

# LP32 - Microscopies optiques

Cléments (DE LA SALLE et COLLÉAUX

12 juin 2020

Niveau : L2

## Bibliographie

- ↗ *Optique*, Houard →
- ↗ *PCSI*, Grécias →
- ↗ *Les instruments d'optique*, Dettwiller →
- ↗ *Les nouvelles microscopies*, Aigouy →
- ↗ <http://toutestquantique.fr/microscopes/> → Tout plein d'animations!
- ↗ *Optique expérimentale*, Sextant → p.30 et 50 pour le microscope

## Prérequis



## Expériences



## Table des matières

Table des matières	1
<b>1 Microscope à deux lentilles</b>	<b>2</b>
1.1 L'oeil et ses limites . . . . .	2
1.2 Présentation . . . . .	3
1.3 Performances . . . . .	4
1.4 Limites du microscope à deux lentilles . . . . .	5
<b>2 Microscopie à fluorescence, ou microscopie à champ lointain</b>	<b>8</b>
2.1 Microscope à fluorescence . . . . .	8
2.2 Microscope confocal . . . . .	9
2.3 Technologie PALM . . . . .	9
<b>3 Microscopie à champ proche</b>	<b>10</b>
3.1 Nécessité des ondes évanescente . . . . .	10
3.2 Technologie STOM . . . . .	11

# Introduction

## 1 Microscope à deux lentilles

### 1.1 L'oeil et ses limites

Deux trois mots sur l'oeil pour contextualiser la leçon... Attention à ne pas aborder trop de notions, c'est pas une leçon sur l'oeil! Je laisse cette sous-partie, mais ne pas hésiter à l'abandonner (quitte à en toucher un mot en intro) si manque de temps.

Notre oeil est le premier instrument d'optique que l'on utilise dans notre vie (enfin pour 99.99% de la population...). On peut résumer son fonctionnement à celui d'une lentille (cristallin) et d'un écran (rétine). On que si on prend une lentille, de distance focale donnée, pour une position de l'écran fixe, il n'existe qu'un lieu où l'objet est net. Dans le cas de l'oeil, on veut pouvoir voir net quelque soit la distance de l'objet... Ceci implique donc que le cristallin doit adapter sa focale (à l'aide de muscles) puisque la distance cristallin-rétine est fixe (17 mm).

Si l'objet à observer est à l'infini, les muscles sont totalement relâchés et la focale du cristallin est donc  $f = 17$  mm. Si l'objet est plus proche, il faut diminuer la focale pour que l'image se situe toujours sur la rétine, c'est l'**accomodation**.

Balancer l'animation :

<https://www.geogebra.org/m/mfhzbyue>

Dans ce contexte, chaque objet (ponctuel) est associé à un point de la rétine. Mais cette rétine justement, il s'agit d'une matrice de récepteurs (bâtonnets et cônes). Si deux points ont leur image sur le même récepteur, alors il ne sont pas dissociable.

#### Définition : Limite de résolution

Ceci nous amène à la **limite de résolution** de l'oeil (ou d'un capteur CCD) comme l'angle minimale sous lequel peuvent être vus deux objets pour les séparer (angle AOB sur l'animation). Pour l'être humain, il vaut environ  $1'$  d'angle, soit  $2.9 \cdot 10^{-4}$  rad.

#### OG

En gros, la limite c'est des détails de 1mm à 3m

Mais vous allez me dire, on est pas cons, on n'a qu'à rapprocher l'objet pour voir mieux les détails... Sauf que chacun le sait, on ne peut pas accomoder indéfiniment : il existe une distance (de l'ordre de 25 cm pour un oeil emmétrope) qui correspond à la focale minimale du cristallin (10 mm). Les muscles écrasent au maximum ce dernier.

#### Définition : Ponctum proximum

Cette distance critique est appelée **ponctum proximum**. Je place ma main à moins de 20 cm, on sent que l'oeil force pour voir net et que ce n'est plus possible si on rapproche trop la main.

#### OG

Au PP, les détails observables sont de  $2.9 \cdot 10^{-4} \times 0.25 = 70 \mu\text{m}$ . C'est la distance la plus petite observable à l'oeil nu.

■ Mais quand on veut regarder des cellules, ou pire : des molécules ou atomes... C'est clairement pas suffisant !

## 1.2 Présentation

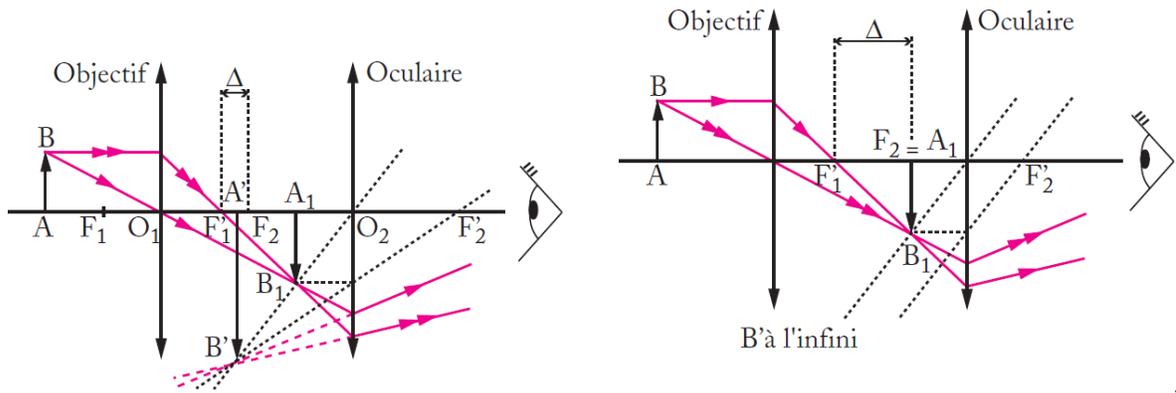


FIGURE 1.1 – Attention, une erreur s'est glissée... À toi de la trouver :)

On utilise alors un système à deux lentilles...

### Définition : Objectif et oculaire

La première lentille est appelée **objectif**. C'est la pièce maîtresse, celle qui doit agrandir l'image, souvent d'un facteur -100. La seconde est l'**oculaire**, son grossissement est généralement de 10 et il sert à observer l'image formée par l'objectif à l'oeil nu.

Dessiner le schéma, dans le même sens que la manip sur la paillasse et pourquoi pas avoir un microscope commercial pas loin.

### Manip' : Microscope

Utiliser un banc d'optique et on peut modéliser l'oeil par un lentille et un écran qu'on attache ensemble.

Les contraintes à respecter sont les suivantes :

- L'image doit être agrandie (rôle de l'objectif)
- L'oeil ne doit pas se fatiguer : il faut que l'image soit formée à l'infini (rôle de l'oculaire)
- Le microscope ne doit pas être trop encombrant.

La première contrainte nous fait donc utiliser un objectif de courte focale (quelques millimètres), et la deuxième contraint l'emplacement de l'oculaire : pour que l'image sorte à l'infini, il faut que  $A_1$  (image intermédiaire) coïncide avec  $F_2$  blabla. En pratique  $\Delta$  est fixé et on bouge juste la distance entre l'objet et

l'objectif.

### Cercle oculaire

Pour utiliser au mieux le microscope, il faut que l'oeil collecte toute la lumière issue de l'échantillon... Si on représente les trajectoires des rayons extrémaux (contraint par la taille de l'objectif) issus de deux points d'un même objet, on remarque qu'elles se croisent en sortie en un cercle appelé **cercle oculaire**. Pour collecter le maximum de lumière, il faut donc placer l'oeil au niveau de ce cercle.

Notons que la taille du cercle est très inférieure à celle de la pupille... Il suffit donc que l'oeil soit pas trop loin de ce cercle. S'il est trop éloigné, il ne recevra que les rayons proches de l'axe et on perd alors l'image plus loin de l'axe optique.

En fait, ce cercle se situe en général au niveau de  $F'_2$  le plan focal image de l'oculaire.

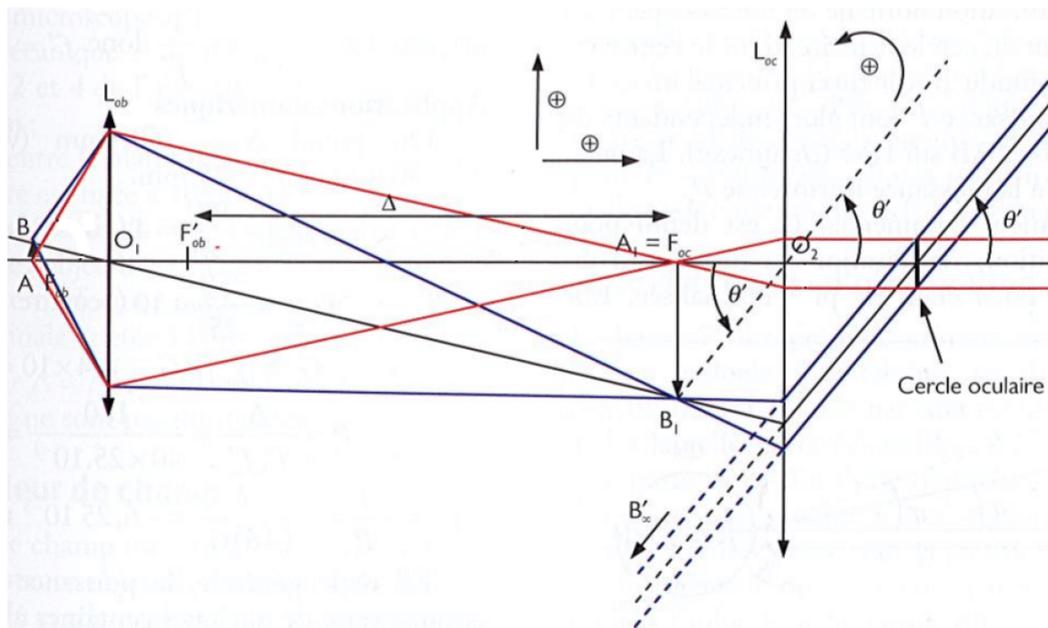


FIGURE 1.2 – Le cercle oculaire est l'intersection des faisceaux rouge et bleu

## 1.3 Performances

On peut caractériser un microscope et son efficacité par les grandeurs suivantes :

### Définition : Grossissement

Le **grossissement** est définie comme le rapport des des diamètres apparents de l'objet vu avec le microscope et de l'objet vu à l'oeil nu, au PP (distance  $d_m$ ). Il s'agit donc également d'un rapport d'angles.

Sans microscope,

$$\alpha = \frac{\overline{AB}}{d_m}$$

Avec microscope (algébriquement) :

$$\alpha' = \frac{\overline{A_1B_1}}{f_2}$$

Avec un grossissement (on utilise un moment la formule de conjugaison aux centres)

$$\gamma = \frac{\overline{A_1B_1}}{\overline{AB}} = \frac{\overline{O_1A_1}}{\overline{O_1A}} = 1 - \frac{\overline{O_1A_1}}{f_1} = -\frac{\overline{O_1A_1} - f_1}{f_1} = -\frac{\Delta}{f_1}$$

D'où une expression finale :

$$G = -\frac{\alpha'}{\alpha} = \frac{\Delta d_m}{f_1 f_2}$$

### Remarque

Le grossissement est négatif car l'image est inversée

### Définition : Puissance

On utilise aussi parfois la notion de puissance, même si elle n'apporte rien de plus. On la définit comme

$$P = \left| \frac{\alpha'}{\overline{AB}} \right|$$

Elle s'exprime en dioptrie.

Pour un objet de taille fixe, une grande puissance donnera donc une image plus grande. Réciproquement, on se dit qu'on peut observer des objets plus petits avec une plus grande puissance.

$$P = \frac{|\gamma|}{f_2} = \frac{|G|}{d_m}$$

Les constructeurs prennent  $d_m = 25 \text{ cm} = 1/4 \text{ m}$ , donc on trouve parfois écrit, par abus de notations

$$P = 4G$$

### OG

Les grossissements de microscopes de paillasse varient de 40 à 1000. On peut calculer

$$\Delta = 16 \text{ cm} \quad d_m = 25 \text{ cm} \quad f_1 = 4 \text{ mm} \quad f_2 = 2 \text{ mm} \implies G = 500$$

## 1.4 Limites du microscope à deux lentilles

### Définition : Profondeur de champ

Comme pour l'oeil, qui peut accommoder sur une certaine plage de distances, on définit une plage dans laquelle peut se situer l'objet sans que l'oeil n'est à accommoder.

On a la relation

$$\overline{AF_1 A_1 F'_1} = -f_1^2$$

Donc dans le cas où les rayons partent à l'infini (PR) :

$$\overline{AF_1}^{(PR)} = \frac{f_1^2}{\Delta}$$

Il faut maintenant calculer cette même longueur dans le cas d'accommodation maximale (PP) :

$$\overline{AF_1} = \frac{f_1^2}{\Delta + F_2 A_1}$$

Et

$$\overline{A_1 F_2 A' F'_2} = -f_2^2$$

Et puisque l'on place son oeil au niveau de  $F'_2$  (cf. cercle oculaire), la distance au punctum proximum (PP) est

$$d_m = \overline{A' F'_2}$$

Ainsi, dans le cas (PP),

$$\overline{AF_1}^{(PP)} = \frac{f_1^2}{\Delta + \frac{f_2^2}{d_m}}$$

Donc la profondeur de champ vaut

$$Pc = \overline{AF_1}^{(PR)} - \overline{AF_1}^{(PP)} = \frac{f_1^2}{\Delta} \left( 1 - \frac{1}{1 + \frac{f_2^2}{d_m \Delta}} \right) \underset{f_2 \ll d_m, \Delta}{\sim} \frac{f_1^2}{\Delta} \frac{f_2^2}{d_m \Delta}$$

D'où une valeur finale

$$Pc = \frac{d_m}{G^2}$$

Ce qui met en lumière un compromis : si on veut un fort grossissement, on pourra moins explorer plusieurs couches... La zone dans laquelle l'image est nette est de plus en plus faible. C'est embêtant par exemple pour l'observation de grosses cellules comme les nerfs.

### OG

Pour un grossissement de 500, on trouve  $Pc = 1 \mu\text{m}$ .

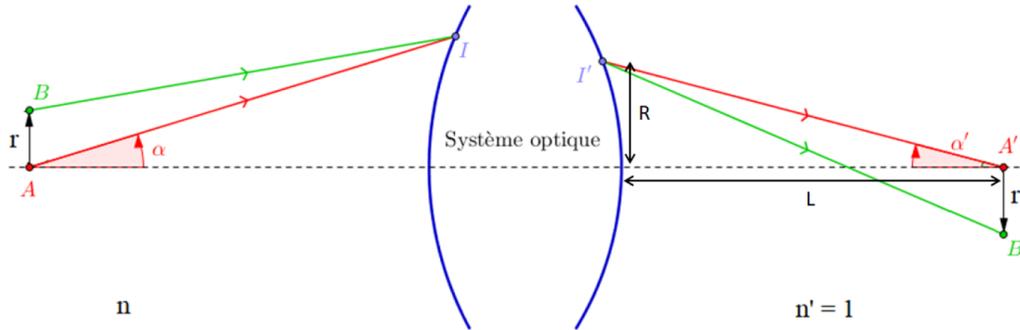
*Au besoin, juste balancer le résultat ici, en expliquant pourquoi c'est logique d'avoir un truc en  $\lambda$*   
Il existe une autre limite, due au caractère ondulatoire de la lumière : la limite de diffraction. On sait qu'un objet sphérique va être vu comme une **tâche d'Airy**. L'angle sous lequel est vu cette tâche est

$$\alpha_R = 0.61 \frac{\lambda}{R}$$

Avec  $R$  le rayon des lentilles. Donc l'objet apparaît avec une taille minimale sur l'écran

$$r' = 0.61 \frac{\lambda L}{R}$$

Cf. critère de Rayleigh et programme Python.



Or pour avoir applanétisme selon le plan orthogonal à l'axe optique, il faut vérifier la condition d'ABBE :

$$nr \sin \alpha = n' r' \sin \alpha' \implies nr \sin \alpha = 0.61 \frac{\lambda d R}{R d} = 0.61 \lambda$$

Ainsi l'objet le plus petit observable est de taille

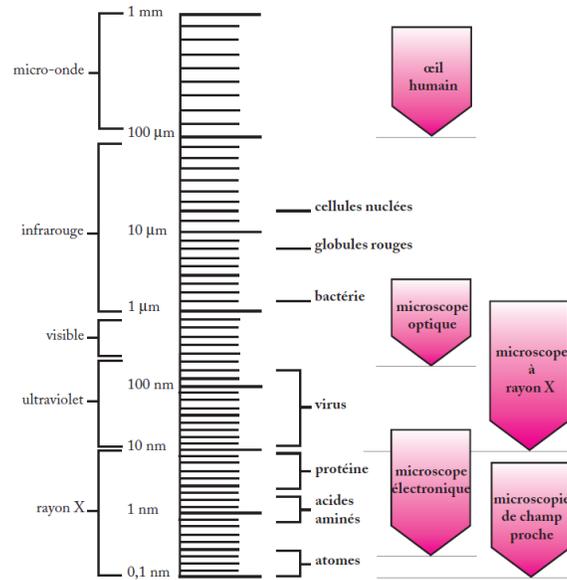
$$r = 0.61 \frac{\lambda}{\omega} \quad \text{avec} \quad \omega = n \sin \alpha \quad \text{appelé ouverture numérique}$$

### Remarques

Ainsi, pour améliorer le pouvoir de résolution, on peut

1. Utiliser des petites longueurs d'ondes (logique, une grande onde ne "voit" pas les détails). Mais on est limité à 400 nm
2. Augmenter l'indice de milieu dans lequel se trouve l'objet... On peut avoir au mieux 1.5
3. Augmenter l'angle sous lequel est vu l'objet (attention aux aberrations géométriques en sortant des conditions de GAUSS!) mais on aura au mieux  $\sin \alpha = 1$

Toutes ces considérations regroupées nous permettent d'affirmer que la meilleure résolution pour un tel microscope est de  $0.2 \mu\text{m}$ . C'est 1000 fois mieux que l'oeil humain, mais ça suffit toujours pas...



## Aberrations

On peut aussi se faire les aberrations chromatiques et géométriques.

## Remarque

C'est bien la diffraction qui est plus contraignante que les aberrations.

! C'est simple : on a deux problèmes... Voyons les solutions pour les annuler!

## 2 Microscopie à fluorescence, ou microscopie à champ lointain

C'est une partie un peu originale... Normalement c'est plutôt la microscopie en champ proche qui est traitée (il faut en choisir une seule et ne pas faire les deux!!!). Si on veut en parler, se renseigner sur le STOM, les ondes évanescente...

Globalement cette partie va être carrément plus qualitative, d'où l'utilité d'avoir fait quelques calculs avant pour pas passer pour un touriste.

### 2.1 Microscopie à fluorescence

Pour cette sous-partie et la suivante :

<http://toutestquantique.fr/fluorescent-et-confocal/>

Dans toutes les microscopies à fluorescence, on procède ainsi :

1. On ajoute dans l'échantillon des fluorochromes, molécules capable d'absorber la lumière à une certaine longueur d'onde  $\lambda_1$  et de réémettre ensuite par émission spontanée à  $\lambda_2$

2. On envoie de la lumière à  $\lambda_1$  sur l'échantillon
3. On observe la lumière réémise à  $\lambda_2$

On obtient ainsi une cartographie de l'emplacement des fluorochromes... L'avantage est que l'on peut choisir de localiser certaines zones (par exemple les fluorochromes se fixent sur la membrane d'un virus). Par contre, on a toujours nos problèmes de profondeur de champ et de limite de diffraction.

## 2.2 Microscope confocal

🔗 [Page WIKIPÉDIA](#)

**But**

Ici, on se débarrasse du problème de profondeur de champ.

Cf. la vidéo, on est capable de focaliser le rayon sur une toute petite zone de l'échantillon, mais surtout on peut, grâce à un deuxième diaphragme appelé "sténopé", n'observer qu'un point de l'échantillon. Ceci est très important : on n'a plus aucun problème de profondeur de champ puisque l'image observé ne correspond qu'à une toute petite partie de l'échantillon.

Il suffit ensuite de recommencer pour tous les points de l'espace (balayage 3D), et on obtient alors une image nette pour tout l'échantillon, que l'on peut même observer en 3D!...

Ce système est donc approprié aux grosses molécules, qu'on ne pouvait pas capturer entièrement de façon nette (avec en bonus la modélisation 3D). Mais on n'a toujours pas repoussé la barrière de diffraction, donc on fait à peine mieux en résolution (on reste dans la centaine de nanomètre pour l'instant).

### Attention

En vrai il existe deux types de microscope confocal :

1. Le vrai confocal : Il n'y a que le sténopé... La fluorescence provient de tout l'échantillon. On parle d'excitation monophotonique, puisqu'en gros, un seul photon arrive sur chaque fluorophore.
2. L'autre, par excitation multiphotonique. C'est bien ici qu'on dirige le faisceaux d'excitation en un seul point.

Il n'y a pas de réels avantage pour l'un ou pour l'autre... Les grosses différences sont que pour le deuxième on utilise des plus hautes longueurs d'onde, qui vont donc plus loin. Et qu'en n'excitant moins l'échantillon, on limite le photoblanchiment (le fluorophore peut perdre sa fluorescence en entrant dans une réaction chimique lorsqu'il est excité).

### Limites

C'est cool, on peut descendre les échelles, mais vu qu'il faut balayer l'échantillon, c'est assez lent et donc si le système évolue trop vite (bio), c'est la merde.

## 2.3 Technologie PALM

## But

Ici, on va enfin repousser la limite de diffraction !

L'idée est d'envoyer un pulse d'excitation très faible et délocalisé sur tout l'échantillon. C-à-d on envoie un petit nombre de photons à la longueur d'onde d'excitation. Ainsi, les rares fluorophores touchés, vont ré-émettre et comme ils sont peu nombreux, la photo que l'on récupère contient quelques tâches d'AIRY toutes séparées. Informatiquement on peut donc retrouver (par déconvolution d'une gaussienne 2D) l'emplacement exact de chaque fluorophore. On répète l'opération autant qu'il le faut, et on obtient finalement la position de tous les fluorophores !

Il existe pas mal de variantes, cf. diapo...

### 3 Microscopie à champ proche

Bon vu que la partie précédente est un peu claquée au sol, on va pas se mentir, soyons sérieux et faisons de la vraie physique...

Paraît qu'il faut chercher dans le *Aigouy* !!!

#### 3.1 Nécessité des ondes évanescente

On part d'HEISENBERG :

$$\Delta x \Delta k_x \geq 2\pi$$

Et si on regarde un objet de taille  $\Delta x$  sous un angle  $\theta$ , alors

$$\Delta k_x = 2k \sin \theta = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \theta \implies \Delta x = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} = \frac{\lambda}{2\omega}$$

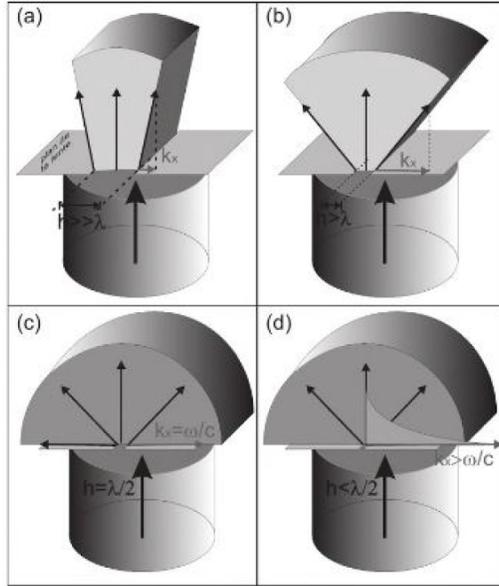
Or l'équation de HELMOLTZ indique que

$$k_z^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_x^2 - k_y^2$$

Donc pour voir les plus petits détails, il faut  $k_x$  grand donc  $k_z^2 < 0$  c'est-à-dire une onde évanescente !

Le critère pour lequel on dépasse la limite de diffraction est (en oubliant la direction  $y$ ) :

$$k_x = \sqrt{|\mathbf{k}|^2 - k_z^2} > |\mathbf{k}| \implies k_z \in \mathbb{C}$$

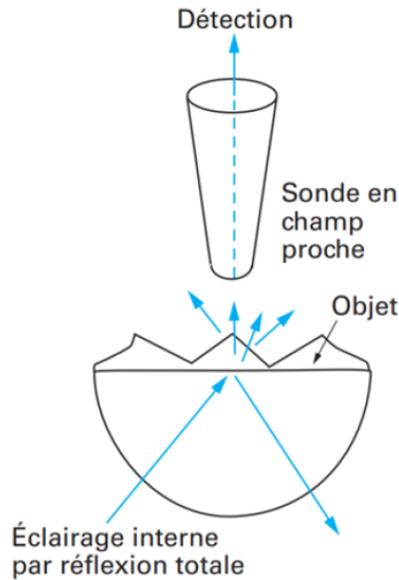


On retrouve la nécessité d'une onde évanescente... On parle alors de champ proche puisque l'onde évanescente s'étale sur une longueur  $L$  de l'ordre de la centaine de nanomètre

$$L \sim \frac{1}{\text{Im } k_z}$$

### 3.2 Technologie STOM

On utilise alors cette propriétés en envoyant des ondes propagatives sur notre objet... Celui-ci modifie l'amplitude de l'onde et ainsi de l'onde évanescente qui en sort :



On récupère l'information à l'aide d'une fibre optique qui relaie la propagation de l'onde évanescente...

Pour déterminer la résolution de cet appareil, on considère un objet de taille  $\delta < \lambda$  (invisible en microscopie optique classique), alors

$$k_z = \frac{2\pi}{\delta} \implies L = \frac{\delta}{2\pi}$$

Donc la résolution est déterminée par la distance entre la sonde et l'échantillon. En théorie on peut avoir une précision infinie, mais alors ce sont les problèmes techniques qui dominent à ce moment... On obtient généralement une précision de la dizaine de nanomètre!!!

## Questions

Idée du temps pour avoir une image par confocale ?

**Citer les différentes aberrations. Quel est l'effet de ne plus se limiter à l'approximation des petits angles ?**

**ODG de R pour une dioptrie air/verre ?**

**Qu'est ce que l'approximation de l'optique géométrique ?**

**Qu'est ce que l'approximation de Gauss ?**

**Préciser la limite de diffraction.**

**Préciser les dispositifs expérimentaux et les limites des différents microscopes.**

**Citer d'autres techniques de microscopies optiques et expliquer leurs principes.** Microscopie confocale, microscopie à fluorescence, microscopie interférentielle...

**Citer d'autres techniques de microscopies non-optiques et expliquer leurs principes.** Microscopie électronique, microscopie à effet tunnel, AFM...

**Quels sont les principaux avantages et inconvénients de l'oeil par rapport aux autres photorécepteurs ?** . Les photorécepteurs actuels ont une résolution bien meilleure que l'oeil, mais celui-ci garde l'avantage de ne pas être soumis aux différents problèmes électroniques (bruit électronique, problèmes des algorithmes de détecteurs...)

**Donner la définition du cercle oculaire, et préciser son intérêt.** Le cercle oculaire est l'image de l'objectif à travers l'oculaire. Tous les rayons sortant du microscope passent par le cercle oculaire, c'est donc là où il faut placer l'oeil pour recevoir un maximum de lumière.

**En pratique, est-ce que l'on réussit à atteindre la résolution du critère de Rayleigh ?** Non, car dans le calcul du pouvoir de résolution on fait l'approximation de Gauss (stigmatisme approché), ce n'est pas forcément le cas en pratique.

**Quelles sont les autres facteurs qui limitent la résolution (en plus du critère de Rayleigh) ?** Les aberrations géométriques et chromatiques des lentilles limitent la résolution. On utilise des lentilles asphériques et achromatiques pour les réduire.

**Pourquoi peut-on définir un grandissement pour une loupe (ou une lentille), mais pas pour un microscope ?** Un grandissement est un rapport entre deux longueurs. Or, l'image en sortie d'un microscope est localisée à l'infini, on ne peut donc pas définir sa taille. On caractérise alors un microscope par son grossissement, qui est un rapport entre deux angles.

**L'ouverture numérique peut-elle être supérieure à 1 ?** Oui, en utilisant des milieux à immersion (glycérol par exemple).

**Premiers microscopes ? Qui a inventé le premier microscope ?**

**Relation focale - Rayons de courbure ?**

**Microscopie à contraste de Phase ? en champ sombre ?**