LP 32 – Microscopies optiques

Niveau : licence

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

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

16ème siècle pour avoir le 1èr microscope composé.

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

1. Principe général du microscope
2. 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, en sortie du microscope, = angle de vision de l’objet au PP = d/dm avec dm = 25 cm donc .

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

et avec le théorème de thalès. Relation de Newton sur L1 (objectif) : on trouve les deux angles theta et on abouti à .

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

1. 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 : , avec l’ouverture numérique.

odG : 🡪 pas suffisant pour étudier le vivant.

Il faut changer l’indice optique : les objectifs à immersion **PWP**

Aberration des lentilles :

* Objectif : succession de dioptres 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 ?

1. Microscopie par contraste de phase

Objet de phase : déphase les rayons

Sans objet :

Ajout d’un objet :

I = s² =I0

Si phi est petit devant 1, on simplifie. C’est le deuxième terme qui contient l’information, on ne veut pas du premier : le couper

Strioscopie : on coupe s0, I = I0phi² mais comme phi<1 on a phi²<<<1, donc difficile de distinguer ce changement de phase

Contraste de phase : retarder s0 de –pi/2

 ; , le contraste

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…

1. 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’éviolution et en olus 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 clorophores)

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

Questions :

* Lentille unique = microscope ? ca depend 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 forcement non optique ? non : champ proche
* Eclairage du microscope : Khöler ou eclairage 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\_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 lambda\_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\_debroglie des électrons (inconvénient : 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