

# D17 – MICROSCOPIES OPTIQUES

June 8, 2021

Corentin Naveau & Simon Jeanne

## Niveau : L2

### Prérequis

- Optique Géométrique
- Diffraction

### Expériences

- 🔬 Microscope à deux lentilles

## Contents

<b>1</b>	<b>Microscope à deux lentilles</b>	<b>2</b>
1.1	Principe . . . . .	2
1.2	Puissance et grossissement . . . . .	2
1.3	Limites du microscope à deux lentilles . . . . .	2
<b>2</b>	<b>Amélioration du microscope</b>	<b>3</b>
2.1	Microscopie par fluorescence . . . . .	3
2.2	Microscopie par contraste de phase . . . . .	3
2.3	Microscopie confocale . . . . .	4
2.4	Microscopie en champ proche . . . . .	4

## Introduction

Que ce soit en biologie ou en géologie, le microscope est un instrument omniprésent, pour ne pas dire emblématique, des sciences modernes.

Il nous permet d'observer des objets extrêmement petits, allant jusqu'aux atomes eux même pour les récents microscopes à effet tunnel.

(Œil humain)

## Microscope à deux lentilles

Mais ne sautons pas les étapes, et attardons nous d'abord sur sur les microscopes optiques, et en particulier sur le plus simple d'entre eux : le microscope à deux lentilles.

## Principe

Le microscope à deux lentilles est composé d'un tube aux extrémités duquel se trouve deux lentilles : l'objectif de distance focale  $f_1$  et l'oculaire de distance focale  $f_2$ . La distance entre le foyer image de l'objectif et le foyer objet de l'oculaire est appelé l'intervalle optique  $\Delta$ .

L'objectif permet de faire une première image grossie de l'objet. On fait la netteté en changeant la distance objet-objectif. L'image est nette lorsque l'oculaire projette l'image à l'infini, c'est à dire lorsque l'image de l'objet à travers l'objectif se trouve sur le foyer objet de l'oculaire.

On montre le schéma géométrique.

## Puissance et grossissement

La puissance du microscope est défini :

$$P = \frac{\theta'}{AB} \quad (1)$$

avec  $\theta'$  est la taille angulaire de l'objet en sortie de microscope. En faisant un peu de géométrie, on trouve que  $\tan(\theta') \simeq \theta' = \frac{\Delta AB}{f_1 f_2}$ . On obtient donc la puissance du microscope :

$$P = \frac{\Delta}{f_1 f_2} \quad (2)$$

Le grossissement est défini comme  $G = \theta'/\theta$ , où  $\theta$  est la taille angulaire de l'objet telle qu'elle est vue par l'œil humain nu, sans instrument. En plaçant l'objet au punctum proximum d'accommodation (situé à environ 25cm pour un œil sain), on obtient  $\tan(\theta) \simeq \theta = AB/d_{ppa}$ .

Finalement on a le grossissement :

$$G = -P d_{ppa} \quad (3)$$

Le signe moins vient du fait que l'image est renversée.

Expérience : On fait l'image en sortie du microscope sur un écran placé au foyer image d'une lentille. On mesure la taille angulaire  $\theta'$  comme le rapport entre la taille de l'image sur l'écran et la distance focale de la lentille. On peut reproduire la mesure pour différente valeur de  $\Delta$  en laissant fixe l'objectif et l'ensemble lentille-écran (qui représente l'œil), mais en déplaçant l'objectif (ce qui revient à changer  $\Delta$ ) puis en remplaçant l'objet pour retrouver la netteté. On peut utiliser un petit écran pour montrer que, lorsque l'image est net sur l'écran représentant le fond de l'œil, elle est également nette sur le foyer objet de l'oculaire (ça permet simplement de montrer au jury que les distances du montage sont bonnes). On peut également montrer que plus  $\Delta$  est grand (forte puissance), plus la plage de netteté est courte.

Les microscopiques classiques ont des grossissements pouvant aller jusqu'à 500.

Au delà, les microscopes se heurtent à certaine limitation.

## Limites du microscope à deux lentilles

- La profondeur de champ. Comme on l'a constaté expérimentalement, plus la puissance du microscope est forte, plus il est difficile de faire la netteté. Cela est dû à la profondeur de champ (c'est à dire l'épaisseur d'objet que notre œil est capable de voir net) qui diminue. On peut en effet montrer que cette épaisseur  $l = \frac{1}{4G^2}$  (voir figure en annexe). Ainsi, la profondeur de champ sera de  $100\mu\text{m}$  pour  $G=50$ , mais de seulement  $1\mu\text{m}$  pour  $G=500$  ! Un microscope avec un fort grossissement devient donc très délicat à manipuler.

• La seconde limite du microscope à deux lentilles vient de la diffraction. En effet, la lumière diffracte sur les bords des lentilles. Ainsi une source ponctuelle n'apparaîtra pas comme ponctuelle mais formera une tâche d'Airy (montrer une image sur projecteur ?). Le rayon angulaire de la tâche est de  $1.22\lambda/a$ , avec  $a$  le diamètre du trou diffractant. D'après le critère de Rayleigh, deux objets sont séparables si leurs images sont séparées d'au moins cette distance.

Ainsi, l'image d'une source ponctuelle  $A$  sur l'axe optique forme (au niveau de l'image intermédiaire) une tache de rayon  $R = 1.22\frac{\lambda}{a}D$ ,  $D$  étant la distance lentille-image. L'image d'une source située en  $B$  légèrement au dessus de  $A$  se forme à une distance  $A'B' = \frac{AB \times D}{d}$ , avec  $d$  la distance objet-lentille (règle de l'optique géométrique). Les deux sources sont résolues si  $A'B' > R$ , c'est à dire :

$$AB > \frac{1.22\lambda d}{a} = \frac{0.61\lambda}{ON} \quad (4)$$

Où  $ON$  est l'ouverture numérique du microscope, c'est à dire le sinus du demi angle sous lequel l'objet "voit" l'objectif.

$$AB_{min} = \frac{0.61\lambda}{ON} \quad (5)$$

L'ouverture numérique ne peut pas être supérieur à 1, on a donc ici une limitation physique au pouvoir de résolution d'un microscope. Comme  $ON$  est inférieur à 1, cette limite est de l'ordre de la longueur d'onde.

Remarque : En réalité, si on fait le calcul naïvement, on obtient une dépendance en  $\tan$  de l'angle, et non en sinus. Pour avoir la dépendance en sinus, il faut utiliser la condition des sinus d'Abbe qui tient compte de l'égalité de tous les chemins optiques de  $A$  à  $A'$  (ce qu'on ne fait pas dans la description classique d'une lentille parfaitement plate).

## Amélioration du microscope

Le microscope optique classique souffre donc de diverses limitations. Essayons de voir diverses méthodes pour les contourner.

### Microscopie par fluorescence

Le principe est simple : on éclaire un échantillon avec une lumière de faible longueur d'onde. Par effet de fluorescence, certaines molécules (déjà présentes comme la chlorophylle ou ajoutées par l'expérimentateur) vont émettre des photons dans une longueur d'onde plus grande (c'est par ce principe que certains objets brillent sous une lampe UV).

Un filtre permet ensuite de ne sélectionner que la lumière émise par fluorescence. Cette technique permet donc de repérer des sources fluorescentes potentiellement plus petites que le pouvoir de résolution du microscope. Néanmoins, la résolution n'est pas réellement améliorée avec ce système.

### PALM : photo-activated localization microscopy (amélioration de la fluorescence)

Le principe est comme celui de la fluorescence, sauf qu'en plus on sélectionne une molécule fluorescente très spécifique, qui ne va se placer que sur certains sites particuliers, très petits devant la résolution théorique. Chaque uns de ces sites va former une source ponctuelle qui va alors produire une tâche d'Airy. On recompose ensuite l'image en calculant les centres de toutes les tâches. Avec cette technique, on peut descendre à des résolutions de l'ordre de 20nm.

### Microscopie par contraste de phase

En biologie, il arrive souvent qu'on observe des tissus transparents. Il est alors très difficile de distinguer quoi que ce soit, car le contraste est très faible. Par contre, l'indice optique n'étant pas le même partout dans l'échantillon, il y a une différence de phase selon l'endroit qu'on regarde. Ainsi, si on éclaire l'échantillon avec une lumière  $E_0 \sin(\omega t)$ , après l'échantillon l'onde lumineuse devient  $E_0 \sin(\omega t + \phi(x, y))$ . En considérant que le déphasage est très petit (échantillon mince), on peut réécrire l'onde après l'échantillon :

$$E(x, y, t) = E_0(\sin(\omega t) + \phi(x, y) \cos(\omega t)) \quad (6)$$

L'intensité  $E \times E^T$  perçue est donc en  $1 + \phi^2$ . Le déphasage apparaît à l'ordre 2 : le contraste est très faible.

La fonction transparence de l'échantillon est :

$$t(x, y) = 1 + j\phi(x, y) \quad (7)$$

Ainsi, dans le plan de Fourier, on a :

$$T(u, v) = \delta(u, v) + j\Phi(u, v) \quad (8)$$

On place une petite lame quart d'onde au centre du plan de fourrier. En sortie on obtient donc :

$$T'(u, v) = j\delta(u, v) + j\Phi(u, v) \quad (9)$$

Ce qui revient virtuellement à changer la fonction transparence de l'échantillon par :

$$t'(x, y) = E_0 \cos(\omega t)(1 + \phi(x, y)) \quad (10)$$

L'intensité perçue est alors :

$$I(x, y) = I_0(1 + 2\phi(x, y)) \quad (11)$$

La différence de phase apparaît désormais dans l'expression de l'intensité à l'ordre 1 : on est bien en contraste de phase.

## Microscopie en champ proche

Si le critère de Rayleigh est valide en champ lointain, il n'est pas vrai en champ proche. En effet, proche de la cible diffractante se trouve des ondes électromagnétiques évanescentes. Celles-ci portent l'information des structures de taille caractéristique inférieur à la longueur d'onde (c'est pour cela que ces informations disparaissent en champ lointain).

La microscopie en champ proche consiste à placer une sonde proche de l'échantillon qui va scanner les ondes évanescentes. La résolution du problème inverse permet ensuite de remonter à la fonction transparence de l'objet étudié avec une résolution latérale de 20nm et verticale de 2 à 5 nm.

## Autres

Pour les questions, pensée à relire vite fait des trucs sur microscopie confocale, microscopie effet tunnel, , Microscopie optique en champ proche...

## Conclusion

## Annexe

Pour calculer la profondeur de champ du microscope, on s'intéresse aux deux cas extrêmes suivants : l'image focalise au punctum remotum de l'œil (comme dans le microscope correctement réglé) et l'image focalise au punctum proximum de l'œil. On peut représenter ces deux cas par les équations suivantes :

$$\begin{aligned} A_R &\xrightarrow{obj} F_2 \xrightarrow{ocu} \infty \\ A_P &\xrightarrow{obj} A_{P1} \xrightarrow{ocu} PP \end{aligned} \quad (23)$$

Passons aux calculs :

- Pour la première équation, la relation de conjugaison de Newton donne :

$$\overline{F_1 A_R F'_1 F_2} = -f_1'^2 \Leftrightarrow \overline{F_1 A_R} = -\frac{f_1'^2}{\Delta}. \quad (24)$$

- Pour la deuxième équation, la même relation nous donne :

$$\begin{cases} \overline{F_1 A_P F'_1 A_{P1}} = -f_1'^2 \\ \overline{F_2 A_{P1} F'_2 PP} = -f_2'^2 \end{cases} \Leftrightarrow \overline{F_1 A_P} = -\frac{f_1'^2}{F'_1 A_{P1}} = -\frac{f_1'^2}{\Delta - \frac{f_2'^2}{F'_2 PP}} = -\frac{f_1'^2}{\Delta + 4f_2'^2}. \quad (25)$$

La punctum proximum est ici pris à 25 cm tel que  $\overline{F'_2 PP} = -\frac{1}{4}$  en faisant attention aux valeurs algébriques des distances (yeaaaaah on adore l'optique géométrique).

On peut alors définir la profondeur de champ comme :

$$l = \overline{A_R F_1} + \overline{F_1 A_P} = -\frac{f_1'^2}{\Delta} - \frac{f_1'^2}{\Delta + 4f_2'^2} = -\frac{f_1'^2}{\Delta} \left( 1 - \frac{1}{1 + \frac{4f_2'^2}{\Delta}} \right) \simeq \frac{4f_1'^2 f_2'^2}{\Delta^2} = \frac{1}{4G_e^2}. \quad (26)$$

On a supposé ici que l'intervalle optique  $\Delta$  était grand devant les focales des deux lentilles, ce qui est le cas en réalité (au moins un facteur 10).