
MICROSCOPIE OPTIQUE

Niveau

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.

Bibliographie

- Oeil ultra stylé
- femptophysique
- Lionel Aigouy and co., Les nouvelles microscopies, à la découverte du nanomètre, pour le principe du STOM et notamment de l'utilisation de la sonde en mode collection avec une fibre optique (p.180) si on a accès.

pré-requis

- Optique géométrique
- diffraction
- TF

Expériences

—

Table des matières

1	Le microscope à deux lentilles	2
1.1	Présentation	2
1.2	Caractéristiques	3
1.3	Limites	5
2	Microscope en champ proche	7
2.1	Utilisation des ondes évanescentes	8
2.2	description du dispositif	8
2.3	Récupération des ondes évanescentes et résolution	8
3	Microscope à contraste de phase	10

Introduction

La microscopie est un mot venant du grec, composé de *mikros* (petit) et *skopein* (examiner). on se sert de microscopes parce que l'oeil humain a une limite de résolution : environ une minute d'arc. Cela signifie que l'on

peut distinguer un détail de 1mm à 3m de nous. En particulier, de nombreux objets sont plus petits que ça, même si on les regarde de près...

On distingue 3 types de microscopies : la microscopie optique, avec des rayons lumineux. La microscopie électronique, avec un faisceau d'électrons, et la microscopie à sonde locale où l'on obtient une cartographie en relief de l'échantillon sondé à l'aide d'une mesure physique.

Aujourd'hui on va faire de l'optique : on va se placer avec des longueurs d'ondes visibles. Le premier "microscope" est en fait une loupe, utilisée dès l'antiquité. C'est au XIX^e siècle que le besoin de microscopes à 2 lentilles s'est fait sentir.

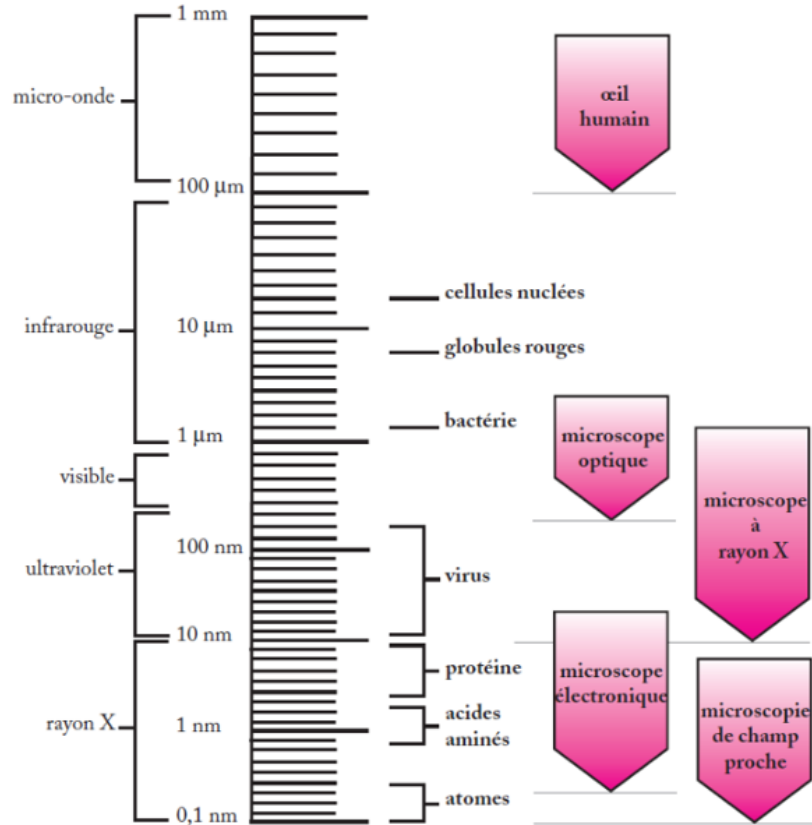


FIGURE 1 – Echelle de taille

1 Le microscope à deux lentilles

On va faire l'étude du microscope à 2 lentilles dans le cadre de l'optique géométrique : on considère des rayons lumineux peu inclinés par rapport à l'axe optique.

1.1 Présentation

Commençons par la Loupe : Un loupe permet de grossir un objet avec une seule lentille : Chaque détail est vu sous un angle plus grand que sans la loupe. On dit qu'il y a grossissement. La loupe se place de telle sorte que l'objet soit dans le plan focal objet de la lentille, ainsi la loupe en donne une image virtuelle à l'infini. Les rayons sont alors parallèles et on ne fatigue pas l'œil.

Pour la caractériser on compare les angles avec et sans loupe :

$$G = \frac{\theta'}{\theta} = \frac{d_{\text{objet}}}{f'}$$

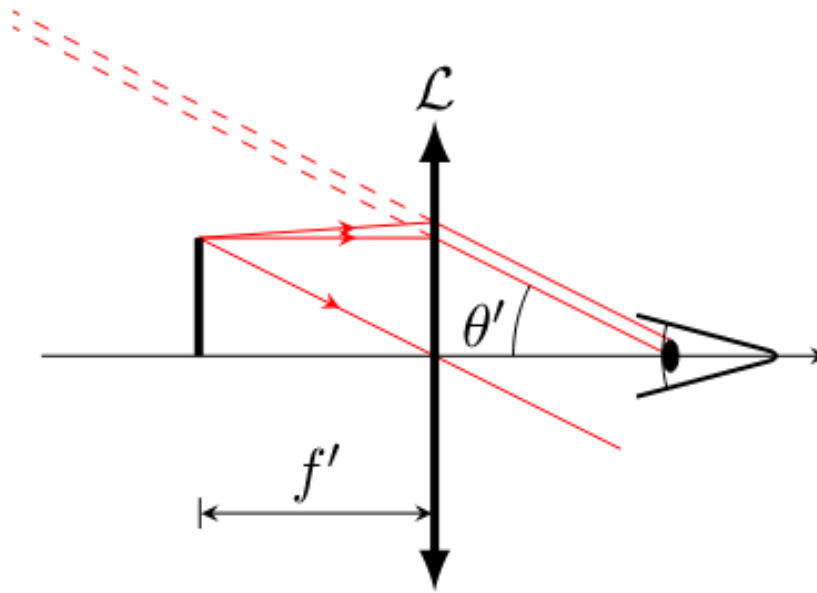


FIGURE 2 – Loupe (*femtophysique*)

Ainsi pour donner un ordre de grandeur, si on prend une loupe avec un grossissement commerciale de $G_c = 5$ ($d_{\text{objet}} = 25$). L'objet nous paraîtra 5 fois plus gros. C'est pratique pour lire de petites écriture mais pas beaucoup plus.

D'où l'intérêt du microscope à 2 lentille. Plutôt que de grossir l'objet avec une lentille, on va grossir l'image d'un objet fait par une autre lentille. Ainsi, si avec la première lentille, on agrandit l'objet de départ, on aura une image encore plus grosse.

Cahier des charges : On veut un instrument qu'on l'on puisse regarder à l'oeil sans accommoder, donc il doit faire une image à l'infini d'un objet à distance fini. On dit qu'il est afocale.

On fait le schéma au tableau :

— **L'objectif :** Il crée une image intermédiaire réelle inversé et agrandi de l'objet AB.

— **Oculaire :** C'est la loupe. Elle fait une image virtuelle grossi de l'image intermédiaire.

On note $\Delta = F'_1 F_2$ c'est l'**intervalle 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. Donc 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)

Faire un magnifique microscope devant les yeux ébahit du jury !

Mise au point Quand on a un vrai microscope **En demander 1**, il faut faire la mise au point, pourquoi ? Parce que la distance entre les deux lentilles est fixe, il faut que la première lentille face une image intermédiaire pile sur F_2 . **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. Le diamètre du cercle oculaire est de l'ordre de 0.1mm ce qui est inférieur à la pupille (1mm) on récupère bien toute la lumière.

1.2 Caractéristiques

Grossissement : on utilise souvent le grossissement pour caractériser un système optique. Il est défini comme le rapport des angles d'observation avec et sans microscope. La distance objet-oeil est alors fixée. Pas de schéma

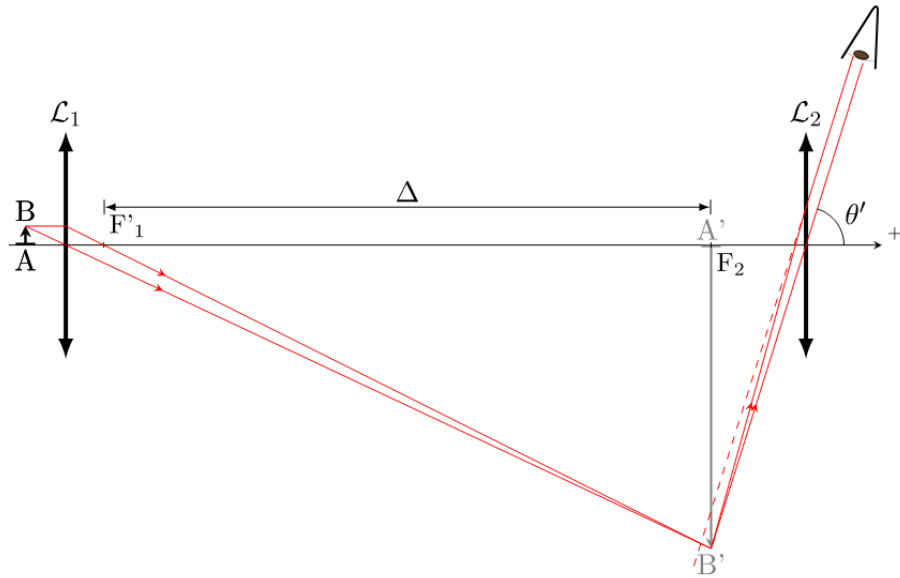


FIGURE 3 – *Microscope (femtophysique)*

sur internet, il faut en faire un au tableau de toute façon.

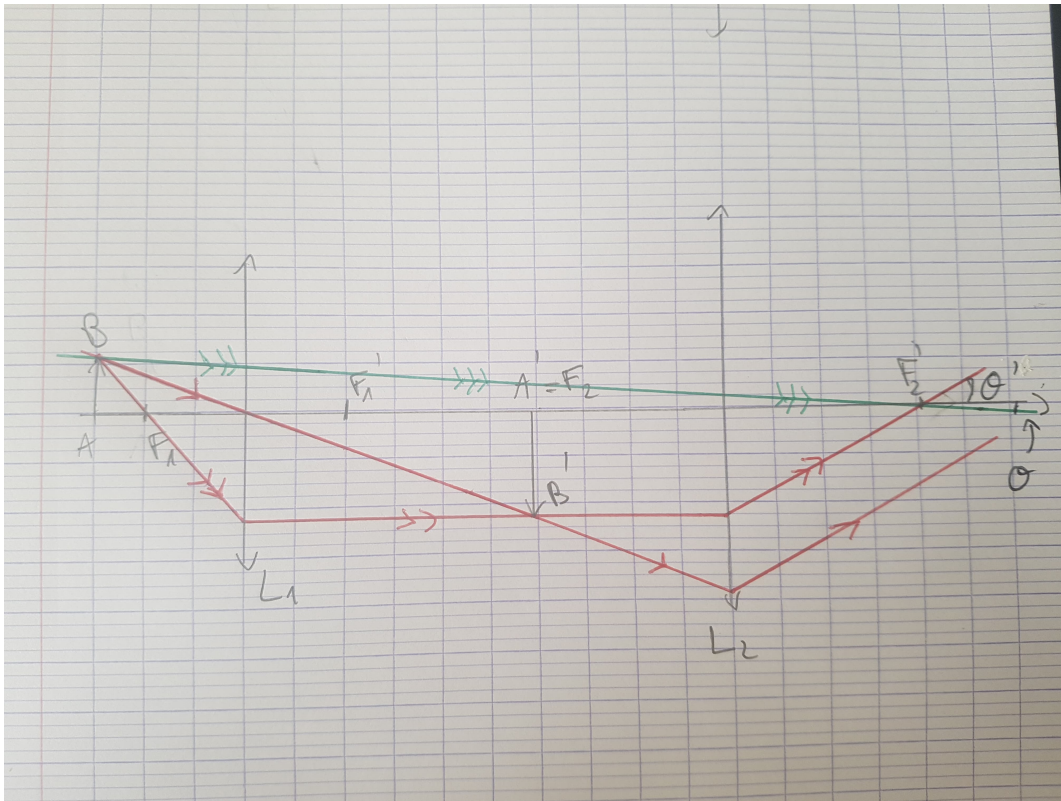


FIGURE 4 – *Tracé des rayons lumineux pour grossissement.*

On considère que l'oeil est placé dans le plan focal image de l'oculaire (c'est là qu'il y a le plus de lumière). On note d la distance oeil-objet et Δ la distance F'_1F_2 , appelée intervalle ou longueur optique. On a donc :

$$\tan \theta \approx \theta = \frac{\bar{AB}}{d} \quad \text{et} \quad \theta' = \frac{\bar{A'B'}}{f'_2}$$

Remarque : les 2 angles n'ont pas le même signe, le grossissement est négatif. L'image apparaît retournée.
Théorème de Thalès "en papillon" avec AB et $A'B'$ (prendre le rayon issu de B parallèle à l'AO) :

$$\frac{A'B'}{AB} = \frac{\Delta}{f'_1}$$

D'où le grossissement :

$$G = \frac{\Delta d}{f'_1 f'_2}$$

Calcul du grossissement du microscope qu'on vient de fabriquer ?

Puissance : on a introduit le grossissement, mais son gros défaut est de faire intervenir la distance oeil objet, qui varie d'un microscope à l'autre. On pourrait aussi utiliser le grandissement transversal, mais lorsque le microscope est réglé, l'image est à l'infini. On introduit donc la puissance :

$$P = \left| \frac{\theta'}{AB} \right| = \frac{\Delta}{f'_1 f'_2}$$

Qui a l'avantage de ne pas dépendre de la distance oeil-objet (et donc de la taille du microscope...).

Mesure de la puissance du microscope monté ? ODG pour un "vrai" microscope : 1000δ

Grossissement commercial : c'est une valeur souvent donnée sur les descriptions de microscopes : c'est le grossissement lorsque $d = d_{PP} = 25$ cm. Cette définition met directement en évidence le fait que l'oeil est limité, et montre l'effet du microscope.

$$G_{com} = \frac{\Delta d_{PP}}{f'_1 f'_2}$$

Là aussi, on a fixé d pour comparer les microscopes entre eux. Typiquement, $G_{com} \approx 40$ à 1000 . On peut le mesurer sur le microscope qu'on a monté mais ça commence à faire beaucoup. Le calculer ?

Une information donnée en plus est **l'ouverture numérique** : $O.N. = n \sin(\theta_m)$ c'est l'indice du milieu (ici 1) multiplié par le sinus de l'angle maximum de l'objet qui rentre dans le diaphragme m'ouverture.

Les microscopes ont l'air de bien marcher comme ça. Pourquoi on va s'embêter à inventer des techniques de microscopies ultra compliquées ? Le microscope à 2 lentilles a évidemment des limites...

1.3 Limites

Aberrations : Pour avoir un grand champ, c'est à dire voir beaucoup de choses, il faut accepter avoir de grands angles... Ceci va à l'encontre du cadre que nous nous sommes fixées : l'approximation de Gauss. On peut limiter les aberrations géométriques avec des ménisques formés de deux dioptries sphériques (ménisque d'Amici). Dans ce ménisque, le centre C1 du dioptré sphérique d'entrée est confondu avec le premier point de Weierstrass W2 du dioptré de sortie. Le ménisque permet de rabattre les rayons vers l'axe optique en diminuant leur angle, ce qui permet de se rapprocher des conditions de Gauss pour le doublet achromat qui suit derrière

Aberration chromatiques Si on observe des objets avec une lumière non monochromatique, nous allons observer des aberrations chromatiques, chaque "rayon de couleur différente" va converger à différents endroits : Ceci est dû au fait que le verre est un milieu dispersif qui suit la loi de Cauchy :

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

On peut corriger les aberrations chromatiques avec des doublets/achromats : En effet pour une lentille mince la vergence s'écrit :

$$V = \frac{1}{f} \left(\frac{1}{\hat{R}_1} - \frac{1}{\hat{R}_2} \right) \implies \frac{df}{f} = - \frac{dn}{n-1} = - \frac{n_{\text{bleu}} - n_{\text{rouge}}}{n_{\text{jaune}} - 1} = -\Delta$$

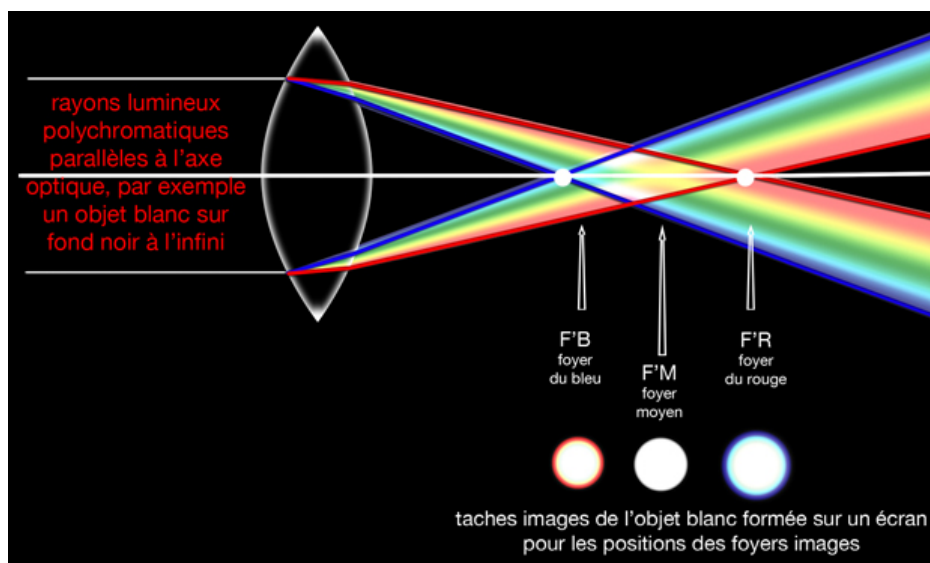


FIGURE 5 – Abération chromatique

En accolant 2 lentilles, on peut compenser la dispersion :

$$V = V_1 + V_2 \quad \Rightarrow \quad \frac{-\Delta f}{f^2} = \frac{-\Delta_1}{f_1} - \frac{\Delta_2}{f_2}$$

Ainsi pour avoir $\Delta f = 0$ on choisit f_1, f_2 telles que : $\frac{-\Delta_1}{f_1} = -\frac{\Delta_2}{f_2}$ Crown et Flint. On obtient alors un objectif de Lister.

On obtient ainsi l'objectif d'Amici-Lister constitué de 2 ménisques (donc 4 dioptries sphériques) + doublet achromatique de Lister.

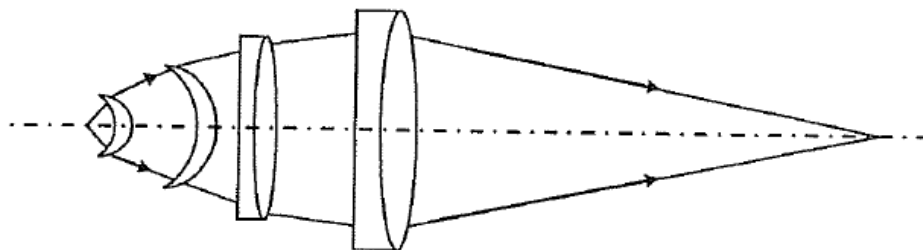


FIGURE 6 – Objectif d'Amici-Lister (Agregation A 2015)

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'oeil, 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'oeil

Diffraction C'est la plus grosse limite que l'on ne peut pas dépasser avec le microscope à 2 lentilles : Un objet ponctuelle qui passe par une lentille circulaire donnera un tache d'Airy $\rho = 1,22 \frac{\lambda}{2R}$: **Programe python**

La capacité du microscope à former une image résolue de deux objets angulairement proches est limitée. La limite de la résolution angulaire est donnée par le critère de Rayleigh : deux objets ponctuels sont tout juste résolus si le max de la figure de diffraction de l'un correspond au premier min de la figure de diffraction de l'autre. La séparation angulaire correspondante est donnée par $\Delta\theta = 1.22\lambda/D_0$. En faisant l'hypothèse que le microscope est aplanétique, on peut utiliser la condition d'Abbe pour déterminer la limite de résolution.

$$nAB \sin(\alpha) = nA'B' \sin(\alpha')$$

$n \sin(\alpha) = O.N.$, AB va être la taille minimal que l'on peut voir, $n' = 1$ car on observe dans l'aire, et $A'B' \sin(\alpha') =$

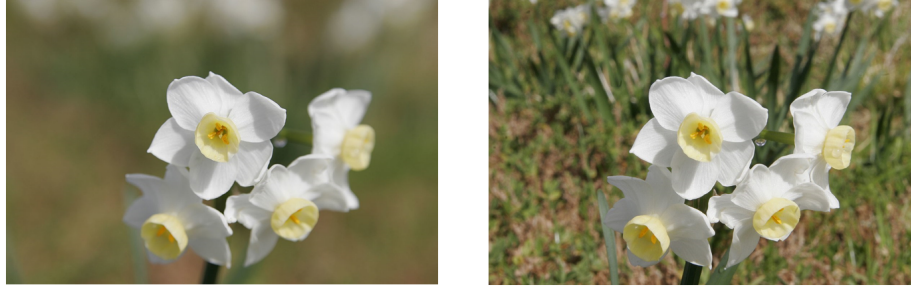


FIGURE 7 – Notion de profondeur de champ

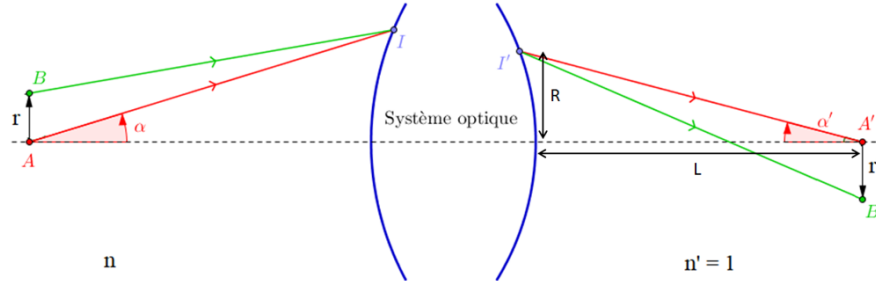


FIGURE 8 – Applanetisme

$$0.61 \frac{\lambda d}{R} = 0.61 \lambda :$$

$$AB_{min} = 0.61 \frac{\lambda}{O.N.}$$

Avec un objectif à immersion on obtient une résolution spatiale de $2 \mu\text{m}$. Si on était sensible à une autre longueur d'onde que le visible, on pourrait voir plus petit...

On veut aller plus loin!!!!

2 Microscope en champ proche

Dans un microscope à 2 lentilles, on considère des rayons lumineux : ce sont des ondes qui se propagent. Mais on a vu en électromagnétisme qu'il existait d'autres types d'onde. En particulier, on connaît les ondes évanescentes.

Si on a du temps à perdre, montrer l'existence d'ondes évanescentes dans la paraffine.

Sinon, effet tunnel optique : cette vidéo. Au delà de l'angle limite de réfraction, la lumière est complètement réfléchie à la sortie du prisme. Mais en pressant un prisme juste en face, on voit que l'onde traverse le prisme !

L'idée et la suivante : la limite que l'on a avec le microscope optique à deux lentilles est :

$$AB_{min} = 0.61 \frac{\lambda}{O.N.}$$

Or $O.N. = n \sin(\alpha)$ donc on a au maximum $O.N. = n$. On a vu que ça c'était générale dès qu'il y avait une lentille. On va alors devoir utiliser un autre type d'instrument qui n'utilise pas de lentille. Pour ça il faut revenir à la nature ondulatoire de la lumière et utiliser les ondes évanescentes. Une manière de le voir et de se rendre compte que la limite de résolution est une conséquence de la l'inégalité de Heisenberg, qui s'écrit, en utilisant la formule de De Broglie :

$$\Delta \vec{r} \Delta \vec{k} \geq 2\pi$$

animation

On peut ainsi relier Δx à Δk_x aussi pour diminuer Δx il va falloir augmenter Δk_x si bien qu'à un moment pour pouvoir augmenter Δk_x , on doit considérer des ondes qui ne se propagent pas : ça se voit bien avec la sphère des indices.

2.1 Utilisation des ondes évanescentes

Propagation : On se place dans le vide et on considère la lumière comme un champ scalaire. On ne s'intéresse pas à la polarisation donc c'est suffisant ici. On considère l'amplitude du $E(x, y, z)$ se propageant selon l'axe Oz . L'amplitude vérifie l'équation de Helmholtz pour la propagation :

$$\nabla^2 E + \frac{\omega^2}{c^2} E = 0$$

Cette équation mène à la relation de dispersion :

$$k_z^2 = \frac{\omega^2}{c^2} - k_x^2 - k_y^2$$

Lien avec la résolution : a partir de l'ouverture numérique $ON = n \sin \theta$, on en déduit la limitation en terme de vecteur d'onde : $-\frac{\omega}{c} n \sin \theta \leq k_x \leq \frac{\omega}{c} n \sin \theta$.

Or, pour la propagation des ondes, la relation de Gabor-Heisenberg s'applique : $\Delta x \Delta k_x \geq 2\pi$. On a $\Delta k_x = 2k_x \sin \theta$ donc : $\Delta x \geq \frac{2\pi}{\Delta k_x} = \frac{\lambda_0}{2n \sin \theta}$

On voit que $\Delta k_x \propto k_x$: on a intérêt à augmenter k_x pour améliorer la résolution.

On remet tout ensemble : avec la relation de Helmholtz, on a $k_x = \sqrt{|\vec{k}|^2 - k_z^2 - k_y^2}$.

Un moyen pour avoir $k_x > |\vec{k}|$ est de travailler avec $k_z \in \mathbb{C}...$

Ce sont donc des ondes évanescentes ! Les ondes évanescentes s'atténuent sur une distance caractéristique de l'ordre de $1/\text{Im}\{k_z\}$, de l'ordre de la centaine de nanomètre. La "captation" de ces ondes permet de se passer de la limite du critère de Rayleigh, ce sont elles qui contiennent l'information sur les détails.

2.2 description du dispositif

Voir Ce lien

Le microscope en champ proche est alors constitué de 3 parties :

- Une source de lumière : Un laser éclaire, par l'intermédiaire d'une lentille demi-boule le l'échantillon. La lentille est par exemple en verre et l'angle d'incidence du laser est supérieur à l'angle limite. Il y a donc réflexion totale. En l'absence de l'objet il y a une onde évanescente.
- L'objet : l'objet posé sur la lentille diffracte l'onde évanescente.
- La sonde : La sonde collecte l'onde diffractée.

Comment on fait les pointes ? 2tirage à chaud, on chauffe au laser à CO2 et on étire. La finesse dépend de la température. Plus c'est chaud, plus c'est fin.

2.3 Récupération des ondes évanescentes et résolution

Il s'agit de convertir les ondes évanescentes en ondes propagatives : comme sur la vidéo. Il est nécessaire de se placer très près de l'échantillon.

La sonde est une tige diélectrique dont le bout peut être associé à une petite sphère diélectrique. En présence du champ évanescent, cette sphère va se polariser et former un dipôle oscillant qui va rayonner le champ dans le reste de la tige et qui va finalement pouvoir être détecté par un détecteur situé en amont. De cette façon, on récolte des informations sur le champ proche et donc sur des échelles spatiales inférieures à la longueur d'onde

Distance sonde-objet et résolution :

La distance sonde-objet doit être de l'ordre de $L = \frac{1}{|k_z|}$. On réécrit la relation de Helmholtz, et on prend en compte le fait que $\delta x \approx \frac{2\pi}{k_x}$ et $\delta y \approx \frac{2\pi}{k_y}$:

$$\begin{aligned} L &= \frac{1}{\sqrt{k_x^2 + k_y^2 - \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2}} \\ &= \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{2\pi}{\delta x}\right)^2 + \left(\frac{2\pi}{\delta y}\right)^2 - \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2}} \end{aligned}$$

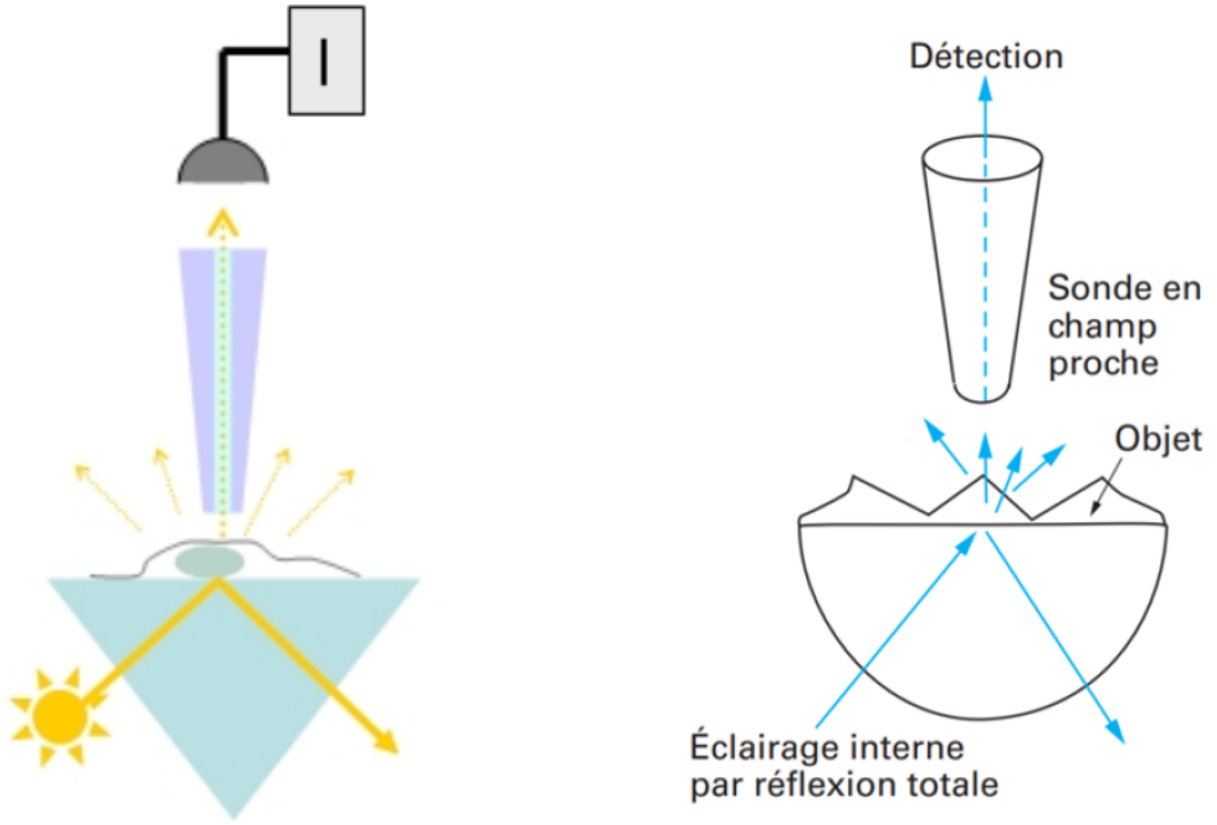


FIGURE 9 – *Scanning near field optical microscope*

Avec cette microscopie, on cherche à résoudre des tailles d'objets très petits, notamment avec $\delta x, \delta y \ll \lambda$. Cela donne :

$$L \approx \frac{\sqrt{\delta x^2 + \delta y^2}}{2\pi} = \frac{\delta}{2\pi}$$

On voit ici que la résolution est dictée par la distance à laquelle on s'approche de l'échantillon : c'est ce qui limite la résolution. On atteint quelques nanomètres, ce qui est bien petit devant la longueur d'onde.. Le contrôle de la position est contraignant et nécessite l'utilisation de céramiques piezo-électriques.

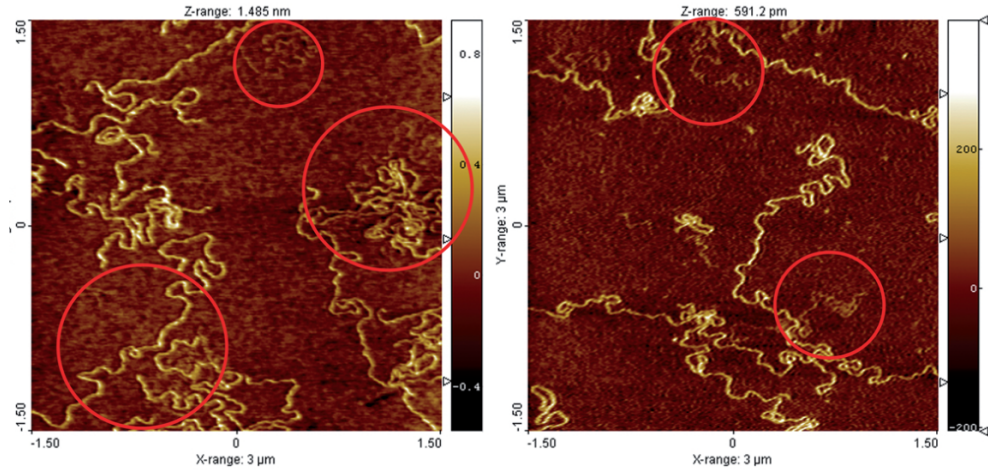


FIGURE 10 – *Images prises par une équipe de l'EPFL, où l'on distingue des brins d'ADN.*

3 Microscope à contraste de phase

Conclusion

On a vu le principe de la microscopie optique : il s'agit de voir le plus petit possible. Le critère de résolution est toujours une limite, mais ce n'est pas toujours la même : on a commencé par corriger les aberrations, puis le critère de Rayleigh s'est imposé en tant que limite ultime, car il intervient nécessairement lors de la propagation de rayons lumineux. Alors des technologies nouvelles ont émergé, avec la microscopie en champ proche qui dépasse le critère de Rayleigh.

D'autres techniques sont apparues, et elles ne sont pas nécessairement réduites au domaine de l'optique : microscope à effet tunnel (qui fonctionne comme le champ proche mais avec des électrons), microscope à balayage, à force atomique (ne pas en parler si on ne sait pas ce que c'est). La limite de résolution permet aujourd'hui de distinguer des atomes, avec une résolution de l'ordre de l'Angstrom.

Compléments :

Microscope confocal :

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.

Microscopies optiques :

La microscopie par contraste de phase : utilisation d'une lame de phase qui convertit une variation de phase en variation d'intensité.

Cf Les compléments complets de Pascal.

Pour les animations