

Niveau : licence

Prérequis : optique géométrique, diffraction (critère de Rayleigh, optique de Fourier)

Intro : qu'est-ce qu'un microscope : un appareil, pour voir en macro un truc micro

16^{ème} siècle pour avoir le 1^{er} microscope composé.

Idée général : agrandir une image pour voir ces détails : bon grossissement, fidèle et ...

I. Principe général du microscope

1. Dispositif

Exp : présente la manip et les différents objets du montage + faire l'image de l'objet par le microscope.

Change objectif ; change grossissement

Change la netteté sur l'oculaire.

- Objectif : transforme un objet AB en une image A1B1 entre Obj et Oc, intermédiaire, agrandie et inversée.
PWP : lentille de courte focale pres du foyer

- Oculaire permet l'observation A1B1 donne une image à l'infini, on a $A1 = F2$

Grossissement commercial, objet de taille $d = AB$, θ en sortie du microscope, θ_m = angle de vision de l'objet au PP = d/d_m avec $d_m = 25 \text{ cm}$ donc $G = \frac{\theta}{\theta_m}$.

Exp : Mesure le grossissement du microscope, on la compare avec la valeur théorique :

$\theta = \frac{A_1 B_1}{f_2}$ et $\frac{A_1 B_1}{AB}$ avec le théorème de Thalès. Relation de Newton sur L1 (objectif) : on trouve les deux angles θ et on abouti à $G_{com,mic} = |\gamma_{ob}| * G_{c,oc}$.

Transition : pourquoi on ne fait pas des microscopes de grossissement infini ? → Limites

2. Limites du microscope (17 min)

Limite de résolution : distance minimale entre deux points A et B telles que leurs images par le microscope soient séparées. → Due à la diffraction par l'objectif qui est de taille très petite. Comment quantifier cette diffraction ?

Critère de Rayleigh : $AB_{Min} = \frac{0.61\lambda}{n \sin(u)} = \frac{0.61\lambda}{\omega_0}$, avec ω_0 l'ouverture numérique.

odG : $\omega_0 = 0.10$ donc $AB_{Min} = 4 \mu m$ → pas suffisant pour étudier le vivant.

Il faut changer l'indice optique : les objectifs à immersion $n_{liq} = 1.5$ **PWP**

Aberration des lentilles :

- Objectif : succession de dioptries pour diminuer u
- Oculaire : verre de champ et verre d'œil (aberrations chromatiques)

Transition : Comment faire quand on a des objets non colorés mais avec du contraste ?

II. Microscopie par contraste de phase

Objet de phase : déphase les rayons

Sans objet : $s_0 = V_0 \exp(i\omega t)$

Ajout d'un objet : $s = s_0 \exp(i\phi)$

$I = s^2 = I_0$

Si ϕ est petit devant 1, on simplifie $s = s_0 + i s_0 \phi$. C'est le deuxième terme qui contient l'information, on ne veut pas du premier : le couper

Strioscopie : on coupe s_0 , $I = I_0 \phi^2$ mais comme $\phi < 1$ on a $\phi^2 \ll 1$, donc difficile de distinguer ce changement de phase

Contraste de phase : retarder s_0 de $-\pi/2$

$s = s_0 \exp\left(-\frac{i\pi}{2}\right) + i s_0 \phi$; $I = I_0(1 - 2\phi)$, le contraste $c = 2\phi$

L'image qu'on observe à l'écran a un contraste proportionnel à la phase.

PWP schéma avec ces deux techniques : fraunhofer + masque ou lame à retard dans le plan de Fourier.

PWP exemple entre deux image : avec et sans ces technique
C'est top car non destructive : prix Nobel

On peut faire autrement : pour étudier les mouvements des particules, cellules...

III. Microscopie confocale laser à fluorescence

- Fluorescence : fluorophores dans l'échantillon
- Confocale laser : image point par point

Vidéo du principe : on aura seulement l'image créé par les fluorophore et non la lumière incidente.

Vidéo de la mitose d'une cellule : plus de destruction de l'échantillon, suivre l'évolution et en plus avec chaque couleur on sait qui est qui.

En général on met MCLF (les faire réémettre de la lumière) + contraste de phase ensemble (suivre les chlorophores)

Conclusion : récap + limites + nouvelles techniques : microscopies non optiques

Questions :

- Lentille unique = microscope ? ça dépend de la définition (sinon c'est une loupe)
- Microscope moderne ? image à l'infini en intermédiaire pour pouvoir rajouter des optiques
- Autres microscopies qui ne sont pas optiques ?
- Est-ce que effet tunnel forcément non optique ? non : champ proche
- Eclairage du microscope : Köhler ou éclairage inversé (si objet optique)
- Différence objectif/ oculaire
- Comment sont faites les lentilles ? dioptre sphérique aux points de Weierstrass + ... succession de dioptre
- Lien entre u_{sortie} et $u_{\text{entrée}}$: relation des sinus d'Abbe
- Importance au niveau du premier dioptre : si on arrive avec un petit u c'est bon
- Pourquoi aberrations chromatique que sur oculaire ? les deux ont des aberrations mais on ne les corrige pas de la même manière. Pour les chromatique : mettre une deuxième lentille qui renvoi les rayons parallèles peu importe la couleur.
- Pourquoi focale objectif courte ? pour réduire taille microscopique, limite des tailles de focale ?
- Limite de résolution : images séparées ? max de l'une = min de l'autre
- Profondeur de champ ? lien avec ouverture numérique ?
- Limite ? = zéro de la fonction de Bessel
- Pourquoi on prend λ_{max} ? pour avoir la moins bonne résolution
- Pourquoi on prend un liquide avec $n = 1.5$? 1.5 car indice proche du verre pour plus de réfraction au niveau des verres
- et comment ça marche ? Goutte sur objectif.
- Delta du microscope ? intervalle optique
- Approximation pour les calculs ? Conditions de gauss
- Prix nobel ? Zernike
- Fluorescence ?
- Inconvénient d'un microscope confocal : il faut décaler l'objectif à chaque fois. Avantage : laser c'est super cohérent ; il n'y a que la diffraction qui limite alors que le microscope classique, on a une perte de cohérence spatiale.
- Meilleure résolution des microscopes : optique : 50 nm et non optique : $\lambda_{\text{debroglie}}$ des électrons (inconvenient : il faut être très proche).

Ne pas dire grossissement au début pour dire que le microscope agrandit l'image

Critère de Rayleigh plus pertinent maintenant

Faire des schémas

Donner la formule pour le calcul du grossissement

Diaphragme ouverture limite tjrs la diffraction par l'objectif

Aberrations pas passer trop de temps mais en même temps notion compliqué

Attention la strioscopie et le contraste de phases n'améliorent pas la résolution mais le contraste.

Microscope classique = à champ clair