

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 398**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G02B 21/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2017 PCT/FR2017/051901**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2018 WO18020098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2017 E 17751434 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3488227**

54 Título: **Sistema y procedimiento de medición de un parámetro físico de un medio**

30 Prioridad:

25.07.2016 FR 1657130

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

08.03.2021

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE -CNRS- (50.0%)**

3, rue Michel-Ange

75016 Paris, FR y

ECOLE SUPÉRIEURE DE PHYSIQUE ET DE

**CHIMIE INDUSTRIELLES DE LA VILLE DE PARIS
(50.0%)**

72 Inventor/es:

FORT, EMMANUEL;

LEVEQUE-FORT, SANDRINE y

BOURG, NICOLAS

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 810 398 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema y procedimiento de medición de un parámetro físico de un medio

La presente invención se refiere a sistemas y procedimientos para medir un parámetro físico en un medio.

5 La invención puede encontrar en particular una aplicación en el campo de la imagenología y la microscopia óptica superresuelta.

Se pueden prever otros campos de aplicación, en particular en el campo de la acústica y las ondas de radiofrecuencia, por ejemplo.

Una técnica de microscopia de luz superresuelta, llamada microscopia óptica de fluorescencia superresuelta, consiste en medir la posición y las características físicas de los fluoróforos integrados en el medio observado.

10 Los fluoróforos son emisores de luz nanoscópicos excitables que, cuando son excitados por la luz incidente, emiten cierta cantidad de fotones antes de autodestruirse. El objetivo de los métodos de superresolución óptica es capturar estos fotones para localizar y/o caracterizar los fluoróforos antes de que se autodestruyan.

15 Las técnicas conocidas de microscopia de superlocalización son, por ejemplo, los métodos "PALM" (acrónimo inglés de "Photo-Activation Localization Microscopy", 'Microscopia de localización de fotoactivación') o "STORM" (acrónimo inglés de "Stochastic Optical Reconstruction Microscopy", 'Microscopia de reconstrucción óptica estocástica').

Estas técnicas tienen la característica común de activar una pequeña cantidad de fluoróforos en el medio para poder hacer un zoom fuertemente sobre un fluoróforo único y determinar el centro del punto focal generado por dicho fluoróforo.

20 Estas técnicas de observación permiten observar así estructuras intracelulares con una precisión del orden de la decena de nanómetros.

Sin embargo, estas técnicas presentan inconvenientes.

25 Por lo tanto, la precisión de la posición obtenida midiendo el centro del punto focal es limitada y depende de la raíz cuadrada del número de fotones recibidos del fluoróforo. Además, la emisión proveniente de un emisor dipolar inmóvil en rotación, como ciertos fluoróforos, es anisotrópica y depende de la polarización de la luz excitadora. Esto induce una incertidumbre sobre la posición del fluoróforo obtenido. Además, la necesidad de acercarse al fluoróforo para visualizar el punto focal limita significativamente el tamaño del campo de visión.

30 La presente invención tiene como objetivo mejorar esta situación. La presente invención es particularmente interesante en el caso de un medio que emite un número limitado de fotones, en particular en un tiempo muy corto, por ejemplo, en el caso de los denominados emisores "únicos", es decir, de los emisores con una vida útil limitada suficientemente espaciada entre sí para poder distinguirse ópticamente entre sí. La presente invención hace posible recolectar una parte importante de los fotones emitidos por el medio y así obtener información precisa sobre las características físicas del medio. Sin embargo, la presente invención no se limita al campo de aplicación de la microscopia óptica superresuelta, sino que puede encontrar una aplicación en muchos otros campos tales como, por ejemplo, la acústica o las ondas de radiofrecuencia, por ejemplo. Los documentos: "Fluorescence nanoscopy by polarization modulation and polarization angle narrowing", Nour Hafi et al., NATURE METHODS, vol. 11, no. 5, pages 35 579-584 (2015) y US 2014/367590 A1 enseñan un procedimiento de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1 y un sistema de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 9.

Para este fin, el primer objeto de la invención es un procedimiento para medir un parámetro físico de una región diana de un medio:

40 se emite una onda de excitación en al menos una región diana de un medio, de modo tal que dicha onda presente, en el sitio de dicha región diana, una modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física con un período de tiempo predefinido,

se recibe una onda de retorno desde dicha región diana, emitida en respuesta a la onda de excitación,

45 desviando periódicamente dicha onda de retorno hacia una onda desviada, por medio de un elemento deflector controlable, de modo que dicha onda desviada escanea una serie de transductores en cada período de la modulación periódica, donde cada transductor de la serie de transductores está asociado con un rango de fase predefinida de dicha modulación periódica,

se registra una imagen de fase que comprende señales generadas por cada transductor de la serie de transductores, en respuesta a la onda desviada, durante al menos un período de la modulación periódica,

50 se determina, a partir de dicha imagen de fase, un desplazamiento de fase entre una modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física de la onda de retorno y la modulación periódica en el tiempo de al

menos una característica física de la onda de excitación,

se determina un parámetro físico de dicha región diana a partir de dicho desplazamiento de fase.

En las realizaciones preferidas de la invención, opcionalmente también se puede recurrir a una y/u otra de las siguientes disposiciones:

- 5 - las ondas son ondas electromagnéticas, en particular ondas luminosas;
- los transductores son fotodetectores, en particular una cámara;
- la modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física es una modulación periódica en el tiempo de la polarización de la onda de excitación y el parámetro físico de dicha región diana es una información de orientación de un emisor de luz presente en dicha región diana, en particular un fluoróforo;
- 10 - la modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física es una modulación periódica en el tiempo de la amplitud de la onda de excitación y el parámetro físico de dicha región diana es información del tiempo de vida o una información de posición de un emisor de luz presente en dicha región diana, en particular un fluoróforo;
- 15 - para emitir la onda de excitación, se genera una onda modulada espacialmente en el medio y se desplaza dicha onda espacialmente modulada en el medio, en particular con una velocidad predefinida constante, en particular se genera una onda electromagnética modulada espacialmente en el medio generando un patrón de interferencia entre dos rayos láser en el medio;
- se emite dicha onda de excitación de modo tal que dicha onda presente, en el sitio de dicha región diana, una pluralidad de modulaciones periódica en el tiempo de al menos una característica física, con una pluralidad de períodos de tiempo predefinidos asociados respectivamente a cada modulación periódica de dicha pluralidad de modulaciones periódica, se desvía periódicamente la onda de retorno en una onda desviada de manera que cada transductor de la serie de transductores se asocie con un rango de fase predefinida de cada modulación periódica de dicha pluralidad de modulaciones periódica,
- 20 - se determina una pluralidad de desplazamientos de fase del medio, donde cada desplazamiento de fase de la pluralidad de desplazamientos de fase se determina respectivamente entre una modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física de la onda de retorno y una modulación periódica en el tiempo de al menos la característica física respectiva de la onda de excitación,
- 25 - y se determina una pluralidad de parámetros físicos de dicha región diana a partir de dicha pluralidad de desplazamientos de fase;
- 30 - dicha pluralidad de parámetros físicos de dicha región diana comprende al menos una información de posición y/o de orientación y/o de tiempo de vida de un emisor de luz presente en dicha región diana, en particular un fluoróforo.

La invención también tiene por objeto un sistema de medición de un parámetro físico de una región diana de un medio que comprende:

- 35 una fuente de onda de excitación capaz de emitir una onda de excitación en al menos una región diana de un medio, de modo tal que dicha onda presente, en el sitio de dicha región diana, una modulación periódica en el tiempo al menos una característica física con un período de tiempo predefinido, una serie de transductores, un elemento deflector controlable capaz de desviar periódicamente, en una onda desviada, una onda de retorno de dicha región diana emitida en respuesta a la onda de excitación,
- 40 de modo tal que dicha onda desviada escanea la serie de transductores en cada período de la modulación periódica, donde cada transductor de la serie de transductores está asociado con un rango de fase predefinida de dicha modulación periódica, donde un módulo de procesamiento comprende:
- una memoria capaz de registrar una imagen de fase que comprende las señales generadas por cada transductor de la serie de transductores, en respuesta a la onda desviada, durante al menos un período de la modulación periódica,
- 45 un procesador capaz de determinar, a partir de dicha imagen fase, un desplazamiento de fase de la onda de retorno procedente de dicha región diana con respecto a una fase de la modulación periódica de la onda de excitación, y de determinar un parámetro físico de dicha región diana a partir de dicho desplazamiento de fase.

En realizaciones preferidas de la invención, opcionalmente también se puede recurrir a una y/u otra de las siguientes disposiciones:

- 50 - el elemento deflector controlable es un espejo giratorio;

- el elemento deflector controlable es un sistema fijo que comprende al menos un elemento de control de polarización, en particular un elemento óptico con birrefringencia inducida, en particular con birrefringencia inducida por un campo eléctrico, un campo magnético o una tensión mecánica.

5 Otras características y ventajas de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción de una de sus realizaciones, dada a modo de ejemplo no limitativo, con referencia a los dibujos adjuntos.

En los dibujos:

- la Figura 1 es una vista esquemática de un sistema de medición de un parámetro físico de una región diana de un medio de acuerdo con una realización de la invención,

10 - la Figura 2 es un organigrama que ilustra una realización de un procedimiento de medición de un parámetro físico de una región diana de un medio de acuerdo con una realización de la invención.

- la Figura 3 es una vista esquemática de una variante de realización del sistema de la Figura 1.

En las diversas Figuras, las mismas referencias designan elementos idénticos o similares.

La Figura 1 ilustra un sistema 1 de medición de un parámetro físico de una región diana de un medio de acuerdo con una realización de la invención.

15 Según las realizaciones de la invención, las ondas mencionadas en la presente descripción pueden ser ondas ópticas, acústicas o electromagnéticas.

Las ondas ópticas son, por ejemplo, ondas que pertenecen a los dominios visible, infrarrojo y/o ultravioleta.

Las ondas electromagnéticas son, por ejemplo, ondas de radiofrecuencia u terahercios, por ejemplo, que presentan una frecuencia central comprendida entre unos pocos megahercios y unos pocos terahercios.

20 Las ondas acústicas pueden ser, por ejemplo, ondas ultrasónicas, por ejemplo, ondas que presentan una frecuencia central que puede estar comprendida entre 200 kHz y 100 Mhz, por ejemplo, entre 0,5 Mhz y 10 Mhz.

Todos los elementos del dispositivo 1 son adaptados y elegidos por los expertos en la técnica según el tipo y la frecuencia de las ondas en cuestión.

25 Así, por ejemplo, los elementos de emisión y recepción, las ventanas de transmisión, la cavidad reflectora y otros elementos reflectantes, el medio difusor y los difusores, las lentes y los elementos de enfoque y cualquier otro elemento utilizado en el dispositivo 1 de enfoque de pulso y el procedimiento de enfoque están adaptados, respectivamente, al tipo y a la frecuencia de las ondas y/o de los pulsos elegidos por un experto en la técnica.

El sistema 1 representado en la Figura 1 comprende una fuente 2 de ondas de excitación, una serie 3 de transductores, un elemento 4 deflector controlable y un módulo 5 de procesamiento.

30 El módulo 5 de procesamiento comprende, por ejemplo, un procesador y una memoria, y es capaz de controlar la fuente 2, la serie 3 de transductores y el elemento 4 deflector controlable.

El sistema 1 está destinado, por ejemplo, a realizar imágenes ópticas de superresolución de un fluoróforo F presente en una región diana R de un medio M.

35 Se entiende por "imagen óptica de superresolución", por ejemplo, que el sistema 1 es capaz de determinar una información de posición del fluoróforo F en la región diana R con una resolución mayor que el límite de difracción.

Por "información de posición del fluoróforo en la región diana", se entiende, por ejemplo, una información de posición relativa del fluoróforo en al menos una dirección espacial, por ejemplo, una cantidad Δx que indica una posición relativa del fluoróforo con respecto a un referencia de posición en una dirección espacial X.

La fuente 2 de onda de excitación puede emitir una onda de excitación en la región diana R.

40 La fuente 2 es capaz de emitir en particular dicha onda de excitación de tal manera que dicha onda presente, en el sitio de la región diana R, una modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física con un período de tiempo predefinido.

45 En una realización de la invención, las ondas, y en particular la onda de excitación, son ondas electromagnéticas y, en particular, ondas luminosas. La onda de excitación es, por ejemplo, una onda coherente que proviene de al menos un láser.

La región diana R puede ser de dimensiones variables. En una realización de la invención, la región diana R puede presentar, por ejemplo, dimensiones cercanas a las de un fluoróforo. En otras realizaciones de la invención, la región diana R puede cubrir un campo más importante.

5 Por “dicha onda presenta, en el sitio de la región diana, una modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física”, se entiende que, en cada punto P de la región diana R, dicha característica física de la onda de excitación se modula periódicamente en el tiempo. Las modulaciones de la característica física de la onda de excitación en cada punto P de la región diana R pueden estar en fase o pueden presentar desplazamientos de fases de modo que, por ejemplo, la onda de excitación también presente una periodicidad espacial.

Así, en una realización de la invención, para emitir la onda de excitación, la fuente 2 puede generar, por ejemplo, una onda espacialmente modulada en el medio y desplazar dicha onda espacialmente modulada en el medio con una velocidad predefinida, por ejemplo, una velocidad constante predefinida.

10 El período de tiempo predefinido se puede determinar a partir de la velocidad de movimiento y el período espacial de la onda electromagnética espacialmente modulada.

En un ejemplo de esta realización, la fuente 2 puede generar, por ejemplo, una onda electromagnética espacialmente modulada en el medio generando un patrón de interferencia entre dos rayos láser en el medio.

En este ejemplo de realización, la modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física es entonces una modulación periódica en el tiempo de la amplitud de la onda de excitación.

15 En otra realización, la modulación periódica de tiempo de al menos una característica física puede ser una modulación periódica de tiempo de la polarización de la onda de excitación. Para esto, la fuente 2 puede comprender, por ejemplo, un polarizador giratorio pivotante con una frecuencia de rotación correspondiente a dicho período de tiempo predefinido.

20 La fuente 2 puede comprender así, por ejemplo, uno o más láseres y, cuando sea apropiado, actuadores y/o componentes ópticos controlables que permitan dar forma a la onda de excitación y controlar la modulación periódica de la onda de excitación. Los componentes ópticos pueden comprender en particular medios para generar un patrón de interferencia a partir de dos haces de láser, tales como lentes y/o espejos en particular. Los actuadores pueden comprender en particular medios para mover un patrón de interferencia de este tipo en el medio con una velocidad predefinida, por ejemplo, espejos y/o lentes motorizados en traslación y/o rotación, o bien espejos deformables.

25 La serie 3 de transductores comprende una pluralidad de transductores 6, por ejemplo, alineados a lo largo de un eje o una dirección de la serie.

En variantes de realización, la serie 3 de transductores puede ser una matriz bidimensional de transductores 6.

30 En la realización en la que las ondas son ondas luminosas, los transductores 6 pueden ser, por ejemplo, fotodetectores. La serie 3 de transductores puede tomar la forma, por ejemplo, de una cámara, en particular una cámara CCD o CMOS.

Además, el sistema 1 comprende un elemento 4 deflector controlable que está adaptado para desviar periódicamente, en una onda desviada, una onda de retorno desde la región diana R, emitida en respuesta a la onda de excitación.

En una primera realización ilustrada en la Figura 1, el elemento 4 deflector controlable es, por ejemplo, un espejo giratorio. Un ejemplo de espejo giratorio es un espejo galvanométrico.

35 En una variante realización ilustrada en la Figura 3, el elemento 4 deflector controlable es un sistema 7 fijo.

Por “el elemento deflector controlable es un sistema fijo”, se entiende que el elemento deflector controlable no comprende partes en movimiento.

De esta manera, es posible desviar periódicamente la onda de retorno con frecuencias aún más altas que en el caso de un espejo giratorio, por ejemplo, con frecuencias de deflexión periódicas de hasta varios MHz.

40 En el ejemplo de realización ilustrado en la Figura 3, el sistema 7 fijo comprende un elemento 8 de control de polarización y elementos de separación del haz en función de la polarización 9.

El elemento 8 de control de polarización es un elemento óptico de birrefringencia inducida. En dicho elemento, la birrefringencia puede controlarse mediante una acción externa.

45 El elemento 8 de control de polarización puede ser un elemento de birrefringencia inducida por un campo eléctrico como una célula de Pockels o Kerr, un elemento de birrefringencia inducida por un campo magnético como un modulador magneto-óptico que utiliza el efecto Faraday, el efecto Cotton-Mouton o el efecto Kerr magneto-óptico, o bien un elemento de birrefringencia inducida por una tensión mecánica, por ejemplo, utilizando un cristal fotoelástico.

50 En la Figura 3, se muestran ejemplos de elementos de división del haz en función de la polarización 9 y comprenden dos cubos separadores. Estos cubos permiten que la onda de retorno se separe en varios haces polarizados con una pérdida mínima de fotones.

Por lo tanto, se entiende que una modulación de la polarización aplicada por el elemento 8 de control de polarización hace posible desviar el haz resultante sobre los transductores 6.

En general, una de las ventajas del procedimiento y sistema de acuerdo con la invención es permitir la recuperación, por los transductores de casi todos los fotones de la onda de retorno de la región diana R.

5 De esta manera, es posible observar fluoróforos únicos en la región diana R que tienen una vida útil muy limitada.

Las diversas realizaciones del elemento 4 deflector controlable detallado con anterioridad permiten una pérdida mínima de fotones durante la desviación periódica de la onda de retorno en una onda desviada.

10 El funcionamiento del sistema 1 se explicará ahora con más detalle con referencia adicional también a la Figura 2 que ilustra un procedimiento de medición de un parámetro físico de una región diana de acuerdo con una realización de la invención.

Durante una primera etapa del procedimiento de acuerdo con la invención, se emite una onda de excitación en al menos una región diana de un medio, de modo que dicha onda presente, en el sitio de dicha región diana, una modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física con un período de tiempo predefinido.

En respuesta a la onda de excitación, dicha región diana R emite una onda de retorno.

15 Ventajosamente, la onda de retorno también presenta además una modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física con el mismo período de tiempo predefinido. Sin embargo, la modulación periódica de la onda de retorno puede presentar un desplazamiento de fase con la modulación periódica de la onda de excitación como se detallará más adelante.

20 Si se considera, por ejemplo, la realización en la que la región diana comprende un fluoróforo y en la que la característica física de la onda de excitación modulada periódicamente, es la polarización de la onda de excitación. Si el fluoróforo se comporta como un emisor dipolar inmóvil, emitirá una onda de retorno cuya intensidad dependerá de la polarización de la onda de excitación recibida y de la orientación del fluoróforo.

25 Por lo tanto, la onda de retorno presentará una modulación periódica en el tiempo de su intensidad, con el período de tiempo predefinido. Esta modulación periódica también presentará un desplazamiento de fase con la modulación de la polarización de la onda incidente que será una función de la orientación del fluoróforo.

En esta realización, si es posible medir el desplazamiento de fase entre la modulación periódica de la onda de retorno y la modulación periódica de la onda de excitación, entonces es posible determinar una información de orientación del emisor de luz presente en la región diana R, es decir, el fluoróforo.

30 Ahora se considera otra realización en la que la región diana también incluye un fluoróforo pero en la que la característica física de la onda de excitación modulada periódicamente es la intensidad de la onda de excitación.

Más particularmente, se considera la realización en la que la onda de excitación es una onda espacialmente modulada, desplazada en el medio con una velocidad predefinida, por ejemplo, una velocidad constante.

35 Debido a la modulación periódica de la intensidad de la onda de excitación en el sitio del fluoróforo F en la región diana R, el fluoróforo F emite una onda de retorno cuya intensidad también se modula con el tiempo. Dado que la onda de excitación también está modulada espacialmente, el desplazamiento de fase entre la modulación periódica de la onda de retorno y la modulación periódica de la onda de excitación será función de la posición del fluoróforo F en la región diana R que modula la periodicidad espacial de la onda de excitación.

40 Por lo tanto, en esta realización, si es posible medir el desplazamiento de fase entre la modulación periódica de la onda de retorno y la modulación periódica de la onda de excitación, entonces es posible determinar información de posición del emisor de luz presente en la región diana R, es decir, el fluoróforo.

El procedimiento según la invención comprende, por lo tanto, etapas que permiten determinar dicho desplazamiento de fase con una precisión importante.

Para esto, el elemento 4 deflector controlable desvía periódicamente la onda de retorno de la región diana R, formando una onda desviada.

45 Esta desviación periódica es tal que dicha onda desviada escanea la serie 3 de transductores en cada período de la modulación periódica, es decir, con el período de tiempo predefinido aplicado a la onda de excitación por la fuente 2.

Cada transductor 6 de la serie 3 de transductores está asociado con un rango de fase predefinida de la modulación periódica de la onda de excitación.

50 A modo de ejemplo no limitativo, se considera una serie de cuatro transductores 6, yuxtapuestos entre sí y escaneados por la onda desviada en cada período de la modulación periódica. El primer transductor se asocia, por ejemplo, con un

5 rango de fase que varía de 0 grados a 90 grados de la modulación periódica, el segundo transductor se asocia, por ejemplo, con un rango de fase que varía de 90 grados a 180 grados de la modulación periódica, el tercer transductor se asocia, por ejemplo, con un rango de fase que va de 180 grados a 270 grados de la modulación periódica y el cuarto transductor se asocia, por ejemplo, con un rango de fase que va de 270 grados a 360 grados de la modulación periódica. Los cuatro transductores cubren un período completo de modulación periódica.

En particular, la onda desviada puede escanear completamente la serie 3 de transductores en cada período de la modulación periódica, o solo escanea un subconjunto de la serie 3 como se detallará en particular a continuación.

10 Entonces es posible registrar, durante al menos un período de la modulación periódica, una imagen de fase que comprende las señales generadas por cada transductor de la serie de transductores en respuesta a la onda desviada. Dicha imagen de fase se puede grabar en particular en una memoria del módulo 5 de procesamiento.

Ventajosamente, dicha imagen de fase se puede registrar durante una pluralidad de períodos de la modulación periódica, en particular si el período predefinido es menor que el tiempo de integración de los transductores.

15 En una realización, los transductores tienen, por ejemplo, un tiempo de integración de 50 milisegundos. El período predefinido de la modulación puede ser, por ejemplo, inferior a 5 milisegundos. La imagen de fase se puede grabar con una duración de adquisición correspondiente a al menos diez períodos de modulación de la onda de excitación.

Así, en una realización de la invención, los transductores presentan un tiempo de integración superior al período de tiempo predefinido, en particular superior a 5 veces el período de tiempo predefinido, preferiblemente superior a 10 veces el período de tiempo predefinido.

20 Como cada transductor 6 de la serie 3 de transductores está asociado con un rango de fase predefinida de la modulación periódica de la onda de excitación, por lo tanto, es posible determinar, a partir de la imagen de fase, un desplazamiento de fase entre la modulación periódica de la onda de retorno y la modulación periódica de la onda de excitación.

25 Para tomar un ejemplo, se puede considerar nuevamente el ejemplo no limitativo detallado con anterioridad, en el que la serie 3 comprende cuatro transductores 6, yuxtapuestos entre sí, y asociados respectivamente con rangos de fase de la modulación periódica de 0 a 90 grados, de 90 a 180 grados, de 180 a 270 grados y de 270 a 360 grados.

30 Se considera también, a modo de ejemplo, que una señal máxima medida en los cuatro transductores proviene del primer transductor, es decir, asociada con el rango de fase de 0 a 90 grados de la modulación de la onda de excitación. Si, además, el rango de fase de 0 a 90 grados de la modulación de la onda de excitación corresponde a un mínimo de dicha modulación, entonces se puede determinar que la modulación de la onda de retorno se invierte con respecto a la modulación de la onda de excitación, es decir, el desplazamiento de fase entre la modulación periódica de la onda de retorno y la modulación periódica de la onda de excitación es de 180 grados con un margen de error que depende del ancho de los rangos de fase asociado con cada transductor 6.

35 Este ejemplo, dado para cuatro transductores 6, obviamente se puede generalizar a un número arbitrario de transductores, cuanto más pequeños son los rangos de fase asociados con cada transductor, mayor es la precisión de la medición de desplazamiento de fase, pero menos recibe cada transductor de una parte de la onda de retorno, por ejemplo, fotones. Por lo tanto, existe un óptimo entre la relación señal/ruido de la señal proveniente de los transductores y la precisión de la determinación del desplazamiento de fase.

40 Sin embargo, una ventaja de la invención es garantizar una medición de la totalidad de la onda de retorno proveniente del medio (con las pérdidas relacionadas con la desviación por el elemento deflector cercano). Por lo tanto, en el caso de una onda luminosa, casi todos los fotones que provienen del medio son recibidos por la serie de transductores (a excepción de las pérdidas vinculadas a la reflexión por el espejo giratorio cercano). En la aplicación a fluoróforos, que emiten una cantidad baja de fotones antes de la autodestrucción, esto permite garantizar la medición de señales muy débiles.

45 Finalmente, en una última etapa del procedimiento, es posible determinar un parámetro físico de la región diana R a partir de dicho desplazamiento de fase como se detalló con anterioridad.

Así, por ejemplo, en la realización en la que la característica física de la onda de excitación modulada periódicamente es la polarización de la onda de excitación, se determina una información de orientación del emisor de luz presente en la región diana R como se detalló con anterioridad.

50 Así, de nuevo, en la realización en la que la característica física de la onda de excitación modulada periódicamente es la intensidad de la onda de excitación y en la que la onda de excitación es una onda modulada desplazada espacialmente en el medio con una velocidad predefinida, se determina una información de posición del emisor de luz presente en la región diana R como se detalló con anterioridad.

En una variante de realización, la onda de excitación se emite de manera que dicha onda presente, en el sitio de dicha región diana, una pluralidad de modulaciones periódica en el tiempo de al menos una característica física, con una

pluralidad de períodos de tiempo predefinidos, respectivamente, asociados con cada modulación periódica de dicha pluralidad de modulaciones periódica.

5 En esta realización, la onda de retorno puede desviarse periódicamente en una onda desviada de modo que cada transductor de la serie de transductores esté asociado con un rango de fase predefinida de cada modulación periódica de dicha pluralidad de modulaciones periódica.

Nuevamente, es posible registrar, durante un período que se extiende durante al menos un período de cada una de las modulaciones periódicas, una imagen de fase que comprende las señales generadas por cada transductor de la serie de transductores en respuesta a la onda desviada.

10 Luego se determina una pluralidad de desplazamientos de fase del medio, donde cada desplazamiento de fase de la pluralidad de desplazamientos de fase se determina respectivamente en relación con una fase de una modulación periódica respectiva de la pluralidad de modulaciones periódica.

Finalmente, se determina una pluralidad de parámetros físicos de dicha región diana a partir de dicha pluralidad de desplazamientos de fase de una manera similar a lo que se ha descrito con anterioridad.

15 De esta manera, por ejemplo, es posible determinar, por ejemplo, al mismo tiempo la información de posición de un emisor de luz en varias direcciones espaciales, por ejemplo X, Y, Z, o incluso la información de posición e información de orientación de dicho emisor de luz.

Se considera, finalmente, una realización de la invención en la que se implementa una microscopia óptica superresuelta de un campo de observación que comprende varios fluoróforos F.

20 En esta realización, se puede combinar ventajosamente una localización superresuelta de los fluoróforos con una localización normalmente resuelta, para obtener información de posicionamiento absoluto de los fluoróforos como se describirá ahora.

Para esto, el procedimiento de acuerdo con la invención puede implementarse, en primer lugar, para que los fluoróforos excitados simultáneamente por la onda de excitación estén separados entre sí en el campo de observación de una distancia mínima predefinida.

25 Una realización que hace posible obtener esto puede consistir en proporcionar un medio que comprenda una densidad suficientemente baja de fluoróforos.

En otra realización, la onda de excitación puede generarse de tal manera que excite solo una parte de los fluoróforos presentes en la región diana R, por ejemplo, por efecto estocástico.

30 Se conocen procedimientos que permiten obtener fluoróforos excitados simultáneamente que están separados entre sí en el campo de observación, por ejemplo, los procedimientos "PALM" o "STORM" mencionados con anterioridad.

Además, la serie 3 de transductores puede ser una matriz bidimensional de transductores 6 que se extienden sobre una longitud y una anchura predefinidas.

Por "longitud" y "anchura", se entienden dimensiones de la matriz respectivamente a lo largo de un eje longitudinal X y un eje transversal Y, perpendiculares entre sí.

35 El elemento deflector controlable puede controlarse para escanear la serie de transductores a lo largo del eje transversal Y en cada período de modulación periódica.

En particular, la onda desviada se puede desplazar sobre la serie de transductores, en cada exploración, por una distancia de exploración inferior al ancho de la serie de transductores, en particular inferior a una quinta parte del ancho de la serie de transductores.

40 Dicha distancia de exploración puede ser, en particular, menor que la distancia mínima predefinida que separa los fluoróforos excitados simultáneamente en el campo de observación.

De esta manera, los puntos focales formados por cada fluoróforo en la serie de transductores se separan entre sí.

Entonces es posible determinar una información de posición normalmente resuelta por la ubicación general de los puntos focales formados por cada fluoróforo en la serie de transductores.

45 También es posible determinar una información de posición superresuelta, modular la periodicidad espacial de la onda de excitación, por determinación de una diferencia de fase como se indicó con anterioridad.

Al combinar la información de posición normalmente resuelta y la información de posición superresuelta, es posible obtener una información de posicionamiento absoluto de los fluoróforos en el campo de observación con una precisión mayor que el límite de difracción.

La realización detallada con anterioridad hace posible obtener una información de posicionamiento absoluto de los fluoróforos en la dirección transversal.

5 Esta realización puede extenderse al caso en el que la onda de excitación comprende una pluralidad de modulaciones, como se detalló con anterioridad. Entonces es posible obtener información sobre el posicionamiento absoluto de los fluoróforos en la dirección transversal, la dirección longitudinal e incluso, cuando sea apropiado, la dirección del grosor, perpendicular a las direcciones transversal y longitudinal, o incluso la orientación de los fluoróforos.

En general, las diversas realizaciones descritas con anterioridad pueden combinarse entre sí.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de medición de un parámetro físico de una región diana de un medio, en el que:

- se emite una onda de excitación en al menos una región diana de un medio, de modo tal que dicha onda presente, en el sitio de dicha región diana, una modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física con un período de tiempo predefinido,
- se recibe una onda de retorno desde dicha región diana, emitida en respuesta a la onda de excitación,

caracterizado porque:

- se desvía dicha onda de retorno periódicamente en una onda desviada, por medio de un elemento (4) deflector controlable, de modo que dicha onda desviada escanea una serie (3) de transductores en cada período de la modulación periódica, donde cada transductor (6) de la serie (3) de transductores se asocia con un rango de fase predefinida de dicha modulación periódica,
- se registra una imagen de fase que comprende señales generadas por cada transductor (6) de la serie (3) de transductores, en respuesta a la onda desviada, durante al menos un período de la modulación periódica,
- se determina, a partir de dicha imagen de fase, un desplazamiento de fase entre una modulación periódica en el tiempo de al menos la característica física de la onda de retorno y la modulación periódica en el tiempo de al menos la característica física de la onda de excitación,
- se determina un parámetro físico de dicha región diana a partir de dicho desplazamiento de fase.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las ondas son ondas electromagnéticas, en particular ondas luminosas.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los transductores (6) son fotodetectores, en particular una cámara.

4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física es una modulación periódica en el tiempo de la polarización de la onda de excitación y en el que el parámetro físico de dicha región diana es una información de orientación de un emisor de luz presente en dicha región diana, en particular un fluoróforo.

5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física es una modulación periódica en el tiempo de la amplitud de la onda de excitación y en el que el parámetro físico de dicha región diana es una información de tiempo de vida o información de posición de un emisor de luz presente en dicha región diana, en particular un fluoróforo.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que, para emitir la onda de excitación, se genera una onda espacialmente modulada en el medio y se desplaza dicha onda espacialmente modulada en el medio, en particular con una velocidad predefinida constante, en particular en el que se genera una onda electromagnética espacialmente modulada en el medio al generar un patrón de interferencia entre dos rayos láser en el medio.

7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,

en el que se emite dicha onda de excitación, de modo tal que dicha onda presente, en el sitio de dicha región diana, una pluralidad de modulaciones periódica en el tiempo de al menos una característica física, con una pluralidad de períodos de tiempo predefinidos, respectivamente, asociados con cada modulación periódica de dicha pluralidad de modulaciones periódica,

en donde se desvía la onda de retorno periódicamente en una onda desviada de manera que cada transductor (6) de la serie (3) de transductores esté asociado con un rango de fase predefinida de cada modulación periódica de dicha pluralidad de modulaciones periódica,

en donde se determina una pluralidad de desplazamientos de fase del medio, donde cada desplazamiento de fase de la pluralidad de desplazamientos de fase se determina respectivamente entre una modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física de la onda de retorno y una modulación periódica en el tiempo de al menos las características físicas respectivas de la onda de excitación,

y en el que se determina una pluralidad de parámetros físicos de dicha región diana a partir de dicha pluralidad de desplazamientos de fase.

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha pluralidad de parámetros físicos de dicha región diana comprende al menos una información de posición y/o de orientación y/o de tiempo de vida de un emisor de luz presente en dicha región diana, en particular un fluoróforo.

9. Sistema (1) de medición de un parámetro físico de una región diana de un medio que comprende:

- una fuente (2) de onda de excitación capaz de emitir una onda de excitación en al menos una región diana de un medio, de modo que dicha onda presente, en el sitio de dicha región diana, una modulación periódica en el tiempo de al menos una característica física con un período de tiempo predefinido,

5 - una serie (3) de transductores,

caracterizado porque comprende, además:

- un elemento (4) deflector controlable capaz de desviar periódicamente, en una onda desviada, una onda de retorno de dicha región diana emitida en respuesta a la onda de excitación,

10 de modo que dicha onda desviada escanee la serie (3) de transductores en cada período de la modulación periódica, donde cada transductor (6) de la serie (3) de transductores está asociado con un rango de fase predefinida de dicha modulación periódica,

- donde un módulo (5) de procesamiento comprende:

15 una memoria capaz de grabar una imagen de fase que comprende las señales generadas por cada transductor (6) de la serie (3) de transductores, en respuesta a la onda desviada, durante al menos un período de la modulación periódica,

un procesador capaz de determinar, a partir de dicha imagen de fase, un desplazamiento de fase de la onda de retorno procedente de dicha región diana con respecto a una fase de la modulación periódica de la onda de excitación, y de determinar un parámetro físico de dicha región diana a partir de dicho desplazamiento de fase.

20 10. Sistema (1) de medición de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el elemento (4) deflector controlable es un espejo giratorio.

11. Sistema (1) de medición de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el elemento (4) deflector controlable es un sistema (7) fijo que comprende al menos un elemento (8) de control de polarización, en particular un elemento óptico con birrefringencia inducida, en particular con la birrefringencia inducida por un campo eléctrico, un campo magnético o una tensión mecánica.

25

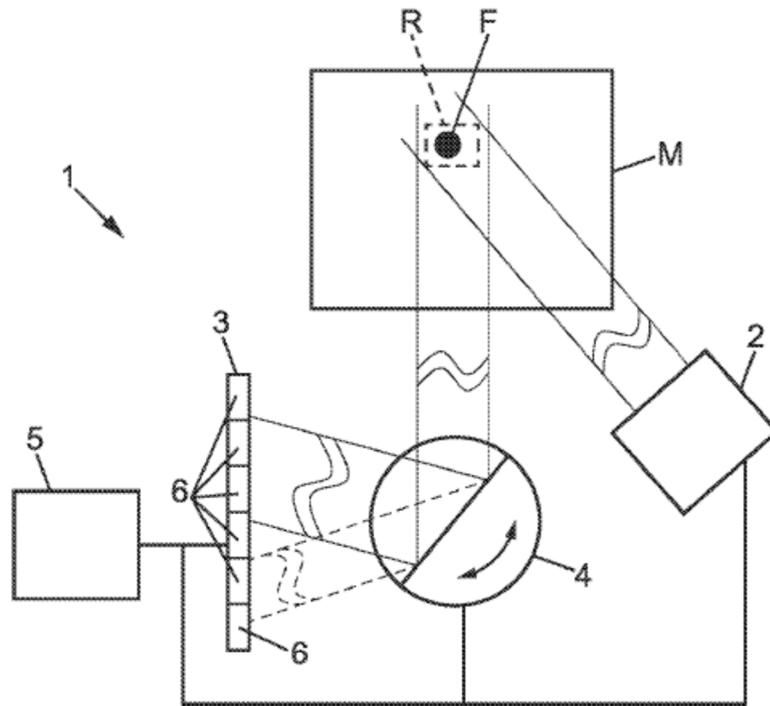


FIG. 1

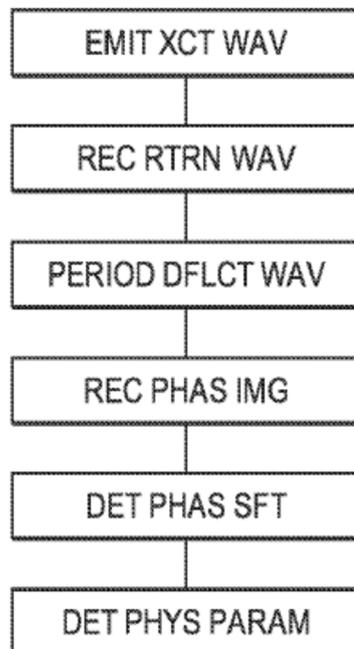


FIG. 2

