

Leçon 16 : microscopie optique

Niveau :

- Première année CPGE

Pré-requis :

- Optique géométrique

Références :

- Optique, une approche expérimentale et pratique, S.Houard.
- La microscopie optique moderne, G.Wastiaux, Tec & Doc, Lavoisier, 1994
- J.Ph. Pérez. Optique : fondements et applications. Dunod, 2011.
- Sextant. Optique expérimentale. Hermann, 1997.
- L. Aigouy. Les nouvelles microscopies : à la découverte du nanomonde. Belin, 2006.
- À la découverte de l'univers Comins, De Boeck(photo)
- Les instruments d'optique, étude théorique, expérimentale et pratique Luc Dettwiller

Introduction

Comment peut-on voir le monde microscopique (micro petit en grec) ? C'est une question importante pour de nombreux secteurs de la recherche, en particulier en biologie, mais pas que ! Informatique, géologie, métallurgie etc...

1. image grossie d'un petit objet, exemple cheveux ?
2. détails de l'image

Introduction historique :

1. 1665, Hooke, microscope composé mais de mauvaise qualité
2. 1830, Bancks, microscope simple mais grand pouvoir de résolution.
3. etc ...

L'objet de cette leçon n'est pas de présenter une liste exhaustive des techniques de microscopies optiques mais plutôt de s'attarder sur le dispositif classique du microscope à deux lentilles pour en comprendre les enjeux et les limites, et d'étudier les réponses modernes aux différents problèmes posés, notamment les questions de résolution et de contraste.

1. Lois de l'optique géométrique

1.1. Lois de Snell-Descartes

Définition - lois de Snell-Descartes

1. Les rayons, incidents, réfléchis et réfractés sont coplanaires ;
2. $i_1 = -i_1'$;
3. $n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2$.

Il est possible d'obtenir une réflexion totale à l'interface si l'angle d'incidence $i_1 > i_{lim}$ lorsque $n_2 > n_1$:

1.2. Lentille mince

Définition - lentille mince

Une lentille mince est une lentille pour laquelle $d \ll r$.

- Donner d'autres exemples de lentilles convergentes et divergentes.

Relations de conjugaison pour une lentille mince :

Dans les **conditions de Gauss** on a :

- $\frac{1}{OA'} - \frac{1}{OA} = \frac{1}{f'}$;
- $\overline{F'A'} \cdot \overline{FA} = -f'^2$;

2. Microscope optique (à deux lentilles)

2.1. Description, schéma, montage

But : exagérer les angles sous lesquels les différents points de l'objets sont vus pour que l'image de l'objet sur la rétine soit la plus grande.

2.2. Grossissement, Grandissement, Puissance et profondeur de champ

Définition - Grandissement

Le Grandissement γ de l'objectif est défini par la relation suivante :

$$\gamma = \frac{\overline{A_1 B_1}}{AB} = \frac{A_1 B_1}{O_1 I} = -\frac{\Delta}{f'_1}$$

Manips : Étude d'un objectif et détermination de la distance focale.

Grossissement commercial

Pour l'oculaire l'image est à l' ∞ . On définit le grossissement comme le rapport de l'angle sous lequel on voit l'objet à travers l'instrument α' et l'angle sous lequel on voit l'objet à l'oeil nu α à une distance de 25 cm.

$$G_{c,oc} = \frac{\alpha'}{\alpha}$$

d_m étant la distance limite d'accommodation.

Définition - Puissance intrinsèque

La puissance intrinsèque d'un microscope est la valeur absolue du rapport entre l'angle sous lequel on voit l'objet à travers le microscope et la taille de l'objet

$$P_i = \frac{\alpha'}{AB}$$

Pour le microscope étudié ici, dans le triangle ($O_2 A_1 A B_1$) on a :

$$\tan \alpha' \approx \alpha' = \frac{A_1 B_1}{f'_{oc}}.$$

Donc

$$G_{c,oc} = \frac{\alpha'}{\alpha} = \frac{\frac{A_1 B_1}{f'_{oc}}}{\frac{A_1 B_1}{dm}} = \frac{dm}{f'_{oc}}$$

où dm est la distance minimale d'accommodation de l'oeil ($dm = 25$ cm). De plus :

$$P_i = \frac{\alpha'}{AB} = \frac{A_1 B_1}{AB} \frac{\alpha'}{A_1 B_1} = |\gamma| \frac{1}{f'_{oc}} = |\gamma| P_{oc}$$

Par conséquent la puissance du microscope est mesurée par le produit du grandissement de l'objectif par la puissance de l'oculaire.

Pour le grossissement du microscope dans le cas où l'oeil observe l'objet à l'infini à travers l'oculaire. C'est à dire que $A_1 = F_2$.

$$G_{com,mic} = \frac{\alpha'}{\alpha} = \frac{\frac{A_1 B_1}{f'_{oc}}}{\frac{AB}{dm}} = \frac{A_1 B_1}{AB} \frac{dm}{f'_{oc}} = \frac{F'_1 F_2}{O_1 F'_1} \frac{dm}{f'_{oc}} = \frac{\Delta dm}{f'_{ob} f'_{oc}}$$

Grossissement du microscope :

On la relation suivante pour le grossissement du microscope :

$$G_{com,mic} = |\gamma_{ob}| G_{c,oc}$$

, de la même façon on obtient :

$$P_i = \frac{\Delta}{f'_{ob} f'_{oc}}$$

Manips : (faire schéma) Mesure du grossissement commercial à l'aide d'une mire micrométrique : $G_c = \frac{D \times 0,25(m)}{d}$

2.3. Ouverture numérique

L'objectif est la pièce maîtresse du microscope. L'objectif contribue au grossissement mais surtout détermine le pouvoir de résolution du microscope c'est-à-dire sa capacité à distinguer 2 objets. Le pouvoir de résolution est directement lié à l'ouverture numérique définie par :

Définition - Ouverture numérique

$$O.N = n \sin \theta$$

Avec n l'indice optique du milieu et θ l'angle maximum par rapport à l'axe optique.

Manip : Détermination expérimentale de l'ouverture numérique.

3. Limites et Aberrations

3.1. Limite du pouvoir de résolution, critère de Rayleigh

la lumière n'est pas géométrique mais ondulatoire. L'image d'un point obtenue à travers un instrument optique n'est pas un point mais une tâche appelée tâche d'Airy.

Définition - Critère de Rayleigh

Deux points A et B sont résolus si les tâches d'Airy entourant A' et B' ne se recouvrent pas à plus de leur demi largeur. On peut montrer que :

$$AB = 1.22 \frac{\lambda}{2O.N} = 1.22 \frac{\lambda}{2n \sin \theta}.$$

Deux points A et B peuvent être vu séparés à travers le microscope, à condition que l'angle sous lequel est vue l'image des deux points soit supérieur à $3 \cdot 10^{-4}$ rad. C'est le pouvoir de résolution du microscope. Pour un microscope dont le grossissement $G = 400$.

$$G_c = \frac{\alpha'}{\alpha} \text{ avec } \alpha = \frac{AB}{0.25}.$$

Dans ce cas $AB = \frac{\alpha' \times 0.25}{400} = 0.2 \text{ } \mu\text{m}$. Le pouvoir de résolution du microscope ne dépend que du grossissement commercial. Cependant, on ne peut pas augmenter le pouvoir de résolution du microscope en augmentant le grossissement commercial. A partir d'un certain grossissement (de l'ordre de 1500), les phénomènes de diffraction ne sont plus négligeables et ils limitent le pouvoir de résolution des microscopes.

Par conséquent, pour diminuer AB, on peut soit :

1. diminuer λ ;
2. augmenter O.N. (n ou θ).

Conclusion : Même dans les meilleures conditions, la résolution optique reste limitée à la demi longueur d'onde. On ne peut donc pas avoir des microscopes optiques infiniment grossissant avec des lentilles classiques.

3.2. Aberration sphériques, chromatiques et profondeur de champ

Aberration sphérique : Si l'on envoie de la lumière monochromatique sur une lentille convexe de forme sphérique, tous les rayons provenant d'un point ne se concentrent pas en un point. Ils convergent en un point différent suivant que le rayon passe plus ou moins proche du centre de la lentille. Il faut bien noter que ces aberrations ne sont pas intrinsèques au système : elles sont liées au fait qu'on ne travaille pas vraiment dans les conditions de Gauss !

Aberrations chromatiques : (longitudinale/connaitre la transversale) : On utilise sur les microscopes modernes de la lumière blanche (polychromatique). Or chaque longueur d'onde est plus ou moins réfractée lors de son passage au travers de la lentille (la plus réfractée est la bleue, d'après la loi de Cauchy). slide. Elles sont corrigées en faisant des doublets achromates comme le doublet de Fraunhofer. Cela corrige à l'ordre un, les microscopes dits **apochromats** réalisent la superposition des plans focaux pour trois longueurs d'onde distinctes.

En pratique, il est difficile d'obtenir des valeurs d'ouverture numérique supérieures à 0,95 avec des objectifs secs (cf. MicroscopyU). Des ouvertures numériques plus élevées peuvent être obtenues en augmentant l'indice n de réfraction du support de formation d'image entre l'échantillon et la lentille frontale de l'objectif. Il existe désormais des objectifs de microscope permettant d'imager sur d'autres supports, tels que l'eau (indice de réfraction $n = 1.33$), la glycérine (indice de réfraction $n = 1.47$) et l'huile d'immersion (indice de réfraction $n = 1,51$). slide. Noter d'ailleurs la remarque le fait que c'est bien sûr l'objectif qui limite la résolution du microscope : si il n'est pas bon l'oculaire ne rattrapera pas les défauts ! On peut aussi insister sur la subjectivité du critère de Rayleigh : on fait aujourd'hui des détecteurs qui ont une bien meilleure résolution que cela !

Limite de résolution verticale Lien entre profondeur de champ et ouverture numérique.

Transition :

Transition : Il y a une question qu'on ne s'est pas posée du tout dans le microscope précédent, c'est celle du contraste. Pourtant, la plupart des objets que l'on veut observer sont transparents et a priori sans effet sur l'intensité lumineuse. Il faut alors travailler avec le seul élément optique modifié à la traversée de l'échantillon par l'onde lumineuse : la phase !

4. Microscopie à contraste de phase

Voir TD Diffraction (2) Clément Sayrin. Cette technique s'intéresse en particulier à des échantillons transparents dont les épaisseurs sont faibles Slide photos avec ou sans contraste de phase + photos microscopies Nikon. Elle a valu le prix Nobel à Frederik Zernike en 1953.

Principe

Voir Hecht p635. On envoie de la lumière sur un objet dit de phase qui va modifier localement la phase de la lumière incidente :

$$E_i = E_0 e^{i\phi} = E_0 + E_0 \times (e^{i\phi} - 1) \sim \quad (1)$$

On fait passer la lumière à travers une lentille qui va donner la figure de diffraction dans fait l'image de cette

5. Microscope en champ proche

La microscopie classique a donc une résolution limitée, elle ne détecte que des ondes homogènes diffractées en champ lointain, c'est-à-dire à de grandes distances de l'objet,

sans être capable de capter des informations relatives aux structures inférieures à $\lambda/2$. Une technique est apparue, permettant de collecter les ondes évanescentes confinées à la surface de l'objet, c'est la microscopie optique en champ proche. Le microscope optique en champ proche est apparu dans les années 80.

5.1. Diffraction d'une onde plane

La limite de résolution en optique est une conséquence du principe d'incertitude d'Heisenberg (on ne peut pas mesurer avec une bonne précision la position et la vitesse d'une particule). Exprimons la relation d'incertitude d'Heisenberg et projetons sur l'axe x :

$$\Delta x \Delta k_x > 2\pi \quad (2)$$

Prenons l'exemple d'un microscope classique. À cause de son ouverture numérique, il ne va capter que les photons entre $[-\theta, \theta]$. Ainsi :

$$\Delta k_x = k_{x,\min} - k_{x,\max} = 2k \sin \theta \Rightarrow \Delta x \geq \frac{\lambda}{2n \sin \theta} \quad (3)$$

On retrouve à une constante près le critère de Rayleigh. Mais on a maintenant un critère pour Δx . Pour obtenir une grande résolution, c'est à dire un Δx très petit, il faut que l'intervalle Δk_x soit le plus grand possible. Pour des ondes planes progressives k_x est compris entre $[-\omega/c, \omega/c]$ i.e :

$$\Delta k_x \geq \frac{2\pi}{\Delta x} = \frac{\lambda}{2} \quad (4)$$

Des objets très petits $\Delta x \ll \lambda/2$ diffractant la lumière, vont permettre d'accéder à des grandes valeurs de Δk . Un type d'onde est caractérisé par $k_x > 2\pi n/\lambda$.

5.2. Ondes évanescentes

On considère deux milieux diélectriques d'indices n_1 et n_2 avec $n_2 < n_1$. Le vecteur d'onde incident s'exprime par :

$$\vec{k}_i = k_i (\sin \theta_1 \vec{e}_x + \cos \theta_1 \vec{e}_z) \quad (5)$$

avec $k_1 = k_0 n_1$. Grâce aux lois de réfraction, le vecteur d'onde dans la partie transmise s'exprime :

$$\vec{k}_t = k_0 n_1 \sin \theta_1 \vec{e}_x + k_0 \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1} \vec{e}_z \quad (6)$$

Le terme k_z est réel tant que l'angle d'incidence de l'onde plane est inférieure à l'angle critique θ_c défini par :

$$\theta_l = \frac{n_2}{n_1} \quad (7)$$

Pour $\theta > \theta_c$, il y a réflexion totale de la lumière sur le dioptré. k_{tz} devient imaginaire pur. L'onde transmise dans le second milieu est évanescente et on a :

$$k_{t,z} = ik_0 (n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2)^{1/2} = ik_z'' \quad (8)$$

Comme $k_{t,z}$ est imaginaire pure, l'amplitude de l'onde évanescente décroît exponentiellement en fonction de z . Le champ électrique peut s'écrire :

$$\vec{E}_t = \vec{E}_{t,0} \exp\{-k_z'' z\} \exp\{i(k_{t,x}x - \omega t)\}. \quad (9)$$

L'onde évanescente se propage suivant Ox et voit son amplitude décroître exponentiellement selon Oz . On définit la profondeur d'atténuation dans le milieu 2 par :

$$\delta = \frac{1}{k_z''} = \frac{\lambda_0}{2\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}} \quad (10)$$

5.3. Réalisation pratique

Pour capter l'onde évanescente, on va se servir du principe de Fermat. Si un objet sub-longueur d'onde peut transformer par diffraction une onde progressive en onde évanescente, il peut réciproquement transformer des ondes évanescentes en ondes planes. Il faut alors plonger dans le champ proche optique un objet de dimension inférieure à la longueur d'onde. Les ondes évanescentes présentes à la surface peuvent être transformées en onde progressive et se propager dans un guide d'onde jusqu'à un détecteur. On réalise le microscope en plaçant une sonde éfilée de diamètre inférieur à une dizaine de nanomètres.

En balayant la pointe sur la surface on peut obtenir une cartographie des détails de celle-ci, avec une résolution spatiale bien inférieure à la longueur d'onde. La résolution peut être d'autant plus grande que le détecteur peut s'approcher de la surface de l'objet. Le microscope à champ proche permet d'atteindre une résolution de $\lambda/4.3$. Le critère de Rayleigh est ainsi surmonté.

Conclusion

Recap + limites + nouvelles techniques : microscopies non optiques (Force atomique, électronique)