

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 449**

51 Int. Cl.:

**G02B 21/33** (2006.01)

**G02B 21/00** (2006.01)

**G02B 21/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2011 PCT/FR2011/052482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO2012056160**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2011 E 11785747 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2633357**

54 Título: **Método de observación de la emisión de luz desde una muestra por microscopía óptica dinámica**

30 Prioridad:

**28.10.2010 FR 1058913**

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

**19.06.2017**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (100.0%)  
3, rue Michel Ange  
75794 Paris Cedex 16 , FR**

72 Inventor/es:

**FORT, EMMANUEL;  
LEVEQUE FORT, SANDRINE;  
BALAA, KARLA y  
BARROCA, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 617 449 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 de observación de la emisión de luz desde una muestra por microscopía óptica dinámica

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método de observación de la emisión de luz de una muestra por microscopía óptica dinámica.

10 **Estado de la técnica**

La luz procedente de la muestra puede ser el resultado de una difusión o de una fluorescencia. La microscopía de fluorescencia es una técnica que se aprovecha del fenómeno de fluorescencia para observar diversos compuestos. La fluorescencia es la propiedad que poseen ciertos cuerpos para emitir luz fluorescente por sí mismos.

15 La fluorescencia de un compuesto a observar puede ser primaria si este compuesto es fluorescente por sí mismo (por ejemplo: clorofila, aceite) o secundaria cuando se marca el compuesto a observar con una sustancia fluorescente, denominada fluorocromo o marcador fluorescente.

20 Particularmente en biología celular, se estudian en microscopía de fluorescencia un gran número de eventos moleculares que intervienen en la superficie de las células como por ejemplo la adherencia celular, la fijación de hormonas sobre los receptores de la membrana plasmática, la secreción de neurotransmisores así como la dinámica membranosa (endocitosis, exocitosis).

25 Un dispositivo de microscopía de fluorescencia comprende normalmente una fuente de luz para la excitación, unos medios para separar los fotones de excitación de los fotones de emisión, un sistema de lentes para recoger los fotones y en general unos medios de captura de imágenes.

Las técnicas de fluorescencia pueden utilizarse con diferentes tipos de microscopio, particularmente:

- 30
- un microscopio óptico clásico en el que la luz de excitación puede pasar por la muestra o por el objetivo. En este último caso, se habla entonces de microscopía de epifluorescencia;
  - un microscopio confocal, por ejemplo de barrido láser que permite particularmente realizar unas imágenes en
- 35 tres dimensiones de la muestra;
- un microscopio de fluorescencia por reflexión total interna (en inglés:

40 "total internal refection fluorescence" normalmente denominado TIRF) que utiliza una onda evanescente para no excitar la fluorescencia más que sobre una profundidad muy reducida, inmediatamente adyacente a la interfaz del soporte de la muestra (en general de vidrio) y el medio líquido (en general agua) en el que se dispone la muestra. La iluminación se realiza mediante un haz incidente de un láser que sigue un ángulo sobrecrítico para crear una onda evanescente (exponencialmente decreciente ortogonalmente a la interfaz). En la presente solicitud los términos "sobrecrítico" y "supercrítico" tienen el mismo sentido.

45 La microscopía TIRF, aunque actualmente está en pleno auge y permite unas observaciones precisas, presenta sin embargo ciertos inconvenientes. En efecto la utilización de la fuente láser adaptada se revela onerosa y el campo de excitación así generado puede no ser homogéneo (como consecuencia de las interferencias procedentes de la coherencia del haz). Además se constata que una iluminación por el objetivo no permite una excitación homogénea y que la profundidad de penetración resultante no es constante sobre el conjunto del campo a observar. Además, existen unas pérdidas de confinamiento del campo excitador vinculadas a la difusión intrínseca de la luz por las células.

50 El documento FR-A-2943428 divulga un método de observación por microscopía de fluorescencia de una muestra que comprende unos componentes presentes en un medio líquido de índice de refracción  $n_L$  dispuesto sobre un soporte transparente de índice de refracción  $n_s$ , superior a  $n_L$  e inferior o igual a 1,55 y un dispositivo de observación que comprende un objetivo de campo pleno de inmersión cuya apertura angular numérica, AN, es superior o igual a 1,33 e inferior o igual a  $n_s$  y un conjunto de lentes para formar una imagen en al menos un plano de imagen y que comprende además una máscara dispuesta en el plano focal posterior del objetivo de inmersión o en un plano conjugado de dicho plano focal posterior de manera que oculte los componentes de emisión de fluorescencia de la muestra en las direcciones angulares en las que el ángulo  $\theta$  es inferior o igual a un ángulo crítico  $\theta_c$ , siendo  $\theta_c = \arcsen(n_L/n_s)$  y definido el ángulo  $\theta$  como el ángulo de una dirección angular de emisión de fluorescencia con relación a la dirección perpendicular de la superficie del soporte sobre el que se dispone la muestra a observar.

65 Este método de observación permite obtener unas imágenes de fluorescencia de gran calidad con un dispositivo poco oneroso o mejorar la calidad de las imágenes obtenidas en microscopía TIRF.

El dispositivo y el método anteriores conducen a unas imágenes muy satisfactorias que poseen una buena resolución. Sin embargo se puede, en ciertas circunstancias, desear mejorar su resolución.

## 5 Objeto de la invención

La presente invención tiene como objeto proporcionar un método alternativo que permita principalmente mejorar sustancialmente la resolución de las imágenes a costa de ciertas modificaciones.

10 La solución de la invención trata de un método para observar una emisión de luz de una muestra en un medio de índice de refracción  $n_L$ , estando dispuesta la muestra contra una superficie de un soporte transparente de índice de refracción  $n_s$  superior a  $n_L$ , comprendiendo la emisión de luz unos componentes luminosos de amplitud y de fase dadas, orientadas hacia el soporte y que forman un ángulo  $\theta$  con una dirección perpendicular a la superficie, entre las que están, por un lado, unos componentes luminosos supercríticos para los que el ángulo  $\theta$  es estrictamente superior a un ángulo crítico  $\theta_c = \arcsen(n_L/n_s)$  y, por otro lado, unos componentes luminosos críticos o subcríticos, para los que el ángulo  $\theta$  es inferior o igual al ángulo crítico  $\theta_c$ , implementando el método un dispositivo de observación capaz de:

- 20 - recoger al menos una parte de la emisión de luz de una región de interés de la muestra y obtener una señal luminosa recogida que incluye unos componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz;
- aplicar unos filtros a la señal luminosa recogida para disminuir selectivamente la amplitud y/o modificar la fase de ciertos componentes luminosos de la señal luminosa recogida para obtener una señal luminosa filtrada; y
- 25 - transformar la señal luminosa filtrada en una zona de imagen de la región de interés de la muestra;

estando el método caracterizado por que:

- 30 - se realiza una modulación de la señal luminosa filtrada, en la que se dejan pasar unos componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz, para obtener unas zonas de imagen de una misma región de interés de la muestra, tratando la modulación sobre todos o parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedente de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz; y
- 35 - se produce al menos una zona de imagen útil de la muestra por combinación de las zonas de imagen, poniendo en evidencia la combinación unas diferencias entre las zonas de imagen vinculadas a la modulación.

40 La luz emitida por la muestra puede ser resultado de una fluorescencia (después de la excitación apropiada) o bien de una difusión. Una parte de esta luz se recoge mediante un dispositivo de observación, posteriormente se filtra y transforma en zona de imagen.

45 La región de interés de la muestra es la parte de la muestra que se desea observar. Puede ser extendida o puntual. En este último caso, es posible reconstruir una imagen mayor por barrido de la muestra. Una zona de imagen es una imagen de una región de interés de la muestra. Puede ser por tanto una imagen completa de la muestra, o bien una imagen de una parte de la muestra, o bien incluso una imagen de un punto de la muestra. La modulación trata sobre unas zonas de imagen procedentes de la misma región de interés de la muestra.

50 Gracias al dispositivo según la invención, es posible obtener unas imágenes de microscopía con una resolución mejorada, permitiendo por ejemplo obtener unas informaciones precisas para el estudio de materiales biológicos.

55 La mejora de la resolución se obtiene, no trabajando directamente sobre una señal luminosa expurgada de todos o parte de los componentes procedentes de la luz emitida por la muestra en unos ángulos críticos o subcríticos, es decir una señal rica en componentes procedentes de la luz emitida por la muestra con unos ángulos supercríticos (método descrito por el documento FR-A-2943428), sino trabajando directamente, mediante una modulación de la señal que trata sobre los componentes procedentes de la luz emitida por la muestra en unos ángulos supercríticos. El método es indirecto porque exige tomar varias zonas de imagen de la muestra y combinarlas para tener una zona de imagen útil que ponga en evidencia las diferencias entre las zonas de imagen creadas por la modulación de la señal luminosa en el origen de las zonas de imagen.

60 Al tratar la modulación sobre todos o parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz, la combinación refuerza estos componentes luminosos supercríticos en la zona de imagen útil. Por el contrario, los componentes de la señal luminosa recogidas procedentes de la luz emitida por la muestra en unos ángulos críticos o subcríticos no son modificadas por la modulación, la combinación atenúa estos componentes críticos o subcríticos en la zona de imagen útil. La combinación puede ser vista como una demodulación. Hace aparecer en la zona de imagen útil la

contribución de los componentes supercríticos modulados.

La modulación puede referirse a la amplitud de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida y/o a su fase. Dicho de otra manera, los filtros utilizados modifican la amplitud de las ondas luminosas y/o su fase. Este también es el sentido a dar al verbo "actuar" cuando se emplea con respecto a los filtros en la presente solicitud. Actuar de modo diferente, para dos filtros, quiere decir "realizar una modulación". La modificación de la amplitud puede ser una atenuación más o menos fuerte, yendo hasta la ocultación. Ciertos de los filtros utilizados (pero no todos) pueden ser neutros y no actuar; en este caso, la señal luminosa resultante se denomina por su parte "señal filtrada", incluso si es idéntica a la señal luminosa recogida. Por "dejar pasar" unos componentes luminosos, se entiende que después del filtrado, los componentes subsisten, incluso bajo una forma atenuada (amplitud reducida) o con una fase modificada.

Las zonas de imagen, como toda imagen formada con la ayuda de un captador tal como una cámara contienen una información de intensidad luminosa vinculada al cuadrado del módulo de la señal luminosa filtrada.

De manera inesperada, la resolución de la zona de imagen útil obtenida puede mejorarse en un factor del orden del 20 al 25 %, principalmente porque la modulación trata sobre la totalidad de los componentes luminosos de la señal recogida procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz (véanse las explicaciones de la figura 7 en el presente documento a continuación) con relación a una zona de imagen obtenida según el método del documento FR-A-2943428.

La toma de zonas de imagen, con el fin de obtener una zona de imagen útil, puede hacerse simultáneamente, por ejemplo desdoblado la señal luminosa recogida y aplicando un filtro en cada duplicado. La toma de las zonas de imágenes puede ser también sucesiva. Se recoge entonces una señal luminosa y se le aplican sucesivamente los filtros realizando la modulación. Se conserva la zona de imagen que corresponde a cada señal luminosa filtrada obtenida.

El método proporciona al menos una zona de imagen útil, pero puede aplicarse tan frecuentemente como sea necesario, con una cadencia permitida por el dispositivo de observación y los filtros utilizados, de manera que se obtengan unas zonas de imágenes útiles a intervalos de tiempo dados. Si las zonas de imágenes corresponden a unos puntos de la muestra, puede realizarse un barrido espacial de la muestra.

La invención permite obtener unas zonas de imágenes con una gran sensibilidad, particularmente en zonas localizadas en la interfaz del soporte de índice de refracción  $n_s$  y el medio de índice de refracción  $n_L$ . Se pueden visualizar así unos eventos que se producen muy cerca de la interfaz, en una cierta profundidad. Para una interfaz vidrio/agua ( $n_L = 1,33$  y  $n_s = 1,51$  aproximadamente), la profundidad puede ser de alrededor de 1/6 de la longitud de onda, o menos si no se recogen más que los componentes luminosos más inclinados (los más supercríticos) de la luz emitida, es decir del orden de 50 nm (nanómetros) a 100 nm para unas longitudes de onda en el visible

Los soportes comúnmente utilizados en microscopía, particularmente de fluorescencia, son de vidrio y es posible elegir unos vidrios clásicos, de índice de refracción inferior o igual a 1,55, cuyo coste es reducido, o unos vidrios de índice más elevado.

Un fluorocromo se comporta como una antena susceptible de emitir una señal. Este emisor posee en su entorno inmediato (algunas decenas de nanómetros) unos componentes electromagnéticos que son evanescentes cuando se colocan en un medio homogéneo. Estos componentes pueden convertirse en propagadores cuando el fluorocromo se coloca en la proximidad de una interfaz. Se propagan entonces en unos ángulos superiores al ángulo crítico en el medio de índice de refracción más elevado.

La figura 5a representa los componentes de emisión de fluorescencia de un emisor 12 situado en la interfaz entre un soporte 20 y un medio líquido 11.

La emisión de fluorescencia del emisor 12 comprende una componente 14 emitida para  $\theta$  comprendido entre 0 y  $\theta_c$  y una componente 15 emitida para  $\theta$  superior a  $\theta_c$ , denominada "luz prohibida" o "luz supercrítica" y corresponde a los componentes evanescentes en el medio líquido 11 convertidos en propagativos en el soporte transparente 20.

Por ejemplo, para una interfaz vidrio/agua, se constata que la luz supercrítica puede representar hasta alrededor de un tercio de la intensidad de luz total emitida.

El valor del ángulo crítico viene dado por la ley de la refracción de Snell-Descartes en la que  $\theta_c = \arcsen(n_L/n_s)$ . En el caso en el que el líquido es agua ( $n_L = 1,33$ ) y el soporte es de vidrio estándar ( $n_s = 1,52$ ),  $\theta_c$  vale  $61^\circ$ .

La figura 5b representa los componentes de emisión de fluorescencia de un emisor 12 situado a una distancia superior a aproximadamente 100 nm.

Se constata que la luz emitida comprende la misma componente 14, emitida para  $\theta$  comprendido entre 0 y  $\theta_c$  pero

no comprende una componente emitida con un ángulo superior a  $\theta_c$ , correspondiente a la luz supercrítica.

5 El método según la invención permite recuperar la información contenida en la luz supercrítica y producir así unas zonas de imágenes útiles que proporcionan unas informaciones sobre unas estructuras y su evolución eventual en los 100 nm de profundidad con relación a la interfaz medio líquido/soporte.

La apertura numérica, AN, de un objetivo se define por  $AN = n \cdot \sin(\alpha_{\max})$  en la que n es el índice del medio de funcionamiento del objetivo y  $\alpha_{\max}$  es el ángulo máximo de recogida del objetivo.

10 Se han desarrollado unos objetivos comerciales actuales de gran apertura numérica de inmersión en aceite ( $n = 1,51$ ). Poseen unas AN por ejemplo de 1,45 y 1,49. Los ángulos máximos recogidos son superiores al ángulo crítico  $\theta_c$ . De ese modo, estos objetivos permitan recoger la mayor parte de la luz supercrítica. Preferentemente, estos objetivos tienen corregidas unas aberraciones cromáticas y esféricas y permiten de ese modo obtener una imagen de campo completo de excelente calidad.

15 Según unos modos de realizaciones particulares, la invención puede implementar una o varias de las características siguientes:

20 - los componentes luminosos de la señal luminosa recogida que forman el objeto de dicha modulación son los procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz para los que el ángulo  $\theta$  está comprendido en una gama predeterminada en función de una gama de profundidades a explorar en la muestra.

25 - las zonas de imagen obtenidas con ayuda de un dispositivo de observación y que se producen por combinación la zona de imagen útil de la muestra se obtienen sucesivamente aplicando sucesivamente a la señal luminosa recogida unos filtros.

- el método puede comprender las etapas siguientes:

30 a) toma de una pluralidad de zonas de imagen de una misma región de interés de la muestra con ayuda del dispositivo de observación y de una pluralidad de filtros, sirviendo cada filtro para la toma de una zona de imagen de dicha pluralidad de zonas de imagen, siendo la pluralidad de filtros tal que:

35 + un filtro de dicha pluralidad de filtros deja pasar en la señal luminosa filtrada unos componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz;

40 + los filtros de dicha pluralidad de filtros dejan todos pasar unos componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz y actúan de manera sustancialmente idéntica entre sí sobre los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz; y

45 + existen al menos dos filtros de dicha pluralidad que actúan de manera sustancialmente diferente entre ellos sobre la amplitud o la fase de al menos una parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedente de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz; y

b) producción de una zona de imagen útil de la muestra mediante un cálculo que combina la pluralidad de zonas de imagen tomadas en la etapa a) para poner en evidencia unas diferencias entre las zonas de imágenes de la pluralidad de zonas de imagen de la muestra.

50 - el método puede comprender las etapas siguientes:

55 a) toma de al menos dos zonas de imagen de una misma región de interés de la muestra con ayuda del dispositivo de observación y de dos filtros, sirviendo cada filtro para la toma de una de las dos zonas de imagen, siendo los dos filtros tales que:

- uno de los dos filtros deja pasar en la señal luminosa filtrada unos componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz; y

60 - el otro filtro actúa de manera sustancialmente idéntica a dicho uno de los dos filtros sobre los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz y disminuye de manera sustancialmente más que dicho uno de los dos filtros la amplitud de al menos una parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz; y

65 b) producción de una zona de imagen útil de la muestra mediante un cálculo que combina las dos zonas de imagen de la muestra tomadas en la etapa a), comprendiendo el cálculo una diferencia algebraica entre las

dos zonas de imagen de la muestra.

- 5 - los filtros implementados disminuyen además parcialmente la amplitud de todos o parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos críticos y subcríticos de la emisión de luz.
- 10 - unos componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de componentes luminosos de la emisión de luz que forman el mismo ángulo  $\theta$  se tratan de manera sustancialmente idéntica por un mismo filtro para la disminución de la amplitud o la modificación de la fase.
- 15 - presentando la muestra un fenómeno a observar que tiene un tiempo característico dado, las zonas de imágenes se toman sucesivamente con unos intervalos de tiempo inferiores o iguales a la mitad del tiempo característico.
- 20 - una de las zonas de imagen de la muestra se obtiene con ayuda de un filtro neutro que deja pasar en la señal luminosa filtrada sin disminución de la amplitud todos los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz; y otra de las zonas de imagen de la muestra se obtiene con ayuda de un filtro total que anula en la señal luminosa filtrada todos los componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz.
- 25 - el dispositivo de observación comprende un objetivo de campo pleno de inmersión y los filtros se sitúan en un plano focal posterior del objetivo de inmersión y/o en un plano conjugado de dicho plano focal posterior.
- 30 - los filtros comprenden un diafragma que permite, en una posición abierta, dejar pasar unos componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedente de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz y permite, en función de un grado de cierre, ocultar los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz que presentan un ángulo  $\theta$  superior a un valor límite vinculado a dicho grado de cierre.
- 35 - la muestra a observar es de naturaleza biológica.

Según un modo particular, la modulación no se refiere a todos los componentes luminosos de la señal recogida procedente de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz. Puede afectar solamente a aquellas para las que el ángulo  $\theta$  está comprendido en un conjunto predeterminado, por ejemplo el intervalo  $[\theta_a; \theta_b]$ , siendo  $\theta_a$  y  $\theta_b$  ambas estrictamente superiores a  $\theta_c$ . Esto permite explorar la gama de profundidades correspondientes en la muestra (véase las explicaciones dadas para la figura 1).

Según otro modo de realización, el método comprende una etapa a) de toma de una pluralidad de zonas de imágenes que corresponden a unas señales luminosas moduladas. Para obtener la modulación, es necesario que al menos uno de los filtros utilizados deje pasar unos componentes luminosos procedentes de la parte supercrítica de la emisión de luz. Es igualmente necesario que los otros filtros actúen de modo diferente que este filtro sobre todos o parte de los componentes supercríticos de la señal luminosa recogida. "De modo diferente" puede significar que los filtros en cuestión atenúan más, o menos, la amplitud de los componentes luminosos afectados. La diferencia puede tratar también sobre la fase. Las acciones sobre la amplitud y la fase pueden combinarse.

Por el contrario, los filtros deben actuar de manera sustancialmente idéntica sobre los componentes luminosos procedentes de la parte crítica o subcrítica de la emisión de luz. Los componentes luminosos procedentes de la parte crítica o subcrítica de la emisión de luz pueden modificarse por los filtros utilizados para obtener las zonas de imagen, pero esta modificación debe ser sustancialmente la misma para todas las otras imágenes combinadas para obtener la zona de imagen útil. Por "sustancialmente la misma", se entiende que según un modo particular no hay diferencia, pero que, según otro modo, puede haber unas diferencias mínimas con relación a la modulación buscada (tratando esta sobre los componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz). Preferentemente, se dejan subsistir en la señal luminosa filtrada unos componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz.

El método comprende una etapa b) en la que se combinan las zonas de imágenes tomadas en la etapa a). Las combinaciones se realizan mediante un cálculo que trata sobre la intensidad luminosa. Este cálculo es función de los filtros utilizados y sirve para poner en evidencia las diferencias entre las zonas de imágenes inducidas por la modulación.

La ventaja de tomar una pluralidad de zonas de imágenes es permitir reducir un ruido de fondo eventual, por ejemplo introduciendo unas medias en el cálculo.

Por ejemplo, se pueden tomar tres zonas de imagen sucesivas de la misma región de interés de la muestra. La primera es una zona de imagen de la muestra que contiene la información vinculada a todos los componentes luminosos procedentes de la parte supercrítica de la señal recogida, es decir que el filtro utilizado no ha modificado sustancialmente estos componentes. La segunda es una zona de imagen que no contiene ninguna información

vinculada a los componentes luminosos procedentes de la parte supercrítica de la señal recogida, es decir que el filtro utilizado ha ocultado estos componentes. La tercera zona de imagen se toma en unas condiciones idénticas a la primera. Una combinación posible de estas tres zonas de imagen sucesivas es calcular el valor absoluto de la diferencia entre, por un lado, una media de la primera y tercera zonas de imagen y, por otro lado, la segunda zona de imagen. Esto puede permitir reducir el ruido en la zona de imagen útil (fenómeno de fotoblanqueo, fluctuación de la intensidad de excitación, movimiento de la muestra).

Las imágenes contienen una información vinculada a la intensidad (positiva) del campo eléctrico global. Una diferencia entre dos píxeles puede por tanto ser positiva o negativa, esto es por lo que se utiliza un valor absoluto para obtener un resultado positivo que represente una intensidad, la de la zona de imagen útil.

Según otro modo particular, se toman en la etapa a) dos zonas de imagen de una misma región de interés de la muestra. La primera se toma utilizando un filtro que deja pasar unos componentes luminosos procedentes de la parte supercrítica de la emisión de luz. La segunda se toma con un filtro que actúa de modo diferente al primer filtro sobre todos o parte de los componentes supercríticos de la señal recogida, y sustancialmente de modo idéntico sobre los componentes críticos o subcríticos de la señal recogida. En la etapa b), se combinan las dos zonas de imagen calculando para cada píxel el valor absoluto de la diferencia entre la primera y la segunda zonas de imagen. Este resultado representa una intensidad, la de la zona de la imagen útil. La ventaja de este modo de realización reside en la simplicidad de la combinación de las zonas de imagen, es decir la simplicidad y la rapidez de los cálculos.

Según un modo particular, se pueden atenuar en las dos zonas de imagen de manera idéntica parcialmente todos o parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedente de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz. Esto es importante cuando la luz procedente de las radiaciones subcríticas es muy grande frente a las procedentes de las radiaciones supercríticas.

En general, los filtros utilizados respetan la simetría de revolución y tratan de la misma manera los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos de la emisión de luz que forman el mismo ángulo  $\theta$ . En efecto, una modulación sobre el azimut de los componentes de la luz emitida no presenta mucho interés. Por el contrario, el hecho de no modular sobre el azimut permite no introducir astigmatismo en la zona de imagen útil.

Si la muestra evoluciona en el tiempo (por ejemplo una membrana celular) con un tiempo característico dado, se toman unas zonas de imágenes sucesivas (bastante representativas de la muestra en profundidad) con un periodo inferior a la mitad del tiempo característico (cadencia de video) de manera que puedan seguirse estas evoluciones. El método permite normalmente obtener las zonas de imágenes útiles (bastante representativas de la interfaz de la muestra) con la misma cadencia que la de las zonas de imagen sucesivas, es decir a la cadencia de video y no a la mitad de la cadencia de video como en el método descrito por el documento FR-A-2943428.

El añadido de un diafragma en el plano focal posterior del objetivo y/o en un plano conjugado puede realizarse de manera simple y particularmente ponerse en práctica con unos microscopios comerciales. Da como resultado un dispositivo cuyo coste de la mejora es muy modesto.

La función del diafragma consiste en ocultar los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos de la emisión de luz de la muestra en las direcciones angulares  $\theta$  superiores o iguales a un cierto ángulo que depende de la apertura del diafragma. Las figuras 5a y 5b recuerdan los principios de emisión de fluorescencia. Una ventaja del método es que la información subcrítica está siempre disponible en las zonas de imagen utilizadas para la combinación. Esta información es frecuentemente interesante, porque está vinculada a las regiones más internas de la muestra.

### Descripción de las figuras

Surgirán otras particularidades y ventajas de la presente invención en la descripción que sigue a continuación de ejemplos de realizaciones no limitativas, en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- la figura 1 ilustra una vista esquemática de un dispositivo de microscopía que permite implementar un método según la invención;
- la figura 2 ilustra una variante según la invención del dispositivo según la figura 1, adaptado a la microscopía confocal;
- la figura 3 ilustra una variante según la invención del dispositivo según la figura 1, adaptado a la microscopía TIRF;
- la figura 4 ilustra un ejemplo de filtro para la implementación de un método según la invención;

- las figuras 5a y b ilustran los componentes de emisión de fluorescencia según diferentes configuraciones y según se ha comentado en el presente documento anteriormente;
- las figuras 6a y 6b ilustran unas zonas de imagen de una misma célula respectivamente con, posteriormente sin, los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz;
- la figura 6c representa una zona de imagen útil de la misma célula obtenida por combinación de las zonas de imagen de las figuras 6a y 6b;
- la figura 7 es una representación gráfica de la intensidad luminosa de las manchas obtenidas a partir de una misma muestra de ensayo, por un lado por el método descrito en el documento FR-A-2943428 (ocultación de los componentes críticos o subcríticos) y por otro lado mediante un método según la invención (modulación que trata sobre los componentes supercríticos, posteriormente la demodulación).

Por razones de claridad, las dimensiones de los diferentes elementos representados en estas figuras no están necesariamente en proporción con sus dimensiones reales. En las figuras, unas referencias idénticas corresponden a unos elementos idénticos.

## Descripción detallada de la invención

La figura 1 representa una vista esquemática de un dispositivo de microscopía de fluorescencia 100. Este comprende un objetivo de inmersión 110 cuya AN es superior o igual a 1,33. Se dispone un soporte de vidrio 20 por encima de este objetivo de inmersión 110. Se dispone aceite entre el objetivo de inmersión 110 y el soporte de vidrio 20.

Se dispone una muestra 10 a observar sobre el soporte de vidrio 20. Esta muestra 10 comprende por ejemplo unos componentes fluorescentes dispersos en el agua.

El plano focal posterior del objetivo se referencia como 400. La luz de excitación se produce mediante un haz 200 procedente de una fuente luminosa que atraviesa un filtro de excitación 210 y se refleja mediante un espejo dicroico 120 para llegar a iluminar la muestra 10 después de haber atravesado el soporte transparente 20. Un ejemplo de trayecto de la luz de excitación incidente está representado por las flechas dirigidas hacia la parte alta de la figura. La luz de excitación incidente puede ser reflejada en parte y se filtra entonces mediante un filtro de emisión 130 de manera que la imagen formada en un plano de imagen no comprenda más que la luz de fluorescencia emitida por la muestra 10.

La luz de fluorescencia emitida por la muestra 10 atraviesa el soporte transparente 20, el espejo dicroico 120, el filtro de emisión 130.

Según el modo de realización representado en la figura 1, esta luz se refleja en un espejo 140 y lo que sigue del dispositivo funciona con la luz reflejada.

Una lente 150, denominada lente de tubo, permite enfocar la luz sobre un plano de imagen intermedio 410.

La luz se paraleliza a continuación gracias a una lente 160 y se enfoca a continuación mediante una lente 180 sobre el plano de imagen 430 en el que la imagen es adquirida mediante un dispositivo adaptado, principalmente una cámara 300. Los planos 430 y 410 son unos planos de imágenes conjugadas del plano de observación.

Las lentes 160 y 180 se disponen de manera que se sitúe un plano conjugado 420 del plano focal posterior del objetivo de inmersión 110 entre estas lentes 160 y 180.

Se dispone un diafragma 170 de apertura variable en este plano focal posterior del objetivo de inmersión. Este diafragma actúa como un filtro para los componentes luminosos de la señal luminosa recogida. Puede estar en posición abierta y dejar pasar todos los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos de la emisión de luz. Puede estar en posición parcialmente cerrada y ocultar una parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida.

Más precisamente, los rayos luminosos emitidos según un cierto ángulo por los emisores fluorescentes de la muestra 10 situados en el plano de observación interceptan el plano focal posterior 400 del objetivo (o todo plano conjugado 420 de este plano 400) a una cierta distancia  $r(\theta)$  del centro (definido por el eje óptico) de este plano.  $r(\theta)$  es una función creciente de  $\theta$ . Para unos objetivos aplanéticos, por ejemplo,  $r(\theta)$  es sustancialmente proporcional a  $\text{sen}(\theta)$ . De ese modo, el conjunto de los rayos emitidos según el ángulo  $\theta$  (formando un cono) describen un círculo de radio  $r(\theta)$  en el plano focal posterior.

Cuando el diafragma 170 se dispone en el plano focal posterior 400 del objetivo 110, la relación entre  $r(\theta)$  y  $\text{sen}(\theta)$



es:

$r(\theta) = n_i \times f_o \times \text{sen}(\theta)$ , en la que  $f_o$  es la distancia focal del objetivo de inmersión 110 (en general del orden de algunos milímetros) y  $n_i$  es el índice del medio de inmersión utilizado para el objetivo (en general aceite).

5 Según un ejemplo de realización, se tiene un objetivo de inmersión de aumento  $G = 100$  y la distancia focal de la lente de tubo 150 vale  $f_t = 200$  mm.

Se tiene entonces  $f_o = f_t/G = 2$  mm. Se obtiene en esta configuración:  $r(\theta_c) = 2,66$  mm.

10 Si el diafragma 170 se dispone en el plano conjugado del plano focal posterior, conviene tener en cuenta el factor de ampliación vinculado al sistema óptico. A modo de ejemplo, en el plano 420, conviene introducir un factor multiplicativo  $G' = f_{160}/f_{150}$ , en la que  $f_{150}$  es la distancia focal de la lente de tubo 150 y  $f_{160}$  es la distancia focal de la lente 160.

15 Los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz interceptan el plano focal posterior según un disco cerrado centrado en el radio  $r(\theta_c)$ . Los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz, para las que  $\theta_c < \theta < \theta_{\text{máx}}$ , forman un anillo abierto en el plano focal posterior  $r(\theta_c) < r(\theta) < r(\theta_{\text{máx}})$ . La colocación de un diafragma 170 centrado sobre el eje óptico y de apertura  $r(\theta_c)$  permite por tanto ocultar todos los componentes luminosos supercríticos.

20 La selección se realiza de ese modo en la emisión. Dando como resultado que el sistema de iluminación no tiene necesidad de ser cambiado con relación al de un dispositivo de observación de epifluorescencia estándar. Se puede iluminar así con una fuente de luz no coherente, por ejemplo una luz blanca estándar, obtenida particularmente con una lámpara de mercurio. Da como resultado varias ventajas, como la ausencia de un sobrecoste significativo (a comparar con la técnica de microscopía TIRFM, en la que se requiere una iluminación por láser) así como la posibilidad de obtener un campo homogéneo (que permite eventualmente unas mediciones cuantitativas).

30 Según un modo de realización, unos medios de accionamiento del diafragma funcionan a la cadencia de video (típicamente del orden de algunas decenas de hercios) con el fin de pasar de la posición abierta a la posición cerrada alternando a la velocidad de adquisición de las imágenes. Es posible así tener la información de volumen y la de superficie simultáneamente.

35 Este método de obtención de imagen está adaptado particularmente para la creación de imágenes de muestras de naturaleza biológica, en particular para el estudio de procesos biológicos en las células vivas, tales como fenómenos de adhesión celular, de endocitosis / exocitosis,...

40 La figura 2 presenta una vista esquemática de una variante, según la invención, del dispositivo de la figura 1 en la que los componentes presentes antes del plano de imagen 430 son idénticos en los dos modos de realización. El dispositivo de la figura 2, una máscara de tipo estenopo 190 que comprende un orificio 195 se dispone en el plano de imagen. Un monodetector 350 permite una adquisición punto por punto de la luz que pasa a través del orificio 195. Es posible así obtener una configuración que permite efectuar microscopía confocal.

45 La figura 3 presenta una vista esquemática de una variante, según la invención, del dispositivo de la figura 1 en la que los componentes del dispositivo de microscopía son similares, pero en la que la fuente de luz difiere.

En el dispositivo de la figura 3, la luz 250 procede de un láser y la iluminación de la muestra se produce por reflexión total interna. Es posible así obtener un dispositivo de tipo TIRF mejorado.

50 Se observa que el plano focal posterior de los objetivos comerciales se sitúa en general en el interior del objetivo y por tanto difícilmente accesible. Es por tanto frecuentemente recomendado realizar un sistema que permita capturar la imagen de este plano focal posterior para poder insertar el sistema de filtro 170 entre el detector y el objetivo.

55 Según un ejemplo de realización, se utiliza un microscopio invertido de fluorescencia de tipo Ti de Nikon que comprende un módulo (referencia TI-T-BPH, MEB55810) que permite capturar la imagen del plano focal posterior y posicionar una máscara anular para permitir el contraste de fase (externa) con los objetivos de grandes aperturas numéricas. Es posible poner un diafragma 170 del dispositivo según la invención en este tipo de módulo. El sistema de centrado y de la regulación de la posición del plano está totalmente adaptado para un diafragma que filtre los ángulos supercríticos. El sistema comprende varias posiciones para los diferentes objetivos.

60 La figura 4 presenta una vista esquemática de un diafragma 170 destinado a disponerse sobre el plano focal posterior 400 del objetivo de inmersión 110 o en un plano conjugado 420 de dicho plano focal. El diafragma 170 está compuesto por una zona periférica 176 adecuada para ocultar la luz. O bien esta zona 176 es efectivamente móvil (como en un aparato fotográfico), o bien el diafragma es sustituido por otro, por ejemplo haciendo girar una rueda de filtro rotativo motorizado.

El diafragma 170 puede ser un diafragma de iris, tal como el comercializado por Thorlabs. Su apertura se modifica mediante desplazamiento de piezas mecánicas móviles (no representadas).

- 5 Otra posibilidad es utilizar una rueda que incluye unas aperturas o unos materiales semitransparentes repartidos en unos sectores de la rueda y hacerla girar. En este caso, el diafragma puede, por ejemplo, realizarse mediante un orificio circular del diámetro adecuado en un material opaco. Esto permite obtener unos ciclos transmisión/obturación muy cortos, susceptibles por ejemplo de seguir el ritmo de adquisición de las imágenes con una cámara.
- 10 Según un ejemplo de realización, se utiliza un microscopio invertido de fluorescencia Nikon tipo "Ti-U"® con una base de tubo binocular de fase "TI-T-BPH"®, un objetivo de inmersión en aceite x100 de apertura numérica 1,49. Se utiliza un cubo de filtros de fluorescencia que contienen un filtro de emisión, una lámina dicróica y un filtro de excitación. La fuente luminosa utilizada es una fuente de fibra de referencia comercial "Nikon Intensilight"® con una lámpara de mercurio de 130 W y un generador "C-HGFI"®. La cámara utilizada es una cámara EMCCD Andor Ixon+,
- 15 refrigerada a sustancialmente -75°. El diafragma 170 utilizado es el diafragma de iris realizado por Thorlabs.

El diafragma se posiciona a continuación en el módulo Nikon MEB55810 ("TI-T-BPH") en lugar del anillo de fase. La posición del diafragma se regula con la ayuda de la lente Bertrand del microscopio y unos desplazamientos del módulo gracias a unos tornillos de centrado y de posición axial. El procedimiento seguido es idéntico al de

20 regulación del anillo de fase proporcionado por el constructor con este módulo.

Se han efectuado unas observaciones sobre algunas células de embrión de riñón humano marcadas con cólera-toxina (que se vincula a unos glicolípidos sobre la membrana y los constituyentes de las balsas lipídicas) acoplado a un Alexa 488 y excitados por la lámpara Nikon Intensilight de Hg 130 W (lámpara clásica). El cubo de filtros utilizado

25 está compuesto de un filtro de excitación de banda pasante de 450 a 490 nm, de un espejo dicróico a 500 nm y un filtro de emisión de banda pasante de 510 a 550 nm.

Las figuras 6a y 6b muestran dos imágenes obtenidas con un diafragma abierto (6a), y con un diafragma cerrado de manera que oculte todos los componentes luminosos supercríticos (6b). Los tiempos de pausa ( $T = 300$  ms) y la ganancia ( $G = 0$ ) son idénticos para las imágenes 6a y 6b. La imagen 6c se obtiene como el valor absoluto de la

30 diferencia entre las imágenes 6a y 6b (es decir entre la intensidad de las señales asociadas a estas imágenes).

Se constata que las dos imágenes 6a y 6b parecen idénticas. Por el contrario la imagen 6c está bien contrastada. Se observan en este caso ventajosamente unas variaciones de intensidad que se asocian con unos fenómenos

35 membranosos difíciles de distinguir sobre las dos otras imágenes, difuminadas entre las otras informaciones procedentes del interior de la célula.

Se hace notar que estas observaciones han sido realizadas ventajosamente con una lámpara "clásica" y que no ha sido necesario implementar un láser para obtenerlas.

40

Se han efectuado unas mediciones de la resolución lateral con unas bolas fluorescentes Fluosphere® (comercializadas por Invitrogen) excitación/emisión: 580/605 nm depositadas por centrifugado ("spin-coating") sobre una contra-lámina de vidrio estándar (grosor 0,13-0,16 mm), y posteriormente sumergidas en agua destilada.

45 La figura 7 ilustra el perfil de intensidad de fluorescencia de las bolas (intensidad de señal normalizada en ordenadas en función del desplazamiento lateral en abscisas, expresado en micrómetros). Se constata que el perfil C2, que corresponde a la zona de imagen útil obtenida mediante el método según la invención, es más estrecho que el perfil C1, que corresponde a la imagen obtenida mediante el método descrito en el documento FR-A-2943428. La mejora correspondiente de la resolución es del 20 - 25 %.

50

La invención no se limita a estos tipos de realización y debe interpretarse de manera no limitativa, y englobando todos los modos de realización equivalentes.

## REIVINDICACIONES

1. Método para observar una emisión de luz (14, 15) de una muestra (10) en un medio (11) de índice de refracción  $n_L$ , estando la muestra dispuesta contra una superficie (20a) de un soporte transparente (20) de índice de refracción  $n_s$  superior a  $n_L$ , comprendiendo la emisión de luz unos componentes luminosos de amplitud y de fase dadas, orientadas hacia el soporte y que forman un ángulo  $\theta$  con una dirección (20b) perpendicular a la superficie (20a), entre las que están, por un lado, unos componentes luminosos supercríticos para los que el ángulo  $\theta$  es estrictamente superior a un ángulo crítico  $\theta_c = \arcsen(n_L/n_s)$  y, por otro lado, unos componentes luminosos críticos o subcríticos, para los que el ángulo  $\theta$  es inferior o igual al ángulo crítico  $\theta_c$ , implementando el método un dispositivo de observación (100) capaz de:

- recoger al menos una parte de la emisión de luz de una región de interés de la muestra y obtener una señal luminosa recogida que incluye unos componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz;
- aplicar unos filtros (170) a la señal luminosa recogida para disminuir selectivamente la amplitud y/o modificar la fase de ciertos componentes luminosos de la señal luminosa recogida para obtener una señal luminosa filtrada; y
- transformar la señal luminosa filtrada en una zona de imagen de la región de interés de la muestra;

estando el método **caracterizado por que**:

- se realiza una modulación de la señal luminosa filtrada, en la que se dejan pasar unos componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz, para obtener unas zonas de imagen (6a, 6b) de una misma región de interés de la muestra, tratando la modulación sobre todos o parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedente de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz; y
- se produce al menos una zona de imagen útil (6c) de la muestra por combinación de las zonas de imagen (6a, 6b), poniendo en evidencia la combinación unas diferencias entre las zonas de imagen (6a, 6b) vinculadas a la modulación.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado por que** los componentes luminosos de la señal luminosa recogida que forman el objeto de dicha modulación son los procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz para los que el ángulo  $\theta$  está comprendido en un intervalo predeterminado en función de un intervalo de profundidades a explorar en la muestra.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** las zonas de imagen (6a, 6b) obtenidas con ayuda de un dispositivo de observación (100) y que producen por combinación la zona de imagen útil (6c) de la muestra se obtienen sucesivamente aplicando sucesivamente a la señal luminosa recogida unos filtros (170).

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** comprende las etapas siguientes:

a) toma de una pluralidad de zonas de imagen de una misma región de interés de la muestra con ayuda del dispositivo de observación (100) y de una pluralidad de filtros (170), sirviendo cada filtro para la toma de una zona de imagen de dicha pluralidad de zonas de imagen, siendo la pluralidad de filtros tal que:

- un filtro de dicha pluralidad de filtros deja pasar en la señal luminosa filtrada unos componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz;
- los filtros de dicha pluralidad de filtros dejan todos pasar unos componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz y actúan de manera sustancialmente idéntica entre sí sobre los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz; y
- existen al menos dos filtros de dicha pluralidad que actúan de manera sustancialmente diferente entre sí sobre la amplitud o la fase de al menos una parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedente de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz; y

b) producción de una zona de imagen útil de la muestra mediante un cálculo que combina la pluralidad de zonas de imagen tomadas en la etapa a) para poner en evidencia unas diferencias entre las zonas de imágenes de la pluralidad de zonas de imagen de la muestra.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** comprende las etapas siguientes:

a) toma de al menos dos zonas de imagen de una misma región de interés de la muestra con ayuda del dispositivo de observación y de dos filtros, sirviendo cada filtro para la toma de una de las dos zonas de imagen, siendo los dos filtros tales que:

- 5           - uno de los dos filtros deja pasar en la señal luminosa filtrada unos componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz; y  
               - el otro filtro actúa de manera sustancialmente idéntica a dicho uno de los dos filtros sobre los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos críticos o subcríticos de la emisión de luz y disminuye de manera sustancialmente más que dicho uno de los dos filtros la amplitud de al menos una parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz; y
- 10           b) producción de una zona de imagen útil de la muestra mediante un cálculo que combina las dos zonas de imagen de la muestra tomadas en la etapa a), comprendiendo el cálculo una diferencia algebraica entre las dos zonas de imagen de la muestra.
- 15           6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** los filtros implementados disminuyen además parcialmente la amplitud de todos o parte de los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos críticos y subcríticos de la emisión de luz.
- 20           7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** unos componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de componentes luminosos de la emisión de luz que forman el mismo ángulo  $\theta$  se tratan de manera sustancialmente idéntica por un mismo filtro para la disminución de la amplitud o la modificación de la fase.
- 25           8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** presentando la muestra un fenómeno a observar que tiene un tiempo característico dado, las zonas de imágenes se toman sucesivamente con unos intervalos de tiempo inferiores o iguales a la mitad del tiempo característico.
- 30           9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que:**  
               - una de las zonas de imagen de la muestra se obtiene con ayuda de un filtro neutro que deja pasar en la señal luminosa filtrada sin disminución de la amplitud todos los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz; y  
               - otra de las zonas de imagen de la muestra se obtiene con ayuda de un filtro total que anula en la señal luminosa filtrada todos los componentes luminosos procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz.
- 35           10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que** el dispositivo de observación (100) comprende un objetivo de campo pleno de inmersión (110) y los filtros (170) se sitúan en un plano focal posterior (400) del objetivo de inmersión (110) y/o en un plano conjugado (420) de dicho plano focal posterior.
- 40           11. Método según la reivindicación 10, **caracterizado por que** los filtros (170) comprenden un diafragma (176) que permite, en una posición abierta, dejar pasar unos componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedente de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz y permite, en función de un grado de cierre del diafragma (176), ocultar los componentes luminosos de la señal luminosa recogida procedentes de los componentes luminosos supercríticos de la emisión de luz que presentan un ángulo  $\theta$  superior a un valor límite vinculado a dicho grado de cierre.
- 45           12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado por que** la muestra a observar es de naturaleza biológica.

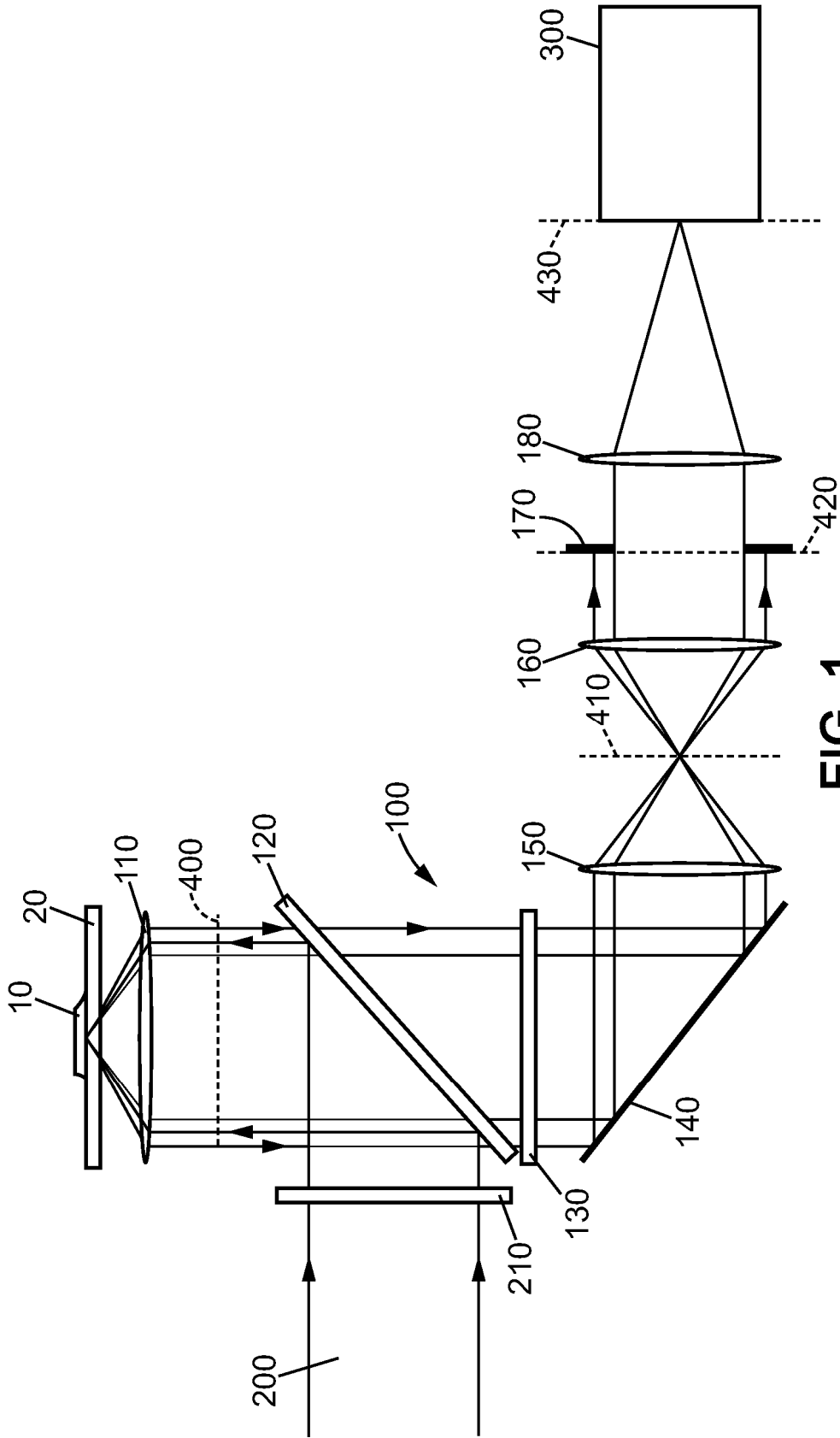
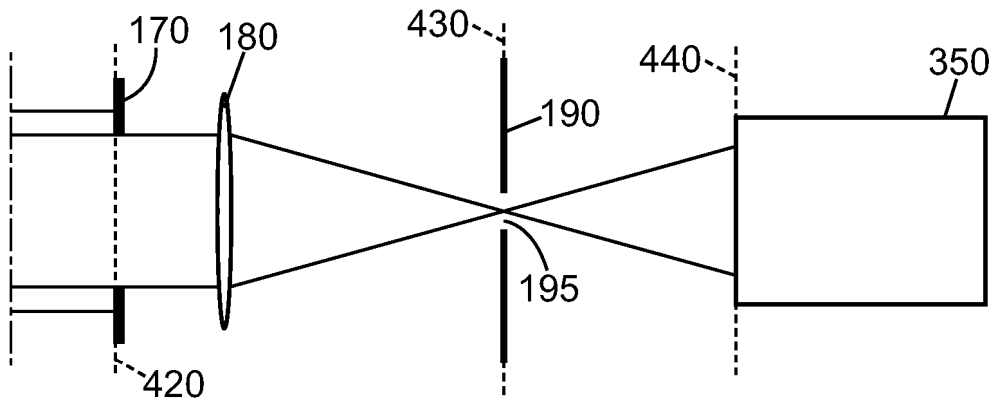
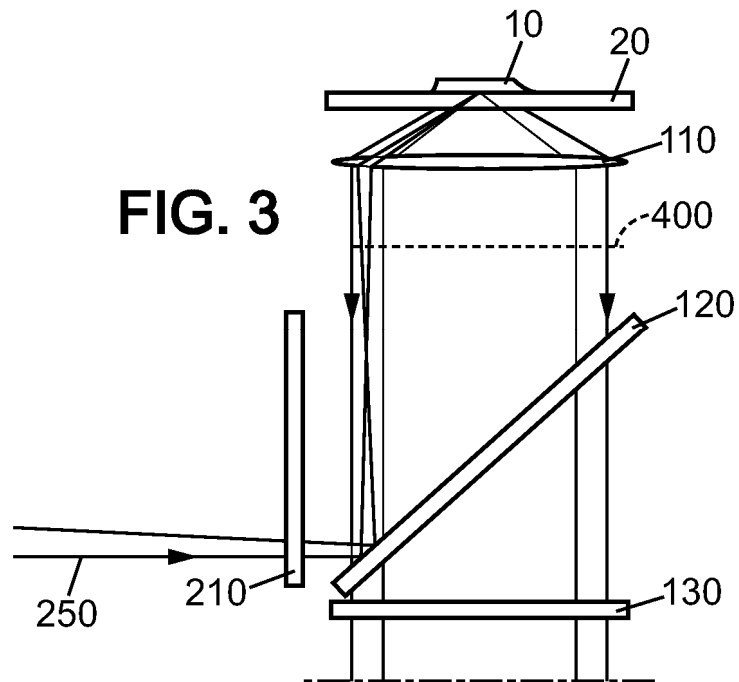


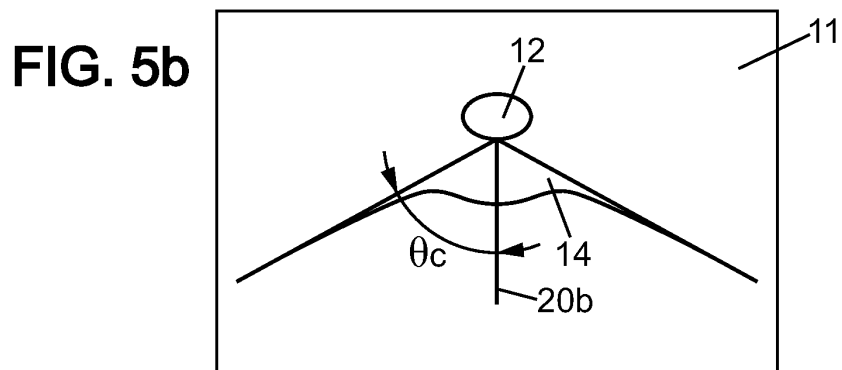
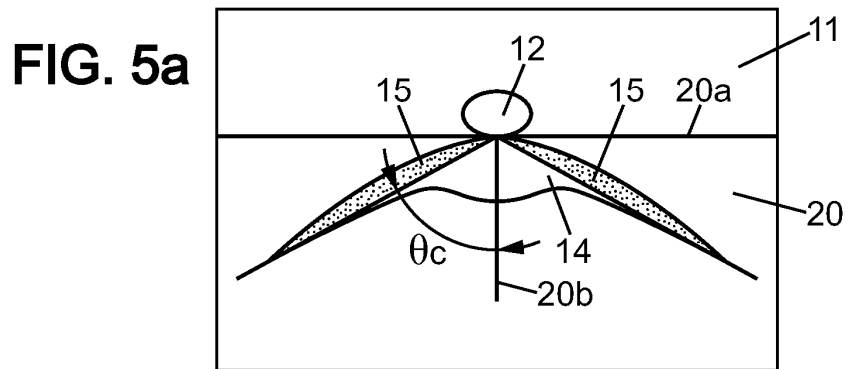
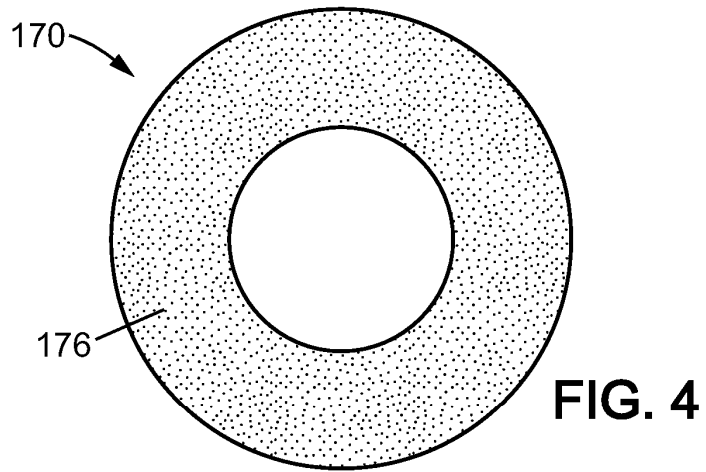
FIG. 1

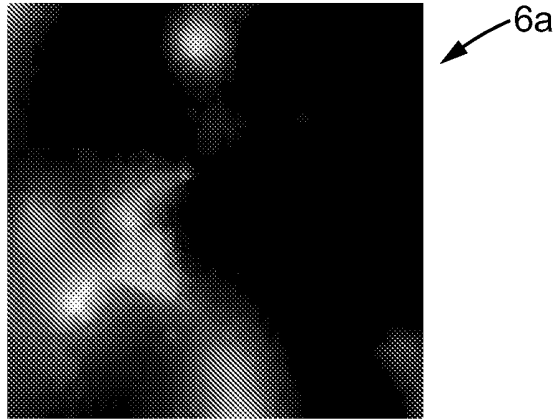


**FIG. 2**

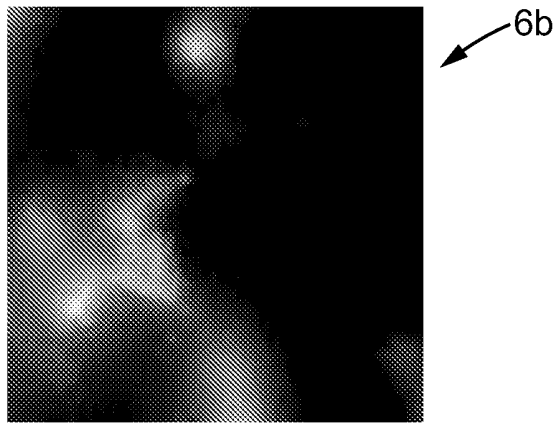


**FIG. 3**

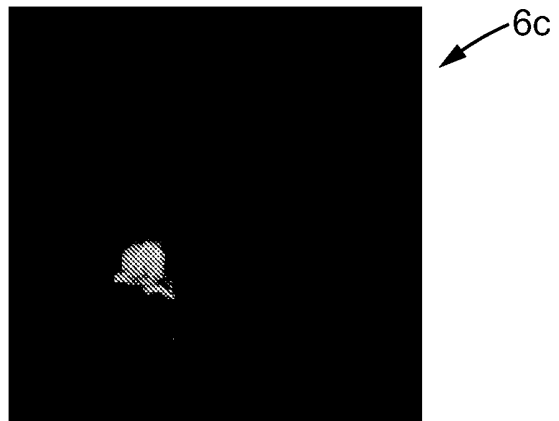




**FIG. 6a**



**FIG. 6b**



**FIG. 6c**



