

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 128**

51 Int. Cl.:

G01N 21/65 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2014 PCT/EP2014/055987**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154708**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2014 E 14718523 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2979080**

54 Título: **Dispositivo y método para la detección Raman estimulada**

30 Prioridad:

26.03.2013 FR 1300694

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (50.0%)
58 boulevard Charles Livon
13007 Marseille , FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (ETABLISSEMENT PUBLIC)
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BERTO, PASCAL;
ANDRESEN, ESBEŃ y
RIGNEAULT, HERVÉ**

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP, .

ES 2 628 128 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

Dispositivo y método para la detección Raman estimulada

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un dispositivo y un método para detectar una señal óptica resonante, no lineal, del tipo de dispersión o difusión Raman estimulada (SRS) en una muestra. Se aplica en particular a la formación de imágenes microscópicas, espectroscopía y la formación de imágenes hiperespectrales en dispersión medios de difusión tales como los medios biológicos.

Estado de la técnica

10 Todos los enlaces químicos tienen frecuencias de vibración que les son inherentes. Se llaman técnicas ópticas de vibración de los métodos que tienen como objetivo utilizar la interacción luz/materia para obtener informaciones sobre estas vibraciones moleculares. La más conocida de estas técnicas es la espectroscopía de infrarrojos (IR) para observar las líneas de absorción específicas de los enlaces químicos presentes en una muestra. Descubierta en 1928, la difusión Raman (por el nombre del físico Chandrasekhara Venkata Raman, que descubrió el efecto) hace que sea posible el uso de luz visible para acceder al espectro de vibración de moléculas que interactúan con un haz de luz. En un proceso de dispersión Raman, una bomba ω_P ondas de impulso incidente en una molécula es inelásticamente dispersada en una denominada onda de Stokes de impulso ω_S y una denominada onda anti-Stokes de impulso ω_{AS} . La diferencia de frecuencias entre las ondas generadas y la longitud de onda de la bomba depende de la transición Raman molecular (de impulso Ω_R) de tal forma que $\omega_P - \omega_S = \omega_{AS} - \omega_P = \Omega_R$. En una vista fotónica del proceso, las ondas Stokes y anti-Stokes corresponden a una absorción a partir respectivamente del nivel de vibración fundamental o excitado. El proceso de generación de la onda anti-Stokes, a partir del nivel de vibración excitado, es mucho menos probable que el proceso de creación de la onda de Stokes, que es la única observada en la práctica en la espectroscopía Raman espontánea. Un estudio detallado de la distribución espectral de las ondas Stokes informa sobre las densidades de los enlaces químicos presentes en la muestra. Este proceso espontáneo de dispersión inelástica es muy poco eficiente en comparación con la fluorescencia (las secciones eficaces Raman son del orden de 10^{-30} cm² / molécula, en comparación con la sección eficaz de absorción a un fotón de un fluoróforo, que alcanza 10^{-16} cm² / molécula).

15 Las técnicas estimuladas de Raman, CARS (por Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) y SRS (por Stimulated Raman Scattering) son procesos de dispersión Raman coherente que ofrecen, con respecto al proceso de dispersión Raman espontánea, una ganancia de alrededor de 10^7 . En estas técnicas (véase la Figura 1A), dos impulsos de láser de pulsaciones ω_p y ω_s (o de frecuencias ν_p y ν_s), cuya diferencia de pulsaciones se hace igual a la pulsación Ω_R del nivel vibratorio que se quiere abordar, son enviados al medio que se ha de analizar. Estos impulsos, denotados respectivamente bomba y Stokes, crean un batido de frecuencia que hace posible entrar en resonancia el modo de vibración de pulsación Ω_R . En el proceso CARS, esta resonancia es sondeada por el haz bomba que induce la dispersión anti-Stokes en la pulsación ω_{AS} . La dispersión Raman estimulada (SRS) es un proceso que resulta de la excitación de la respuesta no lineal debida a la interacción del campo no lineal inducida por los campos bomba y Stokes con el campo de excitación (bomba) y por lo tanto se observa, a diferencia del proceso CARS, a las mismas frecuencias que los impulsos bomba y Stokes. Esto se traduce en una transferencia de energía desde el haz bomba hacia el haz Stokes. Por lo tanto, la dispersión Raman estimulada cubre ambos procesos, el proceso de RLS (por Stimulated Raman Loss) y proceso de SRG (por Stimulated Raman Gain) que inducen respectivamente una pérdida de intensidad ΔI_{SRL} en el haz bomba y una ganancia de intensidad ΔI_{SIG} en el haz de Stokes (véase la Figura 1B). El proceso de SRS se describe por ejemplo en el artículo de la revista de N. Bloembergen ("El efecto Raman estimulado," American Journal of Physics, 35:989-1023, 1967). Se muestra que el agotamiento de intensidad ΔI_{SRL} del haz bomba y la ganancia en intensidad ΔI_{SRG} del haz de Stokes son proporcionales a la parte imaginaria de la susceptibilidad no lineal de orden 3 ($\text{Im}(\chi_R^{(3)})$). La medición de estas cantidades permite remontar rigurosamente hasta el espectro Raman. Recientemente, las técnicas ópticas de vibración están más concentradas en las tecnologías SRS que, a diferencia de las técnicas CARS, no están sujetas a un fondo no resonante siempre presente en CARS y son lineales con la concentración de las especies químicas.

20 La microscopía SRS es una nueva técnica que ha aprovechado los últimos avances en el campo de la espectroscopía SRS en régimen femtosegundo. En el año 2007, Ploetz et al. ("Femtosecond Stimulated Raman Microscopy", Applied Physics B, 87(3):389-393, 2007), desarrollaron el primer microscopio SRS sobre la base de un sistema de láser amplificado que suministra impulsos de femtosegundo y picosegundo. Este tipo de sistema induce una fuerte señal de SRS, pero sin embargo no está adaptado para la formación de imágenes biológicas. En efecto, los fuertes picos de potencia implicados (del orden del nJ) dañan las muestras, y las tasas de repetición bajas (1 kHz) son incompatibles con la microscopía de barrido rápido.

25 Por lo tanto, se ha propuesto (véanse, por ejemplo los artículos de C. W. Freudiger et al. : « Label-free biomedical imaging with high sensivity by stimulated Raman scattering microscopy » ("Formación de mágenes biomédicas sin etiquetas con alta sensibilidad por microscopía de dispersión Raman estimulada", Science, 322(5909): 1857-1861, 2008, P. Nandakumar et al. : « Vibrational imaging based on stimulated raman scattering microscopy» ("Formación vibracional de imagen basada en microscopía de dispersión Raman estimulada", New Journal of Physics,

11(3):033026 (9pp), 2009, Y. Ozeki et al. : «Analysis and experimental assessment of the sensitivity of stimulated Raman scattering microscopy» ("Análisis y evaluación experimental de la sensibilidad de la microscopía de dispersión de Raman estimulada"), Optics Express, 17(5):3651 a 3658, marzo de 2009, un microscopio SRS basado en el uso de un sistema láser de picosegundos con alta tasa de repetición (80 MHz), compatible con la formación de imágenes de muestras biológicas. En microscopía CARS, la señal útil, es decir la señal anti-Stokes, se genera a una frecuencia diferente de los haces excitadores. Esto puede ser detectado por detectores altamente sensibles, tales como fotodiodos de avalancha o tubos fotomultiplicadores. En microscopía SRS, la problemática de detección es diferente, ya que la señal útil se genera en la misma frecuencia que los haces de excitación. Se trata entonces de detectar la pérdida de energía del haz de bomba ΔI_{SRL} o, indiferentemente, la ganancia de energía del haz de Stokes ΔI_{SRG} . En la práctica, la pérdida de energía del haz de la bomba es del orden de $\Delta I_{SRL}/I_p \approx 10^{-5} - 10^{-8}$. En los artículos mencionados anteriormente, se propone modular la señal de Stokes a una frecuencia f_m y extraer la pérdida de la señal de bomba a la frecuencia f_m por una detección síncrona para ganar en sensibilidad de detección.

La Figura 2 muestra así un diagrama de un microscopio de SRS de acuerdo con la técnica anterior en configuración SRG, es decir, en una configuración adecuada para la extracción de la ganancia del haz de Stokes. Trenes de impulsos bomba y Stokes, referenciados 102, 104 en la Figura 2, respectivamente a los impulsos ω_p y ω_s , se envían sobre una muestra S colocada en el foco de un objetivo de microscopio 122 dispuesto en el cuerpo de un microscopio 120. Los impulsos ω_p y ω_s se eligen de manera que la diferencia de los impulsos sea igual a una pulsación Ω_R del nivel vibratorio que se quiere abordar en la muestra. Los trenes de impulsos bomba y Stokes se superponen espacialmente por medio de un combinador 114, y una línea de retardo ajustable (no mostrada) está prevista para asegurar la superposición temporal de los impulsos de la muestra. El tren de impulsos bomba 102 es modulado en amplitud a la frecuencia de modulación f_m por medio de un dispositivo de modulación 112 para formar un tren de impulsos modulado 106. Para reducir el ruido electrónico y el ruido del láser, la frecuencia de modulación se elige para que sea mayor que 1 MHz. En la Figura 2, las curvas 101 y 103 por lo tanto representan, respectivamente, la variación en el tiempo de las intensidades de luz I_p e I_s de los trenes de impulsos bomba modulado 106 y Stokes 104 (no modulado). Un objetivo colector 124 se utiliza para recoger las señales ópticas que resultan de la interacción de los impulsos bomba y Stokes en la muestra. En la configuración elegida, un filtro 126 permite seleccionar el tren de impulsos 108 a la pulsación ω_s que se envía a continuación a un detector óptico 128, por ejemplo un fotodiodo. La intensidad óptica medida en función del tiempo está representada esquemáticamente en la curva 107. Una detección síncrona 130 a la frecuencia de modulación f_m permite extraer la señal buscada ΔI_{SRG} , característica de la vibración molecular en la pulsación Ω_R . Una exploración de los haces excitadores 104, 106 en la muestra, por ejemplo por medio de un sistema de exploración o barrido 116 que comprende dos espejos galvanométricos, permite a continuación hacer una imagen de la zona de interés de la muestra.

La microscopía SRS está sin embargo sujeta a un cierto número de aberraciones que limitan la especificidad química porque introducen señales que pueden ser interpretadas como la señal SRS. En particular, la microscopía de SRS es sensible al efecto Kerr cruzado (o XPM, por "Cross Phase de Modulation"), no específico de los enlaces químicos objetivo y que aparece como un desplazamiento positivo o negativo en la señal SRS. La microscopía SRS también es sensible a la absorción de dos fotones cruzados (o TPA, por "Two Photons Absorption") que aparece como una desviación positiva (en configuración SRL) o negativa (configuración GIS) en la señal SRS.

La absorción de dos fotones cruzados es un proceso instantáneo no lineal que induce (en configuración SRG tal como se muestra en la Figura 2) un agotamiento del haz de Stokes sólo cuando el haz bomba está presente. Las modulaciones inducidas en el haz de Stokes son así detectadas e interpretadas como la señal SRS. En un modo SRG de detección, el agotamiento del haz de Stokes por TPA aparece como un desplazamiento negativo con respecto a la medición de la ganancia de RGS. En un modo SRL de detección, el agotamiento del haz bomba por TPA aparece como un desplazamiento positivo frente a la medida de pérdida SRL.

El efecto Kerr óptico es un proceso no lineal (instantáneo), que induce un cambio en el índice de refracción proporcional a la intensidad de la onda que lo genera y se traduce en un efecto de lente que causa el enfoque o desenfoque de haz que lo genera. En microscopía SRS, el efecto Kerr, que pone en juego únicamente la bomba, o sólo fotones Stokes, no es molesto. En efecto, por ejemplo en la configuración SRG (como se muestra en la Figura 2), el efecto Kerr, que pone en juego únicamente fotones bomba, induce una variación que no se percibe más que por el haz bomba; o no se detecta este último, por lo que su enfoque no influye en la medición. El efecto Kerr que implica sólo fotones Stokes induce una variación que no es percibida por el haz de Stokes; al no estar este modulado, el enfoque y el cambio de energía inducida en el detector son constantes en el tiempo y por lo tanto no influyen en la medida de SRS a la frecuencia de modulación f_m . Por contra, en la configuración de SRG por ejemplo, se observa una variación del índice de refracción a la pulsación ω_s del haz de Stokes, inducida por el haz bomba ω_p ; es el efecto Kerr cruzado el que provoca en este caso el enfoque o el desenfoque del haz de Stokes con la misma modulación que la de la señal SRS medida. Esto se traduce en un desplazamiento de la medición. Para reducir la influencia del efecto Kerr cruzado, es importante no introducir diafragma durante la recogida del haz de medición (bomba en SRL, Stokes en SRG) después de su interacción con la muestra. Para esto, se conoce el uso de un objetivo colector cuya apertura numérica es mayor que la del objetivo de excitación.

Puestos en práctica en los medios de dispersión, especialmente los tejidos biológicos, estas aberraciones son exaltadas y gravan el uso de la microscopía SRS para realizar un seguimiento de los enlaces vibracionales con

secciones eficaces Raman débiles. En efecto, incluso en el caso de la utilización de una lente objetivo colectora con una abertura numérica mayor que la de la lente objetivo de excitación, la difusión conducirá a una diafragmación por la lente objetivo de recogida que va a exacerbar la influencia de las aberraciones, particularmente el efecto Kerr cruzado.

5 Las figuras 3B y 3D ilustran los espectros obtenidos por micro-espectroscopia CARS, SRS y Raman en las diferentes regiones espectrales, en un tejido formado de piel humana cuyo espectro Raman se muestra en la Figura 3A. El espectro que se muestra en la Figura 3A, tomado del artículo de Huang et al. (Optics Express, 19, 23 (2011)) destaca tres regiones espectrales de interés para la formación de imágenes Raman. Una región llamada de los "lípidos y proteínas", correspondiente a impulsos entre 2750 cm^{-1} y 3050 cm^{-1} y que tiene vibraciones moleculares de alta intensidad, una región denominada de las "amidas", correspondiente a impulsos entre 1350 cm^{-1} y 1750 cm^{-1} y una región llamada de las "huellas dactilares", correspondiente a impulsos entre 850 cm^{-1} y 1150 cm^{-1} . Las figuras 3B a 3D representan respectivamente medidas de espectros realizadas por micro-espectroscopia CARS, SRS y Raman en cada una de estas regiones. En las regiones donde la intensidad de las vibraciones moleculares es alta (Figura 3B), se verifica una buena adecuación de la medición SRS 203 con el espectro Raman 201, mientras que la medición CARS 202 tiene un desplazamiento vinculado al fondo continuo no resonante. El efecto del fondo continuo no resonante sobre la medición CARS es también visible en las otras dos regiones (curvas 212 y 222 de las Figuras 3C y 3D). Por otra parte, se observó la aparición de un desplazamiento (fondo continuo) en la medición SRS en las regiones en las que la intensidad de las vibraciones moleculares es menor. Por lo tanto, las curvas resultantes de las medidas de SRS (213 y 223 en las figuras 3C y 3D) se solapan más con los espectros Raman (211 y 221). Estas curvas experimentales ilustran la influencia de las aberraciones en la medición SRS, particularmente en las regiones donde la intensidad de las vibraciones moleculares es baja.

25 La solicitud de patente EP2211219 da a conocer la detección de una señal de Dispersión Raman Estimulada, en la que la muestra se ilumina con fases alternas por medio de trenes de impulsos que excitan, respectivamente, una molécula diana y una molécula de interferencia. La señal de la molécula de interferencia puede de este modo ser eliminada por sustracción.

30 La presente invención propone un método original de detección de una señal óptica no lineal, resonante, de tipo SRS, inducida en una muestra, lo que permite incrementar la señal útil buscada SRS y suprimir las aberraciones, particularmente las que resultan del efecto Kerr cruzado, incluidas en las muestras formadas de medios biológicos dispersantes.

35 Compendio de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un dispositivo para la detección de una señal óptica no lineal, resonante, del tipo de Dispersión Raman Estimulada (SRS), inducida en una muestra. El dispositivo comprende:

- 40 • medios electro-ópticos para hacer interactuar en la muestra, a una primera frecuencia de modulación, trenes de impulsos luminosos de pulsaciones ω_1 y ω_2 y, a una segunda frecuencia de modulación, trenes de impulsos luminosos de pulsaciones ω_2 y ω_3 , tales que $\omega_2 - \omega_1 = \omega_3 - \omega_2 = \Omega_R$, donde Ω_R es una pulsación (o frecuencia angular) de resonancia vibracional molecular de la muestra,
- medios de detección síncrona a las primera y segunda frecuencias de modulación de las señales ópticas no lineales que resultan de la interacción de los impulsos de luz en la muestra,
- 45 • medios de tratamiento electrónico que permiten, a partir de señales electrónicas resultantes de la detección síncrona, obtener una señal característica de la resonancia vibracional molecular de la muestra.

50 Por tanto, este nuevo dispositivo pone en práctica tres haces excitadores, en tres longitudes de onda predeterminadas, cuyas interacciones de dos en dos en la muestra a las primera y segunda frecuencias de modulación permiten generar a la vez un proceso de SRL y un proceso de SRG, sirviendo el haz de longitud de onda intermedia alternativamente como haz bomba o como haz de Stokes en cada proceso. Las frecuencias de modulación pueden ser idénticas o diferentes, de acuerdo con realizaciones alternativas. En ambos casos, una detección síncrona a la o a las frecuencias de modulación en las señales ópticas no lineales resultantes de las interacciones en los dos procesos, permite eliminar las aberraciones y duplicar la señal útil SRS.

60 Los medios para hacer interactuar en la muestra los trenes de impulsos comprenden ventajosamente medios para enfocar los trenes de impulsos en un volumen de enfoque común, que permiten obtener suficientes densidades de energía en la muestra para generar los efectos ópticos no lineales.

El dispositivo descrito puede estar, al menos parcialmente, provisto de fibras. La solicitante ha demostrado que el método de detección puesto en práctica también permitió liberarse de las aberraciones debidas a los efectos no lineales generados en la fibra.

65 Una aplicación de tal dispositivo es la formación de imágenes vibracional Raman, y en particular de imágenes

microscópicas. El dispositivo puede comprender entonces medios para el desplazamiento relativo de este volumen de enfoque en la muestra para llevar a cabo formación de imágenes.

5 Otra aplicación del dispositivo descrito es la espectroscopia Raman. El dispositivo puede comprender por ejemplo medios para variar las pulsaciones ω_1 y ω_3 de los trenes de impulsos que interactúan en la muestra, permitiendo hacer variar la pulsación de resonancia vibracional molecular Ω_R de la muestra que se desea estudiar.

Una aplicación del dispositivo descrito es el de formación de imágenes hiperespectrales Raman, que permite la realización de imágenes SRS de la muestra a diferentes pulsaciones de resonancia vibracional molecular Ω .

10 En la formación de imágenes o en la espectroscopia, los medios de detección síncrona comprenden medios de detección ópticos señales ópticas no lineales que resultan de la interacción de los trenes de impulsos en la muestra, pudiendo la detección óptica realizarse en un modo de detección antes (o "forward") en un modo de detección posterior (o "epi") o en un modo de detección endoscópica, en particular para el estudio de las vibraciones moleculares en capas profundas de una muestra biológica.

15 Según una primera variante del dispositivo descrito, una modulación de amplitud se realiza en al menos uno de los trenes de impulsos.

20 En un primer ejemplo de realización, los medios electro-ópticos comprenden una fuente de emisión de trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 , y medios para la modulación en amplitud de los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 , respectivamente a las primera y segunda frecuencias de modulación.

25 Por ejemplo, los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 son modulados en amplitud a la misma frecuencia de modulación, pero en oposición de fase. En este caso, los trenes de impulsos luminosos de pulsaciones ω_1 y ω_2 , por una parte, y los trenes de impulsos luminosos de pulsaciones ω_2 y ω_3 , por otra parte, interactúan de una manera alterna en la muestra a la frecuencia de modulación. Los medios de detección síncrona comprenden por ejemplo un detector óptico de impulsos procedentes de la muestra a la pulsación ω_2 y una detección síncrona, analógica o digital, de la señal eléctrica procedente del detector óptico a la frecuencia de modulación. La señal procedente de la detección síncrona es característica de la resonancia vibracional molecular de la muestra. Los medios de tratamiento electrónicos utilizados permiten extraer esta señal para su explotación.

30 Alternativamente, trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 están modulados en amplitud a dos frecuencias de modulación distintas no múltiplos una de otra. En este caso, una detección sincrónica de los impulsos procedentes de la muestra a la pulsación ω_2 se lleva a cabo a cada una de las frecuencias de modulación. Las señales procedentes de la detección síncrona se procesan para extraer la señal característica de la resonancia vibracional molecular de la muestra.

35 En un segundo ejemplo de forma de realización, las primera y segunda frecuencias de modulación son idénticas, y los medios electro-ópticos comprenden una fuente de emisión de trenes de impulsos a las pulsaciones de emisión ω_1 , ω_2 y ω_3 , y medios para la modulación en amplitud del tren de impulsos a la pulsación ω_2 a la frecuencia de modulación. En este caso, una detección síncrona a la frecuencia de modulación se lleva a cabo por impulsos procedentes de la muestra a la pulsación ω_1 , por una parte, y los impulsos procedentes de la muestra a la pulsación ω_3 , por otra parte. Las señales procedentes de cada una de las detecciones sincronas se procesan para extraer la señal característica de la resonancia vibracional molecular de la muestra.

40 De acuerdo con una segunda variante del dispositivo descrito, una línea de retardo se inserta en la trayectoria de al menos uno de los trenes de impulsos y se realiza una modulación del retardo de tiempo entre los trenes de impulsos.

45 Más precisamente, las primera y segunda frecuencias de modulación son idénticas, los medios electro-ópticos pueden comprender una fuente de emisión de trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 y al menos una línea de retardo que permite generar entre los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 y los trenes de impulsos a la pulsación ω_2 , un retardo de tiempo modulado a la frecuencia de modulación. En este caso, como en el caso de los trenes de impulsos modulados en amplitud en oposición de fase, los trenes de impulsos luminosos de pulsaciones ω_1 y ω_2 , por una parte, y los trenes de impulsos luminosos de pulsaciones ω_2 y ω_3 , por otra parte, interactúan en la muestra de una manera alterna a la frecuencia de modulación.

50 Ya sea en la primera variante (modulación de amplitud) o en la segunda variante (modulación del retardo de tiempo), los impulsos pueden ser, por ejemplo impulsos de picosegundos finos espectralmente de pulsaciones centradas en las pulsaciones ω_1 y ω_2 y ω_3 , o, según una variante impulsos en deriva de frecuencia ("derivados") de pulsaciones centradas en las pulsaciones ω_1 y ω_2 y ω_3 .

55 En el caso de impulsos de picosegundos, los trenes de impulsos son emitidos, por ejemplo, por una fuente de láser de picosegundos que comprende un láser maestro emisor de los trenes de impulsos de pulsación ω_2 y un láser OPO emisor de los trenes de impulsos de pulsación ω_1 (Idler) y ω_3 (Signal).

En el caso de impulsos con deriva de frecuencia, los trenes de impulsos son obtenidos, por ejemplo, por una fuente de láser de femtosegundo que comprende un láser maestro y un OPO, siendo extendidos los impulsos por un alargador temporal.

5 En el caso de impulsos con deriva de frecuencia, la fuente de emisión puede comprender además una línea de retardo que permita generar la misma diferencia de tiempo entre los impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_2 , por una parte, y los impulsos a las pulsaciones ω_2 y ω_3 , por otra parte, permitiendo la variación del desplazamiento de tiempo sondear las frecuencias de resonancia de vibración molecular de la muestra.

10 En la segunda variante del dispositivo descrito (la modulación del retardo de tiempo), la fuente de emisión puede comprender un generador de trenes de impulsos con deriva de frecuencia centrados en la pulsación ω_2 , una lámina separadora dicróica que permite separar, por una parte, los impulsos centrados en la pulsación ω_2 y, por otra parte, los impulsos centrados respectivamente en las pulsaciones ω_1 y ω_3 . Un retardo de tiempo modulado con la frecuencia de modulación puede introducirse entonces, como se ha descrito anteriormente, entre los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 y los trenes de impulsos a la pulsación ω_2 .

15 De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para detectar una señal óptica no lineal, resonante, del tipo de Dispersión Raman Estimulada (SRS), inducida en una muestra, llevado a cabo por el dispositivo descrito en el primer aspecto y el conjunto de sus variantes o ejemplos de realización.

Breve descripción de los dibujos

25 Otras ventajas y características de la invención aparecerán con la lectura de la descripción, ilustrada por las figuras siguientes:

Las figuras 1A y 1B (ya descritas), muestran el principio de dispersión Raman estimulada (SRS);

La figura 2 (ya descrita), es un esquema de un microscopio de SRS de acuerdo con la técnica anterior;

30 Las figuras 3A a 3D (ya descritas), muestran un ejemplo de espectro Raman de una muestra de tejido humano (piel) y mediciones comparativas de los espectros obtenidos por micro-espectroscopia CARS, y Raman SRS de acuerdo con la técnica anterior, en tres regiones espectrales de interés ;

Figura 4 es un ejemplo de realización de un dispositivo de detección de SRS de acuerdo con un primer ejemplo de una primera variante de la presente invención (modulación de amplitud);

35 Las figuras 5A a 5C, son una ilustración esquemática de las interacciones en la muestra, de acuerdo con la primera variante;

La figura 6 es una tabla que ilustra las señales detectadas (señales SRS y aberraciones) en la implementación ejemplar del dispositivo mostrado en la Figura 4;

40 Las figuras 7A a 7D son diagramas que ilustran variaciones del dispositivo mostrado en la figura 4, respectivamente en modos de detección delantero, trasero, delantero con fibras y según el modo de detección endoscópica.

Las figuras 8A a 8C son diagramas que muestran segundos resultados experimentales obtenidos con una muestra difusora, utilizando un dispositivo tal como el mostrado en la Figura 4;

Las figuras 9A a 9F son diagramas que muestran segundos resultados experimentales obtenidos con una muestra de dispersión, utilizando un dispositivo tal como el mostrado en la Figura 4;

45 Las figuras 10A a 10C son diagramas que muestran terceros resultados experimentales obtenidos con una muestra formada de un tejido biológico, utilizando un dispositivo tal como el mostrado en la Figura 4;

Las figuras 11A y 11B, son otros dos ejemplos de dispositivo que ilustran variantes de la presente invención;

50 Las figuras 12A y 12B, muestran tablas que ilustran las señales detectadas (señales SRS y aberraciones) en los ejemplos de implementación de los dispositivos descritos, respectivamente, en las figuras 11A y 11B;

La figura 13 es un ejemplo de realización de un dispositivo de detección SRS de acuerdo con otra variante de la presente invención (modulación del retardo de tiempo);

Las figuras 14A-14C, son una ilustración esquemática de las interacciones en la muestra, de acuerdo con la variante representada en la Figura 13;

La figura 15 es una tabla que ilustra las señales detectadas (señales SRS y aberraciones) en el ejemplo de la aplicación del dispositivo descrito en la Figura 13;

Las Figuras 16A, 16B son diagramas que ilustran un ejemplo de realización de una fuente de trenes de impulsos extendida espectralmente;

5 Las Figuras 17A a 17C son una ilustración esquemática de las interacciones en la muestra, según una primera variante (modulación de amplitud), con impulsos espectralmente extendidos;

Las figuras 18A-18C son una ilustración esquemática de las interacciones en la muestra, según una segunda variante (modulación del retardo de tiempo), con impulsos espectralmente extendidos;

10 Las figuras 19A-19C son una ilustración esquemática de las interacciones en la muestra, de acuerdo con la segunda variante (modulación del retardo de tiempo), con impulsos espectralmente extendidos y una variación del retardo de tiempo;

La figura 20 muestra otro ejemplo de realización de un dispositivo de detección SRS de acuerdo con una variante de la presente invención (la modulación del retardo de tiempo) con impulsos espectralmente extendidos;

15 Las figuras 21A-21C son una ilustración esquemática de las interacciones en la muestra, en el ejemplo de la Figura 20.

Descripción detallada

En las figuras, los elementos idénticos se indican mediante las mismas referencias.

20 La figura 4 muestra un ejemplo de un dispositivo para detectar una señal resonante óptica, no lineal, SRS, de acuerdo con una variante de la presente invención, que pone en práctica una modulación de amplitud.

25 El dispositivo de detección 10 comprende una fuente de emisión 20 de trenes de impulsos centrados en las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 , tales que $\omega_2 - \omega_1 = \omega_3 - \omega_2 = \Omega_R$, donde Ω_R es una frecuencia de resonancia de vibración molecular que se desea analizar en una muestra S. Los impulsos son, por ejemplo, impulsos de picosegundos, de finura espectral de unos pocos cm^{-1} , o pueden ser impulsos en deriva de frecuencia, como se describirá en más detalle más adelante. Típicamente, los trenes de impulsos incluyen, por ejemplo, impulsos de unos pocos picosegundos, emitidos a tasas de varias decenas de MHz, por ejemplo de aproximadamente 80 MHz, durante un período del orden del microsegundo.

30 Según una variante, la fuente de emisión 20 comprende un sistema de láser constituido por un láser maestro 24 que emite trenes de impulsos 12 a la pulsación ω_2 y por un láser OPO (u Oscilador Paramétrico Óptico) 22 que recibe impulsos 11 del láser maestro duplicados en frecuencia y adaptados a la generación paramétrica de la Signal y del Idler dentro del OPO. De ello resultan trenes de impulsos 14 y 16 a las pulsaciones a ω_1 y ω_3 sintonizables, que corresponden respectivamente a Idler y Signal. El haz "Laser" 12 directamente emitido por el láser maestro 24 y los haces "Idler" 14 y "Signal" 16 emitidos por el láser OPO 22 podrían ser explotados directamente para la formación de imágenes SRS acuerdo con la presente descripción; en efecto, el mecanismo de generación paramétrica del OPO es tal que la pulsación de los impulsos Laser (ω_2), Signal (ω_3) e Idler (ω_1) cumplen la condición de $\omega_2 - \omega_1 = \omega_3 - \omega_2 = \Omega$, donde Ω se puede seleccionar a la pulsación Ω_R de interés actuando sobre el ajuste de OPO. Por lo tanto, al ser la longitud de onda de los impulsos 12 de aproximadamente 1064 nm, la longitud de onda de los impulsos 13 duplicados en frecuencia es de aproximadamente 532 nm, y las longitudes de onda de impulsos Idler y Signal son sintonizables respectivamente entre aproximadamente 1150 y 2450 nm y aproximadamente entre 690 y 990 nm. Cuando los tres trenes de impulsos 14, 12, 16 a las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 interactúan en la muestra, el haz Signal cumple la función de bomba en la interacción de los impulsos de Laser/Signal, mientras que el haz Laser actúa como el haz de Stokes y el haz Idler actúa como Stokes en la interacción de los impulsos de Laser/Idler, mientras que el haz Laser actúa como la bomba.

35 40 45 50 En el ejemplo de la Figura 4, en cada una de las vías Signal e Idler, una línea de retardo (respectivamente 56 y 54) hace que sea posible sincronizar temporalmente los tres trenes de impulsos con el fin de garantizar solapamiento temporal en la muestra.

55 En el ejemplo de la figura 4, una modulación de amplitud se realiza en cada uno de los trenes de impulsos Signal e Idler, a la misma frecuencia de modulación, pero en oposición de fase, permitiendo hacer interactuar en la muestra alternativamente los trenes de impulsos de luz de las pulsaciones ω_1 y ω_2 y los trenes de impulsos de luz de las pulsaciones ω_2 y ω_3 , a la frecuencia de modulación. En otras palabras, durante un período de tiempo dado T solamente los impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_2 interactúan, y durante el siguiente período de tiempo, sólo los impulsos a las pulsaciones ω_2 y ω_3 interactúan, estando, el periodo T dado por la inversa de la frecuencia de modulación. Los trenes de impulsos Signal e Idler son, por ejemplo, los dos modulados por un modulador acústico-óptico (respectivamente 36, 34). La señal de modulación del modulador acústico-óptico 36 que tiene una frecuencia

f_1 , ventajosamente mayor que 1 MHz, típicamente entre 1 y 40 MHz, es suministrada por un generador de baja frecuencia 30. La señal de modulación del modulador acústico-óptico 34 con la misma frecuencia f_1 proviene de la misma fuente, pero es desplazada en fase por medio de un generador electrónico de retardo 32 con el fin de que los trenes de impulsos Signal e Idler sean modulados en oposición de fase.

5 Los trenes de impulsos modulados en oposición de fase 15 y 17 (respectivamente a las pulsaciones ω_1 y ω_3) se combinan con el tren de pulsos de Laser a la pulsación ω_2 por ejemplo por medio de espejos dicróicos 64, 66 y se enfocan después en un volumen de enfoque común en la muestra S por medio de una lente objetivo de microscopio 42, por ejemplo un objetivo de microscopio de apertura numérica $ON = 0,45$, acromático en el dominio próximo al infrarrojo (700-1300-nm). Un objetivo 44 de mayor apertura numérica, por ejemplo $ON = 0,60$, permite recoger los trenes de impulsos procedentes de la muestra sin pasarlos por el diafragma. El tren de impulsos 18 a la pulsación ω_2 procedente de la muestra es a continuación filtrado por un filtro de interferencia óptico 48 y luego detectado, por ejemplo, por un fotodiodo 70 sensible a 1064 nm. La señal de modulación se detecta entonces mediante un detector síncrono 80 y la señal de la detección síncrona es conformada por los medios de procesamiento 90. Los medios de detección síncrona pueden comprender, por ejemplo, una detección síncrona analógica a la frecuencia de modulación f_1 . Alternativamente, la detección sincrónica de la señal puede llevarse a cabo digitalmente por tratamiento digital de las señales que resultan directamente de la detección óptica. Ventajosamente, en cada una de las vías Signal e Idler, un telescopio (no mostrado) con un aumento 1 permite ajustar la divergencia de los haces Signal e Idler para optimizar su superposición espacial al foco del objetivo. Un telescopio 69, por ejemplo de aumento 3, permite alargar el diámetro de los haces de excitación para llenar completamente la pupila trasera del objetivo. En este caso, la apertura numérica de excitación digital es la indicada por el fabricante de lentes. Por ejemplo, los haces Signal e Idler son excitados de acuerdo con su modo fundamental TEM00 para que los campos eléctrico y magnético sean ambos perpendiculares a la dirección de propagación de estas señales; los tres haces Laser, Signal e Idler son, por ejemplo, polarizados de manera rectilínea, con la misma dirección de polarización, lo que permite la optimización de la señal en un medio homogéneo.

Según una variante, una platina motorizada 46 permite desplazar la muestra en relación con el volumen de enfoque común de trenes de impulsos para formar una imagen de la muestra por una aplicación del dispositivo a la formación de imágenes SRS. Los objetivos de enfoque y de recogida, así como la platina 46, están, por ejemplo, dispuestos en un cuerpo del microscopio 40. Alternativamente, un sistema de exploración de los haces de excitación se puede utilizar para mover el volumen de enfoque en la muestra. En el ejemplo de aplicación a la formación de imágenes SRS, los medios de procesamiento 90 permiten también extraer la señal característica buscada como una función de la posición en la muestra para generar una imagen.

35 Para una aplicación del dispositivo a la espectroscopia o a la formación de imágenes hiperespectrales, también es posible hacer variar las pulsaciones ω_1 y ω_3 de Idler y de Signal, permitiendo sondear la señal SRS de acuerdo con la frecuencia vibracional molecular Ω . Los medios de procesamiento 90 permiten entonces extraer la señal característica buscada en función de la frecuencia de vibración molecular Ω para formar un espectro.

40 Las figuras 5A a 5C y 6 ilustran el principio de un método de detección de acuerdo con una variante de la presente descripción, puesto en práctica, por ejemplo, por medio del dispositivo mostrado en la Figura 4, y que será denominado método SRGOLD en el resto de la descripción, por « Stimulated Raman Gain Opposite Loss Detection »

45 La figura 5A ilustra el estado denominado "estado a" en el que se superponen durante el período de tiempo T impulsos a la pulsación ω_2 e impulsos a la pulsación ω_1 . Según este ejemplo, los impulsos son impulsos cortos, por ejemplo, impulsos de picosegundos, típicamente inferiores a 100 picosegundos. La figura 5B ilustra el estado denominado « estado b », en el que se superponen durante el mismo período de tiempo T, pero alternando con el estado a, impulsos a la pulsación ω_2 e impulsos a la pulsación ω_3 . Se considera en este ejemplo que la diferencia de las pulsaciones $\omega_2 - \omega_1$ y $\omega_3 - \omega_2$ es igual a Ω_R , donde Ω_R es una pulsación de resonancia de un modo de vibración molecular de la muestra. Gracias al método implementado por el dispositivo mostrado en la Figura 4, los estados a y b se alternan en la muestra a la frecuencia de modulación f_1 , como se ilustra en la Figura 5C.

55 La Figura 6 ilustra los mecanismos físicos puestos en juego al interactuar trenes de impulsos a las pulsaciones ω_3 y ω_2 en la muestra ("estado b" columna 301 : "SRG"), durante la interacción de los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_2 (columna 302 : "SRL"), durante la interacción de los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_2 desfasadas en 180° en relación con el estado b ("estado a", columna 303 : "SROL") y la detección puesta en práctica (columna 304 : "SRGOLD").

60 Se considera en un primer tiempo (columna 301) la interacción entre el tren de impulsos Laser no modulado (12, Figura 4), la intensidad del cual se muestra esquemáticamente en función del tiempo en la curva 310, con el tren de impulsos a la pulsación ω_3 , modulado en amplitud a la frecuencia de modulación f_1 (17, figura 4) cuya intensidad se muestra esquemáticamente como una función del tiempo en la curva 312. En estos diagramas, sólo la envolvente del tren de impulsos está representada. En esta interacción, los impulsos a la pulsación ω_3 (Signal) juegan el papel de bomba, mientras que los impulsos Laser a la pulsación ω_2 juegan el papel de Stokes. Estos últimos experimentan después de la interacción en la muestra una ganancia de energía (SRG) por parte de los impulsos de

Stokes, que se muestra esquemáticamente en la curva 314 por la variación de la intensidad ΔI_{SRG} . Las curvas 316 y 318 ilustran los efectos de las aberraciones debidas respectivamente a efecto Kerr cruzado y la absorción de 2 fotones. Se supone en este ejemplo que el efecto Kerr cruzado se traduce en un efecto de enfoque que entraña una ganancia de intensidad de los impulsos Laser, modulada a la frecuencia de modulación f_1 . La absorción de 2 fotones se traduce en una pérdida de intensidad de los impulsos Laser a la frecuencia de modulación f_1 .

Entonces se considera (columna 302) la interacción entre el tren de impulsos Laser no modulado, cuya intensidad se muestra esquemáticamente como una función del tiempo en la curva 320, con un tren de impulsos a la pulsación ω_1 , de amplitud modulada a la frecuencia de modulación f_1 y la intensidad del cual se muestra esquemáticamente como una función del tiempo en la curva 322. En esta interacción, los impulsos a la pulsación ω_1 (Idler) actúan como Stokes, mientras que los impulsos Laser a la pulsación ω_2 juegan el papel de bomba. Esto último experimentan, por lo tanto después de la interacción en la muestra una pérdida de energía (SRL) esquematizada en la curva 324 por la variación de la intensidad ΔI_{SRL} . Las curvas 326 y 328 ilustran los efectos de aberraciones debidas respectivamente al efecto Kerr cruzado y a la absorción de 2 fotones. Si los impulsos a la pulsación ω_3 inducen en los impulsos Laser un efecto Kerr cruzado que dé lugar a un efecto de enfoque (curva 316), los impulsos a la pulsación ω_1 también dan lugar a un efecto de enfoque de los impulsos Laser causando una ganancia de intensidad de los mismos, modulados a la frecuencia de modulación f_1 (curva 326). La absorción de 2 fotones se traduce, como anteriormente, en una pérdida de intensidad de los impulsos Laser a la frecuencia de modulación f_1 (curva 328). Por lo tanto, se constata que cuando los trenes impulsos a pulsación ω_1 y ω_3 están modulados en amplitud, en fase, las aberraciones inducidas también están en fase, mientras que las modulaciones SRL y SRG están en oposición de fase (comparación de las curvas 314 y 324).

Supóngase ahora que el tren de impulsos Laser a la pulsación ω_2 (curva 330, columna 303) interactúa con el tren de impulsos a la pulsación ω_1 , de amplitud modulada en oposición de fase con relación a la modulación del tren de impulsos a la pulsación ω_3 (curva 332, columna 303). En este caso, la modulación SRL de los trenes de impulsos Laser (curva 334) está en fase con la modulación SRG (curva 314), mientras que las aberraciones inducidas por los trenes de impulsos a la pulsación ω_1 (curvas 336, 338) están en oposición de fase con las inducidas por los trenes de impulsos a la pulsación ω_3 (curvas 316, 318). El método descrito según la presente variante, llamado SRGOLD, por "Stimulated Raman Gain Opposite Loss Detection", consiste por tanto en modular en amplitud los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 en oposición de fase (curvas 342, columna 304) y en detectar las modulaciones inducidas en el tren de impulsos Laser no modulado (curva 340) por detección sincrona a la frecuencia de modulación. En estas condiciones, las aberraciones, en oposición de fase, se compensan (véanse las curvas 346, 348 de la columna 304) y desaparecen durante la detección sincrona. Además, las señales de SRL y SRG están en fase y se suman en la detección sincrónica (curva 344) de acuerdo con la expresión:

$$\Delta I_{SRGOLD} = \Delta I_{SRG} + \Delta I_{SRL}$$

$$= \Delta I_{SRG} + \Delta I_{SRL} \times \cos(180^\circ)$$

Despreciando el cromatismo y suponiendo que las intensidades de excitación son equivalentes (intensidad de los impulsos a la pulsación ω_1 incidentes en la muestra idéntica a la intensidad de los impulsos a la pulsación ω_3), Se deduce:

$$\Delta I_{SRGOLD} \approx 2\Delta I_{SRG}$$

El dispositivo de detección 10 que se muestra en la Figura 4 incluye medios delanteros de detección óptica (o "forward", según la expresión anglo-sajona) y la propagación de los haces excitadores en el dispositivo se lleva a cabo en el espacio libre. Las figuras 7A a 7D muestran esquemáticamente diferentes alternativas del dispositivo de detección mostrado en la Figura 4. Las representaciones son parciales, estando representados sólo los elementos útiles para la comprensión.

La figura 7A muestra un dispositivo de detección similar al de la figura 4. Por simplicidad, sin embargo, no todos los elementos han sido representados. En particular, el bloque 36 representa el módulo para la modulación de amplitud a la frecuencia de modulación f_1 de los trenes de impulsos a la pulsación ω_1 y bloque 34 representa el módulo para la modulación de amplitud en la frecuencia de modulación f_1 de los trenes de impulsos a la pulsación ω_3 , en oposición de fase con la modulación de trenes de impulsos a la pulsación ω_1 . En lo que sigue de la descripción, se indica "- f_1 " la modulación a la frecuencia f_1 en oposición de fase.

La figura 7B ilustra, según una representación fragmentaria, una variante del dispositivo mostrado en la Figura 7A, en la que la detección óptica se lleva a cabo en el modo trasero (o "epi"). En esta configuración, la lente objetivo de enfoque 42 también actúa como objetivo colector, siendo la señal detectada la señal retrodispersada por la muestra. Los medios de detección óptica pueden comprender, de acuerdo con esta variante, además del detector rápido 70, una placa dicroica semi-reflectante 65 para reflejar los trenes de impulsos a la pulsación ω_2 . Gracias al método de detección de acuerdo con la presente descripción, los efectos de las aberraciones, resultantes principalmente de la absorción de 2 fotones y del efecto Kerr óptico cruzado que induce un efecto de diafragmación modulado al nivel del objetivo 42, que actúa como objetivo de colección la señal SRS, se eliminan como se explicó anteriormente, cuando se multiplica la señal útil SRS.

La Figura 7C ilustra, según una representación fragmentaria, una variante del dispositivo mostrado en la figura 7A, en la que la propagación de los haces excitadores 12, 15, 17 es hecha en modo de fibra, al menos parcialmente. En las aplicaciones en microscopía óptica, por ejemplo, se investiga una propagación por fibra óptica de los haces luminosos que se propagan en el dispositivo, en particular por problemas de espacio y facilidad de ajuste de los componentes ópticos. En el ejemplo mostrado en la Figura 7C, la propagación de los haces excitadores se realiza por medio de una fibra óptica 60 situada aguas arriba del objetivo de enfoque 42. La fibra óptica es, por ejemplo, una fibra de modo único. Los objetivos 61 y 63 permiten, respectivamente, acoplar los haces excitadores a la entrada y a la salida de la fibras. El método de detección descrito en este documento permite entonces no sólo limitar los efectos de las aberraciones que resultan de las interacciones de los haces excitadores en la muestra, como se describió anteriormente, sino también limitar posibles aberraciones de medición resultantes de los efectos no lineales en la fibra óptica 60. Debido, en efecto, a que las intensidades de luz se propagan en la fibra, efectos no lineales de tipo mezcla degenerada de cuatro ondas o efecto Kerr cruzado pueden ocurrir en la propia fibra y originar por las mismas razones que las explicadas anteriormente un agotamiento de los impulsos Laser a la frecuencia de modulación f_1 , generando de este modo una aberración de medición. Modulando los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 a la misma frecuencia, pero en oposición de fase, y llevando a cabo una detección síncrona de la señal a la pulsación ω_2 , también se evitan las aberraciones generadas por efectos no lineales en la fibra.

La Figura 7D ilustra, según una representación fragmentaria, una variante del dispositivo mostrado en la figura 7A, en la que la propagación de los haces excitadores 12, 15, 17 es realizada, al menos parcialmente, en el modo de fibra, y se lleva a cabo la detección óptica de acuerdo con un modo de detección endoscópica. La muestra S corresponde aquí, por ejemplo, a capas profundas de un medio biológico. La detección se hace en modo trasero (o epi). La señal óptica no lineal de interés a la pulsación ω_2 , retrodispersada por la muestra, se transmite después de pasar a través de la fibra óptica 60, por medio de un espejo dichroico, al detector rápido 70. En este modo de detección, además de la diafragmación por el objetivo 42, que actúa como el objetivo colector de la señal SRS, la señal puede también ser diafragmada por la fibra óptica 60. El método según este documento elimina aberraciones, incluyendo las resultantes de la diafragmación por la fibra óptica.

Las figuras 8A a 8C muestran los primeros resultados experimentales para validar el método de detección llevado a cabo con un dispositivo como se muestra en la Figura 4 en muestras no dispersantes.

La figura 8A muestra tres espectros obtenidos con una cuba de clorobenceno, realizados entre 960 y 1120 cm^{-1} . Para poner de relieve los efectos de las aberraciones debidas al efecto Kerr cruzado, un diafragma está dispuesto aguas arriba del detector, cerrado de tal manera que corta 50% de la intensidad de los impulsos Laser a la pulsación ω_2 . Las curvas 501, 502, 503 representan los espectros realizados, respectivamente, de conformidad con los modos SRG, SROL y SRGOLD, tales como se describen en en relación con la Figura 6. Más específicamente, la curva en modo SRG se obtiene cortando el tren de impulsos a la pulsación ω_1 , la curva en modo SROL se obtiene cortando el tren de impulsos a la pulsación ω_3 y la curva en modo SRGOLD se obtiene mediante la interacción en la cuba de líquido de los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_2 , ω_3 , estando los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_3 modulados en amplitud, en oposición de fase. Para estos experimentos, la potencia óptica media del tren de impulsos Laser, medida después del combinador 66 (Figura 4), se ha fijado en 90 mW, las potencias ópticas medias de los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_3 se fijan en 50 mW de modo que el efecto Kerr cruzado generado por la pulsación ω_1 y considerado como principal componente de las aberraciones, compensa exactamente el efecto Kerr cruzado generado por los impulsos a la pulsación ω_3 . Este ajuste se puede realizar mediante la cancelación de la señal de SRGOLD fuera resonancias, por ejemplo en $\Omega = 960 \text{ cm}^{-1}$. Se observa en la curva 501 que el espectro SRG, obtenido por detección síncrona a la frecuencia f_1 de la señal SRS resultante de la interacción entre el tren de impulsos Laser (ω_2) y el tren de impulsos Signal (ω_3) modulado en amplitud a la frecuencia f_1 , está parasitado por un desplazamiento negativo correspondiente al efecto Kerr cruzado, traducándose aquí el efecto Kerr en un efecto de desenfoque del haz de Laser. Como se esperaba, el espectro SROL (curva 502), obtenido por detección síncrona a la frecuencia f_1 de la señal SRS resultante de la interacción entre el tren de impulsos Laser (ω_2) y el tren de impulsos Idler (ω_1) modulado en amplitud a la frecuencia f_1 pero en oposición de fase, tiene un desplazamiento debido al efecto Kerr cruzado de signo opuesto al observado en la configuración SRG. En modo SRGOLD (curva 503), la detección síncrona a la frecuencia f_1 de la señal Laser permite eliminar el efecto de las aberraciones debidas al efecto Kerr cruzado que son de signos opuestos y se compensan en toda la gama espectral. Estos experimentos confirman que con el método SRGOLD descrito de este modo, es posible eliminar completamente el efecto Kerr cruzado en un medio homogéneo.

La figura 8C muestra una validación en formación de imágenes del método SRGOLD descrito anteriormente. Para estos experimentos, una serie de imágenes se realiza en la resonancia ($\Omega = 1003 \text{ cm}^{-1}$) y fuera de la resonancia ($\Omega = 930 \text{ cm}^{-1}$) en una muestra tal como la ilustrada en la Figura 8B y que comprende bolas de poliestireno 413 de 20 μm de diámetro, sumergidas en un líquido de índice 411 que tiene un índice de refracción 1,54 entre dos láminas de vidrio 410, 412. El experimento se realizó, como anteriormente, con un diafragma posicionado aguas arriba del detector y parcialmente cerrado con el fin de maximizar la detección del efecto Kerr cruzado. La potencia óptica media del tren de impulsos Laser es de aproximadamente 160 mW, y la del tren de impulsos Signal (pulsación ω_3) es de aproximadamente 70 mW. Las aberraciones se reducen al mínimo en el líquido mediante el ajuste de la

potencia óptica media del tren de impulsos Idler (pulsación ω_1) de aproximadamente 30 mW. La figura 8C representa, respectivamente, imágenes de una bola de poliestireno a la resonancia en el modo SRG (511), SROL (512), SRGOLD (513), en comparación con la imagen del haz Laser no modulado (514). La figura 8C muestra estas mismas imágenes fuera de resonancia (imágenes 521-524, respectivamente). La imagen "Laser" es una imagen de referencia que permite evaluar el ruido y que se obtiene cortando los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_3 . A resonancia y fuera de resonancia, las mediciones SRG y SROL hacen claramente aparecer la presencia de aberraciones, de signos opuestos. En la resonancia, en la imagen SRGOLD, la contribución del líquido desaparece y la señal SRS de la bola es más intensa que en las imágenes SRG y SROL (suma de las dos contribuciones). Fuera de resonancia, se constata que las aberraciones se redujeron significativamente en comparación con las imágenes SRG y SROL. La contribución del líquido ha desaparecido por completo. Sólo un leve residuo de la aberración (<10% con respecto a las aberraciones de la imagen SRG) se mide en la bola.

Las figuras 9A a 9D ilustran los resultados experimentales obtenidos con una muestra dispersante, las características de la cual están más cerca de un tejido biológico.

La figura 9A representa la muestra, idéntica a la de la figura 8B, pero en la que un difusor 414 se ha dispuesto, por ejemplo una hoja de cinta adhesiva colocada encima de la cuba que contiene las bolas de poliestireno sumergidas en el líquido de índice. No está presente esta vez ningún diafragma en el dispositivo y la abertura numérica del objetivo colector 44 se elige mayor que la del objetivo de enfoque 42. Las imágenes 505 y 506 (Figura 9B) representan las imágenes del haz Laser al nivel de la pupila trasera del objetivo de recogida, respectivamente, en ausencia del difusor y en presencia del difusor. El círculo punteado blanco define el tamaño de la pupila del objetivo. En ausencia del difusor, el haz Laser no está diafragmado porque la abertura numérica colector es mayor que la de excitación. En contraste, la presencia del difusor amplía el espectro angular del haz Laser en la salida de la muestra. La pupila del objetivo colector juega el papel de un diafragma. Una parte de la energía (aproximadamente 12,5%) de este modo se bloquea. Las figuras 9C y 9D muestran, respectivamente, imágenes de una bola de poliestireno en resonancia (531 a 534) y fuera de resonancia (541 a 544) para las configuraciones SRG, SROL, SRGOLD y Laser. Para obtener estas imágenes, las potencias son alrededor de 50 mW (Laser), 50mW (Idler) y 60 mW (Signal). La escala de colores está adaptada para resaltar las aberraciones. Las imágenes SRG (531, 541) y SROL (532, 542) muestran la detección del efecto Kerr cruzado debido a la difusión de la muestra. Al igual que en los experimentos anteriores, se constata que en las imágenes SRGOLD (533, 543), la contribución del líquido ha desaparecido y que la de la bola fuera de resonancia se ha reducido considerablemente.

Se observa que la línea Raman estudiada aquí ($\Omega = 1003 \text{ cm}^{-1}$) es extremadamente intensa en comparación con las aberraciones. La figura 9F muestra una serie de imágenes de 50 x 50 micras realizadas en la misma muestra dispersante que anteriormente, a $\Omega = 1034 \text{ cm}^{-1}$ (imágenes 551-554) y a $\Omega = 1041 \text{ cm}^{-1}$ (imágenes 561-564). Esta última frecuencia está ligeramente desplazada con respecto al máximo de la línea Raman a 1034 cm^{-1} (véase el espectro Raman 510 del poliestireno que se muestra en la Figura 9E) y se utiliza para simular el caso de una línea Raman de intensidad comparable a las aberraciones. Para esta frecuencia, el contraste de las bolas de poliestireno sobre las imágenes SRG y SROL imágenes (561, 562) es pequeño, ya que la medición está dominada por el efecto Kerr cruzado. Por el contrario, la imagen SRGOLD (563) permite aportar un buen contraste de las bolas debido a que las aberraciones se reducen y la señal SRS es aproximadamente dos veces más fuerte que en las imágenes SRG o SROL. Se observa que las diferentes imágenes están sujetas al mismo ruido producido por el rayo Laser y por el ruido electrónico.

Las figuras 10A a 10C muestran los primeros resultados obtenidos con el método descrito SRGOLD, de acuerdo con la presente variante, sobre los tejidos biológicos. El tejido biológico está formado de piel de ratón (corte de 20 micras de espesor). La Figura 10A muestra una imagen de luz blanca de la zona estudiada. La compensación de aberraciones se realizó fuera de resonancia (1550 cm^{-1}) en el punto indicado por 0 sobre la imagen de luz blanca. Este punto se eligió arbitrariamente. Las potencias ópticas medias son de aproximadamente 33 mW (Laser), 40 mW (Idler), 86 mW (Signal). La Figura 10B muestra los espectros de SRG (911, 921), SROL (912, 922), SRGOLD (913, 923) y la referencia Laser (914, 924) en la gama espectral de las amidas ($1350-1700 \text{ cm}^{-1}$) medidas respectivamente en los puntos 1 y 2 indicados sobre la imagen de luz blanca. En ambos casos, las medidas de SRG y SROL son de signos opuestos a las frecuencias fuera de resonancia (alrededor de 1550 cm^{-1}), lo que confirma la presencia de aberraciones. En los espectros SRGOLD, es reducida la influencia de los aberraciones.

La figura 10C muestra imágenes efectuadas en resonancia de las amidas II (1450 cm^{-1}) y fuera de resonancia (1550 cm^{-1}) para las diferentes configuraciones, SRG, SROL, SRGOLD, Laser (curvas señaladas, respectivamente, con 571 a 574 en resonancia y 581 a 584 fuera de resonancia). La zona de imagen se muestra en línea de trazos sobre la imagen de luz blanca que se muestra en la figura 10A. En la resonancia, es difícil identificar las estructuras en las imágenes SRG (571) y SROL (572), mientras que la imagen SRGOLD (573) muestra una estructura similar a la imagen de luz blanca. Fuera de resonancia, la imagen SRGOLD (583) globalmente proporciona una mejor cancelación de la señal que las imágenes SRG y SROL. Estos experimentos demuestran, en los tejidos biológicos, la influencia de la difusión en la medida SRS. La técnica SRGOLD permite obtener un mejor contraste espacial y espectral, así como una mejor especificidad.

El método descrito por medio del dispositivo de la Figura 4 o 7A tiene la ventaja de ser simple de implementar, una detección síncrona a una frecuencia de modulación que se puede realizar en una señal óptica (tren de impulsos a la pulsación ω_2) y utiliza para esta puesta en práctica componentes comúnmente disponibles en el mercado.

Las figuras 11A y 11B ilustran dos variantes del dispositivo mostrado en las Figuras 4 y 7A. Las figuras 12A y 12B muestran tablas que ilustran las señales detectadas (señales SRS y aberraciones) en los ejemplos de puesta en práctica de los dispositivos representados en las figuras 11A y 11B, respectivamente.

En el ejemplo de la Figura 11A, los trenes de impulsos 14 y 16 a las pulsaciones ω_1 (Idler) y ω_3 (Signal) están modulados en amplitud a frecuencias de modulación f_2 y f_1 distintas, no múltiplos una de otra para formar trenes de impulsos 15, 17 modulados. El tren de impulsos 12 a la pulsación ω_2 (Laser) no está modulado. En la muestra, por lo tanto interactúan trenes de impulsos a las pulsaciones ω_2 y ω_1 (moduladas), por una parte, y los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_2 y ω_3 (moduladas), por otra parte. Como antes, los impulsos se detectan a la pulsación ω_2 procedente de la muestra. Durante la interacción de impulsos Laser/Signal, el proceso puesto en juego es un proceso SRG, que se muestra en la columna 601 de la figura 12A. La curva 610 muestra el tren de impulsos de láser no modulados, la curva 612 el tren de impulsos a la pulsación ω_3 modulada a la frecuencia f_1 . En estas curvas, sólo se muestra la envoltura de los trenes de impulsos. La señal SRS resultante de la interacción de estos dos trenes de impulsos tiene una variación de intensidad ΔI_{SRG} positiva, modulada a la frecuencia de modulación f_1 (curva 614). Las aberraciones, que tienen una contribución que resulta del efecto Kerr supuesto preponderante, presentan una variación en la intensidad $\Delta I_{Aberraciones}$ modulada a la misma frecuencia de modulación f_1 (curva 616), que se supone positiva. Por detección síncrona a la frecuencia de modulación f_1 se obtiene por tanto una señal $\Delta I(f_1)$ tal que :

$$\Delta I(f_1) = \Delta I_{SRG} + \Delta I_{Aberraciones}$$

Además, durante la interacción de los impulsos Laser/Idler, el proceso puesto en juego es un proceso SRL, que se muestra en la columna 602 de la figura 12A. La curva 620 muestra el tren de impulsos de láser no modulado, la curva 622 el tren de impulsos a la pulsación ω_1 modulado a la frecuencia f_2 . La señal SRL resultante de la interacción de estos dos trenes de impulsos tiene una variación de intensidad $-\Delta I_{SRL}$ negativa, modulada a la frecuencia de modulación f_2 (curva 624). Las aberraciones tienen una variación en intensidad $\Delta I_{aberraciones}$ modulada a la misma frecuencia de modulación f_2 (curva 626) y del mismo signo que el cambio en la intensidad debido a las aberraciones en el proceso SRG. Actuando sobre las potencias ópticas medias de los trenes de impulsos incidentes en la muestra, es posible obtener variaciones en la intensidad $\Delta I_{Aberraciones}$ del mismo valor en ambos procesos SRG y SRL. Por detección síncrona a la frecuencia de modulación f_2 , se obtiene por tanto una señal $\Delta I(f_2)$ tal que:

$$\Delta I(f_2) = -\Delta I_{SRL} + \Delta I_{Aberraciones}$$

Un tratamiento electrónico de las señales procedentes de la detección síncrona a la frecuencia de modulación f_1 y de la detección síncrona a la frecuencia de modulación f_2 permite entonces, mediante sustracción, obtener una señal SRS amplificada útil, mientras que las señales debidas a las aberraciones se cancelan. También es posible mediante este método determinar la contribución de las aberraciones en la señal total mediante la realización de una adición de las señales procedentes de la detección síncrona, lo que permite disponer de otra información de contraste.

La figura 11B muestra otra variante en la que los trenes de impulsos 14 y 16 a las pulsaciones ω_1 (Idler) y ω_3 (Signal) no están modulados, sino es el tren de impulsos 12 a la pulsación ω_2 (Laser), el que está modulado en amplitud a una frecuencia f . En la muestra, por lo tanto, interactúan los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_2 (moduladas), por una parte, y los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_3 y ω_2 (moduladas) por otra parte. A diferencia de los métodos descritos anteriormente, se detectan en este ejemplo, por una parte, los impulsos a la pulsación ω_1 procedentes de la muestra, por otra parte los impulsos a la pulsación ω_3 procedentes de la muestra. Los medios de detección comprenden por lo tanto dos vías separadas por un espejo dicróico 68. En la primera vía, un filtro 47 permite transmitir sólo los impulsos a la pulsación ω_1 que son detectados por medio de un detector óptico rápido 71. En la segunda vía, un filtro 49 permite transmitir los impulsos a la pulsación ω_3 , también detectados por medio de un detector óptico rápido 72. En cada vía, una detección síncrona de las señales de los sensores ópticos se realiza a la frecuencia de modulación f . Durante la interacción de los impulsos Laser/Signal en la muestra, el proceso puesto en juego es un proceso SRL, que se muestra en la columna 701 de la figura 12B. La curva 710 muestra el tren de impulsos a la pulsación ω_3 no modulada, la curva 712 el tren de impulsos láser modulado a la frecuencia f . La señal SRL medida en los impulsos a la pulsación ω_3 (bomba), y que resulta de la interacción de estos dos trenes de impulsos, tiene una variación de intensidad $-\Delta I_{SRL}$ negativa, modulada a la frecuencia de modulación f (curva 714). Las aberraciones presentan, como anteriormente, una variación de intensidad $\Delta I_{Aberraciones}$ modulada a la misma frecuencia de modulación f (curva 716). Por detección síncrona a la frecuencia de modulación f se obtiene por tanto una señal $\Delta I(A)$ tal que:

$$\Delta I(A) = -\Delta I_{SRL} + \Delta I_{Aberraciones}$$

Por otra parte, durante la interacción de los impulsos Laser/Idler, el proceso puesto en juego es un proceso SRG, que se muestra en la columna 702 de la figura 12B. La curva 720 muestra el tren de impulsos a la pulsación ω_1 no modulada, la curva 722 el tren de impulsos láser a la pulsación ω_2 modulada a la frecuencia f . La señal SRG, medida esta vez en impulsos a la pulsación ω_1 (Stokes) y que resulta de la interacción de estos dos trenes de impulsos, tiene una variación de intensidad ΔI_{SRG} positiva, modulada a la frecuencia de modulación f (curva 724). Las aberraciones tienen una variación de la intensidad $\Delta I_{Aberraciones}$ modulada a la misma frecuencia de modulación f (curva 726) y del mismo signo que el cambio en la intensidad debido a las aberraciones en el proceso SRL. Como anteriormente, actuando sobre las potencias ópticas medias de los trenes de impulsos incidentes en la muestra, es posible obtener variaciones de intensidad $\Delta I_{Aberraciones}$ del mismo valor en ambos procesos SRG y SRL. Por detección sincrona a la frecuencia de modulación f se obtiene por tanto una señal $\Delta I(B)$ tal que:

$$\Delta I(B) = \Delta I_{SRG} + \Delta I_{Aberraciones}$$

Un tratamiento electrónico de las señales procedentes de las detecciones sincronas en cada vía, a la frecuencia de modulación f , permite entonces, mediante sustracción, obtener una señal útil amplificada SRS mientras que las señales debidas a las aberraciones se cancelan. También es posible mediante este método determinar la contribución de las aberraciones en la señal total mediante la realización de una adición de las señales procedentes de las detecciones sincronas.

Los ejemplos descritos hasta ahora han puesto en práctica una modulación de amplitud de uno o de dos de los trenes de impulsos. El método según la presente descripción también puede ser puesto en práctica por medio de una modulación de un retardo de tiempo efectuada entre el tren de pulsos de láser a la pulsación ω_2 y los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 .

La figura 13 muestra así un ejemplo de realización de un dispositivo de detección SRS de acuerdo con un ejemplo que realiza una modulación del retardo de tiempo. Las figuras 14A a 14C muestran esquemáticamente las interacciones en la muestra de acuerdo con este ejemplo, y la Figura 15 muestra una tabla que ilustra las señales detectadas (señales SRS y aberraciones) en el ejemplo de aplicación del dispositivo descrito en la figura 13.

En el dispositivo de la Figura 13, una línea de retardo 58 está dispuesta en una vía común a los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 . Alternativamente, la línea de retardo podría estar en el camino de los impulsos Laser (pulsación ω_2). Esta línea de retardo permite introducir entre los impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 y los impulsos a la pulsación ω_2 un retardo de tiempo modulado a una frecuencia de modulación f_1 , como se explica por medio de las figuras 14A y 14B. La línea de retardo permite introducir un cambio en la trayectoria óptica. La variación de la trayectoria óptica puede obtenerse mecánicamente, entre dos posiciones. Alternativamente, la línea de retardo puede comprender un deflector acústico-óptico que alterne entre dos ángulos para la generación de dos longitudes de trayectoria óptica. Jugando sobre líneas de retardo específicas cada vía Idler y Signal (véanse, por ejemplo, las líneas de retardo 54, 56, Figura 4), se ajusta entre los impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 un retardo fijo de 2ζ . La modulación de la línea de retardo 58 (Figura 13) hace que sea posible introducir un retardo de tiempo que varía entre $\pm \Delta t$ a la frecuencia de modulación f_1 de modo que los impulsos a las pulsaciones ω_2 y ω_3 se superpongan durante un período de tiempo T en la muestra (Estado a, Figura 14A) y los impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_2 (Estado b, Figura 14B) se superpongan en el siguiente período de tiempo T , alternándose los estados a y b a la frecuencia de modulación f_1 (Figura 14C). Una detección sincrona sobre los impulsos Laser a la pulsación ω_2 permite entonces determinar la señal característica de la resonancia vibracional molecular de la muestra. En el estado a (columna 801, Figura 15), los impulsos a las pulsaciones ω_2 (curva 810) y ω_3 (curva 814) se superponen temporalmente, mientras que los impulsos a las pulsaciones ω_1 (curva 812) están desplazados en el tiempo; el resultado de ello es un proceso de SRG sobre los impulsos Laser ilustrados en la curva 816. En este ejemplo de nuevo, se supone que las aberraciones son principalmente debidas al efecto Kerr cruzado y se traducen en una señal positiva (curva 818). En el estado b (columna 802, Figura 15), los impulsos a las pulsaciones ω_2 (curva 820) y ω_1 (curva 822) están superpuestos, mientras que los impulsos a las pulsaciones ω_3 (curva 824) están desplazados en el tiempo; el resultado de ello es un proceso SRL sobre impulsos Laser ilustrado en la curva 826. Las aberraciones se traducen de nuevo en una señal positiva (curva 828). Al igual que antes, el ajuste de las potencias ópticas medias de los trenes de impulsos incidentes en la muestra hace que sea posible igualar las señales debidas a las aberraciones en los procesos SRG y SRL, por ejemplo mediante la cancelación de la señal SRGOLD fuera de resonancia, como se ha explicado anteriormente. Así, durante la detección sincrona a la frecuencia de modulación f_1 de los impulsos procedentes de la muestra a la pulsación ω_2 (columna 803, Figura 15), las aberraciones se cancelan (curva 838), mientras que la señal útil SRS se incrementa (curva 836). En la Figura 15, las curvas 830, 832 y 834 ilustran esquemáticamente esta variante del proceso SRGOLD descrita anteriormente. El tren de impulsos a la pulsación ω_2 se emite continuamente (curva 830), mientras que los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 sufren un retardo temporal modulado (curvas 832, 834). Téngase en cuenta que son posibles variaciones en la disposición de líneas de retardo. Es posible, como es el caso de la Figura 13, proporcionar una línea de retardo en la vía común a las pulsaciones ω_1 y ω_3 o una línea de retardo en la vía de los impulsos a la pulsación ω_2 . En este caso, las líneas de retardo específicas de cada vía Idler/Signal permiten ajustar el retardo 2ζ entre impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 . Alternativamente, las líneas de retardo pueden estar dispuestas específicamente en cada vía

Idler/Signal, en cada una de las vías con un retardo de tiempo modulado entre $\zeta-\Delta t$ y $\zeta+\Delta t$ para una vía y $-\zeta-\Delta t$ y $-\zeta+\Delta t$ para la otra vía.

5 Aunque la detección óptica se haya presentado en los ejemplos de las figuras 11A, 11B y 13 en el modo delantero, es posible una detección óptica en modo trasero (epi) o en modo endoscópico, como ya se ha ilustrado anteriormente por medio de las figuras 7B y 7D. Estos dispositivos también pueden ser al menos parcialmente de fibras.

10 Las figuras 16 a 20 ilustran con más detalle la puesta en práctica de variantes del método de acuerdo con la presente descripción en el caso en que los impulsos son impulsos en deriva de frecuencia.

15 Las Figuras 16A, 16B son diagramas que ilustran un ejemplo de realización de una fuente de trenes de impulsos extendidos espectralmente. Esta fuente comprende, por ejemplo, una fuente OPO 20 de impulsos ultracortos, típicamente menos de 200 fs que comprende un láser maestro 24, por ejemplo del tipo Nd: YVO que emite impulsos de 12 a 1064 nm y un láser OPO 22 que recibe del láser maestro impulsos 11 de frecuencia doble en torno a 532 nm. El láser OPO emite, mediante oscilación paramétrica óptica, impulsos Idler 14 a la pulsación ω_1 e impulsos Signal 16 a la pulsación ω_3 . En cada una de las vías de Laser, Signal, Idler, una línea de dispersión en el tiempo (respectivamente 52, 53, 51) permite extender el impulso ultracorto en un impulso más largo temporalmente, típicamente inferior a 100 picosegundos, por ejemplo de unos pocos picosegundos, y cuya pulsación varía linealmente con el tiempo en torno a una pulsación central. Así, la Figura 16B muestra los impulsos de salida del OPO. La línea de dispersión en el tiempo puede comprender, de manera conocida, un material dispersivo, por ejemplo una barra de vidrio o un compresor de prisma o red.

25 Las figuras 17A a 17C ilustran las interacciones en la muestra en la puesta en práctica de un método de acuerdo con la presente descripción, basado en una modulación de amplitud, cuando los impulsos son extendidos espectralmente. En comparación con las figuras 5A a 5C, cada impulso tiene una deriva lineal de la pulsación en función del tiempo. La aplicación del método SRGOLD es, sin embargo, invariable. En particular, los trenes de impulsos interactúan en la muestra alternativamente a una frecuencia de modulación dada. En cada momento, se observa que se respeta la condición $\omega_2 - \omega_1 = \omega_3 - \omega_2 = \Omega_R$, donde Ω_R es una frecuencia de resonancia de vibración molecular de la muestra, lo que permite poner en práctica el método de acuerdo con la presente descripción. En este ejemplo, un retardo de tiempo idéntico entre los impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_2 , por una parte, y los impulsos a las pulsaciones ω_2 y ω_3 , por otra parte, se puede insertar de manera que sea posible sondear las frecuencias de resonancia de vibración molecular, traducándose una ligera diferencia de tiempo entre los impulsos en un cambio de la separación de las pulsaciones entre los impulsos.

35 Las figuras 18A a 18C ilustran las interacciones en la muestra en la puesta en práctica de un método de acuerdo con la presente descripción, basado en una modulación del retardo de tiempo, cuando los impulsos son extendidos espectralmente. Una vez más, el método descrito, en particular en relación con las figuras 13 a 15, se aplica a los impulsos con deriva de frecuencia. En el caso de la utilización de impulsos con deriva de frecuencia, es también posible, mediante el ajuste del retardo de tiempo, modificar la frecuencia resonante de vibración de interés, en particular para las aplicaciones de espectroscopia o de formación de imágenes hiperespectrales. En las figuras 18A y 18B, se observa una modulación del retardo de tiempo entre dos valores $-\Delta t_1$ y $+\Delta t_1$. Esto corresponde a una diferencia Ω_1 entre las pulsaciones ω_2 y ω_1 , por una parte y ω_3 y ω_2 de otra parte. En las figuras 19A a 19C, se muestran los mismos impulsos, pero con una modulación del retardo de tiempo entre dos valores $-\Delta t_2$ y $+\Delta t_2$, correspondiente a una diferencia Ω_2 entre las pulsaciones ω_2 y ω_1 , por una parte y ω_3 y ω_2 , por otra parte. La variación del retardo de tiempo hace que sea posible sondear el espectro de las resonancias de vibración.

50 La figura 20 muestra un ejemplo de realización de un dispositivo de detección SRS de acuerdo con otro ejemplo de la presente invención, que pone en práctica una modulación del retardo temporal y de los impulsos espectralmente extendidos. En este ejemplo, la fuente de emisión 20 de los trenes de impulsos emite trenes de impulsos ultracortos temporalmente extendidos por medio de un alargador 52 para formar trenes de impulsos en deriva de frecuencia centrados en la pulsación ω_2 . El dispositivo comprende además una hoja separadora dicróica 67 para separar, por una parte, impulsos centrados en la pulsación ω_2 y, por otra parte, impulsos centrados, respectivamente, en las pulsaciones ω_1 y ω_3 . Una modulación del retardo de tiempo entre los trenes de impulsos a la pulsación ω_2 y los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 es entonces posible, por ejemplo por medio de una línea de retardo 58 como se ha descrito en relación con la figura 13, por ejemplo. El mismo método de detección síncrona se puede aplicar para la detección de la señal SRS.

60 Las figuras 21A a 21C ilustran las interacciones en la muestra en el ejemplo de la figura 20. Como se ilustra en las figuras 18A a 18C, la modulación se realiza entre un estado a y un estado b correspondiente a un retardo de tiempo de $\pm \Delta t$ entre los impulsos a la pulsación ω_2 y los impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 . Se observa en este ejemplo una vez más que el cambio en el retardo de tiempo Δt hace que sea muy fácil cambiar la pulsación de resonancia vibratoria Ω de interés.

65 Aunque se describe a través de un cierto número de ejemplos de realización detallados, el dispositivo de detección y

el método según la invención incluyen diferentes variantes, modificaciones y mejoras que se harán evidentes para los expertos en la técnica, entendiéndose que estas diferentes variantes, modificaciones y mejoras son parte del marco de la invención, tal como está definido por las siguientes reivindicaciones.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo para detectar una señal óptica no lineal resonante del tipo de Dispersión Raman Estimulada (SRS) inducida en una muestra, comprendiendo el dispositivo:
- medios electro-ópticos para hacer interactuar en la muestra, a una primera frecuencia de modulación, trenes de impulsos luminosos (14, 12) de pulsaciones ω_1 y ω_2 y, a una segunda frecuencia de modulación, trenes de impulsos luminosos (12, 16) de pulsaciones ω_2 y ω_3 , tales que $\omega_2 - \omega_1 = \omega_3 - \omega_2 = \Omega_R$, donde Ω_R es una pulsación de resonancia vibratoria molecular de la muestra;
 - 10 - medios para la detección síncrona (70, 80), a las frecuencias de modulación primera y segunda, de señales ópticas no lineales resultantes de la interacción de los impulsos de luz en la muestra;
 - 15 - medios de tratamiento electrónico (80) que permiten obtener, a partir de señales electrónicas resultantes de la detección síncrona, una señal característica de la resonancia vibratoria molecular de la muestra.
- 20 2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que los medios electro-ópticos comprenden una fuente óptica (20) para emitir trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 , y medios para modular en amplitud los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 , respectivamente, a las frecuencias de modulación primera y segunda.
3. Dispositivo según la reivindicación 2, en el que los medios electro-ópticos comprenden medios (32, 34, 36) para modular en amplitud los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 a la misma frecuencia de modulación, pero en oposición de fase.
- 25 4. Dispositivo según la reivindicación 2, en el que los medios electro-ópticos comprenden medios (34, 36) para modular en amplitud los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 a dos frecuencias de modulación distintas que no son múltiples una de la otra.
- 30 5. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que las frecuencias de modulación primera y segunda son idénticas, y los medios electro-ópticos comprenden una fuente óptica (20) para emitir trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 , y medios (38) para modular en amplitud el tren de impulsos a la pulsación ω_2 a la frecuencia de modulación.
- 35 6. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que las frecuencias de modulación primera y segunda son idénticas, y los medios electro-ópticos comprenden una fuente óptica (20) para emitir trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 , y al menos una línea de retardo (58) que permite generar un retardo de tiempo modulado a la frecuencia de modulación entre los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 y los trenes de impulsos a la pulsación ω_2 .
- 40 7. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los medios electro-ópticos comprenden una fuente óptica (20, 51-53) para emitir trenes de impulsos con deriva de frecuencia, centrados respectivamente en las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 .
8. Dispositivo según la reivindicación 7, en el que la fuente óptica emisora comprende además una línea de retardo que permite generar un desplazamiento de tiempo idéntico entre los impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_2 , por una parte, y los impulsos a las pulsaciones ω_2 y ω_3 , por otra parte, de tal manera que se hace variar la frecuencia de resonancia vibratoria molecular de la muestra en la que se detecta la señal óptica no lineal.
- 45 9. Dispositivo según la reivindicación 7, en lo que depende de la reivindicación 6, en el que la fuente óptica emisora comprende un generador (20, 50) de trenes de impulsos con deriva de frecuencia, centrados en la pulsación ω_2 y, una lámina separadora dicróica (67) que permite separar, por una parte, los impulsos centrados en la pulsación ω_2 , y, por otra parte, los impulsos centrados en las pulsaciones ω_1 y ω_3 , respectivamente.
10. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque está al menos parcialmente fibrado.
- 50 11. Un método para detectar una señal óptica no lineal, resonante, del tipo de Dispersión Raman Estimulada (SRS) inducida en una muestra, que comprende:
- interacción en la muestra, a una primera frecuencia de modulación, de trenes de impulsos luminosos de pulsaciones ω_1 y ω_2 , y, a una segunda frecuencia de modulación, trenes de impulsos luminosos de pulsaciones ω_2 y ω_3 , tales que $\omega_2 - \omega_1 = \omega_3 - \omega_2 = \Omega_R$, donde Ω_R es una pulsación resonante vibratoria molecular de la muestra;
 - 55 - detección síncrona, a las frecuencias de modulación primera y segunda, de señales ópticas no lineales resultantes de la interacción de los impulsos de luz en la muestra;

- tratamiento electrónico que permite obtener, a partir de señales electrónicas resultantes de la detección síncrona, una señal característica de la resonancia vibratoria molecular de la muestra.

- 5 12. El método según la reivindicación 11, que comprende la emisión de trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 y la modulación de amplitud de los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 a las frecuencias de modulación primera y segunda, respectivamente.
13. El método según la reivindicación 12, en el que los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 son modulados en amplitud a la misma frecuencia de modulación, pero en oposición de fase.
14. El método según la reivindicación 12, en el que los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 son modulados en amplitud a dos frecuencias de modulación distintas que no son múltiplos una de otra.
- 10 15. Método según la reivindicación 11, en el que, al ser idénticas las frecuencias de modulación primera y segunda, comprende la emisión de trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 , y la modulación de amplitud del tren de impulsos a la pulsación ω_2 a la frecuencia de modulación.
- 15 16. Método según la reivindicación 11, en el, al ser las frecuencias de modulación primera y segunda idénticas, comprende la emisión de trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1, ω_2 y ω_3 , y la generación de un retardo de tiempo modulado a la frecuencia de modulación entre los trenes de impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_3 y los trenes de impulsos a la pulsación ω_2 .
- 17.. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que los impulsos son impulsos con deriva de frecuencia centrados respectivamente en las pulsaciones ω_1 , ω_2 y ω_3 .
- 20 18.. El método de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende además generar un desplazamiento de tiempo idéntico entre los impulsos a las pulsaciones ω_1 y ω_2 , por una parte, y los impulsos a las pulsaciones ω_2 y ω_3 , por otra parte, de tal manera que se detecte una señal óptica no lineal característica otra frecuencia de resonancia vibratoria molecular de la muestra.
- 25 19. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en lo que depende de la reivindicación 16, que comprende generar trenes de impulsos con deriva de frecuencia centrados en la pulsación ω_2 , y separar los impulsos en impulsos centrados en la pulsación ω_2 , por una parte, y en impulsos centrados en las pulsaciones ω_1 y ω_3 , respectivamente, por otra parte.

30

35

40

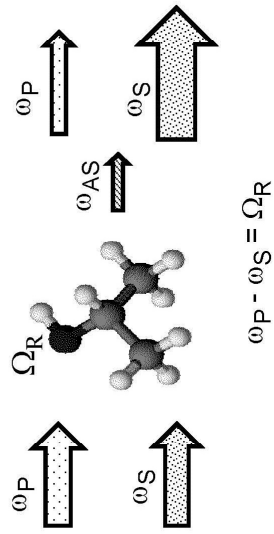
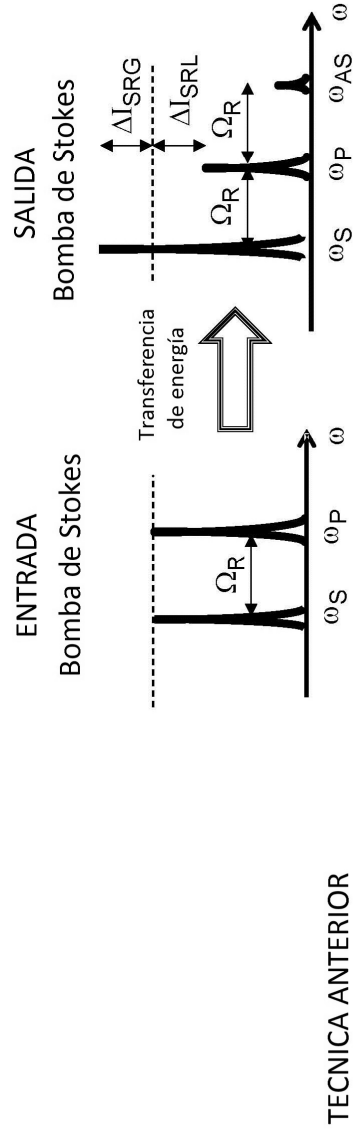


FIG.1A



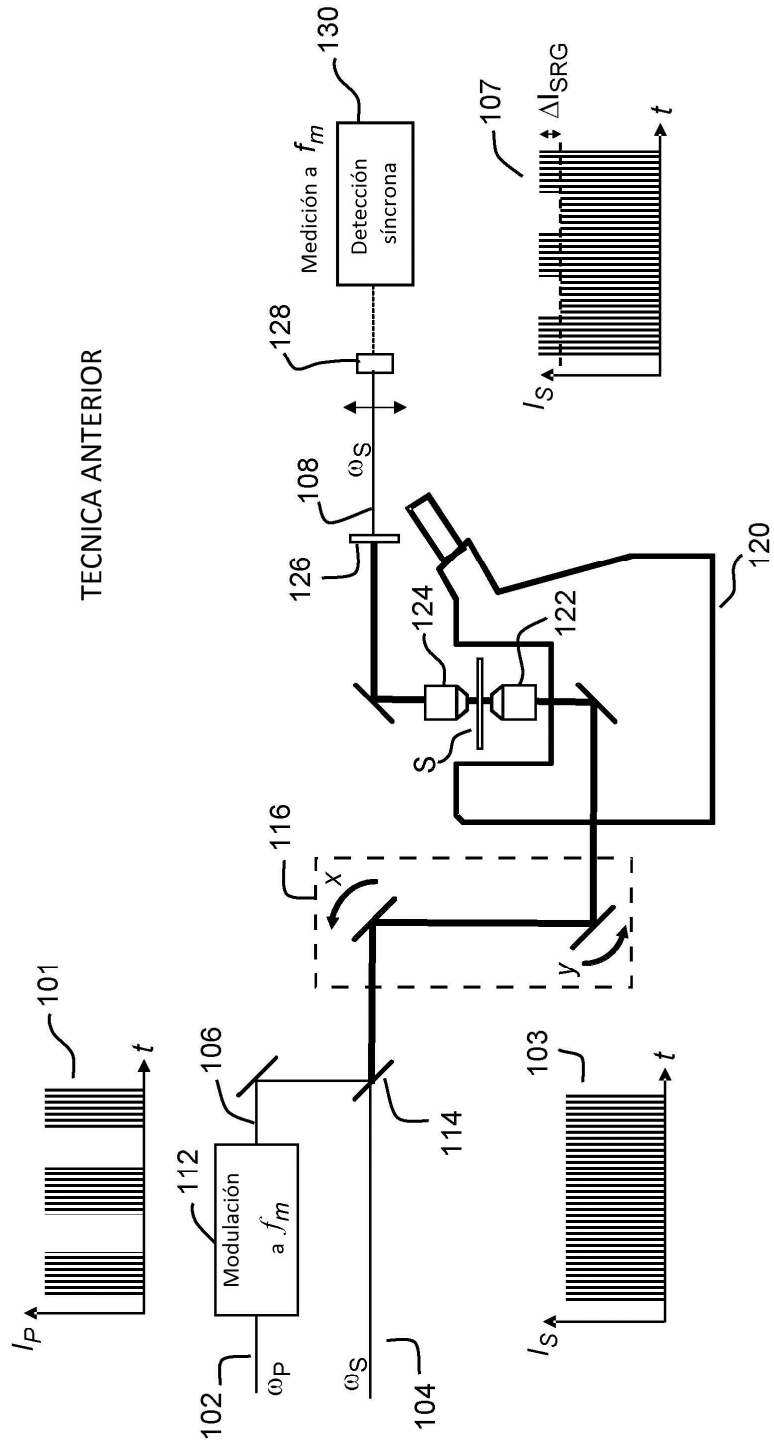


FIG.2

TECNICA ANTERIOR

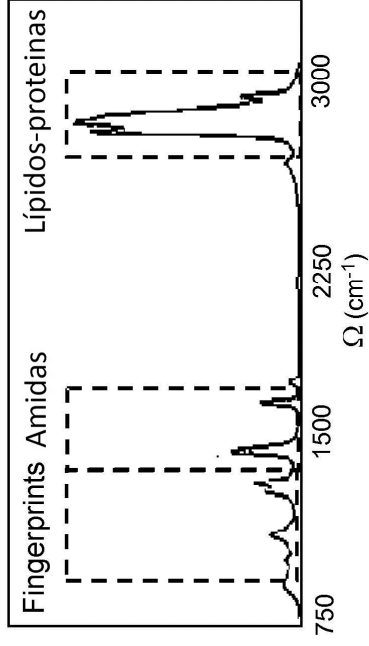


FIG.3A

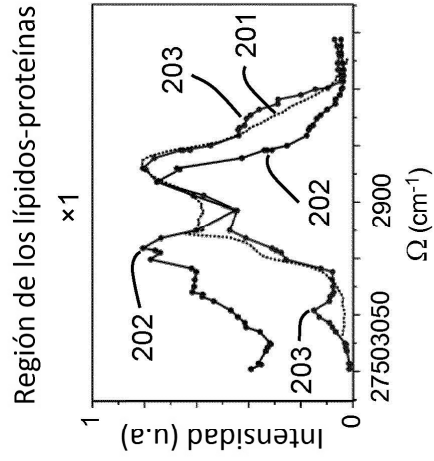


FIG.3B

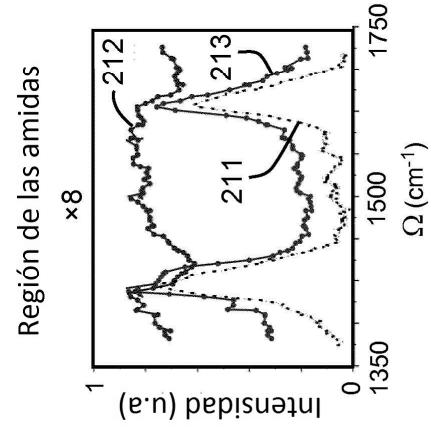


FIG.3C

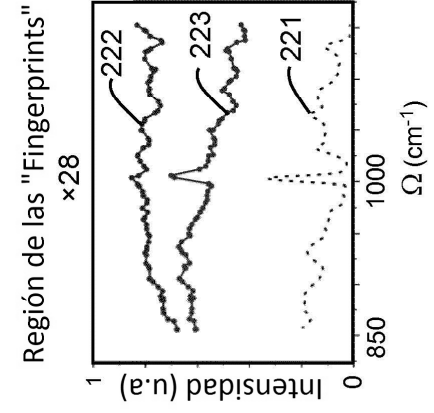


FIG.3D

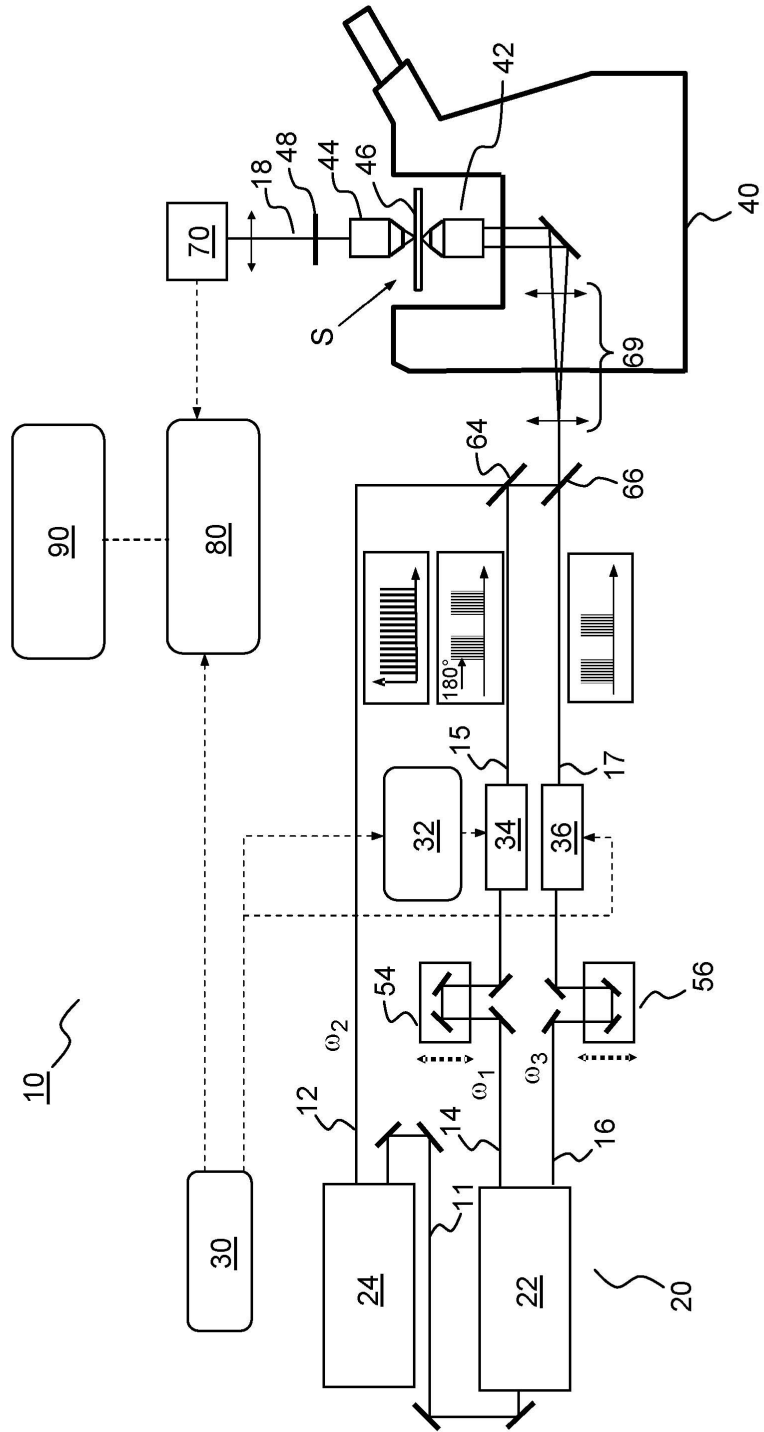


FIG.4

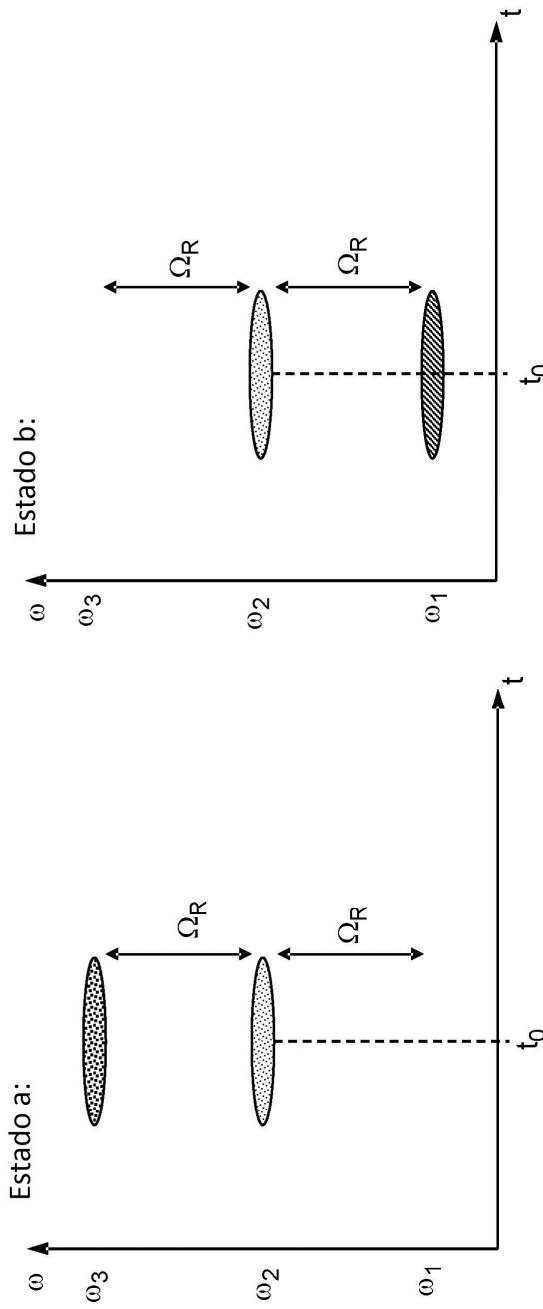


FIG. 5B

FIG. 5A

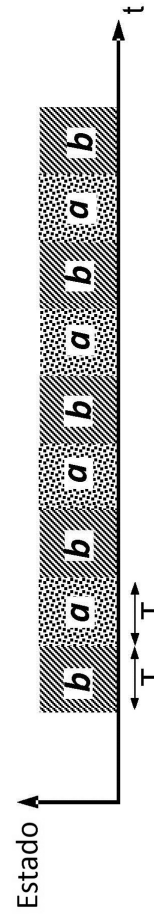


FIG. 5C

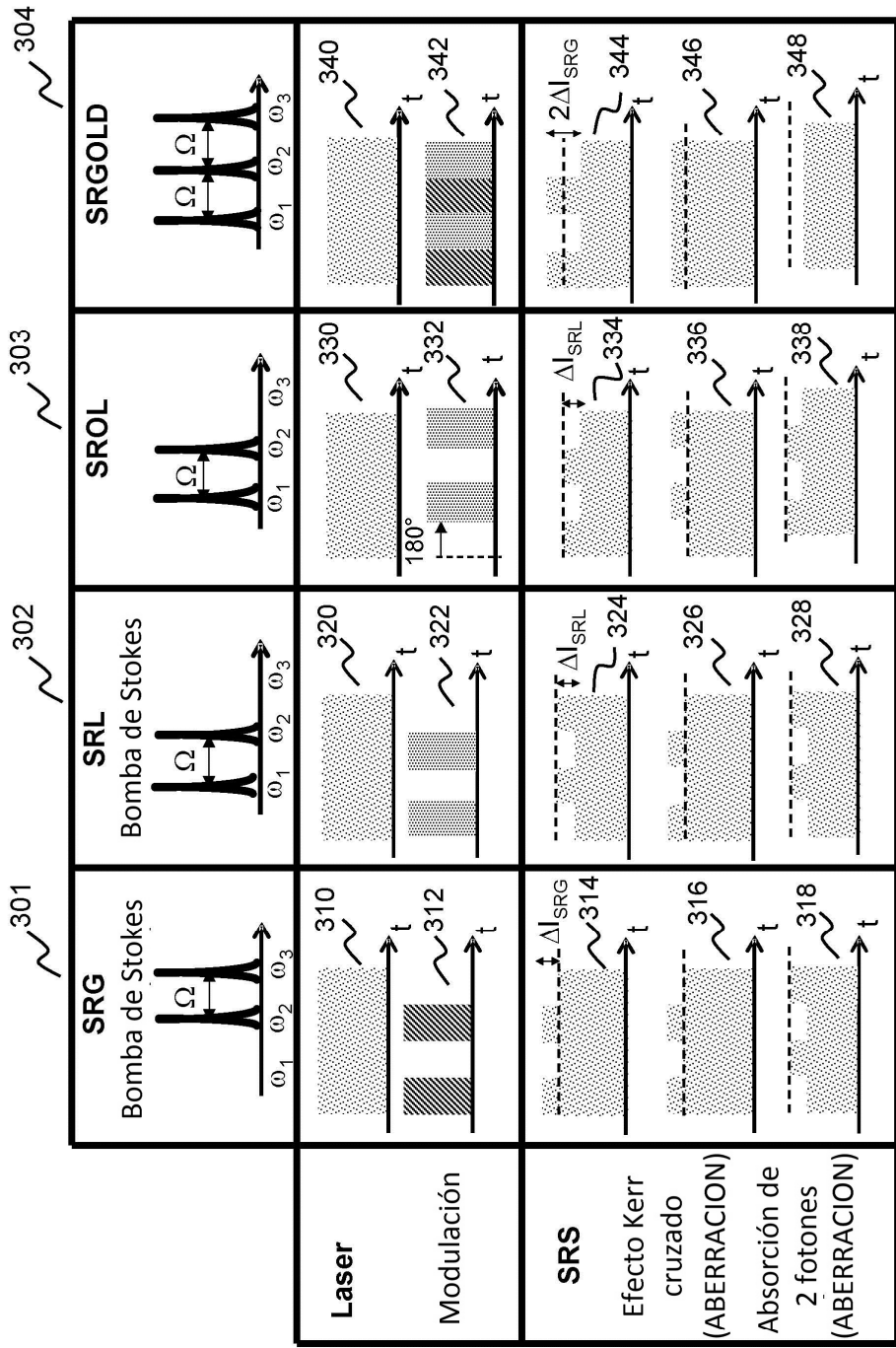


FIG.6

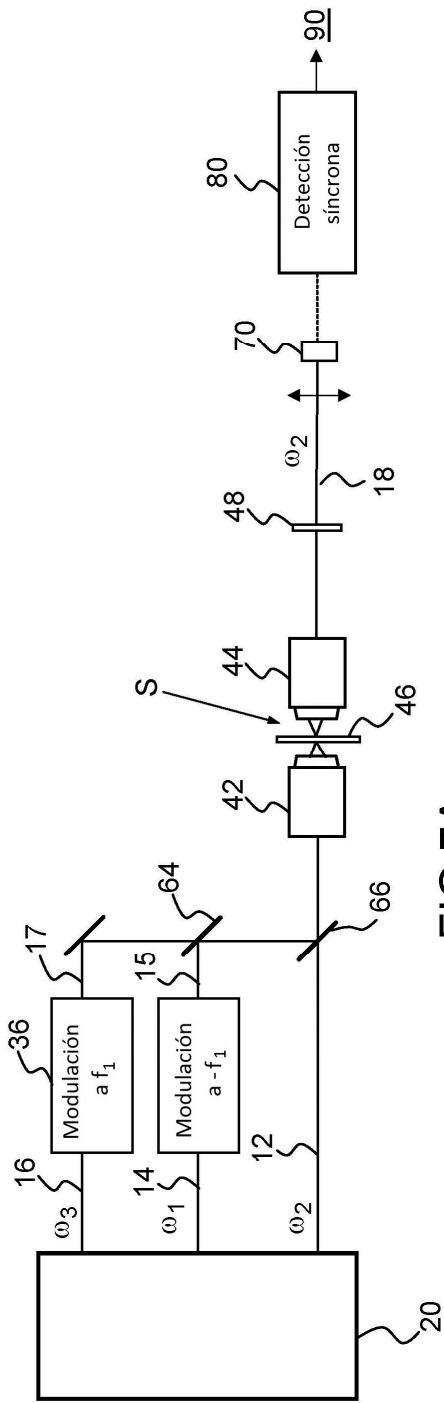


FIG. 7A

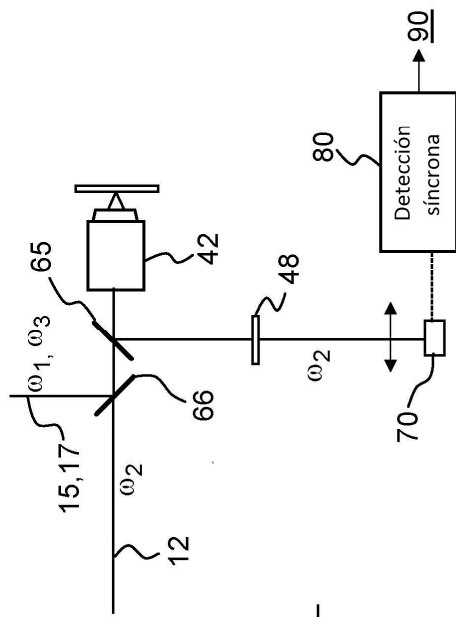


FIG. 7B

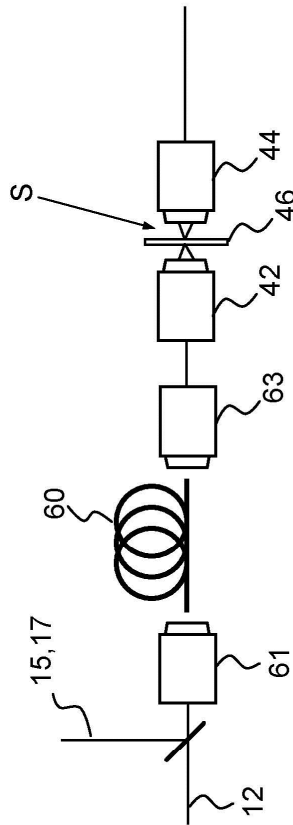


FIG. 7C

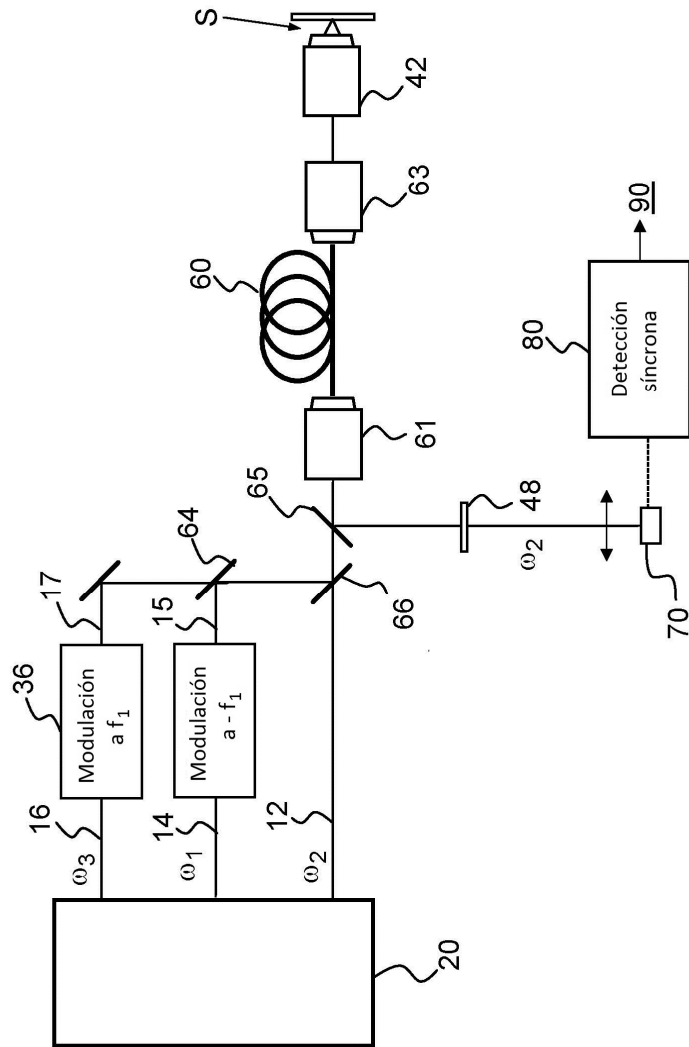


FIG.7D

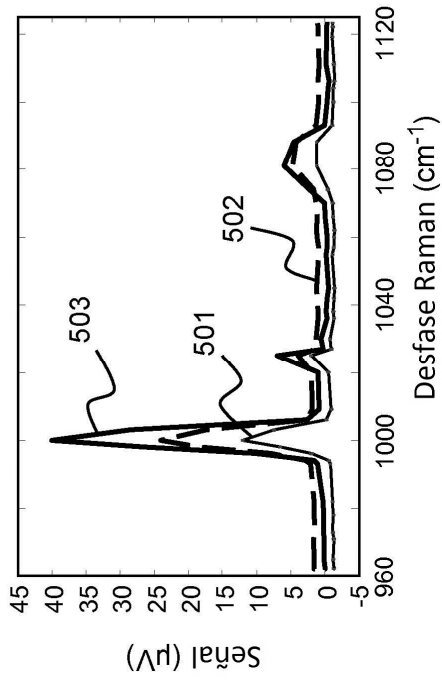


FIG.8A

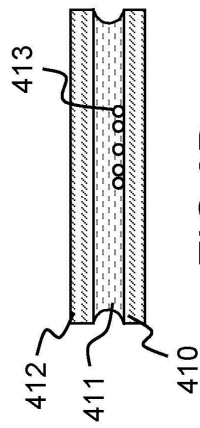


FIG.8B

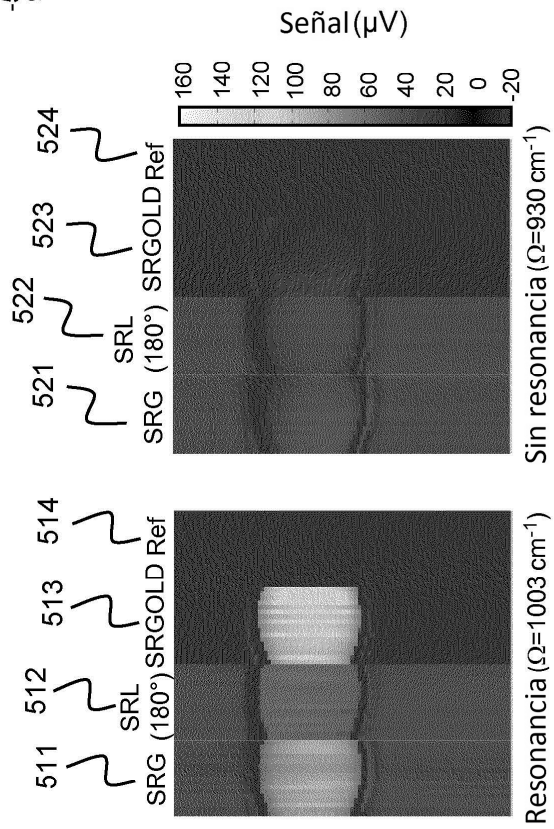


FIG.8C

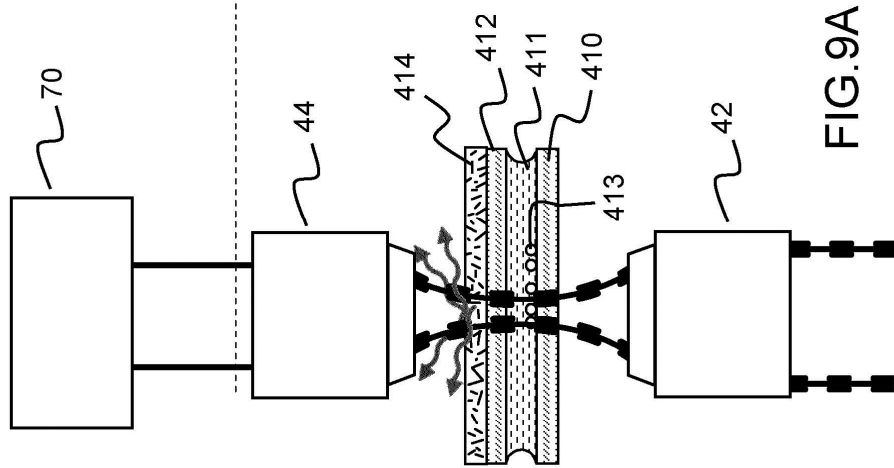


FIG. 9A

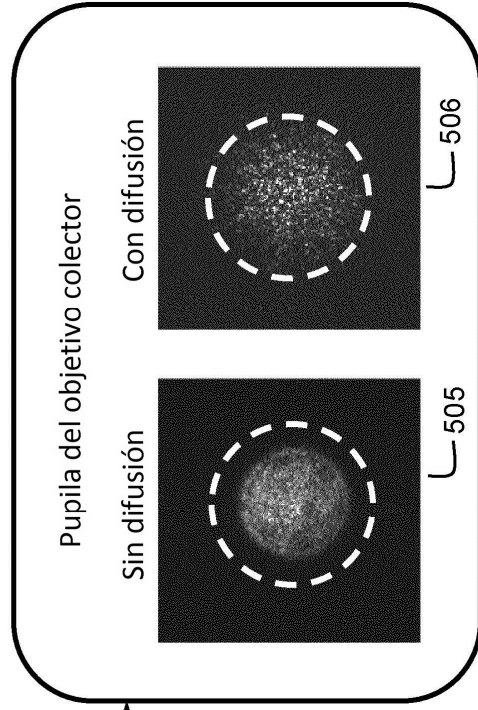
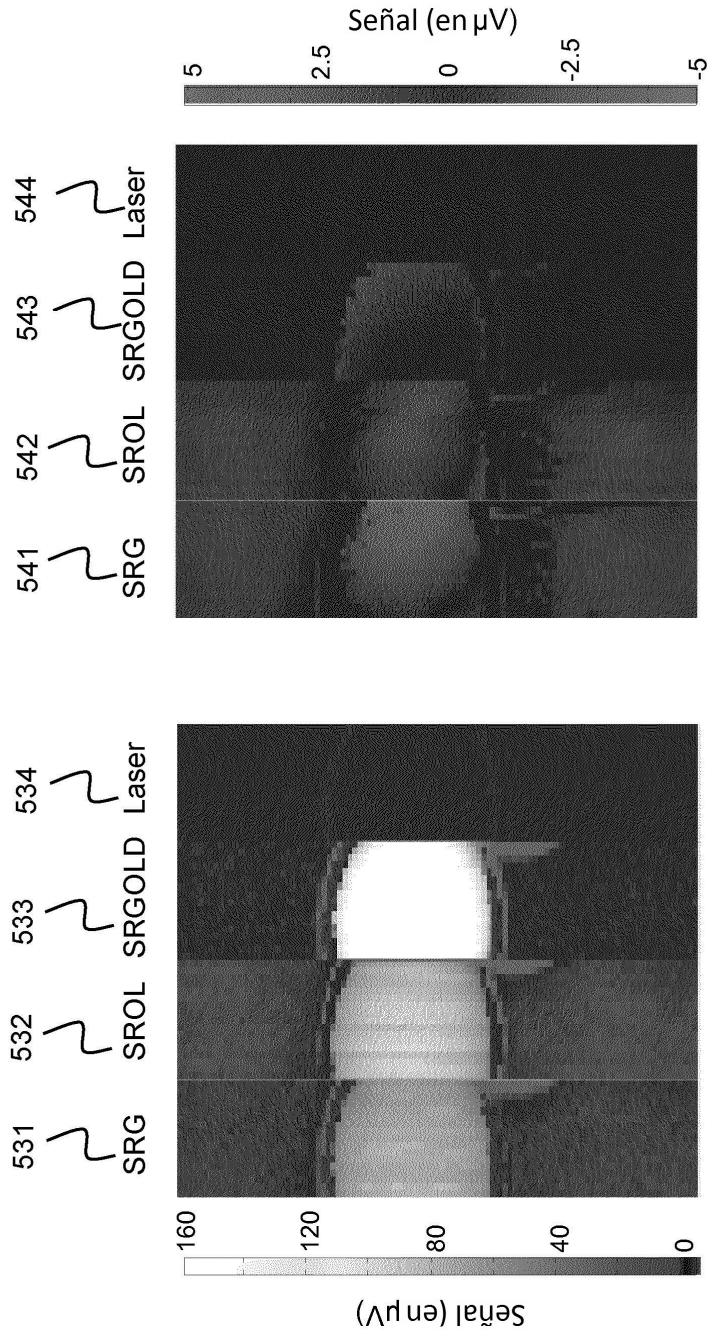


FIG. 9B

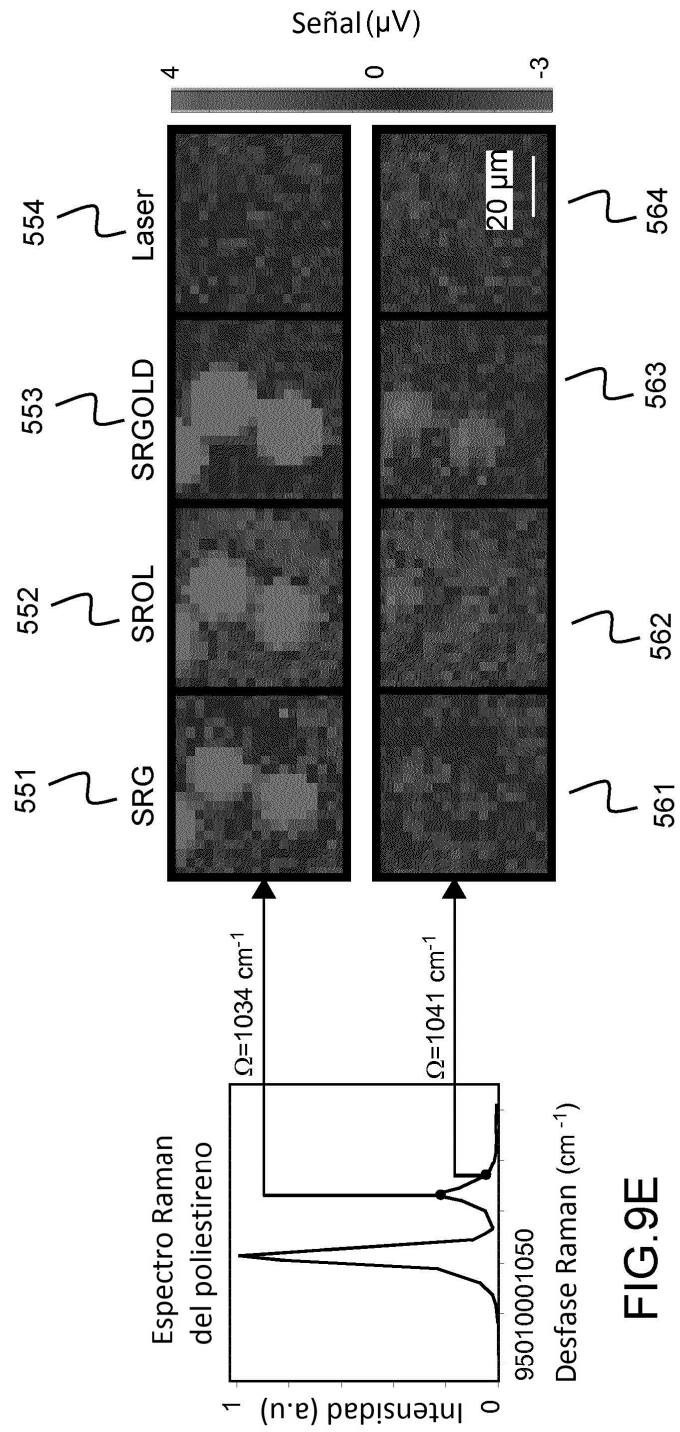


Sin resonancia (930 cm⁻¹)

Resonancia (1003 cm⁻¹)

FIG.9D

FIG.9C



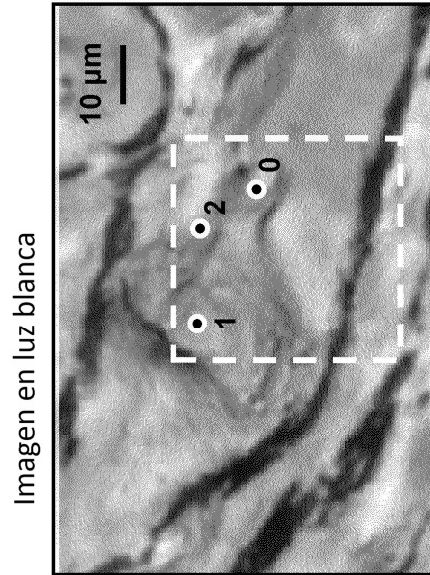


FIG.10A

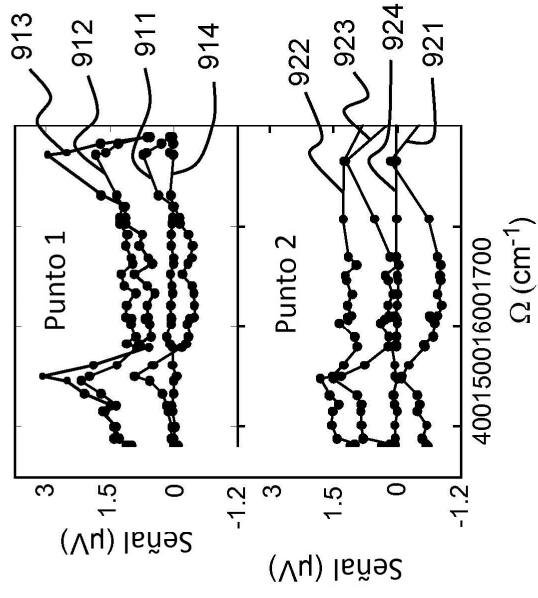


FIG.10B

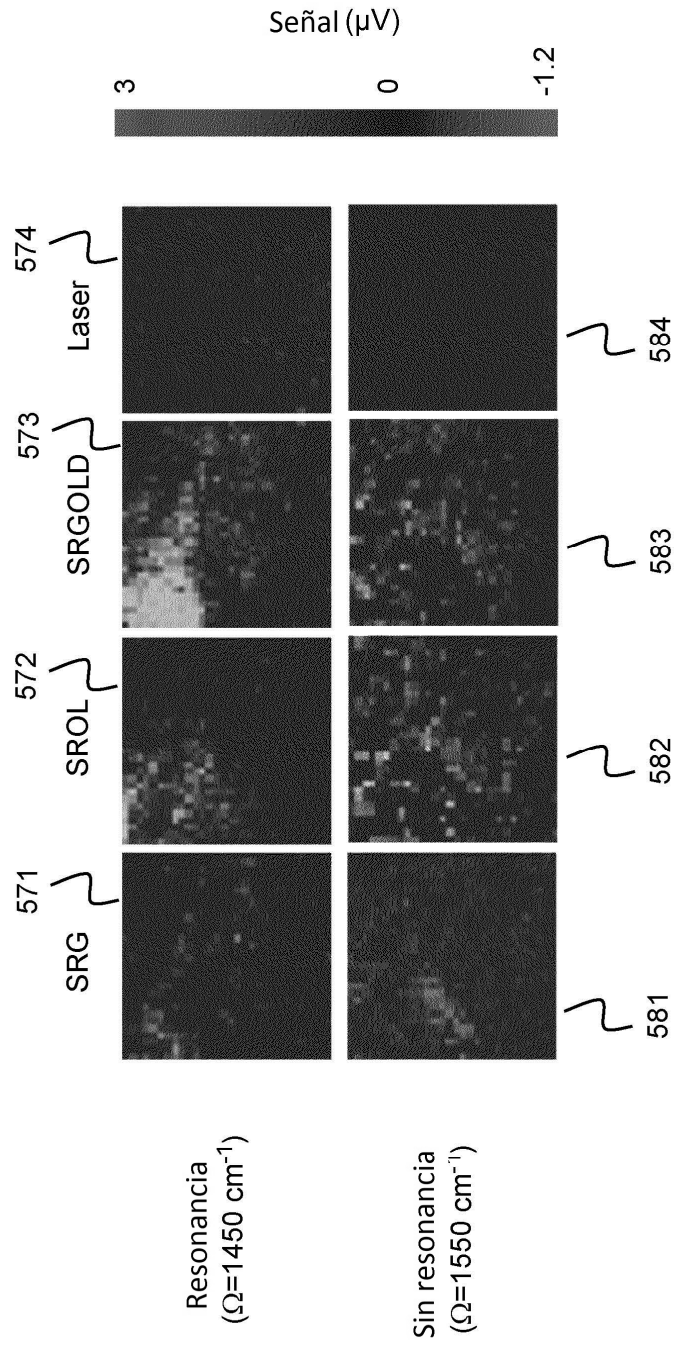


FIG.10C

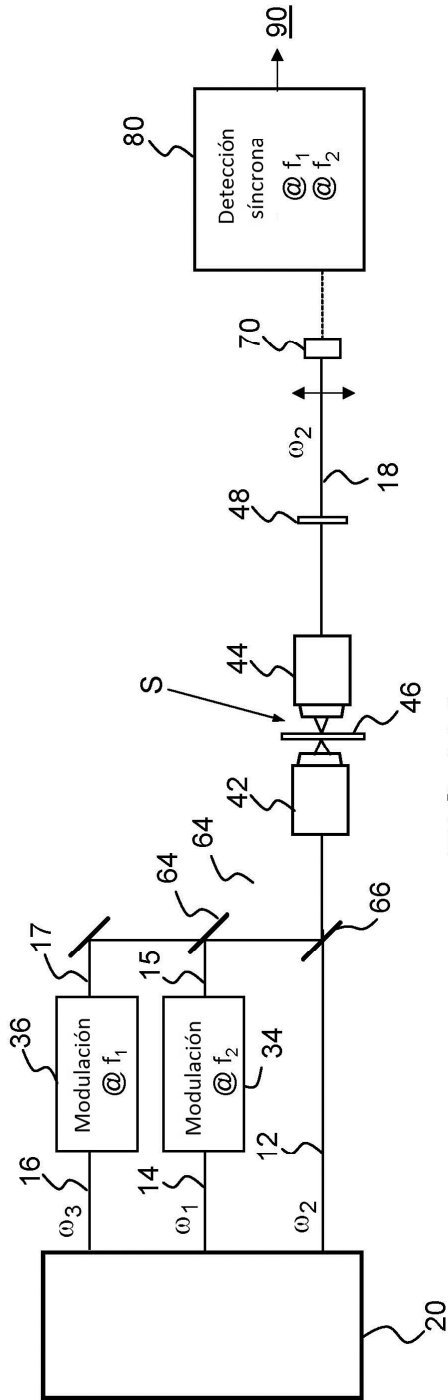


FIG. 11A

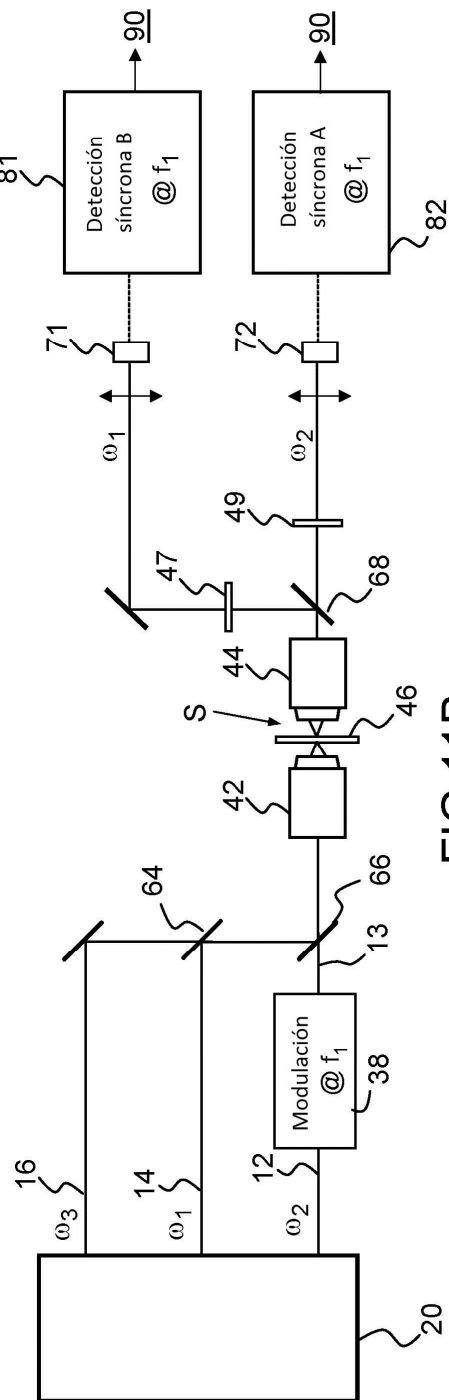


FIG. 11B

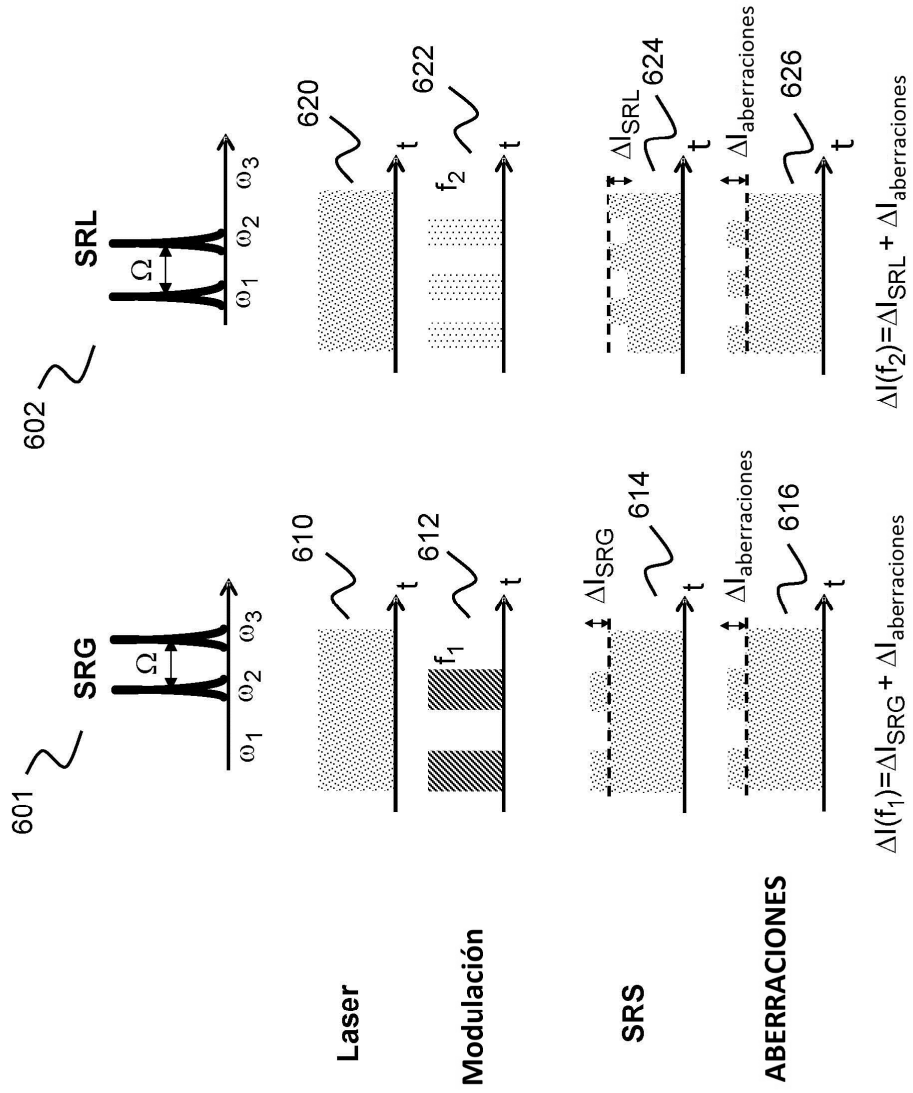
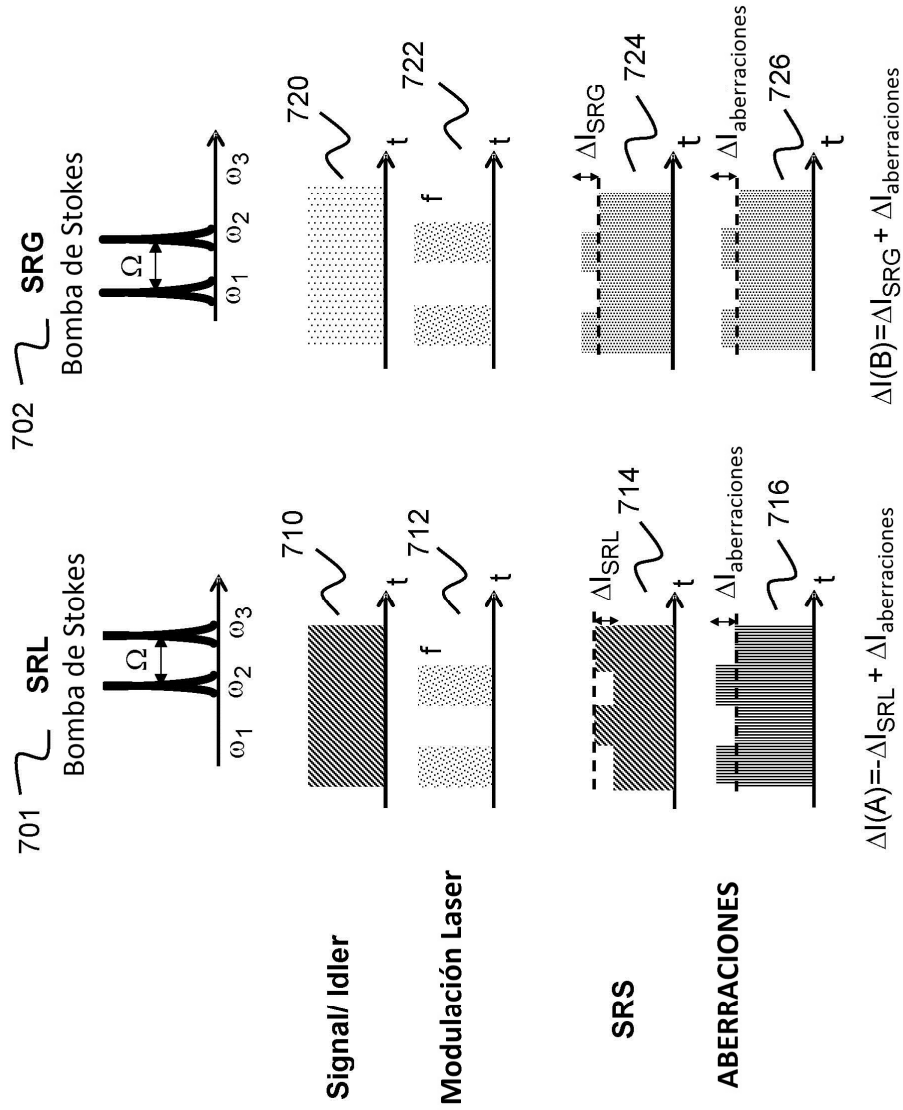


FIG.12A



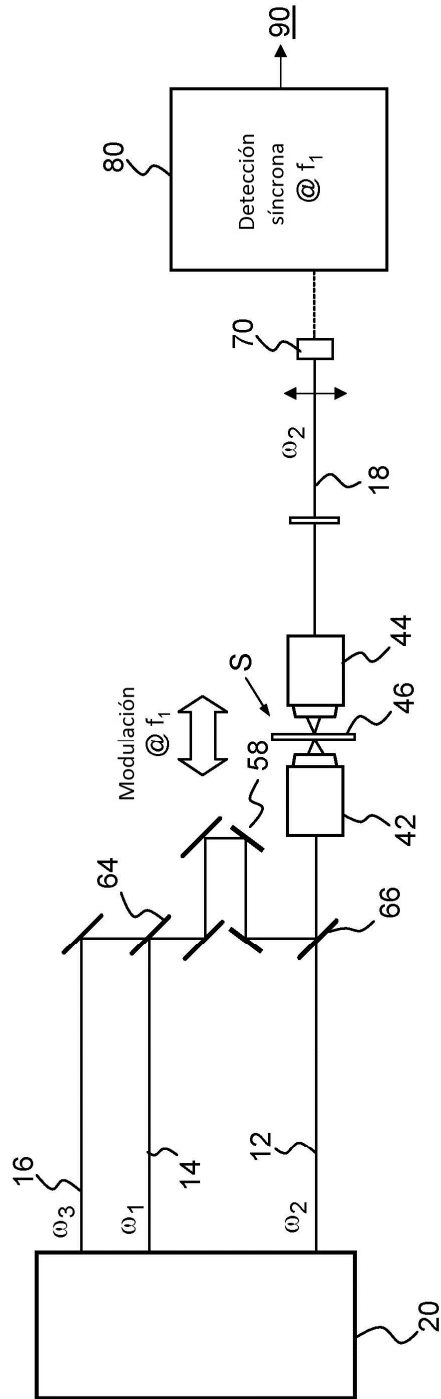


FIG.13

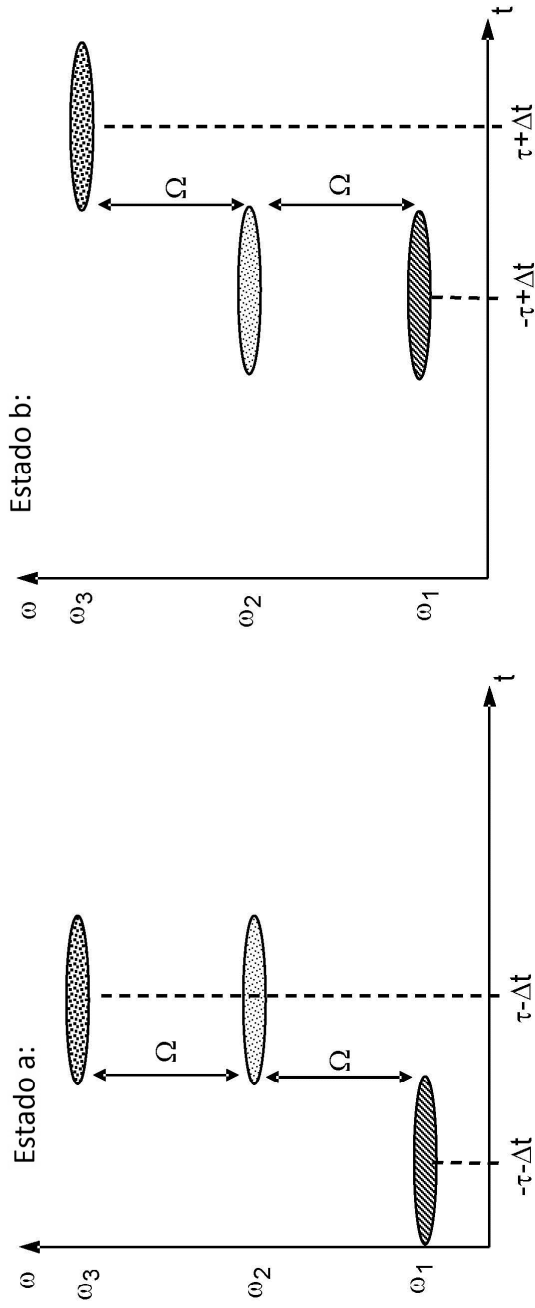


FIG. 14A

FIG. 14B

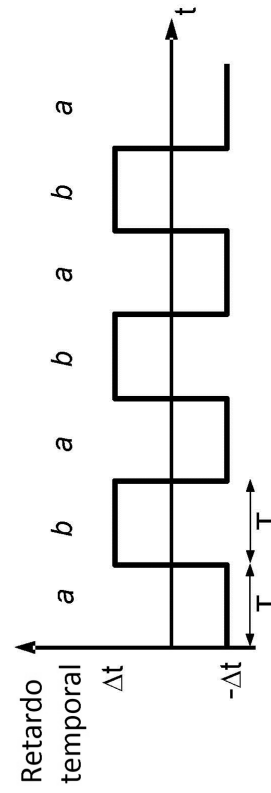
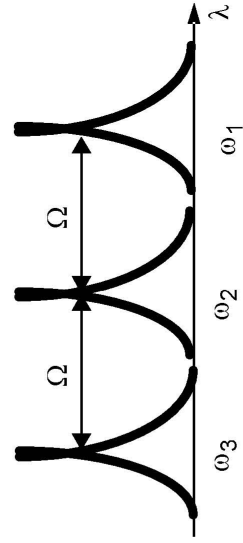
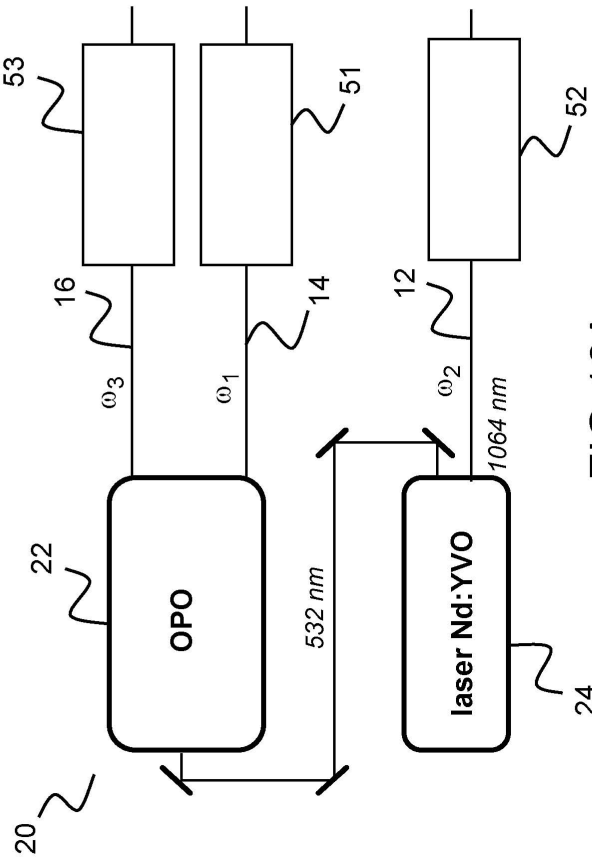


FIG. 14C



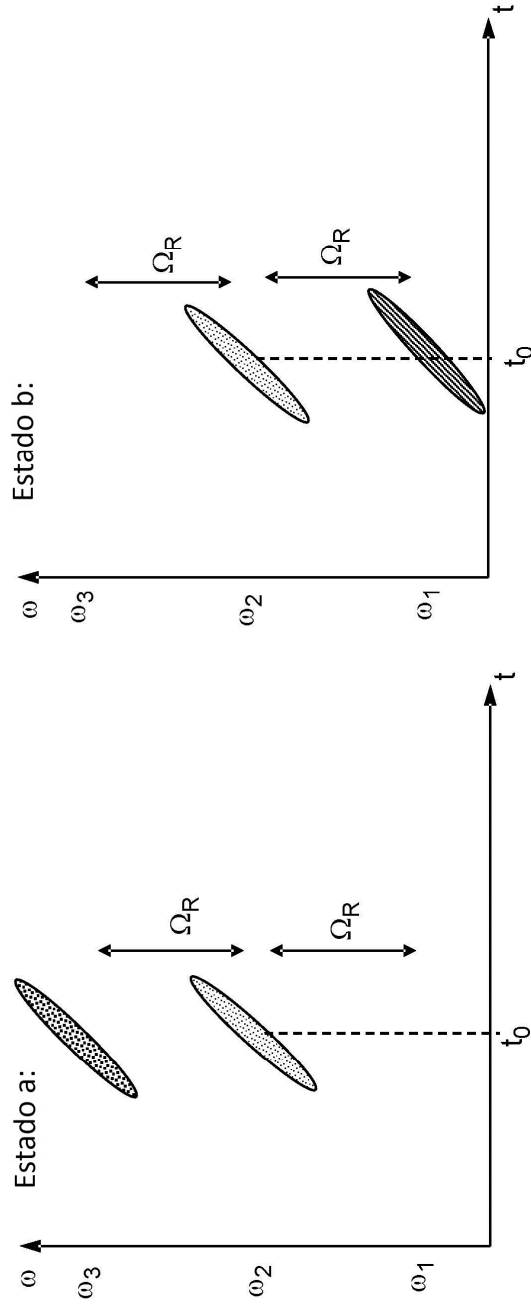


FIG.17A

FIG.17B

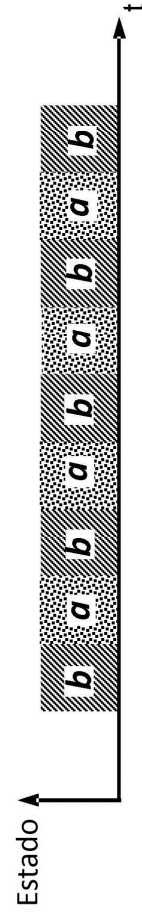


FIG.17C