LP32 - Microscopies optiques

29juin2020

Laura Guislain & Pascal Wang

Niveau :

Commentaires du jury

Bibliographie

\land Optique expérimentale, Houard

Prérequis

 \longrightarrow Microscope

Expériences

 \succ prérequis

🛎 Biréfringence du quartz

Table des matières

1	Miscroscope à deux lentilles	3
	1.1 Présentation	3
	1.2 Caractéristiques du microscope	4
	1.3 Limites du microscope à deux lentilles	5
2	Microscopie à fluorescence	7
	2.1 Principe de la fluorescence	7
	2.2 Microscope confocal	9
	2.3 Compter les marqueurs un par un : PALM	10
3	Microscope à champ proche	10
	3.1 Spectre d'ondes planes, ondes évanescentes	10
	3.2 Le STOM (scanning tunneling optical microscope	11
4	Microscope à contraste de phase	11
	4.1 Objets de phase	11
	4.2 Strioscopie (optionnel)	11
	4.3 L'imagerie par contraste de phase	12

Préparation

Préparation : s'entraîner à tracer les rayons sur le gros schéma, python pour la superrésolution

Questions : abberrations (correction sphérique 4P, cf. fiche), doublet achromatiques (pouvoir dispersif différent, divergent/convergent, flint/crown), condition des sinus d'Abbe (stationnarité des chemins, principe de Fermat, cf. Sayrin+schéma), pupilles, formule de l'ouverture numérique (grandeur constante par passage de dioptre), microscopie électronique (dispositif?)

Ressources : STOM https://publiweb.femto-st.fr/tntnet/entries/9911/documents/author/data, fluorescence https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy, vidéo qui explique le calcul https://www.youtube.com/watch?v=Rx2htdJiaZY

A faire

Regarder l'utilité des dioptres sphériques pour les abberrations géométriques. Lire Aigouy. Trouver de belles images pour les parties 2 et 3. Lire le Dettwiller instruments optique.

http://perso.ens-lyon.fr/vincent.martos/Agr%c3%a9gation/LP/Optique/14%20Microscopies%200ptiques/Champ% 20proche.pdf

Trouver une transition entre le 2 et le 3 (est ce que le STOM marche pour les objets de phases ?) Si il ne reste pas beaucoup de temps, faire la fluorescence plutôt que le contraste de phase ?

Laura te donne un lien : http://toutestquantique.fr/microscopes/ (videos explicatives sur les microscopes, photos ? tout sauf le champ proche).

A lire: https://www.photoniques.com/articles/photon/pdf/2012/06/photon201262p42.pdf

Introduction

Microscopie Du grec ancien *mikros* et *skopein* signifiant respectivement "petit" et "examiner", la microscopie désigne étymologiquement l'observation d'objets invisibles à l'oeil nu.

Pouvoir de résolution Ce besoin vient de la limite de résolution de l'oeil. **ODG:** $3 \cdot 10^{-4}$ rad soit une minute d'arc ou encore 1 mm pour un objet à 3 mètres de distance. On peut mettre l'échelle de comparaison

Microscopies On distingue principalement trois types de microscopies : la microscopie optique, la microscopie électronique et la microscopie à sonde locale. En microscopie optique et électronique, un faisceau lumineux ou un faisceau d'électrons interagit avec l'objet à observer et est recueilli par un détecteur (oeil, caméra...) alors qu'en microscopie à sonde locale, un capteur sonde directement la surface de l'objet.

Loupe On va s'intéresser aux microscopes optiques. Les premiers microscopes optiques étaient simplement constitués d'une seule lentille pour obtenir d'un objet rééel une image virtuelle agrandie : c'est la loupe. Inventée par les Grecs durant l'Antiquité, elle s'est perfectionnée au XVII ème siècle avec Galilée (1610), Hooke (1665) et surtout Van Leeuwenhoek (1674) qui a pérennisé son utilisation jusqu'au XIX ème siècle. A ce moment-là, le microscope à deux lentilles fut nécessaire pour augmenter la résolution des instruments d'optique.

1 Miscroscope à deux lentilles

1.1 Présentation

Présentation du microscope On montre la photo du microscope commercial, en pointant deux lentilles : l'objectif et l'oculaire, on fait le parallèle avec le schéma du tableau.

Objectif Le microscope à deux lentilles est constituée d'une première lentille appelée objectif, dont le but est de créer une image intermédiaire réelle inversée agrandie de l'objet AB. On fait le tracé au tableau L'indication x20 de l'objectif est la valeur absolue de son grandissement transverse γ_{ob} pour un microscope réglé i.e. une image intermédiaire dans le plan focal de l'oculaire, i.e. à une distance Δ de F'_{obj} . Le rayon est de qq mm. Un objectif de microscope est plus compliqué qu'une simple lentille (cf. abberrations et corrections). Mais on le modélise par une unique lentille. On prend un objectif de petite focale pour réduire l'encombrement et augmenter la résolution.

Oculaire La deuxième lentille est l'oculaire. Son but est de faire un effet loupe, c'est-à-dire d'obtenir une image finale virtuelle agrandie A'B' de l'image intermédiaire A_1B_1 . On fait le tracé au tableau L'indication x10 de l'oculaire est son grossissement commercial $G_{c,oc}$ défini par le rapport de l'angle sous lequel on voit un objet à l'infini à travers l'oculaire et celui sous lequel on voit ce même objet à l'œil nu à la distance minimale de vision distincte $d_m = 25cm$. Un oculaire est aussi plus compliqué qu'une simple lentille.

Bonus : zone d'insertion Les objectifs "corrigés à l'infini" utilisent une troisième lentille pour créer une zone dans laquelle on peut insérer tout ce qu'on veut sans modifier le chemin optique, ce que est très pratique pour mettre des polariseurs, des filtres colorés, etc, sans modifier le chemin optique

Ordres de grandeur En pratique, la focale de l'objectif est assez courte (entre 2 et 45 mm) pour limiter l'encombrement dans les microscopes commerciaux, ce qui nous oblige à placer l'objet très proche du plan focal objet de l'objectif. **ODG:** focale de l'objectif : entre 2 et 45 mm, focale de l'oculaire : entre 12,5 et 50 mm. Intervalle optique : 160 mm (standardisé, pour des raisons industrielles).

On fait un diagramme récapitulatif sur tableau

Tube/tourelle/revolver Les deux lentilles sont solidaires d'un même tube. L'intervalle optique Δ est fixé et standardisé à 160mm.

Bonus : lecture des caractéristiques d'un objectif Si on voit écrit : "60X/1,40 oil $\infty/0,17$ WD 0,21" sur l'objectif. Le grandissement, lorsque le microscope est correctement réglé "à l'infini", est de 60, l'ouverture numérique de 1,4, le milieu d'immersion est l'huile (optique), l'objectif est corrigé à l'infini, l'épaisseur de la lamelle couvre-objet doit être de 0,17 mm, La distance de travail (WD pour « working distance ») est de 0,21 mm. Alternativement (Sextant), si on lit "10/0,25-160/0.17", c'est en fait " $\gamma/O.N.-\Delta(mm)/e$ " où e(mm) est l'épaisseur de la lamelle couvre-objet.

Réglage et mise au point Le but d'un microscope étant avant tout d'observer des objets avec l'œil, il faut que l'image finale soit située en l'infini pour que l'oeil n'ait pas besoin d'accommoder et ainsi ne fatigue pas ses muscles. Pour cela, il faut déplacer l'objet de sorte que l'image intermédiaire doit se former dans le plan focal objet de l'oculaire, tel que les points A_1 et F_2 soient confondus. En pratique, on déplace la lame coincée sur la platine verticalement avec des vis.

Montage du microscope sur paillasse

Présentation (obsolète) Pour construire notre microscope, on a utilisé un objectif de focale $f_1 = 10$ cm et un oculaire de $f_2 = 20$ cm. On éclaire avec une lampe Quartz-Iode (et son filtre anti-calorique, on oublie pas les amis!) une lettre T de 0,9 cm de hauteur. L'image intermédiaire se forme dans le plan focal de l'oculaire : on place un diaphragme à cet endroit pour le mettre en évidence. En sortie, l'image se focalise en l'infini : l'image finale est donc nette sur le mur situé à deux ou trois mètres que l'on suppose être l'infini. Pour modéliser notre oeil, on peut placer une lentille de focale 30 cm au niveau du plan focal image de l'oculaire que l'on approximme comme étant le cercle oculaire de notre microscope. En plaçant un écran à 30 cm de la troisième lentille (ce qui correspond à focaliser notre image sur la rétine de l'œil), on retrouve bien une image agrandie dans l'œil, objectif principal du microscope.

Cercle oculaire Même si l'image est rejetée à l'infini, il est préférable de placer l'oeil à un endroit particulier pour observer l'image, c'est le cercle oculaire. Le cercle oculaire est l'image géométrique de la monture de l'objectif par l'oculaire. On le trace au tableau. Il contient donc le maximum de luminosité du système en sortie puisque tous les rayons lumineux entrant dans l'oculaire passent par lui. Il faut donc placer ce dernier au niveau du cercle oculaire pour collecter le maximum de lumière. On calcule le diamètre du cercle oculaire avec le théorème de Thalès : $D_c = D_1 f'_2 / (\Delta + f'_1) \sim 0.1 \text{mm}$, avec D_1 le diamètre de l'objectif., de qq mm. Le diamètre du cercle oculaire étant très inférieur devant celui de la pupille **ODG:** 0,1 mm \ll 1 mm, on récupère bien la totalité de la lumière). Pour la position, le cercle oculaire est très proche du point focal image de l'oculaire F'_2 (différence de l'ordre du millimètre), on va les confondre pour le reste de la leçon. On peut admettre l'ordre de grandeur et dire qu'on peut le déduire avec la formule de conjuguaison de Newton.

1.2 Caractéristiques du microscope

Cadre : conditions de Gauss On se place dans les conditions de Gauss, c'est-à-dire avec des rayons proches et peu inclinés par rapport à l'axe optique.

Jury : Souligner l'intérêt des grandeurs qu'on introduit : grandissement, grossissement, puissance intrinsèque.

Puissance Pour caractériser le pouvoir d'agrandissement, on connaît le grandissement transversal, qui est le rapport des hauteurs algébriques de l'image et de l'objet. Mais lorsque le microscope est réglé, l'image est à l'infini. A la place, on caractérise la "taille" de l'image à l'infini par son angle θ' . Cela conduit à introduire la puissance :

$$P = \frac{\theta'}{AB}$$

en m^{-1} ou dioptrie δ . On fait le calcul et on donne des ordres de grandeur.

Grossissement Alternativement, on peut utiliser la notion de grossissement commercial. On fait le calcul et on donne des ordres de grandeur.

Mesures de la puissance et du grossissement du microscope monté

Quantitativement, on peut calculer la puissance et le grossissement de notre microscope en mesurant la taille de l'image intermédiaire en plaçant un écran à son niveau. On compare aux ordres de grandeurs usuels.

Commentaires Le grossissement commercial des microscopes de paillasse varient entre 40 et 1000 : on voit donc que la valeur trouvée expérimentalement est très faible devant celles du commerce, ce qui semble logique puique les microscopes de paillasse ont des valeurs de focale spécifiques pour compenser un grossissement commercial acceptable et un encombrement minimal. Pourquoi n'a-t-on pas en pratique des microscopes de grandissement très élevé? Cela ne sert à rien si l'on ne peut pas résoudre correctement l'image. Cependant, le microscope à deux lentilles comporte comme tout système optique des limitations auxquelles il faut faire attention pour connaître la précision de notre système.

1.3 Limites du microscope à deux lentilles

Bonus : dioptre sphérique, points de Weierstrass Animation ménisque d'Amici Un dioptre sphérique entre deux milieux n et n' est rigoureusement stigmatique pour les points de sa surface, le centre C de la sphère (confondus avec leur image) ainsi que pour un doublet de points W et W', les points de Weierstrass, qui dépendent de R, n, n'.

Abberrations $\not=$ agreg A 2015 et correction. Pour avoir un grand champ il faut accepter de grands angles d'incidence, donc il va apparaître des abberrations géométriques et chromatiques. \checkmark Un microscope fonctionne en optique non-paraxiale. On peut corriger les abberrations chromatiques avec des doublets/achromats (objectifs de Lister). On peut limiter les abberrations géométriques avec des ménisque formés de deux dioptres sphériques (ménisque d'Amici). Dans ce ménisque, le centre C_1 du dioptre sphérique d'entrée est confondu avec le premier point de Weierstrass W_2 du dioptre de sortie. Le ménisque permet de rabattre les rayons vers l'axe optique en diminuant leur angle, ce qui permet de se rapprocher des condtions de Gauss pour le doublet achromat qui suit derrière. On pourrait montrer l'animation : http://ressources.univ-lemans.fr/AccesLibre/UM/Pedago/physique/02/optigeo/menisque.html En pratique, l'objectif d'Amici-Lister est constitué de 2 ménisques (donc 4 dioptres sphériques) + doublet achromatique de Lister. On montre le schéma sur diaporama. On doit mettre l'objet au centre C_1 du premier dioptre sphérique. L'oculaire est utilisé dans les conditions de Gauss, il reste donc seulement à le corriger d'éventuelles aberrations chromatiques L'utilisation de dioptres sphériques permet d'augmenter l'angle d'acceptation des rayons, ce qui augmente l'ouverture numérique O.N. donc augmente le pouvoir de résolution.

Limitation des abberrations par éclairage de Köhler 🗳 Super lien Une manière de limiter les aberrations simplement et d'augmenter la qualité des images est de faire attention à la manière dont on éclaire l'objectif. Pour ça on utilise généralement un éclairage de Köhler, monté de base sur les microscopes commerciaux. Il permet d'avoir un pinceau de lumière parallèle au niveau de l'objet d'étude en utilisant deux autres lentilles. Sous ces conditions, on montre sans grande difficulté que chaque point de l'objet est éclairé par chaque point de la source, ce qui explique l'uniformité apparente de l'éclairage. The primary advantage of Köhler illumination is the even illumination of the sample. This reduces image artifacts and provides high sample contrast. Even illumination of the sample is also critical for advanced illumination techniques such as phase contrast and differential interference contrast microscopy.

L'optique (lentille) I de l'illuminateur est éclairée très uniformément grâce à un dépoli mis juste après la lampe, situés quelques centimètres en retrait. L'éclairage de la préparation, par l'image de la lentille I (limitée par le diaphragme de champ DC) à travers l'optique (lentille) C du condenseur dans le plan de la préparation Pr est donc uniforme. Par contre, l'image du dépoli, de texture et d'éclairage plus ou moins uniformes, est formée dans le plan du diaphragme d'ouverture DO. Ce dernier étant par construction dans le plan focal objet de l'optique C du condenseur, l'image du dépoli est rejetée à l'infini et est donc le plus éloignée possible de la préparation.

Cette configuration possède des propriétés remarquables. Le diaphragme d'ouverture étant dans le plan focal du condenseur, la pupille de sortie du système (DO, C) est donc rejetée à l'infini (système télécentrique image). Ceci signifie que, en sus de recevoir le même éclairement, tous les points de la préparation sont éclairés par le même cône de lumière, ce qui, associé au caractère télécentrique objet de l'objectif du microscope, garantit une réponse photométrique identique pour tous les points du champ du microscope, ce qui est très important en pratique et serait difficile à obtenir dans d'autres configurations... De surcroît, l'éclairage Köhler permet de régler, de manière totalement indépendante l'une de l'autre, la taille du champ éclairé sur la préparation [contrôlé par le diaphragme de champ DC (Il est souvent utile, pour des problèmes de lumière parasite, de limiter la zone éclairée à celle vue ou même simplement étudiée par le microscopiste)] et l'angle du cône de lumière frappant chaque point de la préparation, ou, autrement dit, l'ouverture numérique de l'éclairage [contrôlé par le diaphragme d'ouverture DO (Ceci règle la quantité de lumière totale reçue mais aussi et surtout la manière dont se forme l'image finale de l'objet observé, par son influence sur la cohérence partielle de l'éclairage; voir la sous-partie « Cohérence de l'éclairage et limite de résolution » sur la formation des images en éclairage partiellement cohérent)]. L'éclairage Köhler assure par ailleurs, par conception même, la conjugaison des plans du diaphragme d'ouverture DO et de la pupille Pu de l'objectif. Il en va de même pour le plan du diaphragme de champ DC de l'éclairage et celui du diaphragme de champ Dc de l'oculaire. Par conséquent, l'éclairage Köhler n'introduit aucun vignettage et l'uniformité de l'illumination du champ observé peut effectivement être obtenue.

Notion de profondeur de champ Une première limitation du microscope à deux lentilles est la profondeur de champ ou latitude de mise au point. C'est la plage de distances objet-objectif pour laquelle l'œil, situé au niveau

du cercle oculaire, obtiendra une image nette de l'objet. De pratique, c'est la distance les deux positions extrêmes qui correspondent à la formation des images au niveau du punctum remotum et du punctum proximum de l'œil. On montre des photos pour comprendre ce qu'est la profondeur de champ.

Calcul de profondeur de champ On peut juste donner le diagramme et le principe de calcul au tableau.

La profondeur de champ ℓ diminue avec le grossissement, il faut faire un compromis.

ODG: avec les valeurs de grossissement commercial données précédemment, on a $\ell = 0, 16$ mm pour $G_c = 40$ et $\ell = 0, 25\mu$ m pour $G_c = 1000$.

Diffraction Cependant, une limite purement physique est à prendre en compte : la limite de diffraction. Une lentille d'ouverture circulaire forme à partir d'un objet ponctuel une appelle tâche d'Airy.

Illustration numérique de la tache d'Airy

On sort le script python ou en backup : http://ressources.univ-lemans.fr/AccesLibre/UM/Pedago/physique/ 02/optiondu/rayleigh.html

Tache d'Airy La tâche d'Airy étant représentée mathématiquement par une fonction de Bessel, la taille angulaire de la tache d'Airy correspond au premier zéro de la fonction de Bessel.

Critère de Rayleigh On ne peut distinguer deux objets différents dans un appareil que si les taches de diffraction sont distinctes. On peut considérer que c'est le cas si le maximum de l'une correspond au premier minima de l'autre : c'est le critère de Rayleigh. Autrement dit, deux pics sont séparables sur l'écran si la distance entre leur maxima est plus grande que le rayon de la tâche d'Airy.

Bonus : ouverture numérique La définition change selon les domaines : microscopie, fibre optique, laser. En microscopie, $O.N. = n \sin \theta_0$ où θ_0 est le plus grand angle d'entrée possible. Avec les lois de la réfraction, O.N. est une quantité invariante par passage de dioptre.

Limite de résolution en diffraction Concernant le microscope, on suppose que notre système est aplanétique donc respecte la condition des sinus d'Abbe. On calcule alors la limite de résolution du microscope. On fait le schéma sur diaporama

$r = 0.61\lambda/O.N.$

. En réalité, on a une limite à $1.22\lambda/(ON_{obj} + ON_{cond})$, où intervient également l'ouverture numérique du condenseur qui sert à éclairer le système.

Améliorations sur la limite de diffraction. À longueur d'onde donnée, pour améliorer la résolution, on peut augmenter l'ouverture numérique en augmentant sin α (objectif de grande ouverture) et/ou en augmentant n (objectif à immersion utilisant des huiles d'indice proche de celui des verres de l'objectif soit environ 1,5). Actuellement, on atteint des ouvertures numériques de l'ordre de 1.45. Pour un objectif sec (n=1), la meilleure résolution que l'on peut espérer est alors obtenu avec des radiations violettes de longueur d'onde 380 nm, ce qui donne une limite de résolution des microscopes optiques à objectif sec de l'ordre de $0, 61\lambda_{bleu} \sim 0, 23\mu m$.

A retenir : La limite de résolution est de l'ordre de la longueur d'onde. Le grossissement ne dépasse pas 5000 à cause de la diffraction.

Conclusion en vrac : compromis ouverture numérique/résolution/abberrations En microscopie au « fond clair », qui est la technique de base de la microscopie, l'illumination se fait par transmission en lumière blanche, c'est-à-dire que l'échantillon est illuminé par-dessous et observé par-dessus. La profondeur de champ, dans ce cas, va créer du « flou » ce qui limite la résolution de l'appareil. Dans ce cas, on veut limiter la profondeur de champ et être le plus proche possible de la résolution théorique : la limite de diffraction dans le plan d'observation. Pour limiter la profondeur de champ, on va chercher à avoir le diaphragme d'ouverture le plus ouvert possible, donc la plus grande ouverture numérique possible. Pour augmenter la résolution d'un microscope et diminuer la profondeur de champ, il faut augmenter son ouverture numérique et ça, ça détériore automatiquement l'image des champs un peu grand puisque l'on sort des conditions de Gauss. Donc il faut corriger les objectifs pour avoir des images résolues avec des champs importants. Après, quand on a une grande ouverture numérique (typiquement supérieur à 0,35), on sort des conditions de Gauss, puisque ça veut dire que l'on a des rayons ayant des angles importants avec l'axe optique qui rentrent dans l'objectif. Avec une seule lentille, on observe des aberrations géométriques sur le bord des images. En gros ce que l'on gagne en résolution, on le perd en qualité d'image. C'est pour cela que les objectifs sont des dispositifs optiques complexes qui couplent plusieurs lentilles afin de corriger toutes ces aberrations ; même si on les modélise

par une seule lentille convergente. Quand on fabrique un objectif, on s'arrange à ce que la correction optimale de ces aberrations soit à la distance standardisée à laquelle on place l'oculaire dans le microscope.

Avantages/limites de la microscopie en fond clair Les limitations de la microscopie au « fond clair » sont principalement qu'il faut travailler avec des échantillons minces et contrastés, sinon on ne voit pas grand-chose. En contrepartie, la technique est simple et l'échantillon ne nécessite qu'une préparation minime.

Profondeur de champ et photographie Quand on fait de la photo, en particulier de paysages ou de groupes, on cherche à avoir un maximum de profondeur de champ, donc à l'impression que des points qui sont dans des plans différents du plan objet conjugué au plan images ne sont pas trop flous, la contrepartie de ça est un manque de précision dans le plan image. Pour augmenter la profondeur de champ, il faut fermer le diaphragme d'ouverture.

Vrac : Objectif à immersion et lamelle couvre-objet (huile ou eau, mais généralement à huile) L'ouverture numérique de l'objectif est liée au rayon de l'objectif (qqs mm) et à la distance « objet-objectif » (de qqs mm au cm) qui fixent l'angle. Pour un angle de 20 deg, on commence déjà à avoir des problèmes d'aberration. Dans l'air, ces problèmes d'aberration sont amplifiés par le fait que quand un rayon sort d'un point de l'objet que l'on cherche à visualiser vers l'objectif, il passe d'abord par une lamelle de verre (le couvre objet). En entrant dans cette lamelle le rayon subit une première réfraction, puis il sort de la lamelle ce qui induit une seconde réfraction qui là tend à éloigner les rayons de l'axe optique (indice de l'air < indice du verre). Ceci conduit à une aberration sphérique sévère puisque les rayons quittant l'objet avec un grand angle paraissent se situer plus haut dans l'échantillon que ceux qui quittent l'objet avec un angle plus petit (donc plus haut que le point réel dont ils sont issus). On peut corriger cette aberration, mais cette correction n'est valable que pour un type bien précis de lamelle couvre objet car l'aberration introduite par la lamelle dépend de son épaisseur et de son indice. Donc, si les lamelles ont des défauts d'épaisseur, de quelques longueurs d'onde, la correction ne sera pas optimale. Plus le grandissement de l'objectif est important, plus cette aberration sphérique devient forte et difficile à corriger, et plus on est sensible au défaut des lamelles couvres objets. Donc, si utiliser un objectif à immersion au lieu d'un objectif à « sec » permet augmenter la valeur de « n » dans la formule $O.N. = n \sin(\theta)$ et donc la résolution, mais en prenant un liquide dont l'indice de réfraction et la dispersion sont identiques à ceux de la lamelle couvre-objet et de la lentille frontale de l'objectif (typiquement n = 1.515) ça permet aussi de supprimer l'aberration sphérique causée par le couvre-objet. L'adaptation des indices fait comme s'il n'y avait que du verre entre le couvre-objet et la lentille frontale de l'objectif; ça supprime la réfraction à la sortie de la lamelle. L'épaisseur du couvre-objet n'est alors plus critique et l'objectif devient aussi plus facile à construire puisqu'il ne nécessite plus d'avoir une forte aberration sphérique négative pour le corriger.

Dépasser la limite de diffraction Pour passer outre, plusieurs voies ont été étudiées et développées :

- changer la longueur d'onde en utilisant des rayons X ou des électrons.
- Utiliser des propriétés quantiques pour sonder la matière avec l'effet tunnel.
- sonde locale (AFM)
- superrésolution

Cette expression finale sur la résolution maximale du microscope met en avant ses limitations. La résolution est certes améliorée d'un facteur 100 par rapport à l'œil, mais elle est encore trop faible pour pouvoir observer des objets d'une taille inférieure au micron. On a une limite, si on veut observer un virus, comment on fait ? On a de nouvelles techniques qui dépassent la limite de Rayliegh. Nous allons donc voir dans une deuxième partie une autre approche de la microscopie qui nous permet de dépasser le critère de Rayleigh : la microscopie en champ proche. montrer une photo et dire qu'on veut encore zoomer plus dessus

2 Microscopie à fluorescence

2.1 Principe de la fluorescence

Fluorescence La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation des électrons d'une molécule (ou atome), généralement par absorption d'un photon immédiatement suivie d'une émission spontanée. Certaines substances, lorsqu'elles sont éclairées par une longueur d'onde donnée, émettent une lumière à une longueur d'onde plus élevée. Il peut y avoir des relaxations internes non radiatives, comme des transitions vibrationnelles. Le processus implique la dissipation d'énergie de la molécule vers ses voisines, il est donc interdit pour les molécules isolées. C'est notamment ce que l'on observe lorsque l'on utilise une "lumière noire", qui éclaire dans le bleu et l'ultraviolet. On peut alors voir que certains objets émettent une lumière d'une autre couleur, parfois très différente de leur couleur apparente en lumière blanche. Montrer des photos.

Bonus : fluochromes Un fluorochrome ou fluorophore est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore des molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons π . Le fluorochrome le plus utilisé est le Sybr-green, composé organique aromatique de formule chimique $C_{32}H_{37}N_4S$ faisant partie des cyanines asymétriques (fluorophores). On entend parler de rhodamine, fluorescine. Les fluorochromes sont utilisés dans plusieurs marquages immunologiques : cytométrie en flux, immunofluorescence. Les plus utilisés sont la phycoérythrine (PE), Fluorescéine isothiocyanate (FITC), la gamme d'Alexa Fluor, la Protéine fluorescente verte (green fluorescent protein, GFP).

Principe de la microscopie par fluorescence Dans toutes les microscopies à fluorescence, on procède ainsi :

- On ajoute dans l'échantillon des fluorochromes, molécules capable d'absorber la lumière à une certaine longueur d'onde λ_1 et de réémettre ensuite par émission spontannée à λ_2
- On envoie de la lumière à λ_1 sur l'achantillon. The most common lamps are mercury burners, ranging in wattage from 50 to 200 Watts, and the xenon burners that range from 75 to 150 Watts. An unfortunate consequence of low emission levels in most fluorescence microscopy applications is that the number of photons that reach the eye or camera detector is also very low. In most cases, the collection efficiency of optical microscopes is less than 30 percent and the concentration of many fluorophores in the optical path ranges in the micromolar or nanomolar regions. In order to generate sufficient excitation light intensity to produce detectable emission, powerful compact light sources, such as high-energy short arc-discharge lamps, are necessary. In the past few years, optical microscopy has experienced an increase in the application of laser light sources, particularly the argon-ion and argon-krypton (ion) lasers. These lasers have the virtues of small source size, low divergence, near-monochromicity, and high mean luminance.
- On observe la lumière réémise à λ_2 On obtient ainsi une cartographie de l'emplacement des fluorochromes...

L'avantage est que l'on peut choisir de localiser certaines zones (par exemple les fluorochromes se fixent sur la membrane d'un virus). Par contre, on a toujours nos problèmes de profondeur de champ et de limite de diffraction.

Miroir dichroïque La microscopie par fluorescence va chercher à suivre la présence de tels composés, dans une cellule par exemple. Elle a été rendue possible par le développement de miroirs dichroïques, qui fonctionnent à la manière de filtres interférentiels, et sont capables de réfléchir ou de transmettre sélectivement certaines longueurs d'onde. Structurellement, les miroirs dichroïques font partie de la famille des miroirs diélectriques et des lames à faces parallèles. Structurellement, un miroirs dichroïques est un miroirs diélectriques / une lame à faces parallèles/un Fabry Pérot.

Fonctionnement du microscope Le fonctionnement du microscope est alors donné par le schéma suivant On montre un schéma.

Fluorophores On observe toujours la même région que celle que l'on éclaire, mais on n'observe que la couleur réémise par fluorescence, et non la couleur qui nous sert à éclairer l'échantillon. Ainsi, on ne va observer que les molécules qui sont fluorescentes dans l'échantillon. Selon les cas, il peut s'agir de molécules naturellement présentes (chlorophylle par exemple, on parle de fluorescence primaire) ou au contraire de marqueurs fluorescents que l'on a ajouté à l'échantillon car ils peuvent se fixer spécifiquement à une région d'intérêt (fluorescence secondaire). En utilisant divers marqueurs qui ont des propriétés de fluorescence différentes, on peut alors reconstruire l'intérieur d'une cellule avec une meilleure visibilité sur "où se trouve quoi".

Limitation par la diffraction Cependant, la microscopie par fluorescence reste limitée par la diffraction, comme toutes les microscopies optiques. Cela signifie qu'en général, on va avoir des dizaines (voir des milliers) de centres actifs qui vont être dans la même tache d'Airy, quand bien même leur taille serait bien plus petite, et on sera incapable de les voir indépendamment.

Excitation monophotonique, multiphotonique On peut exciter les substances fluorescentes par une excitation monophotonique. On utilise pour cela une lumière d'excitation dont la longueur d'onde excite directement le fluorophore. Donc, la fluorescence émise peut provenir de toute l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau d'excitation. L'élément clé de ce microscope confocal est alors représenté par une "fenêtre" (un sténopé ou un iris confocal) placée devant le détecteur qui élimine la fluorescence provenant des régions non focales.

L'excitation multiphotonique consiste en l'absorption quasi simultanée de plusieurs photons d'excitation d'une longueur d'onde proche d'un multiple de l'excitation optimale à un photon. On utilise pour cela un laser pulsé dans des fréquences proches de l'infrarouge. Dans ce cas, seul le point de focalisation du faisceau laser est excitateur (densité de photon suffisante pour coupler l'énergie d'excitation). Bien souvent les applications sont limitées à la microscopie biphotonique (excitation du fluorophore par deux photons).

Ce système est considéré comme une évolution technologique importante pour trois raisons majeures :

Il n'existe pas d'iris confocal (sténopé) dans un microscope biphotonique. On ne peut donc plus parler de microscopie confocale, bien qu'on emploie quelquefois le terme de microscopie confocale multiphotonique de manière abusive. L'utilisation d'une lumière d'excitation à une longueur d'onde élevée (> 900 nm) assure une plus grande pénétration à l'intérieur de l'échantillon (jusqu'à 500 μ m au lieu de 150 μ m) offrant la possibilité de travailler sur des échantillons plus épais. L'excitation des fluorophores étant limitée au point de focalisation du faisceau laser, le risque de photoblanchiement est réduit.

Bonus : microscope de fluorescence par réflexion totale interne Le microscope de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF, total internal reflection fluorescence microscopy), ou microscope à onde évanescente, est un type particulier de microscope optique à fluorescence permettant d'examiner une tranche très fine d'un échantillon. **ODG:** moins de 200 nm d'épaisseur, contre 600 nm de profondeur de champ en confocal, grâce à un mode d'illumination particulier : la réflexion totale interne.

En biologie cellulaire, un grand nombre d'évènements moléculaires intervenant à la surface des cellules comme l'adhésion cellulaire, la fixation d'hormones sur des récepteurs de la membrane plasmique, la sécrétion de neurotransmetteurs ainsi que la dynamique membranaire (endocytose, exocytose) ont été étudiés en microscopie de fluorescence conventionnelle ou confocale. Cependant, il existe un état d'équilibre entre les molécules fluorescentes qui se lient à la surface du spécimen et celles présentes dans son environnement immédiat. Lorsque ces molécules sont excitées et leur fluorescence détectée par un microscope conventionnel, la fluorescence provenant des molécules liées est mélangée avec la fluorescence provenant des molécules libres qui sont généralement largement excédentaires.

La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne permet de surmonter ce problème. Le principe de cet appareil est de n'exciter la fluorescence que sur une très faible profondeur, immédiatement adjacente à l'interface verre (support de l'échantillon)/eau (milieu environnant l'échantillon). L'excitation est due à une onde évanescente. Celle-ci est générée uniquement quand la lumière incidente est totalement réfléchie à l'interface verre / eau, ce qui ne se produit que pour un certain angle d'incidence : l'angle critique, c'est la réflexion totale interne. L'échantillon est alors soumis à un champ électromagnétique sur une faible profondeur au-delà de la surface (environ 200 nm). L'intensité d'excitation de la fluorescence décroît exponentiellement en fonction de la distance par rapport à la surface. On peut ainsi en TIRFM visualiser de manière très sélective les régions de contact de la cellule avec son support (membrane basale). Il est ainsi possible d'étudier avec une très grande résolution la morphologie ou les évènements intervenant à la membrane plasmique de cellules vivantes.

2.2 Microscope confocal

Limite du microscope classique En microscopie optique à champ large, pour qu'une image soit nette, il faut que l'objet soit dans le plan focal du système optique. Lorsqu'un objet est épais, présente un relief important, ou bien lorsqu'il est incliné par rapport à l'objectif, seule une partie de l'objet est nette dans l'image (faible profondeur de champ). De plus, plus le grossissement est élevé, plus cette profondeur est faible, ce qui empêche d'avoir une image nette sur la totalité d'un objet un peu étendu. Ceci est particulièrement ennuyeux pour les objets allongés comme les nerfs; ils sont donc flous sur une partie de leur trajet quelle que soit l'habileté du préparateur.

Principe Pour résoudre ce problème, on éclaire la surface non plus par un faisceau de lumière blanche, produite par une lampe, mais par un faisceau laser, concentré par une lentille (identique avec l'objectif optique), qui balaie la surface en positionnant un sténopé (pinhole en anglais) devant le détecteur, dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif (plans confocaux). De cette manière, seuls les photons provenant du plan focal passent le sténopé et participent à la formation de l'image, d'où le nom « confocal » (synonyme de monofocal).

La lumière provenant des plans adjacents (floue) est arrêtée par les bords du trou. Il est ainsi possible d'obtenir une coupe optique nette correspondant uniquement au plan focal. En faisant varier ce plan on obtient une succession de coupes donnant des informations nettes et précises dans les trois dimensions de l'objet observé.

Reconstitution 3D Un microscope confocal, appelé plus rarement microscope monofocal, est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques ». En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. L'objet n'est donc pas directement observé par l'utilisateur; celui-ci voit une image recomposée par ordinateur.

Résolution 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. Ceci mène à une résolution latérale légèrement meilleure (180-160 nm) à celle attendue pour un

microscope optique conventionnel (200 nm). La résolution en Z (profondeur) est de l'ordre de 600 nm en microscopie confocale.

2.3 Compter les marqueurs un par un : PALM

Je pense qu'un programme numérique permettrait de manière très efficace d'illustrer de manière pédagogique cette partie. Il convient de fabriquer une image en utilisant un générateur aléatoire en python, de flouter l'image pour mettre en évidence la diffraction puis de repérer les centres. En répétant cette opération, nous obtenons l'image initiale.

Superrésolution Si plusieurs taches d'Airy se superposent, on ne peut pas résoudre l'image. Notre but va donc être de faire en sorte de n'avoir à chaque instant que très peu de marqueurs actifs dans l'échantillon pour que les taches d'Airy se superposent peu. Ensuite, quand on a une tache d'Airy individuelle, on peut fitter la distribution d'intensité de la tache par un profil auquel on s'attend pour trouver son centre. On peut atteindre une précision sur le fit qui est sub-longueur d'onde et sub-pixel. En fait, on fait une déconvolution d'une gaussienne 2D.

Principe du PALM Pour cela, on a développé une technique appelée PALM (Photoactivated localization microscopy), basée elle-même sur le principe de RESOLFT (reversible switchable optical fluorescence transitions). Cette technique (RESOLFT) correspond au développement de marqueurs fluorescents qui sont inactifs dans leur état fondamental (état «off») mais actifs dans un état excité («on»). On peut passer de l'état «off» à l'état «on» par l'absorption d'un photon de longueur d'onde λ_{off-on} . Seul l'état «on» peut participer à la fluorescence en absorbant des photons de longueur d'onde λ_0 .

Etapes de la technique PALM La technique PALM est alors la suivante :

- Photoactivation. On éclaire un échantillon contenant des marqueurs dans l'état «off» pendant un temps très court avec la longueur d'onde λ_{off-on} . Quelques marqueurs passent dans l'état activé «on».
- Fluorescence Avant que ces marqueurs ne retournent à l'état «off» (transition rapide), on soumet l'échantillon à un éclairage à la longueur d'onde λ_0 , ce qui entraîne la fluorescence des quelques marqueurs activés.
- *Fitting* L'image obtenue ne contient que quelques taches d'Airy. Statistiquement, il n'y aura qu'un marqueur par tache dans ce cas, car on peut être quasiment être dans la limite où un seul marqueur a été activé. On peut alors effectuer un ajustement de l'image obtenue par la forme attendue pour la figure de diffraction afin de trouver son centre.
- on laisse les marqueurs revenir sous leur forme «off». En vrai, on va souvent faire du photobleaching sur l'échantillon à chaque étape, ce qui va faire passer les marqueurs déjà activés dans un troisième état qui ne participe plus du tout à la fluorescence. Un fluorophore peut perdre sa fluorescence en entrant dans une réaction chimique lorsqu'il est excité. Photobleaching is the irreversible decomposition of the fluorescent molecules in the excited state because of their interaction with molecular oxygen before emission. Comme ça, on est sûr de ne pas compter deux fois le même. For fluorescein in an oxygenated saline solution, measurements indicate that each molecule can only emit about 36,000 photons before being destroyed. In a deoxygenated environment, the rate of photodestruction diminishes about tenfold
- On recommence l'opération autant de fois que nécessaire. Les marqueurs activés seront différents à chaque fois, ce qui permet de retrouver la position de tous les marqueurs présents dans l'échantillon.

Ordre de grandeur As discussed above, a single fluorescein molecule could emit as many as 300,000 photons before it is destroyed by photobleaching. Assuming a 20-percent collection and detection efficiency, about 60,000 photons would be detected. Using avalanche photodiode or electron multiplying CCD detectors for these experiments, investigators have been able to monitor the behavior of single molecules for many seconds and even minutes. The major problem is adequate suppression of the optical background noise. Because many of the materials utilized in construction of microscope lenses and filters display some level of autofluorescence, efforts were initially directed toward the manufacture of very low fluorescence components.

3 Microscope à champ proche

3.1 Spectre d'ondes planes, ondes évanescentes

En microscopie en champ proche, on suppose que la lumière est une onde électromagnétique. En partant de ce principe, le but est de récupérer l'information sur les détails les plus infimes de notre objet à analyser en s'intéressant aux ondes que l'on appelle évanescentes, par opposition aux ondes propagatives.

Cette zone pour laquelle les ondes évanescentes ne sont pas négligeables est appelée champ proche.

Mise en évidence des ondes évanescentes à l'interface plexiglas-air

Vidéo https://www.youtube.com/watch?v=3gGtm67daTc On a une réflexion interne totale à l'interface verre-air. On peut récupérer l'onde évanescente avec un deuxième prisme lorsqu'on le presse assez fort.

On considère un demi-hémisphère en plexiglas dans lequel on envoie un laser vert $\lambda = 532$ nm. On se place en réflexion totale à la sortie de l'interface plexiglas-air tel que l'angle de réflexion totale. On peut alors montrer le calcul que des ondes évanescentes sont présentes à la sortie de l'interface plexiglas-air. Les ondes évanescentes ne se propagent pas, mais on peut quand même les observer si on rapproche suffisamment près un demi-hémisphère en plexiglas de l'interface plexiglas-air. A ce moment-là, les ondes évanescentes se propagent dans le deuxième hémisphère de plexiglas par effet tunnel optique, analogue à l'effet tunnel quantique. On peut donc avoir une propagation des ondes évanescentes dans un milieu! ATTENTION On s'intéresse dans cette leçon aux microscopies OPTIQUES : il faut donc dans cette expérience utiliser une lumière de longueur d'onde VISIBLE pour qu'elle soit pertinente (la mise en évidence d'ondes évanescentes centimétriques est certes plus simple car la décroissance exponentielle est moins violente, mais elle est complètement hors-sujet).

Importance des ondes évanescentes : pour avoir accès aux détails de l'objet à étudier, il faut pouvoir capter les hautes fréquences spatiales et donc les ondes évanescentes du champ.

3.2 Le STOM (scanning tunneling optical microscope

[schéma][photo d'application en biologie]

Principe Le principe du STOM est le même que celui de l'expérience précédente, en remplacçant le deuxième hémisphère de plexiglas par l'objet à étudier, fixé sur le premier hémisphère de plexiglas. Par effet tunnel optique, les ondes incidentes se propagent à l'intérieur de notre objet qui a remplacé le deuxième hémisphère de plexiglas. En sortie de l'objet, les ondes propagatives sont alors modifiées par le coefficient de transmission de l'objet comme expliqué dans la sous-partie précédente. Il est alors possible d'accéder aux détails de l'objet en récupérant les ondes évanescentes à la sortie de l'objet. Pour cela, il faut placer une sonde en champ proche, qui capte ces ondes évanescentes et les transmet jusqu'au détecteur situé en champ lointain. On utilise souvent une fibre optique de la sonde au détecteur qui rend l'onde évanescente propagative. On peut utiliser des nanodiffuseurs qui diffusent (propagativement) les ondes évanescentes, pour être captée par un détecteur en champ lointain.

Résolution Le STOM n'est pas limité par la diffraction donc peut théoriquement résoudre des détails plus petits que la longueur d'onde. Pour résoudre un détail de taille d, on doit capter l'onde évanescente telle que $k_z = 2\pi/\delta$ qui s'atténue sur une longueur caractéristique δ . Donc la limite de résolution du STOM est donnée par la distance entre la sonde et l'objet, fixée par les limites techniques prennent. En effet, réussir à conserver une distance constante entre la sonde et l'objet est très compliqué et demande de stabiliser la position de la sonde par un système piézoélectrique. **ODG:** En pratique, la limite de résolution est de l'ordre de la dizaine de nanomètres voire du nanomètre.

Application [montrer un exemple]

4 Microscope à contraste de phase

4.1 Objets de phase

Les objets caractérisés par des variations d'indice ou d'épaisseur sont appelés «objets de phase». Ces objets, parfaitement transparents, ne présentent pas de contraste avec le champ qui les entoure, c'est-à-dire qu'ils sont invisibles par les méthodes d'imagerie ordinaires, car ils sont caractérisés seulement par des variations du chemin optique et non par des variations d'amplitude (|t(X,Y)| = 1). Sans rien faire, l'éclairement est donc uniforme sur l'écran d'observation.

4.2 Strioscopie (optionnel)

On se place dans le cadre de la diffraction de Fraunhofer. Sans écran dans le plan de Fourier, la vibration lumineuse sur l'écran d'observation est

$$s = s_0 e^{i\phi} \tag{1}$$

où ϕ est la phase introduite par l'objet de phase au point considéré. On peut toujours décomposer la vibration lumineuse selon

$$s = s_0(e^{i\phi} - 1) + s_0 \tag{2}$$

où le deuxième terme est l'onde directe est le premier l'onde diffractée. S'il n'y a pas d'objet de phase, l'éclairement est uniforme, sans déphasage, soit une vibration lumineuse $s = s_0$. Si on bloque les très basses fréquences spatiales dans le plan de Fourier, alors on retire s_0 de la vibration lumineuse sur l'écran d'observation (les ondes non diffractées), et on obtient finalement une vibration

$$s = s_0(e^{i\phi} - 1) \tag{3}$$

Si on suppose que la phase ϕ est faible devant 2π , alors $e^{i\phi} - 1 \approx i\phi$, d'où l'expression de l'intensité lumineuse sur l'écran d'observation

$$I = I_0 \phi^2 \tag{4}$$

On observe donc les variations de phase sur un fond noir $(I = 0 \text{ si } \phi = 0)$: le contraste est maximal et toujours égal à 1. L'inconvénient de cette méthode est la faible intensité des images obtenues : si ϕ est petit, ϕ^2 l'est plus encore ! De plus, on n'a accès qu'à la norme de ϕ , et son signe reste inconnu.

4.3 L'imagerie par contraste de phase

(Zernike, PN 1953) est une autre technique permettant de remonter au signe de la phase. Au lieu d'avoir un petit écran opaque au foyer de la lentille, on place une petite lame à retard $\lambda/4$ introduisant un déphasage de $\pi/2$. Si l'on introduit la lame $\lambda/4$, alors les ondes non diffractées accumulent une phase $\pi/2$ supplémentaire et alors

$$s = s_0(e^{i\phi} - 1) - is_0 \approx s_0 i(\phi - 1) \tag{5}$$

en supposant une nouvelle fois que la phase ϕ petite. Il faut donc travailler avec une onde monochromatique. d'où une intensité

$$I = I_0(1 - 2\phi) \tag{6}$$

car ϕ^2 est négligeable. On peut donc mesurer directement ϕ avec cette méthode. On a ici une image avec un contraste égal à 2ϕ (d'où le nom de la technique). Contrairement à la strioscopie, le contraste donc faible. On peut toutefois augmenter la sensibilité en rendant la lame de phase absorbante. Supposons qu'elle réduise l'intensité de la lumière directe par un facteur β , on a alors

$$I = I_0 (1/\sqrt{\beta} - \phi)^2 \approx I_0 / \beta (1 - 2\phi\sqrt{\beta})$$
(7)

et donc un contraste $C = 2\phi\sqrt{\beta}$. Le contraste est multiplié par $\sqrt{\beta}$. L'imagerie par contraste de phase est employée en microscopie. Les microscopes à contraste de phase sont utilisés dans les laboratoires de biologie car ils permettent d'étudier les objets vivants sans les colorer et donc sans les tuer.

[trouver des photos]

Remarque Les images observées par contraste de phase possèdent un certain halo autour des détails. Ce halo est dû à la diffraction : le second pic de la tache d'Airy est déphasé de π par rapport au pic principal, et au lieu d'interférer destructivement il interférera constructivement, pour former une zone plus claire.

Conclusion

Dans cette leçon, nous avons pu voir le concept de microscopie optique, ses caractéristiques et sa principale limite à savoir le critère de résolution. Ce dernier a évolué au fil des siècles pour nous permettre aujourd'hui de dépasser le critère de Rayleigh et d'attendre des détails de nos systèmes de plus en plus faibles (voir le tableau 11). Aujourd'hui, les techniques de microscopie se sont largement élargies au domaine non optique (micro-scope à effet tunnel analogue à celui présenté en deuxième partie, microscope à balayage, microscope à force atomique...). Chaque technique est adaptée à une limitation expérimentale particulière et nous permet d'atteindre des résolutions de l'ordre du dixième de nanomètre. Les microscopes actuels les plus avancés permettent d'observer les atomes [photo?]

Ouverture :

Compléments/Questions

Microscope confocal et fluorescence

Un microscope confocal, positionne le plan focal objet de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon. En réalisant des séries d'images, on obtient une représentation 3D de l'objet après traitement informatique. PALM.

Microscopies

- Microscopie en champ sombre et microscopie par contraste de phase qui sont toutes les deux basées sur du filtrage spatiale(application de la diffraction)
- Microscope à contraste interférentiel qui est basé sur des interférences

Microscopie en fluorescence On peut le diviser en quatre exemples

- Microscopie en fluorescence classique, juste avec des fluorophores, un éclairage à la bonne longueur d'onde et des filtres devant le détecteur. C'est obligatoire.
- Microscope confocale (qui en fait n'est pas obligatoirement en fluorescence, mais très majoritairement). Dans le cas en fluorescence, tu viens focaliser la lumière d'excitation des fluorophores en un point précis de l'échantillon et ensuite tu utilises un diaphragme de champ devant le détecteur pour sélectionner une toute petite partie de la zone éclairée. Avantage, on a une très bonne résolution de l'endroit d'où vient la fluorescence en scannant l'échantillon en x, y et z on arrive à reconstruire précisément une image 3D de ce que l'on veut observer.
- La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF en anglais), qui est joli problème puisque l'on mélange microscopie et ondes évanescentes. C'est peut-être un peu exotique car ça sert uniquement pour regarder des choses près d'une surface de verre (max 500 nm de profondeur) sans être pollué par la fluorescence de volume de l'échantillon.
- Le PALM, c'est une technique de super résolution qui permet de passer sous la limite de diffraction.

Microscopie électronique

Un microscope électronique (ME) est un type de microscope qui utilise un faisceau d'électrons pour illuminer un échantillon et en créer une image très agrandie.

Le microscope électronique utilise des lentilles électrostatiques et électromagnétiques pour former l'image en contrôlant le faisceau d'électrons et pour le faire converger sur un plan particulier par rapport à l'échantillon. Le principe est similaire à celui du microscope optique qui utilise des lentilles en verre pour focaliser la lumière sur ou au travers de l'échantillon pour former une image.

La forme originale de microscope électronique, le microscope électronique en transmission (MET) utilise un tungstène comme cathode source d'électrons. Le faisceau d'électrons est accéléré par une anode en général à 100 keV (40 à 400 keV) par rapport à la cathode, concentré par des lentilles électrostatiques et électromagnétiques, et transmis sur la cible qui est en partie transparente pour les électrons et en partie les disperse. Quand il ressort de l'échantillon, le faisceau d'électrons comporte des informations sur la structure de l'échantillon qui sont amplifiées par le système de lentilles de l'objectif du microscope. La variation spatiale de cette information (l'«image») est vue par projection de l'image électronique agrandie sur un scintillateur, tels que le sulfure de zinc ou le phosphore. L'image peut être enregistrée photographiquement par l'exposition d'un film ou une plaque photographique directement sur le faisceau d'électrons ou une plaque phosphorée à haute résolution peut être couplée au moyen d'un système optique ou d'une fibre optique vers le capteur d'une caméra CCD (Charge-Coupled Device). L'image détectée par le CCD peut être affichée sur un moniteur ou dirigée vers un ordinateur.

La résolution est limitée essentiellement par l'aberration sphérique, mais une nouvelle génération de correcteurs sphériques augmente la résolution. Le logiciel de correction de l'aberration sphérique pour le MET à haute résolution (HRTEM) a permis la production d'images avec une résolution suffisante pour montrer les atomes de carbone dans des diamants, séparés par seulement 0,89 Ået les atomes de silicium à 0,78 Å au grossissement de 50 millions de fois

Miscroscopie à force atomique

La technique AFM exploite l'interaction (attraction/répulsion) entre les atomes de l'apex nanométrique d'une pointe et les atomes surfaciques d'un échantillon. **ODG:** résolution dépend du rayon de courbure de la pointe/l'apex, résolution latérale 10 nm, résolution verticale 0.1 nm, on voit les marches atomiques.

Mesure de flexion par réflexion laser Le microscope à force atomique permet donc de balayer la surface d'un échantillon grâce à une pointe très fine, positionnée à l'extrémité libre d'un micro-levier flexible, pouvant se déplacer dans toutes les directions de l'espace, grâce à un tube piézoélectrique. L'analyse des flexions du micro-levier permet de déterminer l'exact parcours de la pointe, ainsi que la mesure des forces d'interactions intervenant entre elle et l'échantillon. On mesure la déviation via réflexion d'un laser. Quand le faisceau n'est pas dévié, il frappe au centre d'un quadrant de photodiodes, et donc illumine également les 4 photodiodes. Si le faisceau laser vient à être dévié vers le haut, les deux photodiodes du haut recevront plus de lumière que celles du bas, et il apparaît donc une différence de tension.

Nano-tribologie : L'intérêt de la mesure par laser est essentiellement la facilité de mise en œuvre, mais elle permet aussi d'accéder à une mesure secondaire qui est celle de la friction. En effet, la pointe balaie la surface à une certaine vitesse ; à partir du moment où elle est en contact, ceci génère des frottements, et donc infléchit le levier autour de son axe. Cette déviation implique une différence de tension non plus entre le haut et le bas du quadrant, mais entre la droite et la gauche. On peut ainsi avoir accès aux forces de frottement existant entre la pointe et la surface, et donc de façon qualitative à la nature chimique de la surface.

Passage

Plan

Prérequis. Optique géométrique (lentilles convergentes, conditions de Gauss, formation des images, aplanétisme). Effet tunnel. Transformée de Fourier.

I) Le microscope à deux lentilles. A. Description et caractéristiues. B. Limites du miscroscope à 2 lentilles. II) Le microscope à champ proche. A) Rappel sur les ondes évanescentes. B) Le STOM.(scanning tunneling optical microscopy).

Introduction. Définition de la microscopie : technique d'imagerie d'objets plus ou moins petits. 1er microscope : l'oeil. Constitué d'une lentille, le cristallin, d'un écran, la rétine. Parallèle sur Geogebra. La distance cristallin-rétine est fixée. Par la loi de conjuguaison de Descartes, si un objet se rapproche, la vergence du cristallin diminue (?), l'oeil accommode. Jusqu'à une certaine limite, le punctum proximum. Valeur pour un oeil emmétrope 25cm. Punctum remotum : pas d'accomodation. Cadre : conditions de Gauss (énoncer). Problématique : l'oeil ne peut pas séparer deux objets très proches \rightarrow pouvoir de résolution. Première approche : loupe à 1 lentille au 17e siècle crée une image virtuelle agrandie, le dispositif à 2 lentilles au 19e siècle \rightarrow présenté en 1ère partie.

Objectif : crée une image intermédiaire agrandie. Oculaire : image virtuelle à l'infini. Parllèle sur Geogebra.

Cercle oculaire : construction au tableau, c'est l'image géométrique de l'objectif par l'oculaire, tous les rayons y passent. L'oeil doit s'y placer pour un maximum d'intensité.

Puissance d'un microscope. Cadre : pour les calculs on ne considère que des distances positives, non algébriques.

Grossissement $G = \theta'/\theta$. Définition avec un schéma. Lien avec la puissance. $G = Pd_m$. Application numérique pour le montage. Mais on ne peut pas comparer avec les microscopes commerciaux \rightarrow on définit le grossissement commercial. **ODG:** 40-1000.

Limites (i) profondeur de champ. Limitation technique. **ODG:** : $G = 40 \ d = 0.1 \text{mm}, G = 2000, \ d = 0.1 \mu \text{m}$ (ii) diffraction par les montures. Limite physique. Taches d'Airy. Rayon de la tache d'Airy. Critère de Rayleigh, illustation sur Python des 2 cas (séparé, pas séparé). Aplanétisme, stigmatisme, condition d'Abbe, schéma sur diapo, calcul de $r = 0.61 \lambda / ON$

Rappel sur ondes évanescentes. Manip effet tunnel optique en collant deux hémisphères en plexi à la réflexion totale. Analogue à l'effet tunnel en mécanique quantique.

Présentation du STOM (scanning tunneling optical miscroscopy). Schéma du principe.

Image d'article de biologie. Micelle de l'ordre de 10nm. Tableau de limite de résolution : oeil (0.1mm au pp), microscope à 2 lentilles (1 micron), STOM (10 nm). Au fur et à mesure de l'histoire on est descendu de plus en plus proche de l'inifiniment petit.

Ouverture : échelle atomique avec microscope à effet tunnel.

Questions

Quels sont les paramètres qui jouent sur la résolution d'un microscope optique? 2) Vous avez dit qu'on pouvait améliorer la résolution en utilisant une lumière incidence de faible longueur d'onde, pourquoi? Est-ce qu'on peut faire mieux que l'UV? Microscopie électronique. 3) Décrivez-nous cette microscopie. 4) Vous avez dit qu'on prenait un objectif de petite focale pour réduire l'encombrement et augmenter la résolution, y a-t-il un autre intérêt? 5)Pour choisir la taille de l'objectif et de l'oculaire y a-t-il un compromis à faire? A-t-on intérêt à prendre des grandes lentilles, si oui pourquoi? Quel est l'inconvénient majeur? 6) Parlez-nous d'optique non paraxiale. 7) Dans la microscopie par contraste de phase vous avez appliqué le déphasage à la lumière directe seulement et pas à la lumière diffractée, pourquoi? 8) Vous avez dit que les objectifs n'étaient pas des lentilles simples comme dans notre modèle, dites-nous en plus. 9) Comment fabrique-t-on ces doublets?

Tu as parlé de l'oeil emmétrope. Défauts de l'oeil ? Myopie, le pp. s'éloigne. Hypermétropie, le pr. se rapproche. On corrige avec lentille CV ou DV. Presbytie : l'oeil a du mal à accomoder \rightarrow verres progressifs. D'où vient la presbytie ? Muscles cilliaires qui modifient la vergence du cristallins viellissent et ont du mal à accomoder.

Age du 1er miscroscope? 1610 Galilée.

Problème de la loupe?

Conditions de la tache d'Airy?

Différence entre grossissement et grandissement? Grossissement est sur les angles, le grandissement est sur les tailles, non défini pour des objets à l'infini du coup on utilise le grossissement.

Que se passe-t-il hors approximation paraxiale, comment définir grossissement et puissance?

Abberations géométrique? Aberrations sphériques, étalement de la tache. Distorsion : coussinet, barillet. Coma. Astigmatisme et courbure de champ.

Lentille achromat? Corrige aberration chromatique, verre crown, verre flint.

Avantage/inconvénient de l'oeil? Batonnets et cônes. Meilleure luminosité?

Comment agrandir la profondeur de champ? Réduire l'ouverture numérique?

Comment calculer la profondeur de champ? Voir agreg blanche 2015.

Sur un objectif commercial, peut on savoir le grossissement et l'ouverture numérique? Que lit-on? On lit le grossissement et l'ouverture numérique directement sur le microscope. Pour un microscope à immersion (dans l'huile), c'est indique "oil".

Si on augmente l'ouverture numérique, que se passe-t-il? On s'éloigne des conditions de Gauss, il faut un dispositif qui les corrige.

Intervalle optique, fixé dans tous les microscopes commerciaux.

Que règle-t-on dans un microscope? On ajuste la position de l'objet par rapport à l'objectif pour que l'image intermédiaire se forme sur le foyer objet de l'oculaire.

Comment faire pour connaître la focale d'une lentille? Objet dans le plan focal et on regarde quand l'image est à l'infini mais bof. Méthode de Bessel : on regarde quand il n'y a qu'une seule image, la distance objet image est 4f.

A quoi est dû la diffraction dans le montage? La monture de l'objectif.

Diaphragme d'ouverture, diaphragme de champ?

Facteur 1.22? Premier zéro de la fonction de Bessel.

Peut-on théoriquement dépasser le critère de Rayleigh? Numériquement en ajustant bien les données.

Est-ce que c'est le critère de Rayleigh qui limite? Oui en paraxial. En non paraxial, ce sont les aberrations qui limitent.

Autres techniques de miscroscopie optiques? Microscopie à contraste de phase. Utilisé pour quel type d'objet? En biologie, on veut une image 3D. Est-ce qu'il y a une meilleure résolution que pour les miscroscopes classiques? Oui. Microscopie à fluorescence? On envoie une radiation sur les atomes. Système à 3 niveaux, schéma. Emission à une autre fréquence. Miroir dichroïque : on détecte la fluorescence. Comment rendre un object fluorescent? Marqueur fluophorore? Un fluorochrome ou fluorophore est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont des substances composées de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ou encore des molécules planes et cycliques qui possèdent une ou plusieurs liaisons π . L'utilisation de fluorochromes en biologie moléculaire est un peu plus récente que celle d'isotopes radioactifs. Elle a l'avantage de donner des résultats très rapidement, voire immédiatement, en s'affranchissant des longs temps d'exposition requis pour la technique par radioactivité. La fluorescence a le désavantage de ne pas être permanente, l'intensité de la fluorescence diminuant avec le temps jusqu'à devenir indétectable. Exemple : GHP méduse.

Que fait la sonde du miscroscope à champ proche? C'est une fibre optique, ou une pointe très fine.

Profondeur de pénétration dans l'air des ondes évanescentes?

Comment relier un champ électromagnétique et les rayons lumineux? Direction du vecteur de Poynting. Microscopie non optique? Microscopie à effet tunnel.

Ordre de grandeur de la résolution des différentes techniques?

Microscopie électronique : de l'ordre de l'angstrom. Peut-on l'utiliser avec des objets vivants?

Il faut se placer sous vide mais bof pour les échantillons en biologie.

Super-résolution ? L'instrument est une fonction de transfert. Si on connait exactement la fonction de transfert, on déconvolue pour remontr à l'objet initial . C'est très théorique. En pratique, dur avec le bruit numérique. En traitement du signal et en traitement d'images, la super-résolution désigne le processus qui consiste à améliorer la résolution, c'est-à-dire le niveau de détail, d'une image ou d'un système d'acquisition. Cela regroupe des méthodes matérielles qui visent à contourner les problèmes optiques et autres difficultés physiques rencontrées lors de l'acquisition d'image, ainsi que des techniques algorithmiques qui, à partir d'une ou de plusieurs images déjà capturées, créent une image de meilleure résolution.

Storm. On illumine plein de fois. Storm image actine.

Bleaching : on tue les cellules avec l'illumination. Peut être intentionnel si on veut capter la fluorescence que de certaines cellules.

Confocal?

Commentaires

Transition entre microscope à 2 lentilles et le STOM à travailler. Plus écrire au tableau, écrire les définitions importantes ex : écrire la définition du punctum proximum. Bien de faire une construction de rayons lumineux au tableau (cercle oculaire). Bien de sortir le microscope commercial : plus insister avec le vrai microscope en intro.

Les élèves connaissent le microscope commercial : qu'il y a-t-il vraiment dedans ? Mentionner les aberrations géométriques/chromatiques. Ex : utiliser une non achromat d'abord et ensuite remplacer par achromat. "Dans les microscopes commerciaux c'est corrigé".

Quand on introduit ON et grossissement, relier aux inscriptions sur le microscope.

Ca prend du temps mais on pourrait placer bloc par bloc les composantes du microscope.

Montrer de belles images en partie 2 : illustrer les applications du microscope. Insister sur le besoin en recherche (biologie...). Champ de recherche actuel d'améliorer les microscopies.

Pour les questions, se renseigner à fond sur les microscopies (autres).

Alternative : fluorescence et confocal.