

# LP32 : MICROSCOPIES OPTIQUES

16 novembre 2017

*C'était pas votre question mais c'est ma réponse*  
JOËL BELLESSA

Élise Camus & Maxime Martinez

## Niveau : L2

## Commentaires du jury

**2017** : L'intérêt des notions introduites doit être souligné.

**2016** : Une technique récente de microscopie optique à haute résolution doit être présentée.

**2015** : Deux nouvelles leçons ont été ajoutées [dont] une leçon intitulée « Microscopies optiques », dans laquelle un développement rigoureux et suffisamment complet d'au moins une technique est souhaité.

## Prix Nobel

**1953** : Frits (Frederik) Zernike : microscope à contraste de phase.

**1986** : Ernst Ruska : microscopie électronique, Gerd Binnig et Heinrich Rohrer : microscope à effet tunnel à balayage

**2014** (chimie) : Eric Betzig, William Moerner et Stefan Hell microscopie à fluorescence à très haute résolution

## Bibliographie

✦ *Optique*, **Houard**

→ fonctionnement de l'œil et montage de microscope

✦ *Nano-optique du solide*, **Jacquier**

→ trouvé sur internet, mais il y a une partie intéressante sur le champ proche, à feuilleter

✦ *Les nouvelles microscopies*, **Aigouy**

→ beaucoup de chose notamment le calcul du champ proche

✦ *CAPES 2008, Agrégation épreuve A 2015*

→ faudrait trouver les versions éditées des corrections, j'ai pas cherché, mais fort utile

✦ *site web : <https://toutestquantique.fr/microscopes/>*

→ petites vidéos explicatives d'une dizaine de techniques de microscopies

## Prérequis

➤ Optique géométrique et ondulatoire (diffraction)

➤ Éléments de mécanique quantique

## Expériences et animations

☞ Fonctionnement de l'œil

☞ Microscope sur table

☞ Diaphragmes

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Le microscope à deux lentilles</b>	<b>2</b>
1.1	Grossissement et puissance . . . . .	3
1.2	Diaphragmes et cercle oculaire . . . . .	4
1.3	Limitations . . . . .	4
<b>2</b>	<b>Microscopie à fluorescence</b>	<b>5</b>
2.1	Principe de fonctionnement . . . . .	5
2.2	Microscopie confocale . . . . .	5
2.3	PALM : photo-activated localization microscopy . . . . .	6
<b>3</b>	<b>Microscopie en champ proche</b>	<b>6</b>
3.1	Retour sur la limite de résolution . . . . .	6
3.2	SNOM : Scanning near-field optical microscopy . . . . .	7

## Introduction

**Microscope** : un microscope est un dispositif optique permettant de former l'image d'objet (au sens optique) invisible à l'œil nu. On parle de microscopie optique quand le vecteur de l'information est un flux lumineux.

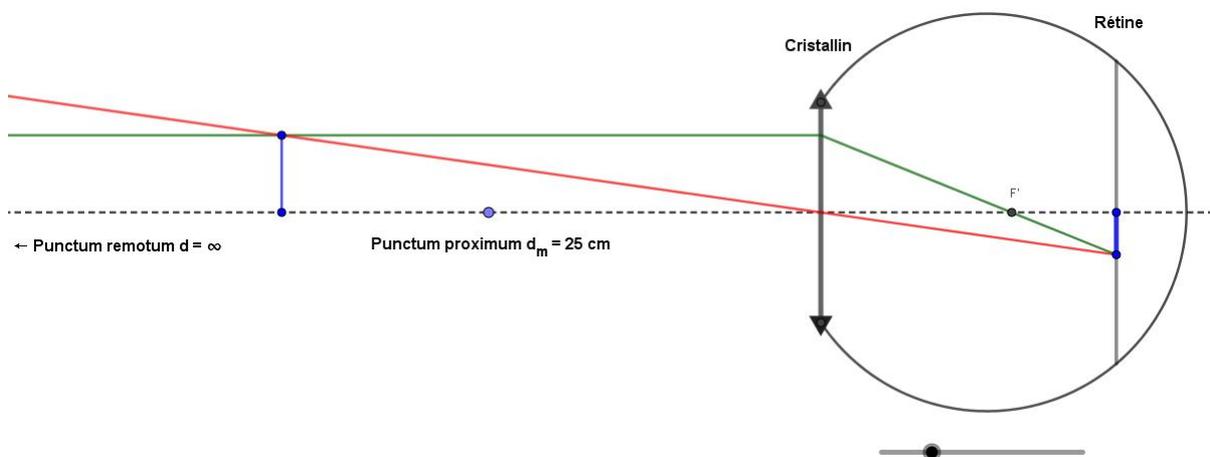
### Fonctionnement de l'œil

🔗 Géométrie

⌚ 2 min

On modélise l'œil par une lentille simple, on montre la nécessité d'adapter la focale pour former des images d'objets à différentes distances, si la distance rétine-cristallin reste elle constante.

Cette définition nécessite un rappel du fonctionnement de l'œil. L'œil est formé (entre autre) d'une rétine qui joue le rôle d'écran et du cristallin qui joue le rôle de lentille convergente, tout deux espacés de 17 mm. L'œil est cependant capable de former une image nette d'objet se situant à des distances différentes en modifiant la focale de. La vision nette est obtenue pour des objets se situant entre le *punctum proximum* (à une distance noté  $d_m$ ) et le *punctum remotum*. Pour un œil emmétrope  $d_m = 25$  cm et le *punctum remotum* est à l'infini. La situation où l'objet est à l'infini correspond à un œil au repos, quand l'œil forme l'image d'un objet plus proche, on dit qu'il accommode.



Dés lors pour un objet  $AB$  donné, l'angle maximal sous lequel sera vu l'objet, noté  $\alpha$  sera :  $\alpha = \frac{AB}{d_m}$ , un œil standard pourra distinguer cet objet si  $\alpha > 3 \cdot 10^{-4}$  rad =  $0.017^\circ$ . Un microscope est alors un dispositif capable de fournir une image de cet objet vu sous un angle  $\alpha' > \alpha$ , on définit donc le grossissement  $G$  d'un microscope comme

$$G = \left| \frac{\alpha'}{\alpha} \right|$$

On peut aussi définir de manière équivalente la puissance  $P$  (en dioptrie) pour caractériser un microscope, qui permet de s'affranchir de  $d_m$

$$P = \left| \frac{\alpha'}{AB} \right| = \frac{G}{d_m}$$

Le dispositif le plus simple auquel on puisse penser et qui est connue depuis l'antiquité est une lentille où l'on place l'objet après le plan focal objet, on parle alors de microscope simple ou de loupe. On montre que

$$P = \frac{1}{f'} \quad \text{et} \quad G = \frac{d_m}{f'}$$

Valeurs typiques :  $f' \sim [12.5, 125]$ cm,  $G \sim [2, 20]$  et  $P \sim [8, 80]$  δ

## 1 Le microscope à deux lentilles

**Note** : se reposer sur les épreuves de CAPES/agreg et le Houard.

## Schéma de fonctionnement



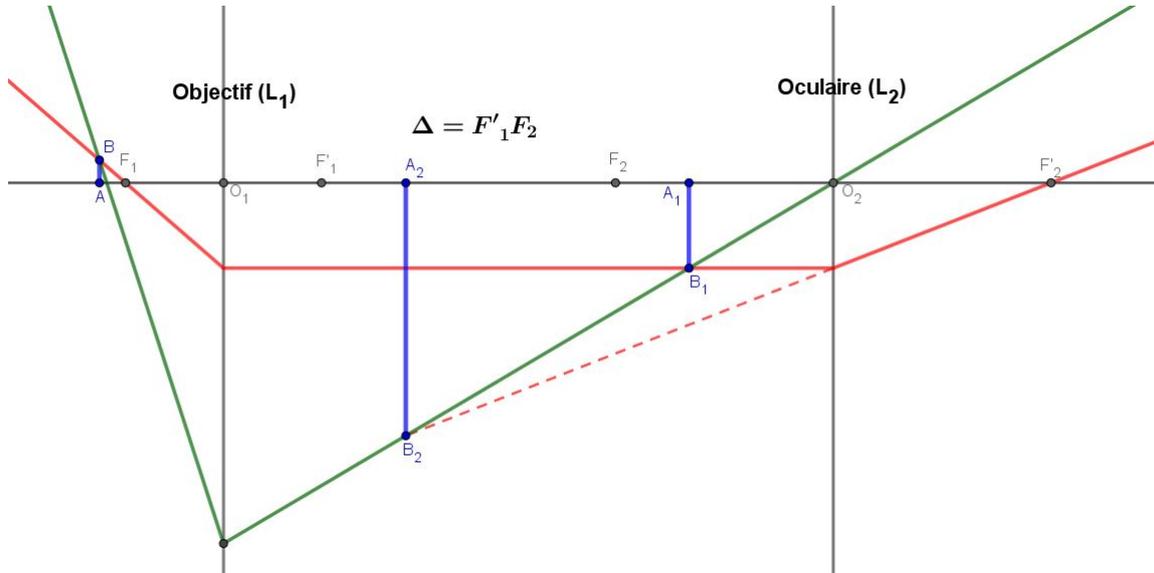
### Microscope sur table

📖 Livre utilisé : Houard

⌚ 2 min

On illustre le principe de fonctionnement du microscope, pas très spectaculaire. Parallèlement on utilise le schéma géométrique pour l'aspect dynamique de la modélisation.

On appelle  $\Delta$  l'intervalle optique en général de l'ordre de 160 mm, la lentille d'entrée est l'objectif, celle de sortie est l'oculaire.



### 1.1 Grossissement et puissance

Il faut déterminer  $\alpha'$  à partir des grandeurs caractéristiques du microscope. On peut commencer par caractériser le rôle de la première lentille : elle forme une image  $\overline{A_1B_1}$  agrandie telle qu'on puisse définir le grossissement de l'objectif

$\gamma_{ob}$

$$\gamma_{ob} = \left| \frac{\overline{A_1B_1}}{AB} \right| \Rightarrow \boxed{\gamma_{ob} = \frac{\Delta}{f'_1}}$$

La deuxième lentille joue simplement le rôle d'une loupe et on peut donc utiliser son grossissement oculaire  $G_{oc} = \frac{d_m}{f'_2}$  tel que définit précédemment

$$G_{oc} = \frac{\alpha'}{\alpha_1}$$

Où  $\alpha_1 = \left| \frac{\overline{A_1B_1}}{d_m} \right|$  est l'angle sous lequel serait vu  $A_1B_1$  par l'œil à une distance  $d_m$ . On voit alors que

$$G = \frac{\alpha'}{\alpha} = G_{oc} \frac{\alpha_1}{\alpha} = G_{oc} \frac{A_1B_1}{AB} \Rightarrow \boxed{G = G_{oc} \cdot \gamma_{ob} = \frac{d_m \Delta}{f'_1 f'_2}}$$

Par un calcul immédiat

$$P = \frac{\alpha'}{AB} = G \frac{\alpha}{AB} = \frac{G}{d_m} = \frac{\Delta}{f'_1 f'_2}$$

Valeurs typiques

- $\Delta \sim 160\text{mm}$ ,  $\gamma_{ob} \sim [4, 100] \Rightarrow f'_1 \sim [1.6, 40]\text{mm}$
- $G_{oc} \sim 10 \Rightarrow f'_2 \sim 25\text{mm}$

- $G \sim [40, 1000]$  et  $P \sim [160, 4000] \delta$

On voit que l'on obtient des biens meilleurs grossissement en combinant deux lentilles, mais historiquement le microscope composé n'a commencé à être utilisé qu'au milieu du XIX<sup>e</sup> car jusque là les verres étaient de mauvaise qualité : poli dans des blocs de verres de qualités inégales et soumis aux aberrations chromatiques. Ainsi, si le premier microscope composé apparaît en 1590 (hollandais JANSEN, père et fils), dans les années 1830 Charles DARWIN et Robert BROWN observe respectivement le noyaux des cellules et le mouvement brownien à l'aide de microscope simple.

## 1.2 Diaphragmes et cercle oculaire



### Diaphragmes

↗ Géométrie

⊖ 2 min

On montre les diaphragmes sur la construction puis sur le microscope.

**Diaphragme de champ** : diaphragme qui limite la dimension transverse du champ objet observable.

**Diaphragme d'ouverture** : diaphragme qui limite le flux d'énergie entrant dans le microscope.

**Cercle oculaire** : image du diaphragme d'ouverture à travers le système.

On l'aide de l'animation on comprend que

- Le diaphragme de champ se situe dans le plan focal objet de  $L_2$
- Le diaphragme d'ouverture se situe dans le plan focal image de  $L_1$
- Le cercle oculaire est le plus petit cercle par lequel passent tous les rayons sortants du microscope, comme  $\Delta \ll f'_2$ , le cercle oculaire est quasiment confondu avec  $F'_2$  justifiant a posteriori l'intérêt d'y placer son œil

On définit l'angle d'ouverture comme l'angle du dernier rayon accepté avec l'axe optique. Cet angle est constant pour tout point du champ optique observable.

## 1.3 Limitations

### Profondeur de champ

On sait que l'œil peut former une image d'un objet entre  $d_m$  et l'infini. Le point  $A_\infty$  correspond au condition optimale dans lesquelles nous avons définis les grandeurs du microscope. On définit  $A_m$  tel qu'en se plaçant au foyer image  $F'_2$  on voit  $\overline{AB}$  à une distance  $d_m$ , autrement dit  $\overline{A_m F'_2} = d_m$ . On veut alors déterminer  $\overline{A_\infty A_{2,m}}$

$$\begin{aligned} \overline{A_\infty A_m} &= \overline{A_\infty F_1} + \overline{F_1 A_m} = \frac{-f_1'^2}{A_{1,\infty} F_1} + \frac{-f_1'^2}{F_1' F_2 + F_2 A_{1,m}} = \frac{-f_1'^2}{A_{1,\infty} F_1} + \frac{-f_1'^2}{F_1' F_2 + \frac{-f_2'}{F_2' A_{2,m}}} \\ &= \frac{f_1'^2}{\Delta} - \frac{f_1'^2}{\Delta + \frac{f_2'}{d_m}} = \frac{f_1'^2 \cdot f_2'^2}{\Delta(\Delta d_m + f_2'^2)} = \frac{\Delta \cdot f_2'^2}{\gamma_{ob}^2 (\Delta d_m + f_2'^2)} \end{aligned}$$

On voit que ce résultat dépend de l'inverse du carré de  $\gamma_{ob}$  cela souligne l'intérêt d'utiliser des objectifs dans l'ordre de grandissement croissant et la nécessité de garder une image nette lors de cette opération : les microscopes sont standardisé pour cela, ainsi la distance  $F_2 A_\infty$  est fixée à 195 mm.

Valeur typiques :  $l \sim [1, 100] \mu\text{m}$

### Limite de résolution

La théorie de la diffraction nous enseigne que l'image à l'infini d'un point à travers un diaphragme circulaire est une tâche d'IRY. Pour distinguer deux points lumineux, il faut qu'ils soient suffisamment éloignés, le critère de RAYLEIGH fixe cette condition comme  $\delta r \geq 2 * h_{1/2}$ , ceci implique tout calcul fait que

$$\Delta r = 0.61 \frac{\lambda}{\omega_0} \quad \text{avec} \quad \omega_0 = n \sin \theta$$

On appelle  $\omega_0$  l'ouverture numérique. On voit donc, qu'une fois les aberrations corrigées la diffraction devient la limitation de notre microscope. On peut minimiser  $\Delta r$  :

- en diminuant  $\lambda$ , mais on est limité par  $\lambda = 400$  nm pour rester en lumière visible
- en augmentant l'indice, mais avec des lentilles en verre on doit garder  $n < 1.5$  pour avoir des lentilles convergentes
- en augmentant  $\theta$ , avec de l'optique non paraxiale, mais on est limité à  $\sin(\theta) = 1$

Finalement la limite de résolution ultime en microscope classique est de l'ordre de  $0.2\mu\text{m}$ .

## 2 Microscopie à fluorescence

**Note** : honnêtement y'a pas beaucoup de littérature accessible (satisfaisante en terme de concision) à ce sujet, mais rien de très compliqué au final si on reste superficiel, ça vaut le coup à mon avis de bien se familiariser avec ces microscopies en grappillant ci et là.

### 2.1 Principe de fonctionnement

Lorsqu'une molécule est photo-excitée elle peut perdre une partie de son énergie par une transition non radiative, sous forme d'énergie de vibration par exemple, avant de se désexciter vers son état fondamental cela aura pour effet l'émission d'un photon de plus faible énergie (donc de plus grande longueur d'onde).

On peut alors facilement distinguer les photons émis des photons incidents vu qu'ils n'ont pas la même longueur d'onde, on utilise pour cela des filtres en entrées et en sortie de dispositif, ainsi qu'un miroir dichroïque, dont les facteurs de transmission en fonction de la longueur d'onde sont représentés ci-dessous.

Ce principe est utilisé en biologie pour imager des zones d'intérêt (membrane, etc) marqué par des fluorophores (molécules fluorescentes).

### 2.2 Microscopie confocale

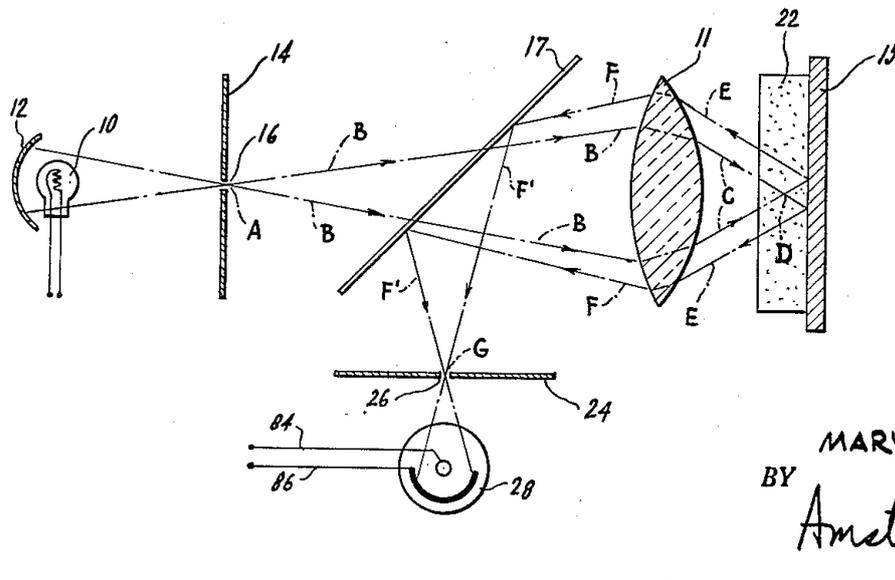


Schéma de fonctionnement par son inventeur Marvin Minsky en 1957

On a vu que le microscope classique possède une profondeur de champ relativement faible qui diminue avec, ce qui peut s'avérer problématique pour imager des échantillons ayant du relief. L'idée du microscope confocal est d'imager uniquement un petit volume de notre échantillon et de reconstruire l'image en balayant dans les trois dimensions de l'espace.

La dimension de la tranche en  $z$  éclairée peut-être ajusté en diminuant le diaphragme de sortie (*pinhole* en anglais), il y a un compromis à trouver entre le flux lumineux reçu et la résolution axiale souhaitée.

Cependant de la même façon que la diffraction limite la résolution latérale, la largeur de la lentille diaphragmante induit une limite de résolution axiale. On peut montrer expérimentalement que cette limite est autour de 600nm.

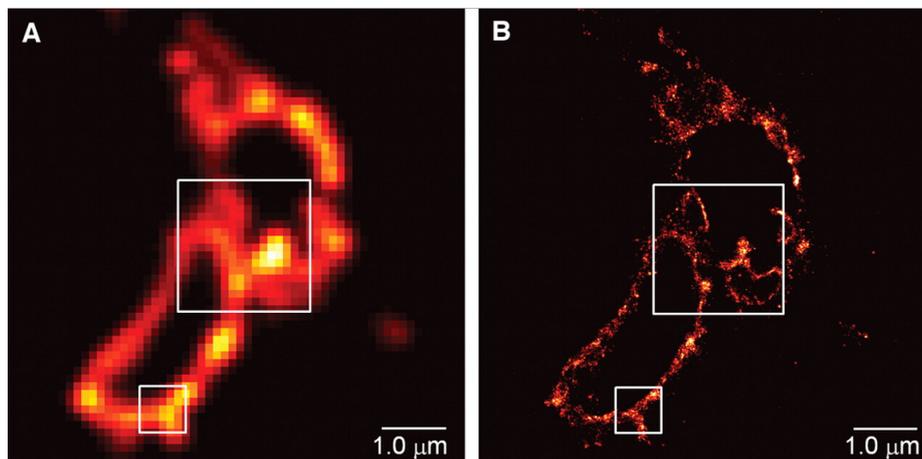
## 2.3 PALM : photo-activated localization microscopy

Les développements récents en microscopies arrivent cependant à s'affranchir de la limite de résolution, c'est le prix Nobel 2014, reçu par Eric Betzig, Stefan Hell et William Moerner.

Pour se faire il faut revenir à l'origine du critère de RAYLEIGH : il s'agit d'un critère pour distinguer 2 points sources différents, mais si l'on sait avec certitude qu'il n'y a qu'un seul point source alors, on peut réussir à déterminer la position du centre de la figure d'Airy avec précision.

Pour se placer dans de telles conditions on utilise des fluorophores photo-actifs, une première illumination va activer stochastiquement certains fluorophores qui seront alors dans une forme fluorescente et donc soumis au processus de fluorescence, on les image puis on vient les éteindre définitivement.

Valeur de la résolution obtenue : 20nm.



Lysosome (organite responsable de la digestion cellulaire) au PALM (Betzig, Science 2006)

## 3 Microscopie en champ proche

**Note** : Là y'a de quoi faire avec les bouquins (notamment le Aigouy).

### 3.1 Retour sur la limite de résolution

On va réinterpréter la limite de résolution comme conséquence du principe d'incertitude d'HEISENBERG adapté à l'optique (à creuser)

$$\Delta \mathbf{r} \cdot \Delta \mathbf{p} \geq h \Rightarrow \Delta \mathbf{p} \cdot \Delta \mathbf{k} \geq 2\pi \Rightarrow \Delta x \cdot \Delta k_x \geq 2\pi$$

Imaginons donc un photon émis depuis un objet de taille  $\Delta x$ , il est vu par le microscope avant un angle limite  $\theta$ , on a alors un  $\mathbf{k}$  limite observé tel que

$$\Delta k_x = 2k \sin \theta = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \theta$$

Finalement il vient

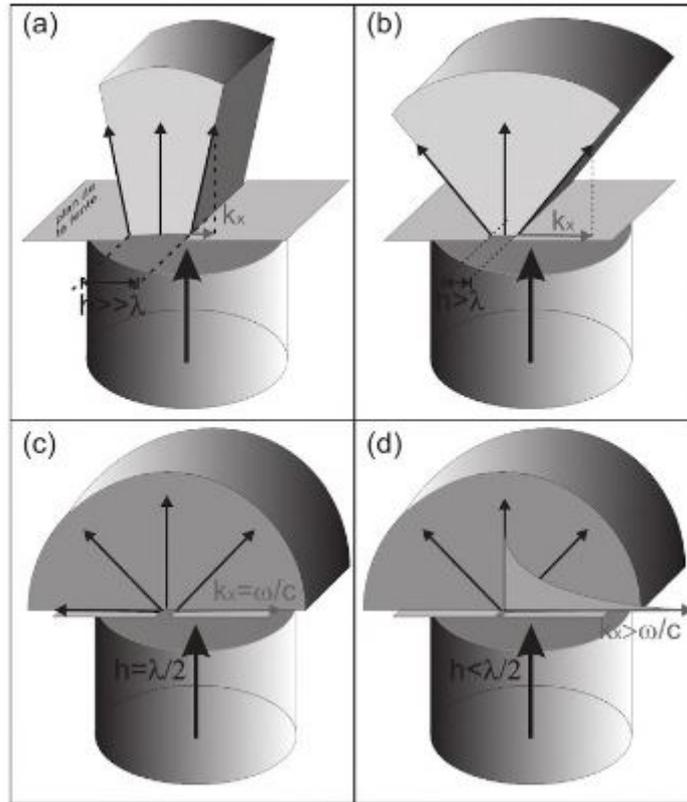
$$\Delta x = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} = \frac{1}{2} \frac{\lambda}{\omega_0}$$

On peut tracer  $\Delta x = f(\Delta k_x)$  pour représenter les deux limites. Une première est simplement la limite quantique, l'autre est imposé par le détecteur.

On voit alors que franchir la limite de résolution revient à chercher des  $k_x$  réels tels que  $k_x > \|\mathbf{k}\|^2 = \frac{2\pi n}{\lambda}$

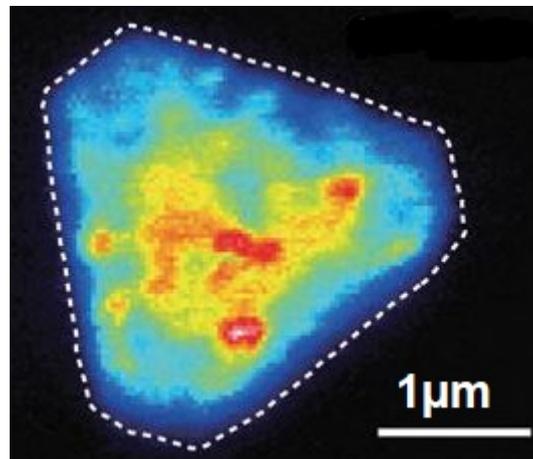
$$|k_x| = \sqrt{\|\mathbf{k}\|^2 - k_z^2} > \|\mathbf{k}\|^2 \Rightarrow k_z \in \mathbb{C}$$

Il faut recourir à des ondes évanescentes selon  $z$  qui transporte des informations sur les  $\Delta x < \lambda/2$ .



### 3.2 SNOM : Scanning near-field optical microscopy

Par le principe retour de la lumière on peut distinguer deux modes de fonctionnement : on éclaire avec des ondes propagatives et on vient sonder les ondes évanescentes avec une fibre, ou bien on éclaire en onde évanescentes et on collecte les ondes propagatives. Subtilité : nous avons besoin de fibre sub-demi-longueur d'onde, on réalise de telle fibre en étirant à chaud les fibres optiques. Résolution atteintes : 20nm.



## Conclusion

Nous avons au cours de cette leçon présenté le microscope traditionnel à deux lentilles dont les performances bien qu'élevées sont limitées (une fois les aberrations corrigées) par la diffraction et la profondeur de champ. Nous avons donc présenté ensuite deux familles de microscopies, qui apportent des réponses différentes aux points soulevés. Enfin on peut noter qu'il existe un panoplie de microscopies (non optiques) qui permettent d'abaisser encore la limite de résolution : microscopie à effet tunnel, à force atomique, etc.

## Espace pour noter les questions et les non réponses