

LP n° 32 : Microscopies Optiques.

NIVEAU : LICENCE

PRÉREQUIS :

- Optique géométrique
- Diffraction (critère de Rayleigh, notions d'optique de Fourier)

PLAN :

1. Le microscope à deux lentilles
2. Le problème de la résolution et la microscopie confocale LASER à fluorescence
3. La question du contraste et la microscopie par contraste de phase

BIBLIOGRAPHIE :

- [44] *Optique, une approche expérimentale et pratique*, S.Houard.
- [77] La microscopie optique moderne, G.Wastiaux, Tec& Doc, Lavoisier, 1994
- TD de C. Sayrin *Optique géométrique & Diffraction II*
- Cours de M. Dahan (PWP en annexe)
- [73] Sextant
- Site microscopyU

IDÉES À FAIRE PASSER :

Bon grossissement, bonne résolution et image fidèle (peu de défauts)

Introduction : Cours de M. Dahan : Qu'est-ce qu'un microscope? Un instrument qui

- Donne une image grossie d'un petit objet (grossissement)
- Sépare les détails de celui-ci sur l'image (résolution)
- Rend les détails visibles à l'œil ou avec une caméra

[44], p. 154 - Introduction historique ([slide](#)) :

- 1665, Hooke : microscope composé mais d'une qualité optique bof.
- 1830, Bancks : microscope simple encore mais grand pouvoir de résolution
- ... à compléter.

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 Le microscope à deux lentilles

1.1 Description du dispositif

[44], p. 155 - Tracer au tableau le schéma du microscope classique. Il est constitué de deux systèmes optiques successifs : l'objectif et l'oculaire. On les représente schématiquement par des lentilles minces.

- L'objectif donne de l'objet AB une image intermédiaire A_1B_1 agrandie et renversée. Pour avoir un bon grossissement et un encombrement réduit la lentille doit être de focale la plus courte possible et l'objet très proche.
- L'oculaire agit comme une loupe. On place l'image intermédiaire dans son plan focal permettant une observation sans accommodation (à l'infini) de l'œil.

Expérience : En même temps que l'on présente le dispositif au tableau ou le décrit sur un microscope sur la paillasse et préalablement réglé pour avoir une image sur l'écran. On peut ensuite changer l'objectif et montrer que cela change le grossissement.

Un tracé supplémentaire rapide permet de mettre en évidence le cercle oculaire (cf. [44], p. 155). C'est ici que l'on place l'œil pour une vision optimale.

1.2 Grossissement du microscope

TD C. Sayrin - Définition du grossissement commercial. Puisque le microscope forme d'un objet à distance finie une image à l'infini, on cherche à calculer le grossissement commercial G_c de ce dispositif optique. Schéma du microscope sur [slide](#) avec les bonnes notations.

$$G_{com,mic} = |\gamma_o b| * G_{c,oc}.$$

Expérience : mesurer le grossissement commercial du microscope qu'on a sur la paillasse ([73], p. 54)

C'est cette donnée que l'on veut maximiser puisque c'est justement elle qui quantifie l'intérêt du microscope dans l'agrandissement des images. On a donc intérêt à prendre des focales les plus petites possibles mais ça, ça pose des problèmes importants...

1.3 Aberrations liées à l'utilisation des lentilles simples

[77], p. 31 - Aberrations des lentilles : Il est impossible de construire des systèmes optiques sans défauts. Les principaux défauts d'images sont dus aux différentes aberrations provoquées par le passage des rayons lumineux au travers de la lentille et de manière générale de n'importe quel système optique non idéal. Notamment :

- Aberration sphérique - Voir [44], p. 129 : 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 [slide](#). 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/connaître la transversale) - Voir [44], p. 126 : 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, cf. [44], p. 128. Cela corrige à l'ordre un, les microscopes dits apochromats réalisent la superposition des plans focaux pour trois longueurs d'onde distinctes.

Pour l'application de ces corrections aux objectifs de microscope, voir [44], p. 158. En ce qui concerne l'oculaire on a le même genre de problème (mais moins marqués du fait que la focale reste raisonnable) que l'on corrige grâce à des verres de champ et d'oeil pour obtenir un achromatisme apparent. Il n'est pas forcément utile d'en parler mais on peut lire [44], p. 161.

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!

2 La question du contraste et la microscopie par contraste de phase

Pour cette partie, voir le cours de M. Dahan, à partir de la slide 26; le cours d'A. Jobart, à partir de la slide 47, cette page de microscopyU pour l'alignement du télescope ou de manière moins technique cette page contenant des généralités sur la technique. Sur cette page on trouve une animation pour comprendre champ clair / champ sombre.

Il faut prendre l'image du microscope et voir qui est l'image de qui, comment les rayons progressent sans échantillon, interpréter l'influence de l'échantillon et ensuite parler de la phase, de comment on la gère et de son influence sur l'intensité.

Si l'objet est transparent il ne modifie pas l'intensité du signal mais sa phase seulement et du coup ça se voit pas! [77], p. 191 - Intro historique, puis TD de Sayrin : on explique le principe de l'expérience d'Abbe et du filtrage sur slide. On peut utiliser cette méthode en plaçant un objet de phase PWP (ex : lame de polarisation), pour modifier les contrastes. Calculs de Clément Sayrin avec la vibration lumineuse directe et diffractée : effet d'une $\lambda/4$: l'intensité dépend de la phase, on y a directement accès. L'image qu'on observe à l'écran a un contraste proportionnel à la phase. Les microscopes à contraste de phase sont utilisés dans les laboratoires de biologie car ils permettent d'étudier les objets vivants sans les colorer et donc sans les tuer. (Prix Nobel!!)

Pour la réalisation expérimentale, voir [77], p. 194 principe optique du microscope à contraste de phase.

Transition : Cette nouvelle technique permet de mettre dans le microscope des objets épais, mais pose dès lors la question de savoir si on est capable de voir nette toute l'épaisseur de l'objet, et de savoir à quelle profondeur est telle ou telle objet. De plus, on ne voit a priori pas de limite, à ce stade, à avoir de très grand grossissement.

3 Le problème de la résolution et la microscopie confocale

3.1 Limites de résolution

Limite de résolution horizontale

Voir [44], p. 160 - Limite de résolution imposée par la diffraction (critère de Rayleigh en prérequis), faire la démonstration de la note de bas de page? A minima donner le résultat pour montrer qu'on doit augmenter l'ouverture numérique (Site MicroscopyU) pour avoir une meilleure résolution!

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

Voir [44], p. 157 et [77], p. 70. On reste qualitatif en exprimant juste le lien entre profondeur de champ et ouverture numérique.

3.2 La microscopie confocale

[77], p. 254 - agit comme un couteau optique : examiner l'intérieur des structures épaisses + découper l'échantillon dans plusieurs directions : image 3D. Video du principe : <https://toutestquantique.fr/fluorescent-et-confocal/> Principe général : reproduction point par point d'un fin diaphragme dans le plan de l'objet. Pour obtenir une image totale, le point lumineux balaie la surface de l'objet au moyen de miroirs. Seules les informations du plan focal parviennent au détecteur : microscope confocal.

3.3 Intérêt supplémentaire de la fluorescence

Ça marche super bien en fluorescence car la lumière diffusée est pratiquement éliminée. PWP Vidéo de la mitose d'une cellule : plus de destruction de l'échantillon, suivre l'évolution et en plus avec chaque couleur on sait qui est qui.

Conclusion : Récap + limites + nouvelles techniques : microscopies non optiques (type électronique ou à champ proche, [44], p. 162.) (PWP limites de résolution)

BONUS :

- L'objectif n'est pas une lentille simple mais composée de deux lentilles : [2] p. 111
- La puissance est aussi une caractéristique du microscope, on peut la relier au grandissement, cf. [44], p. 156.
- Optique non paraxiale : points de Weierstrass [44], p. 160.
- Détermination expérimentale de l'ouverture numérique d'un objectif [44], p. 164.
- Microscopie classique = à champ clair
- Il faut vraiment regarder les ressources en ligne sur le site de Montrouge, et ne pas hésiter à aller chercher des infos sur wikipédia!
- Je pense qu'on peut assez facilement faire sauter le calcul du grossissement ou de la puissance au profit du reste de la leçon (et supposer que ça a déjà été vu dans un cours d'optique géométrique).

