

LP16 - Microscopies optiques

Mathieu Sarrat

12 mai 2019

Pré-requis

- Optique géométrique
- Diffraction de Fraunhofer

Introduction

Un instrument d'optique est dispositif conçu pour pallier aux limitations de l'œil. Dans cette leçon on se propose d'appliquer les notions que nous avons vues en optique géométrique pour étudier un instrument d'optique, le microscope.

Un microscope sert à voir de petits objets, difficiles ou impossibles à voir à l'œil nu. Les premiers microscopes ont été conçus au XVI^e siècle : Jansen, Galilée et surtout Hooke, qui dans son ouvrage "Micrographia" a décrit ses observations au sujet des puces ou des cellules végétales.

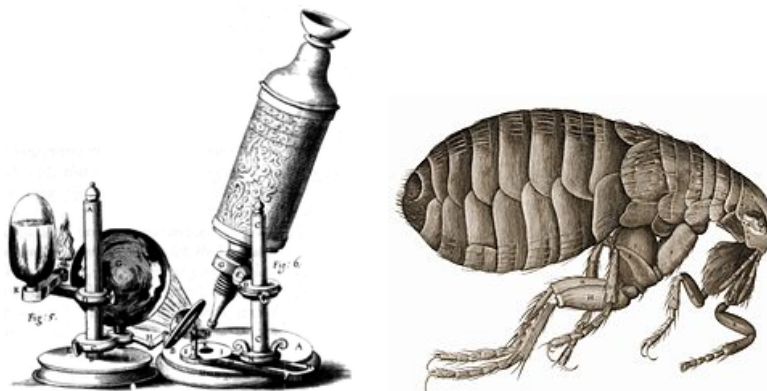


FIGURE 1 – Gauche : microscope de Hooke. Droite : gravure d'une puce.

Hooke avait conçu l'un des premiers microscopes composés, c'est à dire constitué de plus d'une lentille (trois, dans le cas du microscope de Hooke), néanmoins, compte tenu de l'importance des aberrations chromatiques et de la difficulté à les corriger, le microscope de Hooke fut globalement laissé de côté jusqu'à la moitié du XIX^e siècle, au profit du microscope de Van Leeuwenhoek : une seule lentille pour un grossissement allant jusqu'à 500, pour moins d'aberrations.

C'est donc au milieu du XIX^e siècle que les microscopes composés s'imposent, les premiers objectifs achromatiques stigmatiques (Lister) voyant le jour. Ces microscopes sont constitués :

- d'un **objectif**, dont le rôle est de **collecter la lumière de l'objet et d'en faire une image intermédiaire**,
- d'un **oculaire**, dont le rôle est celui d'une **loupe** observant l'image intermédiaire formée par l'objectif.

Le développement de la microscopie optique rend possible de nombreux progrès en biologie, avec notamment la découverte du noyau cellulaire par Brown en 1831, ou encore des bacilles de la lèpre par Hansen en 1874, de la tuberculose par Koch en 1882 et de la peste par Yersin en 1894.

De nos jours, on dispose de microscopes optiques composés très performants (plus d'aberrations) : leur résolution est limitée par le phénomène de diffraction. Le début des années 2000 a marqué un tournant avec le développement massif de techniques d'ultra-microscopies, reposant sur une nouvelle logique (on ne cherche pas à former une image mais plutôt à localiser des objets) permettant de passer outre la limite de résolution imposée par la diffraction.

1 Modèle de microscope composé

Avant de nous intéresser à un système plus réaliste, nous allons d'abord présenter un modèle simplifié de microscope composé pour en comprendre le fonctionnement général. On travaillera dans les conditions de Gauss.

1.1 Constitution

Le modèle de microscope que nous allons caractériser est constitué de deux sous-systèmes :

- l'objectif est constitué d'une lentille mince convergente **indiquer la focale**,
- l'oculaire également (**indiquer la focale**).

Construire le schéma tout en expliquant la conjugaison :

- l'objectif forme l'image réelle A (image intermédiaire) d'un objet réel A_0 ;
- dans les conditions de Gauss, l'image d'un plan est un plan, on peut donc placer le point B, image de B_0 par l'objectif, en utilisant deux rayons, passant par le foyer objet F_1 et par le foyer image F'_1 de l'objectif ;
- on fait coïncider le plan focal objet de l'oculaire avec le plan de l'image intermédiaire AB, par conséquent l'image de AB par l'oculaire est envoyée à l'infini ;
- on trace d'abord les rayons passant par A, puis le rayon (en pointillés) passant par B et le centre de la seconde lentille. On en déduit la direction avec laquelle émergent les autres rayons passant par B.

$$A_0 \xrightarrow{\text{objectif}} A \xrightarrow{\text{oculaire}} A_i \quad (1)$$

L'image finale $A_i B_i$ formée par le microscope est **à l'infini, agrandie et renversée**.

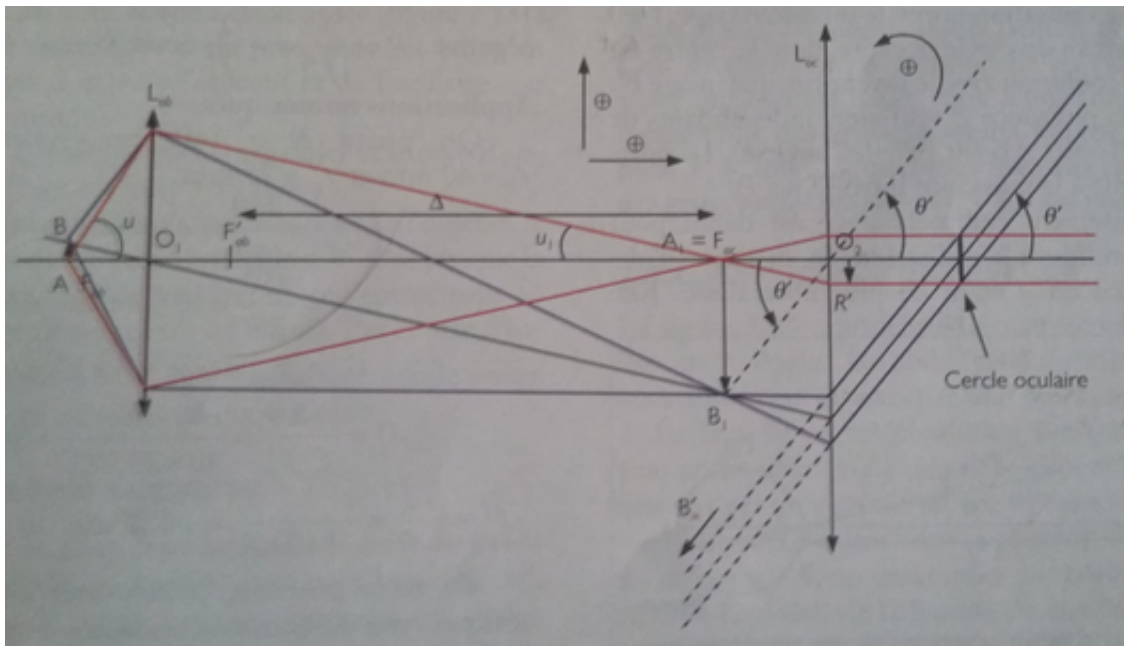


FIGURE 2 – Tracé des rayons dans le microscope, réglé pour un œil emmétrype observant un objet virtuel à l'infini.

On appelle $\Delta = \overline{F'_1 F_2}$ la **longueur optique** du microscope. Cette longueur est fixée, sur un microscope réel, aussi **un microscope est équipé d'une vis micrométrique pour pouvoir faire la mise au point**, c'est à dire placer l'objet à étudier à la bonne distance de l'objectif (celle qui réalise la conjugaison que nous venons de décrire).

On s'intéresse au cas où l'image finale est à l'infini, la mise au point étant faite pour un œil emmétrype (qui voit nettement à l'infini sans besoin d'accommoder).

1.2 Puissance intrinsèque

On définit la puissance P_μ du microscope comme

$$P_\mu \equiv \left| \frac{\theta'}{\overline{A_0 B_0}} \right|. \quad (2)$$

En multipliant et en divisant par \overline{AB} , on peut la relier aux caractéristiques de l'objectif et de l'oculaire :

$$P_\mu \equiv P_{oc} |\gamma_{obj}| \quad (3)$$

avec

— P_{oc} , la **puissance de l'oculaire**

$$P_{oc} \equiv \left| \frac{\theta'}{\overline{AB}} \right| \quad (4)$$

— γ_{obj} , le **grandissement de l'objectif**

$$\gamma_{obj} \equiv \frac{\overline{AB}}{\overline{A_0 B_0}} \quad (5)$$

L'oculaire fait office de loupe, de puissance P_{oc} . Le microscope amplifie la performance de la loupe d'un facteur $|\gamma_{obj}|$.

On parle de **puissance intrinsèque** lorsque l'image finale est rejetée à l'infini ; par ailleurs,

— la trigo de base sur le triangle ABO_2 conduit à

$$\tan \theta' \simeq \theta' = -\frac{\overline{AB}}{f_{oc}}, \quad \text{d'où} \quad \boxed{P_{oc} = \frac{1}{f_{oc}}} \quad (6)$$

— théorème de Thalès avec les deux triangles $O_1 I F'_1$ et $F'_1 A B$

$$\frac{\overline{O_1 I}}{\overline{AB}} = -\frac{f_{obj}}{F'_1 A} \quad \text{or} \quad \overline{O_1 I} = \overline{A_0 B_0} \quad \text{et} \quad \overline{F'_1 A} = \Delta \quad (7)$$

d'où

$$\boxed{\gamma_{obj} = -\frac{\Delta}{f_{obj}}} \quad (8)$$

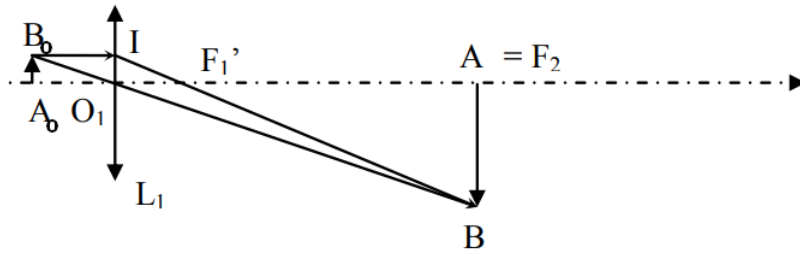


FIGURE 3 – Pour relier le grandissement de l'objectif aux longueurs optique et focale de l'objectif.

On en déduit une expression de la puissance intrinsèque en fonction des caractéristiques techniques du microscope

$$\boxed{P_\mu = \frac{\Delta}{f_{obj} f_{oc}}}. \quad (9)$$

Dans un microscope réel, $\Delta \simeq 160\text{mm}$, fixe. Cette grandeur est bornée : la seule façon de jouer sur la puissance d'un microscope est donc de **réduire les longueurs focales**.

Réduire les longueurs focales implique d'augmenter l'inclinaison des rayons lumineux, et donc des **écarts importants aux conditions de Gauss**, traduits en pratique par des **aberrations**.

1.3 Grossissement commercial

On définit le grossissement comme

$$G \equiv \left| \frac{\theta'}{\theta} \right|, \quad (10)$$

où θ désigne l'angle sous lequel l'objet A_0B_0 est vu à l'œil nu "au plus près", c'est à dire à la plus petite distance possible entre l'œil et un objet pour avoir une vision nette. Cette distance, notée d_m est le **punctum proximum** et vaut 25 cm pour un œil emmétrope. On a la relation suivante

$$\theta \simeq \tan \theta = \frac{\overline{A_0B_0}}{d_m} \quad \text{donc} \quad G = \frac{\theta'}{\overline{A_0B_0}} d_m \quad (11)$$

d'où la relation entre puissance et grossissement :

$$G = P_\mu d_m. \quad (12)$$

On parle de **grossissement commercial** lorsque l'image finale formée par le microscope est rejetée à l'infini.

1.4 Expérimentation du modèle

Profondeur de champ

Pour qu'un œil normal (dit emmétrope) soit capable d'obtenir une image nette, l'image formée par le microscope, et donc l'objet perçu par l'œil, doit se trouver entre deux positions extrêmes :

- le **punctum proximum**, situé à 25 cm,
- le **punctum remotum**, situé à l'infini.

On définit la **profondeur de champ du microscope** (ou sa latitude de mise au point) comme la distance séparant les positions de l'objet A_0 (notées A_m et A_∞ respectivement) pour que l'image formée par le microscope se trouve respectivement au punctum proximum ou au punctum remotum.

Démonstration : donner la démarche et le résultat final pour gagner du temps

- **Cas où l'image formée par l'oculaire est au punctum remotum.** On a $A_0 = A_\infty$. Dans ce cas l'image intermédiaire se forme dans le plan focal objet de l'oculaire, d'où $A = F_2$. D'après la relation de conjugaison de Newton pour l'objectif

$$\overline{F_1A_0} \overline{F_1'A} = -f_{\text{obj}}^2, \quad \text{qui s'écrit alors} \quad \overline{F_1A_\infty} \Delta = -f_{\text{obj}}^2, \quad (13)$$

d'où

$$\overline{F_1A_\infty} = -\frac{f_{\text{obj}}^2}{\Delta}. \quad (14)$$

- **Cas où l'image formée par le microscope est au punctum proximum.** On a $A_0 = A_m$. On utilise les relations de Newton pour l'objectif

$$\overline{F_1A_m} \overline{F_1'A} = -f_{\text{obj}}^2 \quad \text{et pour l'oculaire} \quad \overline{F_2A} \overline{F_2'A_d} = -f_{\text{oc}}^2, \quad \text{or} \quad \overline{F_2'A_d} = -d_m \quad (15)$$

d'où

$$\overline{F_1A_m} = -\frac{f_{\text{obj}}^2}{\overline{F_1'A}} = -\frac{f_{\text{obj}}^2}{\underbrace{\overline{F_1'A} + \overline{AF_2} - \overline{AF_2}}_{=\Delta}} = -\frac{f_{\text{obj}}^2}{\Delta + \frac{f_{\text{oc}}^2}{d_m}} \quad (16)$$

On en déduit la profondeur de champ

$$L = \overline{A_\infty A_m} = \overline{F_1A_m} - \overline{F_1A_\infty} = \frac{f_{\text{obj}}^2 f_{\text{oc}}^2}{\Delta^2 d_m \left(1 + \frac{f_{\text{oc}}^2}{d_m \Delta}\right)} \quad \text{en réarrangeant les termes.} \quad (17)$$

Application numérique : pour une longueur optique de 160 mm, un objectif de focale $f_{\text{obj}} = 8.0\text{mm}$ et un oculaire de focale $f_{\text{oc}} = 25\text{mm}$, on trouve une profondeur de champ d'environ 6 micromètres, d'où la vis **micrométrique** du microscope.

Si on veut augmenter la puissance du microscope sans toucher à l'oculaire, on doit augmenter le grandissement transversal de l'objectif, ce qui implique de réduire sa longueur focale f_{obj} et donc sa profondeur de champ (en f_{obj}^2). Plus un microscope sera puissant, plus la mise au point sera difficile.

Formation d'une image sur la rétine

On va se placer dans la configuration où l'œil n'a pas à accommoder : l'image formée par le microscope est à l'infini, et se comporte comme un objet à l'infini pour l'œil. L'image finale va se former dans le plan focal image de la lentille que nous allons utiliser pour modéliser le cristallin. On place un écran dans ce plan.

MANIP : Monter l'œil par auto-collimation pour régler l'espacement entre écran et cristallin tout en expliquant le principe,

$$A \in \mathcal{F}_o \xrightarrow{L_3} \infty \xrightarrow{M} \infty \xrightarrow{L_3} A' \in \mathcal{F}_i \quad (18)$$

donc $A' \in \mathcal{F}_o$ par symétrie. Bloquer la position relative des deux pieds (barre horizontale) et placer l'œil sur le banc optique.

Mesures des caractéristiques du microscope

Référence : Optique, Sylvain Houard, pages 165 à 167

Une fois l'œil placé, on observe une image $A_d B_d$ sur la rétine :

$$\overline{A_d B_d} = -f_{\text{œil}} \theta' = -f_{\text{œil}} P_\mu \overline{A_0 B_0} \quad \text{et} \quad |\gamma_d| = \left| \frac{\overline{A_d B_d}}{\overline{A_0 B_0}} \right| = \frac{f_{\text{œil}} \Delta}{f_1 f_2} \quad (19)$$

- Grandissement transversal de l'objectif
- Puissance de l'oculaire
- Puissance intrinsèque
- Ouverture numérique
- Profondeur de champ (facultatif)

2 Limite de résolution

On appelle **résolution** la taille du plus petit détail observable de l'objet étudié. Pendant longtemps, les aberrations chromatiques (liées au caractère dispersif du verre) et géométriques (écarts à l'optique dite de Gauss) ont limité la résolution d'un microscope. Nous allons nous intéresser maintenant à un objectif et à un oculaire plus réalistes, conçus pour s'affranchir autant que possible des aberrations.

2.1 Objectif réel

L'objectif est la **pièce majeure du microscope**. C'est lui qui révèle les détails de l'image microscopique avec toutes ses qualités mais aussi ses imperfections. L'image fournie par les premiers objectifs composés était entachée de nombreux défauts si bien que pendant longtemps on leur préféra les microscopes simples.

Il existe des objectifs dits **à sec**, utilisés directement dans l'air, et des **objectifs à immersion**, qui permettent d'obtenir des grossissements plus importants mais à condition de mettre leur face avant dans un liquide (huile, glycérine) de même indice que la première lentille de l'objectif.

Ouverture numérique

La caractéristique la plus importante d'un objectif est son **ouverture numérique**, car nous verrons qu'elle conditionne son pouvoir de résolution. On la définit comme

$$\omega_0 = n_0 \sin u_0 \quad (20)$$

où n_0 est l'indice du milieu objet ($= 1$ pour un objectif à sec) et u_0 le demi-angle d'ouverture du faisceau incident sur l'objectif. **Schéma.**

Sa valeur numérique, propre à chaque objectif, est indiquée sur la monture de l'objectif (ex : 0.08, 0.22, 0.65). Un objectif à sec d'ouverture numérique de 0.65 laisse passer des rayons formant un angle d'environ 40° au plus.

Une telle inclinaison est bien évidemment **incompatible avec les conditions de Gauss**, or un bon objectif doit satisfaire deux conditions : être rigoureusement stigmatique et être achromatique.

Stigmatisme rigoureux et achromatisme

Un objectif réel est donc un système bien plus complexe qu'une simple lentille convergente comme dans le modèle précédent. Son fonctionnement repose sur une optique non paraxiale, c'est à dire qui ne respecte pas les conditions de Gauss. Un objectif réel est constitué :

- d'une **lentille boule** : c'est un dioptre air verre sphérique, caractérisé par un couple de points rigoureusement stigmatiques, appelés **points de Weierstrass** et notés W et W' . La lentille boule est souvent coupée et le morceau retiré remplacé par une couche d'huile d'indice optique égal à celui du verre de la lentille.
- d'un ou plusieurs **ménisques d'Amici**, chargés de rabattre les rayons vers l'axe optique et donc de réduire leur inclinaison par rapport à cet axe.
- d'un ou deux **doubles achromatiques de Lister**, qui rabattent eux aussi les rayons vers l'axe optique, leur conférant une inclinaison compatible avec l'optique de Gauss.

Les doublets de Lister sont constitués d'une lentille convergente et d'une lentille divergence, dont les verres et la courbure sont choisis pour **supprimer l'aberration chromatique**.

Ce système permet d'utiliser des ouvertures numériques plus importantes que si l'objectif n'était constitué que d'une seule lentille convergente.

2.2 Oculaire réel

L'oculaire joue le rôle d'une loupe grossissant l'image intermédiaire. Un oculaire classique est constitué d'un double de lentilles non accolées :

- un **verre d'œil**, situé du côté de l'œil
- un **verre de champ**, situé du côté de l'objectif.

Le fait d'utiliser un doublet permet de **corriger l'achromatisme d'une lentille simple**. Le verre de champ a, de plus, une autre utilité, celui d'**élargir le champ de vision**.

Diaphragme de champ [Manip du verre de champ]

L'oculaire ne prélève qu'une partie de l'image, il joue le rôle de **diaphragme de champ**, en bloquant une partie des rayons lumineux : ceux qui partent de la périphérie de l'objet observé.

Pour élargir le champ de l'instrument, on peut ajouter une **lentille auxiliaire**, appelée **verre de champ** dans le plan de l'image intermédiaire, ce qui ne **change pas la conjugaison** mais qui a pour effet de **rabattre les rayons vers l'axe optique**. On va donc élargir le champ observable [MANIP : faire la manip en direct].

Cercle oculaire [Tracé au tableau]

Une question se pose : où placer l'œil pour recevoir un maximum de lumière ? Il nous faut pour cela déterminer la position de la **pupille de sortie**, également appelée **cercle oculaire**, **image du diaphragme d'ouverture** par l'oculaire [Faire le tracé].

Toute la lumière entrant par le diaphragme d'ouverture va donc ressortir par le cercle oculaire. L'introduction d'un verre de champ a tendance à rapprocher la pupille de sortie de la lentille de l'oculaire : on pratique, on doit mettre l'œil au plus près de l'oculaire.

2.3 Limite de résolution par diffraction

Lorsqu'il n'y a plus d'aberrations (géométriques ou chromatiques), **c'est la diffraction qui impose une limite à la résolution**.

Si on se place dans l'approximation de Fraunhofer ($R^2/(\lambda D) \ll 1$ où D est la distance d'observation entre l'objet diffractant et l'image), **la figure de diffraction est une tâche d'Airy qui se forme autour de l'image géométrique**. Le calcul est nettement plus compliqué que dans le cas d'une ouverture rectangulaire car il fait intervenir les fonctions de Bessel. La première annulation de l'éclairement liée à la diffraction se trouve en

$$r_0 \simeq 0.61 \frac{\lambda}{u_1} \simeq 0.61 \frac{\lambda_0}{n_1 \sin u_1}. \quad (21)$$

avec $\tan u_1 \simeq R/D$.

En appliquant la relation d'Abbe entre le **plan de l'objet** et le **plan de l'image intermédiaire**,

$$n_0 \overline{A_0 B_0} \sin u_0 = n \overline{AB} \sin u, \quad (22)$$

on remonte à la taille minimale $A_0 B_{0,min}$ décelable pour un objet $A_0 B_0$:

$$\overline{A_0 B_{0,min}} = \frac{n \overline{AB_{min}} \sin u}{n_0 \sin u_0} = 0.61 \frac{\lambda_0}{\omega_0} \quad (23)$$

Plus l'ouverture numérique est grande, plus la résolution est fine, et c'est pour cela que nous avons lourdement insisté sur l'importance de l'ouverture numérique de l'objectif.

Pour abaisser au maximum cette limite de résolution, on travaille en UV ($\lambda_0 \simeq 400\text{nm}$) avec un objectif à immersion ($n_0 = 1.50$) d'ouverture numérique $\omega_0 = 1.25$, ce qui conduit à une résolution ultime d'environ 200 nm.

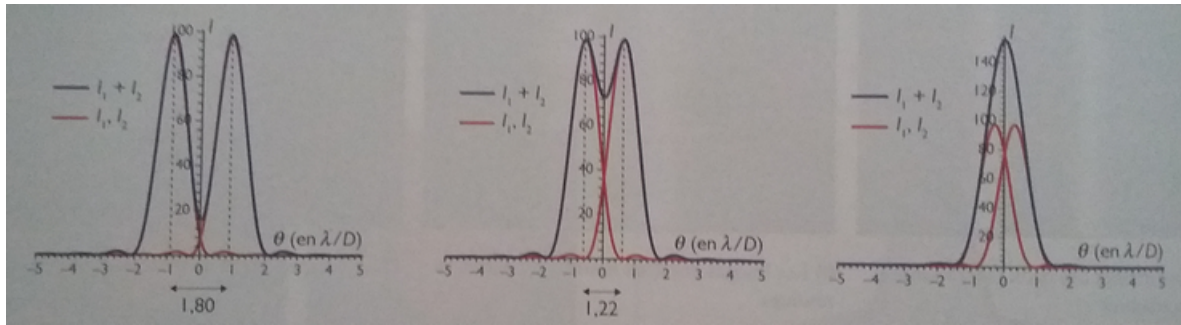


FIGURE 4 – Critère de Rayleigh, θ désigne l'angle sous lequel on voit un objet. Deux tâches d'Airy sont centrées autour des angles correspondant aux deux objets que l'on souhaite résoudre. Gauche : $\Delta\theta > 1.22\lambda/D$. Droite : $\Delta\theta < 1.22\lambda/D$. Centre : cas limite, donnant le critère de Rayleigh. Rouge : éclairement de chaque tâche de diffraction. Violet, éclairement total observé.

3 Battre la limite de diffraction

Il faut donc changer d'approche si on souhaite résoudre des détails plus fins que quelques centaines de nanomètres. S'il n'est pas possible d'obtenir une image fidèle (c'est à dire des points) de deux points situés à moins de 200 nm l'un de l'autre du fait de la diffraction, il reste possible de **pointer le centre de leur tâche de diffraction**.

Il ne s'agit plus alors de former une image des objets émettant la lumière mais plutôt de les localiser. Ce changement d'approche est à l'origine d'une révolution en microscopie optique depuis le début du siècle, source de plusieurs prix Nobel. Nous allons présenter une technique moderne de microscopie de fluorescence à haute-résolution, la microscopie PALM/STORM.

Microscopie optique de fluorescence

La fluorescence est l'émission de lumière par une molécule **fluorochrome**, immédiatement après son excitation lumineuse, en général à une longueur d'onde plus grande (le déplacement de Stokes désigne cet écart de longueur d'onde). Le photon émis par fluorescence a une énergie plus faible que le photon absorbé). La différence d'énergie a été évacuée, par exemple sous forme de phonon lors d'une transition entre deux niveaux de vibration de la molécule.

•

Les photons émis lors de l'émission de fluorescence n'ont pas de direction privilégiée. Il s'agit donc de choisir un objectif de grande ouverture numérique pour collecter un maximum de lumière. De plus, toutes les molécules ne sont pas fluorescentes. Il existe plusieurs techniques de marquage pour contourner ce problème. On observe les molécules d'intérêt indirectement, en repérant la fluorescence des marqueurs chromophores.

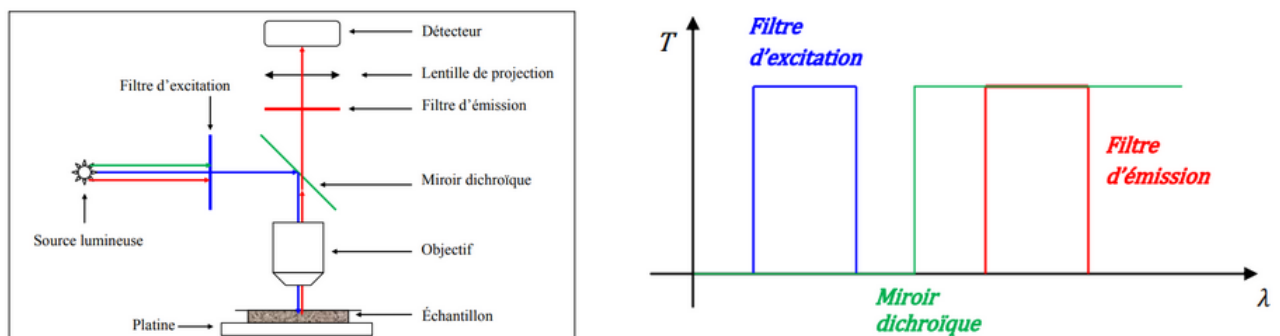


FIGURE 5 – Schéma de principe d'un microscope de fluorescence : gauche, le microscope ; droite, la transmittance des filtres et du miroir dichroïque.

Par rapport à un microscope optique classique, on trouve des éléments supplémentaires :

- un filtre d'excitation, qui sélectionne la longueur d'onde excitatrice des fluorophores de l'échantillon observé et bloquant les longueurs d'ondes indésirables ;
- un filtre d'émission placé dqui laisse passer les longueurs d'ondes émises par fluorescence ;
- un miroir dichroïque, qui réfléchit la lumière excitatrice et qui transmet la lumière émise par fluorescence.

L'oculaire est remplacé par une lentille de projection formant une image finale sur un détecteur, type barette CCD. Les tâches de diffraction se forment donc sur les pixels de la barette, ce qui permet de former une image. Comme la microscopie optique classique, la résolution maximale de la microscopie de fluorescence est limitée par la diffraction.

Remarque : fluorescence et phosphorescence désignent deux cas de luminescence. La phosphorescence perdure plus longtemps que la fluorescence.

Microscopie PALM

La technique PALM (microscopie par localisation photoactivée), proposée en 2006 par l'équipe d'Eric Betzig (Nobel de chimie en 2014), est une technique de microscopie de fluorescence permettant de former des images d'une **résolution meilleure que la limite de la diffraction**. C'est en cela qu'on parle de **microscopie optique de "haute" résolution**.

Si on peut observer quelques molécules individuelles, on peut déterminer leur position avec une précision de quelques nanomètres en enregistrant tous les photons qu'elles émettent. Pour faire une image haute résolution il faut donc marquer des molécules, faire un petit flash UV qui n'en excitera qu'un faible nombre, de récupérer la lumière émise par fluorescence et de **calculer la position du centre de chaque tâche de diffraction (centroïde)**. On répète ce processus un très grand nombre de fois en superposant à chaque fois les images obtenues.

Cette technique permet d'atteindre une résolution de 50 à 20 nm, soit 4 à 10 fois meilleure que la résolution prédite par le critère de Rayleigh.

Il existe d'autres techniques de microscopies optiques à haute-résolution : elles font l'objet de travaux de recherche fructueux en ce début de XXI^{ème} siècle.

Conclusion

Dans cette leçon nous avons détaillé le fonctionnement d'un microscope optique classique en nous appuyant sur l'optique géométrique. La résolution d'un tel dispositif est limitée par un effet intrinsèquement ondulatoire, la diffraction. Le critère de Rayleigh prédit une limite de résolution optique de 200 nm environ.

De nos jours, on développe des techniques de microscopie optique de haute résolution dont le principe repose sur un changement d'approche : **on ne cherche plus à former une image** au sens géométrique du terme, on repère le centre des tâches de diffraction **pour localiser des objets**.

Il existe enfin d'autres techniques de microscopie, exploitant d'autres types de rayonnements ou d'autres effets physiques. C'est le cas de la microscopie électronique (on exploite le comportement ondulatoire des électrons, dont la longueur d'onde est bien plus petite que celle du domaine visible) ou de la microscopie à effet tunnel.

Annexes

Microscope en réglage quelconque

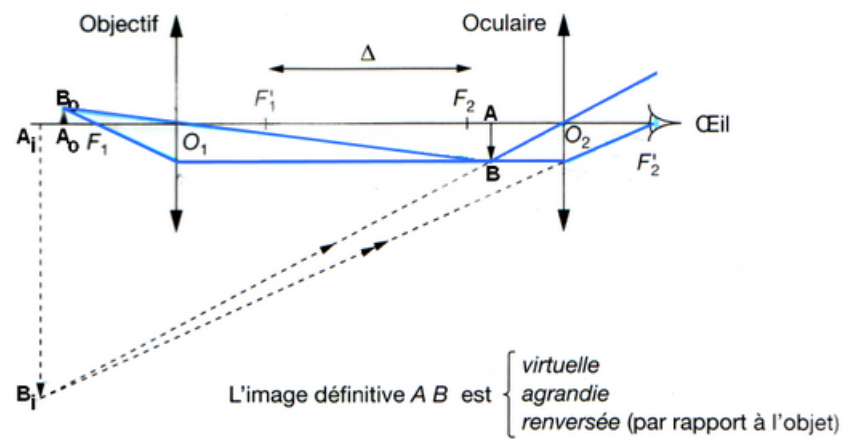


FIGURE 6 – Tracé des rayons dans le microscope, dans le cas général.