

Optique & Microscopie

2 - Historique et principe du microscope

Composants

Limite de résolution

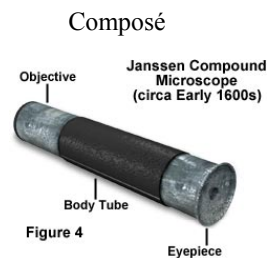
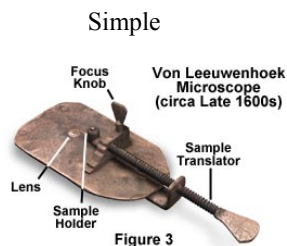
Arnauld Sergé

Microscopie

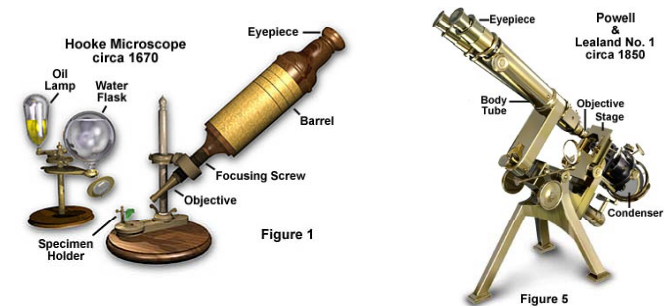
- Trois buts:
 - produire une image **agrandie** du spécimen,
 - **séparer les détails** dans l'image,
 - **rendre les détails visibles** à l'oeil humain ou à l'appareil photo.
- Dispositifs avec **lentilles multiples**, avec objectifs et condenseurs (**composé**)
- Dispositifs avec **lentille simple**, souvent tenus à la main, comme une loupe.

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html>

Microscopie: Histoire



Microscopie: Histoire



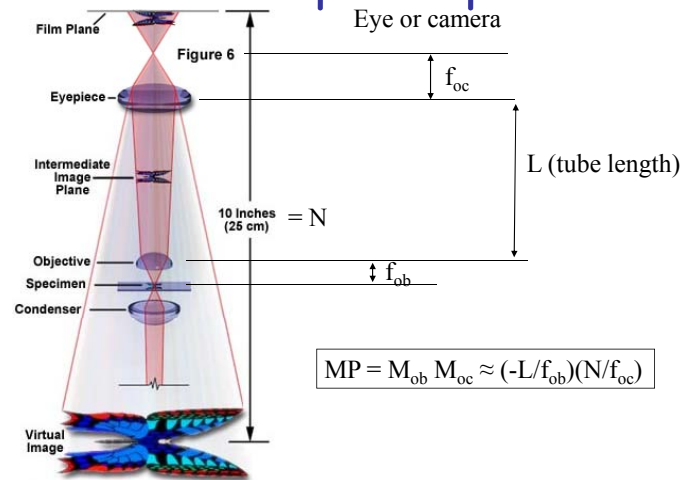
Microscopie: Importance

- Les différences entre la microscopie **biomédicale** et de **matériaux** impliquent comment le microscope projette la lumière sur l'échantillon.
 - Microscope biologique classique: spécimen mince; la lumière est transmise par l'échantillon, focalisée par l'objectif, puis passe dans les oculaires du microscope. *Diascopie*
 - Pour la surface des circuits intégrés: la lumière passée par l'objectif et est alors réfléchi par la surface de l'échantillon et dans l'objectif du microscope. *Episcopie* (cf. également *fluorescence*)
- Principal problème en microscopie: les **faibles contrastes**
 - la lumière passe par des spécimens très minces ou se réfléchit sur des surfaces avec un degré élevé de réflectivité.
 - « trucs » optiques pour augmenter le contraste: lumière polarisée, imagerie par contraste de phase, contraste d'interférence différentiel, illumination par fluorescence, champ noir, illumination de Rheinberg, contraste de modulation de Hoffman, et utilisation des filtres optiques.

Microscope: Concepts de base

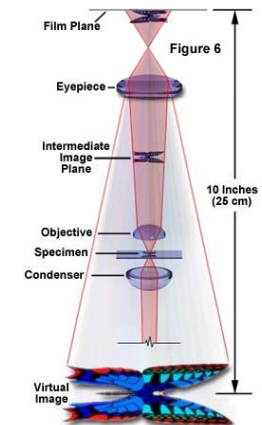
- Le regard dans un microscope voit **l'image** du spécimen.
 - "flottant" dans l'espace environ 10 millimètres au-dessous du haut du tube d'observation (au niveau du diaphragme fixe de l'oculaire) où l'oculaire est inséré.
- Image observée non réelle;
 - "carte" ou représentation du spécimen dans diverses couleurs et/ou des nuances de gris de noir au blanc.
 - image souhaitée : représentation précise du spécimen;
 - facile de dégrader une image par une technique inappropriée ou un mauvais équipement.

Microscope composé



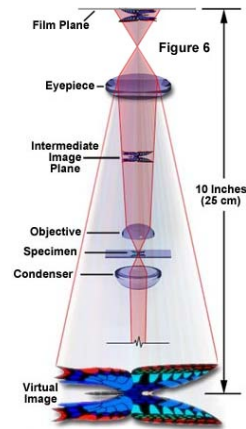
Microscope composé

- Lentille la plus proche de l'objet : **objectif**.
- Source de lumière : **condenseur**, produisant un cône de lumière concentré sur l'objet (spécimen).
- La lumière passe par le spécimen et dans l'objectif
 - projette une image vraie, inversée et agrandie du spécimen à un plan fixe dans le microscope: le **plan image intermédiaire**



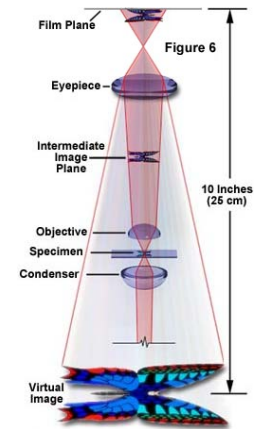
Microscope composé

- **L'objectif:** collecte la lumière de chacun des divers parties ou points du spécimen.
 - focalisé assez étroitement sur le spécimen de sorte qu'il projette une image agrandie et vraie vers le haut dans le tube de corps.
- La distance entre le plan focal arrière de objectif et l'image intermédiaire se nomme la **longueur optique de tube**.
 - longueur mécanique de tube: distance entre la platine (où l'objectif est monté) au bord supérieur des tubes d'observation où les oculaires sont insérés.

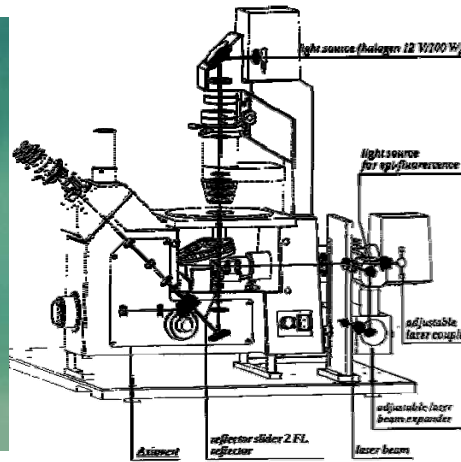


Microscope composé

- **Oculaires :** ajustés dans le tube de corps à l'extrémité supérieure
 - Grossissement supplémentaire de la vraie image projetée par l'objectif.
- L'oeil de l'observateur voit l'image agrandie comme si elle était à une distance de 25 centimètres de l'œil
 - l'image virtuelle apparaît comme si elle était près de la base du microscope.
- **Photomicrographie :** vraie image agrandie projetée par l'objectif.
 - projeté sur le film photographique dans un appareil photo, sur un écran ou une caméra placé au-dessus de l'oculaire.



Microscopes



Chemin optique d'un microscope

$$M = \frac{y''}{y} = M_{ob} \cdot M_{oc} = \frac{L}{f_{ob}} \cdot \frac{N}{f_{oc}}$$

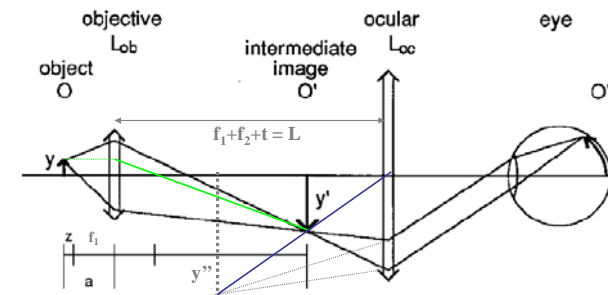
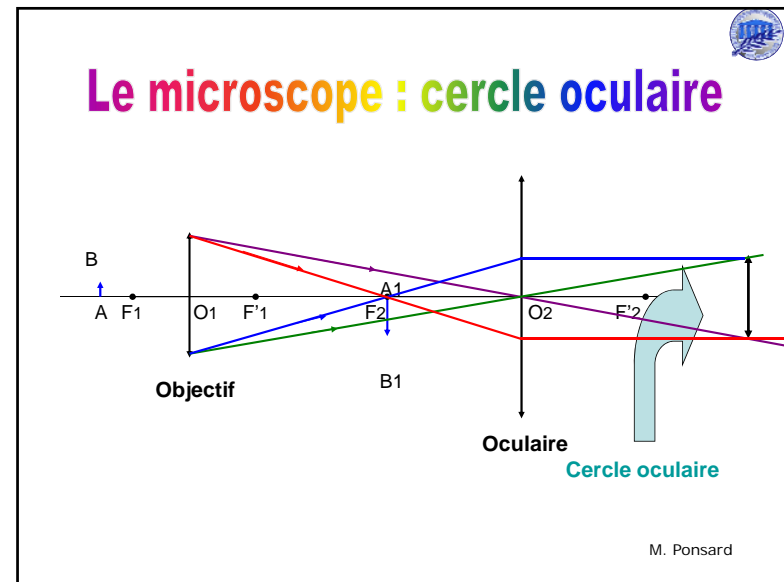
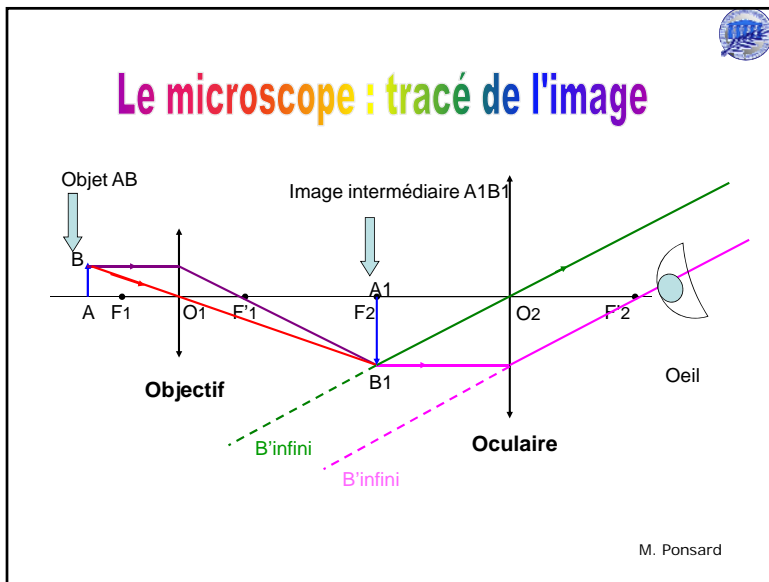
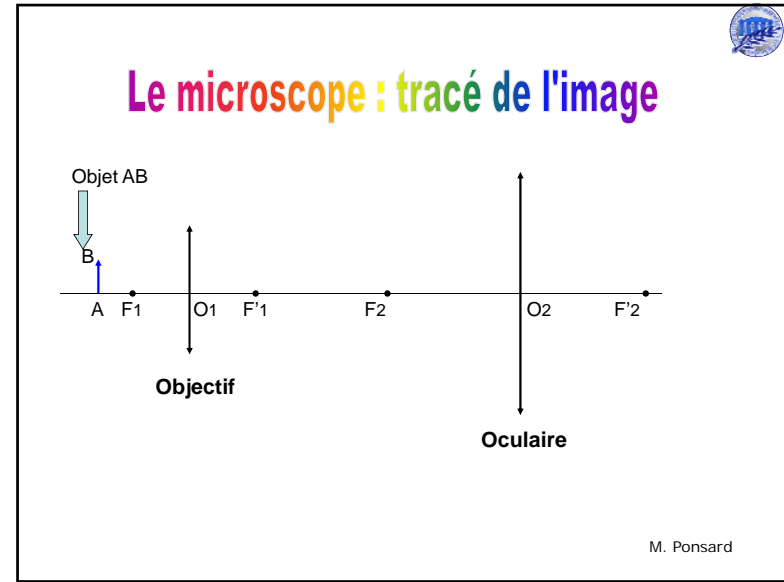
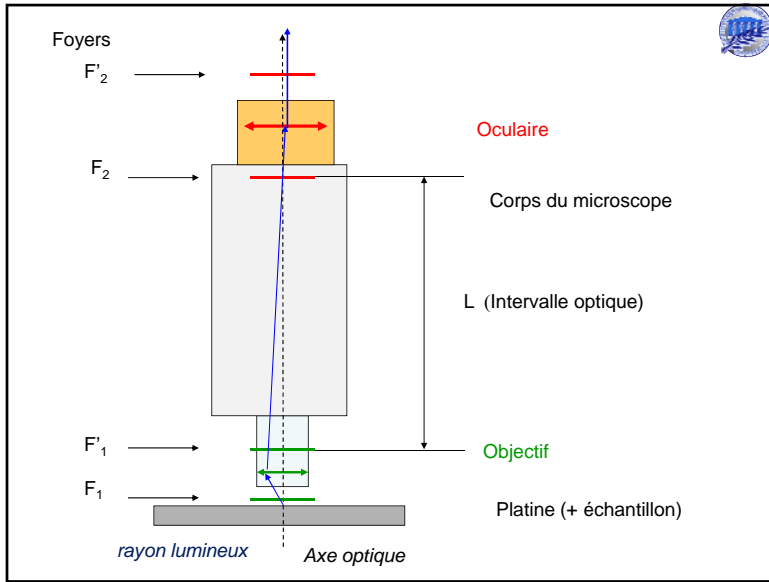
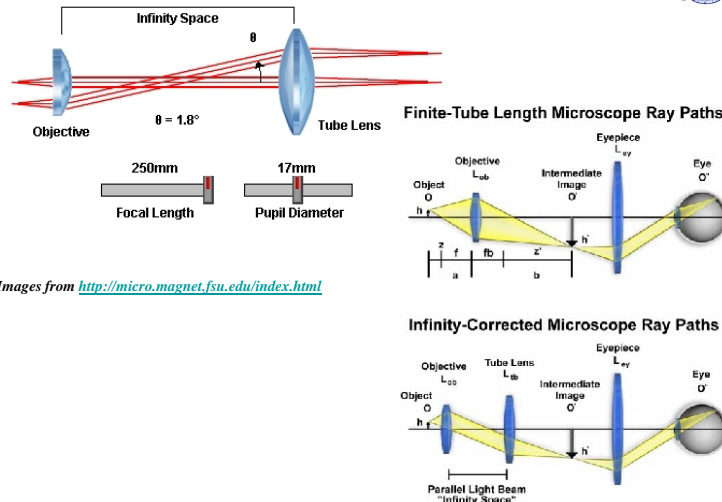


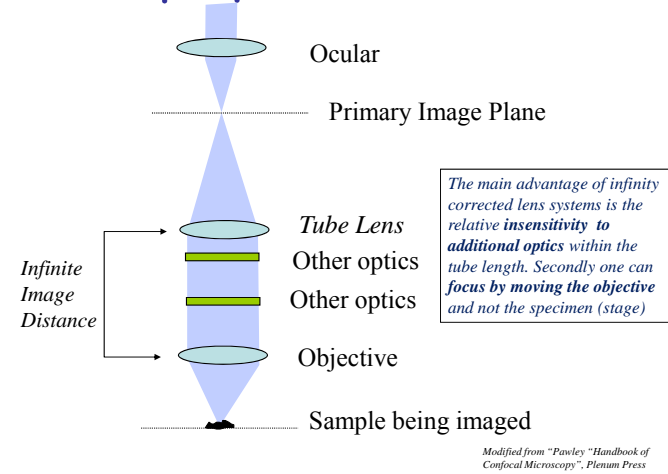
FIGURE 3 Ray path in the microscope from object to observer's eye (see text).



• Microscope Basics, Magnification, Optical systems



Optiques Infinies

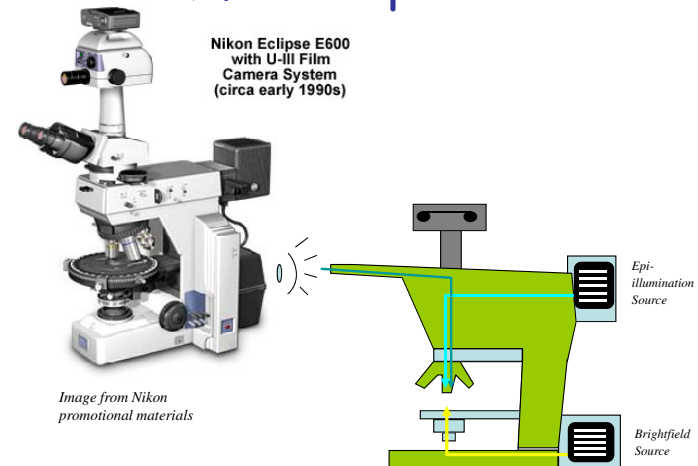


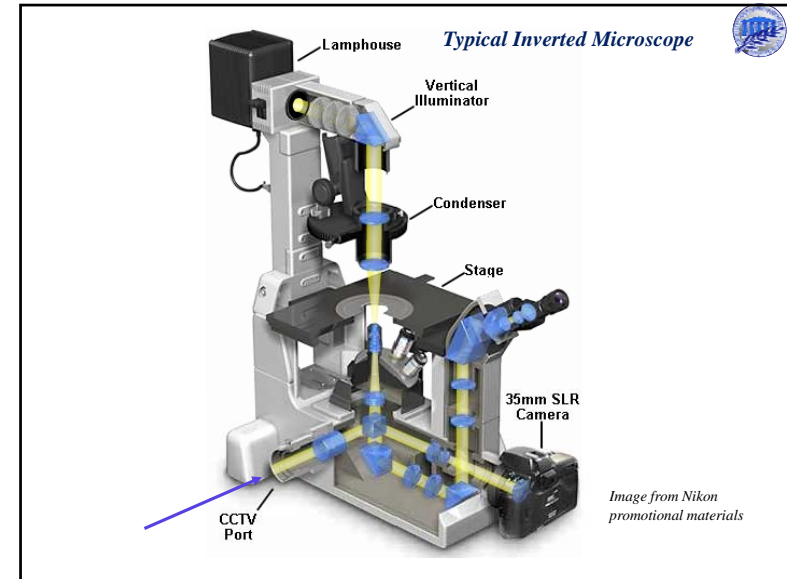
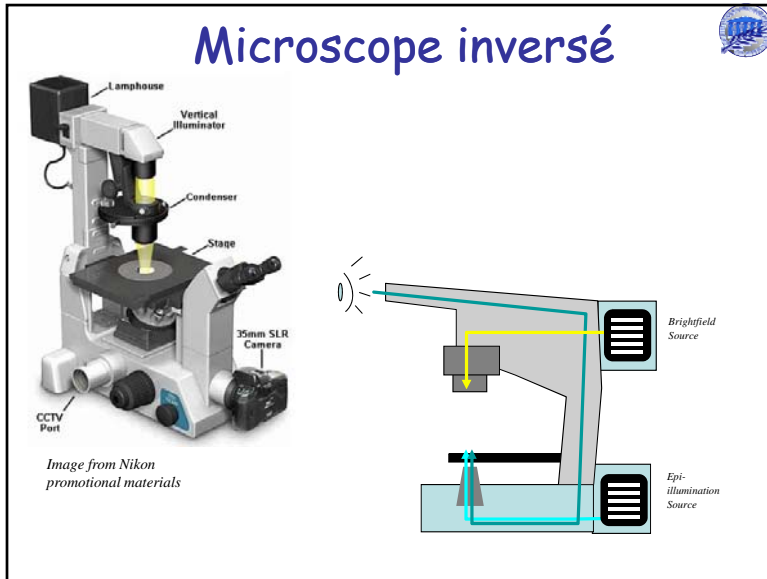
Grossissement d'un microscope

$$M = \frac{y''}{y} = M_{ob} \cdot M_{oc} = \frac{L}{f_{ob}} \cdot \frac{N}{f_{oc}}$$

- typique
 - $M_{ob} = 10 \dots 100$
 - $M_{oc} = 2 \dots 20$
- fort grossissement
 - f_{ob} & f_{oc} petit
 - y petit \rightarrow forte intensité locale
 - L grand
 - mais intensité $\sim 1/L^2$
 - \rightarrow lumière (photons) 'diluée'

Microscope droit





Composants du microscope

- Ocular
- Objectives
- Condenser
- Numerical Aperture
- Refractive Index
- Aberrations
- Optical Filters

Oculaire - Eyepiece

- Essentially a **projection lens** (5x to 15x magnification)
Note: there is usually an adjustment call the inter-pupillary distance on eyepieces for personal focusing
- **Huygenian**
 - Projects the image onto the retina of the eye
 - your eye should not be right on the lens, but back from it ([eyecups create this space](#))
- **Compensating**
 - designed to work with specific apochromatic or flat field objectives - it is color compensated and cannot be mixed with other objectives (or microscopes)
- **Photo-adapter**
 - designed to project the image on the film in the camera - usually a longer distance and lower magnification from 0.5x to 5x

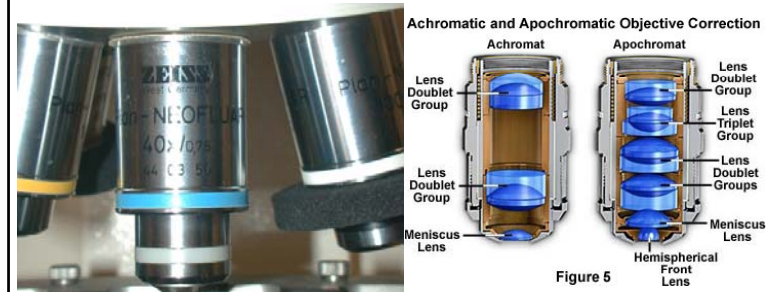
Images from <http://micro.magnet.fsu.edu/index.html>

Condenseur

- Has several purposes
 - must **focus the light** onto the specimen
 - fill the entire numerical aperture of the objective (i.e. it must **match the NA of the objective**)
- Most microscopes will have what is termed an “**Abbe**” condenser (not corrected for aberrations)
- Note if you exceed 1.0 NA objective, you probably will need to use oil on the condenser as well (except in inverted scopes)



Objectifs



Images from <http://micro.magnet.fsu.edu/index.html>

Objectifs



∞ - Infinity corrected



PLAN-APO-40X 1.30 N.A. 160/0.22

Flat field Apochromat Magnification Numerical Tube Coverglass
Factor Aperture Length Thickness

Inscriptions sur les objectifs



Limite de résolution

Figure 1

Microscopie photonique

Optique limitée par la diffraction

Source ponctuelle

rayons diffractés

Plan image

Yves Usson TIMC-EMMO Université Joseph Fourier Grenoble Janvier 1999

Point Spread Function = Image d'un point

Système optique

L'image d'un point n'est pas un point !

Microscopie photonique

Formation de l'image - Diffraction

Image idéale d'un point

distribution idéale

Image obtenue (disque de Airy)

fonction d'étalement (PSF)

Yves Usson TIMC-EMMO Université Joseph Fourier Grenoble Janvier 1999

Microscopie photonique

Pouvoir séparateur

intensité

points résolus

intensité

points non-résolus

Yves Léon TIMC-EMM Université Joseph Fourier Grenoble Janvier 1998

Ernst Abbé (1840-1905)

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Théorie d'Abbé de la résolution latérale

Figure 18.37 Overlapping images

Figure 18.38 Overlapping images

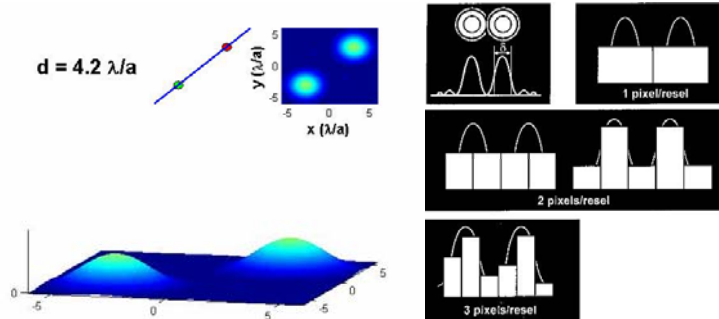
Résolution théorique

Image d'un point à travers une lentille.
Interférence positive et négative.

Tache de Airy
 $r = 0.61 \lambda / \text{ON}_{\text{obj}}$

Haute résolution et échantillonnage

- La limite à laquelle deux disques de Airy peuvent être résolus en deux entités séparées est appelée le **critère de Rayleigh**.
- Quand la distance centre à centre entre deux pics est moins que la largeur de ces pics, les deux disques ne sont pas séparables individuellement d'après le critère de Rayleigh ($D = r$).



Fonction de Airy

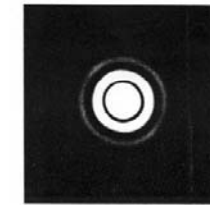
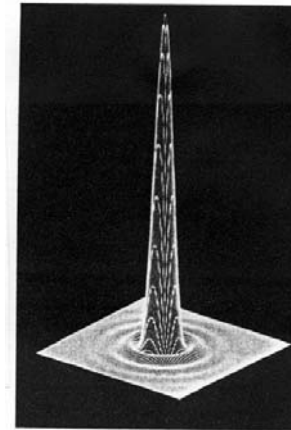


Figure 10.50 Airy rings (1.0-mm hole diameter).

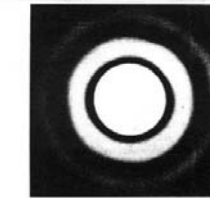
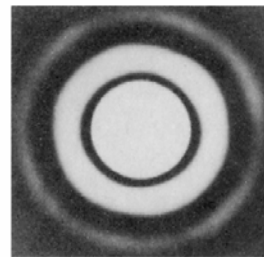
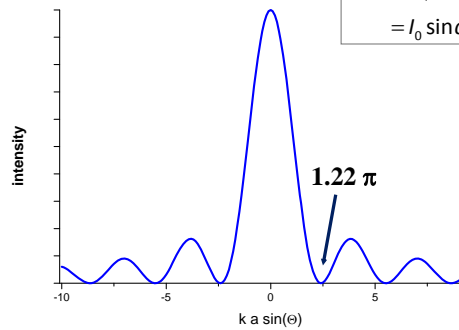


Figure 10.29 Airy rings (0.5-mm hole diameter).

Formule de Airy - fonction d'étalement d'un objet ponctuel (PSF)

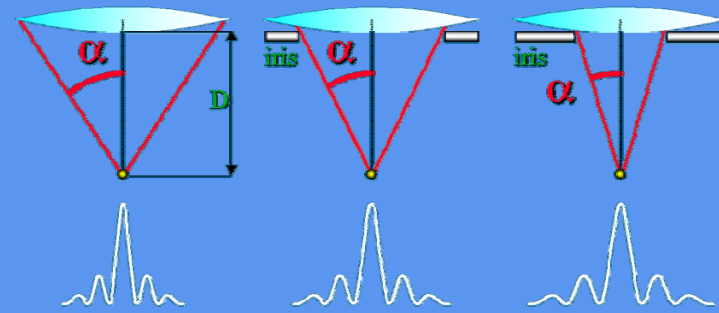
$$I(P) = I_0 \left(\frac{J_1(\pi D \sin \theta / \lambda)}{\pi D \sin \theta / \lambda} \right)^2 \quad (\text{cercle})$$

$$= I_0 \text{sinc}(\pi a \sin \theta / \lambda)^2 \quad (\text{fente})$$



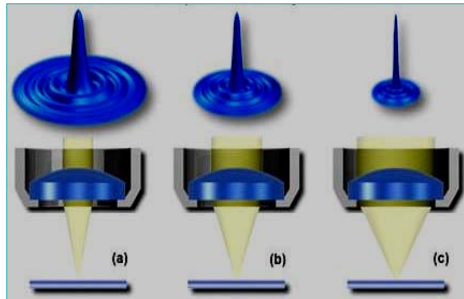
Microscopie photonique

Effet de l'ouverture numérique

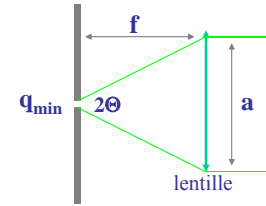


Ouverture numérique $NA = n \sin \alpha$, D : distance de travail

Ouverture numérique, PSF et résolution



Résolution latérale



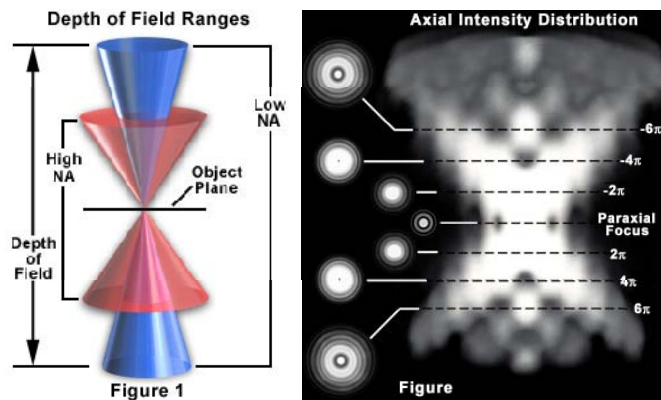
- critère de Rayleigh :
la distance entre 2 objets doit être plus grande que la distance du 1^{er} minimum du disque de Airy

$$q_{\min} = 1.22 \frac{f \lambda}{a} = 1.22 \frac{\lambda}{2 NA}$$

Facteur correctif de Rayleigh

NA: Ouverture numérique

Profondeur de Champ



Résolution axiale

- Changement de largeur en z

$$q(z) = q_{\min} \sqrt{1 + \left(\frac{z \lambda}{\pi q_{\min}^2} \right)^2}$$

- profondeur focale
– distance pour laquelle la taille de l'image double

$$DOF = 2 \frac{q_{\min} f}{a} = 1.6 \frac{q_{\min}^2}{\lambda}$$

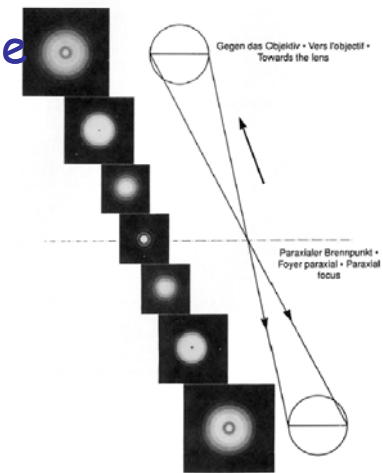


FIGURE 8 The evolution of the diffraction image of a circular aperture with differing planes of focus in an aberration-free system.

Ouverture numérique

- The wider the angle the lens is capable of receiving light at, the greater its **resolving power**
- The higher the NA, the shorter the working distance

Objective
Front Lens
Specimen

$NA = n \sin(\theta)$
 $0.25 = 1.0 \sin 15.0^\circ$

NA = Numerical Aperture
n = Refractive Index = 1.00 (Air)
 θ = Angular Aperture

Numerical Aperture

Approximate Magnification **10x**

Objective
Front Lens
Specimen

$NA = n \sin(\theta)$
 $0.50 = 1.0 \sin 30.0^\circ$

NA = Numerical Aperture
n = Refractive Index = 1.00 (Air)
 θ = Angular Aperture

Numerical Aperture

Approximate Magnification **40x**

Objective
Front Lens
Specimen

$NA = n \sin(\theta)$
 $0.95 = 1.0 \sin 74.7^\circ$

NA = Numerical Aperture
n = Refractive Index = 1.00 (Air)
 θ = Angular Aperture

Numerical Aperture

Approximate Magnification **100x**

Images reproduced from:
<http://micro.magnet.fsu.edu/>
Please go to this site and do the tutorials

Variations d'indice

Object Space n = 1.00
Cover Glass
Microscope Slide
Specimen
Objective Front Lens

n = Refractive Index
Low High
Numerical Aperture (NA) = n sin(θ)
NA = 1.00 sin (65°)
0.90 = 1.00 sin (65°)
 θ = Angular Aperture = 65°

Object Space n = 1.11
Cover Glass
Microscope Slide
Specimen
Objective Front Lens

n = Refractive Index
Low High
Numerical Aperture (NA) = n sin(θ)
NA = 1.11 sin (65°)
1.00 = 1.11 sin (65°)
 θ = Angular Aperture = 65°

Object Space n = 1.33
Cover Glass
Microscope Slide
Specimen
Objective Front Lens

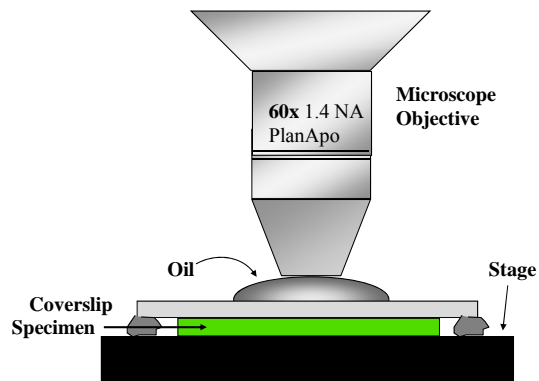
n = Refractive Index
Low High
Numerical Aperture (NA) = n sin(θ)
NA = 1.33 sin (65°)
1.20 = 1.33 sin (65°)
 θ = Angular Aperture = 65°

Object Space n = 1.51
Cover Glass
Microscope Slide
Specimen
Objective Front Lens

n = Refractive Index
Low High
Numerical Aperture (NA) = n sin(θ)
NA = 1.51 sin (65°)
1.38 = 1.51 sin (65°)
 θ = Angular Aperture = 65°

Images reproduced from:
<http://micro.magnet.fsu.edu/>

Objectifs de microscope



Index de réfraction

