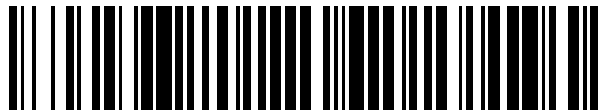


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 599**

51 Int. Cl.:

**G01B 9/02** (2006.01)

**G01B 21/00** (2006.01)

**G01N 21/45** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2011 E 11723374 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2572157**

54 Título: **Método y dispositivo para microscopía interferencial de campo completo de alta resolución**

30 Prioridad:

**18.05.2010 FR 1053833**

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

**10.12.2015**

73 Titular/es:

**LLTECH MANAGEMENT (100.0%)  
Pépière Paris Santé Cochin 2ème étage 29 rue  
du Faubourg Saint Jacques  
75014 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BOCCARA, ALBERT CLAUDE;  
HARMS, FABRICE y  
LE CONTE CHRESTIEN DE POLY, BERTRAND**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 553 599 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

Método y dispositivo para microscopía interferencial de campo completo de alta resolución

Técnica anterior

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método y a un dispositivo para microscopía interferencial de campo completo de alta resolución, en particular para la formación de imágenes de células.

Técnica anterior

10 La figura 1 es un diagrama esquemático de un microscopio interferencial de campo completo de luz incoherente, o de un microscopio de campo completo de coherencia óptica, basado en un método de formación de imágenes también conocido como OCT de campo completo (donde OCT es la abreviatura del término "Tomografía de Coherencia Óptica"). Este método de formación de imágenes se describe, por ejemplo, en el artículo "Full-field optical coherence tomography" de A. Dubois y C. Boccara, tomado del libro "Optical Coherence Tomography – Technology and Applications", editado por Wolfgang Drexler y James G. Fujimoto, Springer 2009. En la solicitud de patente francesa FR 2 817 030, también se describe la microscopía basada en OCT de campo completo en luz de  
15 baja coherencia.

El dispositivo 1, como se ilustra en la figura 1, se basa en un interferómetro de Michelson 100 iluminado por una fuente de longitud de coherencia corta 101, tal como una lámpara halógena. El interferómetro comprende un elemento divisor de haz 102, tal como un cubo divisor de haz no polarizador, formando dos brazos, y dos objetivos de microscopio idénticos 103 y 104 están dispuestos en estos dos brazos. Un dispositivo de este tipo se denomina  
20 interferómetro Linnik. En uno de los brazos, denominado a continuación brazo de referencia, hay una superficie plana 105 que tiene reflectividad uniforme, colocada en el plano focal objeto del objetivo de microscopio 104. En el otro brazo, denominado a continuación brazo objeto, hay una muestra de difusión tridimensional 106 para la que se va a reconstruir el mapa tridimensional de la amplitud de retrodispersión. En la salida de este interferómetro, una doble lente acromática con una longitud focal grande, típicamente 300 mm, se utiliza para conjugar los planos focales objeto de los dos objetivos en un sensor multicanal 108, tal como una cámara CCD. Con el fin de beneficiarse de una resolución transversal limitada por la difracción, se elige la distancia focal de esta lente para no submuestrear la función de dispersión de punto (PSF) de los objetivos. Las placas de vidrio 109, 110 están  
25 dispuestas en cada brazo para compensar la dispersión.

Ya que la fuente luminosa 101 tiene una longitud de coherencia corta, la interferencia entre la luz reflejada por la superficie de referencia 105 y aquella retrodispersada por la muestra 106 sólo se produce cuando los caminos ópticos en ambos brazos son iguales, dentro de la longitud de coherencia efectiva. Existe por tanto una sección virtual a través del objeto, denominada sección de coherencia, para la que la información de retrodispersión es relativa a la figura de interferencia vista por la cámara. Puesto que la luz retrodispersada a ambos lados de esta sección no es coherente con la luz reflejada por la referencia, contribuye a un fondo global en la señal. Cuando se modula la diferencia de marcha de los dos brazos del interferómetro mediante un desplazamiento axial de la superficie de referencia 105 por medio de una pletina piezoeléctrica 111, sólo la figura de interferencia que lleva la información de la sección de coherencia es modulada, mientras que el fondo permanece constante. Mediante la sincronización de esta modulación con la formación de imágenes de la cámara se pueden registrar diferentes figuras de interferencia. Una combinación no lineal de las imágenes permite entonces demodular la información relativa a la sección de coherencia y por tanto discriminar la información relativa a los fotones balísticos retrodispersados exclusivamente mediante esta sección a partir de la información relativa a las que han sido difundidas en otros lugares de la muestra. Dado que la intensidad registrada en cada píxel de la cámara contiene un término constante y un término modulado, que en sí está compuesto de una amplitud y de una fase, al menos tres figuras de interferencia deben teóricamente ser registradas con el fin de extraer la amplitud compleja del término modulado.  
40 Estas tres fases de la señal se eligen dentro de un período de modulación, y por lo tanto la amplitud del desplazamiento de la superficie de referencia no sobrepasa la media longitud de onda central del espectro efectivo del instrumento. Una imagen tomográfica de campo completo puede entonces ser adquirida en el volumen de la muestra, y la información tridimensional se puede registrar mediante el desplazamiento de la muestra con respecto al plano de coherencia. Las reconstrucciones en todas las direcciones, u otras representaciones tridimensionales,  
50 pueden ser producidas a continuación.

Así, el uso de microscopía interferencial de campo completo hace que sea posible usar una fuente luminosa que tenga una banda espectral de más de 300 nm, centrada, por ejemplo, en aproximadamente 750 nm, para obtener una resolución espacial anatomopatológica correspondiente a una resolución celular (aproximadamente 1 micra en las tres dimensiones), de hasta 1 milímetro de profundidad en tejidos vivos. Para ello, ambos objetivos 103 y 104 son generalmente objetivos de microscopio de inmersión, por ejemplo objetivos de inmersión en agua (agua que tiene un índice de refracción,  $n$ , de 1,33), con una corrección adecuada de aberraciones geométricas y cromáticas.  
55

A fin de mantener una precisión de 1 micra en X, Y y Z a la profundidad requerida, es necesario tener un medio homogéneo (agua pura) con un índice óptico fijo para mantener la igualdad de los caminos ópticos entre el brazo de referencia y el brazo de medición (objeto) del interferómetro, en ambas dimensiones (sobre toda la superficie de análisis).

5 Cuando se analiza un tejido biológico, se verá que, por una parte, el índice óptico macroscópico rara vez es igual al del agua (siendo generalmente mayor), mientras que, por otro lado, varía localmente tanto transversalmente como en profundidad, dependiendo de las estructuras biológicas a analizar. Para la exploración mecánica o de frecuencia convencional OCT, estos efectos son menos obvios porque la abertura numérica es pequeña, ya que estos sistemas funcionan con una gran profundidad de campo, del mismo orden que la profundidad explorada.

10 El solicitante ha demostrado que, en microscopía OCT de campo completo, cuando se trabaja a alta resolución (una resolución de 1 micra en las tres dimensiones), estos efectos de pérdida de resolución llegan a ser sustanciales a profundidades en el intervalo de 20 a 200 micras, dependiendo de los tejidos biológicos a observar.

15 Un objeto de la presente invención es mejorar la resolución de imagen, y por consiguiente la profundidad de análisis. Para este propósito, la invención propone la modificación controlada del plano de onda en dos dimensiones en el brazo objeto del interferómetro para corregir la deformación del frente de onda en el medio biológico debido a variaciones locales en el índice de las diferentes células a través de las cuales pasa el haz luminoso. Para lograr esto, la invención propone un nuevo enfoque de la óptica adaptativa (OA) controlada en base a las propiedades estadísticas de la señal OCT

#### Resumen de la invención

20 En un primer aspecto, la invención se refiere a un dispositivo de microscopía interferencial de campo completo de luz incoherente de una muestra de dispersión volumétrica, que comprende todas las características detalladas en la reivindicación 1.

En una realización preferida, el elemento óptico de modificación de fase está dispuesto en el brazo objeto, permitiendo el control de la fase de la onda incidente sobre la muestra.

25 En una variante, el dispositivo de interferencia comprende un objetivo de microscopio en cada uno de los brazos, y el elemento óptico de modificación de fase está dispuesto en un pupila o en una imagen de la pupila del objetivo de microscopio del brazo objeto.

En una variante, el elemento óptico de modificación de fase es un espejo deformable.

30 En una variante, el cálculo de la imagen de la sección de la muestra comprende la sustracción de al menos dos señales de interferencia que tienen un desfase de  $\pi$  y el elemento óptico de modificación de fase es controlado por la optimización de la desviación estándar medida en al menos algunos de los valores de los puntos de la imagen calculada.

35 En una variante, el cálculo de la imagen de la sección de la muestra comprende, además, el cálculo del valor absoluto de la sustracción antes mencionada, y el elemento óptico de modificación de fase se controla mediante la optimización del valor medio, de la desviación estándar o del contraste medido en al menos algunos de los valores de los puntos de la imagen calculada.

En una variante, la optimización del parámetro estadístico comprende la medición del parámetro para tres estados del elemento óptico de modificación de fase correspondientes a la introducción de tres valores dados respectivos de una aberración óptica.

40 En una variante, el dispositivo de interferencia es de tipo Linnik, que comprende un elemento divisor de haz para formar los brazos objeto y de referencia, y un objetivo de microscopio en cada uno de los brazos.

En una variante, el dispositivo de interferencia comprende un filtro óptico variable en uno de sus brazos y una placa en el otro brazo para compensar la diferencia de marcha introducida por el filtro óptico variable.

45 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método de microscopía interferencial de campo completo de luz incoherente de una muestra de dispersión volumétrica, que comprende todas las etapas del método que se detallan en la reivindicación 10.

50 En una variante, el cálculo de la imagen de la sección de la muestra comprende la sustracción de al menos dos señales de interferencia que tienen un desfase de  $\pi$ , y la fase de la onda incidente sobre la muestra es controlada mediante la optimización de la desviación estándar medida en al menos algunos de los valores de los puntos de la imagen.

En una variante, el cálculo de la imagen de la sección de la muestra comprende, además, el cálculo del valor absoluto de la sustracción antes mencionada, y la fase de la onda incidente sobre la muestra se controla mediante la optimización del valor medio, de la desviación estándar o del contraste medido en al menos algunos de los valores de los puntos de la imagen.

5 En una variante, el control de la fase de la onda incidente sobre la muestra comprende, para una aberración óptica dada, la medición de un número determinado de valores del parámetro estadístico después de la introducción del mismo número de valores de la aberración óptica en la fase de la onda incidente sobre la muestra, donde el cálculo del valor de la aberración maximiza el valor del parámetro, y la introducción del valor de la aberración en la fase de la onda incidente sobre la muestra.

10 En una variante, el número de valores introducidos de la aberración óptica es tres.

Breve descripción de los dibujos

Otras ventajas y características de la invención se pondrán de manifiesto a la luz de la descripción, ilustrada por las siguientes figuras:

15 - La figura 1 (descrita anteriormente) es un diagrama esquemático de un microscopio interferencial de campo completo de luz poco coherente de acuerdo con la técnica anterior;

La figura 2 es un diagrama que explica el origen de la naturaleza aleatoria de una señal OCT;

Las figuras 3A a 3C son tres imágenes que representan, respectivamente, un patrón moteado, la superposición de 16 patrones moteados no correlacionados y la superposición de 100 patrones moteados no correlacionados;

20 La figura 4 muestra una realización ejemplar de un microscopio interferencial de campo completo de acuerdo con la invención;

Las figuras 5A y 5B muestran otras dos realizaciones ejemplares de un microscopio interferencial de campo completo de acuerdo con la invención.

Descripción detallada

25 La presente invención propone un método original de microscopía interferencial con óptica adaptativa, que utiliza una propiedad estadística particular de las imágenes adquiridas por el método de formación de imágenes OCT de campo completo durante la exploración en profundidad de medios de difusión, relacionado con la naturaleza aleatoria de las señales.

30 El origen de la naturaleza aleatoria de una señal OCT de campo completo se explica esquemáticamente en la figura 2. La onda incidente 201 es enfocada en un volumen elemental, o vóxel, de la muestra 202. La sección transversal a través del vóxel en ausencia de aberraciones es dada por el punto de difracción del objetivo de microscopio 103. La sección desde la cual es devuelta la onda retrodispersada, correspondiente a la longitud del vóxel, tiene un espesor  $L$  igual a la longitud de coherencia temporal de la fuente dividida por dos veces el índice de refracción del medio. La onda retrodispersada 203 resulta de la suma de ondículas retrodispersadas por las estructuras 204 que tienen posiciones aleatorias en el vóxel en cuestión. La onda retrodispersada es detectada mediante interferencia con la onda de referencia, no mostrada aquí. La naturaleza aleatoria de las estructuras que forman la muestra proporciona a las imágenes OCT un aspecto moteado. El término "moteado" se utiliza comúnmente para indicar la granularidad láser observada cuando un objeto difusor es iluminado por un láser altamente coherente. En este caso, el fenómeno descrito es de un tipo diferente, aunque se puede representar matemáticamente en ambos casos mediante una marcha aleatoria en el plano complejo (véase, por ejemplo Goodman, "Speckle phenomena in optics", de Roberts and Company Publishers, 30 de Octubre 2006). Una imagen afectada por moteado se muestra en la figura 3a. El moteado generalmente tiene una propiedad especial en la distribución de intensidades. El contraste, que es igual a la relación entre la desviación estándar y el valor medio de la distribución de intensidades, es igual a la unidad.

40 Como regla general, los usuarios de microscopía OCT tratan de eliminar en la medida de lo posible el moteado de las imágenes suavizando la distribución de intensidades, a menudo en detrimento de la resolución. A pesar de esto, el solicitante ha demostrado que es posible hacer uso de la naturaleza aleatoria de la imagen OCT y del moteado para poner en práctica un método de óptica adaptativa.

50 Por un lado, debido a las propiedades de reflexión local aleatoria de las muestras estudiadas, el solicitante ha demostrado que una imagen de intensidad de la muestra se puede obtener con sólo dos figuras de interferencia con un desfase de  $\pi$ , producido por ejemplo mediante dos posiciones de espejo de referencia. La imagen se calcula entonces mediante la búsqueda de la diferencia (o el módulo de la diferencia) entre las dos señales de interferencia, suprimiendo así el fondo mientras que conservan las propiedades estadísticas esenciales de la imagen.

Además, las aberraciones geométricas introducidas por las heterogeneidades macroscópicas de las estructuras penetradas que son mucho más grandes en tamaño que las estructuras microscópicas de los difusores causan una expansión del punto focal de la onda incidente en la muestra. La imagen es entonces el producto de la convolución de la imagen ideal, libre de aberraciones, por el punto de difusión resultante de la presencia de aberraciones. Si el punto ocupa una superficie correspondiente a la ocupada por N granos de moteado, la convolución de la imagen ideal por el punto de difusión equivale a superponer un número N de motas no correlacionadas, lo que da como resultado una división del contraste por la raíz cuadrada de N.

A modo de ejemplo, las figuras 3b y 3c muestran la superposición de entre 16 y 100 motas no correlacionadas. Es fácil verificar mediante cálculo basado en estas imágenes que el contraste, definido como la relación entre la desviación estándar y el valor medio calculados sobre la distribución de intensidades, es de hecho 0,25 y 0,1 respectivamente.

La señal OCT resultante está así directamente relacionada con la presencia de aberraciones. Los parámetros estadísticos de la imagen se ven afectados por la presencia de las aberraciones. Esto es porque la convolución de la imagen "ideal" por el punto de enfoque disminuye el valor de los parámetros estadísticos de la imagen, tales como la desviación estándar o la intensidad media.

La invención comprende la introducción de una corrección variable del frente de onda incidente sobre la muestra, con el fin de corregir algunas o todas las aberraciones introducidas por las heterogeneidades macroscópicas de las estructuras en la muestra. Esta corrección variable se controla mediante la optimización de uno de los parámetros estadísticos de la imagen de la sección de la muestra obtenida.

La figura 4 muestra una realización ejemplar de un microscopio interferencial de acuerdo con la invención.

El dispositivo 4 del ejemplo mostrado en la figura 4 se basa en el uso de un interferómetro de tipo Linnik 100 como se describe en la figura 1. Los elementos idénticos se indican con las mismas referencias. El dispositivo comprende, en particular, una fuente 101 para la emisión de una onda incidente con baja coherencia espacial y temporal. Esta es, por ejemplo, una lámpara halógena con una banda espectral por encima de 300 nm, que se utiliza convencionalmente como una fuente de iluminación de luz fría en microscopía (véase, por ejemplo la Fuente Luminosa Fría KL1500 LCD –de Olympus). El interferómetro 100 comprende un brazo de referencia con un objetivo de microscopio 104 y un espejo de referencia 106 montado en una pletina piezoeléctrica 111 y un brazo objeto con un objetivo de microscopio 103 idéntico al objetivo 104. Los objetivos pueden ser, por ejemplo, objetivos con una abertura numérica media (de aproximadamente 0,4), diseñados para funcionar en una combinación de punto infinito / focal, con una corrección de cromatismo en un amplio espectro (tal como la serie de inmersión UMPLFLN-W de Olympus). La onda incidente emitida por la fuente 101 es separada por un cubo divisor de haz 102, por ejemplo, para formar una onda de referencia 401 reflejada por el espejo de referencia en el brazo de referencia y una onda objeto 402 retrodispersada por una sección de una muestra 106 montada, por ejemplo, en una pletina del brazo de referencia. A la salida del interferómetro, una doble lente acromática se utiliza para conjugar los planos focales objeto de los dos objetivos en un dispositivo de adquisición multicanal bidimensional 108, tal como una cámara CCD. Este sistema óptico se elige de manera que el aumento obtenido por la combinación del objetivo y esta doble lente proporcione un muestreo correcto mediante los píxeles de detector del punto de difracción del objetivo, a una tasa de al menos dos píxeles por punto de difracción de acuerdo con el teorema de Shannon. Las longitudes focales típicas varían de 300 a 500 mm en función de la abertura de los objetivos y del tamaño de los píxeles de la cámara. Como se ha descrito anteriormente, ya que la fuente luminosa 101 tiene una longitud de coherencia corta, la interferencia entre la luz reflejada por la superficie de referencia 105 y la retrodispersada por la muestra 106 sólo se produce cuando los caminos ópticos en ambos brazos son iguales que los que están dentro de la longitud de coherencia efectiva. Al variar la diferencia de marcha relativa entre los dos brazos del interferómetro mediante la pletina 111, se introduce un desfase entre las señales de interferencia resultantes de la interferencia entre la onda de referencia y la onda objeto. Por tanto, típicamente, con el fin de aplicar un desfase de  $\pi$  en la configuración de tipo Linnik, un movimiento de  $\lambda_0 / 4n$  debe aplicarse al espejo de referencia (donde n es el índice del medio de propagación orientado hacia el espejo de referencia y  $\lambda_0$  es la longitud de onda media de la fuente de emisión, típicamente alrededor de 750 nm).

El dispositivo 4 también comprende una unidad de procesamiento 403 de señales de interferencia para calcular una imagen de la sección de la muestra.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el dispositivo de interferencia 100 comprende un elemento óptico para modificar la fase del frente de onda, y el dispositivo 4 comprende una unidad 405 para controlar el elemento óptico, vinculada a la unidad de procesamiento 403.

El elemento óptico de modificación de fase es, por ejemplo, un espejo deformable de tipo membrana continua o segmentada o una matriz de cristales líquidos. Un espejo deformable tal como el modelo Mirao52e (de Imagine Eyes, París, Francia) con 52 actuadores colocados bajo una membrana deformable reflectante puede ser adecuado.

De manera ventajosa, el elemento óptico de modificación de fase está dispuesto en el brazo objeto del interferómetro. Esto hace que sea posible corregir las aberraciones de la onda objeto relacionadas con las heterogeneidades de la estructura en la muestra con el fin de obtener una onda objeto que tenga una calidad óptica comparable con la onda de referencia, proporcionando así un aumento de resolución.

- 5 De manera ventajosa, el elemento óptico de modificación de fase está dispuesto en una pupila de entrada del objetivo de microscopio 103 del brazo objeto o en una imagen de la pupila, a fin de mantener el haz centrado en este elemento para todos los puntos de campo.

Las diversas aberraciones que contribuyen a ampliar el punto de difusión pueden estar asociadas a deformaciones del frente de onda que pueden ser expresadas en una base de polinomios ortogonales, lo que permite modificar el nivel de una aberración presente sin afectar al nivel de las otras aberraciones. Estos polinomios se conocen como polinomios de Lukosz, y se describen, por ejemplo, en el artículo de D. Debarre y otros, "Image Based Adaptive Optics Through Optimisation of Low Spatial Frequencies", Optics Express (2007), vol. 15 (13), págs 8176 - 8190. Pueden utilizarse otras descomposiciones del frente de onda, tales como las descritas en el artículo de B. Wang y otros, "Optimum deformable mirror modes for sensorless adaptive optics", Optics Communications 282 (2009), 4467 - 4474. La base ortogonal descrita utiliza los modos de deformación intrínsecos del espejo deformable en cuestión para construir una base de representación para las aberraciones que tienen las mismas propiedades que los polinomios de Lukosz, aunque haciendo una mejor estimación de las deformaciones reales del espejo deformable. Las aberraciones más comúnmente encontradas son la aberración de desenfoque, la aberración esférica, introducida por ejemplo por una placa con una cara plana y paralela dispuesta en el camino de enfoque de un objetivo de microscopio, tal como una placa de microscopio, y la coma.

Por tanto, un objeto de la presente invención es anular el efecto de cada una de las aberraciones que contribuye a la degradación de un parámetro estadístico de la señal OCT resultante de la adquisición de una imagen de la sección de la muestra.

En un ejemplo, la imagen se calcula hallando la diferencia entre dos señales de interferencia que tienen un desfase de  $\pi$  (obteniéndose estas dos señales mediante la variación de la diferencia de marcha relativa entre los dos brazos del interferómetro, por ejemplo moviendo la pletina piezoeléctrica), o mediante la búsqueda del valor medio de un número dado de imágenes calculadas de esta manera. El valor medio de los puntos de la imagen calculada de esta manera es cero en este caso. Por el contrario, la desviación estándar ( $\sigma$ ), dada por:

$$\sigma^2 = \frac{1}{M \times N} \sum_{x=1}^M \sum_{y=1}^N (I(x, y) - m_1)^2$$

30 donde  $I(x, y)$  es el valor de un punto de la imagen con las coordenadas  $(x, y)$ ,  $M$  y  $N$  son los números correspondientes de los puntos de la imagen en las dos dimensiones y  $m_1$  es la media, no es cero, y disminuye en presencia de aberraciones a causa de la suma de motas no correlacionadas, tal como se describe anteriormente.

En un ejemplo, el nivel de cada una de las aberraciones a cancelar se varía mediante la unidad de control 405 y la operación específica del elemento de modificación de frente de onda 404, optimizando el valor calculado de la desviación estándar. El solicitante ha demostrado que, en general, tres mediciones para cada aberración a corregir son suficientes para lograr el objetivo, debido a las propiedades de los polinomios ortogonales elegidos. Esto se debe a que la variación de la calidad de imagen de acuerdo con los parámetros estadísticos intrínsecos de la señal OCT, como se ha descrito anteriormente, se puede representar de forma cuadrática, y en particular el máximo de esta curva de variación se puede aproximar mediante una parábola. Para cada aberración es por tanto posible, a partir de tres valores del parámetro en cuestión obtenidos mediante la unidad de control 405 mediante una operación específica del elemento de modificación de frente de onda 404 que corresponde a cada aberración considerada, reconstruir la parábola que mejor representa esta variación y deducir el valor óptimo de la aberración. Al repetir este proceso de optimización para cada aberración, es posible deducir los parámetros de control óptimos para el elemento de modificación de fase 404, es decir, la forma del frente de onda que permite optimizar la imagen obtenida mediante la compensación de los defectos introducidos a lo largo del camino óptico.

En otro ejemplo, la imagen se calcula tomando el valor absoluto de la diferencia de dos señales de interferencia que tienen un desfase de  $\pi$ , o mediante la búsqueda de la media de un número determinado de imágenes calculado de esta manera. En este caso, un parámetro estadístico característico de la imagen puede ser, por ejemplo, el valor medio de los puntos de la imagen, la desviación estándar o el contraste, que es igual a la relación entre la desviación estándar y la media.

En una variante, y, en particular si el campo es amplio, es posible trabajar únicamente en una parte de la imagen. Esto se debe a que es posible que una corrección "media" hecha en la imagen entera puede no ser óptima para todo

el campo. En este caso, es preferible trabajar únicamente sobre una parte de la imagen, o incluso hacer una serie de correcciones sucesivas en varias partes de la imagen y luego recombinar estas imágenes diferentes.

5 En una variante, un filtro óptico variable 406 puede estar previsto en uno de los brazos del interferómetro, por ejemplo, el brazo de referencia. El propósito del filtro óptico es el de ajustar la intensidad luminosa relativa de las ondas de referencia y objeto. Esto es debido a que el solicitante ha demostrado que la señal de interferencia óptica, y por consiguiente el contraste de imagen óptimo, se obtiene cuando la intensidad luminosa relativa de los dos brazos es sustancialmente equivalente. Usando este sistema, la señal OCT que se obtiene puede ser optimizada mediante un dispositivo adaptativo que permite las variaciones de reflectividad de diferentes muestras biológicas. La intensidad luminosa del brazo del interferómetro en cuestión se puede optimizar, por ejemplo, mediante el uso de un conjunto de filtros ópticos diferentes e intercambiables, teniendo cuidado de incluir un medio en el otro brazo del interferómetro para compensar la diferencia de marcha y la dispersión introducidas por el filtro en cuestión, tal como una placa transparente con una cara plana y paralela 407, hecha del mismo material y con el mismo espesor que el filtro en cuestión.

15 Las figuras 5A y 5B muestran dos variantes de realización de un microscopio interferencial de campo completo de acuerdo con la invención. La figura 5A muestra un microscopio interferencial 5 basado en un interferómetro de tipo Michelson 100, y la figura 5B muestra un microscopio interferencial 6 basado en un interferómetro de tipo Mirau 100. En estos dos dibujos, los elementos idénticos a los del conjunto mostrado en la figura 4 se indican con las mismas referencias.

20 En el ejemplo de la figura 5A, el interferómetro 100 comprende un único objetivo de microscopio 501 y una placa divisora de haz para formar el brazo de referencia que contiene el espejo de referencia 105 y el elemento de modulación 111 del espejo, y el brazo objeto que contiene la muestra 506 y el elemento óptico de modificación de fase 404. Una ventaja de este dispositivo es que permite usar un único objetivo, reduciendo así al mínimo las aberraciones diferenciales entre los dos brazos del interferómetro de tipo Linnik descrito anteriormente.

25 En el ejemplo de la figura 5B, el interferómetro 100 comprende un único objetivo de microscopio 503 en cuya salida está dispuesto el espejo de referencia 105 montado en la pletina de traslación 111, y una placa semireflectante 504 para formar el brazo de referencia y el brazo objeto en el que se encuentran la muestra 506 y el elemento óptico de modificación de fase 404. Como en el caso anterior, este dispositivo utiliza un solo objetivo.

30 Aunque se ha descrito a través de un determinado número de ejemplos de realización detallados, el dispositivo de microscopía interferencial y el método de acuerdo con la invención incorporan otras variantes, modificaciones y mejoras que serán evidentes para una persona experta en la técnica, entendiéndose que tales otras variantes, modificaciones y mejoras están dentro del campo de aplicación de la invención como se define en las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Dispositivo de microscopía interferencial (4) de campo completo de luz incoherente para la formación de imágenes de una muestra de dispersión volumétrica (106), que comprende:

- una fuente (101) para emitir una onda incidente que tiene una banda espectral dada,

5 - un dispositivo de interferencia (100) que comprende un brazo de referencia y un brazo objeto, para proporcionar interferencia óptica entre una onda de referencia (401) obtenida por reflexión de la onda incidente sobre una superficie reflectante (105) del brazo de referencia y una onda objeto (402) obtenida por la retrodispersión de la onda incidente mediante una sección de la muestra a una profundidad dada de dicha muestra, cuando dicha muestra se coloca en un plano focal objeto de un objetivo de microscopio (103) colocado en el brazo objeto,

10 - un dispositivo de adquisición bidimensional (108) para la adquisición multicanal de al menos una primera señal de interferencia y de al menos una segunda señal de interferencia resultante de la interferencia óptica de dichas ondas de referencia y objeto, teniendo las al menos dos señales de interferencia un desfase producido al hacer variar la diferencia de marcha relativa entre los dos brazos del dispositivo de interferencia, estando dispuesto dicho dispositivo de adquisición bidimensional en un plano ópticamente conjugado con dicho plano focal objeto de dicho objetivo de microscopio del brazo objeto,

15 - una unidad de procesamiento (403) para calcular una imagen de la sección de la muestra en base a dichas señales de interferencia primera y segunda,

en el que

20 - el dispositivo de interferencia comprende además un elemento óptico de modificación de fase (404) para modificar la fase del frente de onda de una de dichas ondas de referencia u objeto, y

25 - el dispositivo de microscopía comprende una unidad de control (405) para el elemento óptico de modificación de fase, vinculada a la unidad de procesamiento (403), siendo controlado el elemento óptico de modificación de fase (404) mediante la optimización de un parámetro estadístico de al menos una parte de la imagen calculada por la unidad de procesamiento, comprendiendo dicho parámetro estadístico al menos uno del valor medio, de la desviación estándar y del contraste.

2. Dispositivo de microscopía de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el elemento óptico de modificación de fase (404) está situado en el brazo objeto para controlar la fase de la onda incidente sobre la muestra.

3. Dispositivo de microscopía de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el dispositivo de interferencia comprende un objetivo de microscopio (103, 104) en cada uno de los brazos, y el elemento óptico de modificación de fase está situado en una pupila o en una imagen de la pupila del objetivo de microscopio (103) del brazo objeto.

4. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el elemento óptico de modificación de fase (404) es un espejo deformable.

5. Dispositivo de microscopía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cálculo de la imagen de la sección de la muestra comprende la sustracción de al menos dos señales de interferencia que tienen un desfase de  $\pi$  y el elemento óptico de modificación de fase es controlado por la optimización de la desviación estándar medida en al menos algunos de los valores de los puntos de la imagen calculados de esta manera.

6. Dispositivo de microscopía de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cálculo de la imagen de la sección de la muestra comprende, además, el cálculo del valor absoluto de la sustracción antes mencionada, y el elemento óptico de modificación de fase se controla mediante la optimización del valor medio, de la desviación estándar o del contraste medido en al menos algunos de los valores de los puntos de la imagen calculada de esta manera.

7. Dispositivo de microscopía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la optimización del parámetro estadístico comprende la medición del parámetro para tres estados del elemento óptico de modificación de fase correspondientes a la introducción de tres valores dados respectivos de una aberración óptica.

8. Dispositivo de microscopía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo de interferencia es del tipo Linnik, que comprende un elemento divisor de haz (102) para formar los brazos objeto y de referencia, y un objetivo de microscopio (103, 104) en cada uno de los brazos.

9. Dispositivo de microscopía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo de interferencia comprende un filtro óptico variable (406) en uno de sus brazos y una placa (407) en el otro brazo para compensar la diferencia de marcha introducida por el filtro óptico variable.



10. Método de microscopía interferencial de campo completo de luz incoherente para la formación de imágenes de una muestra de dispersión volumétrica (106), que comprende:

- la emisión de una onda incidente que tiene una banda espectral dada,

5 - la interferencia óptica entre una onda de referencia (401) obtenida por reflexión de la onda incidente en un espejo (105) de un brazo de referencia del dispositivo de interferencia y una onda objeto (402) obtenida por retrodispersión de la onda incidente mediante una sección de la muestra a una profundidad dada de dicha muestra, estando la muestra colocada en un plano focal objeto de un objetivo de microscopio (103) colocado en un brazo objeto del dispositivo de interferencia,

10 - la adquisición, usando un dispositivo de adquisición multicanal bidimensional dispuesto en un plano ópticamente conjugado con dicho plano focal objeto de dicho objetivo de microscopio del brazo objeto, de al menos una primera señal de interferencia y de al menos una segunda señal de interferencia resultante de la interferencia de las ondas de referencia y objeto, teniendo las al menos dos señales de interferencia un desfase producido por la variación de la diferencia de marcha relativa entre los dos brazos del dispositivo de interferencia,

15 - el procesamiento de las señales de interferencia primera y segunda para calcular una imagen de la sección de la muestra,

- el control de la fase de la onda incidente sobre la muestra mediante la optimización de un parámetro estadístico de al menos una parte de la imagen calculada en base al procesamiento de las señales de interferencia, comprendiendo dicho parámetro estadístico al menos uno del valor medio, de la desviación estándar y del contraste.

20 11. Método de microscopía de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el cálculo de la imagen de la sección de la muestra comprende la sustracción de al menos dos señales de interferencia que tienen un desfase de  $\pi$ , y la fase de la onda incidente sobre la muestra es controlada mediante la optimización de la desviación estándar medida en al menos algunos de los valores de los puntos de la imagen.

25 12. Método de microscopía de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el cálculo de la imagen de la sección de la muestra comprende, además, el cálculo del valor absoluto de la sustracción antes mencionada, y la fase de la onda incidente sobre la muestra se controla mediante la optimización del valor medio, de la desviación estándar o del contraste medido en al menos algunos de los valores de los puntos de la imagen.

30 13. Método de microscopía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el control de la fase de la onda incidente sobre la muestra comprende, para una aberración óptica dada, la medición de un número determinado de valores del parámetro estadístico después de la introducción del mismo número de valores de la aberración óptica en la fase de la onda incidente sobre la muestra, donde el cálculo del valor de la aberración maximiza el valor del parámetro, y la introducción del valor de la aberración en la fase de la onda incidente sobre la muestra.

35 14. Método de microscopía de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el número de valores de la aberración óptica introducida es tres.

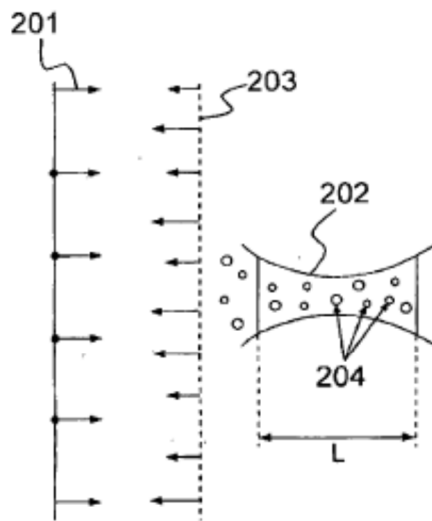
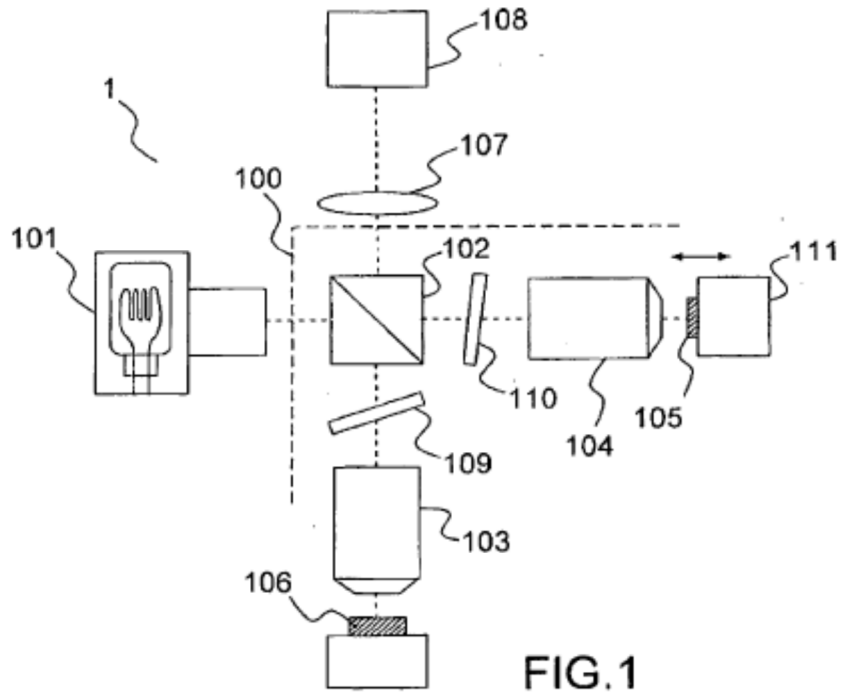
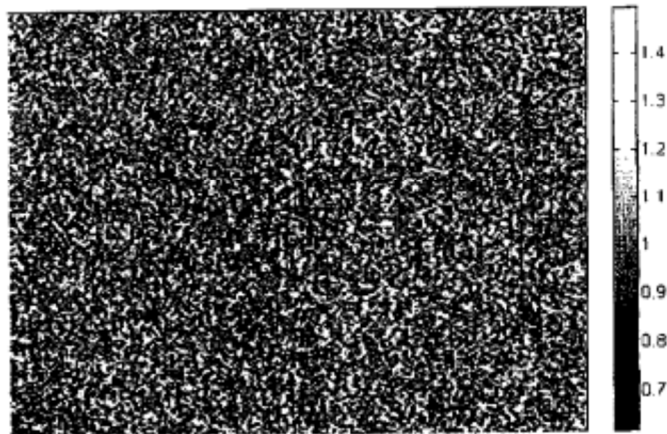
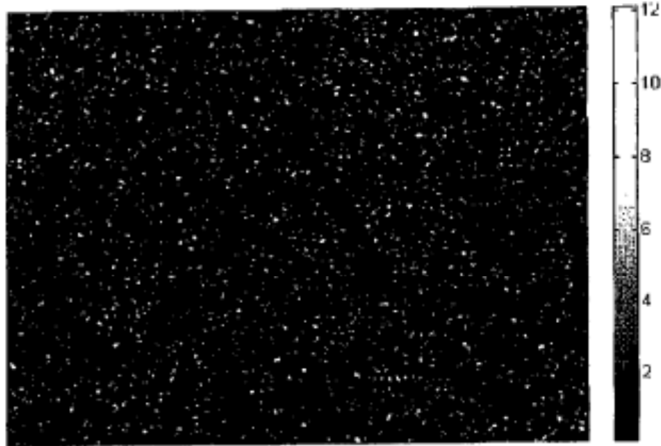


FIG. 2



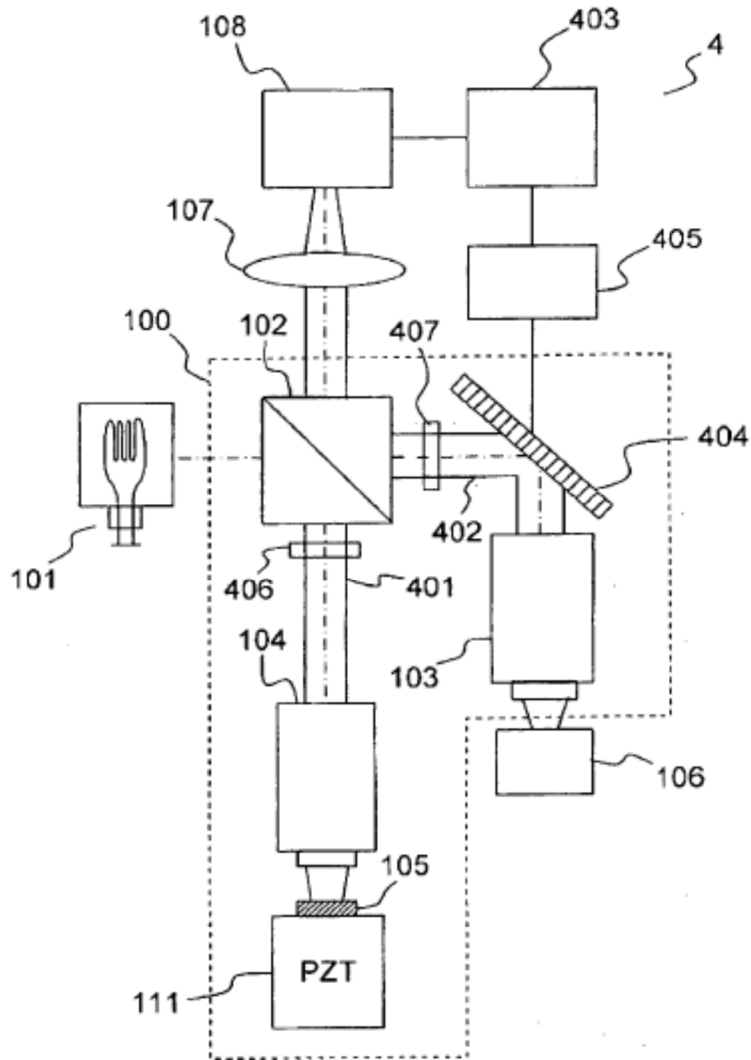


FIG.4

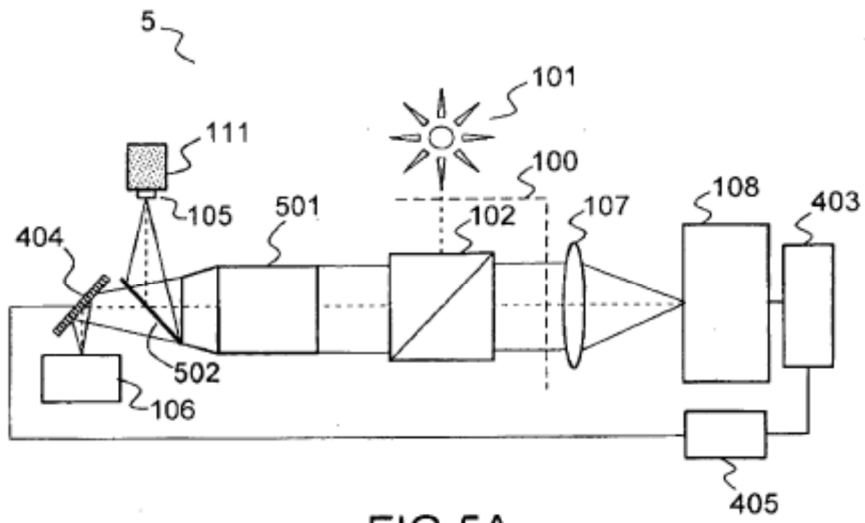


FIG.5A

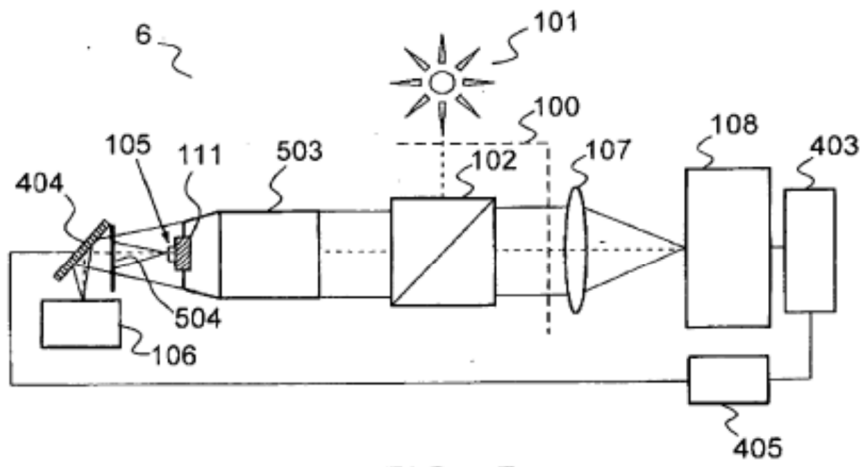


FIG.5B