución está basada en la utilización de un analizador de frente de onda, por ejemplo de tipo Shack-Hartmann, que permite una medición de las deformaciones locales del frente de onda de un haz óptico. Sin embargo, un analizador del frente de onda es costoso y presenta límites geométricos. El acoplamiento de un SHS a un microscopio es restringido ya que el diámetro de haz detectado es limitado (de aproximadamente 5 mm), por lo tanto es necesario adaptar la ampliación del haz entre la pupila de entrada del microscopio y el analizador del frente de onda para cada objetivo de microscopio para el cual el espejo deformable debe ser calibrado. Además, la resolución espacial de la fase por un analizador de tipo Shack-Hartmann está limitada a aproximadamente 30x30 píxeles.

15 Una segunda solución se basa en la medición y el análisis de franjas de interferencias en un interferómetro de tipo Michelson o Twyman-Green, para deducir las variaciones de fase del frente de onda. Así, la publicación D. Débarre *et al.* "Image-based adaptive optics for two-photon microscopy", Optics Letters, Vol. 34, n°16, p. 2495-2497, utiliza un espejo situado en el plano focal del objetivo con el fin de calibrar específicamente la región del espejo reproducida en la pupila trasera del objetivo. Sin embargo, las mediciones interferométricas requieren un procedimiento de alineación minucioso y necesitan una fuente que tiene una gran longitud de coherencia. En las aplicaciones de microscopía que utilizan un haz láser de pulso, el interferómetro necesita otra fuente óptica, que está generalmente dispuesta en otra posición y en otra longitud de onda distinta de la de la aplicación considerada. Además, un interferómetro presenta un volumen difícilmente compatible con un microscopio.

20 Otro grupo de técnicas se basa en una medición de la respuesta de pulso (o PSF) en intensidad en el plano focal del dispositivo y en un cálculo de reconstrucción del frente de onda de amplitud y/o de fase, por ejemplo siguiendo un método denominado de diversidad de fase. La medición de respuesta de pulso consiste generalmente en adquirir la imagen de un punto de origen colocado en el plano focal del dispositivo a través del dispositivo óptico a caracterizar. El método de diversidad de fase consiste en primer lugar en medir por lo menos dos imágenes de un mismo objeto con un desfase conocido entre las dos imágenes, en segundo lugar en modelizar el campo complejo en el plano de Fourier de cada imagen, frecuentemente descomponiendo la fase en una base de polinomios de Zernike, y finalmente en aplicar un algoritmo de minimización sobre los campos que corresponden a las dos imágenes para extraer una reconstitución espacial del frente de onda de amplitud y/o de fase.

30 En el caso de un telescopio de óptica adaptativa para la astronomía, Löfdahl *et al.* ha propuesto un dispositivo y un procedimiento de calibración de un espejo deformable basado en un método de diversidad de fase (Löfdahl *et al.* "Calibration of a deformable mirror and Strehl ratio measurements by use of phase diversity", Appl. Opt. 39, p. 94-103, 2000). El dispositivo experimental de medición de PSF comprende un punto de origen generador de un haz óptico de entrada, una pupila iluminada de manera uniforme, un espejo deformable que refleja el haz bajo una apertura digital casi nula, y una lente de gran focal que forma la imagen del haz reflejado por el espejo deformable sobre una cámara de alta resolución. Se obtienen dos imágenes de PSF desfasadas mediante la inserción de un prisma delante de la cámara que forma así dos imágenes desenfocadas axialmente la una con respecto a la otra. La calibración de la influencia del espejo deformable sobre el frente de onda se obtiene después mediante un método clásico de evaluación y de minimización del frente de onda según una descomposición sobre una base de polinomios de Zernike. Sin embargo, según el método de Löfdahl *et al.*, la matriz de calibración del espejo deformable es no sólo ruidosa sino incompleta, ya que este método no permite medir el *ktilt* y el *tilt* inducidos por el espejo deformable, que deben ser calibrados por una medición independiente. Por otra parte, mientras que un telescopio amplía la imagen de un punto de origen, un microscopio forma una imagen de tamaño más pequeño. El método de calibración de Löfdahl no puede, por lo tanto, ser utilizado directamente en microscopía, en la que el objetivo del microscopio enfoca el haz en una mancha demasiado pequeña para ser visualizada directamente y en la que la apertura digital del objetivo es generalmente elevada.

45 En microscopía, la reconstrucción del frente de onda por diversidad de fase se ha modificado para ser aplicada a dispositivos que tienen unas aperturas digitales importantes (Hanser *et al.*, "Phase-retrieved pupil functions in wide-field fluorescence microscopy", J. Microscopy 216, p.32-48 (2004); Hanser *et al.*, "Phase retrieval for high-numerical-aperture optical systems", Opt. Lett. 28, p.801-803 (2003)). En particular, en un dispositivo que tiene una gran apertura digital, la función de la pupila del sistema ya no puede ser considerada como constante.

50 Teóricamente, la PSF corresponde a la imagen de un punto de origen infinitamente pequeño, de longitud de onda λ y situado en el centro del plano focal del objetivo. Experimentalmente, para la medición de PSF de un microscopio óptico, Hanser *et al.* seleccionan un punto de origen formado por una bola fluorescente de tamaño inferior al límite de resolución óptica del microscopio, siendo la bola dispuesta en el plano focal del microscopio e iluminada por un haz de excitación. Sin embargo, la señal de fluorescencia de estas bolas está limitada al mismo tiempo en intensidad y en el tiempo, lo que limita la relación señal sobre ruido accesible para la medición de PSF. La debilidad de la señal

necesita la utilización de una cámara de sensibilidad, dando como resultado un coste importante del dispositivo. Por otro lado, con el fin de mejorar el análisis se ha intentado aumentar la complejidad del algoritmo de reconstrucción, lo que disminuye la precisión del resultado obtenido. Además, las bolas utilizadas tienen un tamaño determinado, lo que produce errores en las mediciones de PSF, que pueden ser críticos en la microscopía. Finalmente, las publicaciones Hanser 2003 y Hanser 2004 no se refieren a un microscopio con un modulador óptico espacial.

En microscopía óptica adaptiva, la publicación Turaga *et al.* describe un método de calibración de un espejo deformable por una variante de la diversidad de fase ("Image-based calibration of a deformable mirror in wide-field microscopy", Turaga *et al.*, Appl. Opt. 49, p.2030-2040, 2010). En este caso, la medición de PSF de una bola fluorescente se efectúa en el único plano focal del objetivo (no hay ninguna imagen desfasada) y el algoritmo de reconstrucción utiliza el conjunto de las mediciones efectuadas para los diferentes mandos enviados sobre los diferentes accionadores del espejo deformable, con el fin de determinar el perfil de fase del haz en la salida del objetivo. Este procedimiento presenta dos limitaciones principales. Por un lado, se supone que se conoce el perfil de intensidad del haz, lo que generalmente no es el caso, e invariante, lo que restringe la aplicación del método a la calibración de un espejo deformable conjugado con la pupila de entrada del objetivo. Por otro lado, el tiempo de cálculo necesario para la reconstrucción de los perfiles de fase es muy elevado (3 minutos por elemento activo para un sistema que tiene 32 Go de RAM, es decir aproximadamente 2h30 para un espejo deformable que tiene 52 accionadores).

Finalmente, más fundamentalmente, en las publicaciones Löfdahl *et al.*, Hanser *et al.* y Turaga *et al.*, debido al número reducido de mediciones efectuadas (1 o 2), la firmeza del algoritmo de minimización debe estar en compensación asegurada por la modelización a priori del frente de onda buscado, que se descompone según unos modos de Zernike o según otra base de funciones, que se supone que son ortogonales, y mejor adaptada a la geometría del espejo deformable. Esto reduce intrínsecamente la precisión de la reconstrucción de la fase y limita el procedimiento de calibración en el caso en el que el espejo, posicionado en un plano conjugado de la pupila de entrada del objetivo, induce una a pura modulación de fase y en el que la amplitud del campo en la pupilla trasera está considerada como constante.

En el presente documento, los términos pupila trasera y pupila de entrada se utilizan como sinónimos y se refieren al plano conjugado del plano focal del objetivo.

La publicación Botcherby *et al.*, "an optical technique for remote focusing in microscopy", Opt. Comm. 281, p. 880-887 (2008) describe un método alternativo de medición de PSF de un objetivo del microscopio. Este método utiliza un espejo colocado cerca del plano focal del objetivo del microscopio y una cámara CCD situada en un plano conjugado del plano focal del objetivo. Se adquieren las imágenes para diferentes posiciones desplazadas axialmente del espejo plano o de la cámara con el fin de obtener la PSF de intensidad en tres dimensiones. Sin embargo, esta medición de PSF no se utiliza ni para reconstruir un perfil de campo de amplitud y de fase, y mucho menos en el contexto de calibración de un espejo deformable.

Problema técnico

Uno de los objetivos de la invención es proponer un dispositivo y un procedimiento de calibración preciso y fiable de un modulador óptico espacial *in situ* en un microscopio.

Otro objetivo de la invención es proponer un dispositivo de calibración de un modulador óptico espacial compatible con diferentes objetivos del microscopio sin requerir adaptación instrumental para cada cambio de objetivo.

También otro objetivo de la invención es proponer un procedimiento de calibración que permita una calibración de alta resolución espacial y de gran precisión, incluso para los puntos periféricos del campo de la pupila trasera en la que la intensidad del haz óptico es relativamente baja.

La presente invención tiene como objetivo proponer un método para calibrar la influencia de los mandos aplicados a los elementos de un modulador óptico espacial sobre las propiedades ópticas de un microscopio en el cual, o aguas arriba del cual, se inserta un modulador óptico espacial.

Para ello, la invención se refiere a un procedimiento de calibración de un dispositivo óptico con un modulador óptico espacial, comprendiendo dicho dispositivo un punto de origen luminoso, un objetivo óptico de gran apertura digital adecuado para recibir un haz incidente y/o recoger un haz óptico reflejado por una muestra, una cámara dispuesta en un plano conjugado ópticamente con el plano focal del objetivo y un modulador óptico espacial dispuesto en el haz óptico aguas arriba de la cámara. Según la invención, dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

- a) colocación de una muestra plana reflectante cerca del plano focal del objetivo,
- b) aplicación de un mando de amplitud R_i^j sobre un elemento P_i del modulador óptico espacial, con el fin de modular el haz óptico incidente y/o reflejado sobre la muestra,

- 5
- c) adquisición de una imagen de la PSF de intensidad en un plano conjugado del plano focal del objetivo,
- d) modificación de la distancia axial relativa entre el objetivo y la muestra reflectante en una cantidad Z conocida;
- 10
- e) iteración de las etapas c) y d) para una pluralidad de distancias axiales relativas entre la muestra y el plano focal del objetivo;
- f) reconstrucción del perfil de amplitud y/o en fase del haz en un plano conjugado del plano focal del objetivo por un algoritmo de diversidad de fase para un valor R_j^i de un elemento P_i ;
- 15
- g) iteración de las etapas b) a f) para una pluralidad de valores de amplitud R_j^i para un elemento P_i del modulador óptico espacial;
- h) determinación de la función de influencia E_i de un elemento P_i sobre el perfil de amplitud A y/o en fase φ del haz;
- i) iteración de las etapas b) a h) para los diferentes elementos $P_{i=1, \dots, N}$ del modulador óptico espacial;
- 20
- j) determinación de las funciones de influencias (E_1, \dots, E_N) del conjunto de los elementos (P_1, \dots, P_N) del modulador óptico espacial sobre el perfil de amplitud A y/o en fase φ del haz.

25 Según un modo de realización particular de la invención, las mediciones de PSF son efectuadas para tres distancias axiales relativas entre el objetivo y la muestra, definidas con respecto a la posición de la muestra en el plano focal del objetivo tales como: $z = (-z_0, 0, +z_0)$.

Según un modo de realización preferido, la etapa f) de reconstrucción del perfil de amplitud y/o de fase del haz por diversidad de fase comprende las etapas siguientes:

30 Inicialización:

- Estimación de un término de desenfoque que corresponde a las tres posiciones relativas: $-z_0, 0$ y $+z_0$;
- estimación inicial del perfil del campo en la pupila de entrada del objetivo;
- estimación del perfil de transmisión de la pupila de entrada del objetivo;

35 Algoritmo de cálculo:

- cálculo de tres perfiles de campo por multiplicación del perfil del campo estimado en la pupila de entrada del objetivo respectivamente por cada uno de los tres términos de desenfoque;
- 40 - aplicación de una transformada de Fourier para calcular las PSF estimadas para las tres posiciones relativas: $-z_0, 0$ y $+z_0$;
- sustitución de la amplitud de las PSF calculadas por el valor de las PSF medidas respectivamente para cada uno de los valores de z ($-z_0, 0$ y $+z_0$);
- 45 - aplicación de una transformada de Fourier inversa para los tres campos obtenidos;
- división por el término de desenfoque correspondiente respectivamente a cada posición z ($-z_0, 0$ y $+z_0$);
- 50 - media de los tres campos complejos obtenidos;
- multiplicación de la media de los campos por el perfil de transmisión de la pupila de entrada del objetivo, para obtener una nueva estimación del perfil del campo a nivel de la pupila trasera del objetivo;
- 55 - iteración del conjunto de las etapas del algoritmo de cálculo de reconstrucción del perfil de amplitud y/o en fase hasta que se cumple una condición de terminación;

60 Terminación:

- cálculo de la diferencia cuadrática de amplitud entre las tres PSF calculadas y medidas. Si el valor es inferior a un criterio de convergencia (típicamente del orden de 10^{-6} en diferencia relativa), el algoritmo está terminado.
- 65 - la fase del perfil se extrae y se desarrolla con la ayuda de un algoritmo de transformada de Fourier.

Según un modo de realización particular, el procedimiento de calibración de la invención comprende una etapa suplementaria previa a la etapa j), consistiendo dicha etapa suplementaria en una iteración de las etapas b) a i) para diferentes combinaciones simultáneas de mandos de una pluralidad de elementos del modulador óptico espacial.

5 Según un aspecto particular de un modo de realización, el procedimiento de calibración de la invención comprende, tras la etapa c), una etapa suplementaria de filtrado digital de las imágenes de PSF medidas con el fin de disminuir la resolución espacial y/o adaptar la dimensión de las imágenes al tamaño de la pupila del objetivo.

10 Según un modo de realización particular, el procedimiento de calibración de la invención comprende, tras la etapa j), una etapa suplementaria de inversión de las funciones de influencia del conjunto de los elementos (P_1, \dots, P_N) del modulador óptico espacial por un algoritmo de regresión lineal para extraer una calibración del espejo deformable términos de amplitud $A(x, y) = M_A (R_t^i)$ y/o $R_t^i = M_A^{-1} (\varphi(x, y))$ y de fase $\varphi(x, y) = M_\varphi (R_t^i)$ y/o $R_t^i = M_\varphi^{-1} (\varphi(x, y))$, respectivamente.

15 La invención se refiere asimismo a un sistema de calibración de un dispositivo óptico con un modulador óptico espacial, comprendiendo dicho dispositivo un punto de origen luminoso generando un haz incidente, un objetivo óptico de gran apertura digital adecuado para recibir un haz incidente y/o recoger un haz óptico reflejado por una muestra, siendo una imagen del punto de origen formada en el plano focal del objetivo, un modulador óptico espacial que comprende una pluralidad de elementos (P_1, \dots, P_N) y medios de mando de dichos elementos (P_1, \dots, P_N) de dicho modulador óptico espacial, estando el modulador óptico espacial dispuesto sobre el haz óptico con el fin de modular el haz óptico incidente y/o reflejado, comprendiendo dicho sistema de calibración:

- una muestra plana reflectante dispuesta cerca del plano focal del objetivo;
- 25 - un medio de ajuste de la distancia z entre el plano focal del objetivo y dicha muestra;
- un sistema óptico adecuado para recibir una parte del haz reflejado por dicha muestra y para formar una imagen del plano focal del objetivo en un plano conjugado;
- 30 - una cámara dispuesta en dicho plano conjugado ópticamente con el plano focal del objetivo; y
- un sistema de control que comprende una unidad de mando del medio de ajuste de la distancia z , una unidad de mando de los elementos ($P_1, \dots, P_i, \dots, P_N$) del modulador óptico espacial, una unidad de tratamiento de las imágenes adquiridas por la cámara para una pluralidad de distancias z adecuada para deducir de ello una medición de la PSF del dispositivo y de los medios de cálculo adecuados para determinar los valores de los mandos a aplicar respectivamente sobre el medio de ajuste de la distancia z y sobre los elementos del modulador óptico espacial en función de las mediciones de la PSF.

40 Según diferentes aspectos particulares del sistema de calibración de la invención, los medios de cálculo comprenden:

- unos medios de reconstrucción del perfil de amplitud y/o de fase del haz que utiliza un algoritmo de diversidad de fase;
- 45 - unos medios de determinación de las funciones de influencias (E_1, \dots, E_N) del conjunto de los elementos P_1, \dots, P_N del modulador óptico espacial sobre el perfil de amplitud A y/o de fase φ del haz; y/o
- unos medios de inversión de las funciones de influencia del conjunto de los elementos P_1, \dots, P_N del modulador óptico espacial por un algoritmo de regresión lineal y de los medios de minimización para deducir de ello una calibración del modulador óptico espacial.

La presente invención se refiere también a las características que aparecerán durante la descripción siguiente y que deberán ser consideradas aisladamente o según todas sus combinaciones técnicamente posibles.

55 Esta descripción, dada a título de ejemplo no limitativo, hará que se entienda mejor cómo se puede realizar la invención en referencia a los dibujos anexos, en los cuales:

- la figura 1 representa esquemáticamente un dispositivo de calibración según un primer modo de realización de la invención;
- 60 - la figura 2 representa esquemáticamente un dispositivo de calibración según un segundo modo de realización de la invención;
- la figura 3 representa esquemáticamente un dispositivo de calibración según un tercer modo de realización de la invención;

- la figura 4 representa esquemáticamente las principales etapas del procedimiento de la invención;
- la figura 5 representa esquemáticamente una variante de una etapa de inicialización del algoritmo de diversidad de fase;
- la figura 6 representa esquemáticamente una variante del algoritmo de diversidad de fase según un modo de realización de la invención;
- la figura 7 representa esquemáticamente una variante de una etapa de determinación de una función de influencia de un elemento P_i de un modulador óptico espacial.

Descripción detallada

La figura 1 representa un primer ejemplo de realización de un dispositivo experimental de calibración de un modulador óptico espacial 6 en un microscopio. En el ejemplo representado el modulador óptico espacial es un espejo deformable que comprende una pluralidad de accionadores. Sin embargo, el modulador óptico espacial podría ser otro tipo de modulador espacial (SLM de cristales líquidos por ejemplo), sin salirse del ámbito de la invención. Se ha representado en la figura sólo una parte de los componentes del microscopio. En particular, el tubo del microscopio no está representado en la figura 1.

Una fuente luminosa 1 genera un haz de excitación 1a destinado a iluminar una muestra 10. La fuente luminosa puede pertenecer al microscopio o ser acoplada a un puerto de entrada del microscopio. La fuente puede ser una fuente continua o una fuente de impulsos, tal como un láser de impulsos. La fuente 1 es ventajosamente la fuente destinada a ser utilizada después en la aplicación considerada. En el caso de una fuente láser, la superficie espacial de la fuente puede ser muy limitada, por lo que un diafragma de entrada no es necesario. En el caso de una fuente extendida espacialmente, un diafragma suficientemente pequeño, para ser considerado como puntual, debe estar dispuesto en el haz incidente en un plano conjugado ópticamente del plano focal del objetivo (en la práctica, el tamaño del diafragma debe ser, como mucho, la mitad de la anchura de la mancha de Airy, que corresponde a la PSF ideal de excitación del sistema). En lo que sigue en el presente documento, la fuente luminosa 1 es asimilada con un punto de origen.

El haz de origen 1a está acoplado a la trayectoria óptica del microscopio por un sistema óptico 2.

Un cubo separador en polarización 3 envía el haz incidente en dirección de una placa 4 (de tipo placa $\lambda/4$) y de un sistema óptico afocal 5a, 5b para iluminar un espejo deformable 6. El espejo deformable 6 está colocado en el microscopio, o aguas arriba, con el fin de inducir una modulación del frente de onda del haz luminoso excitador. El espejo deformable 6 tiene una superficie reflectante que puede ser deformada por unos accionadores $P_1, \dots, P_i, \dots, P_N$. Existen diferentes tecnologías de accionadores (magnéticos, piezoeléctrico, etc.). Los accionadores están mandados por un sistema de control 15, que puede enviar mandos a un único accionador o simultáneamente a varios accionadores. El espejo deformable 6 utilizado en reflexión sobre el haz incidente está conjugado con la pupila de entrada 9 de un objetivo de microscopio 8.

El cubo separador en polarización 3 recibe el haz reflejado y modulado por el espejo deformable 6. Después de un doble paso a través de la placa $\lambda/4$ orientada a 45° de la polarización incidente, el estado de polarización del haz se gira 90° y el haz inicialmente transmitido por el cubo 3 se refleja sin pérdida de potencia. El cubo 3 reenvía el haz modulado hacia un sistema óptico 7 que lo dirige hacia el objetivo del microscopio 8, con el fin de cubrir el campo de la pupila 9. El diámetro de la pupila 9 determina generalmente la apertura digital del objetivo del microscopio 8. La apertura digital de un objetivo del microscopio está generalmente comprendida entre 0,2 y 1,45.

El microscopio comprende un soporte de muestras en el que se dispone una muestra 10 colocada cerca del punto focal del objetivo del microscopio 8. La muestra 10 es preferentemente un espejo plano. Si el objetivo 8 utilizado está concebido para ser utilizado con una placa que cubre la muestra, una placa del grosor requerido se pega sobre el espejo con la ayuda de un pegamento óptico o de una gota de aceite para objetivo. En el caso de un objetivo de microscopio de inmersión en un medio de índice óptico, un medio de inmersión (por ejemplo: aire, agua, glicerol, aceite) de índice adaptado al objetivo de inmersión se añade entre el espejo y/o la placa y el objetivo, con el fin de colocarse en condiciones normales de utilización del objetivo.

El soporte para muestras se monta sobre un sistema de posicionamiento 11, por ejemplo piezoeléctrico, que asegura el desplazamiento axial relativo entre el objetivo 8 y la muestra 10, eventualmente cubierto por una placa según el objetivo utilizado.

El dispositivo de calibración de la figura 1 comprende una placa separadora 12 (por ejemplo una placa semirreflectante) colocada aguas arriba del objetivo 8. La placa 12 extrae una parte del haz reflejado por la muestra 10 que es después enfocado mediante un sistema óptico 13 sobre una cámara 14, de manera que este plano de detección de la cámara 14 esté conjugado ópticamente con el plano focal del objetivo 8.

El sistema de control 15 comprende una unidad de mando de los accionadores $P_1, \dots, P_i, \dots, P_N$ del espejo deformable 6, una unidad de mando del sistema de posicionamiento 11 objetivo-muestra, una unidad de tratamiento de imágenes para tratar las imágenes adquiridas por la cámara 14 y una unidad de cálculo para determinar los valores de los mandos a aplicar respectivamente sobre los accionadores $P_1, \dots, P_i, \dots, P_N$ del espejo deformable 6 y sobre el sistema de posicionamiento 11 de distancia axial objetivo-muestra, en función de las mediciones de la PSF imagen según un algoritmo detallado más adelante.

Con el fin de comparar las mediciones obtenidas por el dispositivo de calibración de la invención con las obtenidas directamente por un sensor de frente de onda conocido, se dispone un espejo amovible 16 sobre la trayectoria del haz reflejado por la muestra, un analizador de frente de onda 17 de tipo Shack-Hartmann (SHS) y una lente 18 de acoplamiento óptico. La lente 18 se selecciona según el objetivo 8 para adaptar el tamaño del perfil del haz al del sensor del frente de onda 17. En lugar de utilizar varias lentes 18, se puede utilizar también un telescopio de focal variable. El analizador del frente de onda 17 puede así proporcionar una medición de referencia de la distribución espacial del frente de onda en el plano de la pupila 9. Sin embargo, el SHS 17, la lente 18 y el espejo amovible 16 no forman parte del dispositivo de calibración de la invención.

Se describirá ahora el funcionamiento del dispositivo de la figura 1. El haz de origen 1a está acoplado por un sistema óptico 5a, 5b al espejo deformable 6. El espejo deformable 6 induce una modulación del frente de onda del haz luminoso excitador. Esta modulación se traduce por una variación del perfil de fase y de amplitud en el plano de la pupila de entrada 9 del objetivo 8 del microscopio. Estas variaciones del perfil del frente de onda inducen una variación de la respuesta impulsional excitadora (PSF) en intensidad del microscopio detectada por la cámara 14. Esta variación de perfil del frente de onda es la que se utiliza para corregir las aberraciones inducidas por el microscopio o por la muestra en sí misma, o también para dar forma a la PSF con fines de formación de imágenes, de fotoactivación, de fotoablación, etc. En el caso en el que la señal detectada es de nuevo reflejada en el espejo deformable 6 (véase el dispositivo de la figura 2 o 3), se obtiene también una modulación de la respuesta de impulso de detección.

De manera general, para calibrar el conjunto de las modulaciones inducidas por el espejo deformable 6, se considerará a continuación en este documento, no sólo la PSF de excitación, sino también la PSF resultante obtenida en el plano en el que están situados los detectores. La PSF depende intrínsecamente de los diferentes elementos presentes en la trayectoria óptica -espejo deformable 6, componentes ópticos del microscopio, objetivo 8- sino también de su posición relativa. La influencia de cada elemento activo (o accionador $P_1, \dots, P_i, \dots, P_N$) del espejo deformable 6 depende del montaje óptico realizado. Para ser precisa, la calibración del espejo debe ser realizada *in situ* en la configuración de medición de la aplicación considerada.

La figura 2 representa un segundo ejemplo de realización de un dispositivo experimental de calibración de un espejo deformable 6 en otro tipo de microscopio, que funciona en reflexión bajo incidencia oblicua. El dispositivo de la figura 2 comprende unos elementos similares a los del dispositivo de la figura 1, no estando el espejo deformable dispuesto sobre la trayectoria del haz excitador, sino sobre la trayectoria del haz reflejado por la muestra 10. Un sistema óptico 13 forma la imagen del haz reflejado por la muestra y modulado por el espejo deformable 6 sobre la cámara 14. De manera idéntica al dispositivo de la figura 1, un sistema de control 15 comprende una unidad de mando de los accionadores $P_1, \dots, P_i, \dots, P_N$ del espejo deformable 6, una unidad de mando del sistema de posicionamiento 11 objetivo-muestra, una unidad de tratamiento de las imágenes adquiridas por la cámara 14 y una unidad de cálculo para determinar los valores de los mandos a aplicar respectivamente sobre los accionadores del espejo deformable 6 y sobre el sistema de posicionamiento 11, en función de las mediciones de la PSF de imagen según un algoritmo detallado más adelante.

El dispositivo ilustrado en la figura 1 representa un montaje en el que una placa separadora 12 está colocada justo aguas arriba del objetivo 8, lo que es ideal para medir la PSF de excitación. Sin embargo, el conjunto placa separadora 12, lente 13 y cámara 14 se puede colocar en cualquier punto de la trayectoria del haz, mientras que la cámara 14 está conjugada con el plano focal del objetivo 8 y que antes de alcanzar la cámara, el haz no se refleja sobre el modulador espacial antes y después del paso por el objetivo. En el caso, por ejemplo, en el que se desee medir la influencia del espejo deformable sobre la PSF total (excitación + detección) de un microscopio confocal, las dos PSF (excitación y detección) deben ser medidas sucesivamente. Sin embargo, pueden generalmente confundirse si las longitudes de onda de excitación y de detección son idénticas o próximas, y realizar sólo la medición más práctica según la geometría del dispositivo. Así, la figura 3 representa un tercer ejemplo de realización de un dispositivo experimental de calibración de un espejo deformable 6 en un microscopio. El dispositivo de la figura 3 comprende unos elementos similares a los de los dispositivos de las figuras 1 y 2, estando el espejo deformable 6 aquí dispuesto durante la formación de imágenes al mismo tiempo en la trayectoria del haz excitador y en la trayectoria del haz reflejado o creado por la muestra de la que se realiza la imagen. Para calibrar tal microscopio, se puede medir entonces la psf de detección (figura 3a) modificando la trayectoria del haz incidente y colocando la cámara 14 en el lugar del detector habitual; o también medir la psf de excitación (figura 3b) colocando el conjunto placa separadora 12, lente 13 y cámara 14 justo después del objetivo. A título de ejemplo, el dispositivo representado en la figura 3 comprende un dispositivo de barrido 19 del haz también denominado escáner XY, que permite efectuar un barrido del haz láser sobre la muestra, y un detector puntual (por ejemplo orificio diminuto+fotomultiplicador) que permite detectar la señal confocal.

El procedimiento de calibración de la invención se aplica también en el caso de un microscopio recto, inverso u horizontal. En todos los casos, se utiliza un espejo plano cerca del punto focal, y si es necesario un portaobjetos de microscopio por encima, que puede ser fijado por un punto de aceite para microscopio o de pegamento óptico.

5 Procedimiento de calibración

La figura 4 representa esquemáticamente las principales etapas del procedimiento de calibración de la invención, basado en un algoritmo de diversidad de fase.

10 La calibración del espejo deformable 6 se efectúa a partir de las etapas siguientes:

- 15 - inicialización del sistema (etapa 20), estando el espejo plano 10 colocado en una primera posición cerca del plano focal del objetivo, definido por la distancia Z_0 entre el espejo plano y el plano focal del objetivo 8,
- envío de un vector de mando al espejo deformable 6 (etapa 30), con el fin de modular el haz óptico de excitación y/o de reflexión (etapa 40),
- 20 - medición de la PSF tridimensional del dispositivo óptico completo (etapas 50-60),
- reconstrucción del perfil de fase y/o de intensidad a nivel de la pupila de entrada del microscopio a partir de la medición de PSF tridimensional (etapa 70),
- 25 - iteración para diferentes vectores de mando hasta que la influencia de cada accionador (si el espejo deformable 6 es lineal) o de cada combinación posible de mandos de accionadores (si el espejo deformable 6 no es lineal) sea conocida (etapas 80-90),
- inversión de las funciones de influencia para deducir la calibración del espejo deformable (etapa 100).

30 Según un modo de realización preferido de la invención, el procedimiento comprende las etapas siguientes:

- 35 - la medición de PSF en intensidad del microscopio se efectúa con la ayuda de un espejo plano 10 colocado cerca del plano focal del objetivo 8 para reflejar un haz de excitación, y de una cámara 14 dispuesta en un plano conjugado del plano focal del objetivo;
- adquisición de tres mediciones de PSF para tres posiciones axiales diferentes y conocidas del espejo plano con la ayuda de un dispositivo de desplazamiento axial del soporte para muestras o del objetivo (etapas 50-60);
- 40 - reconstrucción, salvo en un factor, del perfil de fase y de amplitud del haz excitador en el plano de la pupila 9 del objetivo 8 a partir de las tres mediciones de PSF axiales utilizando un algoritmo iterativo (etapa 70);
- 45 - iteración de las etapas anteriores para diferentes posiciones de cada accionador del espejo deformable (etapas 30 a 70);
- cálculo de la función de influencia compleja de los accionadores del espejo deformable sobre el campo óptico en entrada del objetivo (que determina la PASF tridimensional) (etapas 80-90);
- 50 - determinación completa e intrínsecamente *in situ* de la influencia del espejo deformable sobre las propiedades ópticas del microscopio, determinadas por su PSF (etapa 100).

Etapas detalladas del procedimiento

55 Se detallarán ahora las diferentes etapas.

I - Medición de la PSF

60 Se toma por ejemplo la configuración representada en la figura 1. Se supone que la transmisión del objetivo 8 es uniforme en el conjunto de su pupila de entrada 9 y que el objetivo 8, la placa semi-reflectante 12 y la lente 13 no inducen aberraciones del frente de onda del haz. Se puede demostrar que se mide directamente en la cámara CCD 14 una imagen de la PSF, ampliada por el factor de aumento de la pareja objetivo 8 - lente 13, en la posición axial 2 x z_0 con respecto al plano focal del objetivo, en el que z_0 es la distancia del espejo plano 10 con respecto al plano focal del objetivo 8. Así, cambiando la distancia z_0 entre el espejo plano 10 y el objetivo del microscopio 8, se puede reconstruir una imagen tridimensional de la PSF del sistema.

En el caso en el que las aberraciones inducidas por el objetivo 8, la lente 13 y/o la placa reflectante 12 no pueden ser desatendidas, o en el caso en el que el perfil de transmisión del objetivo 8 no es uniforme, existe una modulación adicional de la función de transferencia óptica (que describe la modificación del perfil de fase y de intensidad del haz), cuya PSF medida no es ya directamente la obtenida a nivel del plano focal. Sin embargo, esta modulación es constante cuando la forma del espejo deformable 6 se modifica, aunque la variación del perfil de fase y de intensidad del haz relacionada con el espejo deformable 6 puede, sin embargo, ser determinada con la misma precisión.

En el caso en el que el espejo deformable 6 está dispuesto en el haz de excitación, se mide así la PSF de excitación (caso de la figura 1). Asimismo, cuando el espejo deformable 6 está dispuesto sobre el haz reflejado por la muestra, se mide la PSF de detección (caso de la figura 2). Finalmente en el caso en el que el espejo deformable 6 está situado en la trayectoria del haz excitador y del haz reflejado (caso de la figura 3), se mide bien una, o bien la otra, o bien las dos, para obtener la influencia del espejo deformable sobre la PSF total (excitación + detección) del microscopio.

II - Reconstrucción del perfil de fase y de intensidad del haz

Las figuras 5 a 7 representan esquemáticamente un ejemplo de realización de un algoritmo de reconstrucción del perfil de amplitud y/o de fase del haz a partir de la medición tridimensional de PSF por un algoritmo de diversidad de fase. La figura 5 representa las etapas de inicialización del algoritmo de cálculo, y la figura 6 las etapas iterativas de reconstrucción.

La inicialización del algoritmo (figura 5) comprende en primer lugar una inicialización (etapa 20a) del perfil de fase en entrada por una función φ_{ik} , por ejemplo constante en el campo de la pupila de entrada 9. Asimismo, se inicializa la amplitud A_{ik} del campo sobre la pupila de entrada 9 (etapa 20b), suponiéndose la amplitud A_{ik} , por ejemplo, constante. El perfil de transmisión de la pupila de entrada 9 del objetivo se estima (etapa 20c) por una función Π_{ik} que es, por ejemplo, una función de puerta. Se deduce una estimación inicial del perfil del campo igual al producto $A_{ik} \Pi_{ik} \exp[j\varphi_{ik}]$ (etapa 20d). Por otra parte, para obtener una buena convergencia del algoritmo de diversidad de fase en condiciones típicas de ruido sobre la señal, son necesarias tres imágenes de la PSF en unos planos Z_0 diferentes. Se parte de la estimación inicial del perfil de campo obtenida en la etapa 20d. Se estima un término de desenfoque que es igual, respectivamente, a $\exp(-jz_0\delta)$, 1 y $\exp(+jz_0\delta)$, para las tres posiciones relativas: $-z_0$, 0 y $+z_0$ (etapas 20e - 20f).

La figura 6 representa esquemáticamente un algoritmo de reconstrucción del perfil en tres dimensiones por diversidad de fase. Después de la inicialización (etapa 70a, por ejemplo como se indica según las etapas 20a, 20b, 20c, 20d en relación con la figura 5), se dispone de una estimación inicial del perfil del campo y de una estimación inicial del término de desenfoque δ para las tres posiciones relativas: $-z_0$, 0 y $+z_0$ (por ejemplo como se indica según las etapas 20e-20f de la figura 5). En la etapa 70b, se calculan tres perfiles de campo por multiplicación del perfil de campo inicial, respectivamente, por cada uno de los tres términos de desenfoque: $\exp(-jz_0\delta)$, 1 y $\exp(+jz_0\delta)$. Se aplica una transformada de Fourier (TF) para calcular las PSF estimadas para las tres posiciones relativas: $-z_0$, 0 y $+z_0$ (etapa 70c). Después, se sustituye la amplitud de las PSF calculadas por el valor de las PSF medidas, respectivamente, para cada valor de z (etapa 70d). Se aplica una operación de transformada de Fourier inversa (TF^{-1}) para los tres campos obtenidos (etapa 70e). Se divide por el término de desenfoque correspondiente a cada posición: $-z_0$, 0 y $+z_0$ (etapa 70g). Se multiplica la media de los tres campos por el perfil de transmisión de la pupila de entrada del objetivo (etapa 70g). El perfil así obtenido sirve de nueva estimación del campo a nivel de la pupila trasera del objetivo. Las etapas 70b a 70g se repiten hasta que se cumpla una condición de terminación (etapa 70h).

La etapa de finalización comprende, por ejemplo, un cálculo de la distancia cuadrática de amplitud entre las tres PSF calculadas y medidas. Si el valor es inferior a un criterio de convergencia (típicamente del orden de 10^{-6} en distancia relativa), el algoritmo se termina. Se obtiene en esta etapa una estimación del perfil de campo que comprende, por un lado, la amplitud del campo y, por otro lado, la fase generalmente replegada (módulo 2π) del campo (etapa 70i). Una etapa suplementaria (etapa 70j) permite extraer la fase del perfil desplegada con la ayuda de un algoritmo por transformada de Fourier. Un ejemplo de algoritmo de despliegue de fase se describe en la publicación D.C. GHIGLIA, M.D. PRITT "Two dimensional phase unwrapping: theory, algorithms & software", ed. Wiley (1998).

El algoritmo utilizado permite una reconstrucción completa del perfil de fase y de amplitud con, como únicos parámetros: el tamaño de los píxeles de la cámara, la longitud de onda del haz, la ampliación óptica entre el plano focal y el plano de la cámara, la distancia axial entre las tres posiciones z_0 utilizadas, la apertura digital del objetivo y el índice del medio de inmersión utilizado. Según el valor de estos parámetros y con el fin de acelerar la convergencia del algoritmo, las imágenes de partida pueden ser recortadas (disminución de la resolución final sobre los perfiles de fase y de intensidad obtenidos) o "binadas" (ajuste del perfil reconstruido al tamaño de la pupila de entrada del microscopio para evitar unos márgenes excesivos). En una implementación actual con un ordenador reciente (2 Go de Ram, procesador de 2 GHz), la reconstrucción lleva aproximadamente 2 segundos por perfil de fase.

III - Calibración del espejo deformable

5 En el caso más habitual en el que el funcionamiento del espejo deformable 6 es lineal, la calibración se obtiene determinando la función de influencia E_i (sobre el perfil del haz) de cada accionador R_i . El procedimiento está representado esquemáticamente por el diagrama de etapas de la figura 7. Cada accionador R_i está calibrado uno detrás del otro: una serie de mandos (por lo menos dos valores para una gama lineal) se envía sobre un accionador R_i y el perfil correspondiente se mide para cada valor de mando. El ajuste de los diferentes perfiles obtenidos permite finalmente determinar la función de influencia E_i de cada elemento R_i .

10 Una vez obtenidas las fases para diferentes valores de mando sobre los elementos activos del espejo, en el caso de un espejo que tiene un comportamiento lineal, se utiliza una etapa de regresión lineal para calcular la función de influencia de cada elemento activo. Después, si se desea determinar el vector de mando a enviar al espejo para obtener un perfil de fase y de amplitud dada, se pasa por una etapa suplementaria para obtener una matriz de mando. Esta matriz une directamente la combinación de modos (Zernike *et al.*) que se desea obtener (descrita por un vector de coeficientes, uno por modo) al vector de mando a enviar sobre cada uno de los elementos activos. Por ejemplo, si se quiere producir los modos de Zernike, cada función de influencia E_i se descompone en base a los modos de Zernike a producir, y la matriz así obtenida es pseudo-invertida para obtener la matriz de mando.

15 En el caso menos frecuente en el que el comportamiento del espejo deformable 6 no es lineal, es decir cuando las respuestas de los accionadores no son independientes las unas de las otras, es necesario medir la variación del perfil del haz para cualquier combinación posible de mandos enviada a los accionadores del espejo deformable 6.

Ejemplo de mediciones experimentales

25 Se ha realizado unas mediciones sobre un banco de ensayo según un montaje tal como el representado esquemáticamente en la figura 1. El espejo deformable 6 utilizado en reflexión se conjuga con la pupila de entrada 9 de un objetivo de microscopio 8. El espejo deformable comprende 52 accionadores. Un espejo plano 10, eventualmente recubierto de con un portaobjetos según el objetivo 8 utilizado, se monta sobre un sistema de posicionamiento 11 de tipo piezoeléctrico que asegura el desplazamiento relativo entre el objetivo 8 y el espejo plano 10. La detección de la PSF se realiza en una cámara CCD de 8 bits que comprende una matriz de 1200x800 píxeles.

30 Con el fin de evaluar el dispositivo y el procedimiento de calibración, también se utiliza un espejo extraíble 16 para medir el frente de onda sobre un analizador de frente de onda 17 de tipo Shack-Hartmann (SHS). Una lente adicional 18 de acoplamiento óptico se selecciona según el objetivo 8 para adaptar el tamaño del perfil de haz al del sensor del frente de onda 17.

35 En esta realización, el espejo deformable 6 está conjugado a la pupila de entrada 9 del objetivo de microscopio 8. Se trata del caso más frecuente de utilización, para el cual la modulación inducida por el espejo se refiere únicamente al perfil de fase y no de intensidad del haz excitador. Se ha calculado el perfil de intensidad y la función de influencia sobre la fase reconstruida para uno de los 52 elementos activos del espejo deformable conjugado con la pupila de entrada de un objetivo 20x aire, de apertura digital 0,75. Los resultados obtenidos se han comparado con una medición obtenida sobre el dispositivo de medición del frente de onda Shack-Hartmann.

40 Con el fin de evaluar la firmeza del procedimiento utilizado, se mide la función de influencia de un mismo espejo deformable 6 para tres objetivos de microscopio 8 muy diferentes.

- 45 - un objetivo de ampliación 20x de aire, corregido con portaobjetos, de apertura digital 0,75 (pupila de entrada de 13,5 mm);
- 50 - un objetivo de ampliación 10x de aire, sin portaobjetos, de apertura digital 0,4 (pupila de entrada de 9 mm); y
- 55 - un objetivo de ampliación 60x de agua, corregido con portaobjetos, de apertura digital 1,2 (pupila de entrada de 5,4 mm).

60 La reconstrucción de la fase en el plano de la pupila del objetivo según el procedimiento de la invención da unos resultados bastante comparables a las mediciones directas obtenidas sobre el sensor del frente de onda Shack-Hartmann, para los tres objetivos. Además, se observa que el procedimiento de la invención permite obtener una medición de la fase con una mejor resolución espacial que la proporcionada por el Sharck-Hartmann, incluso con una cámara CCD estándar que presenta una resolución de un megapíxel, mientras que los sensores SHS habitualmente disponibles están limitados a aproximadamente 30 x 30 píxeles. Además, el SHS carece de precisión en los bordes de la imagen, en los que el haz es menos luminoso. Por el contrario, el procedimiento de la invención proporciona un perfil de fase con una buena sensibilidad incluso en la periferia de la imagen. El procedimiento de la invención demuestra así su firmeza para unos objetivos de microscopio de características muy variadas, que cubren una amplia gama de aplicaciones.

Otra manera de verificar la exactitud de las funciones de influencia medidas, es utilizar las funciones de influencia determinadas por el procedimiento de la invención, para calcular el vector de mando a enviar al espejo deformable 6, con el fin de producir los modos de Zernike. Se selecciona, por ejemplo, un modo de Zernike conocido para corregir el astigmatismo con un objetivo 60x. La medición de PSF resultante muestra que el modo de Zernike deseado se ha producido correctamente por el vector de mando utilizado. Esto se confirma también mediante una medición del frente de onda utilizando el sensor del frente de onda Shack-Hartmann.

El principal campo de aplicaciones considerado es la microscopía óptica con formación del frente de onda (corrección de las aberraciones y/o modelación de la respuesta impulsional), en particular para:

- la formación de imágenes: microscopía confocal, multifotónica, súper-resolutiva, etc.
- la fotoablación por láser;
- la manipulación óptica: fotoactivación, desencajado foto-inducido, etc.

El procedimiento y el dispositivo de calibración de la invención se aplican de manera análoga a un microscopio que comprende otro tipo de modulador óptico espacial de luz que un espejo deformable para modular un haz luminoso de amplitud y/o de fase. En el caso general de un modulador óptico espacial, cada elemento del modulador está mandado por unos medios de mando con el fin de modular la amplitud y/o la fase del haz luminoso. Así, para un modulador de cristales líquidos, los elementos son los píxeles que son mandados por unos electrodos que permiten aplicar una tensión sobre cada píxel, lo que produce una modulación local de amplitud y/o de fase determinada.

Por comparación con los procedimientos de mediciones del frente de onda (directa o por interferometría), el procedimiento y el dispositivo propuestos según la invención se adaptan a cualquier tipo de fuente (continua o de impulsos, sea cual sea la longitud de onda), de modulador óptico espacial, de objetivo y de microscopio y conlleva poca, o incluso ninguna, modificación del dispositivo existente. Además, la invención proporciona una calibración del sistema activo óptico completo (constituido por el conjunto fuente + modulador óptico espacial + microscopio + objetivo) en las condiciones exactas en las que está destinado a ser utilizado. Finalmente, la invención proporciona también una medición experimental directa de la respuesta impulsional excitadora para diferentes mandos aplicados a los elementos del modulador óptico espacial.

Contrariamente a los métodos anteriores, el procedimiento propuesto no utiliza ninguna modelización a priori del frente de onda. La invención se basa en la medición directa de la PSF tridimensional, que permite así reconstruir el perfil de fase y de intensidad sin aproximación. Así, se calibra directamente el conjunto del dispositivo óptico activo compuesto del modulador óptico espacial, del microscopio y del objetivo, en función de la influencia de un conjunto de mandos en la respuesta óptica global del sistema. El posicionamiento exacto del modulador óptico espacial en el sistema es por lo tanto intrínsecamente tenido en cuenta.

Además, el tiempo de cálculo necesario para la reconstrucción de los perfiles de fase está muy reducido en comparación con los procedimientos anteriores. El procedimiento de la invención permite obtener la calibración de un elemento activo dentro de 20 a 50 segundos en un sistema que tiene 2 Go de RAM.

El procedimiento de la invención y el dispositivo hace a partir de ahora posible la mejora significativa de la resolución de los microscopios ópticos, permitiendo la integración eficaz de espejos deformables en unos microscopios existentes para corregir las aberraciones.

La mejora de la calidad de la calibración puede permitir mejorar la resolución en 3D de un microscopio óptico acoplado a un modulador óptico espacial, en particular para:

- muestras biológicas no homogéneas en volumen;
- muestras sumergidas en un medio de índice desadaptado; y/o
- un microscopio cuyo sistema óptico presenta unas aberraciones ópticas residuales.

Un microscopio existente puede ser modificado para acoplar un modulador óptico espacial y su sistema de calibración, sin necesitar ninguna adaptación costosa. En efecto, la mayoría de los microscopios están habitualmente equipados de un puerto destinado a recibir una cámara con el fin de formar una imagen ampliada del plano focal del objetivo.

El procedimiento y el dispositivo de la invención permiten una mejora significativa, con coste y complejidad moderados, de los rendimientos de formación de imágenes de un microscopio existente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de calibración de un dispositivo óptico con modulador óptico espacial (6), comprendiendo dicho dispositivo un punto de origen luminoso (1), un objetivo óptico (8) de gran apertura digital adecuada para recibir un haz incidente y/o para recoger un haz óptico reflejado por una muestra, una cámara (14) dispuesta en un plano conjugado ópticamente con el plano focal del objetivo (8) y un modulador óptico espacial (6) dispuesto en el haz óptico aguas arriba de la cámara (14), comprendiendo dicho procedimiento las etapas siguientes:
- 10 a) colocación de una muestra plana reflectante (10) cerca del plano focal del objetivo (8),
- b) aplicación de un mando de amplitud R_j^i sobre un elemento P_i del modulador óptico espacial (6), de manera que se module el haz óptico incidente y/o reflejado sobre la muestra (10),
- 15 c) adquisición de una imagen de la respuesta impulsional excitadora, PSF, en intensidad en un plano conjugado del plano focal del objetivo (8),
- d) modificación de la distancia axial relativa entre el objetivo (8) y la muestra (10) reflectante en una cantidad Z conocida;
- 20 e) iteración de las etapas c) y d) para una pluralidad de distancias axiales relativas entre la muestra (10) y el plano focal del objetivo (8);
- f) reconstrucción del perfil en amplitud y/o en fase del haz en un plano conjugado del plano focal del objetivo por un algoritmo de diversidad de fase para un valor R_j^i de un elemento P_i ;
- 25 g) iteración, j , de las etapas b) a f) para una pluralidad de valores de amplitud R_j^i para un elemento P_i del modulador óptico espacial (6);
- 30 h) determinación de la función de influencia E_i de un elemento P_i sobre el perfil en amplitud A y/o en fase φ del haz a partir de los perfiles obtenidos en la etapa f;
- i) iteración de las etapas b) a h) para los diferentes elementos $P_{i=1, \dots, N}$ del modulador óptico espacial (6);
- 35 j) determinación de las funciones de influencias (E_1, \dots, E_N) del conjunto de los elementos P_1, \dots, P_N del modulador óptico espacial (6) sobre el perfil en amplitud A y/o en fase φ del haz.
- 40 2. Procedimiento de calibración según la reivindicación 1, caracterizado por que las mediciones de PSF se efectúan para tres distancias axiales relativas entre el objetivo (8) y la muestra (10) definidas con respecto a la posición de la muestra en el plano focal del objetivo tales que: $z = (-z_0, 0, +z_0)$.
3. Procedimiento de calibración según la reivindicación 2, caracterizado por que la etapa f) de reconstrucción del perfil en amplitud y/o en fase del haz comprende las etapas siguientes:
- 45 - estimación de un término de desenfoque que corresponde a las tres posiciones relativas: $-z_0, 0$ y $+z_0$;
- estimación inicial del perfil del campo en la pupila de entrada del objetivo;
- estimación del perfil de transmisión de la pupila de entrada del objetivo;
- 50 - cálculo de tres perfiles de campo por multiplicación del perfil del campo estimado en la pupila de entrada del objetivo, respectivamente, por cada uno de los tres términos de desenfoque;
- aplicación de una transformada de Fourier para calcular las PSF estimadas para las tres posiciones relativas: $-z_0, 0$ y $+z_0$;
- 55 - sustitución de la amplitud de las PSF calculadas por el valor de las PSF medidas respectivamente para cada uno de los valores de z ($-z_0, 0, +z_0$);
- aplicación de una transformada de Fourier inversa para los tres campos obtenidos;
- 60 - división por el término de desenfoque que corresponde respectivamente a cada posición z ($-z_0, 0, +z_0$);
- media de los tres campos complejos obtenidos;
- 65 - multiplicación de la media de los campos por el perfil de transmisión de la pupila de entrada del objetivo, para obtener una nueva estimación del perfil del campo a nivel de la pupila trasera del objetivo;

- iteración del conjunto de las etapas del algoritmo de cálculo de reconstrucción del perfil en amplitud y/o en fase hasta que se cumpla una condición de terminación.
- 5 4. Procedimiento de calibración según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende una etapa suplementaria previa a la etapa j), consistiendo dicha etapa suplementaria en una iteración de las etapas b) a i) para diferentes combinaciones de mandos simultáneos de una pluralidad de elementos.
- 10 5. Procedimiento de calibración según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que comprende, después de la etapa c), una etapa suplementaria de filtrado digital de las imágenes de PSF medidas de manera que la resolución espacial disminuya y/o la dimensión de las imágenes se adapten al tamaño de la pupila (9) del objetivo (8).
- 15 6. Procedimiento de calibración según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que comprende, después de la etapa j), una etapa suplementaria de inversión de las funciones de influencia del conjunto de los elementos P_1, \dots, P_N del modulador óptico espacial modulador óptico espacial (6) en amplitud $A(x, y) = M_A (R_t^i)$ y/o $R_t^i = M_A^{-1} (A(x, y))$ y respectivamente en fase $\varphi(x, y) = M_\varphi (R_t^i)$ y/o $R_t^i = M_\varphi^{-1} (\varphi(x, y))$.
- 20 7. Sistema de calibración de un dispositivo óptico con modulador óptico espacial (6), comprendiendo dicho dispositivo un punto de origen luminoso (1) que genera un haz incidente (1a), un objetivo óptico (8) de gran apertura digital adecuado para recibir un haz incidente y/o para recoger un haz óptico reflejado por una muestra, estando una imagen del punto de origen (1) formada en el plano focal del objetivo (8), comprendiendo un modulador óptico espacial (6) una pluralidad de elementos (P_1, \dots, P_N) y unos medios de mando de dichos elementos (P_1, \dots, P_N), estando el modulador óptico espacial (6) dispuesto en el haz óptico de manera que module el haz óptico incidente y/o reflejado, comprendiendo dicho sistema de calibración:
- 25
- una muestra (10) plana reflectante dispuesta cerca del plano focal del objetivo (8);
 - un medio de ajuste (11) de la distancia z entre el plano focal del objetivo (8) y dicha muestra (10);
 - un sistema óptico (8, 12, 13) adecuado para recibir una parte del haz reflejado por dicha muestra (10) y para formar una imagen del plano focal del objetivo (8) en un plano conjugado;
 - una cámara (14) dispuesta en dicho plano conjugado ópticamente con el plano focal del objetivo (8); y
 - un sistema de control (15) que comprende una unidad de mando del medio de ajuste (11) de la distancia z, una unidad de mando de los elementos ($P_1, \dots, P_i, \dots, P_N$) del modulador óptico espacial adaptada para proporcionar una pluralidad de valores de amplitud (6), una unidad de tratamiento de las imágenes adquiridas por la cámara (14) para una pluralidad de distancias z adecuada para deducir una medición de la respuesta impulsional excitadora, PSF, del dispositivo y unos medios de cálculo adecuados para determinar los valores de los mandos a aplicar respectivamente sobre el medio de ajuste (11) de la distancia z y sobre los elementos del modulador óptico espacial (6) en función de las mediciones de la PSF.
- 30
- 35
- 40
- 45 8. Sistema de calibración según la reivindicación 7, caracterizado por que los medios de cálculo comprenden unos medios de reconstrucción del perfil en amplitud y/o en fase del haz utilizando un algoritmo de diversidad de fase.
- 50 9. Sistema de calibración según la reivindicación 8, caracterizado por que los medios de cálculo comprenden unos medios de determinación de las funciones de influencias (E_1, \dots, E_N) del conjunto de los elementos P_1, \dots, P_N del modulador óptico espacial (6) sobre el perfil en amplitud A y/o en fase φ del haz.
- 55 10. Sistema de calibración según la reivindicación 9, caracterizado por que los medios de cálculo comprenden unos medios de inversión de las funciones de influencia del conjunto de los elementos P_1, \dots, P_N del modulador óptico espacial (6) por un algoritmo de regresión lineal y unos medios de minimización para deducir una calibración del modulador óptico espacial (6).

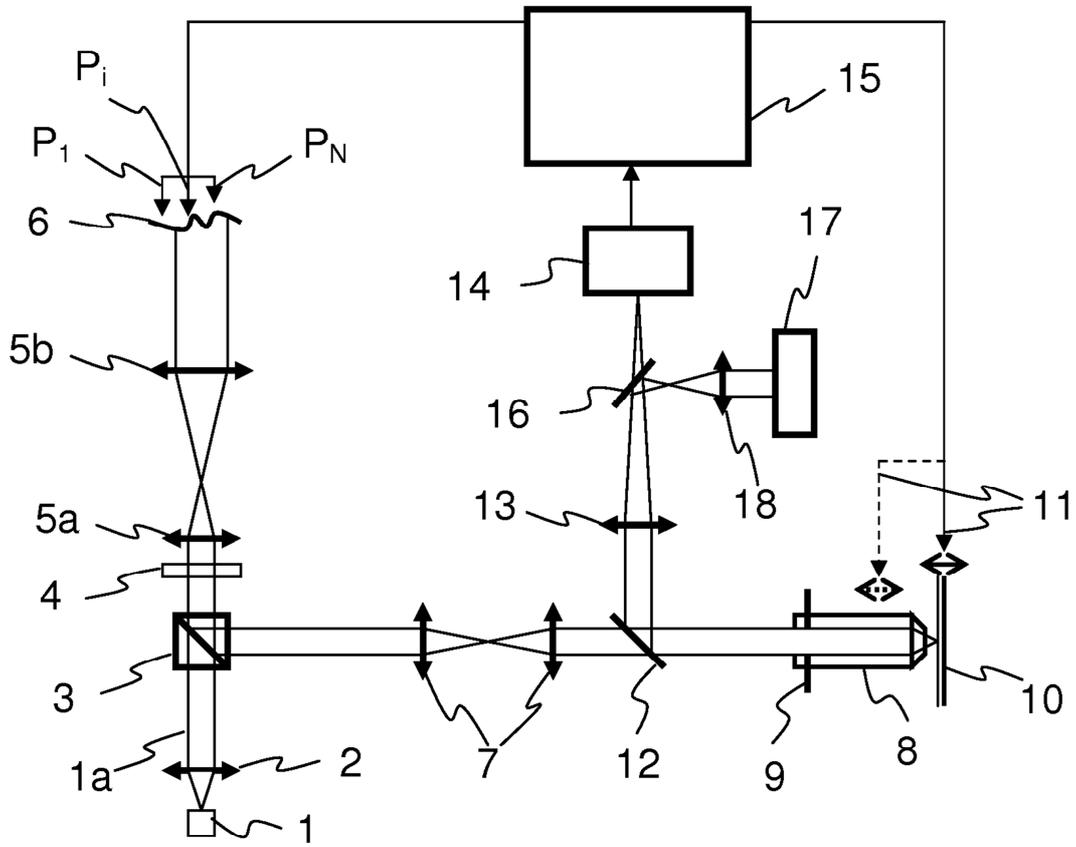


Figura 1

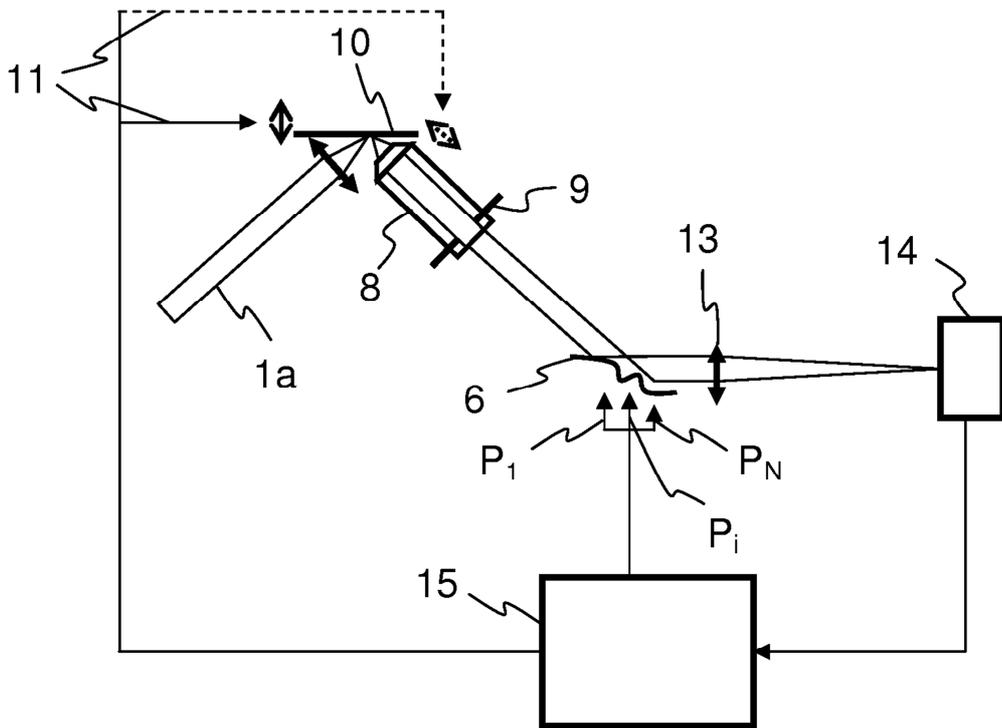


Figura 2

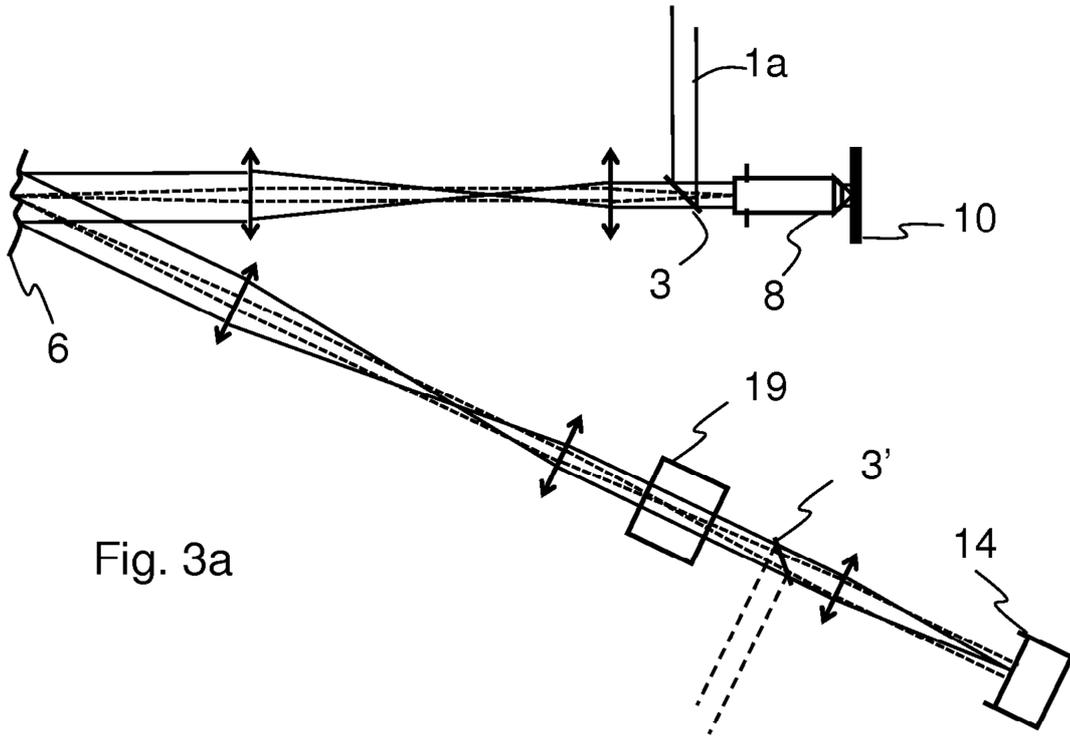


Fig. 3a

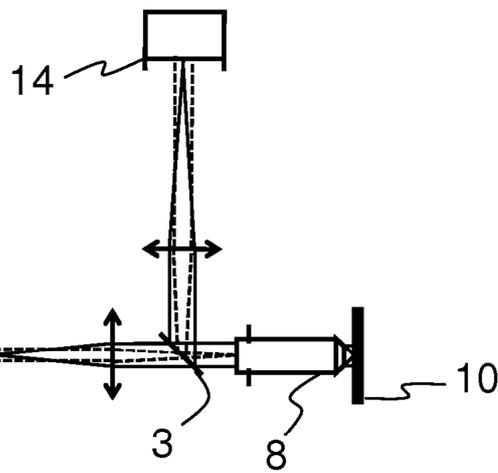


Fig. 3b

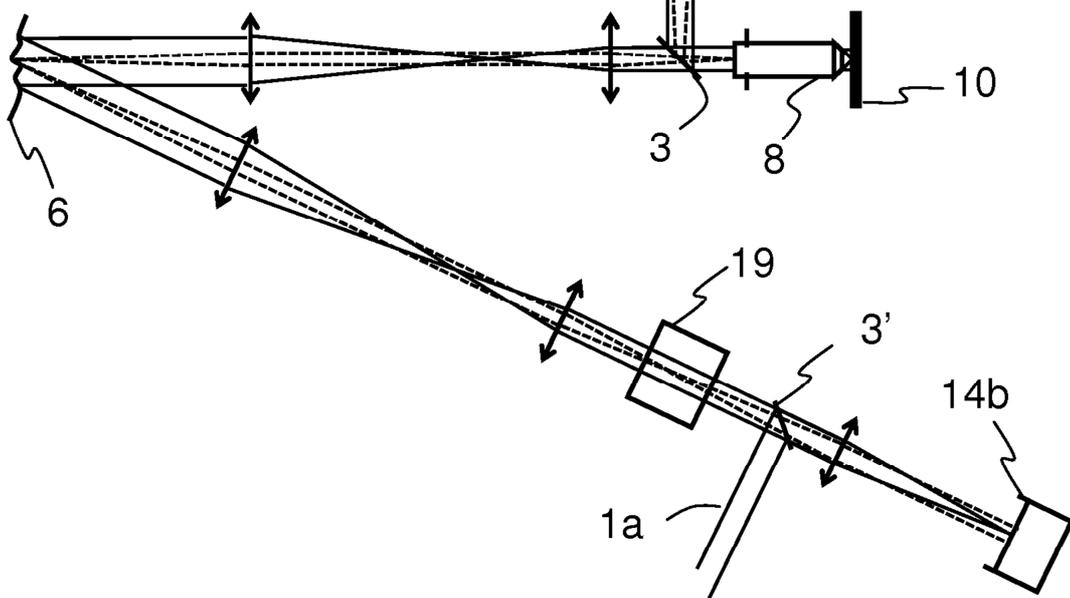


Figura 3

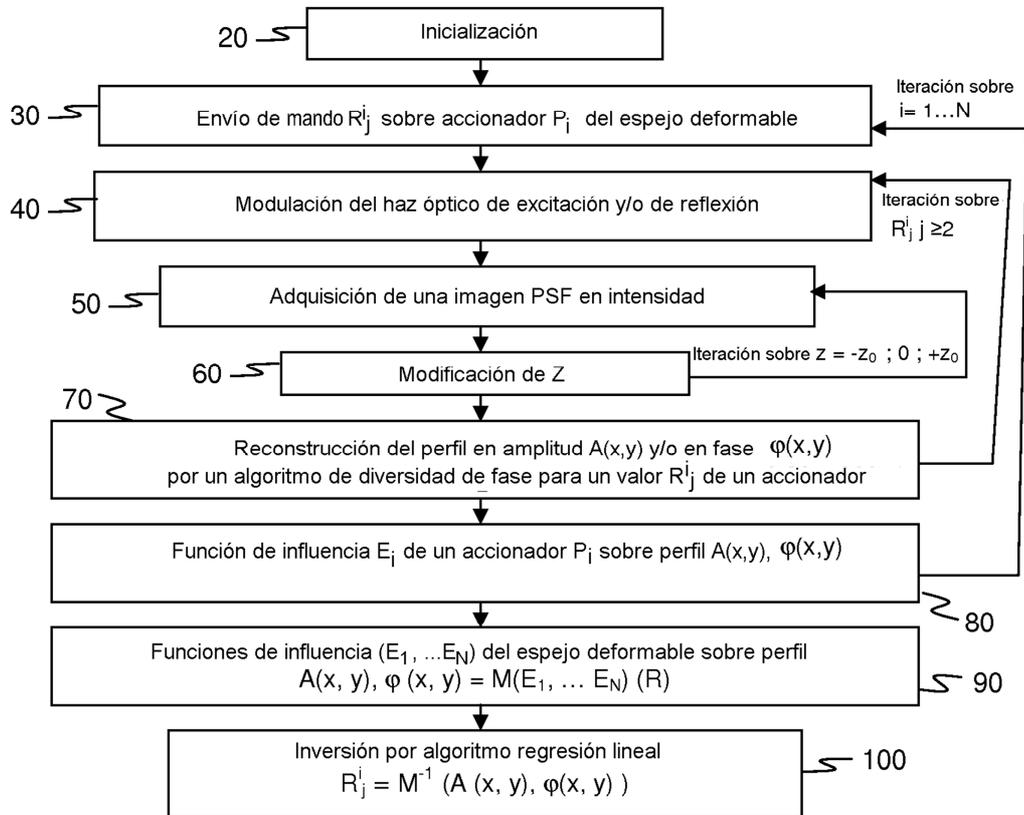


Figura 4

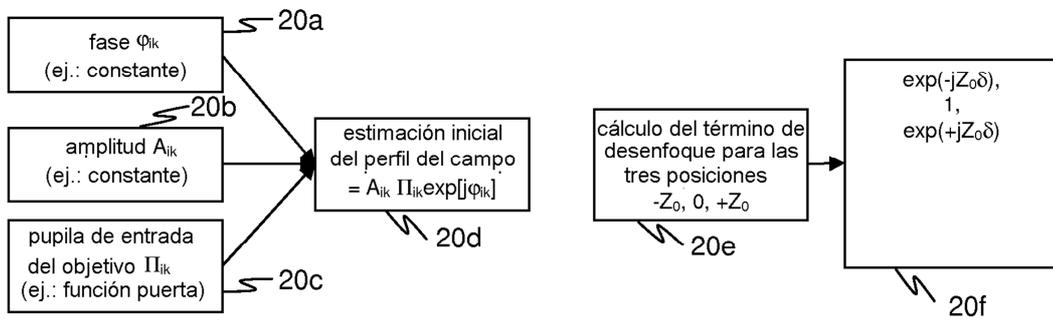


Figura 5

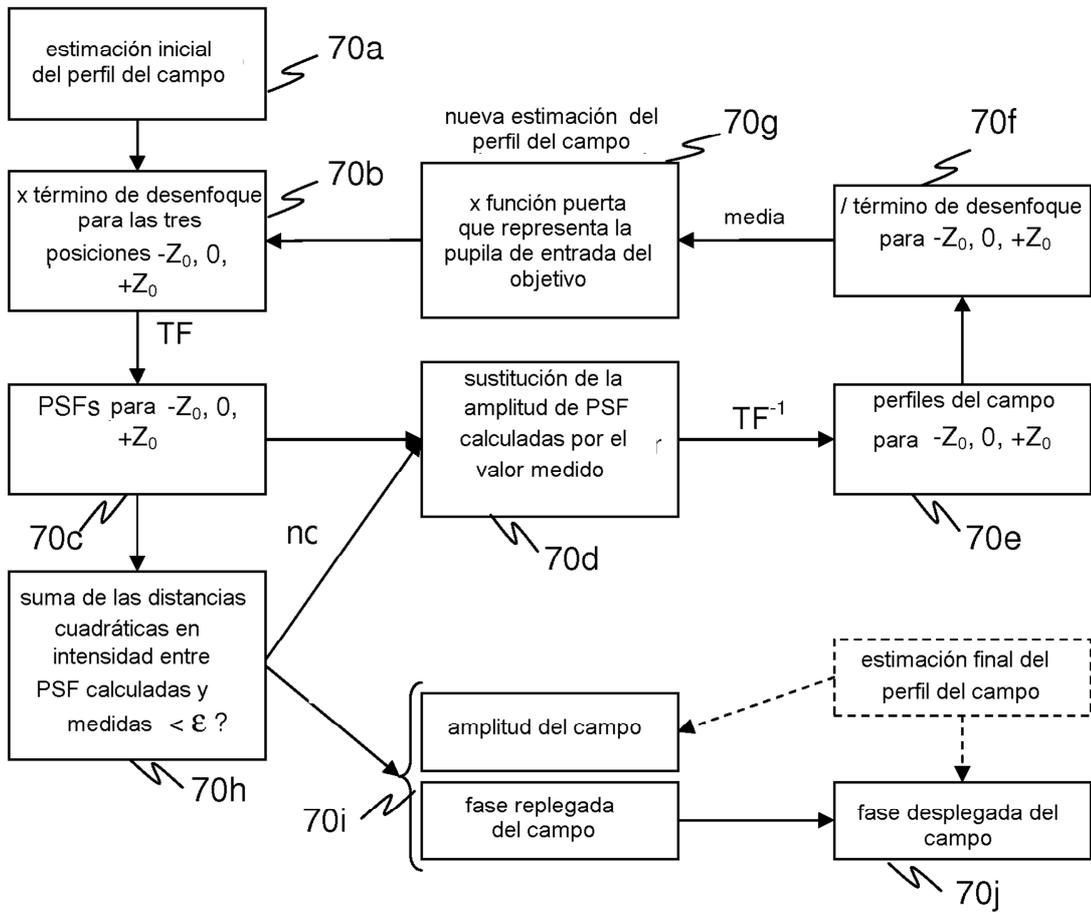


Figura 6

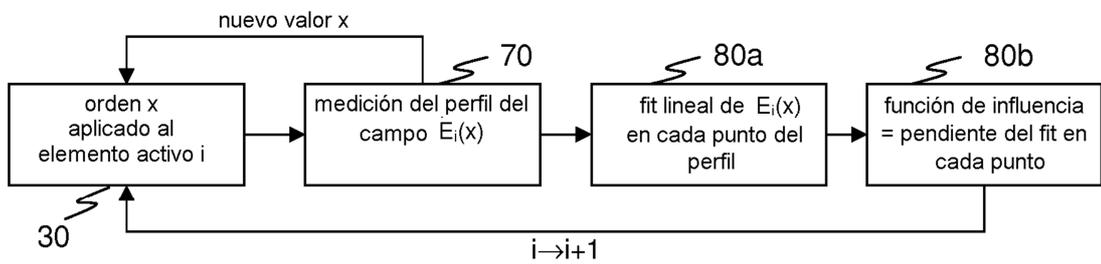


Figura 7