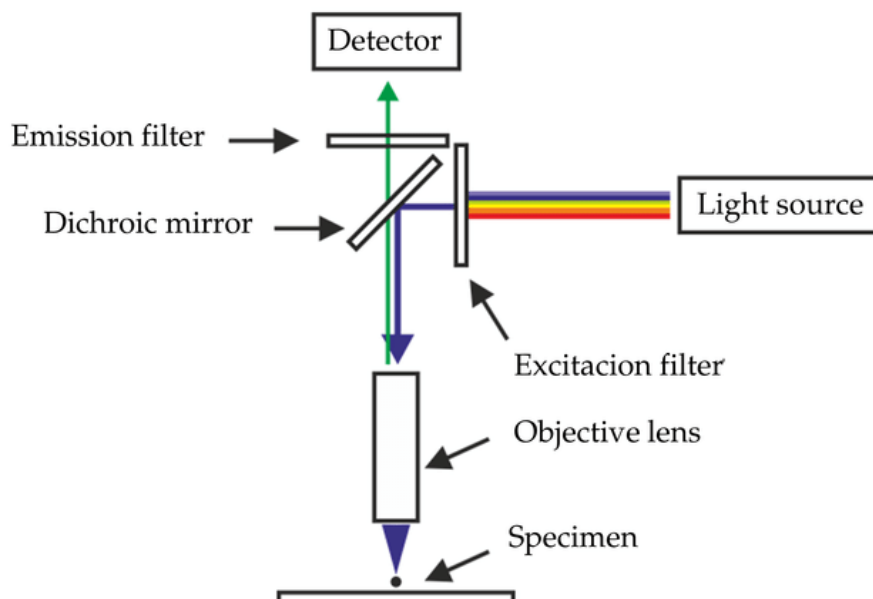


Leçon n°32 : Microscopies optiques

Niveau	Licence
Prérequis	Optique géométrique Diffraction par un réseau, tâche d'Airy Transition d'énergie électronique
Biblio	Optique, Pérez Chap11 et 7 Les instruments d'optique Dettwiller Sujet A Agreg 2015
Plan	<ul style="list-style-type: none">I. <u>Principe d'un microscope optique</u><ul style="list-style-type: none">1. L'oeil humain2. Principe du microscope composé (MC)II. <u>Caractéristiques d'un MC</u><ul style="list-style-type: none">1. Grossissement et puissance2. Oculaires et objectifs commerciaux3. Limite due à la diffraction- pouvoir de résolutionIII. <u>Microscope de fluorescence</u><ul style="list-style-type: none">1. Phénomène de fluorescence2. Présentation du microscope3. Pouvoir de résolution

Microscope de fluorescence :



Questions :

- Condition de Bragg du réseau?

Oui avec l'angle u .

Ordre 1.

- Quelle est le rapport entre l'angle u et l'ouverture numérique ?

Elle sélectionne les rayons, si le rayon est trop diffracté, il est bloqué par l'objectif.

- Ouverture numérique propre au montage ou à l'objectif ?

A l'objectif.

- Réseau très petit, est sur l'axe donc pas de problème pour les rayons venant du bas du réseau.

- Que veut dire la relation entre P et G ?

Puissance = dioptrie $-1 / 4$ dioptries / G pas de dimension physique

- En pratique que vaut δ , que vaut $f'1$ pour un objectif fois 10?

- Distance au delà du plan focal objet de l'objectif?

1,6 mm \rightarrow cf calculs feuille de Marie.

CP 32: Microscopie optique

①

Niveau : Licence

PR : - Optique géo

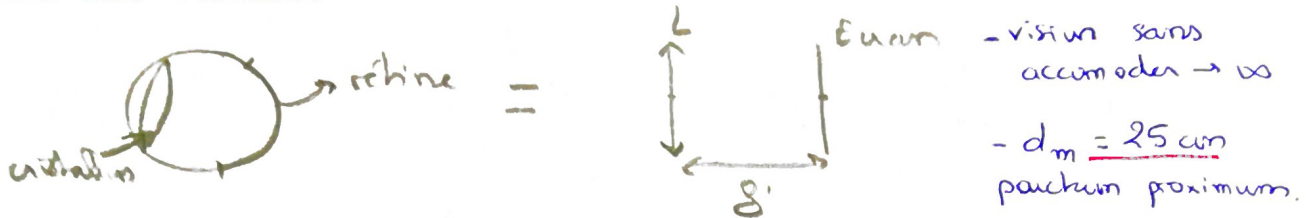
- diffraction (par un réseau, tâche d'Airy)
- Transition d'énergie électronique

Intro : Micro ≡ petit et scope ≡ voir 2 classes : e^- et optique
faible énergie e^- / lumineux

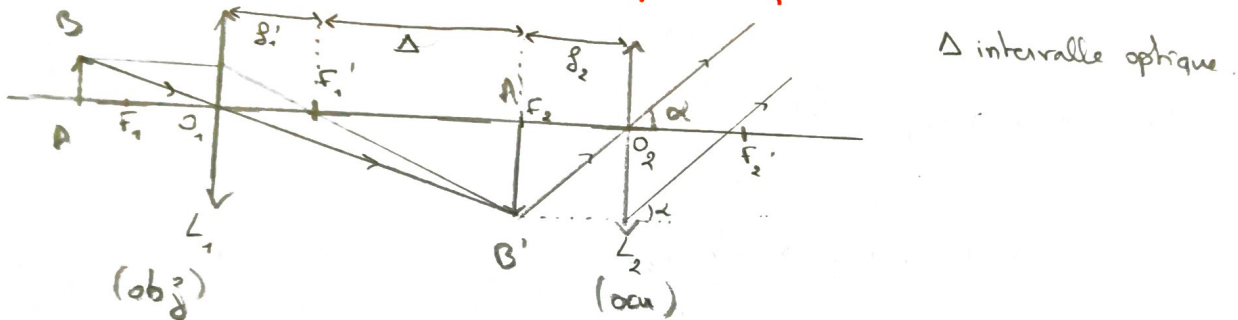
I. Principe d'un microscope optique

Interêt microscope → rayons sortent de l'oculaire à l'infini.

1. L'œil humain



2. Principe d'un microscope composé (MC)



$\overline{O_1 A'} = ① \overline{O_1 A'} = g_1' + \Delta$

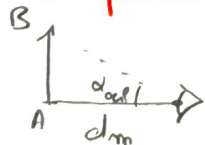
$② \frac{1}{\overline{O_1 A'}} - \frac{1}{\overline{O_1 A}} = \frac{1}{f_1'} \Rightarrow \overline{O_1 A'} = \left(\frac{1}{\overline{O_1 A}} + \frac{1}{f_1'} \right)^{-1}$

or d'après 1 : $\frac{1}{\overline{O_1 A}} + \frac{1}{f_1'} = \frac{1}{g_1' + \Delta}$ donc $\boxed{\overline{O_1 A} = \frac{-f_1'(g_1' + \Delta)}{\Delta}}$

II. Caractéristiques d'un MC

1. Grossissement et puissance

Définition : $G = \left| \frac{\alpha}{\alpha_{\text{œil}}} \right|$



$\tan \alpha_{\text{œil}} = \frac{\overline{AB}}{d_m} \approx \alpha_{\text{œil}} < 10^\circ$ car $\overline{AB} \ll 4,3 \text{ cm}$

donc $\alpha_{\text{œil}} = \frac{\overline{AB}}{d_m}$ et $\alpha = \frac{\overline{A'B'}}{f_2'}$ or $\frac{\overline{A'B'}}{\overline{AB}} = \frac{g_1' + \Delta}{\overline{O_1 A}}$ donc $\alpha = \frac{\overline{AB}}{f_1' f_2'} \Delta$ (*)

Ainsi $G = \frac{\Delta d_m}{f_1' f_2'}$
 $= \gamma_{\text{obj}} \times \frac{d_m}{g_2'}$

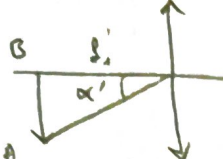
Application expérience : $f_1' = 50 \text{ mm}$, $f_2' = 100 \text{ mm}$, $\Delta = 50 \text{ mm}$.

$G = 2,5$

$G = \frac{d_m}{g_{\text{œil}}} = \frac{\overline{A'B'}}{\overline{AB}}$

Définition: $P = \frac{\alpha}{AB}$ donc $P = \frac{\Delta}{f_1 f_2}$ App eop: $P = G \cdot G$

2. Oculaire et objectif commerciaux


$G_{oc} = \frac{\alpha'}{\alpha_{ep}}$  on a: $\alpha' = \frac{AB}{f_2}$ et $\alpha_{ep} = \frac{AB}{d_m}$ donc $G_{oc} = \frac{d_m}{f_2}$


Alpha' = angle sous lequel on observe l'objet du système optique lorsque l'objet est dans le plan focal objet.

$\gamma = \left| \frac{A'B'}{AB} \right| = \frac{A'B'}{QI} = \frac{\Delta}{f_1} = \gamma_{obj}$ on déf gross. com. $G_{com} = \gamma_{obj} \times G_{oc} = \frac{\Delta}{f_1} \times \frac{d_m}{f_2}$

Ex: $G_{com} = 6,3 \times 20 = 260$ ou $50 \times 20 = 10^3$

3. Limite due à la diffraction - Pouvoir de résolution

Définition: $ON = n_0 \sin u_0$ 

on a: $r \sin u = \lambda$ et $r_{min} \sin u_0 = \lambda_0$
 donc $r_{min} = \frac{n_0 \lambda}{ON} = \frac{\lambda_0}{ON}$ (1) autre forme $r_{min} = \frac{0,61 \lambda_0}{ON}$ (2)
 On obtient par une autre démo: tâche d'Airy formée par l'objet.

Ex: $\lambda_0 = 550 \text{ nm}$ $ON = 98 \rightarrow$ (1) $r_{min} \approx 69 \mu\text{m}$ (2) $r_{min} = 0,62 \mu\text{m}$ résolution minimale.

Cellule végétale: 100 micromètres

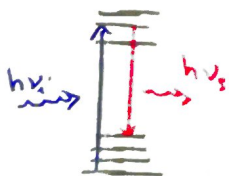
Animale 20 micromètre

Bactérie: 1 micromètre

Donc on ne peut pas tout observer avec ce microscope.

III. Microscopie de fluorescence

1. Phénomène de fluorescence



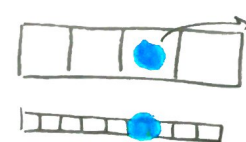
phénomène rapide.

Fluorescence: tout de suite

Phosphorescence: plus long

2. Présentation du microscope de fluorescence.

voir image microscope projectif



tâche d'Airy.

pixel du capteur

microscopie permet d'avoir + de détail sur la tâche d'Airy le centre de

3. Pouvoir de résolution

②

$$g = \frac{p'}{p} = 10^3$$

$$\rightarrow \underline{r' = g r_{\min}}$$

$$\Delta x' = \sqrt{\frac{r'^2 + a^2}{N}}$$

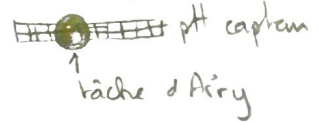
précision sur le capteur du centre de la tâche d'Airy

a : dimensions du capteur

N : nombre de photon / image.

g : le grossissement.

On se place :



Application : $r_{\min} = 0,62 \mu\text{m} \rightarrow r' = 0,62 \text{ mm}$
 $a = 8 \mu\text{m} \quad N = 10^4$

$$\Rightarrow \Delta x' = \frac{r'}{\sqrt{N}} \quad \text{AN: } \Delta x' = 6,20 \mu\text{m}.$$

$$\Rightarrow \Delta x = \frac{\Delta x'}{g} \quad \text{AN: } \Delta x = 6,20 \text{ nm. sur l'image.}$$

Delta x plus grand que $r_{\min} \Rightarrow$ plus précis.

Bcp de découvertes grâce à la microscopie en biologie. S'affranchir des limites que l'on avait avant
 Position de la tâche d'Airy

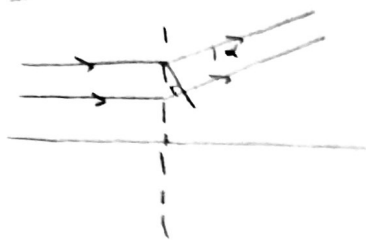
Microscopie en champs proche \rightarrow Plus précis

Microscopie en électronique \rightarrow effet tunnel, image précise également.

Conclusion : biologie

1^{er} limite celle de la taille du pixel \rightarrow on ne peut pas avoir + précis que taille du pixel.
 L'incertitude sur la posⁿ du centre dépend du nb de photon reçu par le capteur.

Questions :



ordre 1 du réseau = condition de Brague



Ouverture numérique relatif à quoi ?

Le réseau est situé sur l'axe car très petit devant obj. de pas de pht pour rayon bas.

$P = GG$ que signifie ? $G = \frac{1}{d_m}$ dioptrie (m^{-1}) P pas de dimension

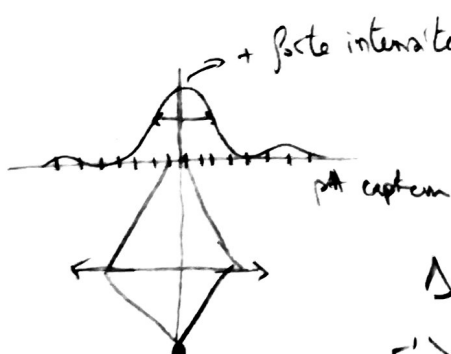
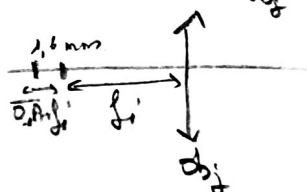
Distan au dela du pht objet de l'obj ($\overline{F_1A}$)

$$\overline{O_1A} = - \frac{f_1' (f_1' + \Delta)}{\Delta} \Leftrightarrow \overline{O_1A} + f_1' = \frac{-f_1'^2 - f_1' \Delta + f_1' \Delta}{\Delta} = \frac{-f_1'^2}{\Delta}$$

$$\alpha \gamma_{obj} = \frac{\Delta}{f_1'} \Leftrightarrow f_1' = \frac{\Delta}{\gamma_{obj}} \text{ donc } \overline{O_1A} + f_1' = - \frac{\Delta^2}{\gamma_{obj}^2} \times \frac{1}{\Delta} = \frac{-\Delta}{\gamma_{obj}^2}$$

$$\Leftrightarrow \overline{O_1A} + \frac{\Delta}{\gamma_{obj}} = \frac{-\Delta}{\gamma_{obj}^2}$$

AN $\overline{O_1A} + f_1' = 1,6 \text{ mm} = \frac{160}{10^3}$



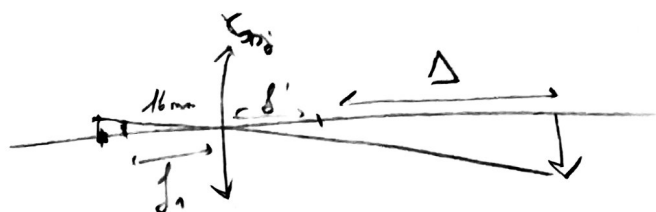
avec grossissement on retrouve une précision bq + faible que largeur de la tâche - grande précision sur le pht obj

$$\Delta x < a$$

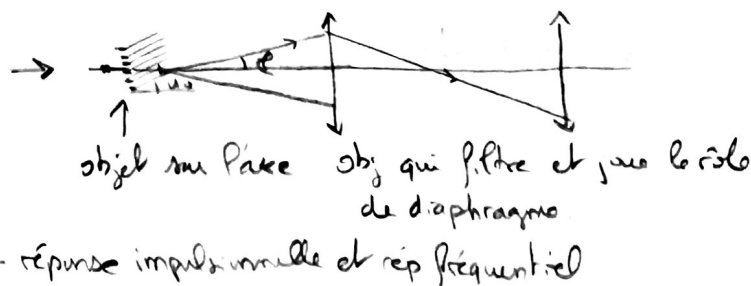
$$r' \geq a$$

$$\Delta x = \frac{r'}{\sqrt{N}}$$

Rq MC + autre chose



Pouvoir de résolution du MOp. de l'ordre de λ .
la limite intrinsèque.
Calcul privilégié MC plutôt que montage.



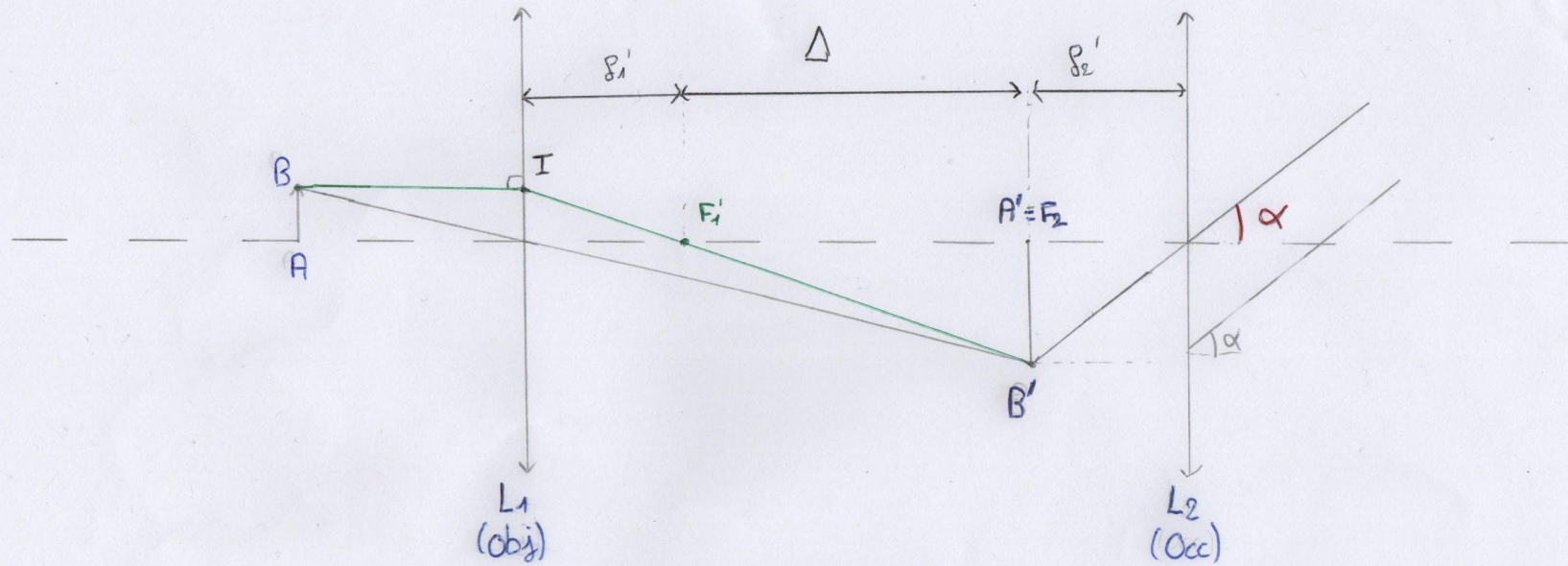
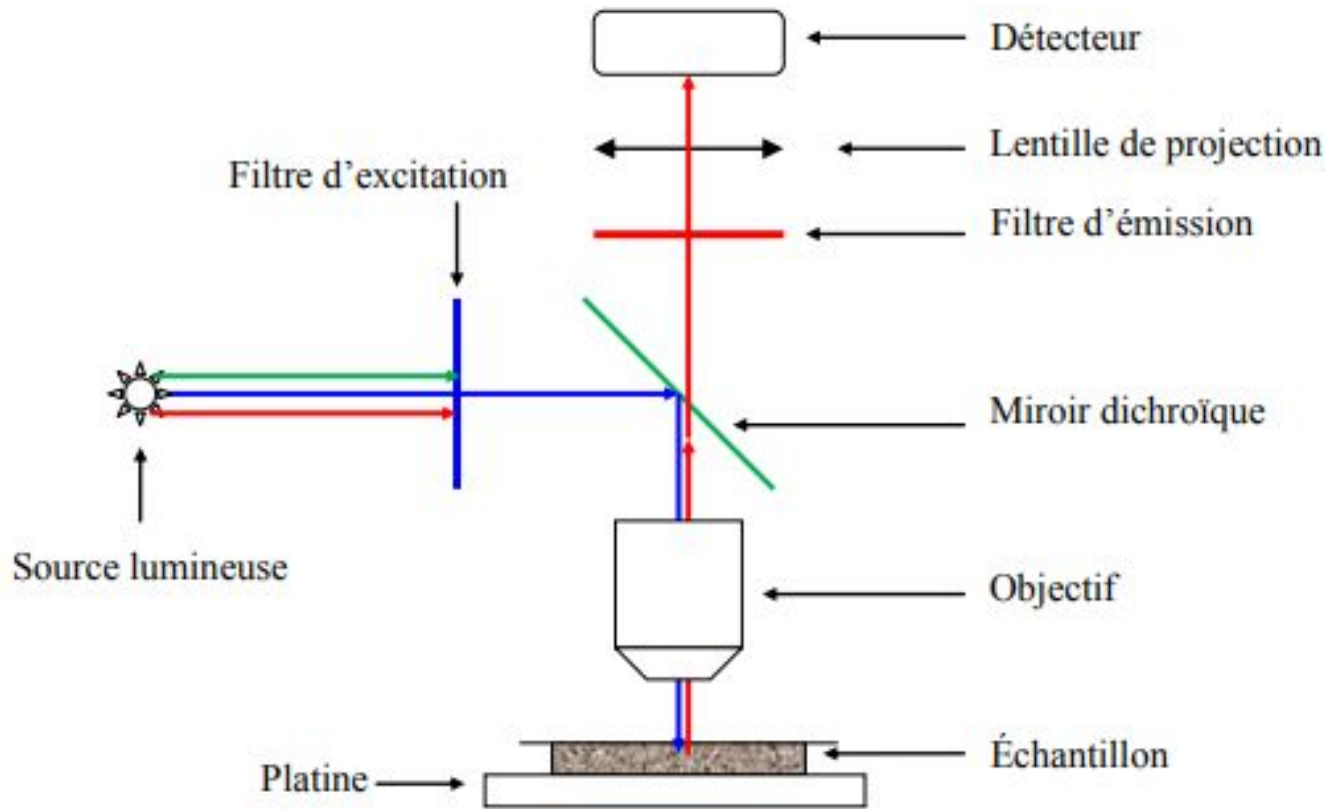
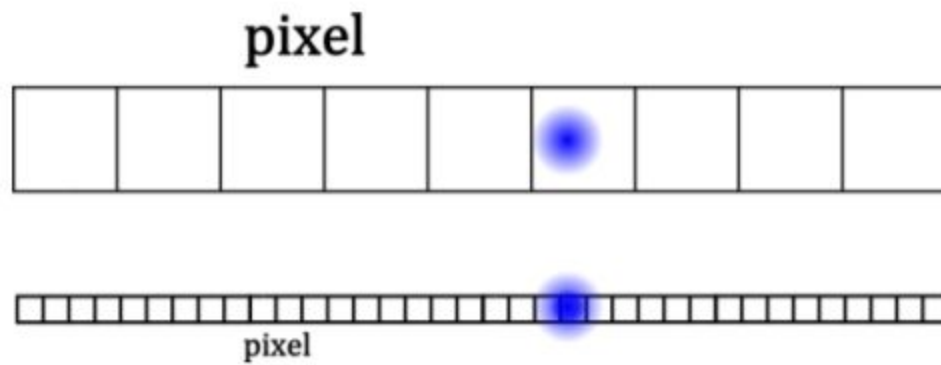


Schéma d'un microscope composé



Sujet A agrégation 2015

Le microscope de fluorescence



Sujet A agrégation 2015

Lecon 32 : Microscopies Optiques

Niveau : Licence

Pré-requis : Optique géométrique de base, Diffraction, Transitions électroniques

0) Introduction :

Micro = Petit, Scopie = Observer, donc microscopie = ensemble de techniques d'imageries permettant d'observer le petit. Microscopie électronique -> Faisceau d'électron, Optique -> Faisceau lumineux.

I) Principe du microscope composé :

a) L'oeil humain

Capteur des microscopes qu'on utilise au lycée. Modèle simplifié : Cristallin \equiv lentille de focale variable (muscle) et rétine \equiv écran. On voit à l'infini sans se fatiguer, et on peut "accommoder" jusqu'au punctum proximum d_m , qu'on peut situer à 25 cm en général.

b) Principe du microscope composé

Deux systèmes optiques, oculaire et objectif, modélisés par des lentilles convergentes simples. Les deux sont centrés (même axe optique) \equiv faire un schéma simplifié au tableau. On définit l'intervalle optique comme $\Delta = F_1'F_2$. Schéma est présenté dans le diapo associé.

On veut projection à l'infini en sortant -> Image A'B' intermédiaire sur le plan focal image de l'oculaire. Faire le tracé en plaçant l'objet. Calcul de la position de l'objet, via formule de conjugaison de Descartes et distance entre l'image intermédiaire et la lentille L1 (\equiv objectif).

Montage faire un microscope optique avec deux lentilles, associé à un système lentille/écran pour l'oeil. ($f_1' = 5\text{cm}$, $f_2' = 10\text{ cm}$ et intervalle optique de $\Delta = 20\text{ cm}$. Avec ces lentilles, prendre une lentille de focale 25 cm nous donne un grossissement angulaire égal au grossissement de l'image).

II) Caractéristiques du microscope composé:

a) Grossissement et puissance

Définition et calcul du grossissement (valeur absolue du rapport de l'angle sous lequel on voit l'objet à travers le microscope et celui sous lequel on le voit à l'œil nu en le plaçant au punctum proximum d_m) à partir des formules de conjugaisons. Faire le lien avec la notion de puissance en microscopie.

$$G = \frac{\Delta d_m}{f_1 f_2}, \quad P = \frac{G}{d_m} = 4G$$

Vérifier si on obtient le bon grossissement avec notre modèle de microscope.

b) Caractéristiques commerciales (Agreg Q6 à 8)

Définitions du grossissement de l'oculaire et du grandissement de l'objectif (x10, x50...)

Faire le lien avec la notion de grossissement vue précédemment :

$$G = \gamma_{obj} \times G_{occ}$$

Donner ordres de grandeurs.

c) Limite dû à la diffraction : pouvoir de résolution

Définition de l'ouverture numérique O.N. (Perez, CH7). En général compris entre 0,1 et 1.

Calcul de la limite de résolution à partir d'un réseau :

$$\Delta r_{min} \approx \frac{\lambda_0}{O.N.}$$

Présentation de la formule qu'on obtient en travaillant avec les tâches d'Airy (Agreg 2015 sujet A Q36). On a seulement un coefficient 0,61 en plus dans la formule .

Application numérique : résolution de l'ordre de la longueur d'onde visible.

III) Microscopie de fluorescence

a) Principe de la fluorescence

Schéma de transitions électroniques + Q51.

b) Le microscope de fluorescence

Explication du fonctionnement à l'aide du schéma du diapo. (Sujet et Correction du sujet d'Agreg Q52).

c) Capteur et pouvoir de résolution

Détail sur l'importance du capteur (Diapo, Q53 et 54). Présentation et explication de la formule sur la limite de résolution (sujet Agreg Q55) :

$$\Delta r_{min} = \sqrt{\frac{r'^2 + a^2/12}{N}}$$

Application numérique pour comparer : résolution de l'ordre du nanomètre.

Biblio : - Perez d'Optique

- Sujet A agrégation physique 2015 et correction
(<http://www.agregation-physique.org/index.php/annales-des-epreuves-ecrites/54-sujets-et-corriges-annee-2015>)
- **La microscopie optique moderne**, de Gérard Wastiaux.

LP30: Microscopies optiques

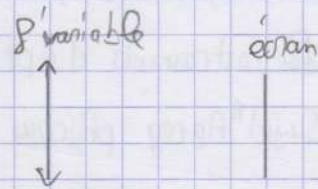
Introduction: Micro = petit et scopie = observer \Rightarrow Microscopie: ensemble de techniques d'imagerie

On a principalement optique et électronique, resp. faisceau lumineux ou d'électrons.

I- Principe d'un microscope optique

a) L'oeil humain

\rightarrow Capteur de l'information



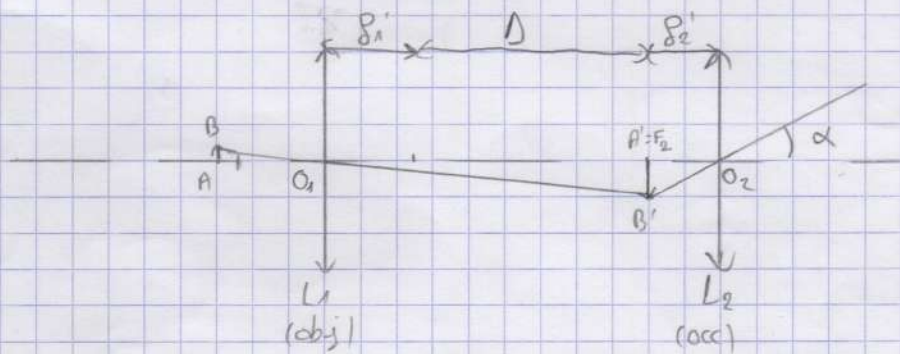
\rightarrow Vision sans accommodation, donc sans fatigue, à l'infini. On peut aller jusqu'à $d_m = 25\text{cm}$ *punctum prox.*

b) Principe du microscope composé

Montrer un vrai modèle de microscope. On a une source de lumière \equiv optique.

On peut voir oculaire et objectif. Composés de différentes lentilles, diaphragme.

\rightarrow On modélise par des lentilles simples. 2 systèmes optiques centrés (m axe optique):



On veut que les rayons sortent à l'infini (pas d'accommodation).

Δ étant fixe, c'est sur la position de l'objet que l'on va jouer

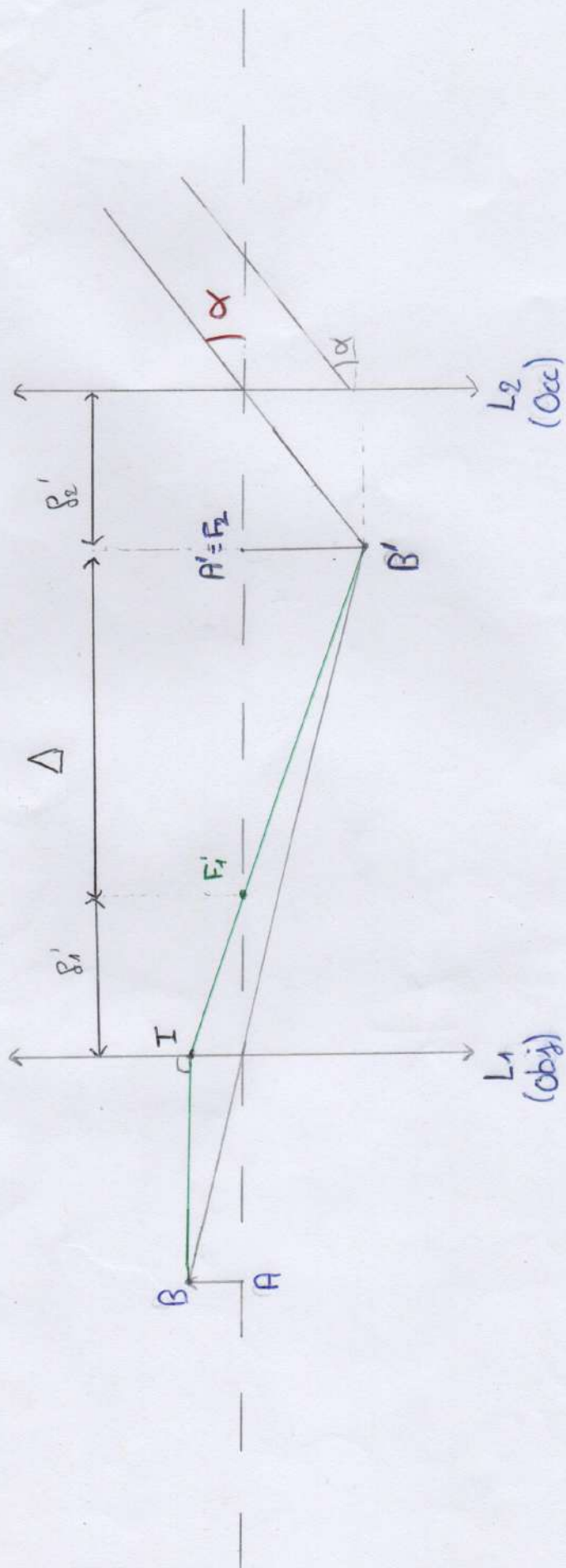
$$\bullet \overline{O_1 A'} = p_1' + \Delta \quad (1) \quad \bullet \frac{1}{\overline{O_1 A'}} - \frac{1}{\overline{O_1 A}} = \frac{1}{p_1'} \quad (2)$$

$$(2) \Rightarrow \overline{O_1 A'} = \left(\frac{1}{\overline{O_1 A}} + \frac{1}{p_1'} \right)^{-1} = \frac{\overline{O_1 A} p_1'}{\overline{O_1 A} + p_1'}$$

$$(1) \left(\frac{1}{\overline{O_1 A'}} + \frac{1}{p_1'} \right) = \frac{1}{p_1' + \Delta} \rightarrow \frac{1}{\overline{O_1 A}} = \frac{1}{p_1' + \Delta} - \frac{1}{p_1'} = \frac{p_1' - \Delta}{p_1' + \Delta}$$

$$\overline{O_1 A} = - \frac{p_1' (p_1' + \Delta)}{\Delta}$$

(1) Dans notre cas, $\overline{O_1 A} = -0,1\text{m} = -10\text{cm}$



II - Caractéristiques d'un microscope composé

1) Grossissement et puissance d'un microscope

Def: $G = \left| \frac{\alpha}{\alpha_{\text{œil}}} \right|$



$\tan(\alpha_{\text{œil}}) = \frac{AB}{dm}$ Gauss: $\alpha < 10^\circ \rightarrow AB < 4,3 \text{ cm}$... On peut considérer que vrai

$\alpha_{\text{œil}} = \frac{AB}{dm}$

Et $\alpha = \frac{A'B'}{p_2'}$ or $\frac{A'B'}{AB} = \frac{p_1' + \Delta}{O_1A}$ et $O_1A = -\frac{p_1'(p_1' + \Delta)}{\Delta}$

On obtient donc $A'B' = -AB \frac{\Delta}{p_1'}$ et donc $\alpha = -AB \frac{\Delta}{p_1' p_2'} (*)$

$G = \frac{\alpha}{\alpha_{\text{œil}}} = + \frac{dm \Delta}{p_1' p_2'}$

Étude de notre modèle

$p_1' = 50 \text{ mm}$

$p_2' = 100 \text{ mm}$

$p_{\text{œil}} = 250 \text{ mm}$
 $\Delta = 50 \text{ mm}$

taille de l'objet initial: $AB = 1 \text{ cm}$ donc $\alpha_{\text{œil}} = \frac{AB}{dm} = 4AB$

donc $\alpha = \frac{A'B'}{p_2'}$ donc en mesurant $\alpha = \frac{A'B'}{250 \cdot 10^{-3}} p_{\text{œil}}$

$|G_{\text{théo}}| = -\frac{dm \Delta}{p_1' p_2'} = 2,5$

$G_{\text{mesuré}} \approx \frac{\alpha}{\alpha_{\text{œil}}} = \frac{dm}{p_{\text{œil}}} \frac{A'B'}{AB} = \frac{A'B'}{AB}$

En microscopie optique, on parle souvent de puissance

Def: $P = \left| \frac{\alpha}{AB} \right|$ or on a vu (*) $|\alpha| = \frac{AB \Delta}{p_1' p_2'}$

$P = \frac{\Delta}{p_1' p_2'} = 4|G| \text{ en } m^{-1}$

II-2) Oculaire et objectif commerciaux

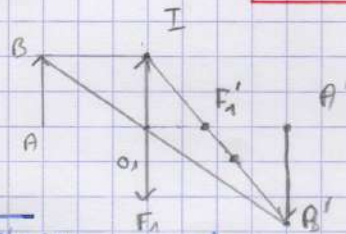
- Sur les microscopes qu'on utilise, objectifs et oculaire x10, x20... → Commercial

Def: $G_{occ} = \frac{\text{Angle sous lequel on voit l'objet à l'infini}}{\text{angle}} = \sin \theta$ le plan focal objet

$$G_{occ} = \left(\frac{AB}{f_2'} \right) \left(\frac{AB}{d_m} \right)^{-1} \quad \text{donc} \quad G_{occ} = \frac{d_m}{f_2'}$$

Def $X_{obj} = \left| \frac{A'B'}{AB} \right|$

Donc $X_{obj} = \left| \frac{A'B'}{O_1 I} \right| = \frac{\overline{F_1 A'}}{\overline{F_1 O_1}} = \frac{\Delta}{f_1'}$



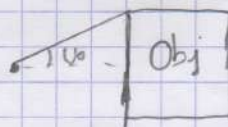
On a vu $G = \left| \frac{d_m \Delta}{f_1' f_2'} \right|$ donc $G_{com} = X_{obj} \times G_{occ}$

Quelques exemples: $10 \times 40 = 400$, $20 \times 50 = 1000$

II-3) Limite due à la diffraction: pouvoir de résolution

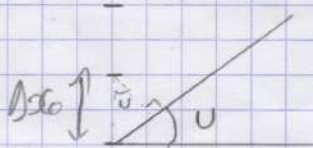
Diffraction → L'image d'un point est une tache (d'Airy)

Def: Pouvoir de résolu° ≡ Capacité à imaginer distinctement 2 détails proches de l'objet
 Limite par diffraction ⇒ Vient de l'ouverture de l'oculaire



$$O.N.: n_0 \sin(\theta_0)$$

→ On va prendre un réseau de paramètre Δx_0 et chercher le $(\Delta x_0)_{min}$ que l'on peut distinguer au microscope



On sait que dépend à:

$$\Delta x_0 \sin(\theta) = \lambda$$

Au max: $(\Delta x_0)_{min} \sin(\theta_0) \lambda$

d'où $(\Delta x_0)_{min} = \frac{n_0 \lambda}{O.N.} = \frac{\lambda_0}{O.N.}$

- Rq : - Plus λ est petit, plus on peut distinguer les détails
 - Plus O.N. est grande, moins on diffracte \rightarrow meilleurs détails

Ex: O.N. $\approx 0,8$, pour $\lambda_0 = 550 \text{ nm}$ $(\Delta x_0)_{\min} \approx 69 \mu\text{m}$
 Cellules végétales $\approx 100 \mu\text{m}$

\rightarrow Ce calcul nous donne un $(\Delta x_0)_{\min}$. En utilisant les propriétés des taches d'Airy et les relations d'Abbe, on peut aboutir à une valeur théorique limite plus fine.

$$(\Delta x_0)_{\min} = \frac{0,61\lambda}{\text{O.N.}}$$

m ordre de grandeur
 $(\Delta x_0) \approx 42 \mu\text{m}$

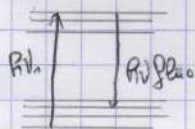
Démo assez longue et pas plus intéressante que ça

Peut-on atteindre des précisions meilleures en microscopie optique
 (Bactérie $\sim 1 \mu\text{m}$, cellule animale $\sim 20 \mu\text{m}$)

III - La microscopie de fluorescence

a) Phénomène de fluorescence

Une molécule est excitée lumineusement (électron) puis reemet à une autre longueur d'onde, généralement plus grande. (Processus de photoluminescence).



$$\rightarrow E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

donc $\lambda_{\text{émission}} > \lambda_{\text{excitation}}$

b) Présentat° du microscope de fluorescence

Image sujet A agrég phys 2015

- On envoie de la lumière sur un filtre d'excitation permettant de sélectionner la bonne longueur d'onde d'excitation. Cette longueur d'onde est bien réfléchie mais peu transmise par le miroir dichroïque

b) Taille des pixels du capteur

Projection du schéma

• Pas des points mais des taches d'Airy qui se forment sur le capteur. Plus précis dans le cas 2, importance du choix des capteurs.

c) Pouvoir de résolution

Comme l'image n'est plus à l'infini mais focalisée sur le capteur (on parle de microscope projectif, plutôt que visuel), on définit plutôt un grandissement transversal $g = \frac{r'}{r}$ $\leftarrow \begin{matrix} \text{Image} \\ \text{Objet} \end{matrix}$. En général, $g \sim 10^3$

À partir des t. d'Airy, on avait $r_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{\text{O.V.}} = 42 \mu\text{m}$ donc on calcule $r' = g r_{\min}$

A.V: $r' \approx 42 \mu\text{m}$ pour $\lambda = 550 \text{ nm}$ (vert/jaune)

T. Thompson a démontré que si les bruits ne sont pas gênants :

taille de l'image sur le capteur

Précision sur la pos. du centre de la tache d'Airy $\rightarrow \Delta x' = \frac{\sqrt{r'^2 + a^2}}{\sqrt{N}}$ \leftarrow taille d'un pixel

$N \leftarrow$ Nombre de photons détectés

Expérimentalement, on peut avoir $N = 10^4$ photon par image et $a = 8 \mu\text{m}$

$\rightarrow \Delta x' = \frac{r'}{100}$ donc $\Delta x' \approx 42 \mu\text{m}$ \leftarrow Sur l'image du capteur

Or on sait que $r' = g r \approx 10^3 r$ donc $\Delta x_0 = 420 \text{ nm}$

C'est mieux !

CCL :

Bonus : Latitude de mise au point

Nous avons étudié le cas où l'on place l'objet de manière à ce que les rayons sortent de l'oculaire à l'infini. Néanmoins l'œil sait accommoder jusqu'à $d_m = 25$ cm. De combien au max peut-on décaler l'objet et le voir encore bien ?

• Autre cas extrême : $\overline{A''B''}$, ^{virtuelle} image de $\overline{A'B'}$ par L_2 , se situe à 25 cm de O_2 .

$$-d_m \cdot \frac{1}{\overline{O_2A''}} - \frac{1}{\overline{O_2A'}} = \frac{1}{f_2'} \rightarrow \frac{1}{\overline{O_2A'}} = -\frac{1}{4} - \frac{1}{f_2'} \quad \overline{O_2A'} =$$

$$\frac{1}{\overline{O_1A'}} - \frac{1}{\overline{O_1A}} = \frac{1}{f_1'} \quad \text{On a } \overline{O_1A'} = \overline{O_1O_2} + \overline{O_2A'} = f_1' + f_2' + \Delta + \overline{O_2A}$$
$$\overline{O_1A'} =$$

$$\overline{O_1A} = \left(\frac{1}{\overline{O_2A'}} - \frac{1}{f_1'} \right) = -9,77 \text{ cm}$$

(avant, -10 cm)
latitude ≈ 233 mm