

LP n°32 Titre : Microscopies optiques

Présentée par : Rémy Armand

Rapport écrit par : Théo Cartier dit Moulin

Correcteur : Agnès Maitre

Date : 27 Novembre 2018

Bibliographie de la leçon :

Titre	Auteurs	Éditeur	Année
Optique	Houard		
La microscopie optique moderne	Gérard Wastiaux		
Cours microscopie Maxime Dahan (internet)			
MicroscopyU (site internet)			

Plan détaillé

Niveau choisi pour la leçon : L3

Pré-requis :

Optique géométrique
Polarisation de la Lumière
Diffraction, filtrage spatial
Critère de Rayleigh
Quantification de l'énergie
Lame quart d'onde

I Observer l'inertie
II Observer le transparent
III Observer le vivant en mouvement
IV Quelques limites techniques

Introduction : Différents objets ont besoin de différentes méthodes microscopiques. On fera Roche, plante, poisson, commençons par microscope classique pour cellules végétales. **1Min30**

I Observer l'inerte

1) Microscope à champ clair

Schéma objet + lentille (objectif) + image intermédiaire située au point focale de deuxième lentille (oculaire) + Faisceaux parallèles en sortie.

2) Grossissement commercial

Besoin du grandissement de l'objectif $\Gamma (=G)$ objet = objet intermédiaire/objet

α' : angle d'émergence = objet intermédiaire / focale2 (oculaire)

Grossissement oculaire et punctum proximum ($=d_m$) = $d_m / \text{focale2 (oculaire)}$

Grossissement commercial microscope = Grossissement oculaire x grandissement

Image de cellules végétales obtenue par microscope. Possible de regarder la polarisation qui aide à avoir indication du l'identité de la roche. Vidéo périodite non polarisée puis polarisée. On observe extinction, c'est de l'olivine. **12min.**

Et si jamais les objets sont transparents ? -> Contraste de phase.

II Observer le transparent

But : Transformer une différence de phase (liée à l'indice optique du milieu) en une différence d'amplitude : c'est le contraste de phase.

Mise en évidence du phénomène par expérience d'Abbe.

Schéma du dispositif : Objet ponctuel, lentille, image à l'infini, lentille, lame quart d'onde. Influence de la lame quart d'onde sur le contraste dans le dispositif optique. Noter les lien (TF, TF-1) entre les différents plans.

1) Intensité

$S(M) = S_0 \exp(i\phi) = (\text{astuce mathématique}) S_0(\exp(i\phi) - 1) + S_0$: Relation sans lame quart d'onde.
L'ajout de la quart d'onde multiplie le terme S_0 par $\exp(i\pi/2)$

Calcul de $I(M)$ dans les deux cas, en faisant préalablement D.L à l'ordre 1 avec $\phi \ll 1$.

$$I(M) = S_0^2$$

$$I(M) = S_0^2 (1 - 2\phi)$$

2) Contraste

$$C=0$$

$$C \neq 0$$

Si $\phi \ll 1$ on peut même avoir contraste approchant 1

Inconvénient : C dépend de ϕ , on le voudrait fixe (indépendant du milieu)

Vidéo cellules qui bougent. Méthode non intrusive, non destructive ! 26Min

Autre méthode pour pallier ce défaut de dépendance avec la phase :

III Observer le vivant en mouvement

1) Dispositif récent

Schéma du dispositif : Objet, lentille, rayon à l'infini, lentille, image dans le plan focal image de la deuxième lentille.
Grandissement facile : rapport des focales $G = -F_2'/F_1'$. Possibilité de séparer le faisceau -> microscope à fluorescence.

2) Microscope à fluorescence

Schéma du dispositif : Deux lentilles, lame semi-réfléchissante, organisme que a ingéré protéine qui absorbent dans l'UV, lampe UV.

Vidéo croissance embryon fluorescent, multiplication des cellules. 34min

IV Quelques limites

1) Résolution latérale

Ouverture numérique, formule, schéma.

Critère de Rayleigh

Résolution latérale $r = 1,22 \lambda f/2$

Petits angles -> $r = 0,61 \lambda / \text{ON}$

2) Aberrations

Loi de Cauchy, formule $n = A + B/\lambda^2$

Image licorne colorée par aberration chromatique

Schéma nappe sagittale, image.

Conclusion : on a vu plusieurs solutions, avec quelques limites. Pour sonder plus petites échelles, il faut autres microscopiques non optiques, effet tunnel par exemple.

Questions posées par l'enseignant

Comment gérer les défauts chromatiques ?

Où ça se passe dans un microscope ? De quoi est fait un objectif ? Y a-t-il des pertes, si oui comment les limiter ? Plus ou moins de pertes à fortes ou faibles puissances ?

Ordre de grandeur de valeur d'ouverture numérique ? Microscope à immersion, pour les milieux biologiques.

D'autres milieux que l'on peut utiliser ? Le verre.

Quel est l'intérêt d'utiliser un objectif à immersion ? Eviter dispersion à cause de l'interface avec un autre milieu.

Faites un schéma du microscope à immersion et sans, discuter la comparaison. Si jamais on met de l'huile (ou quelque chose qui a le même indice que milieu que l'on veut sonder) ?

Si on suppose que vous avez exactement la même ouverture numérique entre l'objectif avec et sans immersion, faite apparaître α , regardons les rayons aux extrémités. Il y a perte d'intensité si l'objectif sans immersion capte moins de rayon mais quel est l'autre problème ?

Qu'est ce qui limite la résolution ? Pour l'œil par exemple ? Valeur résolution de l'œil ? Essayez de le retrouver avec un schéma. Relier avec le punctum proximum.
Si jamais des rayons sont perdus dans les cas transverses ?
Qu'est ce que la profondeur de champ ? Comment se passe l'éclairage d'un microscope ? Qu'est ce qu'on veut quand on éclaire ? Les roches sont assez opaques, comment on fait dans ce cas là ? Réflexion sur l'objet.
Refaites schéma du contraste de phase, détaillez provenance de chaque rayon. Pourquoi est ce qu'on influence pas la transmittance avec le contraste de phase ? L'action de la lame ne joue que sur la source, pourquoi ? Sur le plan de la lame, comment sont répartis les faisceaux issus de l'objet et de la source ? On veut que la lame quart d'onde le soit pas pour l'éclairement mais le soit pour la source. Si on met la $\lambda/4$ au centre, à quelle information au centre on touche ?
Si on met cache au centre et qu'on augmente progressivement le rayon, qu'est ce qui change dans l'image ?

Commentaires donnés par l'enseignant

Point de vue choisi très bien.
Insister sur les limites techniques.
Leçon relativement récente, avec la volonté de la part du jury de voir des leçons diversifiées dans les sujets abordés. Beaucoup de microscopies différentes peuvent être traitées.
Attention, la lame quart d'onde ne l'est que localement.
Pour se mettre en fond sombre, on éclaire tout puis on met un cache, on supprime ainsi la composante continue et on garde que la composante diffractée.

Ce dont on aurait pu parler : Point de vue du microscope moderne. Ouverture numérique, profondeur de champ (important) et résolution. Les questions peuvent tomber. Typiquement dans l'air, l'ouverture numérique vaut entre 0,80 et 0,95. Pour le non vivant, objectif à 1.4.
Ce sont les rayons les plus inclinés qui nous intéressent pour la résolution. Ça donne des grands k dans l'espace de Fourier.
Un petit X dans l'espace réel (par exemple un détail sur une image) va être traduit dans l'espace de Fourier par un grand k . Possible de parler de repère historiques. Aujourd'hui on sait corriger les aberrations pour obtenir faisceau infini.
Important de parler de l'éclairage. Eclairage de Köhler, sinon on fait aussi l'image du filament. On veut éclairage uniforme. On place l'objet au niveau de la transformée de Fourier de notre filament parce que c'est là que l'image est la plus uniforme. Les diaphragmes d'ouverture et de champ sont à connaître. Dans un objectif, plein de lentilles pour corriger, toutes sont traitées pour obtenir 85% de lumière transmise, et ce pour une gamme de longueur d'ondes (le visible dans notre cas).
Profondeur de champ : à partir de quel moment on perd en résolution si l'objet bouge (en profondeur). Plus l'ouverture numérique est grande, plus la profondeur de champ est faible. Avantage comme inconvénient, ça dépend de ce qu'on veut faire.
Microscopie confocale permet d'avoir une meilleure résolution mais il faut parcourir tout l'échantillon point par point.
Microscopie multiphotonique permet d'avoir une meilleure résolution spatiale mais avec peu de photons en sortie.
Microscopie à champ proche. Utiliser des ondes évanescentes pour faire tomber la limite de diffraction en $ON \cdot \lambda/2$
Conseil : Eviter les choses complexes. Faire le microscope ancien. Une seule moderne, puis traiter les limites. Avoir de belles images, en profiter.

Partie réservée au correcteur

Avis sur le plan présenté

Beaucoup de plans sont possibles pour cette leçon.

Ici, le plan proposé est cohérent, mais un tout autre plan est aussi envisageable

Il est possible de parler plus des caractéristiques instrumentales d'un microscope

Concepts clés de la leçon

caractéristique instrumentale d'un microscope (objectif, ouverture numérique, grossissement, grandissement, profondeur de champ....)

Limites de résolution : Rayleigh, aberrations

éclairage de Kohler

Plusieurs types de microscopies optiques (au choix)

Contraste de phase, fond clair, fond sombre, polarimétrie, ...

Plus récent : confocal, fluorescence, nonlinéaire, champ proche....

Concepts secondaires mais intéressants

Le microscope afocal (ou à l'infini, récent)/ le microscope ancien (image interne au tube, décrit dans la plupart des ouvrages d'optique)

détecteur

Plan de Fourier

Image pleine /champ- reconstruction de l'image par une reconstruction point par point

Objectifs en microscopie : Amélioration du contraste/ amélioration de la résolution

Expériences possibles (en particulier pour l'agrégation docteur)

Expériences difficiles mais mettre des images

Points délicats dans la leçon

La leçon peut rapidement devenir très compliquée. En microscopie moderne, la résolution est étroitement liée à l'espace de Fourier

Bibliographie conseillée

Les notions modernes de microscopie ne se trouvent pas dans les ouvrages classiques d'optique qui présentent le microscope classique (pas le microscope actuel à l'infini)

pour la microscopie plus actuelle, quelques ouvrages (les premiers chapitres)

Optical Microscopy, Mertz

Les nouvelles microscopies (champ proche)

Et surtout le web

Par exemple

<https://www.microscopyu.com/tutorials>