

Microscopies Optiques

①

Niveau : L3

Prérequis: Diffraction, Optique géométrique, Critère de Rayleigh, Laser

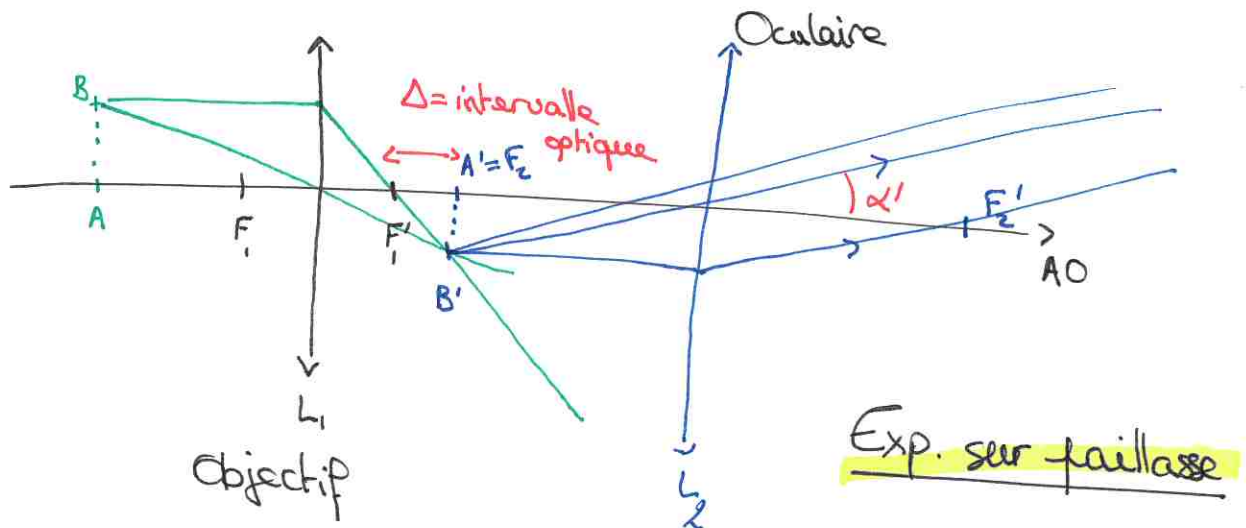
Microscope: Instrument d'optique, constitué de lentilles et destiné à faire une image agrandie d'un objet petit et proche.

Enjeux en médecine

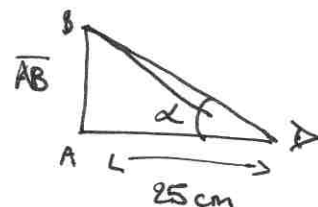
I / Le microscope classique

1) Rappels

2 lentilles convergentes:



Grossissement commercial: $G_c = \frac{\alpha'}{\alpha_{pp}}$; $\alpha_{pp} = \frac{\overline{AB}}{d_n \approx 25 \text{ cm}}$



$$G_c = \frac{\Delta d_m}{f_1' f_2'} = \gamma_{obj} G_{c,oc}$$

$$\text{car } \gamma_{obj} = -\frac{\Delta}{f_1'} = \frac{\overline{A'B'}}{\overline{AB}}$$

$$G_{c,oc} = \frac{\alpha' d_m}{\overline{A'B'}} \quad \text{avec } \overline{A'B'} \approx \frac{\alpha'}{f_2'} \quad (\text{tan } \alpha' \sim \alpha')$$

Mesure de G_c

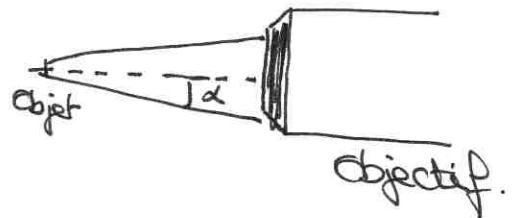
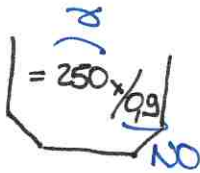
Puissance : $\mathcal{P} = G_c / d_m$

2) Profondeur de champ

Ouverture numérique: $ON = n \sin \alpha$

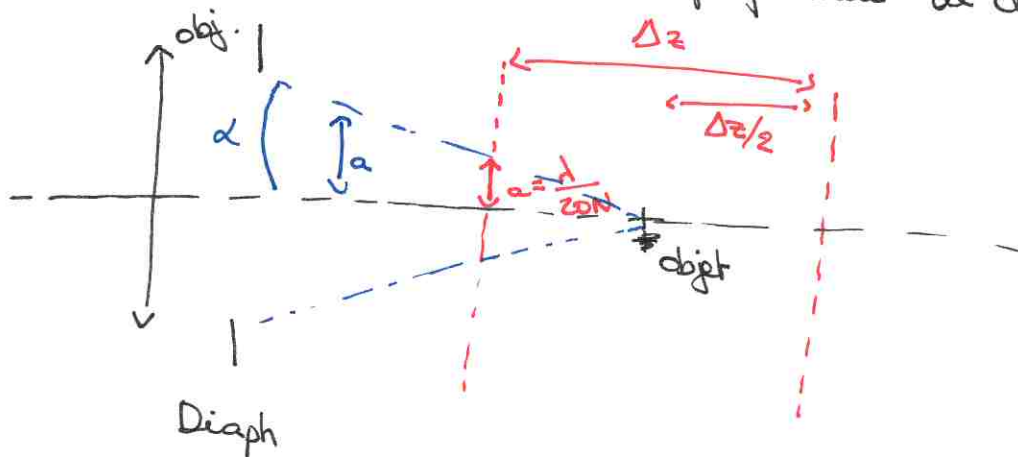
α : $\frac{1}{2}$ angle maximal sous lequel est vu un objet dans un milieu d'indice n :

~~Exemple~~



Profondeur de champ: $\Delta z = \frac{n \sqrt{n^2 - \cos^2 \alpha}}{ON^2}$, plage de distance à l'objectif dont les objets sont nets.

Plus ON est grand, plus la profondeur de champ est faible.



(3)

Tant que $a \leq \frac{\lambda}{2 \text{ON}}$, on ne voit pas la différence de position z de l'objet

Ex: $\lambda = 550 \text{ nm}$
 $\text{ON} = 0,65$
 $n_{\text{air}} = 1$

} $\rightarrow \Delta z = 1 \mu\text{m}.$

II / Limites du microscope classique

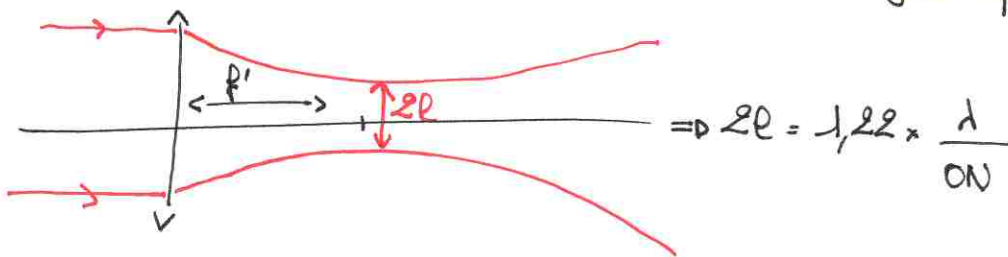
1) Résolution

Problème de diffraction : Largeur à mi-hauteur des taches de diffraction :

$$l = \frac{1,22}{2} \times \frac{\lambda}{\text{ON}}$$

Plus ON est grand, plus la résolution est bonne.

\rightarrow Montage fentes



\hookrightarrow Augmenter ON en utilisant des objectifs à immersion

Ex: huile de paraffine : $n = 1,48$

plus refr. \rightarrow moins refr. : les rayons s'éloignent de la normale.

On peut atteindre $ON \in [-1; 1,4]$ vs $ON \leq 1$ avec l'air

(4)

2) Aberrations

* Chromatique: n dépend de λ

↳ Solution: on accole des lentilles pour compenser:
Doublés chromatiques / achromats
qui corrigent le bleu et le rouge.

1886: Premiers objectifs apochromats (Réunion axiale pour 3λ)

* Sphérique: Pb de convergence des rayons.

↳ Solutions:
• Ne garder que les rayons centraux
• Règle des 4P: "Plus plat, plus près"

Un autre gros pb de la microscopie classique est qu'on écrase nos échantillons souvent.

III / Microscopie confocale

Méthode utilisée pour tracer les connexions entre neurones.

Apocal: Le système n'a pas de foyer vs Confocal: conjugaison des foyers.

1) Fluorescence

Un objet est fluorescent lorsqu'il peut absorber un photon de fréquence ν_1 et se désexciter en émettant un photon de fréquence $\nu_2 < \nu_1$ (Décalage vers le rouge de λ)

1962: 1^{ère} protéine fluorescente : GFP "Green Fluorescent Protein"

- Elles sont utilisées comme marqueur peu toxique
- Etude de la GFP : Prix Nobel Chimie 2008

2) Principe du microscope confocal

Idee introduite en 1953 par M. Minsky

Si l'objet hors du plan focal :

- Illumination réduite
- Faisceau défocalisé en sortie.

Le signal reçu au niveau du détecteur est faible lorsque l'objet n'est pas dans le plan focal de l'objectif :

Il y a sectionnement optique.

L'échantillon étant illuminé point par point, il existe plusieurs méthodes de scanner tout le plan focal :

* varier l'angle du faisceau

* On déplace l'échantillon.

3) Avantages et limites

(+)

- Bonne résolution car 2 PSF :
Echantillon et détection.
 - PSF de détection et d'illumination dues à l'objectif donc égales.
 - $PSF_{tot} = PSF^2$ (si $d \propto \lambda, \lambda_1, \lambda_2$)
et $PSF = \pi \times I_0 \left(\frac{1,22}{\lambda} \frac{d}{ON} \right)^2$
- Résolution de 0,2 μm .

(-)

- Vitesse d'acquisition (20-40 Hz)
- Profondeur de pénétration des tissus (10-100 μm)

- o Bonne résolution selon z : $\Delta z \sim 0,6 \mu m$
- o Image plus claires / contrastées.
- o Reconstruction 3D

Conclusion: Microscope en champ sombre: seule la lumière diffusée par les constituants de l'échantillon sont visibles.

lire / contraste de phase
2 photons

Pas de la mire: 0,1 mm

Pas écran: 3,3 cm \pm 0,3 cm pour 20.

$$G_{c, \text{exp}} = \frac{\text{Pas écran}}{f' = D} \times \frac{25 \times 10^{-2}}{\text{Pas mire}}$$

$$D = 93 \text{ cm} \pm 0,2 \text{ cm}$$