

Titre : LP 16 Microscopies optiques

Présentée par : Léa Chibani

Rapport écrit par : Alfred Hammond

Correcteur : Agnès Maitre

Date : 15/11/19

Bibliographie de la leçon :

Titre	Auteurs	Éditeur	Année
https://www.nikonsmallworld.com/techniques			
https://www.microscopyu.com/tutorials			
Microscopie modernes	Wastiaux		
Optique	Houard		
Sextant			

Plan détaillé

I] Le microscope optique du XVII^{ème} siècle

A) Principe de fonctionnement

B) Pouvoir de grossissement

C) Limites de résolution

II] Exemple d'avancées technologiques en microscopie optique

A) Le microscope à contraste de phase (Zernike 1934 – Nobel 1953)

B) Le microscope confocal à fluorescence

Niveau choisi pour la leçon :

L3

Pré-requis :

Optique géométrique

Optique ondulatoire

Diffraction

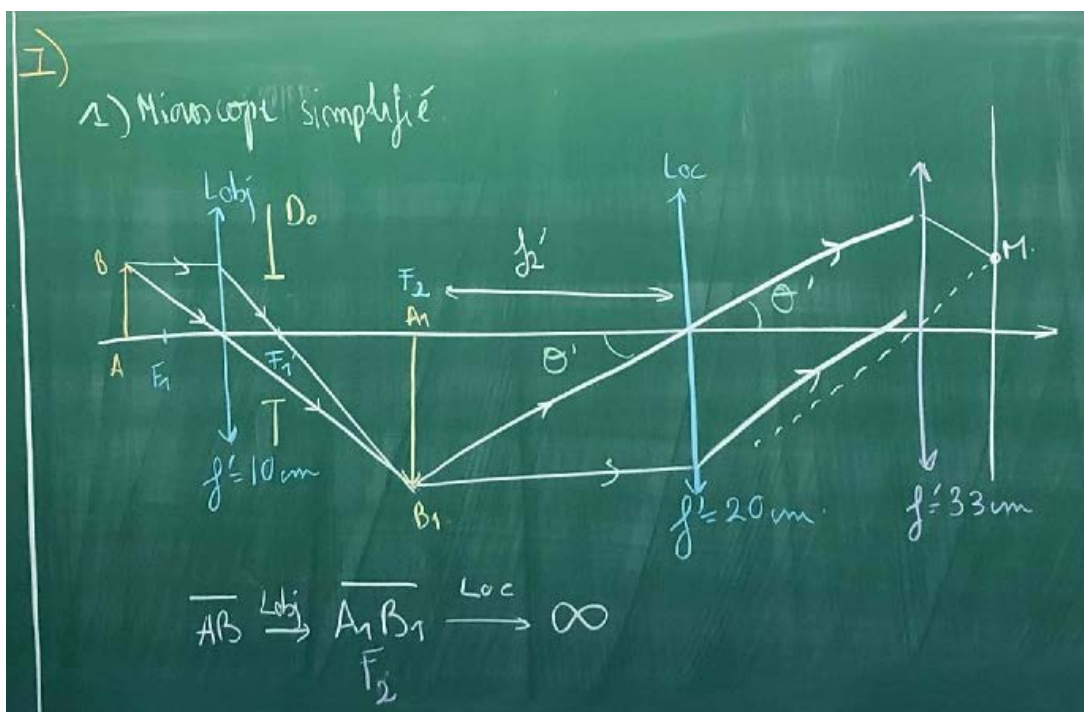
I] Le microscope optique du XVII^{ème} siècle

A) Principe de fonctionnement

Construction d'un objet (lampe blanche, filtre antithermique, cache F)

Construction d'un œil (lentille convergente écran)

Construction d'un microscope rudimentaire (lentille d'objectif, lentille d'oculaire, diaphragme d'ouverture, diaphragme de champ *pas sur la photo*)



Objectif : crée une image agrandie de l'objet

Oculaire : agit comme une loupe, envoi l'image à l'infini

Diaphragme d'ouverture : contrôle la luminosité (flux lumineux) et l'inclinaison maximale des rayons entrant (Cf sextant pour sa position)

Diaphragme de champ : contrôle le champ visible de l'objet sur l'écran

B) Pouvoir de grossissement

2) Grossissement comme celui du microscope

$G_{c, \text{micro}} = \frac{\theta'}{\theta}$ P.P = $d_m = 25 \text{ cm}$

$\begin{cases} \tan \theta' \approx \theta' = \frac{A_1 B_1}{f_2'} \\ \tan \theta = \frac{AB}{d_m} \end{cases}$

Diagram: A right triangle with vertices A, B, and a point on the horizontal axis. The angle at vertex A is θ . The vertical side is AB and the horizontal side is d_m .

$G_{c, \text{micro}} = \frac{A_1 B_1}{AB} \cdot \frac{d_m}{f_2'}$

• objetif : $\gamma_{\text{obj}} = \frac{A_1 B_1}{AB} //$
 • oculaire : $G_{c, \text{ocu}} = \frac{\alpha'}{\alpha}$ $\alpha' = \theta'$
 $= \frac{A_1 B_1}{f_2'} \times \frac{d_m}{A_1 B_1}$
 $= \frac{d_m}{f_2'} //$

$G_{c, \text{micro}} = |\gamma_{\text{obj}}| \cdot G_{c, \text{oculaire}}$

C) Limites de résolution

3) limites du microscope

(A) Le pouvoir de résolution

(*) L'ouverture numérique : $w_o = n \sin(u)$

(*) La limite de résolution : $(AB)_{\text{min}} = \frac{0,61 \lambda_0}{n \sin(u)}$

$\begin{cases} \lambda_0 = 400 \text{ nm} \\ n = 1,5 \\ w_o = 1,25 \end{cases} \left\{ (AB)_{\text{min}} = 0,2 \text{ } \mu\text{m} \right.$

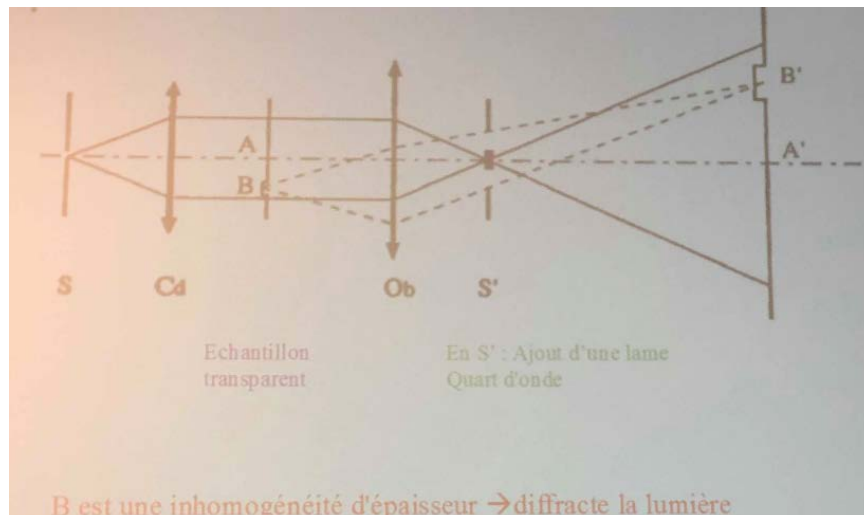
(B) Aberrations

(*) géométriques : dues à la forme de la lentille

(*) chromatiques : dues aux caractéristiques du verre des lentilles.

II) Exemple d'avancées technologiques en microscopie optique

A) Le microscope à contraste de phase (Zernike 1934, Nobel 1953)



II) 1. Microscopie à contraste de phase

$$\begin{aligned} \lambda(A) &= \lambda_0 \\ \lambda(B) &= \lambda_0 e^{i\varphi(e)} \end{aligned} \quad \varphi(e) = \frac{2\pi}{\lambda} m e \quad \left. \begin{aligned} I(A) &= |\lambda_0|^2 \\ I(B) &= |\lambda_0 e^{i\varphi(e)}|^2 = |\lambda_0|^2 \end{aligned} \right\}$$

$$(*) \lambda(B') = \underbrace{\lambda_0 e^{-i\frac{\pi}{2}}}_{\text{rayon non diffracté par } B'} + \underbrace{\lambda_0 (e^{i\varphi(e)} - 1)}_{\text{rayons diffractés par } B'}$$

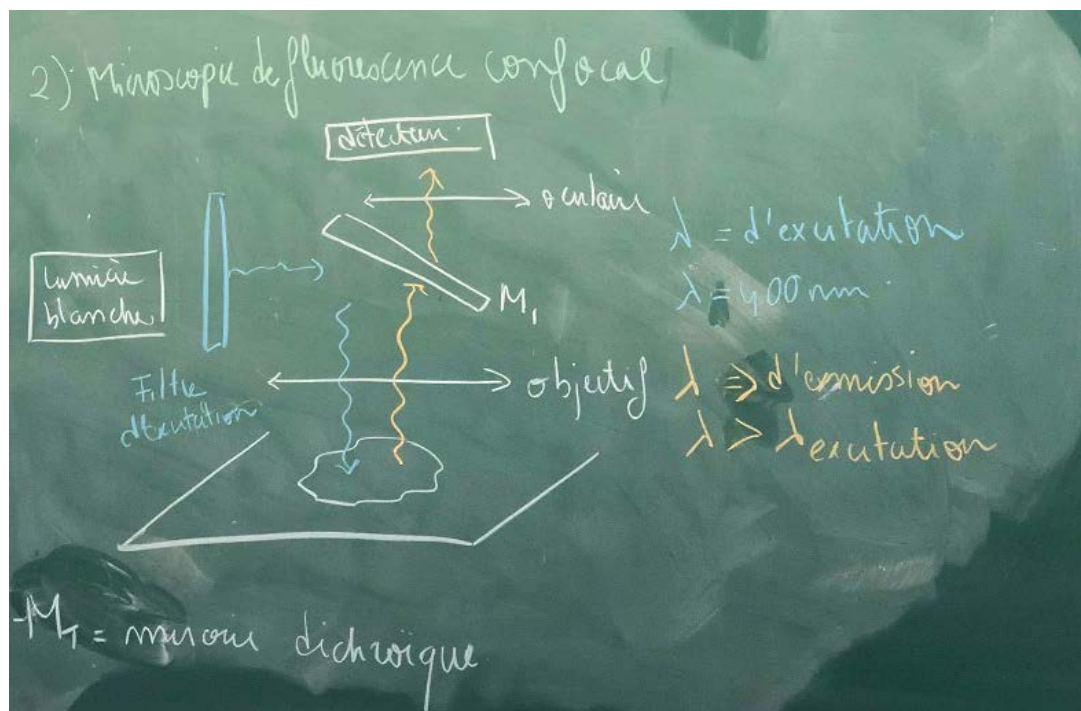
* S'

$$\begin{aligned} I(B') &= |\lambda_0(-i) + \lambda_0(e^{i\varphi(e)} - 1)|^2 \quad \varphi \ll 1 \\ &= |-i\lambda_0 + \lambda_0(1 + i\varphi - 1)|^2 \quad (1+\varepsilon)^2 = 1+2\varepsilon \\ &= |\lambda_0|^2 |1 - 2\varphi| \\ I(B') &= |\lambda_0|^2 |1 - 2\varphi(e)| \\ C &= \frac{I(e) - I(e=0)}{I(e) + I(e=0)} = \frac{2I_0 \varphi(e)}{2I_0 + 2I_0 \varphi(e)} = \varphi(e) \end{aligned}$$

B) Le microscope confocal à fluorescence (après 1957)

Par manque de temps, seul le principe du microscope à fluorescence a été traité. Pour le

rendre confocal, il faut ajouter deux diaphragmes, ce qui a été posé en question.



Questions posées par l'enseignant

Rappelez le principe de l'autocollimation

Le miroir doit-il nécessairement être collé à la lentille ?

Tracez les rayons lorsque l'objet est dans le plan focal objet de la lentille et que le miroir n'est pas collé à la lentille.

Qu'est-ce qu'un objectif à immersion ? En quoi est-ce utile ?

Pour imager des cellules, quel liquide utiliseriez-vous ?

Expliquez d'où sort la formule de la limite de résolution

Qu'est-ce que le critère de Rayleigh ? et la condition des sinus d'Abbe ?

Un objet réel à une certaine taille, à quelle condition sur celle-ci, l'image de l'objet sera la même que celle d'un point ?

Peut-on voir en profondeur avec le microscope simple ? Quels sont les phénomènes à l'origine de la profondeur de champ ?

De quoi dépend la profondeur de champ ?

Comment compense-t-on les aberrations chromatiques ?

Comment limite-t-on les aberrations sphériques ?

Peut-on faire de la microscopie à fluorescence non confocale ?

Dans le microscope confocal, expliquez le lien entre les 2 diaphragmes et la résolution en épaisseur/3D

Obtient-on une image 3D, 2D ou 1D lorsque l'on éclaire avec la configuration confocale ?

Comment reconstitue-t-on ensuite l'image en 3D ?

Qu'est-ce qu'une lame quart-d'onde ? Y-a-t-il de la polarisation en jeu dans le microscope à contraste de phase ?

Dans le microscope à contraste de phase, quelle est la différence entre mettre une lame de phase $\pi/2$ ou une lame opaque au centre du plan de Fourier ?

Commentaires donnés par l'enseignant

- Première partie très appliquée, le rythme était lent mais les schémas d'optiques géométriques extrêmement clairs et propres
- Attention de ne pas qualifier de moderne le microscope du XVII siècle
- Il faut insister un peu plus sur l'origine physique de la formule de limite de résolution, savoir la redémontrer
- Il aurait été préférable de ne traiter qu'un seul type de microscopie plus moderne (par exemple, se concentrer sur la microscopie à contraste de phase)
- Les images de microscopie à contraste de phase étaient belles, c'est important d'en montrer (notamment via Nikon small world)

Partie réservée au correcteur

Avis général sur la leçon (plan, contenu, etc.)

Leçon bien traitée mais trop longue par rapport au temps imparti. Choisir fluorescence ou contraste de phase (ou autre chose)

La démonstration du contraste de phase ne me semble pas très convaincante.

Je préfère celle de Bruhat (optique) ou celle de Taillet (Optique physique, de boeck)

• Pour Bruhat

On éclaire l'objet en $A \sin(\omega t)$.

Si l'objet est un objet de phase, après l'objet la distribution du champ est

$$A \sin(\omega t + \varphi) = A \varphi \sin(\omega t) + A \cos(\omega t)$$

On suppose ici que la variation de phase est très faible pour pouvoir faire des développements limités au premier ordre en φ .

Le terme en sin porte l'information de phase de l'objet, le terme en cos porte l'information de l'éclairement (pas de dépendance en φ)

si on met un masque déphaseur ($-\pi/2$) au plan focal de la lentille (plan de fourier), là on le faisceau d'éclairement focalise, on affecte le faisceau d'éclairement et pas (très peu) le faisceau diffracté. Tout se passe alors comme si juste après l'objet l'amplitude du champ était

$A \varphi \sin(\omega t) + A \cos(\omega t - \pi/2) = A \varphi \sin(\omega t) + A \sin(\omega t) = A \sin(\omega t) (1 + \varphi)$ on récupère donc pour l'image de l'objet diffraction une intensité en $A^2/2 (1 + 2\varphi)$. On a donc transformé une variation de phase en variation d'intensité.

• Pour Taillet

explicitement en considérant, pour simplifier la discussion, que la distribution d'amplitude dans le plan de l'objet prend la forme :

$$\mathcal{A}(x, y) = \mathcal{A}_0 e^{i\phi(x, y)}$$

où $\phi(x)$ est le déphasage introduit par l'objet transparent dont on veut faire l'image. Si ce déphasage est faible, on a :

$$\mathcal{A}(x, y) \approx \mathcal{A}_0 \{ 1 + i\phi(x, y) \}$$

Dans le plan de Fourier, le premier terme correspond au point central alors que le second est distribué sur l'ensemble du plan.

$$TF[\mathcal{A}](k_x, k_y) \approx \delta(k_x, k_y) + i TF[\phi](k_x, k_y)$$

La pastille placée au centre n'affecte donc que le premier terme. Si l'on s'arrange pour que le déphasage qu'elle introduit soit de $\pi/2$, la distribution d'amplitude qui en résulte devient :

$$TF[\mathcal{A}](k_x, k_y) \approx i\delta(k_x, k_y) + i TF[\phi](k_x, k_y)$$

Et donc tout se passe comme si l'on faisait l'image d'un objet dont la distribution d'amplitude serait de :

$$\mathcal{A}(x, y) \approx \mathcal{A}_0 \{ 1 + \phi(x, y) \}$$

Les variations de phase de l'objet initiale deviennent des variations d'amplitude, que l'on peut distinguer beaucoup plus facilement (figure 5.26).

Notions fondamentales à aborder, secondaires, délicates

On peut présenter cette leçon de deux façons

En présentant le microscope classique (celui de la plupart des ouvrages généraux d'optique et des salles de TP_1 objectif et un oculaire avec une image intermédiaire) , soit en présentant le microscope actuel (avec un objectif corrigé à l'infini et une lentille de tube, en position quasi-confocale. L'image est alors après la lentille de tube et peut être à son tour reportée vers des yeux, une caméra,)

Le choix qui a été fait ici est le microscope classique. L'avantage est que les calculs sont dans les livres.

Si l'on choisit de présenter le microscope actuel, les calculs ne sont pas dans les manuels historiques d'optique. Ils sont en revanche extrêmement simples et donc beaucoup plus rapides à mener. Compte tenu du fait que la géométrie est confocale et que la lentille de tube n'est pas modifiable, le grandissement est en $f_{\text{tube}}/f_{\text{objectif}}$ (mais est aussi indiqué dans les spécifications de l'objectif)

• Fondamental (*) et importante/secondaire

✓ Instrument

- Eclairement (*) + diaphragme de champ et diaphragme d'ouverture
- Objectif (*)
- Oculaire (*) / lentille de tube
- détecteur

✓ imagerie

- Grandissement et grossissement (*)
- Ouverture numérique (*)
- Résolution (*)
- Point Spread Function (PSF- fonction d'étalement du point)
- Aberrations géométriques et chromatiques
- Profondeur de champ

✓ Instrumentation

- Objectif (différents type)
- Eclairage de Kohler

✓ Différents types de microscopie

- Contraste de phase
- Fond sombre
- Polarisation
- Fluorescence
- Confocal
- Multiphotonique/ non linéaire
- Structurée (difficile)
- Champ proche optique....

Il en existe beaucoup d'autres dont les noms sont souvent des acronymes

Expériences possibles (en particulier pour l'agrégation docteur)

Realiser son microscope (voir la leçon proposée plus haut)
Etude du microscope de TP

Bibliographie conseillée

Les ouvrages de base d'optique font le calcul du microscope classique
Par exemple Hecht, optique

La microscopie optique moderne, Wastiaux explique bien les différents éléments et pourquoi certaines solutions sont préférables à d'autres

Les nouvelles microscopies : à la découverte du nanomonde : Wilde, Aigouy, Fretigny : le premier chapitre explique les bases des microscopes optiques en champ proche

Introduction to optical microscopy : Jerome Mertz (vraiment difficile pour une première lecture)

Des tutoriels, belles images et animations sur <https://www.microscopyu.com/>

Et des images superbes sur <https://www.nikonsmallworld.com>

C'est important pour cette leçon