

LP 32 – Microscopies optiques

11 juin 2021

Antoine Chauchat & Valentin Dorel

Niveau : L3

Bibliographie

↗ *Les nouvelles microscopies*, **Aigouy**

→ Microscopie à champ proche

Prérequis

- Optique géométrique
- Diffraction et propagation des ondes électromagnétiques
- Transformée de Fourier

Expériences



Table des matières

1	Le microscope à deux lentilles	2
1.1	Principe	2
1.2	Caractéristiques de performance	3
2	Limites du microscope à deux lentilles	4
2.1	Aberrations	4
2.2	Limite de diffraction	5
3	Microscopie haute résolution moderne : microscopie en champ proche	6
3.1	Rappels sur la propagation des ondes électromagnétiques	6
3.2	La propagation comme un filtre passe-bas :	7
3.3	Microscopie en champ proche : sonde en mode collection par éclairage en réflexion	7
4	Questions et commentaires	9
4.1	Questions	9
4.2	Commentaires	9

Introduction

Pour observer des phénomènes se produisant à des échelles microscopiques, on a besoin d'outils permettant de résoudre des tailles bien plus petites que ce que peut résoudre l'œil seul. Pour illustrer cela on modélise l'œil ainsi :

Cristallin C'est une lentille dont la courbure peut varier sous l'action des muscles ciliaires, ce qui permet de faire varier sa focale. C'est *l'accommodation*. Sans accommodations les images proches se forment derrière la rétine.

Iris C'est un diaphragme dont l'ouverture est formée par la pupille.

Rétine Composée de cellules photosensibles, elle forme l'écran d'observation.

L'ensemble cornée+cristallin+humeur vitreuse est assimilé à une lentille sphérique de focale variable caractérisée par

Punctum remotum La distance la plus grande de vision distincte (pas d'accommodation). Il est à l'infini si l'œil est emmétrope.

Punctum proximum Distance la plus petite de vision distincte (cristallin bombé, la vergence est maximale)

On illustre ça avec cette animation interactive GéoGébra <https://www.geogebra.org/m/mfhzbyue>.

La limite de résolution d'un système optique comme l'œil correspond à la taille minimale des objets distinguable. Cette taille dépend de la distance on la définit alors comme un angle qui pour l'œil vaut 2.9×10^{-4} rad ce qui équivaut à des défauts de taille 1 mm sur un objet à 3 m.

Pour pouvoir observer le monde microscopique, il va donc falloir des instruments grossissants dont le plus simple est la loupe. Le nerf de la guerre est alors la quête de la meilleure résolution dont la limitation peut avoir plusieurs natures.

1 Le microscope à deux lentilles

1.1 Principe

Le microscope à deux lentilles est formé de deux lentilles convergentes :

Objectif forme une image réelle agrandie de l'objet placé très proche de son foyer.

Oculaire projette l'image intermédiaire formée par l'objectif à l'infini pour que l'œil puisse la voir sans accommoder.

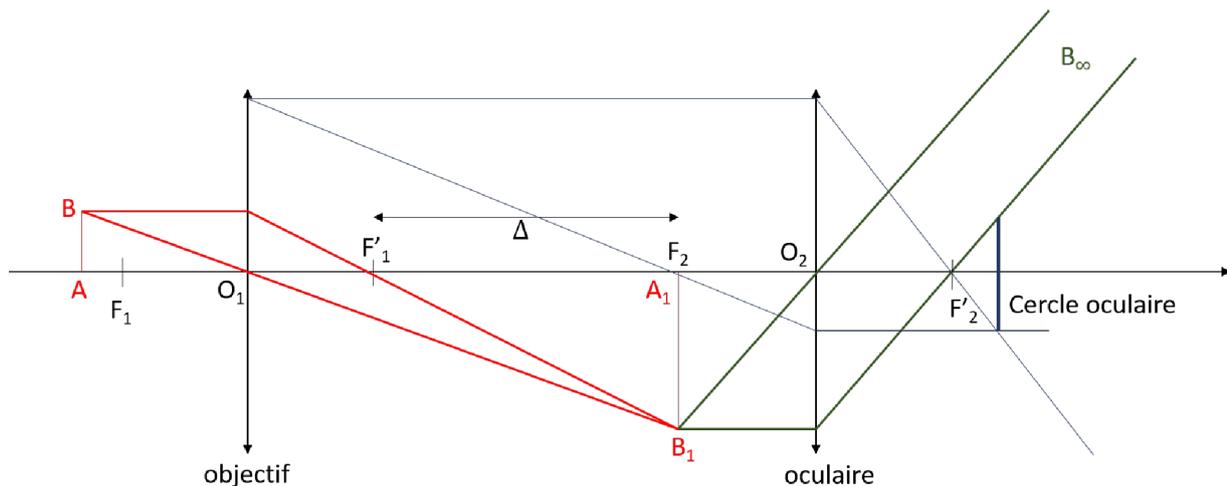


Fig. 1 : Schéma du microscope à deux lentilles

On montre en même temps les notions introduites sur le microscope de paille.

À priori on pourrait placer l'œil où on veut après l'oculaire car celui-ci projette l'image à l'infini. Néanmoins une position est préférable : c'est le cercle oculaire, zone à laquelle le faisceau est condensé dans la zone la plus restreinte et qui ainsi donne le maximum d'intensité lumineuse donc un plus grand confort visuel.

OdG : En pratique, les objectifs ont une focale comprise entre 2 et 45 mm, et l'oculaire entre 2 et 55 mm.

La distance Δ est fixée à une distance de l'ordre de 16 cm et la vis micrométrique permet de déplacer cet ensemble par rapport à l'objet pour que son image par le microscope soit à l'infini.

Comme on le voit, le microscope permet d'agrandir l'image formée sur la rétine pour ainsi pouvoir observer des détails invisibles à l'oeil nu. On va essayer dans la suite de quantifier cet apport.

1.2 Caractéristiques de performance

On va utiliser les grandeurs classiques décrivant les systèmes optiques c'est à dire le grossissement et la puissance.

Grossissement : Le grossissement est défini comme le rapport des angles sous lesquels on voit l'objet avec et sans microscope pour une distance objet-oeil d fixée. On note ces angles respectivement θ' et θ et ainsi $G = \frac{\theta'}{\theta}$.

En traçant les angles sur le schéma, on obtient :

$$\tan \theta' = -\frac{\overline{A_1B_1}}{f_2'} \quad \tan \theta = -\frac{\overline{AB}}{d} \quad (1.1)$$

Par le théorème de Thalès on a :

$$\frac{\overline{A_1B_1}}{\overline{AB}} = \frac{\overline{O_1A_1}}{\overline{O_1A}} \quad (1.2)$$

On utilise les relations de conjugaison :

$$\frac{1}{\overline{O_1A_1}} - \frac{1}{\overline{O_1A}} = \frac{1}{f_1'} \quad (1.3)$$

D'où :

$$\frac{\overline{O_1A_1}}{\overline{O_1A}} = 1 - \frac{\overline{O_1A_1}}{f_1'} = 1 - \frac{f_1' + \Delta}{f_1'} = -\frac{\Delta}{f_1'} \quad (1.4)$$

On a donc :

$$\frac{\overline{A_1B_1}}{\overline{AB}} = -\frac{\Delta}{f_1'} \quad (1.5)$$

Ainsi dans la limite des petits angles :

$$\theta \simeq -\frac{\overline{AB}}{d}; \theta' \simeq \frac{\overline{A_1B_1}\Delta}{f_1'f_2'} \quad (1.6)$$

Finalement le grossissement du microscope est donc :

$$G = -\frac{\Delta d}{f_1'f_2'} \quad (1.7)$$

On peut réaliser le calcul sur le microscope de paillasse et le comparer au grossissement.

Néanmoins cette grandeur dépend de d et n'est donc pas absolue. Pour s'en affranchir on définit le grossissement commercial G_c qui correspond au cas où l'objet est placé au punctum proximum de l'oeil. Cette définition est naturelle car elle met en évidence la limite de l'oeil que le microscope cherche à surmonter.

Le grossissement commercial s'exprime donc simplement comme :

$$G_c = -\frac{\Delta d_{PP}}{f_1'f_2'} \quad (1.8)$$

Puissance : On peut aussi quantifier le pouvoir grossissant du microscope à travers sa puissance qui est le rapport entre l'angle de sortie du microscope et la hauteur de l'objet :

$$P = \frac{\theta'}{\overline{AB}} \quad (1.9)$$

En reprenant les considérations précédentes on obtient :

$$P = \frac{\Delta}{f_1'f_2'} \quad (1.10)$$

On définit également la puissance intrinsèque qui correspond au cas où l'objet est placé au PP de l'oeil. On remarque néanmoins que la puissance du microscope ne dépend pas de la distance objet-oeil ainsi puissance intrinsèque et puissance se confondent dans le cas du microscope à deux lentilles.

Ordre de grandeur : En prenant $\Delta = 16$ cm, $f'_1 = 40$ mm et $f'_2 = 25$ mm on obtient :

$$G_c = 40; P = 160\delta \quad (1.11)$$

De manière générale, la puissance du microscope varie de quelques centaines de dioptries à quelques milliers.

Latitude de mise au point Une autre caractéristique importante du microscope est sa latitude de mise au point. C'est la plage de distance objet-objectif pour laquelle on peut voir l'objet net à l'oeil placé au cercle oculaire. Sa définition est donc directement liée à la capacité à l'oeil d'accommoder.

On peut montrer par le calcul que :

$$l = \frac{4D_{\text{acc}}}{P^2} \quad (1.12)$$

Il y a donc une notion de compromis entre puissance intrinsèque et latitude de mise au point. En effet une très faible latitude de mise au point peut rendre le microscope très difficile à régler. Elle varie d'une fraction de quelques millimètres pour de faibles grossissements à quelques microns pour de forts grossissements.

↓ *En plus de ce compromis à trouver, le microscope à deux lentilles présente d'autres limites que nous allons étudier dans cette prochaine partie.*

2 Limites du microscope à deux lentilles

2.1 Aberrations

Aberration chromatique : Le verre dont sont constituées les lentilles est un milieu dispersif. Son indice dépend de la longueur d'onde du rayonnement incident selon la loi de Cauchy :

$$n = n_0 \left(1 + \frac{B}{\lambda^2} \right) \quad (2.1)$$

Deux rayons de même angle d'incidence passant par le même point mais de longueur d'onde différentes ne convergeront pas au même endroit.

Pour compenser l'aberration chromatique on fabrique des *doublets achromatiques* composés de deux lentilles accolées.

La focale d'une lentille mince est donnée en fonction de ses rayons de courbure et de l'indice du verre utilisé :

$$\frac{1}{f} = (n - 1) \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \implies \frac{df}{f} = -\frac{dn}{n-1} \simeq \frac{n_b - n_r}{n_j - 1} \quad (2.2)$$

Pour un doublet de lentilles :

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{f_1} + \frac{1}{f_2} \implies \frac{-df}{f^2} = -\frac{df_1}{f_1^2} - \frac{df_2}{f_2^2} = -\frac{\Delta_1}{f_1} - \frac{\Delta_2}{f_2} \quad (2.3)$$

On a noté $\Delta_1 = \frac{df_1}{f_1}$ qui est une constante du matériau composant la lentille 1, de même pour 2. On cherche à avoir $df = 0$ et $f_1 + f_2 = f$, on a 2 contraintes et quatre paramètres sur lesquels on peut jouer. On choisit donc f_1 , f_2 et les matériau tels que :

$$\frac{f_1}{\Delta_1} = -\frac{f_2}{\Delta_2} \quad (2.4)$$

On choisit souvent une association verre crown et verre flint.

Aberration sphérique Ces aberrations apparaissent lorsque l'on sort des conditions de Gauss. Les prédictions de l'optique géométrique ne sont plus vraies. Les système devient astigmatique ainsi un faisceau parallèle ne convergera pas en un seul point. Pour corriger ça, il existe des lentilles asphériques.

Aujourd'hui ce ne sont plus les aberrations dues aux lentilles qui limitent la résolution des microscopes optiques mais la diffraction.

2.2 Limite de diffraction

En tant que système optique spatialement limité, le microscope est donc sujet aux phénomènes de diffraction. La monture circulaire de l'objectif joue le rôle de diaphragme et limite l'extension transversale du faisceau lumineux incident, il y aura donc de la diffraction.

L'image d'un point par l'objectif n'est donc plus un point mais une tâche d'Airy centrée sur l'image géométrique du point, de rayon $\rho = 1.22 \frac{\lambda L}{2R}$. L est la distance entre l'objectif et l'oeil et R le rayon de l'objectif.

Ainsi la capacité du microscope à former une image résolue de deux points proches est limitée. Cette limite de résolution est donnée par le **critère de Rayleigh** : deux objets ponctuels sont tout juste résolus si le maximum de la figure de diffraction de l'un correspond au premier minimum de la figure de diffraction de l'autre (faire le schéma).

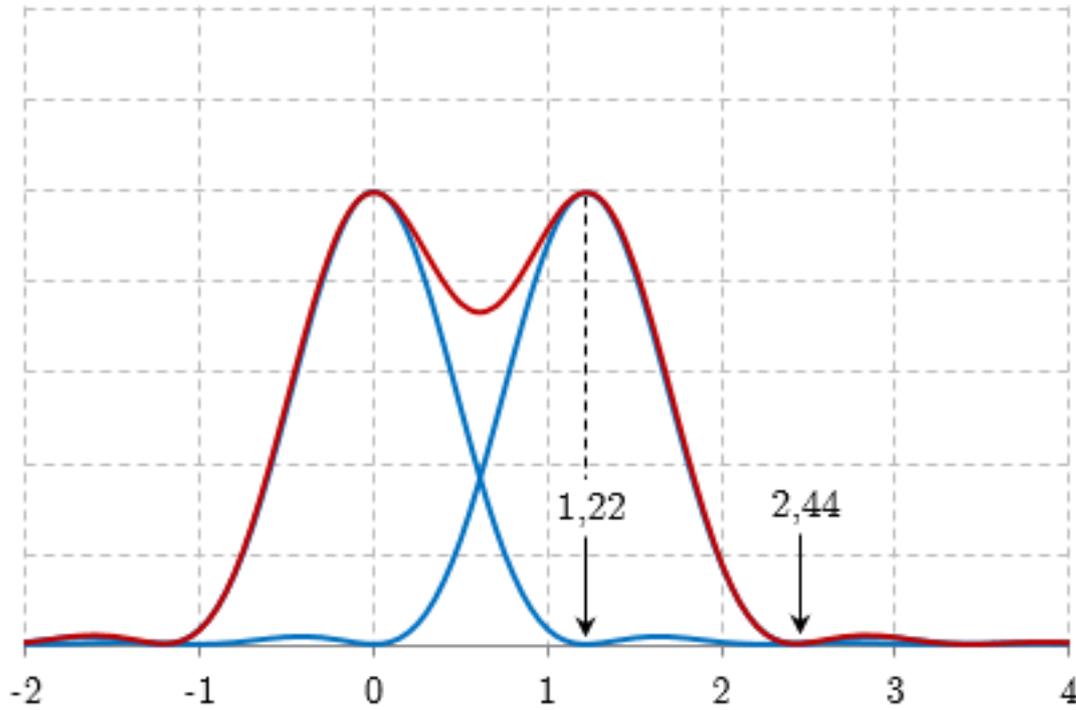


Fig. 2 : Profil d'intensité pour deux taches tout justes distinguables selon le critère de Rayleigh

La séparation angulaire correspondante est donnée par $\Delta\theta = \frac{1.22\lambda}{2R}$. On définit l'ouverture numérique du microscope O.N. en fonction de α_m l'angle maximum d'entrée dans le microscope, $O.N. = n \sin \alpha_m$.

Si l'on suppose le microscope aplanétique, on peut utiliser la condition d'Abbe pour déterminer la limite de résolution :

$$n\overline{AB} \sin \alpha = n\overline{A'B'} \sin \alpha' \tag{2.5}$$

Dans notre cas $\overline{A'B'} = \rho = \frac{0.61\lambda L}{R}$ et $\sin \alpha' \simeq \tan \alpha' = \frac{R}{L}$.

Ainsi :

$$\overline{AB}_{\min} = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha_{\max}} = \frac{0.61\lambda}{O.N.} \tag{2.6}$$

On peut augmenter cette limite en diminuant la longueur d'onde, on se retrouve alors vite limité par les bornes du domaine visible.

On peut augmenter cette limite en augmentant l'ouverture numérique, c'est le principe des objectifs à immersion. Pour un tel objectif on obtient une résolution spatiale de l'ordre de 200 nm (taille d'une grosse bactérie)

Pour observer des détails plus fins, il faut développer de nouvelles microscopies. Par exemple la microscopie en champ proche qui agit avant le champ lointain de diffraction.

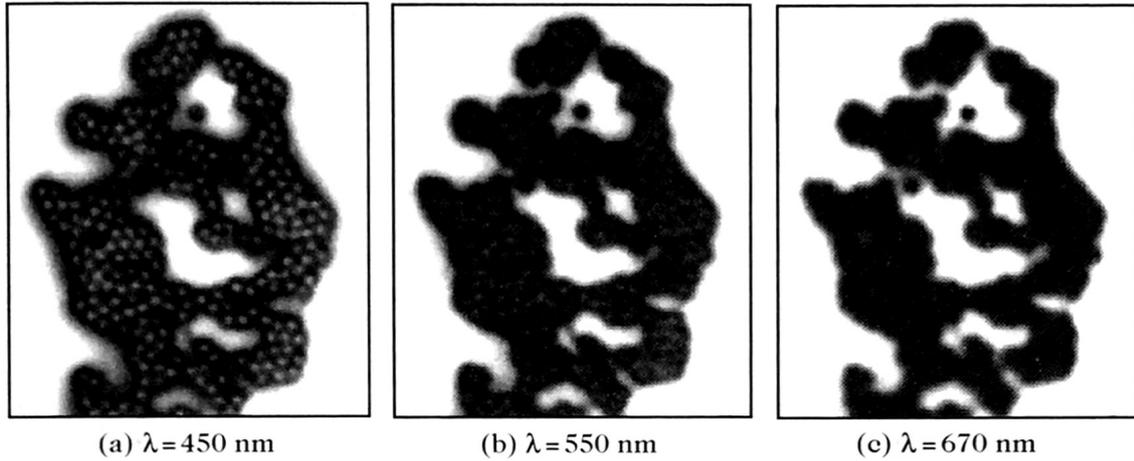


Fig. 3 : Billes de latex de 500 nm de diamètre recouvertes d'or observées au microscope optique à différentes longueur d'ondes.



3 Microscopie haute résolution moderne : microscopie en champ proche

Pour comprendre comment surmonter la limite de diffraction il est nécessaire de revenir à sa première origine et ainsi considérer la propagation d'ondes électromagnétiques.

3.1 Rappels sur la propagation des ondes électromagnétiques

Pour des soucis de simplicité on travaille dans le vide et sur l'amplitude scalaire du champ électrique. On considère que cette amplitude $E(x, y, z)$ est connue en $z = 0$ et on cherche à déterminer sa forme après cette position. Dans le vide on sait que cette amplitude satisfait l'équation d'Helmholtz :

$$\Delta E + \frac{\omega^2}{c^2} E = 0 \quad (3.1)$$

On définit la transformée de Fourier \hat{E} du champ E dans un plan à z fixé telle que :

$$E(x, y, z) = \iint \hat{E}(u, v, z) \exp(i(ux + vy)) du dv \quad (3.2)$$

Dans l'espace de Fourier l'équation de Helmholtz s'écrit donc ainsi :

$$\frac{\partial^2 \hat{E}(u, v, z)}{\partial z^2} + \left(\frac{\omega^2}{c^2} - u^2 - v^2 \right) \hat{E}(u, v, z) = 0 \quad (3.3)$$

On a donc une équation du second ordre en z dont la solution générale s'écrit :

$$\hat{E}(u, v, z) = A(u, v) \exp(iwz) + B(u, v) \exp(-iwz) \quad (3.4)$$

Avec :

$$\frac{\omega^2}{c^2} > u^2 + v^2 \implies w = \sqrt{\frac{\omega^2}{c^2} - u^2 - v^2} \quad (3.5)$$

$$\frac{\omega^2}{c^2} < u^2 + v^2 \implies w = i \sqrt{\frac{u^2 + v^2 - \omega^2}{c^2}} \quad (3.6)$$

Si l'on considère que le champ se propage dans le sens des z croissants uniquement alors la constante B est nulle et A apparaît comme la transformée de Fourier du champ E dans le plan $z = 0$, supposée connue.

Par transformée de Fourier inverse on a donc :

$$E(x, y, z) = \iint \hat{E}(u, v, 0) \exp(i(ux + vy + wz)) du dv \quad (3.7)$$

Le champ en tout point de l'espace est une superposition d'ondes planes obéissant à la relation de dispersion :

$$u^2 + v^2 + w^2 = \frac{\omega^2}{c^2} \quad (3.8)$$

Cette solution est la solution exacte du problème, on n'a pas encore évoqué de notion de champ proche ou lointain.

3.2 La propagation comme un filtre passe-bas :

Comme on le voit avec la décomposition en ondes planes, le poids de chaque onde plane de vecteur d'onde $\vec{k} = (u, v, w)$ correspond à la transformée de Fourier du champ dans le plan de l'objet en $(u, v, 0)$.

Or prendre la transformée de Fourier de $E(x, y, 0)$ revient à décomposer cette fonction connue en fréquences spatiales. La composante u de la TF correspond donc à $2\pi f_x$ avec f_x une fréquence spatiale du plan objet.

Si l'on n'a aucun objet dans le plan objet, la fréquence spatiale est nulle et le vecteur d'onde correspondant est $\vec{k} = (0, 0, \frac{\omega}{c})$.

Dans le cas où l'objet est un réseau de fentes selon l'axe y , écartées chacune d'une distance d selon l'axe x , la fréquence spatiale correspondante est $f_x = \frac{1}{d}$. Le vecteur d'onde correspondant est donc $\vec{k} = \left(\frac{2\pi}{d}, 0, \sqrt{\frac{\omega^2}{c^2} - \left(\frac{2\pi}{d}\right)^2} \right)$

Illustration : <https://www.geogebra.org/m/wfwjw5cx>

Plus la fréquence spatiale contenue dans le plan objet est grande, plus son vecteur d'onde dans le spectre d'ondes planes propagées s'éloigne de l'axe de propagation initial.

Les systèmes optiques comme le microscope à deux lentilles travaillent en champ lointain. Étant de taille finie ils ne vont pas pouvoir capter tous les vecteurs d'onde qui se propagent et en particulier ceux correspondant à de grandes fréquences spatiales donc à de petits détails. C'est pour cela que l'ouverture numérique intervient dans le critère de Rayleigh : l'angle maximum d'ouverture définit les vecteurs d'ondes que l'on peut possiblement capter.

Les ondes propageant l'information sur les trop hautes fréquences spatiales du plan objet vont être perdues pendant la propagation. On dit que cette dernière agit comme un filtre passe-bas.

Afin d'avoir une résolution spatiale importante il faut donc récupérer le plus de vecteurs d'onde possibles. On se dit qu'il suffit donc d'avoir une ouverture numérique très grande pour augmenter sa résolution. Cependant cette technique va avoir une limite. En effet lorsque la fréquence spatiale contenue dans le plan objet devient inférieure à la longueur d'onde, la composante w du vecteur d'onde devient imaginaire pur, ainsi on a une décroissance exponentielle de l'onde sur une distance caractéristique $1/|w|$. Si on veut résoudre un objet de 10 nm avec un laser rouge tel que $\lambda = 650$ nm on a $1/|w| \simeq 2$ nm, l'atténuation est extrêmement rapide.

Ainsi en champ lointain, même avec une ouverture numérique très grande, ces composantes ne pourront être détectées. Le seul moyen de surmonter le critère de Rayleigh et d'observer des détails de dimension inférieure à la longueur d'onde est de capter ces ondes évanescentes avant leur atténuation. C'est le principe de la microscopie en champ proche.

3.3 Microscopie en champ proche : sonde en mode collection par éclairage en réflexion

Les microscopies en champ proches, qui ne sont pas nécessairement optiques, s'efforcent à recueillir les ondes ne pouvant pas être recueillies par un système optique classique à l'aide d'une sonde. On a donc besoin de trois éléments :

Un émetteur qui émet un champ incident sur l'objet à observer, par exemple un laser

Un objet situé dans le plan objet

Un collecteur qui capte le champ proche diffracté par le plan objet

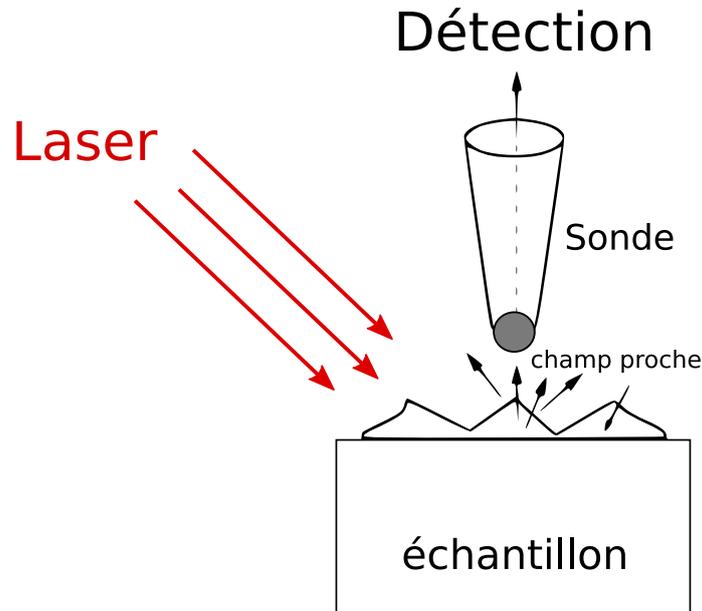


Fig. 4 : Principe de fonctionnement d'un microscope à champ proche

L'objet diffracte l'onde plane incidente émise par le laser et crée un champ proche sur quelques nanomètres. La sonde est une tige diélectrique dont le bout peut être une sphère diélectrique.

En présence du champ évanescent, la sphère se polarise et forme un dipôle oscillant qui rayonne dans le reste de la tige. Cette rayonnement peut être détecté par un détecteur en aval. On récolte ainsi des informations sur le champ proche et donc sur des échelles spatiales inférieures à la longueur d'onde.

La limite de résolution est alors la distance entre la pointe de la sonde et l'objet à observer :

$$d_{\text{lim}} = 2\pi L_{\text{sonde-objet}} \quad (3.9)$$

Pour pouvoir observer un objet de taille caractéristique 100 nm il faut placer la sonde à 15 nm de celui-ci.

Avec cette méthode des chercheurs de l'EPFL ont réussi à imaginer des brins d'ADN avec une résolution de quelques nanomètres seulement.

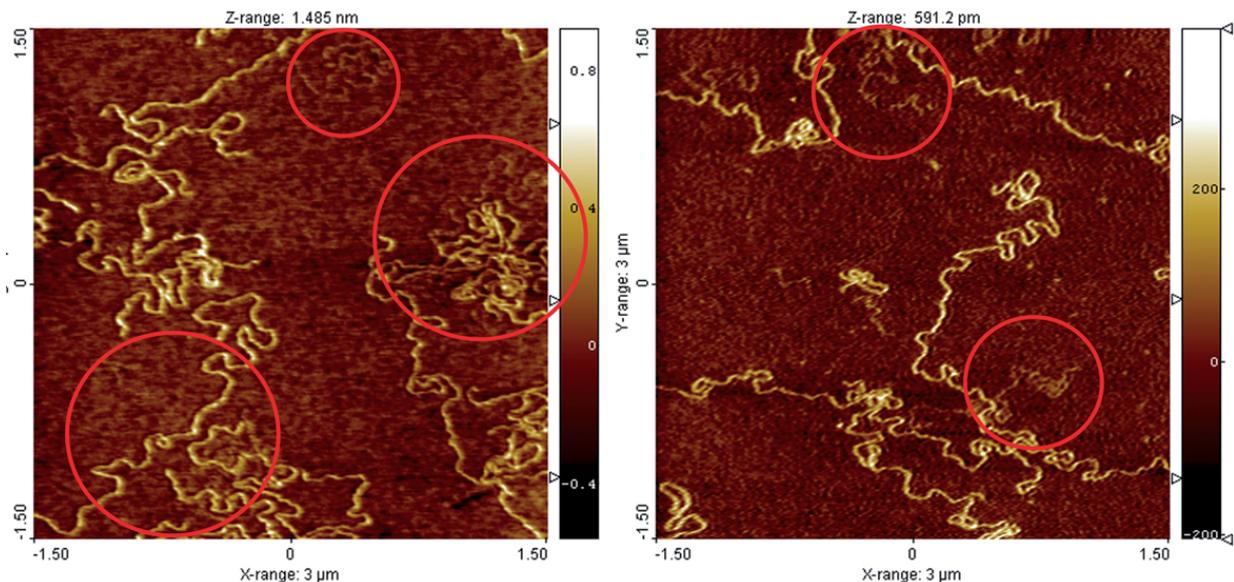


Fig. 5 : Image d'ADN double brin et simple brin faite avec un microscope en champ proche à l'EPFL

Conclusion

La microscopie optique est la microscopie la plus simple technologiquement parlant puisqu'elle exploite la puissance de notre système de vision, photosensible. Pour atteindre son objectif de résolution de détails toujours plus petits,

elle doit faire face aux aberrations chromatiques et géométriques d'abord et désormais on est confronté à la limite de diffraction qui force à trouver de nouvelles technologies comme la microscopie optique en champ proche qu'on a détaillée. On pourrait repousser cette limite de diffraction en utilisant des longueurs d'ondes plus petites par exemple avec des microscopes électroniques.

4 Questions et commentaires

4.1 Questions

-

4.2 Commentaires

-