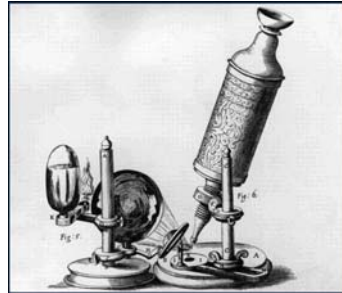


## Le MICROSCOPIE OPTIQUE (champ lointain)



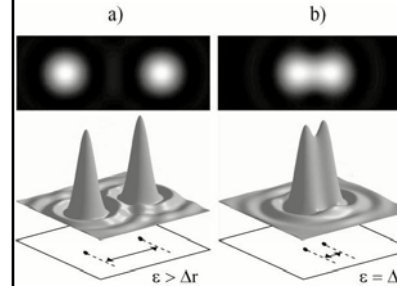
Agnès Maître, Sorbonne Université

Des images et transparents  
sont inspirés du cours du  
-M2 Quom de Alexandra Fragola  
-du site de Nikon <https://www.microscopyu.com/>

Décembre 2024

Propriétés d'imagerie

### Résolution latérale : critère de Rayleigh



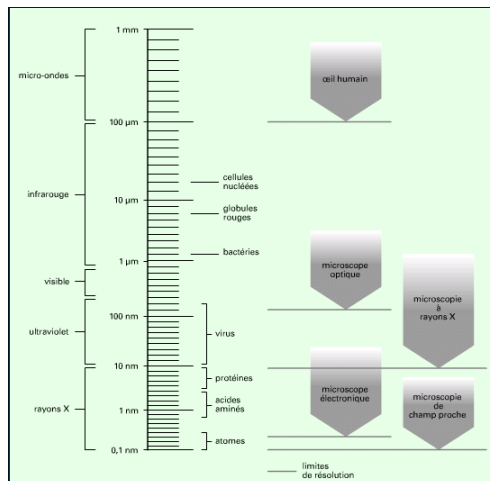
Pour une optique limitée  
par la diffraction

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

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

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

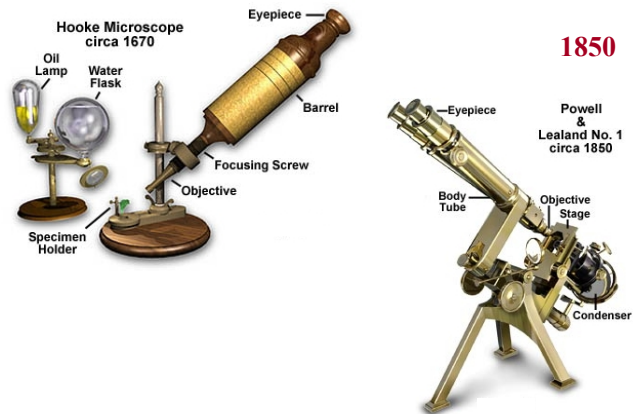
## Que peut-on voir à l'œil nu ?



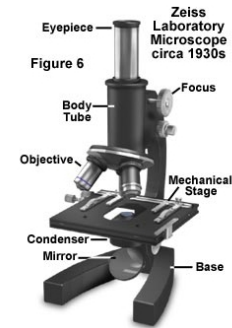
## Quelques repères historiques...

- 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 : 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<sup>ème</sup> siècle : microscopies de champ proche

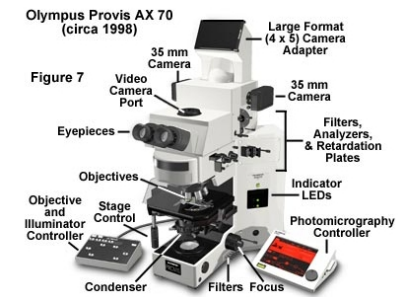
## Microscope de Hooke (1635-1702)



1930



1998



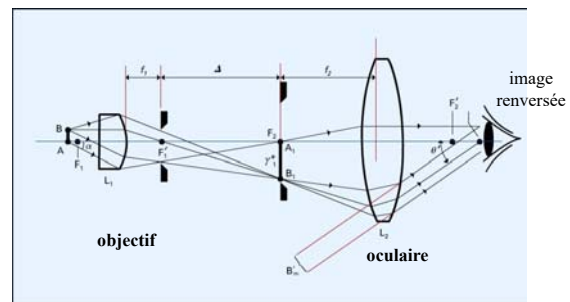
## Le microscope « d'autrefois »

L'objectif forme une image à distance finie,  
L'oculaire met l'image à l'infini

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



## Microscope « moderne »

Afocal

Microscope direct

Microscope inversé



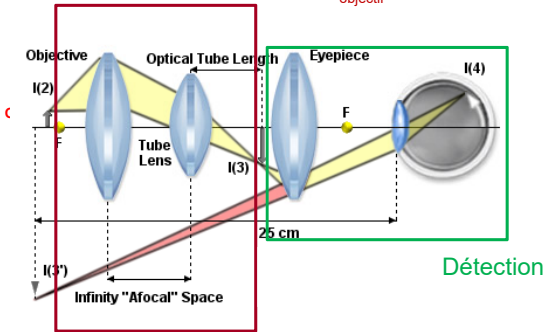
## Le microscope « moderne » Afocal

L'objectif forme d'abord une image à l'infini

L'image se trouve en sortie du microscope, après la lentille de tube

### Imagerie:

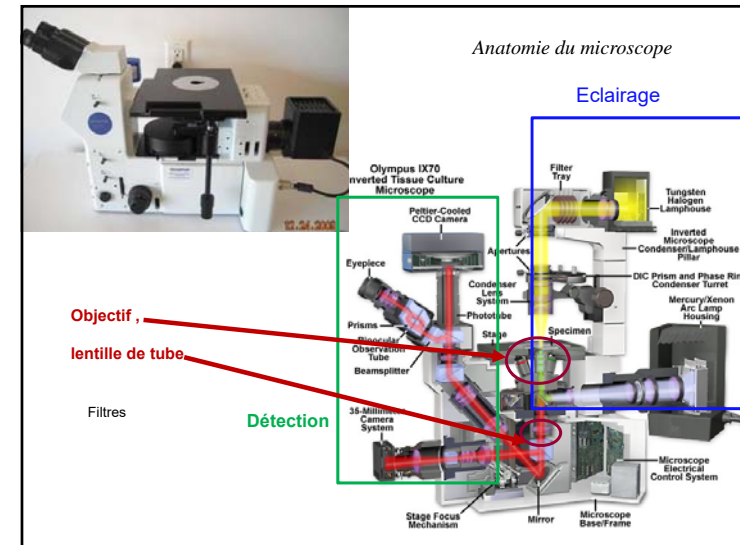
- lentille de tube (fixe, par ex 16cm)
- objectif



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

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

Détection



## Modes d'éclairage

Echantillons transparents ou opaques

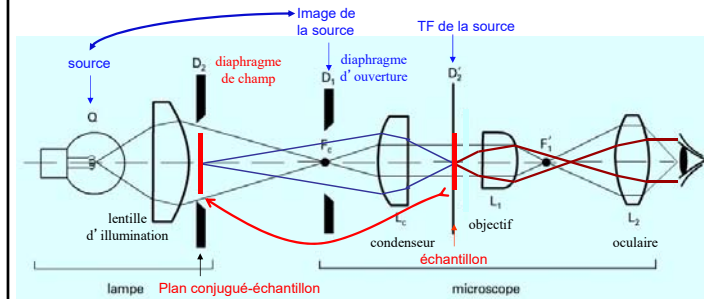
éclairage en transmission

éclairage en réflexion

objectif = condenseur



## Eclairage de Köhler (1893)

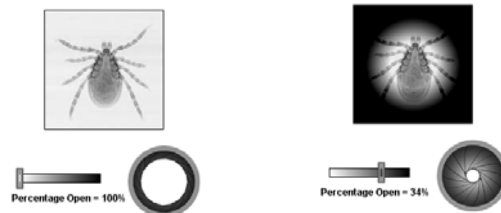


éclairage uniforme sur l'échantillon

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

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

## Diaphragme de champ



## Optimisation de l'éclairage



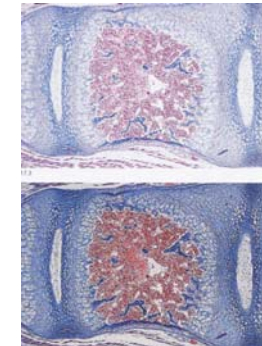
1. Diaphragme de champ fermé, condenseur pas encore optimisé



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

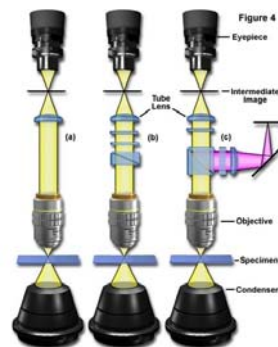


3. Le diaphragme de champ est centré puis ouvert, de façon à juste recouvrir le champ.



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

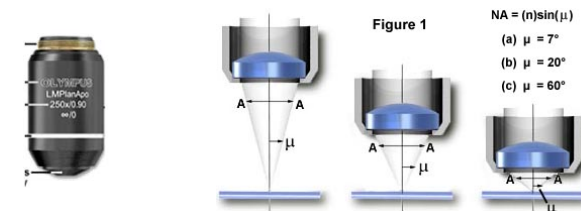


Figure 1

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

(a)  $\mu = 7^\circ$   
 (b)  $\mu = 20^\circ$   
 (c)  $\mu = 60^\circ$

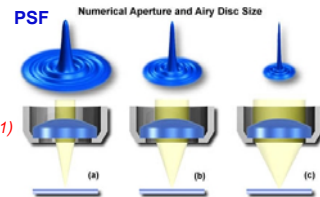
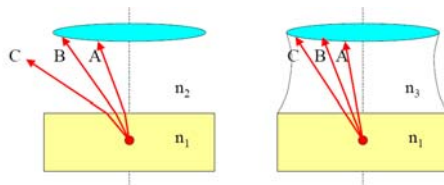
## augmenter la résolution

⇒ forte ouverture numérique

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

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  $\sim 0,2 \mu\text{m}$



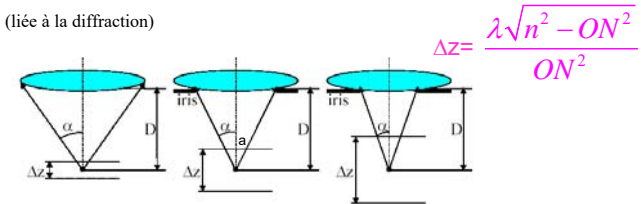
Common Immersion Media

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

(liée à la diffraction)

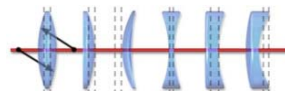


On ne perd pas en résolution quand  $a$  est plus petit que le rayon de la tache de diffraction  
PSF: rayon  $= 1.22 \lambda / (2 ON)$   $a = \Delta Z / 2 \tan \alpha \Rightarrow \Delta Z = 1.22 \lambda / (ON \tan \alpha)$

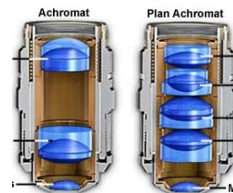
➡ Profondeur de champ  $\Delta Z$   $\lambda = 550 \text{ nm}$ ,  $ON = 0.65$ ,  $n = 1$   
 $\Rightarrow \Delta Z = 1 \mu\text{m}$

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

## Correction des aberrations



Différents types de lentilles simples à  
combinaison pour corriger les aberrations

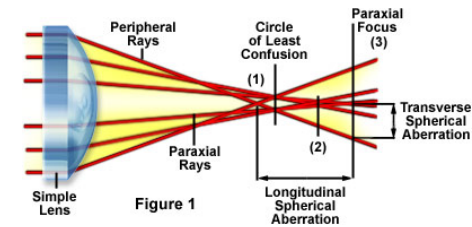


Exemples d'objectifs corrigés

## L'aberration sphérique

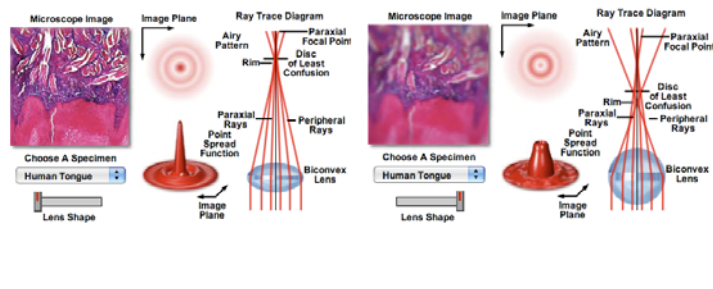
- seule aberration présente sur l'axe du système optique
- par raison de symétrie, sa tache de diffusion est de révolution

Longitudinal and Transverse Spherical Aberration



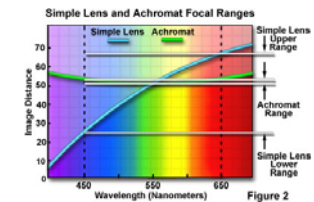
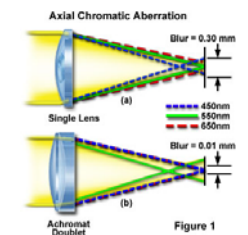
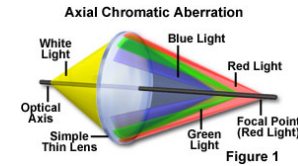
## L'aberration sphérique

- 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  $n(\lambda)$



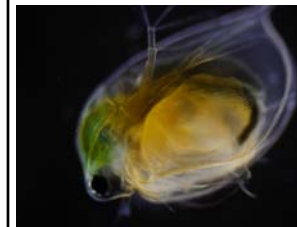
## Les objectifs



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

Plein champ

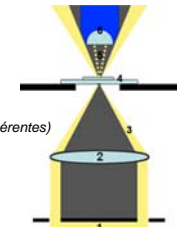
## Microscopie en fond sombre



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

Eclairage annulaire

Sur l'échantillon  
éclairage uniforme  
(somme d'ondes planes 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.

Lumière d'éclairage diffractée par l'échantillon

**Augmenter le contraste:** supprimer le fond continu d'éclairage en filtrant spatialement

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



**Microscopie à contraste de phase**

Plein champ

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

Specimen = objet de phase

cellule épithéliale de joue

Image de l'échantillon

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

Spencer Diamond at the Biological Imaging Facility, UC Berkeley, Wikipedia

**Microscopie de Fluorescence**

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

Plein champ: éclairage par lampe

Point par point: éclairage par laser

Supprimer par filtrage spectral l'excitation

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

Cytokinesis

Mitochondria

Mitochondrial Cytochrome

Centrosome

Nucleus

Chloroplasts

**Microscopie de fluorescence**

Plein champ: éclairage par lampe

Point par point: éclairage par laser

Détecteur

Excitation

émission

Echantillon

Filtres de fluorescence

Dichroïque

Excitation

Emission

**Microscopie confocale**

Point par point:

**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

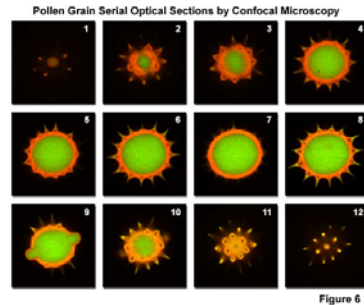


Figure 6

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

### Microscopie par cohérence optique (OCM, ou OCT (tomographie))

3D

Plein champ: éclairage par lampe

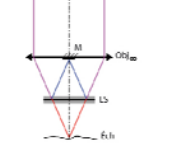
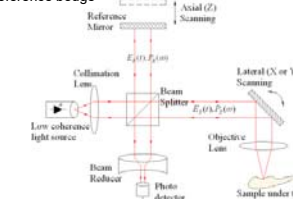
Interféromètre de Michelson

Point par point: éclairage par LED

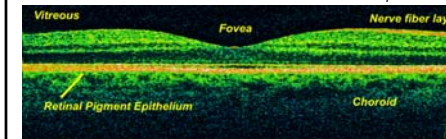
Eclairage: basse cohérence temporelle (résolution en z:  $l_c$ )

Bras de référence bouge

Bras de référence fixe



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



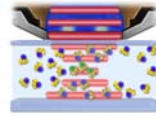
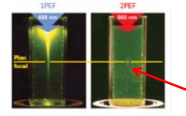
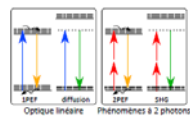
By Maine Eye Center - Bruce C. Cooper, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=525623>

<http://www.optique-ingenieur.com/17/>

Optique pour l'ingénieur (OPT)

Point par point:

### Microscopie multiphotonique



1 photon excitation  
2-photons excitation

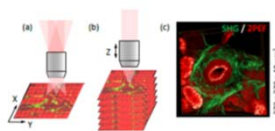
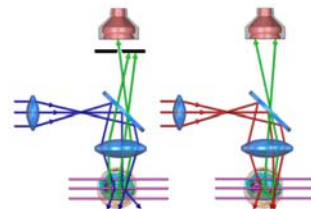


Image reconstruite

Confocal  
Multiphotonique  
(pas de diaphragme)



Thèse Claire Teulon, LOB, oct 2016

<https://www.microscopyu.com>

## La super resolution

Le microscope « moins/pas » limité par la diffraction

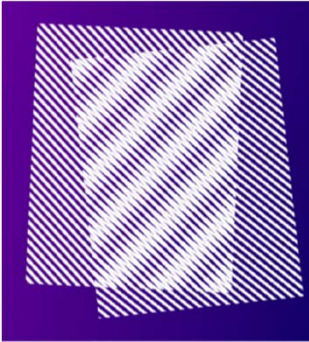


*Plein champ (mais reconstruction)*

**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  
 $k < k_{\text{max}}$

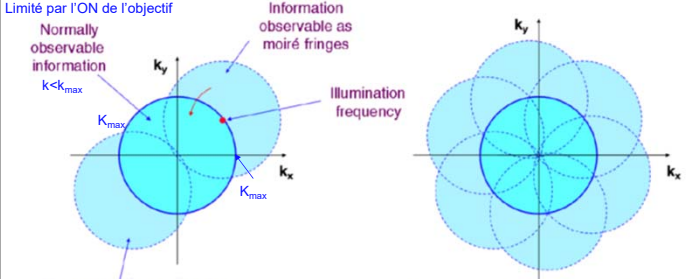
Information observable as moiré fringes

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)

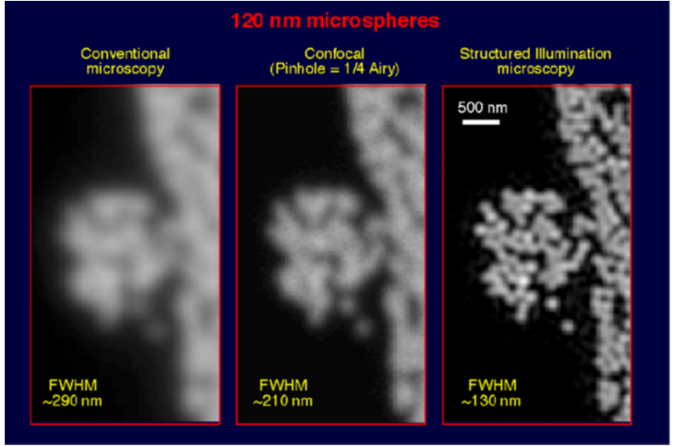
Structured Illumination microscopy

FWHM ~290 nm

FWHM ~210 nm

FWHM ~130 nm

500 nm



**Point par point:**

**Microscopie optique à champ proche**

**Superrésolution**

conventional microscopy  
resolution limit  
features 1/2  $\lambda$  are not resolved

near-field optical microscopy  
diffraction limit circumvented  
much smaller features can be resolved

Far-Field Detector

Scattered Field

Incident Field

High Localized Field

Sample

Metal Probe

Laser Excitation Source

200 nm, 100 nm, 50 nm, 20 nm

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

