



LP32 : Microscopie Optique

Niveau : CPGE, 1^{ère} année

Biblio : « Optique ondulatoire » Hprépa, « Sextant », Houard « Optique : Une approche expérimentale et pratique ».

Prérequis : optique géométrique, diffraction

Plan :

I. L'optique géométrique appliquée au microscope

1. Constitution du microscope
2. Grandeurs caractéristiques
3. Profondeur de champ
4. Correction des aberrations optiques

II. Limite de résolution

1. Diffraction
2. Manipulation : filtrage spatial
3. Dépasser la limite de résolution
 - a) La microscopie PALM (PhotoActivated Localization Microscopy)
 - b) La microscopie STED

Introduction :

Jusqu'alors utilisé pour régler les défauts de la vision, l'amélioration des techniques de polissage du verre au début du XVII^{ème} siècle permit de franchir un palier supplémentaire dans l'utilisation des lentilles optiques. On ne cherchait plus à seulement corriger les problèmes de vues mais à repousser les limites de la vision d'une façon jamais encore atteinte auparavant. Ainsi naquit la fameuse lunette astronomique dont Galilée fut le premier à l'exploiter avec succès pour étudier le ciel en 1609. A cette même époque naquit un autre instrument non moins célèbre, le microscope. Contrairement à la lunette qui nous permet d'observer des objets lointains et grossis, le microscope s'intéresse à des objets proches et de tailles très réduites. D'abord composé d'une seule lentille, il fallut attendre le début du XIX^{ème} siècle pour observer les premiers microscopes composés de plusieurs lentilles suffisamment efficaces, afin d'aboutir au microscope optique classique qui sera le sujet de notre étude. Nous allons dans un premier temps regarder le principe de fonctionnement du microscope du point de vue de l'optique géométrique, puis nous regarderons les limites de résolution auquel est soumis ce type d'appareil.

Pendant toute la leçon nous nous placerons dans l'hypothèse des lentilles minces.

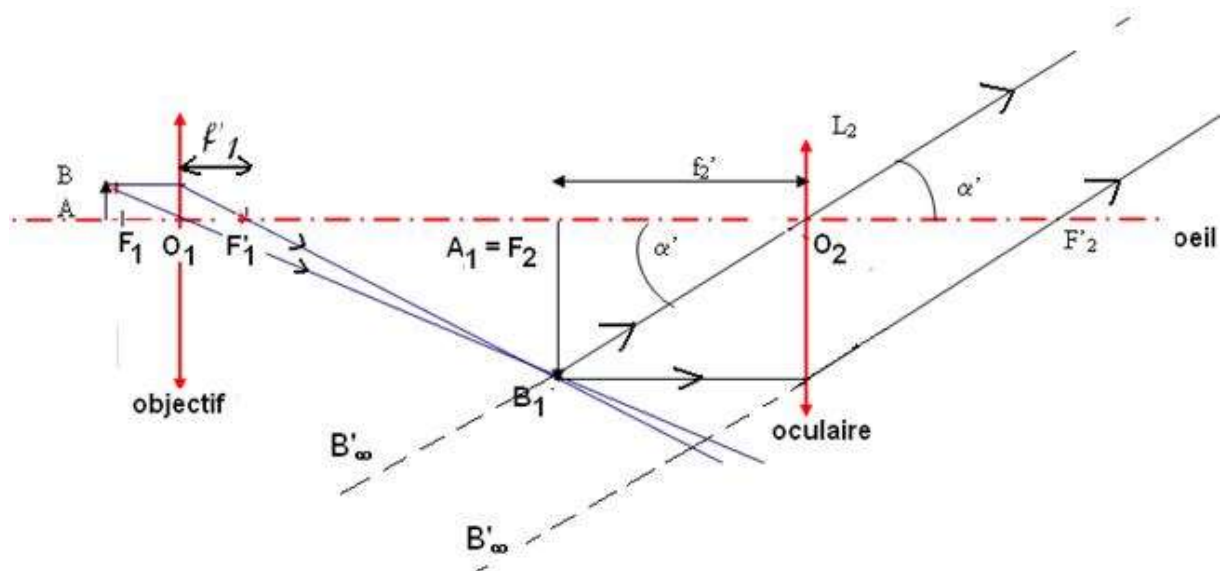
I. L'optique géométrique appliquée au microscope

1. Constitution du microscope

On souhaite étudier un objet AB au microscope

Microscope composé de 2 lentilles convergentes :

- L'objectif par lequel arrivent les rayons lumineux provenant de l'objet que l'on souhaite étudier. Il est disposé à quelques millimètres de l'objet, un grandissement important tout en gardant un microscope de taille raisonnable nécessite donc une lentille de courte distance focale de l'ordre du mm. L'objet est situé juste devant le foyer objet de l'objectif. Il crée une image intermédiaire réelle A_1B_1 .
- L'oculaire a pour fonction de faire ressortir une image virtuelle agrandie $A'B'$ se formant à l'infini afin que l'œil n'ait pas besoin d'accommoder lorsqu'il regarde par l'oculaire. Cela nécessite de placer l'oculaire de telle manière que A_1B_1 se forme au niveau du foyer objet de l'oculaire. Là encore l'oculaire doit être de courte focale.



L'œil de l'observateur doit préférentiellement se placer au niveau du cercle oculaire, là où l'intensité lumineuse est maximum.

Rappel : Le cercle oculaire correspond à l'image du bord de l'objectif et donc à la section la plus étroite du faisceau sortant de l'oculaire. Un bon appareil doit avoir un cercle oculaire plus petit qu'une pupille humaine, soit à peine quelques mm. Il est presque confondu avec le foyer image de l'oculaire

Là je rajouterais un paragraphe: dans le microscope réel on a souvent des ouvertures importantes. On sort des conditions de Gauss donc aberrations chromatiques + géométriques. => systèmes épais constitués de plusieurs lentilles. On sait qu'un système épais se ramène à une lentille mince à condition de distinguer H_o et H_i les points principaux de O . Cela ne change donc pas le principe et dans la suite on va détailler le fonctionnement sur un microscope modèle formé de deux lentilles minces. Voir §4 à mettre ici peut être.

2. Grandeurs caractéristiques

Afin d'exprimer les grandeurs caractéristiques du microscope nous devons rappeler les relations de conjugaisons :

Relation de conjugaison de Descartes : $\frac{1}{\overline{OA'}} - \frac{1}{\overline{OA}} = \frac{1}{f'}$

Relation de conjugaison de Newton : $\overline{F'A'} \cdot \overline{FA} = f'f$

2 grandeurs caractéristiques permettent de caractériser le microscope :

- La **puissance** $P = \frac{\alpha'}{AB}$ avec AB la taille de l'objet et α' l'angle sous lequel est vu l'image A'B' dans le microscope. C'est la principale grandeur caractéristique d'un microscope. On l'utilise pour des instruments d'optique permettant d'observer des objets de taille déterminés ou déterminable renvoyant une image à l'infini, et donc caractérisée par un angle. Ici l'image est renvoyée à l'infini et le cercle oculaire est pratiquement confondu avec le foyer image de l'oculaire. En conséquence on peut assimiler la puissance P à la puissance intrinsèque P_i avec f' la distance focale de l'ensemble du microscope. La puissance ne dépend que des propriétés du microscope et non de la position de l'œil.

- Le **grossissement** $G = \frac{\alpha'}{\alpha}$ où α est l'angle sous lequel on regarde l'objet à l'œil nu à une distance d (voir schéma Houard p156 figure 7.12). Dans la limite des petits angle on peut poser $\alpha = \tan \alpha = \frac{AB}{d}$. On déduit la relation $G = P \cdot d = P_i \cdot d$.

Généralement on utilise une distance d normé au punctum proximum de l'œil soit $d = d_m = 0,25 \text{ m}$.

On parle alors de grossissement commercial G_c . On a $G_c = P_i \cdot d_m$

Changer de paragraphe: c'est le centre de la leçon, toute l'OG apprise avant va nous permettre de comprendre et de donner des valeurs quantitatives à ces définitions naturelles. Faire la manip et les mesures pour comparer au calcul. Bien expliquer comment on fait l'oeil.

On développe alors P_i et G_c pour les caractéristiques du microscope.

Voir Houard p156, refaire le calcul au tableau.

On trouve alors $P_i = |\gamma_{ob}| \cdot P_{oc} = \frac{\Delta}{f'_{ob} f'_{oc}}$ avec l'intervalle optique $\Delta = \overline{F'_{ob} F'_{oc}}$. La puissance du microscope dépend donc uniquement des distances focales des objectifs, plus celles-ci seront faibles, plus la puissance du microscope sera élevée.

On trouve également $G_c = |\gamma_{ob}| \cdot G_{oc} = \frac{\Delta}{f'_{ob} f'_{oc}} \cdot d_m$


Sachant que le microscope renvoie une image renversée, on peut donc finalement dire que l'on a la distance focale f' de l'ensemble du microscope tel que :

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

Pour des microscopes de qualité standard on trouve des P_i l'ordre de la centaine de dioptrie à quelques milliers de dioptrie et des G_c allant jusqu'à 1200.

Faire un paragraphe sur DO, DC, pupilles PE+PS. Avec un objet diffusant montrer qualitativement le rôle de DO sur la "luminosité" d'une image.

3. Profondeur de champ


L'image ressortant du microscope doit se situer entre le *ponctum proximum*  le *ponctum remotum* de l'œil, l'image intermédiaire peut donc se former sur une certaine latitude, entre le point focal objet de l'oculaire (dans le cas idéal) et un peu avant.


Cette latitude étant inversement proportionnelle au carré de la puissance intrinsèque, elle varie de quelques dixièmes de millimètres à quelques microns.


Un microscope précis demande donc une très grande précision quant au positionnement de l'objectif par rapport à l'objet à analyser.

4. Correction des aberrations optiques


Le modèle présenté jusqu'à présent se faisait dans l'hypothèse que l'on était dans les conditions de Gauss, ou optique paraxial. Hors ce n'est généralement pas le cas et l'on a alors des problèmes dus aux aberrations optiques des lentilles.

Des **aberrations géométriques** provenant du fait que les lentilles ne sont pas parfaitement  sphériques. Cela peut entraîner des phénomènes de distorsion, de nature différente en fonction de la position du diaphragme d'ouverture, en barillet si le diaphragme est placé avant la lentille, en coussinet si il est placé après.

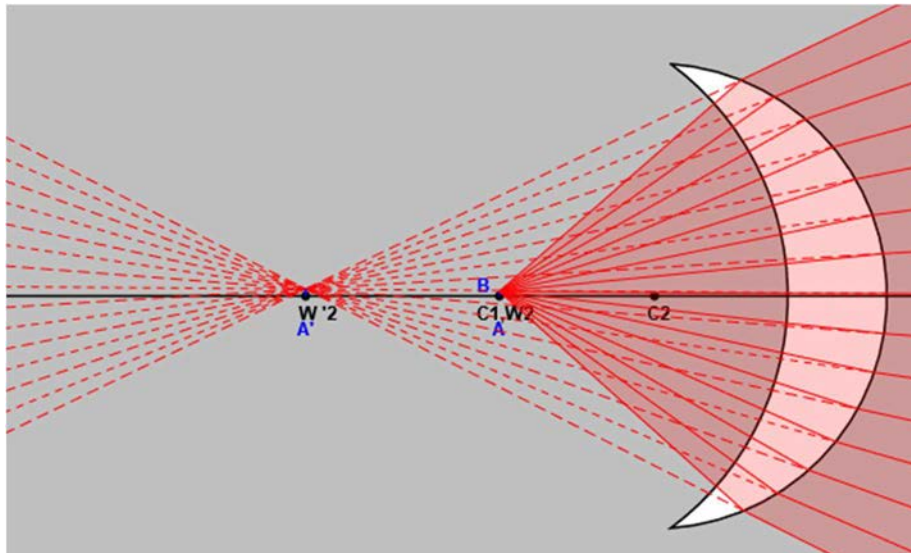
Des **aberrations chromatiques**  due à la variation de l'indice de réfraction du matériau composant les lentilles en fonction de la longueur d'onde de la lumière qui les traverse. La distance focale dépend donc de la longueur d'onde, toutes les couleurs ne sont pas focalisées de la même manière.

Pour corriger ces aberrations  il convient de se rapprocher le plus possible des conditions de Gauss, on va utiliser des outils correctifs afin de limiter au maximum ces aberrations.

Voir Houard p160

On essaye de rendre l'optique du microscope paraxiale en réduisant l'angle d'ouverture du faisceau. Il nous faut pour cela utiliser les points de Weierstrass du dioptré sphérique qui nous serviront de points de référence. 

On utilise d'abord un ménisque d'Amici, en verre, qui aura donc 2 dioptries sphériques, un d'entrée et un de sortie. Le centre C_1 du dioptré sphérique d'entrée est confondu avec le premier point de Weierstrass W_2 du dioptré de sortie dont le centre est C_2 . L'image réfléchie se formera sur le second point de Weierstrass W'_2 . De cette manière on réduit l'angle d'ouverture pour le rayon réfracté qui sortira du ménisque.



Comportement des rayons arrivant sur un ménisque d'Amici

On a également un doublet achromatique de Lister composé de 2 doublets achromatiques simples, réunion d'une lentille convergente et d'une lentille divergente, chaque lentille compensant les aberrations chromatiques de l'autre. Il permet également de réduire de nouveau l'angle d'ouverture des faisceaux qui sont alors proches des conditions de Gauss lorsqu'ils arrivent vers l'oculaire.

De même des corrections sont apportées à l'oculaire, ce dernier étant généralement composé d'un doublet, de focales f_1 et f_2 et séparés par la distance e . On forme alors un achromatisme apparent. Voir Houard p161.

II. Limite de résolution

1. Diffraction

Dans tous les instruments d'optique, la résolution est systématiquement limitée par le phénomène de diffraction. Si la diffraction n'existait pas la résolution serait infinie. Cette limitation provient du fait que chaque point de l'objet ne va pas être représenté par un point image mais par une figure de diffraction, une image est un ensemble de figure de diffraction collés les uns aux autres. Chaque élément constituant une lentille est une source de diffraction. Ceux-ci étant de forme circulaire, chaque tâche de diffraction aura la forme d'une tâche d'Airy, composé d'anneaux dont l'éclairement décroît rapidement à mesure que l'on s'éloigne du cercle, la majorité de l'intensité lumineuse étant concentrée dans la tâche centrale. La tâche centrale possède un rayon angulaire de $1,22 \cdot \frac{\lambda_0}{D}$ avec λ_0 la longueur la plus élevée composant la lumière (du rouge pour la lumière blanche) et D le diamètre de la pupille circulaire.

On applique alors le critère de résolution de Rayleigh pour déterminer la limite de résolution d'un appareil : Le maximum de la tâche de diffraction d'un point image coïncide avec le minimum de diffraction de la tâche de l'autre point image. En dessous on n'a l'impression d'observer une seule et unique tâche.

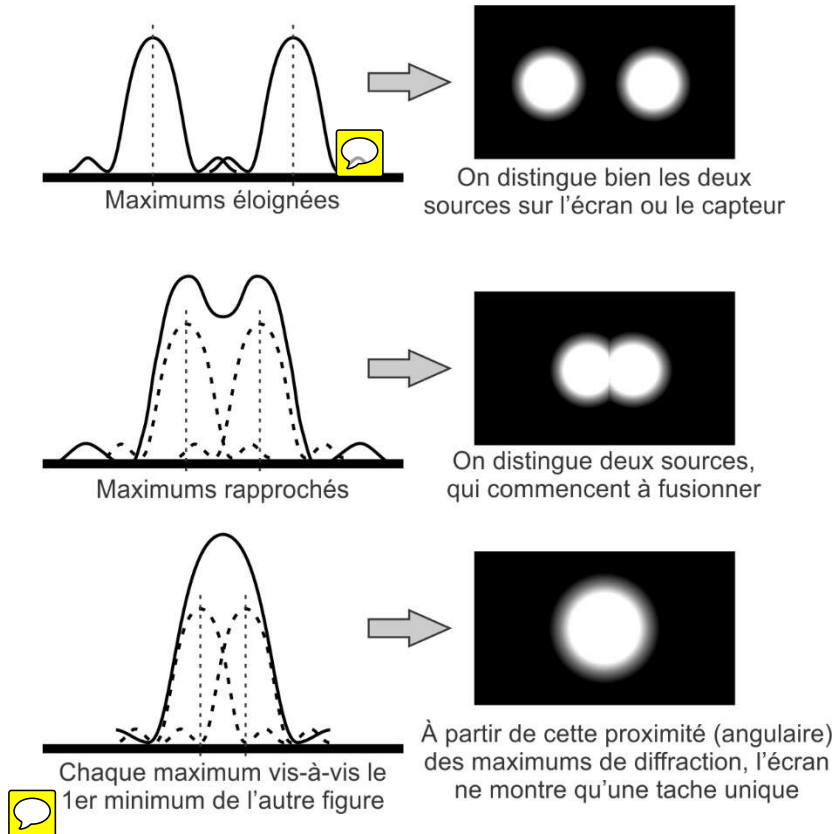


Cela nous amène à une valeur de résolution angulaire $\theta = 1,22 \cdot \frac{\lambda_0}{D}$.

2 objets A et B sont donc observables si $AB > \theta \cdot l$ avec l la distance entre la lentille et le lieu de l'observation, l'œil pour un humain.

Pour un microscope optique possédant une ouverture d'un cm, cela fait une résolution limite de l'ordre du μm . Suffisant pour distinguer la plupart des objets mais pas si l'on veut étudier la matière à l'échelle du nanomètre, comme regarder la rugosité d'un échantillon par exemple.

Il existe néanmoins des appareils qui permettent de repousser cette limite de résolution.



2. Manipulation : Filtrage spatial

Voir *Sextant p 128* Expérience d'Abbe. Le but étant de mettre en évidence le rôle fondamental de la diffraction dans la formation des images, ici la diffraction est faite par un réseau. Lorsque l'on cache les harmoniques avec la fente (qui joue ici le rôle d'un filtre passe-bas) l'image se floute, on enlève de l'information.

Ici il serait légitime de rajouter un paragraphe sur l'oculaire mais on risque de ne pas avoir le temps. L'idée serait de montrer que l'oculaire joue le rôle de DC, mettre une lentille de champ dans le plan de l'image intermédiaire. Constaté l'amélioration et dire que finalement les deux lentilles forment un oculaire composé=doublet. Il existe différentes combinaisons qui permettent de corriger le chromatisme, augmenter le champ et corriger des aberrations

3. Dépasser la limite de diffraction

On ne peut pas s'affranchir de la diffraction mais l'on peut contourner le problème.

Cela a d'ailleurs valu aux découvreurs de ce système le prix Nobel de chimie en 2014

a) La microscopie PALM (PhotoActivated Localization Microscopy)



Essentiellement utilisé pour l'étude de cellule biologique, la microscopie PALM va s'appuyer sur les propriétés fluorescentes de certaines molécules. Elles permettent d'effectuer un marquage sélectif en incluant cette molécule aux cellules que l'on souhaite étudier. Une stimulation de façon très brève ces cellules de manière à ce qu'elles émettent des photons un par un. Le recueillement des photons issus d'une seule molécule par le microscope provoque l'apparition de plusieurs tâches d'Airy très légèrement décalées à chaque fois. En faisant ensuite un traitement statistique des données recueillies, en l'occurrence l'ajustement par une gaussienne, on est capable de remonter à la localisation exacte de la molécule. Cela nous permet d'observer des cellules allant jusqu'à quelques dizaines de nanomètre.

Dans le cas présent ce n'est donc plus de l'observation que l'on effectue mais de la localisation. Cette méthode ne peut s'appliquer que dans des cas particuliers. Il faut connaître à l'avance la cellule d'intérêt pour pouvoir trouver le marqueur biologique permettant de lier la molécule fluorescente à la cellule. L'image recueillie correspond à une carte de probabilité de présence de la cellule. Enfin si plusieurs cellules sont très proches les unes des autres, on ne pourra les distinguer.

Single-Molecule Superresolution Microscopy for Precise Localization

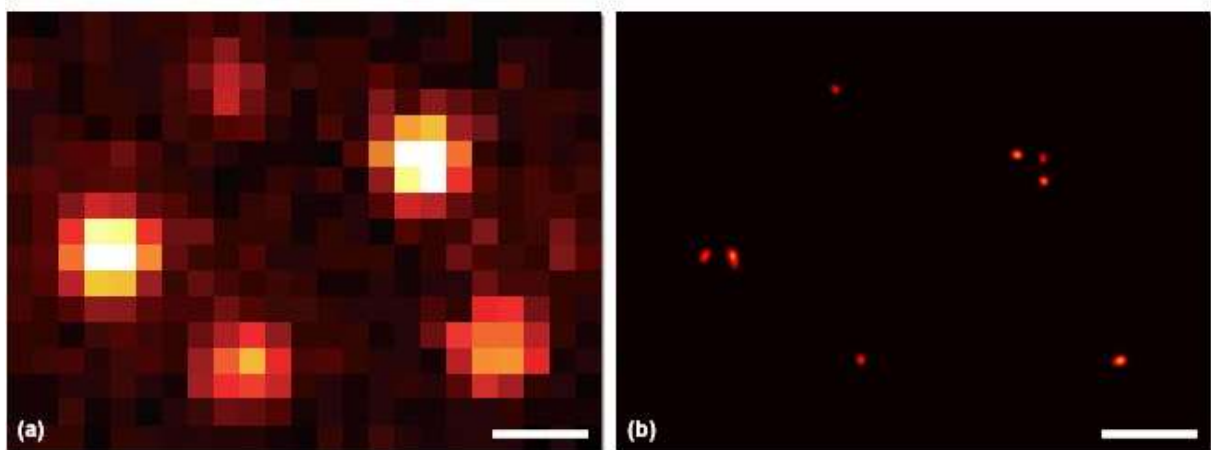


Figure 1

a) probabilité de présences sur la carte

b) Positionnement des centres des protéines étudiées après traitement

b) Microscopie STED (stimulated-emission-depletion)

Voir article Wikipédia

Comme pour le PALM, c'est une technique de localisation utilisant la fluorescence provenant de cellule fluorescente. On l'utilise également pour étudier le vivant.

Ici on va réduire la zone d'intérêt en par une émission stimulée sur la zone de fluorescence dont l'on veut se débarrasser. Il en résulte une zone de fluorescence diminuée sous la limite de résolution.

Conclusion :



Première technique de microscopie inventée, la microscopie optique permet de visualiser des objets μm mais montre ses limites lorsque l'on veut descendre sur des tailles plus petites, à cause de la diffraction. Si certaines techniques dites de localisation permettent de repousser cette limite, il existe d'autres méthodes de microscopie non optique permettant de descendre en-dessous le nm, tel que la microscopie en champs proche qui utilise les ondes évanescentes se propageant dans la matière, , comme le microscope à effet tunnel, ou la microscopie électronique.