

LP32-Microscopies Optiques

Pierre Ghesquiere

Références :

Introduction :

Prérequis :

Optique géométrique, interférences.

I- Description du Microscope

A- Deux systèmes de lentilles :

-**L'objectif** : 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 A1B1. L'objectif contrôle la quantité de lumière (d'énergie) qui rentre dans le système.

-**L'oculaire** a pour fonction de former une image virtuelle A'B' se formant à l'infini afin que l'œil n'ait pas besoin d'accommoder lorsqu'il regarde par l'oculaire (L'oculaire agit donc comme une loupe). Cette image A'B' est caractérisée par sa taille angulaire. Cela nécessite de placer l'oculaire de telle manière que A1B1 se forme au niveau du foyer objet de l'oculaire. Pour obtenir un fort grossissement, l'oculaire doit être de courte focale.

Schéma avec les deux systèmes optiques focaux centrés.]

B- Grandeur caractéristique du microscope : Puissance et grossissement commercial

Comme on envoie l'image à l'infini, la donnée pertinente pour caractériser l'image virtuelle est l'angle sous lequel on voit l'objet. Pour caractériser l'objet, on a sa taille On définit ainsi :

- La puissance du microscope $P = \frac{\alpha}{AB}$

Cette grandeur est l'inverse d'une longueur et est difficilement interprétable. On préfère utiliser un second paramètre caractéristique du microscope :

- Son **grossissement commercial** définit par le rapport entre l'angle sous lequel nous apparaît l'objet après avoir traversé le microscope et l'angle α_{pp} sous lequel nous apparaît l'objet quand on le met le plus près possible de l'œil pour le voir (ponctum proximum. Valeur nominale : $d = 25cm$). $Gc = \frac{\alpha'}{\alpha_{pp}}$.

Pour exprimer ces paramètres, les lois de l'optique géométrique paraxiale ne sont pas applicables car les conditions de Gauss ne sont pas respectées. Les angles sont bien trop importants et des aberrations apparaissent.

C- Correction des aberrations

Dans le microscope réel on a souvent des ouvertures importantes. On sort des conditions de Gauss¹ donc aberrations chromatiques + géométriques. => systèmes épais constitués de plusieurs lentilles.

Présenter les différents types d'aberrations et éventuellement la manière de les corriger.

Aberration Chromatique (p97 Perez si temps...):

¹ Conditions de Gauss : les rayons lumineux issus de l'objet et traversant la lentille sont paraxiaux, c'est-à-dire peu inclinés par rapport à l'axe optique (angles inférieurs à une dizaine de degrés) et de points d'impact sur les dioptries de la lentille peu éloignés de l'axe optique (distances faibles devant les rayons de courbure des dioptries)

Une lentille mince constituée d'un verre dispersif (indice optique fonction de la longueur d'onde) possède une distance focale elle-même fonction de la longueur d'onde. Il en résulte que la mise au point ne peut pas être effectuée simultanément pour toutes les longueurs d'onde du spectre incident ; c'est le phénomène d'aberration chromatique générant une image floue aux contours irisés. Chaque doublet doit associer deux lentilles de vergences différentes (une lentille convergente et une divergente) taillées dans des verres de propriétés dispersives opposées (une lentille convergente en verre peu dispersif de type crown, associée à une lentille divergente en verre plus dispersif de type flint).

Aberrations principales géométriques ; sphérique (liée à l'ouverture du faisceau et responsable de la perte de stigmatisme), coma (liée à la largeur du champ et responsable de la perte d'aplanétisme) distorsion astigmatisme...

Pour pallier les problèmes d'aberrations, des systèmes de lentilles complexes constitués de doublets et de ménisques sont nécessaires (si temps, regarder les sujet 2015 pour le doublet d'Amici avec les points de Weierstrass).

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. On passe d'une phase descriptive du microscope réel à une phase explicative plus quantitative d'un modèle.

II- Modèle du microscope optique

A- Calcul de la puissance et du grossissement commercial

On est désormais capable de calculer la puissance et le grossissement commercial à partir des lois de l'optique géométrique dans l'approximation paraxiale :

Calcul (cf. pdf joint ou sujet 2015 Q6-7-8-10).

On trouve : $P = \frac{\Delta}{f_1' f_2'}$ et $G_c = Pd$ (d étant la distance du ponctum proximum)

Pour un microscope standard (si possible prendre les valeurs du microscope sur la paillasse, sinon, les valeurs du Houard p156)

B- Diaphragme d'ouverture et de champ

Nous avons considéré un système bien réglé. Si j'éteins la lumière, je ne vois rien. Il faut transporter de l'énergie d'un bout à l'autre du système. Par où rentre l'énergie ? Par l'objectif. L'objectif constitue le diaphragme d'ouverture. On peut faire un schéma (reprendre la correction de l'épreuve 2015 (fin du poly pour le schéma !)) Pour constater que la limitation des rayons en provenance de A se fait au niveau de la lentille objectif. L'image de l'objectif par le second système permet de définir la pupille de sortie. Tous les rayons passant par l'oculaire, passent par la pupille de sortie. C'est ici que l'on doit placer son œil d'où le nom de cercle oculaire.

Parler aussi du diaphragme de champ.

Faire manip avec diaphragme pour illustrer.

Transition : L'optique géométrique n'est qu'une approximation de l'optique ondulatoire. La diffraction entraîne une limitation de la résolution du microscope.

III- Limitation de la résolution

La limite de résolution a été traitée par 3 méthodes différentes dans le pdf d'annexe (Resolution.pdf) (méthode dans l'espace des X, dans l'espace des fréquences, grâce au principe d'indétermination de Heisenberg)

IV- Comment contourner la limite de résolution par diffraction : Microscopie PALM/STORM Photo-Activated Localization Microscopy

On ne fait plus une image, on localise les émetteurs. On va accrocher des émetteurs protéines fluorescentes sur des molécules d'intérêt.

PALM : La microscopie de fluorescence repose sur un marquage sélectif de l'échantillon avec une molécule fluorescente, par exemple liée par anticorps en immunohistochimie ou en utilisant une protéine génétiquement incluse au gène d'intérêt. Le contraste augmente avec la densité de fluorophores, mais un fluorophore unique peut quand même être vu à l'aide d'un microscope, voire à l'œil nu si le nombre de photons émis est suffisant et le fond assez sombre. Cependant, la résolution d'un microscope est fixée par la capacité à séparer deux points lumineux. Or l'image d'un point lumineux n'est pas ponctuelle, à cause de la diffraction, mais une tache d'Airy. La résolution est alors limitée par le critère de Rayleigh.

Des émetteurs multiples proches sont indistinguables, mais la position d'un point source peut être retrouvée si cet émetteur est isolé.

L'idée de la microscopie PALM est de remplacer ce critère de séparation par un critère de localisation de source unique. La résolution au sens strict est donc remplacée par la localisation. Il s'agit alors de contrôler la fluorescence de molécules uniques, par stimulations courtes. Les molécules émettant de la lumière une par une, il est possible de séparer les photons venant de chaque émetteur. Lors d'un processus d'imagerie PALM, on enregistre pour traitement environ 10000 images contenant les taches d'Airy résultant de l'observation des émetteurs par le microscope. La localisation exacte de la position est alors réalisée par l'ajustement d'une fonction gaussienne en deux dimensions du profil d'émission.

Conclusion

Réponse à la question :

- les instruments d'optique pallient les limitations de l'œil
- microscope pour objets réels petits constitués de 2 blocs complexes pour corriger les aberrations
- un modèle à base de lentilles minces nous a permis d'appliquer les lois de l'OG pour en comprendre le fonctionnement et les caractéristiques.
- on a en particulier détaillé le rôle de l'objectif qui conditionne la luminosité mais aussi la résolution limitée par diffraction
- cette limite qui semblait indépassable a récemment été contournée en changeant de paradigme : méthodes non linéaires permettant de localiser les émetteurs et non plus de les imager directement.

Ouvrir sur le microscope à effet Tunnel