

# Le MICROSCOPE OPTIQUE (champ lointain)



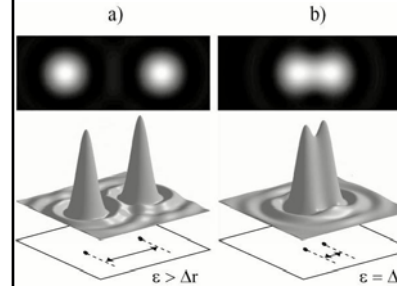
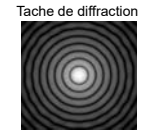
Des images et transparents  
sont inspirés du cours du M2 LUMI  
(Lumière, matière, Interactions) de Alexandra Fragola

Agnès Maître, Sorbonne Université

Décembre 21

Propriétés d'imagerie

## Résolution latérale : critère de Rayleigh



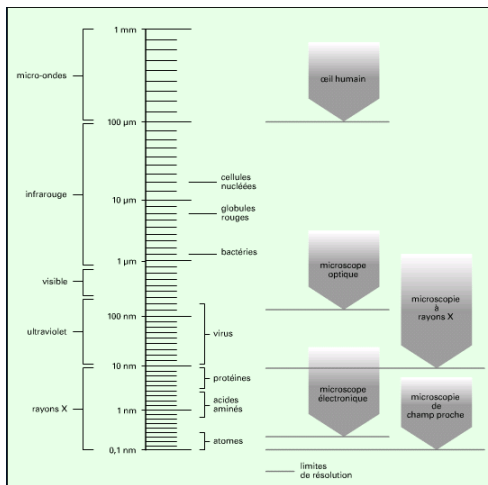
Pour une optique limitée  
par la diffraction

$$\Delta r = \frac{1,22\lambda f}{D} = \frac{1,22\lambda}{2} \frac{f}{D/2}$$

$$\Delta r = \frac{1,22\lambda}{2 \text{ ON}}$$

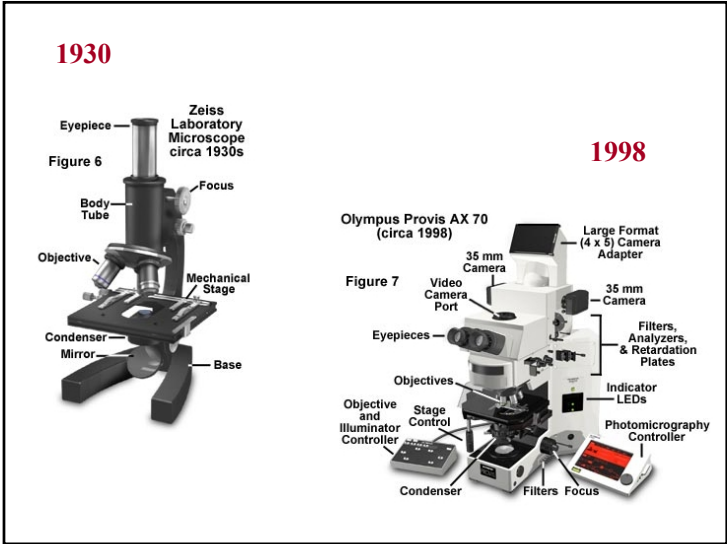
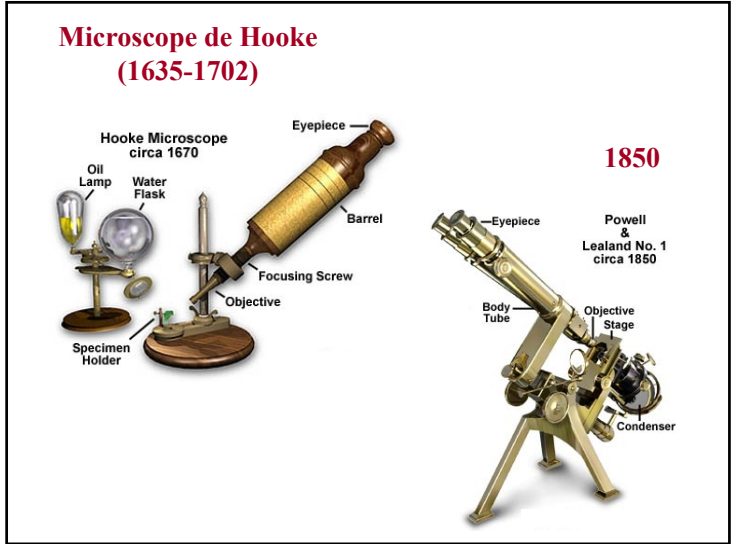
La résolution est limitée à  $\lambda/2 \sim 200$  à  $400$  nm dans le visible

## Que peut-on voir à l'œil nu ?



## Quelques repères historiques...

- fin du XVI<sup>e</sup> siècle : regarder « à la loupe » non plus directement un objet, mais son image agrandie
- 1615 : Galilée (1564-1642) utilise un instrument à deux lentilles pour observer de petits objets
- 1625 : l'Accademia dei Lincei, à Rome, propose le mot *microscopium*
- à partir de 1660 : progrès notables avec les travaux d'Antoine van Leeuwenhoek (1632-1723), « microscope simple », et de Robert Hooke (1635-1702), « microscope composé »
- 1863 : Nacht, avec la collaboration de l'opticien Duboscq, construit l'ancêtre du microscope moderne avec un condenseur à fond noir
- 1893 : éclairage de Köhler
- 1935 : Zernike invente le microscope à contraste de phase
- 1952 : Nomarski invente le microscope interférentiel différentiel
- 1931 : Kroll et Ruska, premier microscope électronique
- seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle : microscopies de champ proche



### Le microscope « d'autrefois »

1) l'objectif forme une image à distance finie

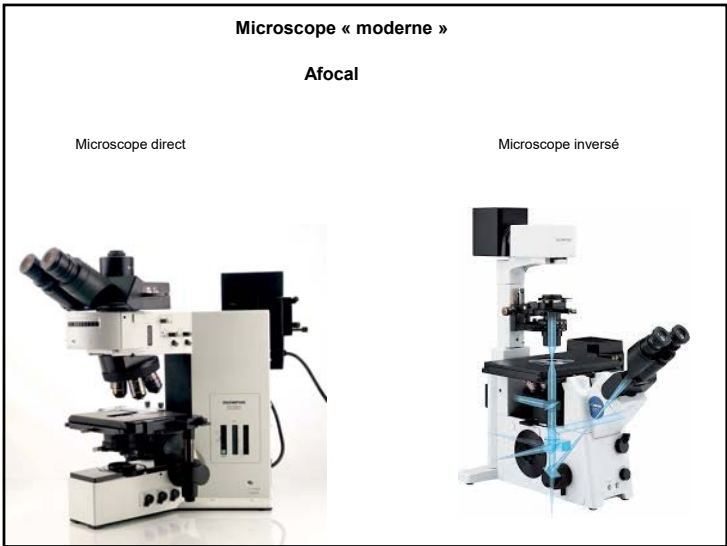
objectif  $L_1$  : diamètre et longueur focale  $f_1$  très petits, quelques millimètres

oculaire  $L_2$  : diamètre et longueur focale  $f_2$  de quelques centimètres

distance  $F_1' - E_2$  : de l'ordre de 20 cm

image renversée

Voir leçon



## Le microscope « moderne »

**Configuration afocale**

L'objectif forme une image à distance **infinie**

**Imagerie:**

- lentille de tube (fixe, par ex 16cm)
- objectif

**Grandissement**  
 $G = F_{obj} / F_{tube}$

**Grossissement**  
 $g = F_{tube} / F_{obj}$

### Anatomie du microscope

**Eclairage**

**Objectif, lentille de tube**

Filtres

**Détection**

## Modes d'éclairage

Echantillons transparents ou opaques

éclairage en transmission

éclairage en réflexion

objectif = condenseur

## Eclairage de Köhler (1893)

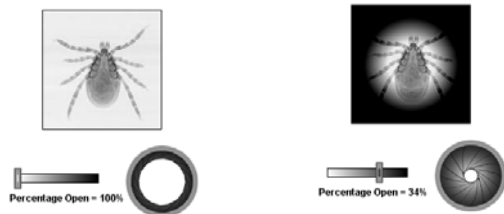
éclairage uniforme sur l'échantillon

2 conjugaisons : filament ↔ foyer objet du condenseur  
 diaphragme de champ ↔ échantillon

**Diaphragme d'ouverture:** luminosité+ incidence d'éclairage  
**Diaphragme de champ:** champ d'éclairage (taille)

Anatomie du microscope

## Diaphragme de champ



## Optimisation de l'éclairage



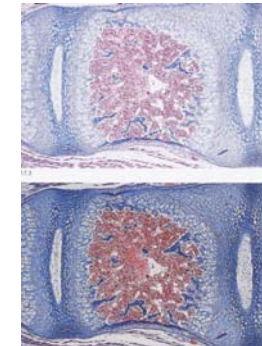
1. Diaphragme de champ fermé, condenseur pas encore optimisé



2. La position du condenseur est optimisée pour rendre les bords du diaphragme nets.

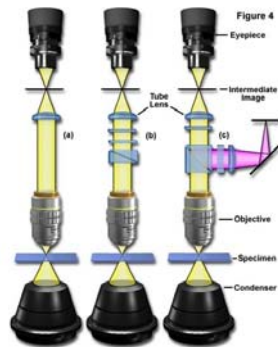


3. Le diaphragme de champ est centré puis ouvert, de façon à juste recouvrir le champ.



4. Le contraste de l'image peut finalement être ajusté grâce au diaphragme d'ouverture

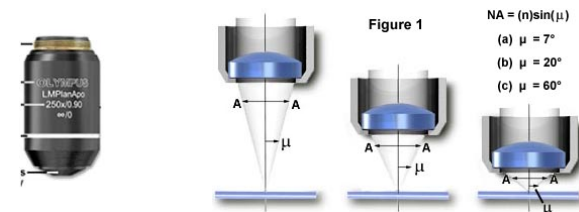
## Intérêt des objectifs « à l'infini »



## Objectifs: ouverture numérique

• **ouverture numérique ON =  $n \cdot \sin(\alpha)$**

$\alpha$  demi-angle maximal sous lequel l'objet immergé dans un milieu d'indice  $n$  peut être observé par l'objectif



### augmenter la résolution

⇒ forte ouverture numérique

La « Point Spread Function » (PSF) s'affine quand l'ON augmente

PSF: image d'un point source par le microscope (G=1)

- objectifs à air :  $ON \leq 1$
- objectifs à immersion :  $1,4 > ON > 1$   
résolution maximale ~ 0,2 μm

**Common Immersion Media**

Material	Refractive Index
Air	1.0003
Water	1.333
Glycerin	1.4695
Paraffin oil	1.480
Cedarwood oil	1.515
Synthetic oil	1.515
Anisole	1.5178
Bromonaphthalene	1.6585
Methylene iodide	1.740

### Profondeur de champ

Résolution verticale = profondeur de champ

(liée à la diffraction)

$$\Delta z = \frac{\lambda \sqrt{n^2 - ON^2}}{ON^2}$$

On ne perd pas en résolution quand a est plus petit que le rayon de la tache de diffraction  
PSF: rayon =  $1.22 \lambda / (2 ON)$      $a = \Delta z / 2 \tan \alpha \Rightarrow \Delta z = 1.22 \lambda / (ON \tan \alpha)$

➔ Profondeur de champ ΔZ       $\lambda = 550 \text{ nm}, ON = 0.65, n = 1 \Rightarrow \Delta z = 1 \mu\text{m}$

- grande ouverture numérique (entre 0,95 et 1,45) ⇒ petite distance de travail et petite profondeur de champ

### Correction des aberrations

Différents types de lentilles simples à combiner pour corriger les aberrations

Exemples d'objectifs corrigés

### L'aberration sphérique

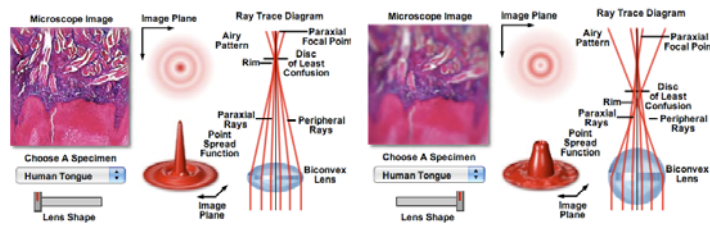
- seule aberration présente sur l'axe du système optique
- par raison de symétrie, sa tache de diffusion est de révolution

Longitudinal and Transverse Spherical Aberration

Figure 1

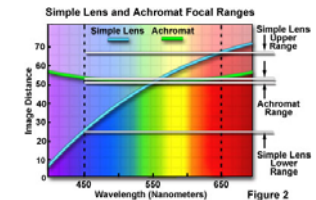
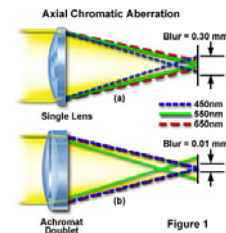
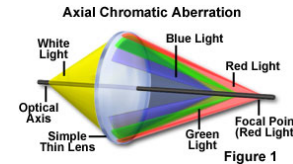
### L' aberration sphérique

- seule aberration présente sur l'axe du système optique
- par raison de symétrie, sa tache de diffusion est de révolution



### Aberration chromatique

dispersion dans le verre  
d' indice  $n(\lambda)$



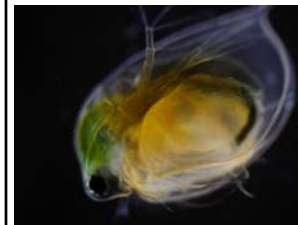
### Les objectifs



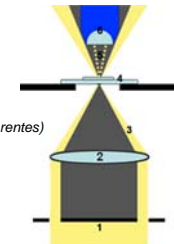
- La pupille arrière de l'objectif est le plan de fourier de l'objectif

Plein champ

### Microscopie en fond sombre



Eclairage annulaire



Sur l'échantillon  
éclairage uniforme  
(somme d'ondes plane incohérentes)

Par Ziluba de de.wikipedia.org, CC BY-SA 3.0,  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12776870>

- Microscope en champ sombre avec diaphragme central. L'éclairage en jaune. 1 - Diaphragme central, 2 - Condenseur, 3 - Cône lumineux, 4 - Plan de l'échantillon (à la distance  $f$  du condenseur), 6 - Objectif.

Eclairage: lumière diffractée par l'échantillon + lumière non affectée (fond continu)

Augmenter le contraste: supprimer le fond continu en filtrant spatialement

- Par l'objectif
- ou
- Par un anneau conjugué au diaphragme d'éclairage

**Plein champ** **Microscopie à contraste de phase**

Plans conjugués (phase de +/-Pi/2 supplémentaire sur l'éclairage)

Specimen = objet de phase

Eclairage  $E_0 \sin(\omega t)$

Après l'objet de phase  
 $E = E_0 \sin(\omega t + \varphi(x,y)) = E_0 \sin(\omega t) \cos(\varphi(x,y)) + E_0 \cos(\omega t) \sin(\varphi(x,y))$   
 soit  $E = E_0 \sin(\omega t) + E_0 \varphi(x,y) \cos(\omega t)$

Sur la lame de phase, là où l'éclairage est focalisé, on rajoute une phase de  $-\pi/2$

Plan image  $E = E_0 \cos(\omega t) (1 + \varphi(x,y))$  L'information de phase est transformée en information d'intensité

Image de l'échantillon

**Plein champ** **Microscopie à contraste de phase**

Plans conjugués (phase de +/-Pi/2 supplémentaire sur l'éclairage)

Image de l'échantillon

cellule épithéliale de joue

Wikipedia  
 Spencer Diamond at the Biological Imaging Facility in Koshland Hall, UC Berkeley.

**Plein champ: éclairage par lampe** **Microscopie de Fluorescence** <https://www.microscopyu.com/>

**Point par point: éclairage par laser (confocal+ fluorescence)**

Supprimer par filtrage spectral l'excitation

Les marqueurs sont des nanomètres: molécules fluorescentes, nanocristaux semi-conducteurs, ...

**Plein champ: éclairage par lampe** **Microscopie de fluorescence**

**Point par point: éclairage par laser**

Détecteur

Excitation

émission

Echantillon

Filtres de fluorescence

Dichroïque

Excitation

Emission

**Point par point:** **Microscopie confocale** **3D**

Augmente la résolution latérale (r) et axiale (en Z) (on diminue la profondeur de champ)

détecteur  
Diaphragme (conjugué avec le spot laser)  
Laser  
Echantillon

Plein champ Focalisé (confocal)

Image 3D en scannant en r et Z

<https://www.microscopyu.com/>

**Point par point:** **Microscopie confocale** Point par point Image reconstruite (latéral + axial) z-series

Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy

Figure 6

<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>

**Microscopie par cohérence optique** (OCM, ou OCT (tomographie)) **3D**

Plein champ: éclairage par lampe Interféromètre de Michelson  
Point par point: éclairage par LED Eclairage: basse cohérence temporelle (résolution en z:  $l_c$ )

Bras de référence bouge Bras de référence fixe

Obj<sub>0</sub>: Objectif de microscope (conjugé à l'infini) à grande f/numéro  
LS: Lame semi-réfléchissante 50% avec compensation de retard  
M: Miroir plan de référence  
Rak: Réseau à l'observateur  
La présence de micro-bulbes une observation correcte dans le système optique.

<http://www.optique-ingénieur.org/fr>

**Optique pour l'ingénieur (OFI)**

OCT scan of a retina at 800nm with an axial resolution of 3 $\mu$ m.

By Maine Eye Center - Bruce C. Cooper, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=525623>

**Point par point:** **Microscopie multiphotonique** **Superrésolution**

Optique linéaire Phénomènes à 2 photons

1 photon excitation  
2-photons excitation

Confocal Multiphotonique (pas de diaphragme)

Image reconstruite

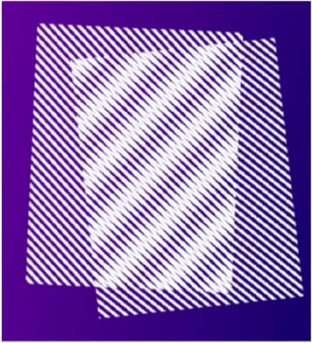
Thèse Claire Teulon, LOB, oct 2016  
<https://www.microscopyu.com>



*Plein champ (mais reconstruction)* **Superrésolution**

Super resolution par illumination structurée

Moiré : baisse la fréquence spatiale



Vincent Croquette ESPCI

**Super resolution par illumination structurée** **Superrésolution**

$K = k_{\text{objet}} - k_{\text{grille}}$

On choisit  $k_{\text{grille}} = k_{\text{max}}$

Limité par l'ON de l'objectif  
Normally observable information  $k < k_{\text{max}}$

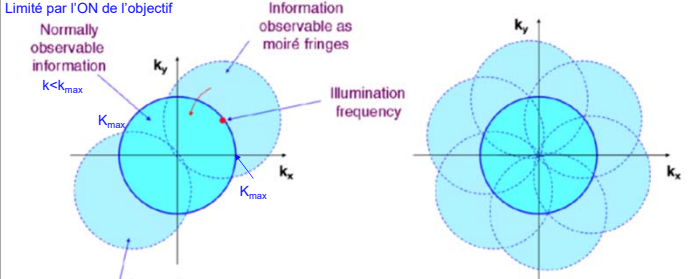
Information observable as moiré fringes

Illumination frequency

You get this region for free...


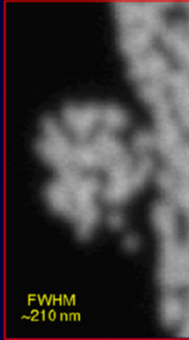
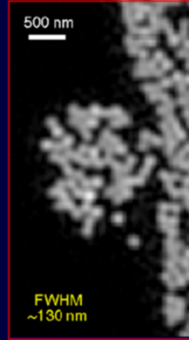
...and can repeat in many directions

$K_{\text{objet, max}} = 2k_{\text{max}}$  → On gagne un facteur 2 sur la résolution



**Super resolution par illumination structurée** **Superrésolution**

**120 nm microspheres**

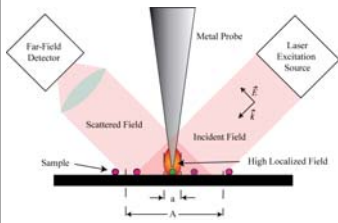
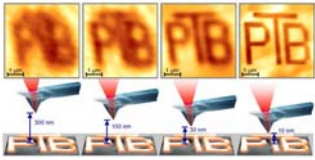
Conventional microscopy	Confocal (Pinhole = 1/4 Airy)	Structured Illumination microscopy
		
FWHM ~290 nm	FWHM ~210 nm	FWHM ~130 nm

**Point par point:** **Superrésolution**

**Microscopie optique à champ proche**

conventional microscopy: resolution limit, features  $\leq \lambda/2$  are not resolved

near-field optical microscopy: defraction limit circumvented, much smaller features can be resolved

*Les nouvelles microscopies (chap 1) / L. Aygouy et al*