

Le MICROSCOPIE OPTIQUE (champ lointain)

*Beaucoup d'images et de transparents
sont extraits du cours du M2 LuMI
(Lumière, matière, Interactions)*

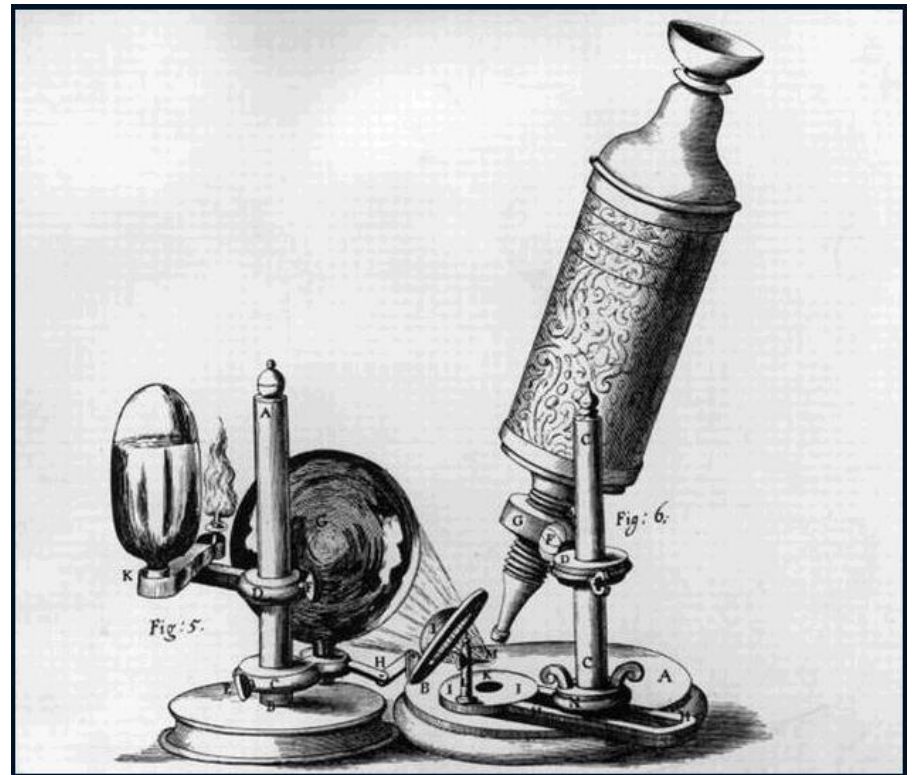
de Alexandra Fragola

*Laboratoire de Physique et Etude des
Matériaux, UPMC*

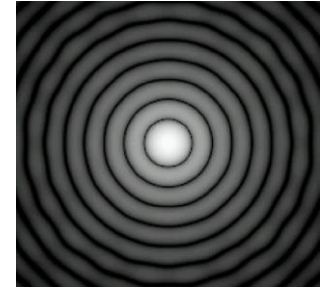
D autres images sont extraites de
Wikipedia, Hecht, ...

Beaucoup d images et dinformations sur

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

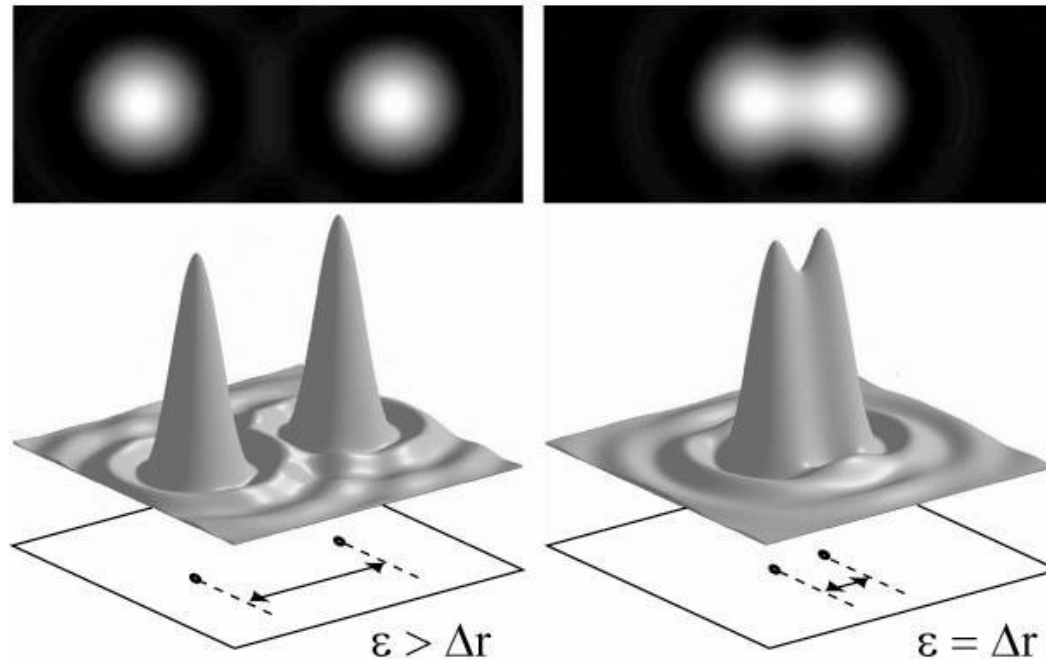


Résolution latérale : critère de Rayleigh



a)

b)



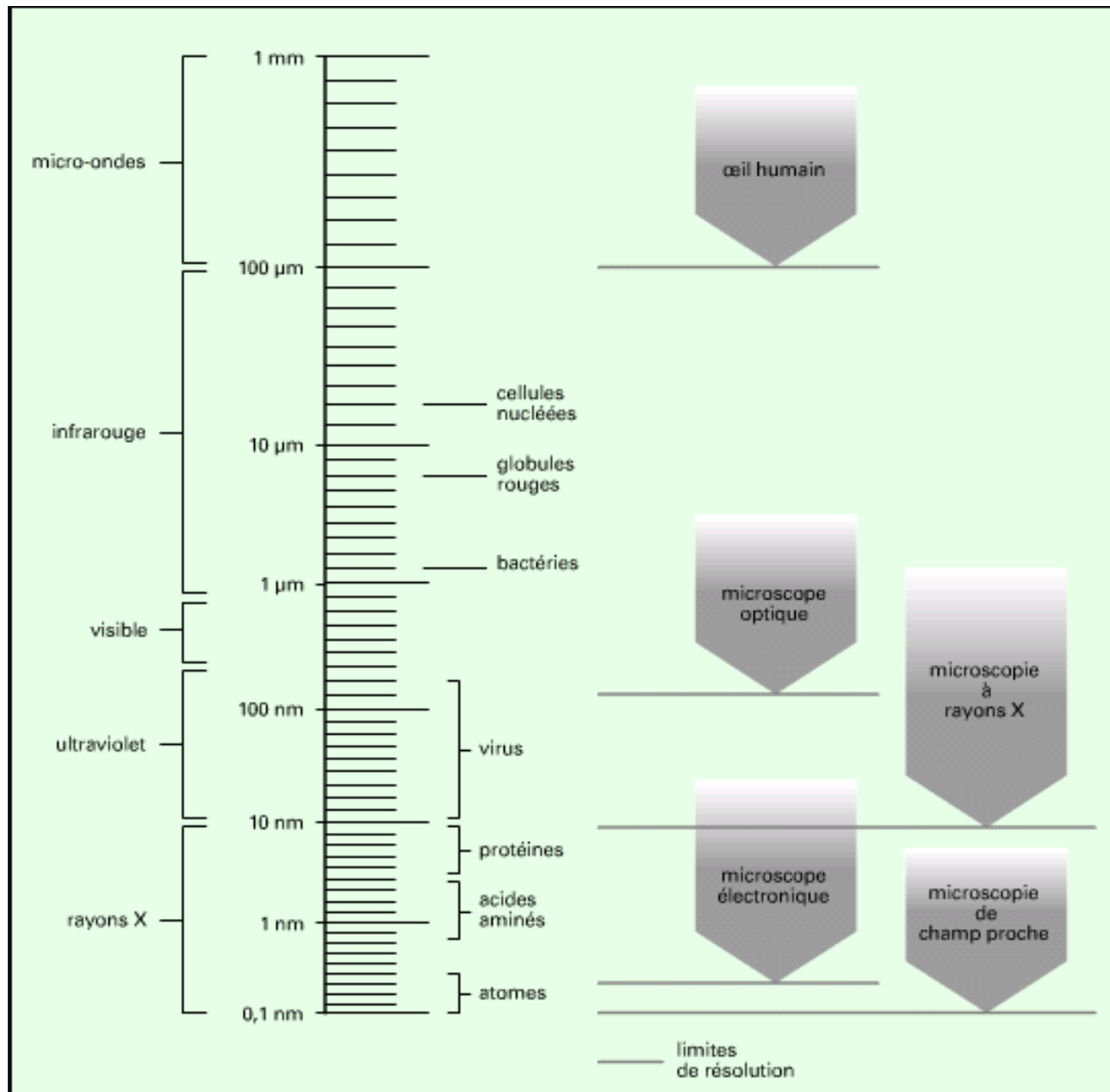
Pour une optique limitée
par la diffraction

$$Dr = \frac{1,22 / f}{D} = \frac{1,22 /}{2} \frac{f}{D/2}$$

$$Dr = \frac{1,22 /}{2 \text{ ON}}$$

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

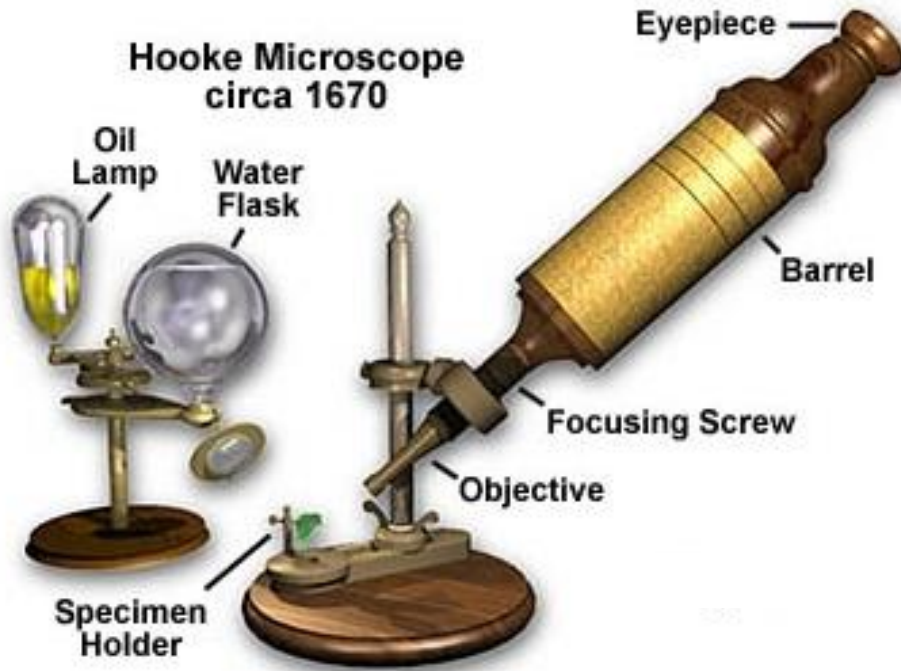
Que peut-on voir à l'oeil nu ?



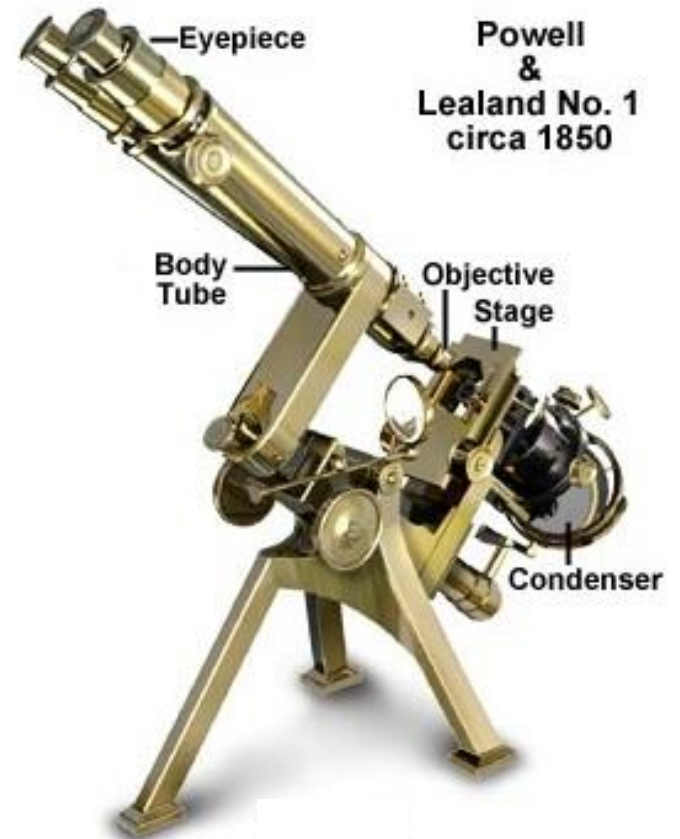
Quelques repères historiques...

- fin du XVI^e 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 : Nachet, 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^{ème} siècle : microscopies de champ proche

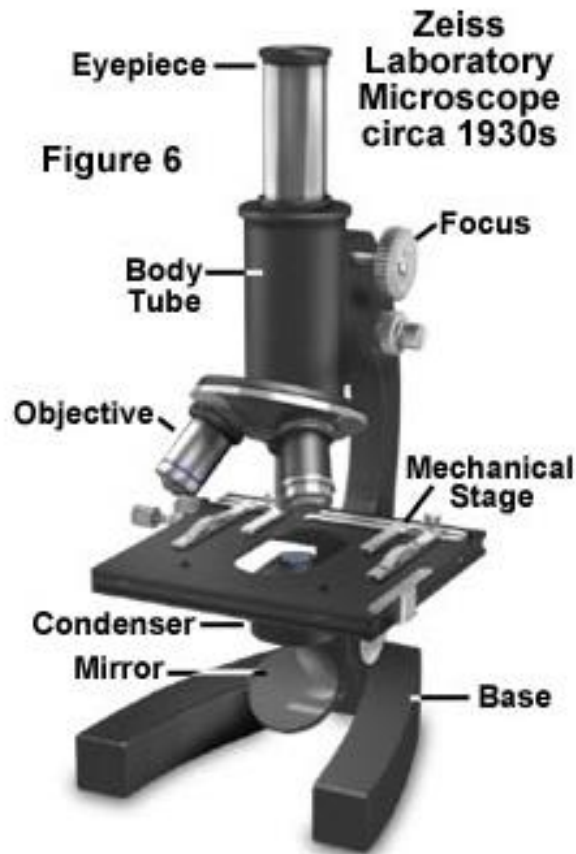
Microscope de Hooke (1635-1702)



1850



1930



1998

Olympus Provis AX 70 (circa 1998)



Microscope inversé



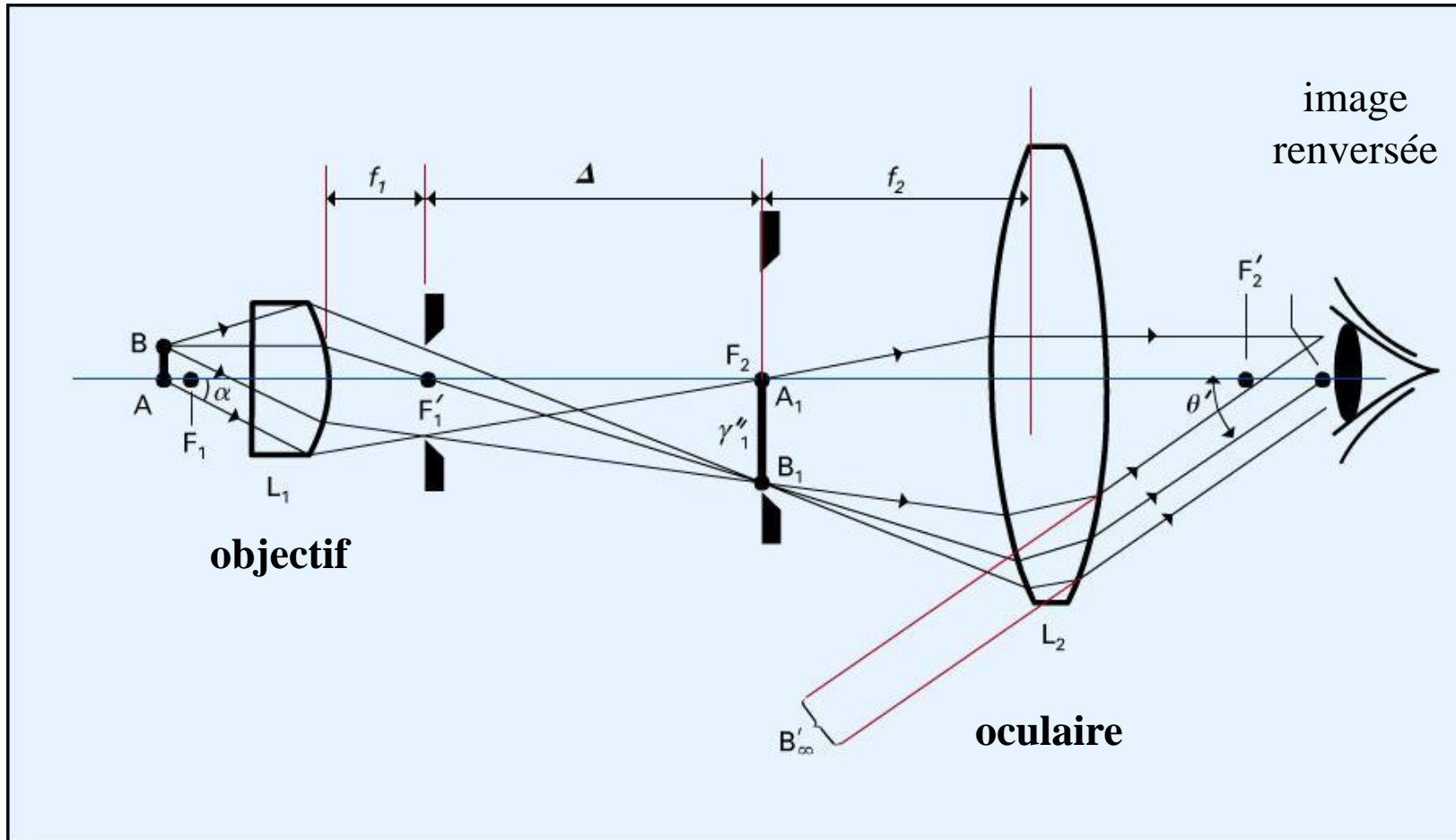
Le microscope « d'autrefois »

1) l'objectif forme une image à distance finie

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

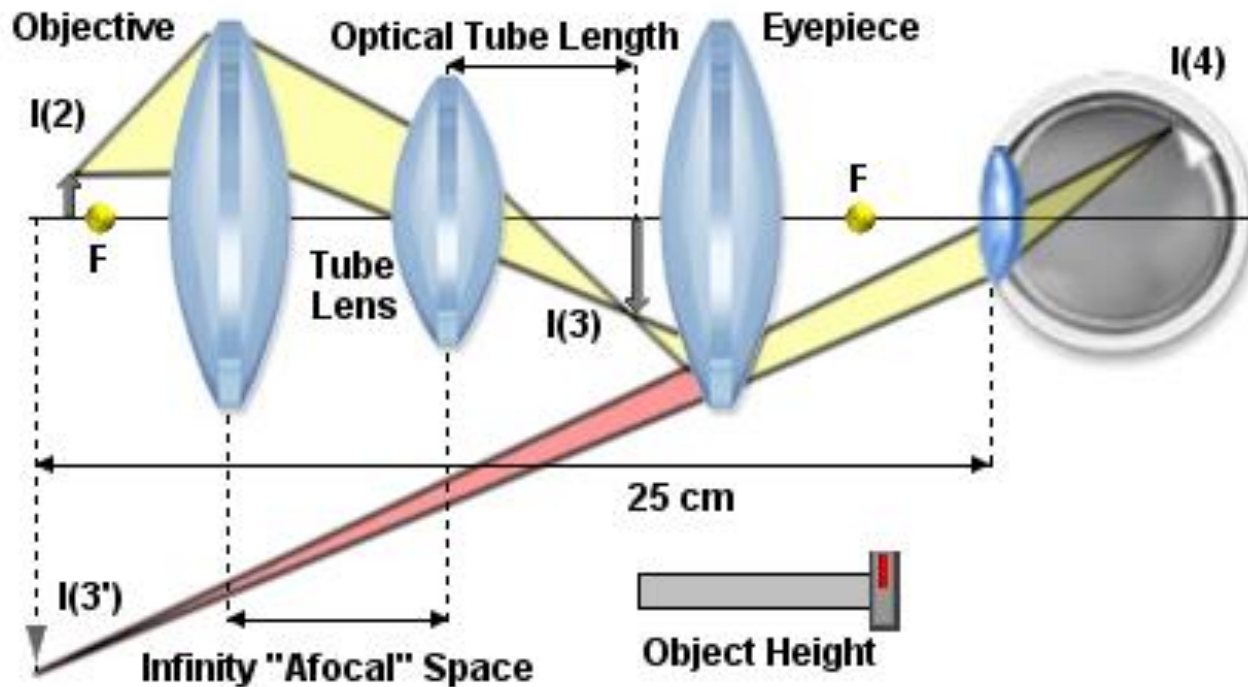
oculaire L_2 : diamètre et longueur focale f_2 de quelques centimètres

distance $F_1' F_2$: de l'ordre de 20 cm

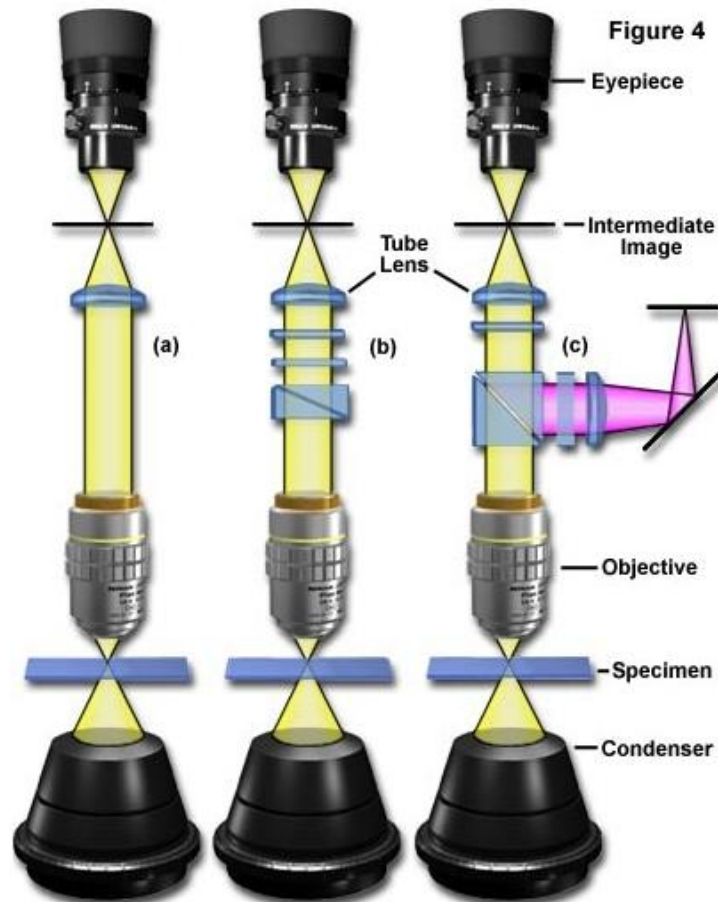


Le microscope « moderne »

2) l'objectif forme une image à distance infinie

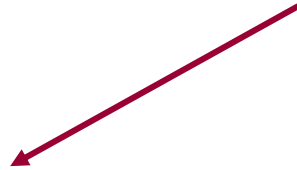


Intérêt des objectifs « à l'infini »



Modes d'éclairage

Echantillons transparents ou opaques



éclairage en
transmission

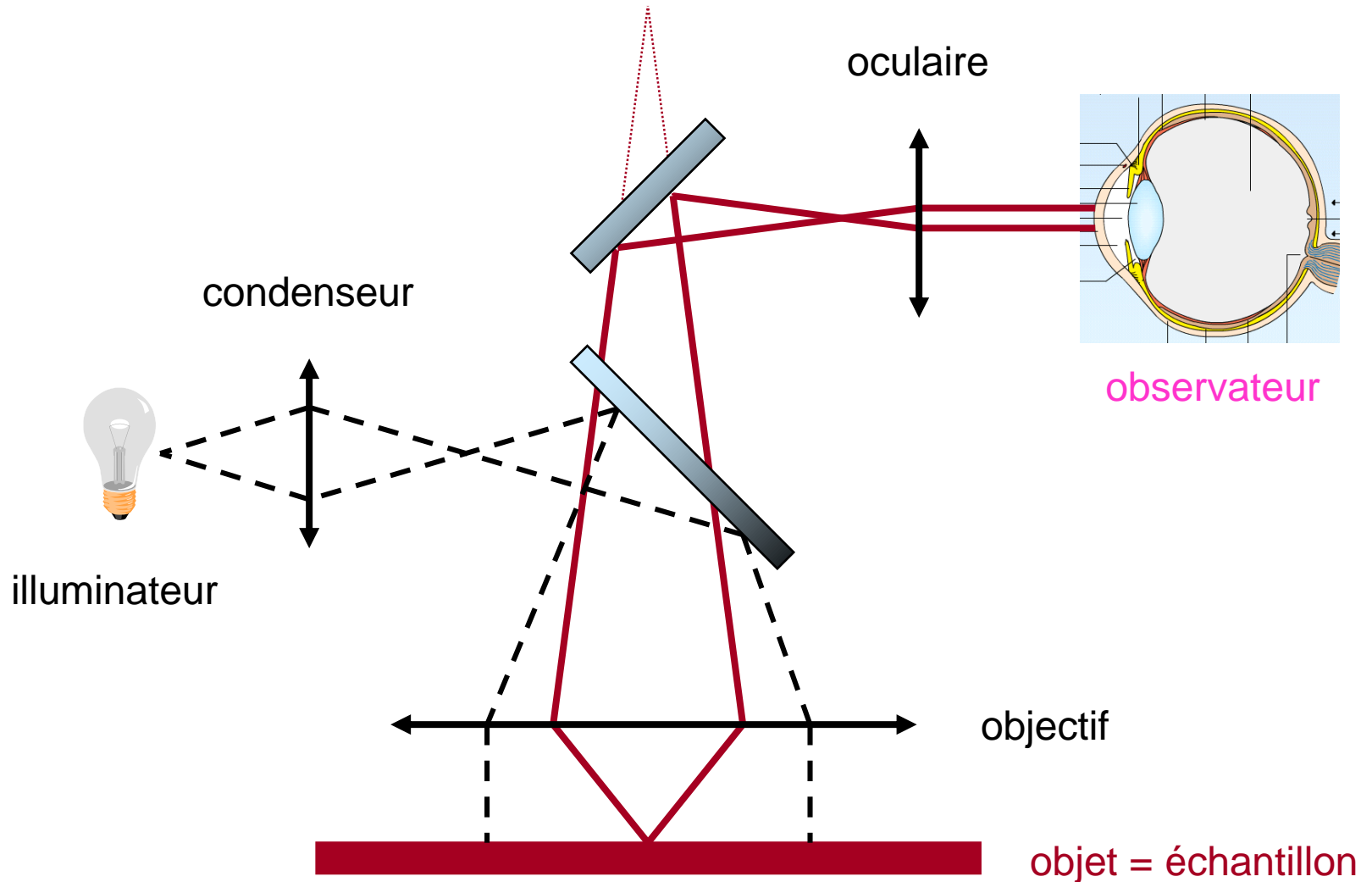
configuration Köhler +
microscope précédent



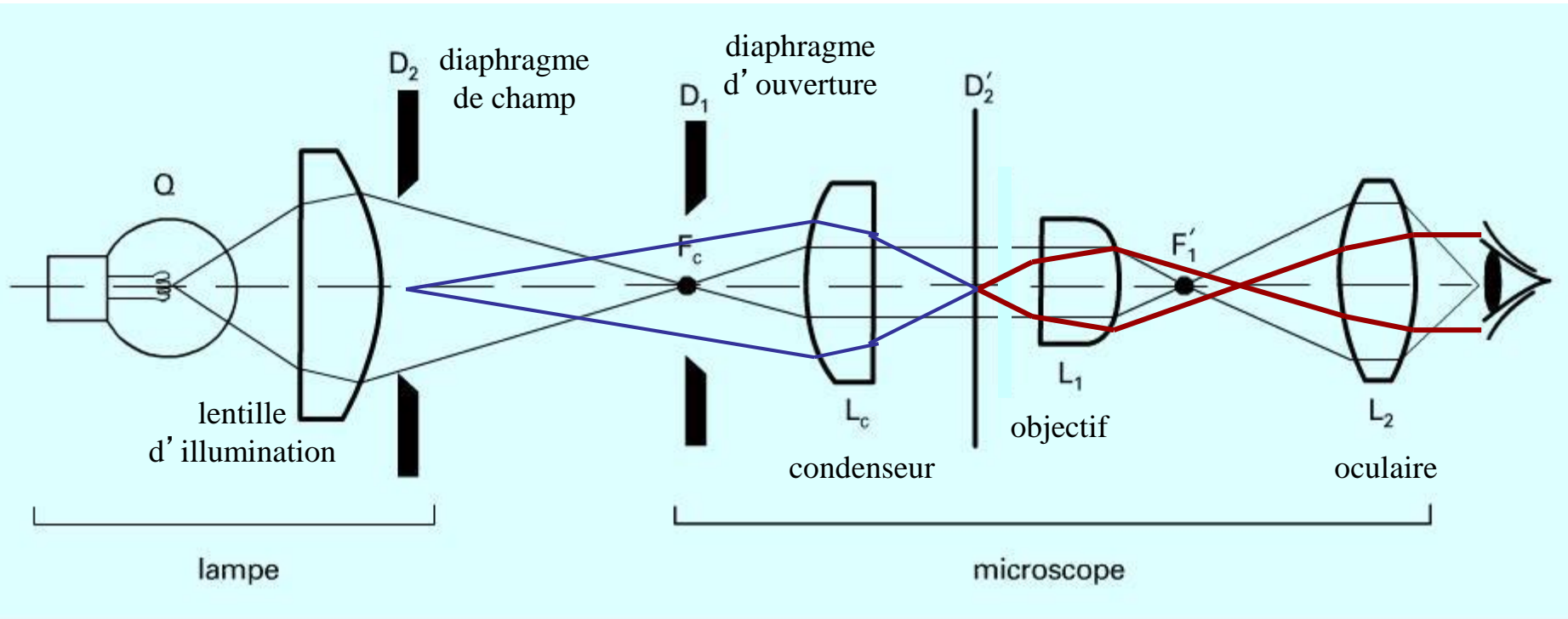
éclairage en réflexion

objectif = condenseur

Montage optique d'un microscope



Eclairage de Köhler (1893)



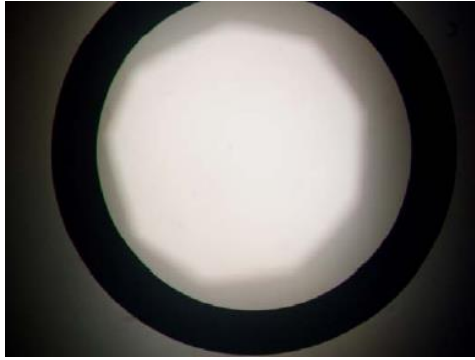
objectif : éclairage uniforme

2 conjugaisons nécessaires : filament \leftrightarrow foyer objet du condenseur
diaphragme de champ \leftrightarrow échantillon

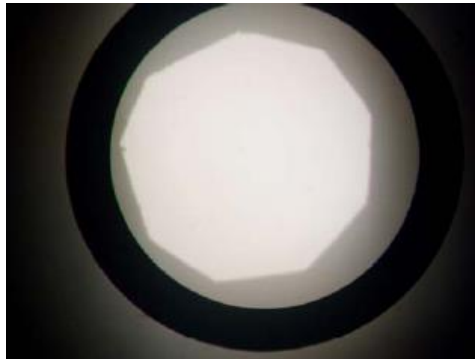
Diaphragme de champ: champ d'éclairement (taille)

Diaphragme d'ouverture: luminosité+ incidence d'éclairement

Optimisation de l'éclairage



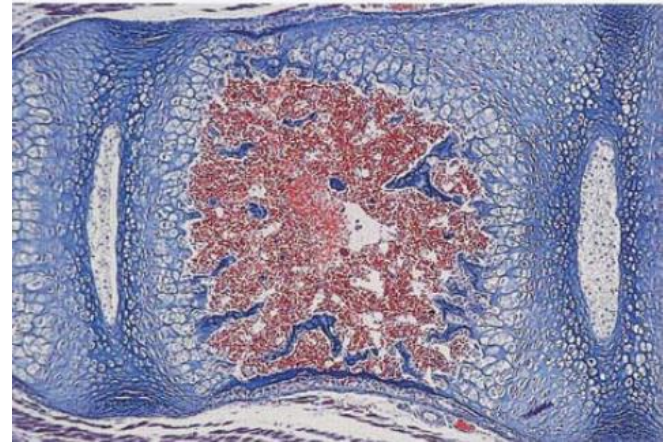
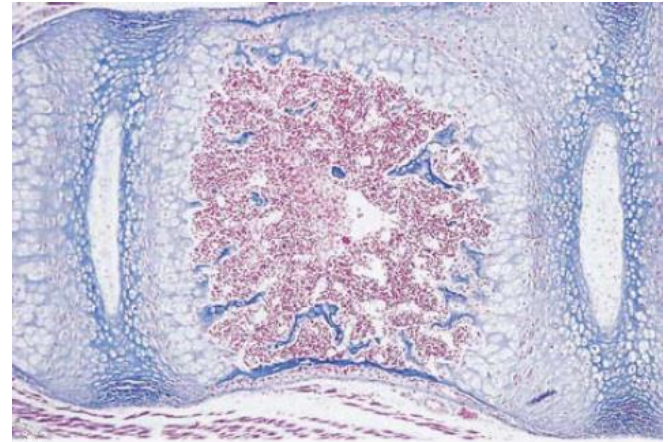
1. Diaphragme de champ fermé, condenseur pas encore optimisé



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

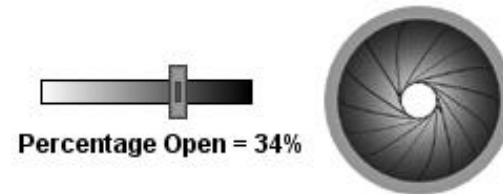


3. Le diaphragme de champ est centré puis ouvert, de façon à juste recouvrir le champ.



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

Diaphragme de champ



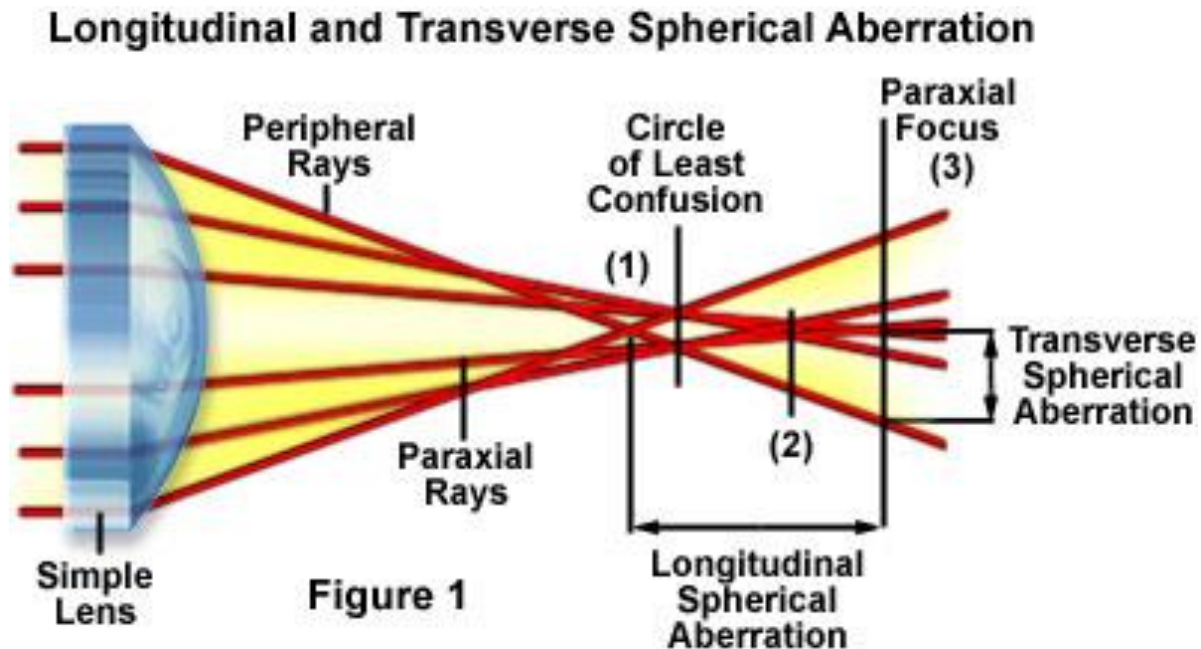
Objectifs: Aberrations

Deux types d' aberrations :

- géométriques
- chromatiques

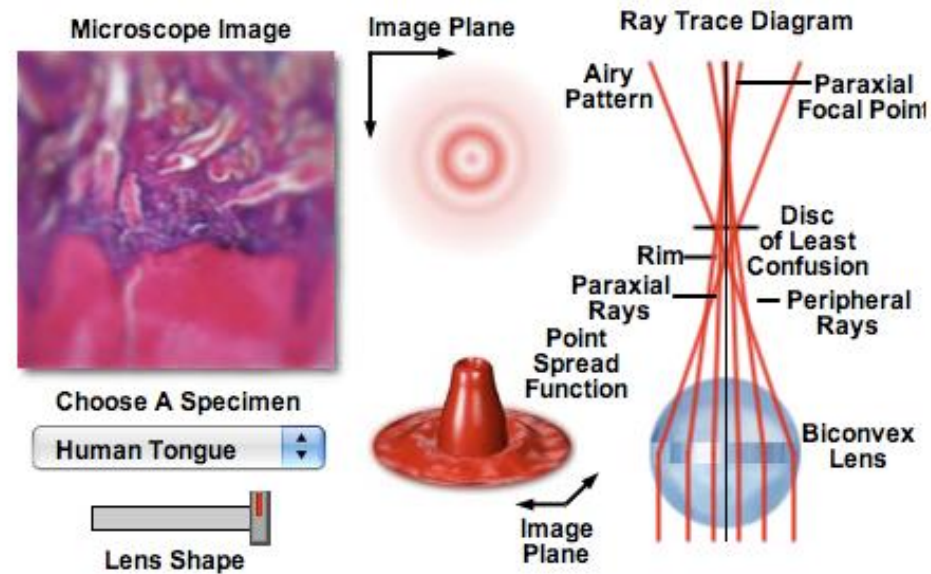
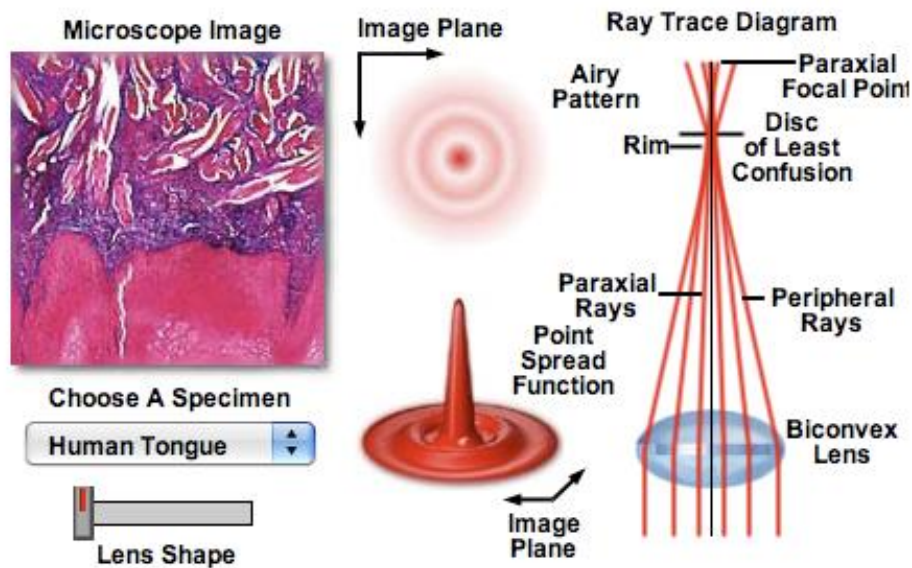
L' aberration sphérique

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

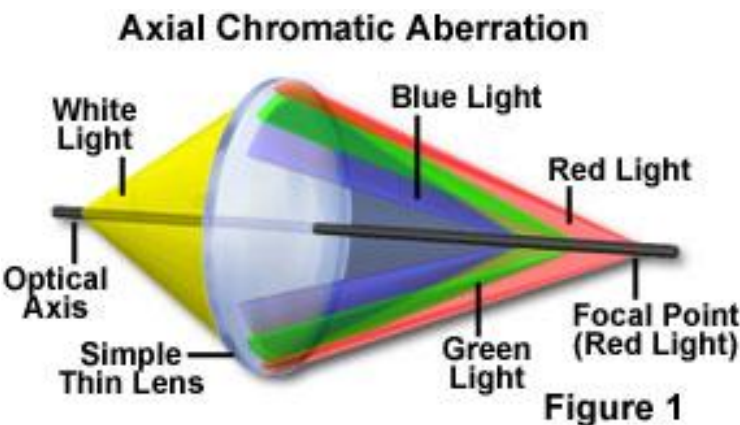


L' aberration sphérique

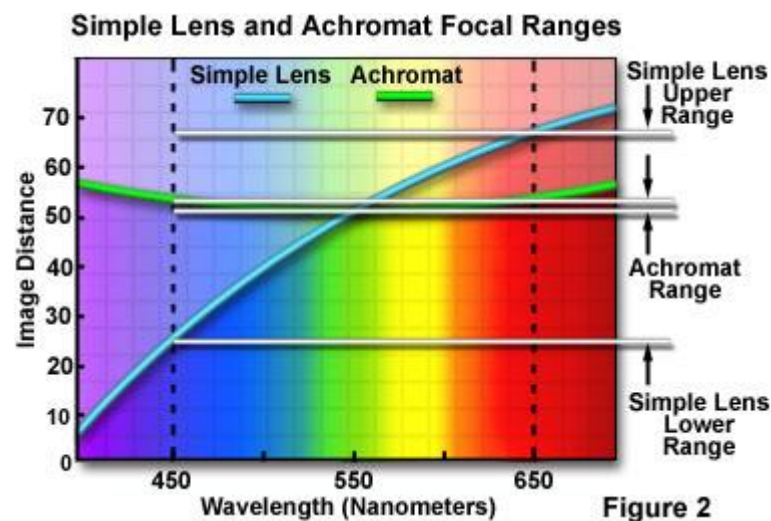
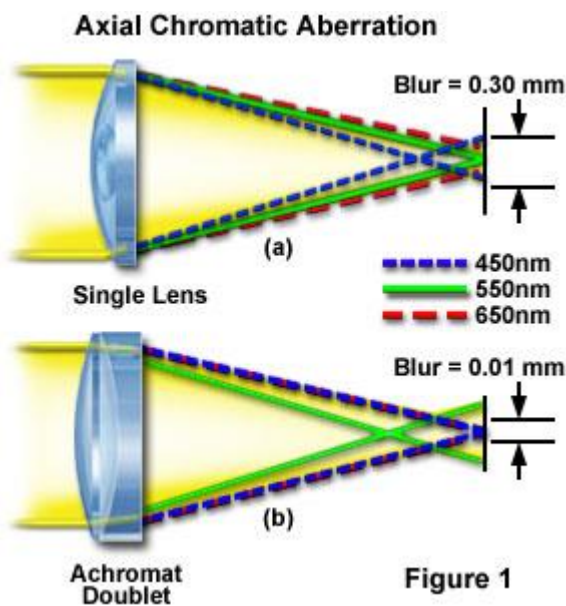
- seule aberration présente sur l'axe du système optique
- par raison de symétrie, sa tache de diffusion est de révolution



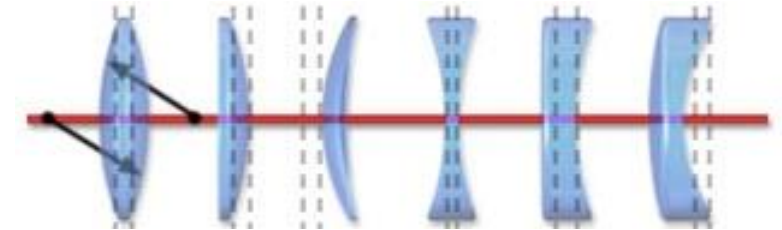
Aberration chromatique



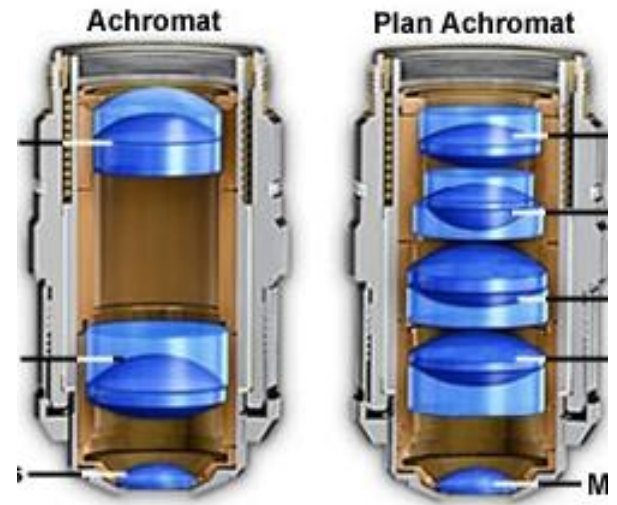
dispersion dans le verre
d' indice $n(\lambda)$



Correction des aberrations



Différents types de lentilles simples à combiner pour corriger les aberrations



Exemples d'objectifs corrigés

Objectifs: ouverture numérique

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

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

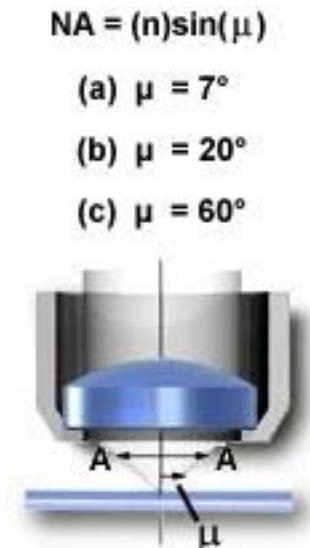
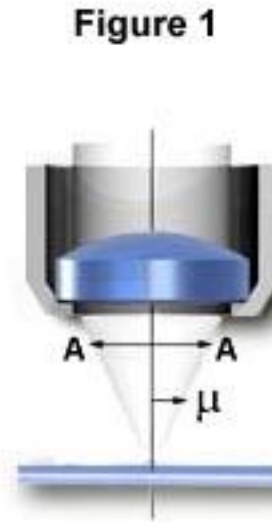
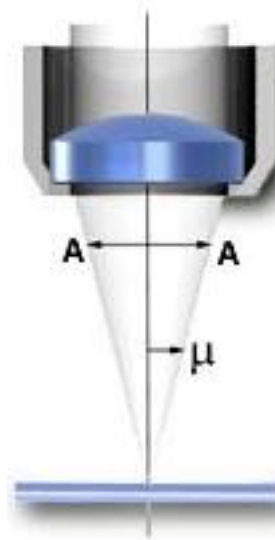


Figure 1

$$NA = (n) \sin(\mu)$$

(a) $\mu = 7^\circ$

(b) $\mu = 20^\circ$

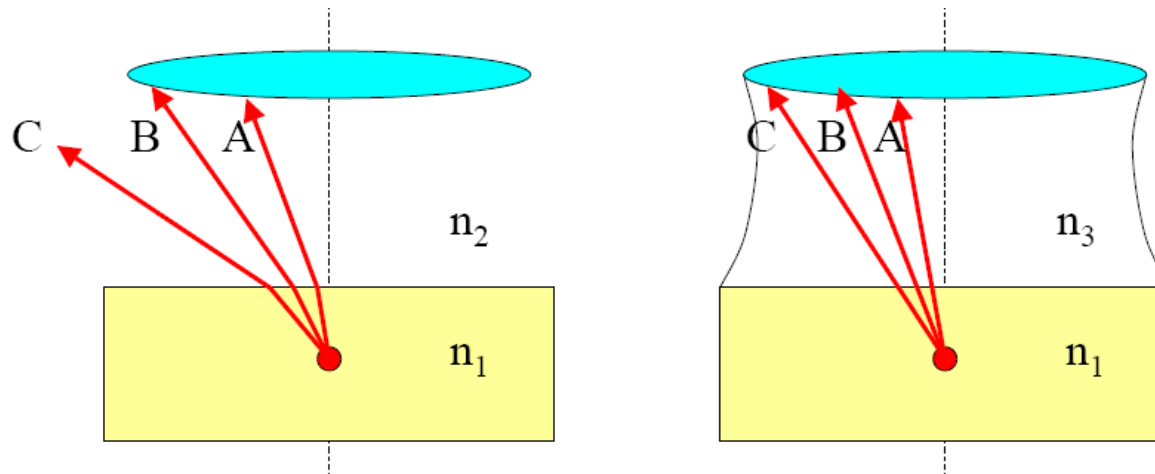
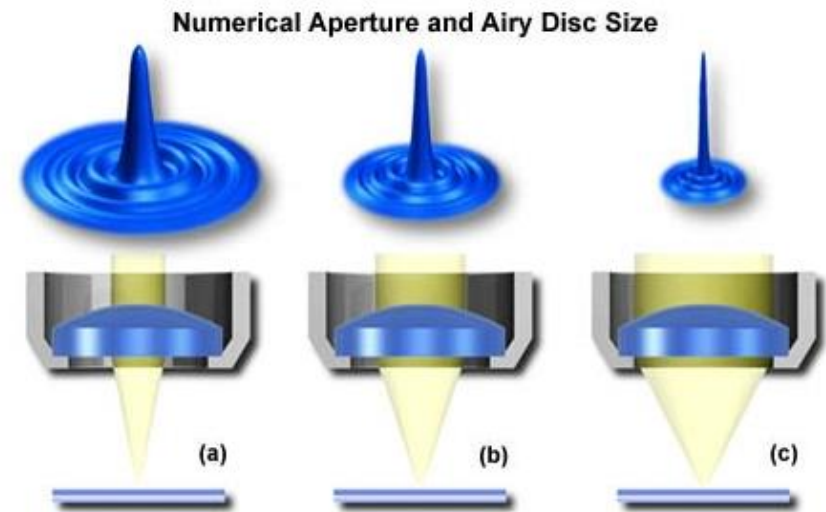
(c) $\mu = 60^\circ$

augmenter la résolution

⇒ forte ouverture numérique

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

- objectifs à air : $ON \leq 1$
- objectifs à immersion : $1,4 > ON > 1$
résolution maximale $\sim 0,2 \mu\text{m}$



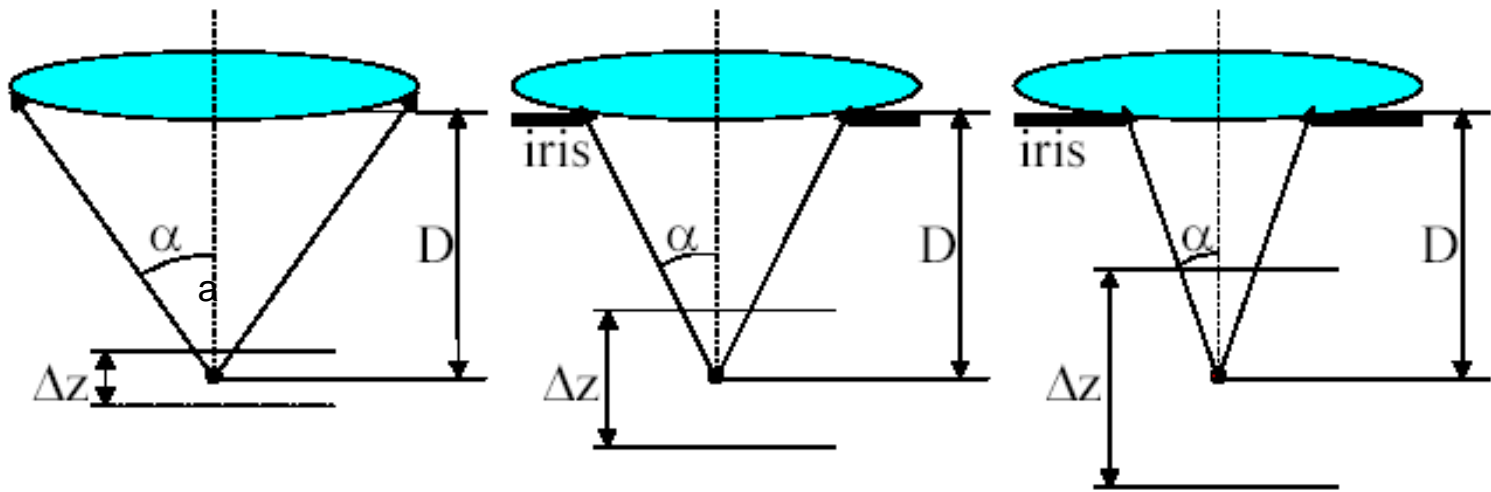
Common Immersion Media

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

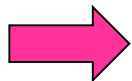
Profondeur de champ

Résolution verticale = profondeur de champ $\frac{\lambda \sqrt{n^2 - \text{ON}^2}}{\text{ON}^2}$

(liée à la diffraction)



On ne perd pas en résolution quand a est plus petit de le rayon de la tache de diffraction



Profondeur de champ

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



petite distance de

Les objectifs

- Normes dimensionnelles du microscope

REF-CONSTRUCTEUR

G_y / O.N. milieu

l_{tube} / e_{lamelle}

60x Plan Apochromat Objective



- Marquage des objectifs

exemples :

NC S Plan 40

0.70

160 / 0

Plan Apochromat

100x / 1.30 Oil

∞ / 0.17

Achromat

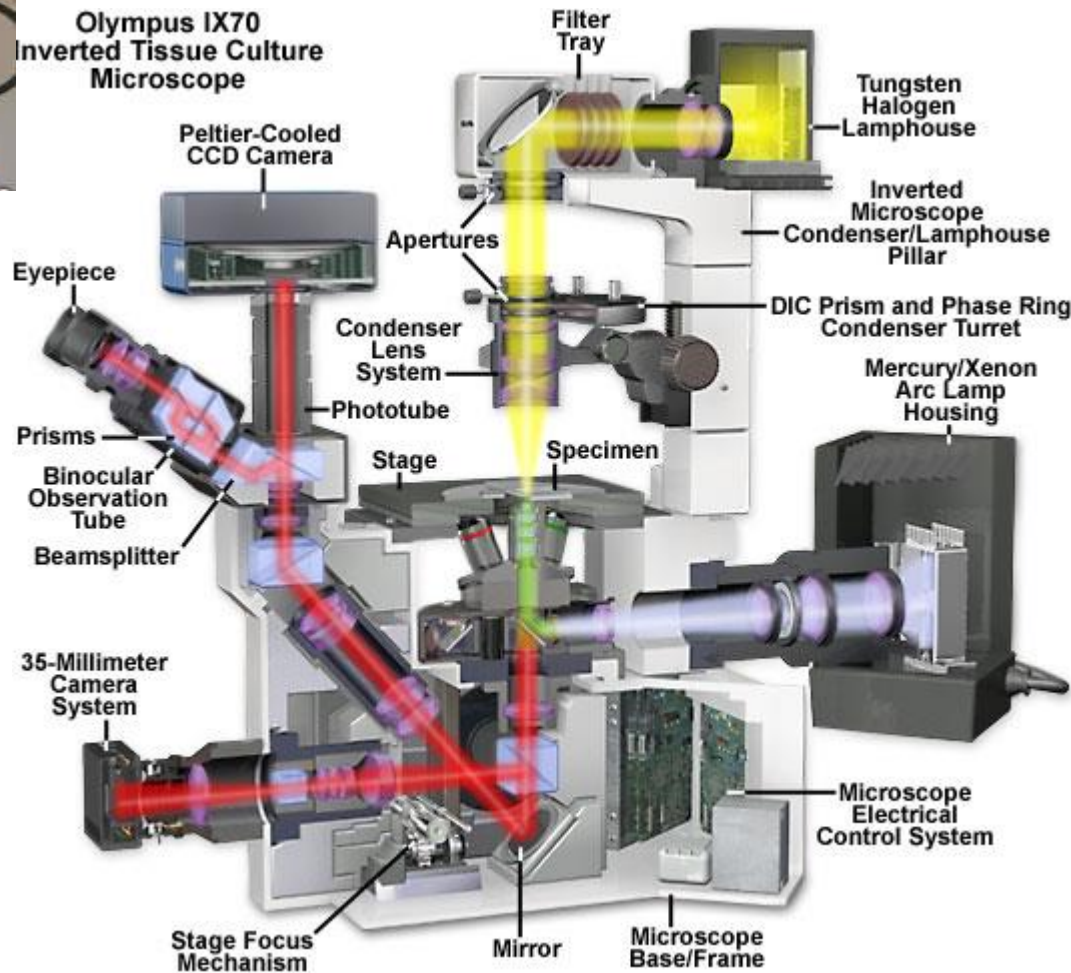
63 / 0.8

160 / 0.17

- La pupille arrière de l'objectif est l'élément diffractant



Anatomie du microscope

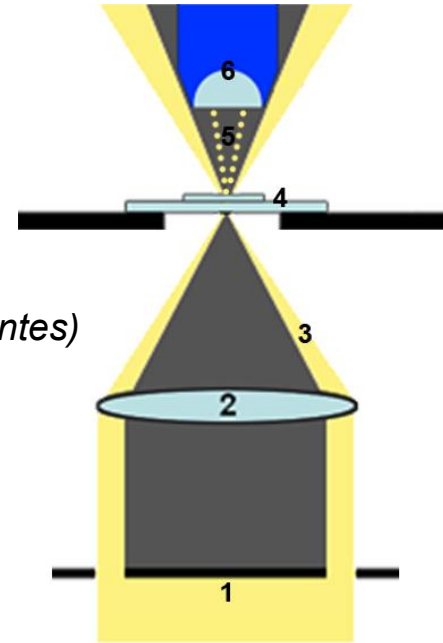


Microscopie en fond sombre



Eclairage annulaire

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



- 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

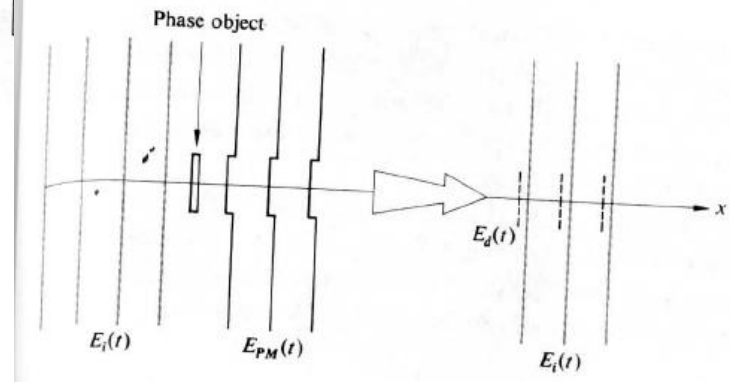
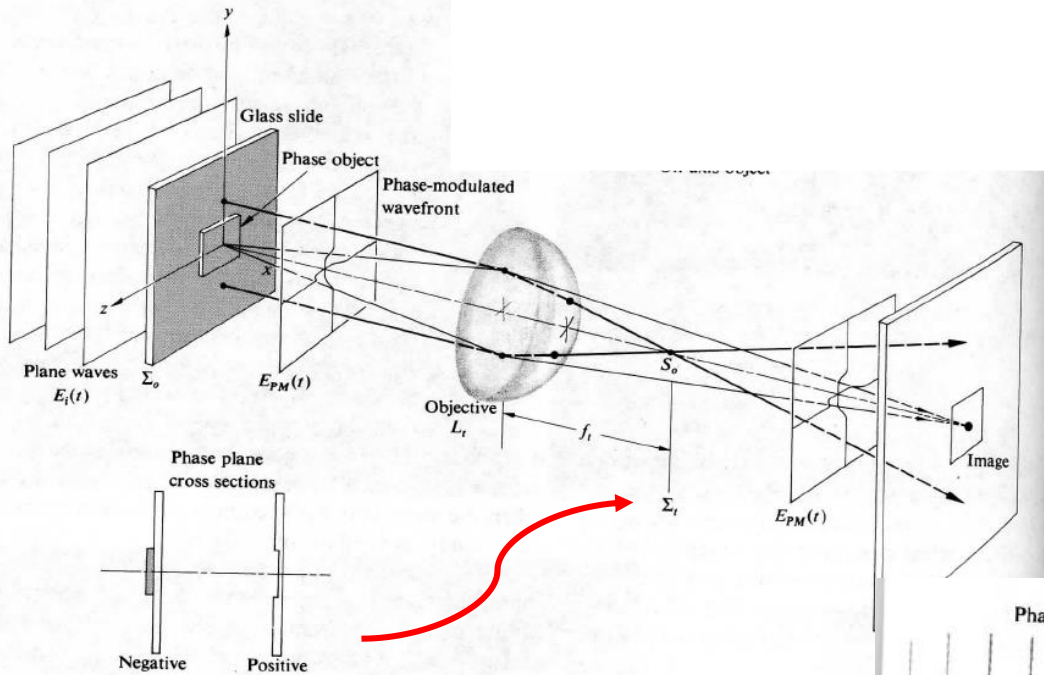
- Par l'objectif

ou

- Par un anneau conjugué au diaphragme d'éclairage

contraste de phase

Le masque de phase est placé dans le plan conjugué de l'objet de phase et déphase de $\pi/2$.

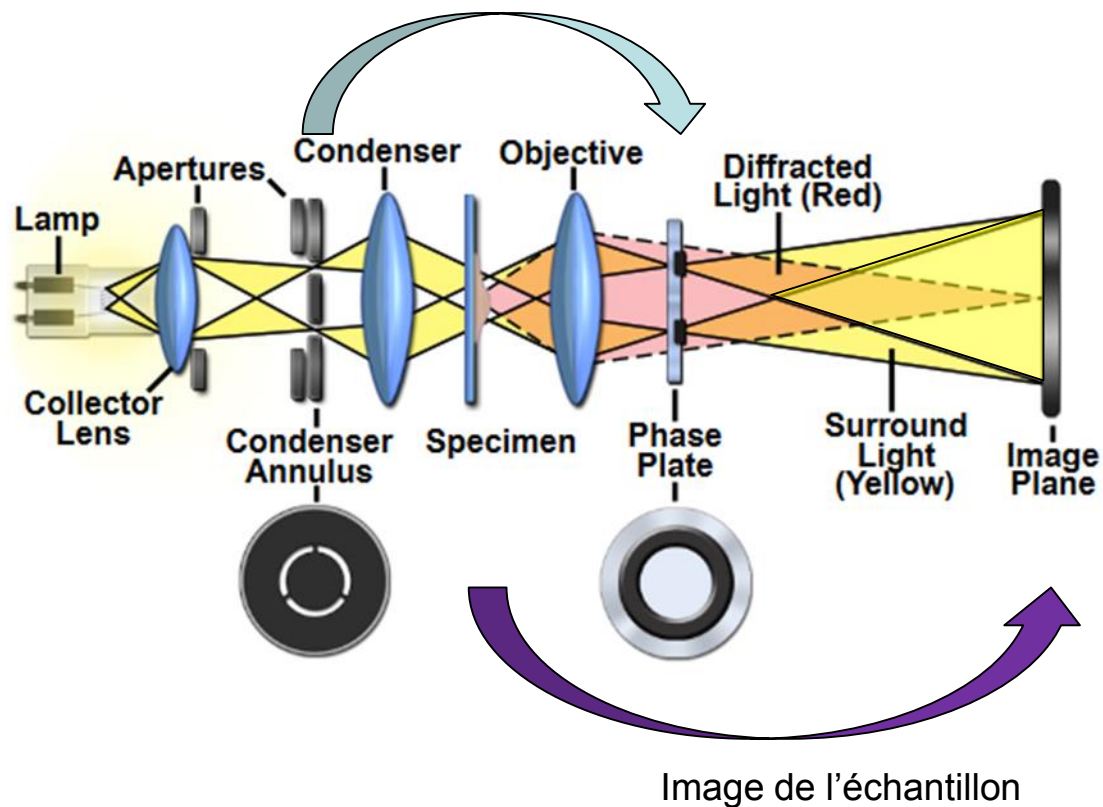


Hecht, optics

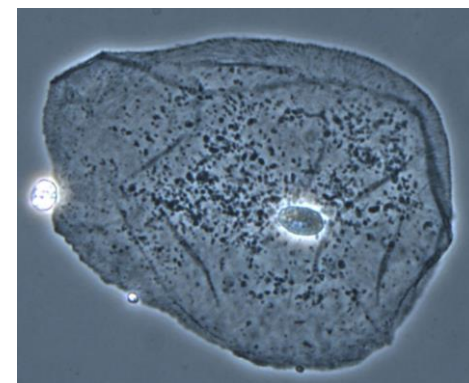
Contraste de phase: Rajouter $\pm \pi/2$ entre l'éclairage et la lumière diffractée

Microscopie à contraste de phase

Plans conjugués (phase de $\pm \pi/2$ supplémentaire sur l'éclairage)

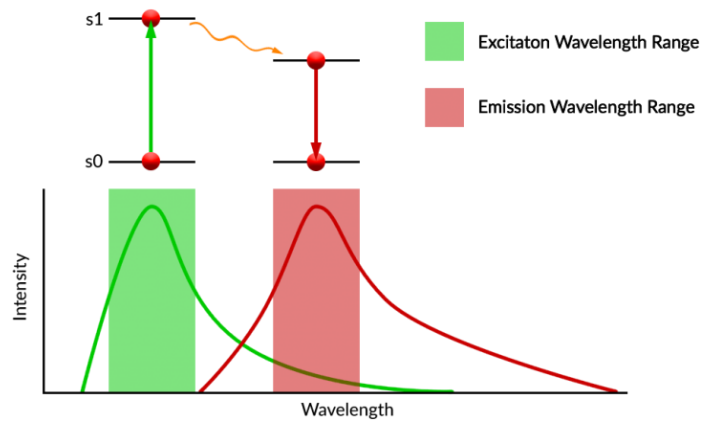


cellule épithéliale de joue



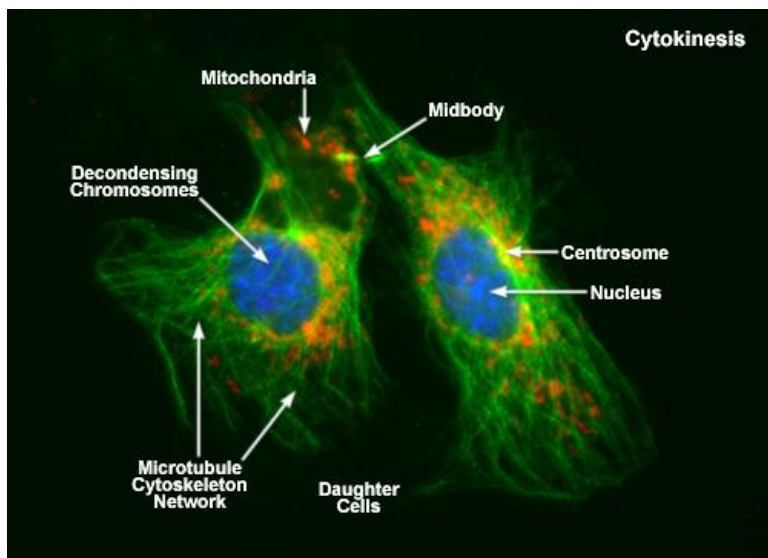
Wikipedia

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

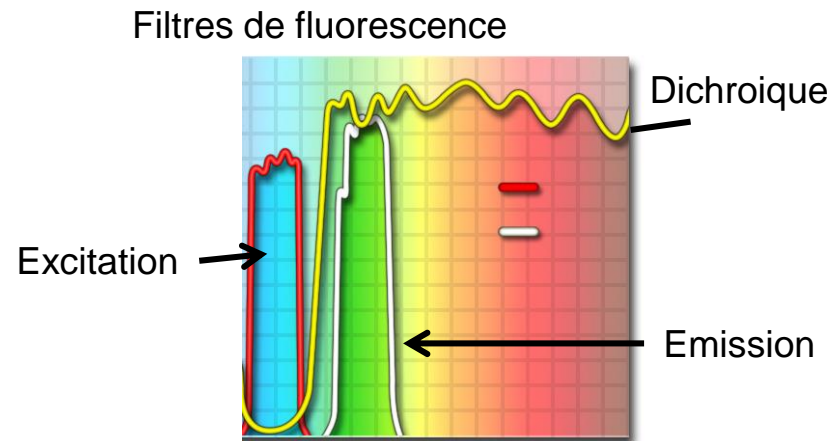
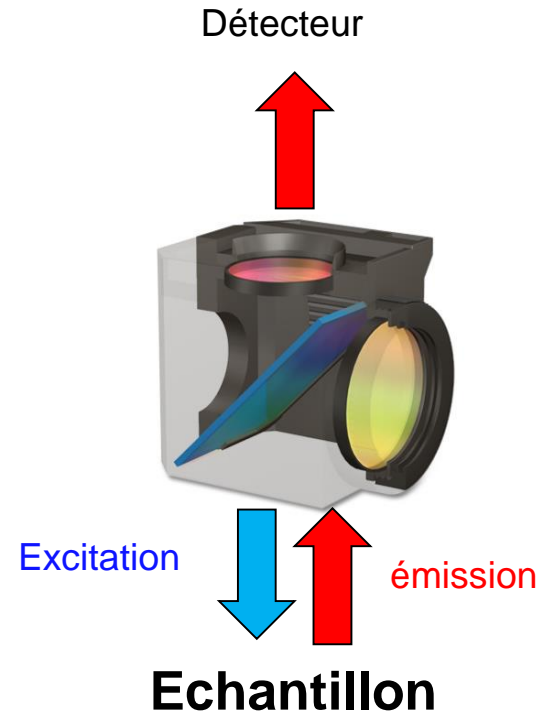


Supprimer par filtrage spectral la pompe

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

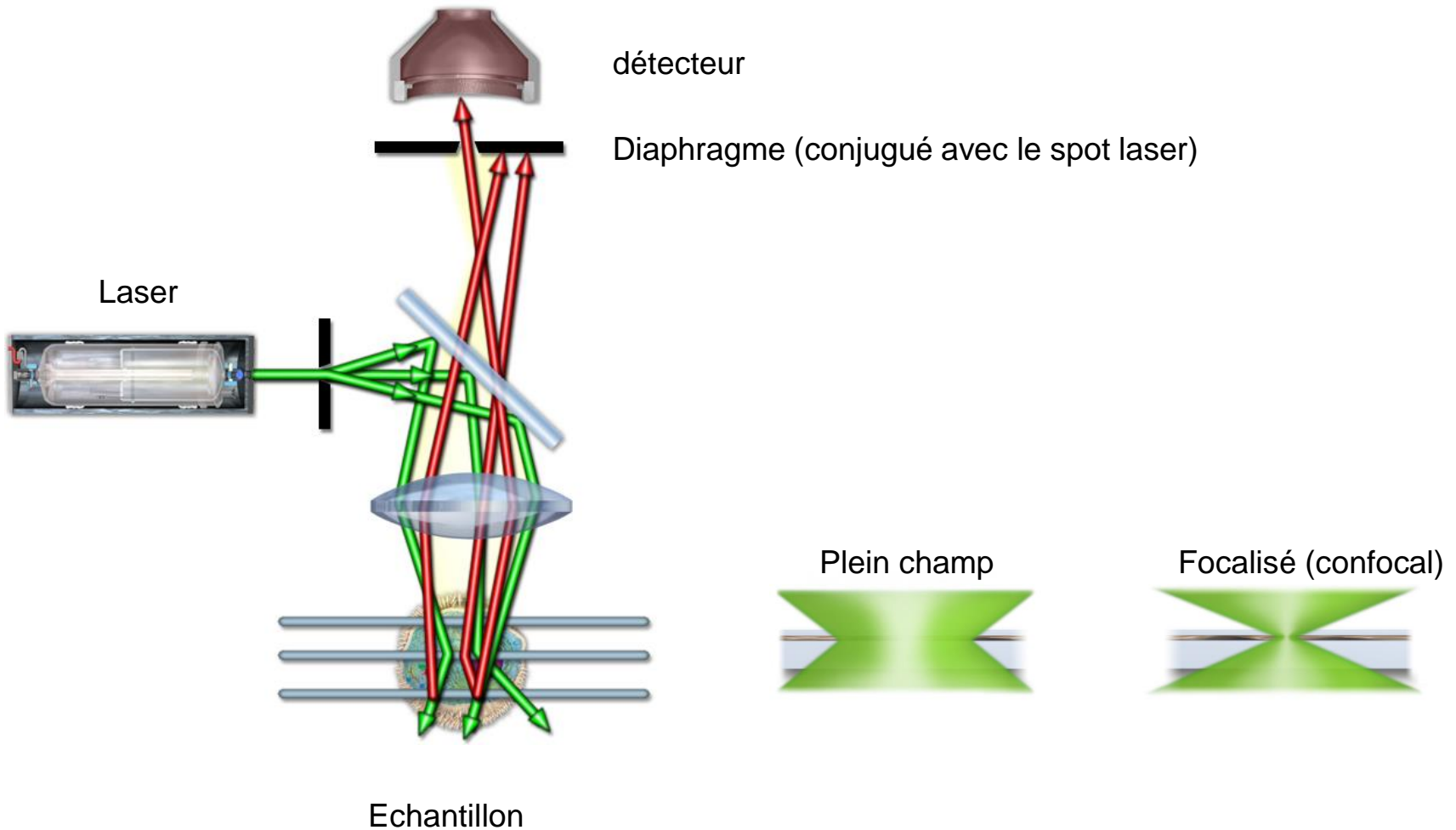


Microscopie de fluorescence



Microscopie confocale

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



Microscopie confocale

Point par point
Image reconstruite (latéral + axial)
z-series

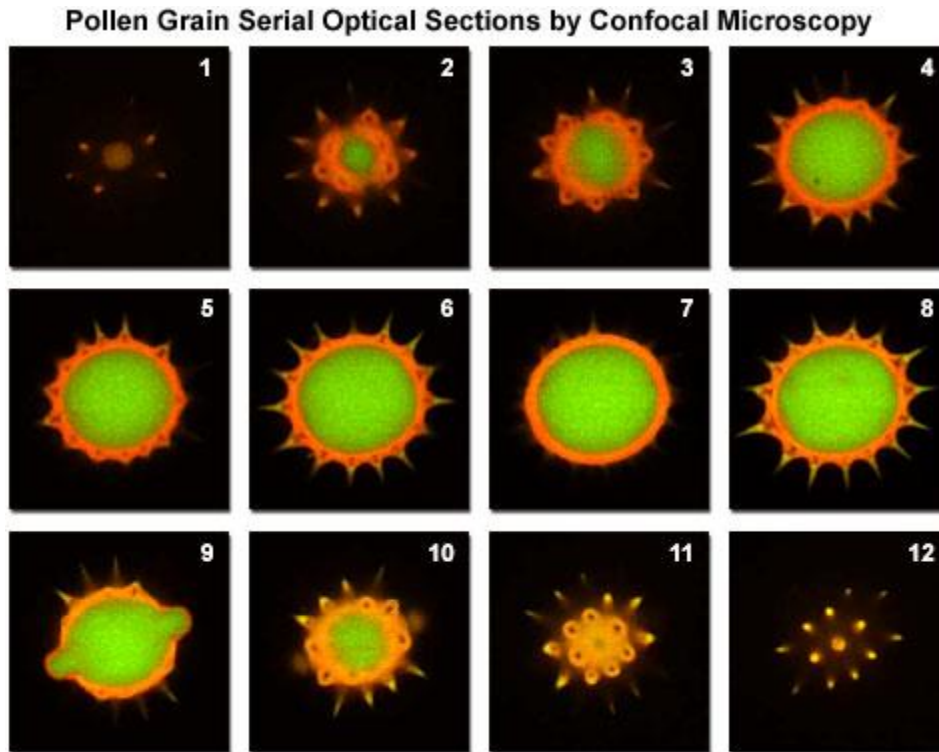
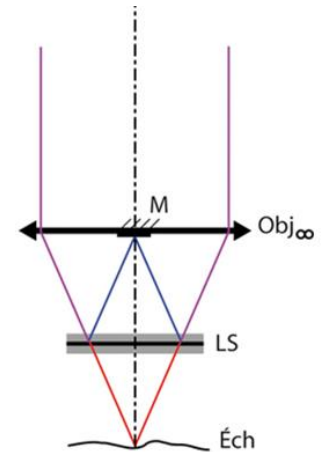
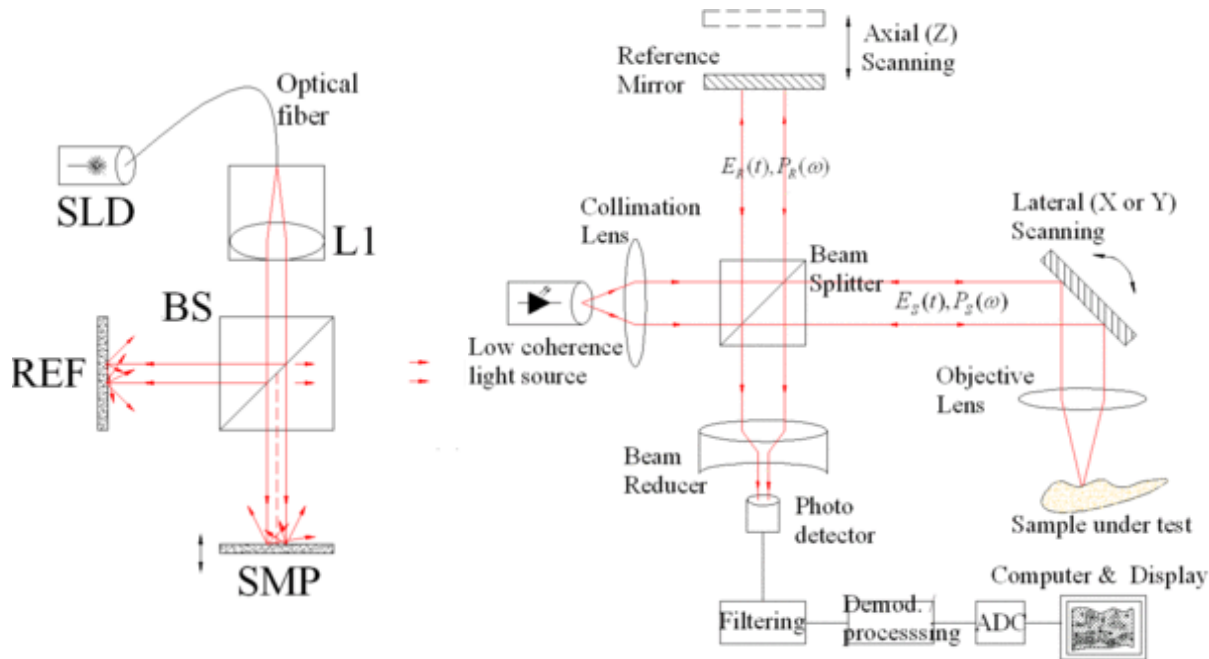


Figure 6

Microscopie par coherence optique (OCM, ou OCT (tomographie))

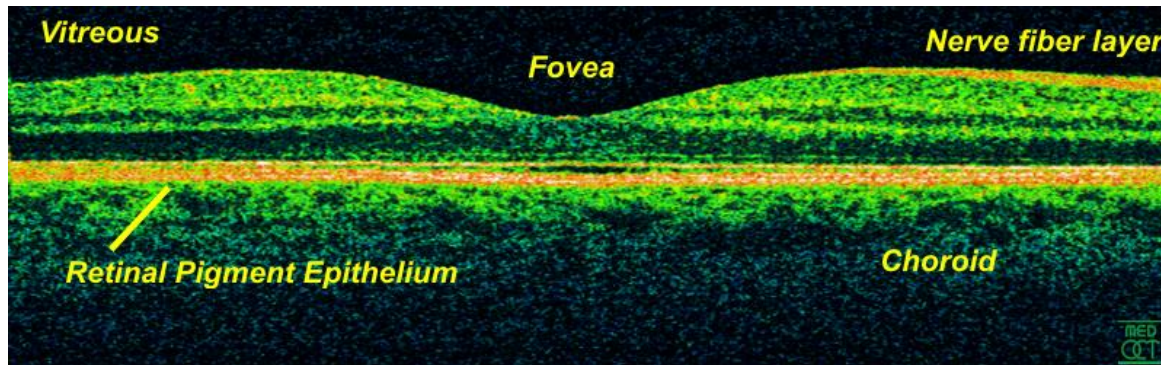
Champ large



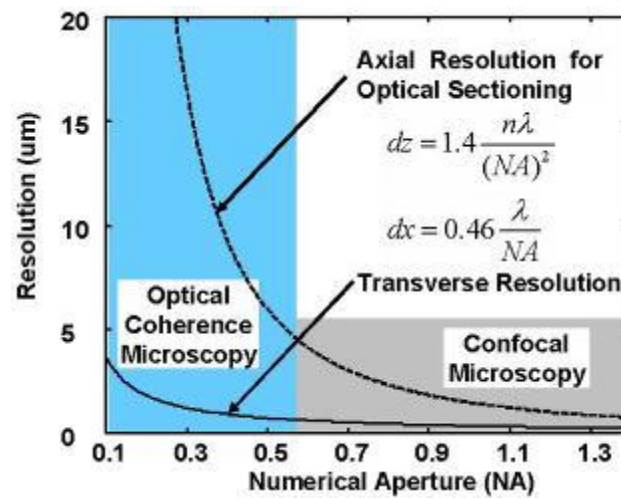
Obj_∞ : Objectif de microscope (corrigé à l'infini) à grande frontale
 LS : Lamme semi-réfléchissante 50% avec compensatrice symétrique
 M : Miroir plan de référence
 Éch : Échantillon à observer
 La présence du miroir induit une obturation centrale dans le système optique.

<http://www.optique-ingenieur.org/fr/>

OCT scan of a retina at 800nm with an axial resolution of 3μm.

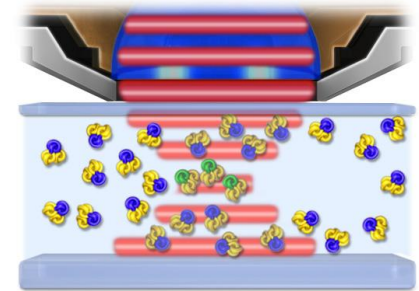
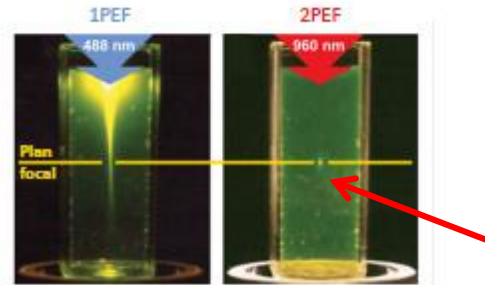
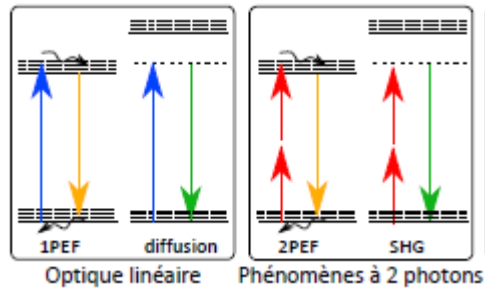


Optique pour l'ingénieur (OPI)



Biomedical imaging and biophotonics group <http://www.rle.mit.edu/boib>

Microscopie multiphotonique



1 photon excitation

2-photons excitation

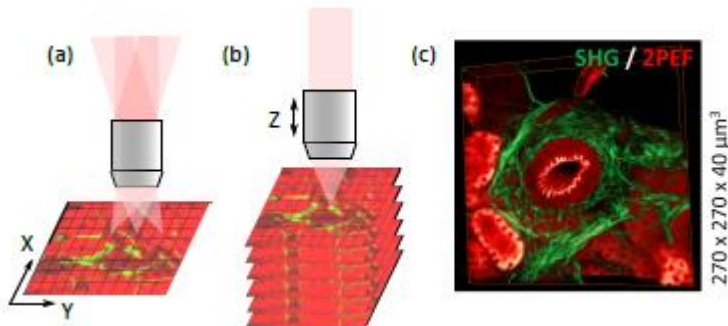
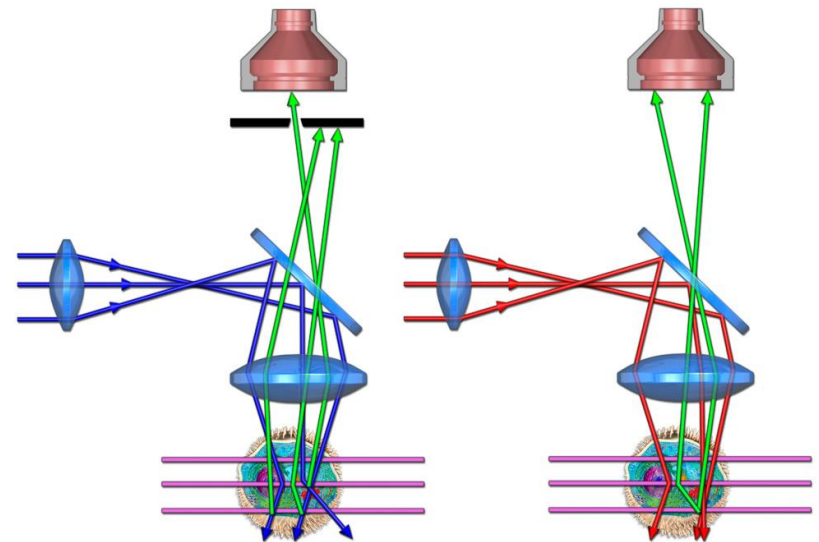


Image reconstruite

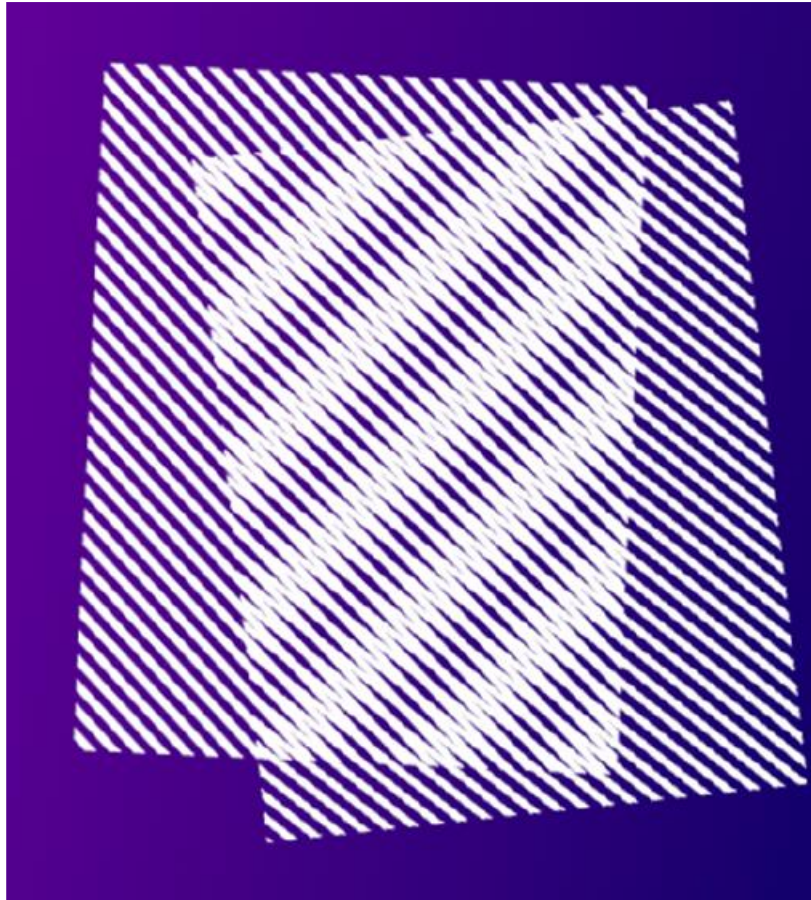
Confocal

Mutiphotonique
(pas de diaphragme)

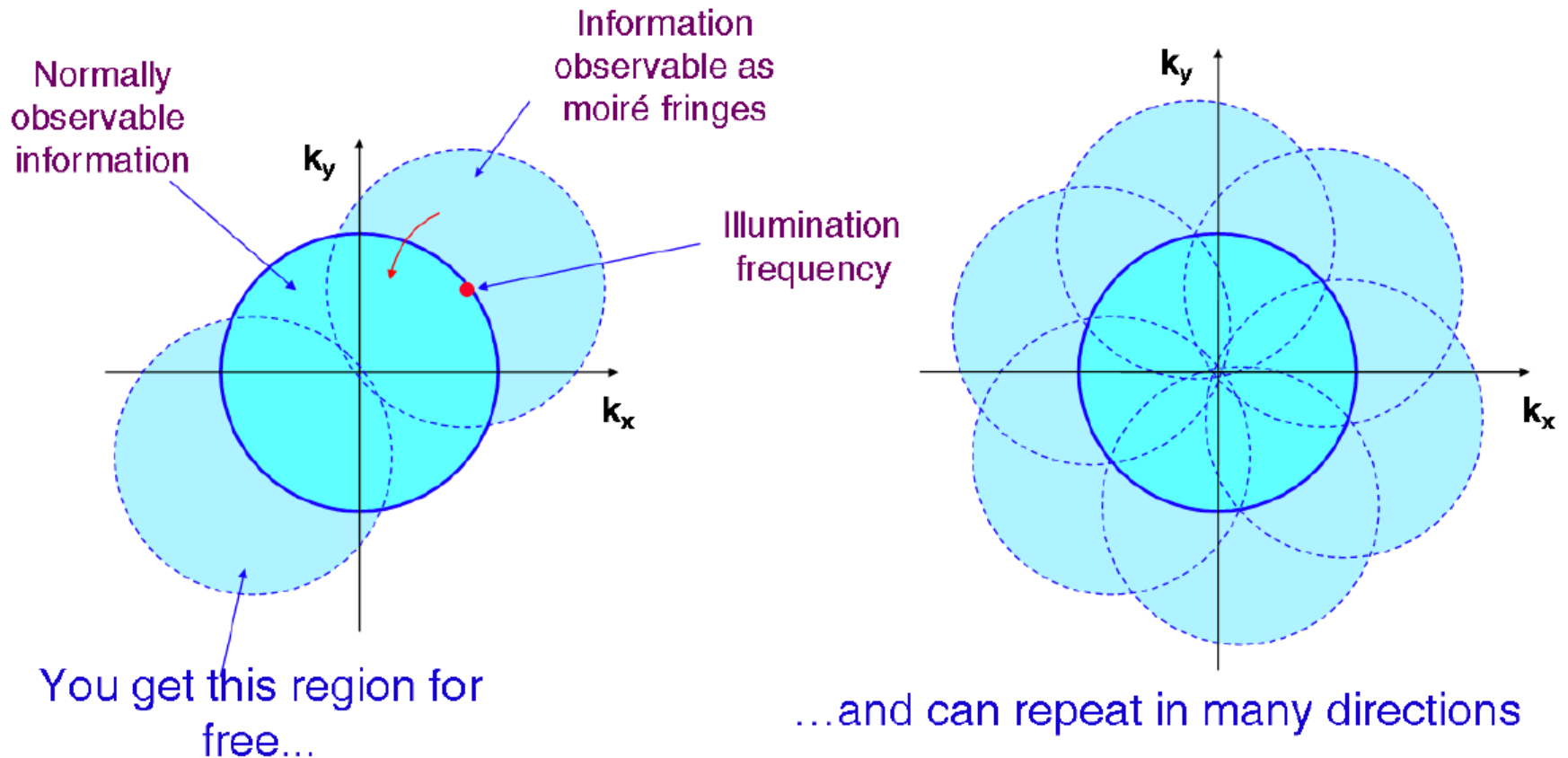


Super resolution par illumination structurée

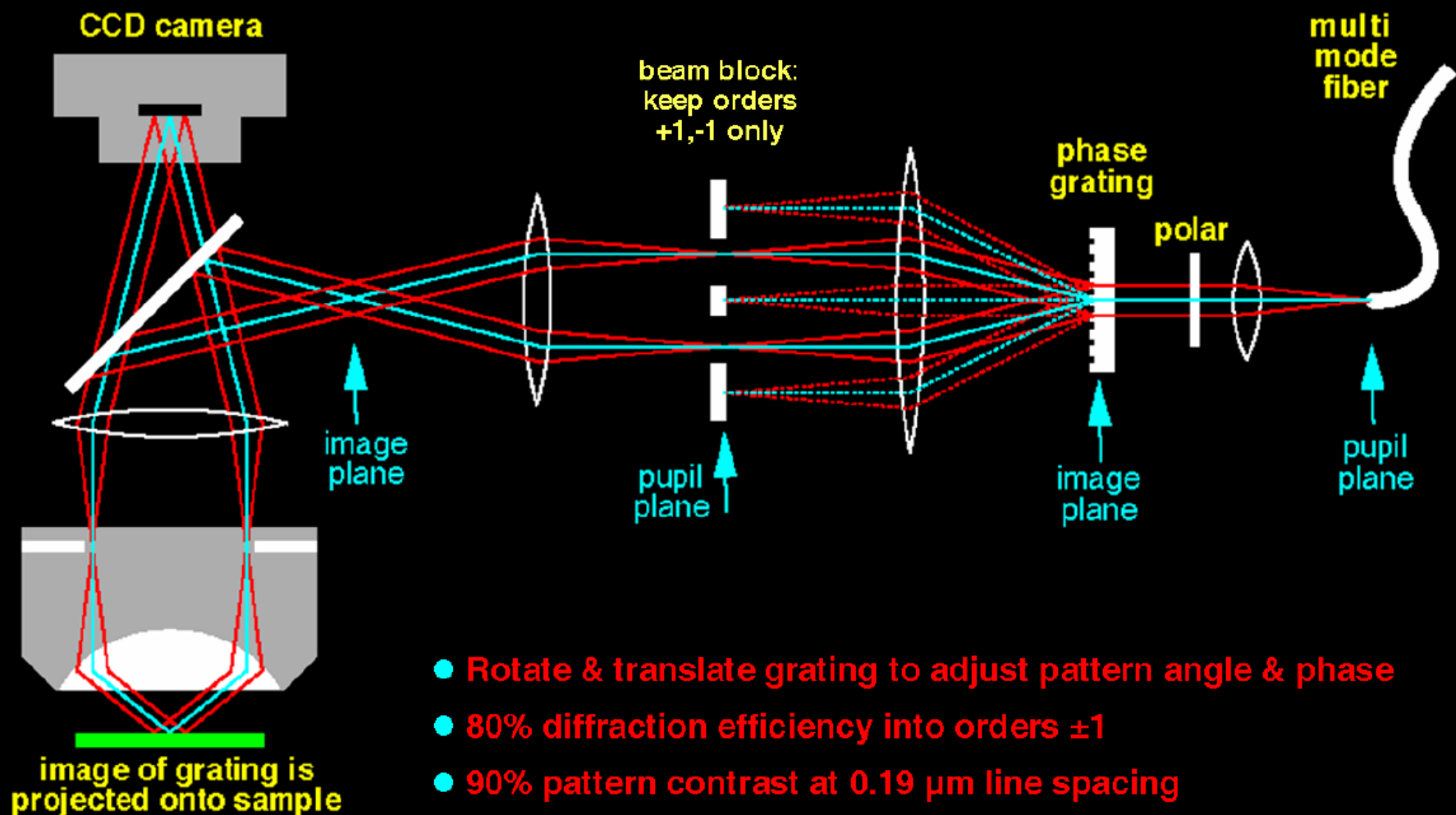
Moiré : baisse la fréquence spatiale



$$\mathbf{K} = \mathbf{k}_{\text{objet}} - \mathbf{k}_{\text{grille}}$$



On gagne un facteur 2



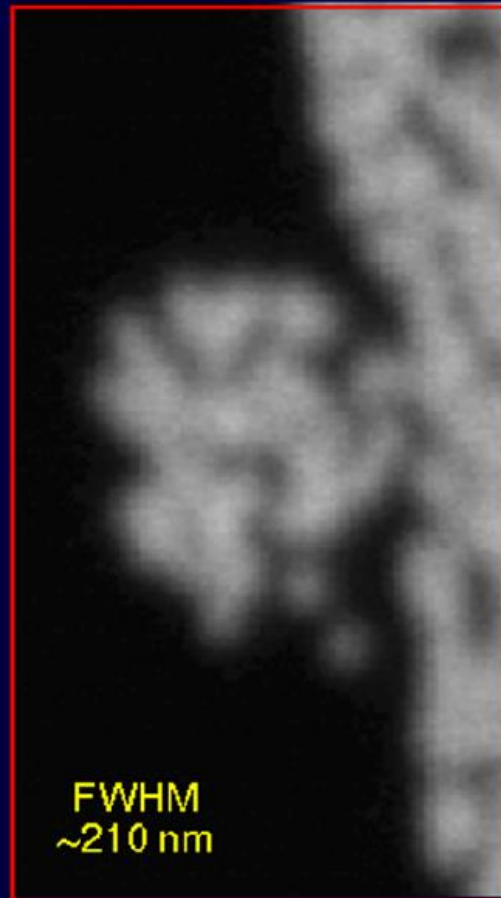
- Rotate & translate grating to adjust pattern angle & phase
- 80% diffraction efficiency into orders ± 1
- 90% pattern contrast at 0.19 μm line spacing
- Multimode fiber ® low spatial coherence ® low stray fringes

120 nm microspheres

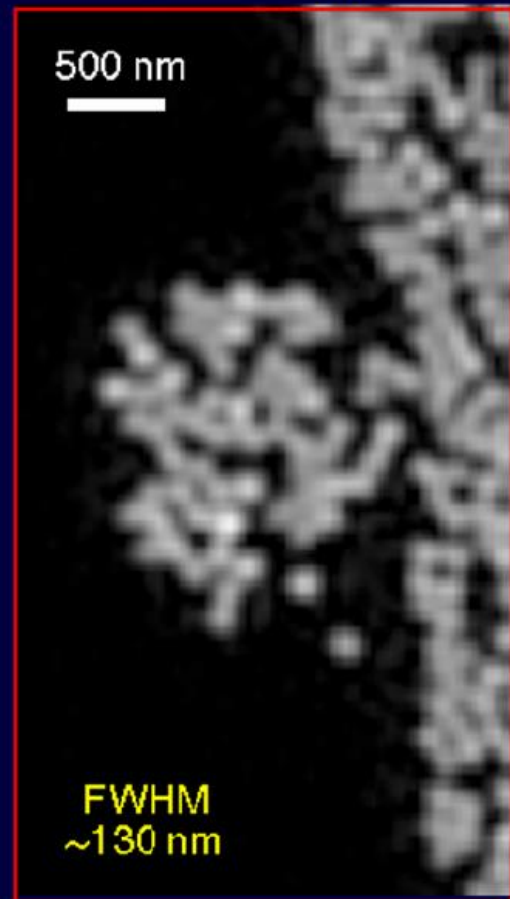
Conventional
microscopy



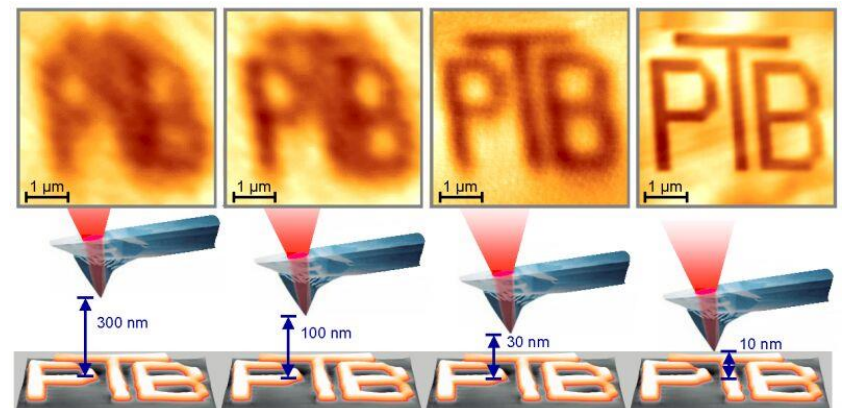
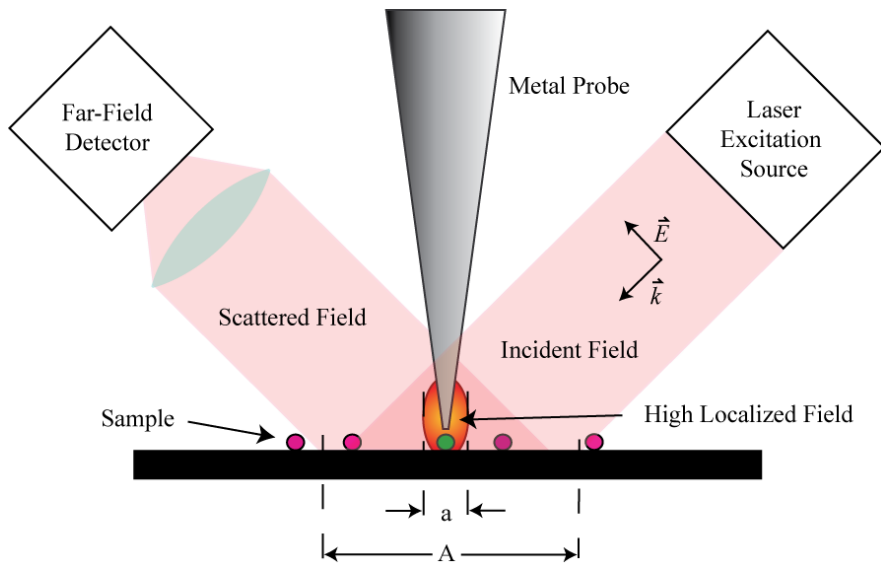
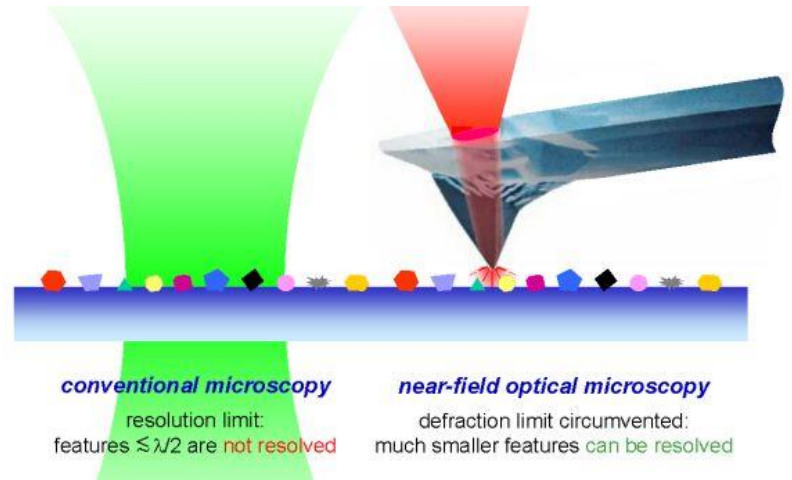
Confocal
(Pinhole = 1/4 Airy)



Structured Illumination
microscopy



Microscopie optique à champ proche



Microscopie à contraste de phase

