

LP32 – MICROSCOPIES OPTIQUES

25 juin 2020

Aurélien Goerlinger & Yohann Faure

Niveau : L2/L3

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

- ✦ *MP07, Instruments d'optique* →
- ✦ *Optique, Houard* → Microscope à deux lentilles et historique
- ✦ *Optique expérimentale, Sextant* → Réalisation pratique et mesures
- ✦ *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging, Murphy et Davidson* → Très bon d'après Clément
- ✦ *Agrégation épreuve A 2015* → Pour les améliorations des objectifs
- ✦ <https://cours.espci.fr/site.php?id=265> → Microscopie Palm
- ✦ <https://toutestquantique.fr/microscopes/> → plein d'animations.
- ✦ *Les nouvelles microscopies, Aigouy, De Wilde, Fréti-gny* → Microscopie en champ proche¹

Prérequis

- Optique géométrique et ondulatoire (diffraction) 🖱
- Bases de mécanique quantique (Heisenberg)
- Équations de Maxwell, ondes évanescentes

Expériences

Table des matières

0.1	L'oeil	2
1	Microscopie à deux lentilles	3
1.1	Présentation	3
1.2	Caractéristiques	4
1.2.1	Puissance	4
1.2.2	Grossissement	5
1.2.3	Grossissement commercial	6
1.3	Limites	6
1.3.1	Profondeur de champs	6
1.3.2	Tâche d'Airy	6
2	Microscopie à fluorescence (ou à champ lointain)	8
2.1	Principe	8
2.2	Microscopie confocale	8
2.3	Microscopie PALM	9
2.4	Microscopie STED	10
3	Microscopie à champ proche	10
3.1	Nécessité des ondes évanescentes	11
3.2	Microscope STOM	12

Introduction

La microscopie est l'ensemble des techniques permettant d'observer des systèmes plus ou moins petits. Avec cette définition, le microscope le plus simple que nous ayons à disposition est l'oeil, qui permet d'observer des objets de notre vie quotidienne.

0.1 L'oeil

L'oeil peut être modélisé par une lentille mince convergente appelée cristallin, et la rétine située au fond de l'oeil. La distance cristallin-rétine est de 17 mm. Pour un oeil emmétrope (sans défaut), la focalisation se fait sur la rétine grâce à la relation de conjugaison de Descartes :

$$\frac{1}{f'} = \frac{1}{OA'} - \frac{1}{OA} \quad (1)$$

On a f' la focale de la lentille, ici du cristallin, O la position du cristallin sur l'axe optique, A et A' les positions respectives de l'objet et de l'image sur l'axe optique.

Pour que la focalisation se fasse toujours sur la rétine, l'oeil a des muscles qui épaississent le cristallin et changent sa focale. On appelle ce processus l'*accommodation*.

L'oeil emmétrope peut focaliser des objets situés en l'infini : à ce moment-là, les muscles ciliaires n'écrasent pas le cristallin qui a une focale maximale de $f_0 = 17$ mm pour focaliser directement sur la rétine. C'est le *punctum remotum* (PR) tel que $PR = \infty$. À l'inverse, l'oeil peut focaliser au maximum des objets situés à 25 cm : à ce moment-là, les muscles ciliaires écrasent au maximum le cristallin qui a alors une focale $f_0 = 10$ mm. C'est le *punctum proximum* (PP) tel que $PP = 25$ cm.

Pour un oeil myope, la focalisation se fait en avant de la rétine, c'est pourquoi on corrige la vue avec des lentilles divergentes de vergence positive qui refocalisent les objets dans le plan de la rétine. À l'inverse, l'oeil hypermétrope focalise en arrière de la rétine, c'est pourquoi on utilise des lentilles convergentes pour corriger la vue. Lorsque les muscles ciliaires fatiguent avec l'âge, la vue baisse de manière générale : c'est la presbytie. À ce moment-là, on utilise la plupart du temps des verres progressifs qui combinent à la fois des lentilles convergentes et divergentes pour corriger la vue.

La rétine est tapissée de deux types de photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes. Les bâtonnets sont majoritaires (95%) et constituent la vision nocturne en teintes de gris de l'oeil. Les cônes sont de trois types (bleu B, rouge R et vert V) et permettent la vision diurne trichromatique de l'oeil. Lorsque deux points proches de notre objet arrivent sur le même photorécepteur sur la rétine, l'oeil ne peut plus distinguer les deux points de l'objet : c'est la limite de résolution de l'oeil. Pour un oeil emmétrope classique, cette limite de résolution est exprimée par l'angle entre OA et OB et vaut une seconde d'angle, soit 2.9×10^{-4} rad. Pour donner un ordre de grandeur plus parlant, on peut dire qu'on peut apercevoir des détails de 1 mm pour un objet à 3 mètres de distance.



Description de l'oeil sur Geogebra



Cette limite de résolution est la raison qui nous a poussés à inventer des systèmes optiques capables de dépasser les limitations de l'oeil : c'est l'avènement de la microscopie. Avec les découvertes faites dans les domaines physiques parallèles, notamment en physique quantique où la description de la matière s'est faite à des distances de l'ordre du nanomètre voire moins, il était impératif d'utiliser des dispositifs expérimentaux qui nous permettaient de caractériser des systèmes aussi petits. Le pouvoir de résolution des systèmes de microscopies optiques est donc au coeur de cette leçon : n'hésitez pas à le mettre en fil rouge tout au long de votre oral.

À noter que l'ensemble des calculs d'optique géométrique sont ici faits dans les conditions de Gauss, c'est-à-dire avec des rayons lumineux peu inclinés par rapport à l'axe optique et proches de l'axe optique.

1 Microscopie à deux lentilles

Les premiers microscopes étaient simplement constitués d'une seule lentille pour obtenir d'un objet 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. À ce moment-là, le microscope à deux lentilles fut nécessaire pour augmenter la résolution des instruments d'optique.

1.1 Présentation



Description via géogebra et sur paillasse



Matériel : Description du microscope à deux lentilles sur Geogebra. À présenter en parallèle d'un microscope commercial tout construit et d'un microscope de paillasse à construire soi-même.

Le microscope à deux lentilles est constituée d'une première lentille appelée objectif. Le but de l'objectif est de créer une image intermédiaire A_1B_1 réelle inversée agrandie de l'objet AB . Plus l'objet se rapproche du plan focal objet de l'objectif, plus l'image intermédiaire sera agrandie. 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.

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 . Le but d'un microscope étant avant tout d'observer des objets avec l'oeil, 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, l'image intermédiaire doit obligatoirement se former dans le plan focal objet de l'oculaire, tel que les points A_1 et F_2 soient confondus. La différence entre un microscope non réglé et réglé est montrée via géogebra. La focale de l'oculaire est située entre 12,5 et 50 mm.

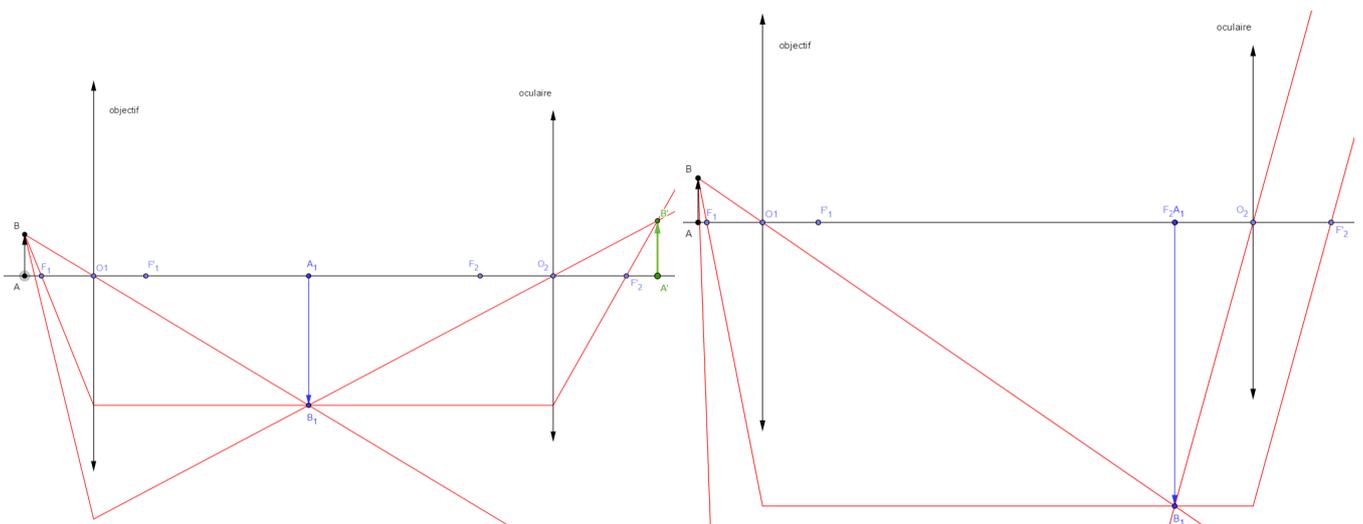


FIGURE 1 – **Gauche** : Schéma du microscope non réglé sur Geogebra. L'objet forme une image intermédiaire réelle renversée agrandie A_1B_1 après le passage de l'objectif et une image finale réelle agrandie $A'B'$ après le passage de l'oculaire. L'image finale n'étant pas située en l'infini, ce cas ne nous intéresse pas.

Droite : Schéma du microscope réglé sur Geogebra. L'objet forme une image intermédiaire réelle renversée agrandie A_1B_1 après le passage de l'objectif dans le plan focal objet de l'oculaire et une image finale virtuelle agrandie $A'B'$ après le passage de l'oculaire qui est donc située en l'infini. C'est le cas qui nous intéresse en pratique.

Maintenant que le microscope est réglé, voyons voir ce que l'on peut en faire.

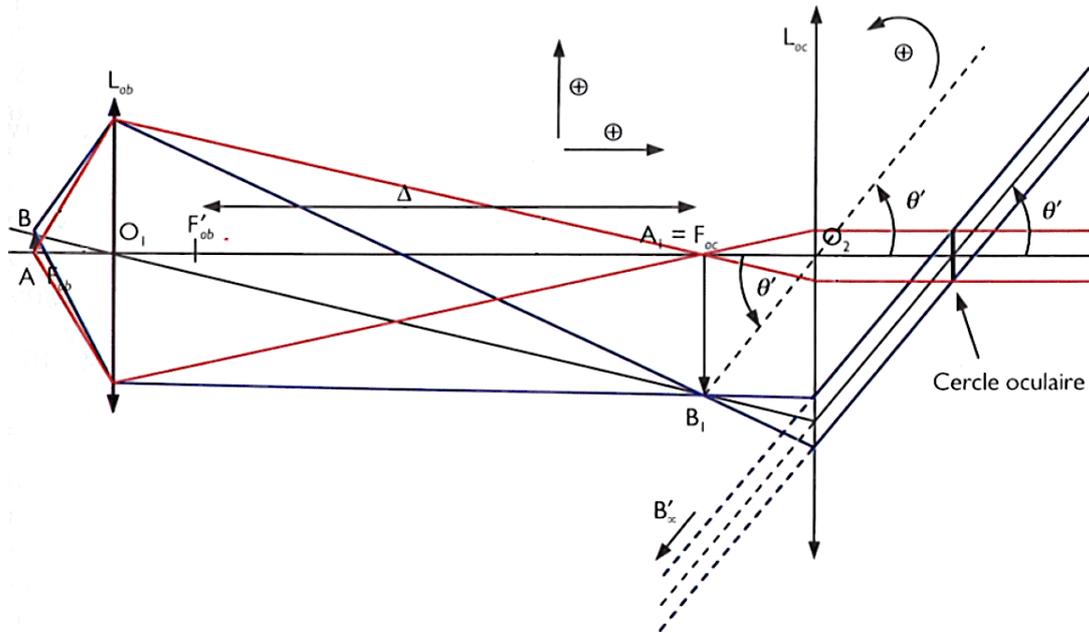


FIGURE 2 – Schéma du microscope réglé. L'image de la monture de l'objectif par l'oculaire définit le cercle oculaire. C'est la position privilégiée de l'oeil lors de l'observation.

Calcul de la position du cercle oculaire

Newton donne

$$F_2 O_1 \times F_2' C = -f_2'^2 \iff F_2' C = \frac{-f_2'^2}{\Delta + f_1'} \tag{2}$$

On trouve $F_2' C$ de l'ordre de 3 mm pour $\Delta = 160$ mm, $f_1' = 25$ mm et $f_2' = 40$ mm. Confondre les deux points est donc justifié.

1.2 Caractéristiques

1.2.1 Puissance

On définit la **puissance** du microscope comme le rapport entre l'angle selon lequel on voit l'image de l'objet après grandissement et sa taille réelle. Il est donné en m^{-1} , ou plus communément en dioptries δ . C'est toujours une grandeur positive :

$$P = \frac{\theta'}{AB} \tag{3}$$

On peut, dans le cadre des conditions de Gauss, ré-exprimer sa valeur en fonction de la puissance de l'objectif et du grandissement transversal de l'objectif :

$$P = \frac{\theta'}{AB} = \frac{\theta'}{A_1 B_1} \frac{A_1 B_1}{AB} = P_{\text{oculaire}} \times \gamma_{\text{objectif}} \tag{4}$$

On a de plus que $\theta' = \frac{A_1 B_1}{F_2 O_2}$, ainsi $P_{\text{ocu}} = \frac{1}{f_2'}$

De même on peut redéfinir $\gamma_{\text{obj}} = \frac{F_1' A_1}{O_1 F_1} = \frac{\Delta}{f_1'}$. On se retrouve alors avec l'expression simplifiée de la puissance :

$$P = \frac{\Delta}{f'_1 f'_2} \quad (5)$$

Celle-ci varie généralement entre 160 et 4000 δ , tandis que $\Delta = 160$ mm dans presque tous les microscopes commerciaux.

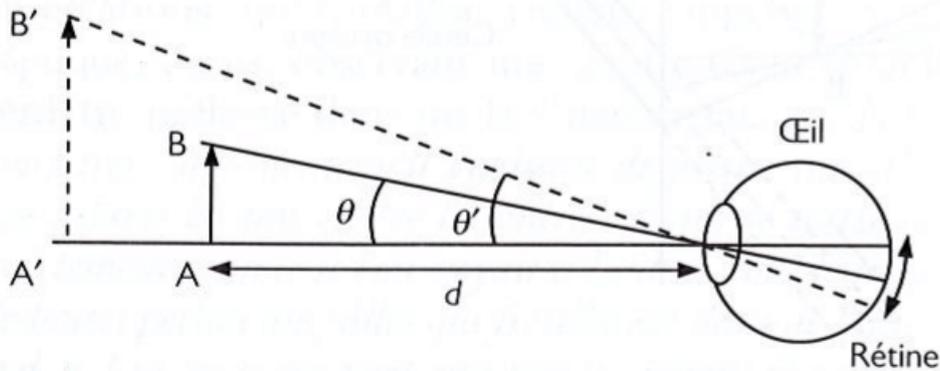


FIGURE 3 – L'œil voit AB sous un angle θ' au lieu de θ .

1.2.2 Grossissement

On rappelle que le microscope a avant tout pour but de grossir notre objet : il nous faut donc inventer une grandeur qui permette de rendre compte de combien l'objet a été agrandi. On définit pour cela le **grossissement** comme le rapport des angles sous lequel on voit l'objet avec ou sans appareil de grossissement.

$$G = \frac{\theta'}{\theta} \quad (6)$$

Par définition, le grossissement est le rapport des tailles des images rétiniennes lorsque l'objet est vu à travers le microscope et l'œil nu. Le grossissement caractérise donc bien de combien l'objet a été agrandi après être passé par le système optique. Le problème de cette définition est qu'on ne connaît pas la distance entre l'œil et l'image finale puisque celle-ci est située en l'infini. Pour cela, on réécrit G comme :

$$G = \frac{\theta'}{\theta} = \frac{\theta'}{\frac{AB}{d}} = \frac{\theta'}{AB} d = Pd \quad (7)$$

Avec d est la distance séparant l'œil de l'objet initial : G est donc bien sans dimension et est également défini positif. Regardons comment on peut retrouver ces valeurs avec notre microscope.



Mesures de la puissance et du grossissement avec notre microscope

✍

☉

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 œil, on peut placer une lentille de focale 30 cm au niveau du plan focal image de l'oculaire que l'on approxime 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. Quantitativement, on peut calculer la puissance et le grossissement de notre microscope en mesurant la taille de l'image intermédiaire. Celle-ci

est de 2,5 cm de hauteur. On trouve alors $P = 13$ et $G = 12$ grâce aux équations ci-dessus (ce sont des ordres de grandeur, tout dépend des distances réelles de votre montage).

À noter ici que nous n'avons pas parlé d'aberrations car nous avons pris des achromats pour les lentilles : discuter rapidement des aberrations chromatiques et géométriques est cependant attendue sans avoir besoin d'être exhaustif.

1.2.3 Grossissement commercial

Pour savoir si les valeurs trouvées expérimentalement sont importantes (on peut déjà les comparer à celles de Van Leeuwenhoek qui atteignaient des grossissements de 500), il faut les comparer à des valeurs données par les constructeurs. Dans le commerce, le grossissement n'est pas directement utilisé. En effet, on définit le **grossissement commercial** comme le grossissement lorsque la distance entre l'oeil et l'objet correspond au *punctum proximum* de l'oeil, c'est-à-dire 25 cm ou 1/4 de mètre.

$$G_c = \frac{P}{4} \quad (8)$$

Le grossissement commercial des microscopes de paillasse varie entre 40 et 1000 : on voit donc que la valeur trouvée expérimentalement est très faible devant celles du commerce, ce qui semble logique puisque les microscopes de paillasse ont des valeurs de focale spécifiques pour compenser un grossissement commercial acceptable et un encombrement minimal.

1.3 Limites

1.3.1 Profondeur de champs

Une première limitation du microscope à deux lentilles est la profondeur de champ ou latitude de mise au point. C'est la distance objet-objectif pour laquelle l'oeil, situé au niveau du cercle oculaire, obtiendra une image nette de l'objet. De manière plus concrète, la profondeur de champ est définie par les deux positions extrêmes qui correspondent à la formation des images au niveau du *punctum remotum* et du *punctum proximum* de l'oeil.

Les calculs sont détaillés ici <http://www.chimix.com/an7/ing7/itpe70.htm>

$$l = \frac{1}{4G_c^2} \quad (9)$$

On voit ici une première limitation technique de notre montage. En effet, le microscope est d'autant plus efficace que son grossissement commercial est grand, ce qui réduit considérablement sa profondeur de champ. Il est alors d'autant plus difficile d'effectuer la mise au point de notre microscope pour obtenir une image nette en sortie. Si l'on prend les valeurs de grossissement commercial données précédemment, on a $l = 0,16$ mm pour $G_c = 40$ et $l = 0,25 \mu\text{m}$ pour $G_c = 1000$. La profondeur de champ est donc une donnée essentielle pour allier performance et limites techniques du microscope.

1.3.2 Tâche d'Airy

Une autre limite purement physique est également à prendre en compte. En effet, si on s'intéresse maintenant au caractère ondulatoire de la lumière, on sait que tout système optique diffracte les rayons lumineux et diminue le pouvoir de résolution du microscope. Si celui de l'oeil a déjà été vu en introduction, il faut aussi regarder l'impact des lentilles d'ouverture circulaire qui diffractent chaque point de l'objet en une tâche que l'on appelle tâche d'Airy.

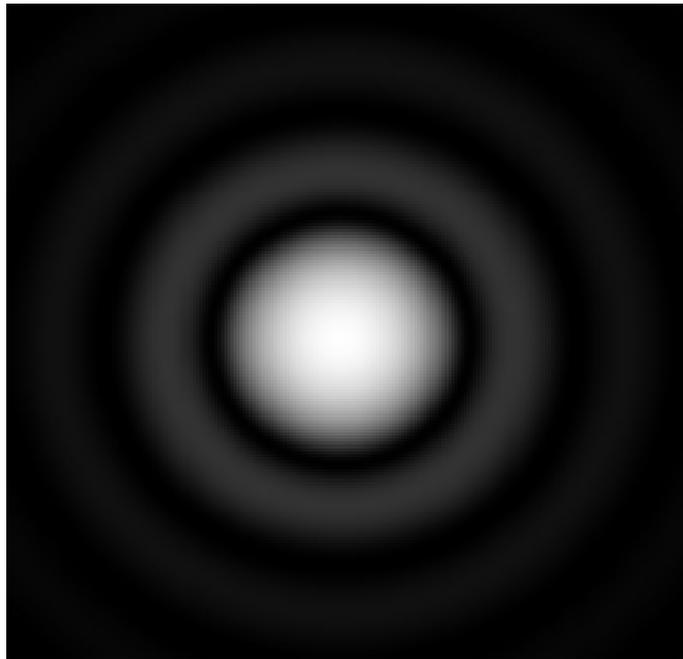


FIGURE 4 – Illustration de la tâche d’Airy. La première annulation rend compte de la limite de résolution du microscope.

La tâche d’Airy étant représentée mathématiquement par une fonction de Bessel, la première annulation de cette fonction est supposée égale au rayon total de la tâche d’Airy tel que :

$$r' = \frac{1.22\lambda L}{2R} \quad (10)$$

où λ est la longueur d’onde du rayon incident, R est le rayon des lentilles et L est la distance séparant l’écran de la sortie du système optique. On peut alors définir une limite de résolution généralisable sous le nom de critère de Rayleigh : deux pics sont séparables sur l’écran si la distance entre leur maxima est plus grande que le rayon de la tâche d’Airy.



Critère de Rayleigh

🔗 Critere_Rayleigh.ca.py



Pour une fente, c’est pas 1.22, c’est juste 1, parce que c’est pas une fonction de Bessel dedans.

Dans le cas du microscope, le calcul de l’ouverture numérique donne, avec α l’angle maximal d’incidence des rayons incidents :

$$r = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha} \quad (11)$$

On peut donc augmenter la résolution de deux manières :

1) en augmentant l’indice de réfraction. Ceci peut être réalisé en utilisant un objectif à immersion : on immerge la frontale de l’objectif dans un liquide dont l’indice de réfraction est proche du maximum de 1,5, celui du verre.

2) en diminuant la longueur d’onde. Toutefois, si on reste dans la lumière visible, il n’est pas possible de descendre en dessous de 400 nm.

La limite de résolution d’un microscope photonique classique est d’environ 0,2 μm . Le microscope électronique en transmission atteindra, lui, une limite 100 fois plus petite.

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. Avec les avancées faites au XX^{ème} siècle sur la structure de la matière, descendre au niveau du nanomètre était impératif dans de nombreux domaines de la physique, chose impossible à réaliser avec un microscope aussi simple que celui présenté dans cette première partie. 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.

2 Microscopie à fluorescence (ou à champ lointain)

➤ <http://toutestquantique.fr/fluorescent-et-confocal/>

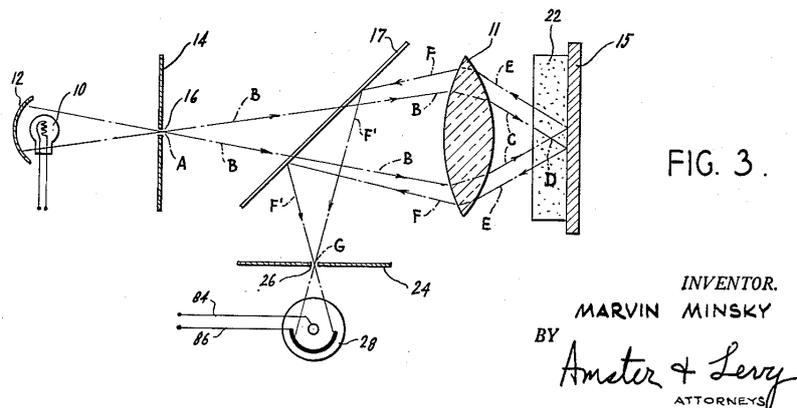
C'est une partie assez qualitative et peu répandue dans les leçons des années précédentes (on parle en général plus de la microscopie en champ proche). La littérature concise sur ce type de microscopie est assez rare mais on peut rester superficiel et s'en sortir.

2.1 Principe

Lorsqu'une molécule absorbe un photon, elle passe à un état excité. Cependant, pour retourner dans son état fondamental, la molécule ne réémet pas toujours directement un photon de même énergie que le photon absorbé. En effet, elle peut perdre une partie de son énergie via une transition non radiative avant d'émettre un photon. Cela a pour conséquence le fait que le photon émis soit moins énergétique que le photon absorbé. Ainsi, une molécule peut absorber dans l'UV et émettre dans le visible : c'est ce qu'on appelle la **fluorescence**, et on dit que la molécule est un **fluorophore**.

Vu que les photons absorbés et émis ont des longueurs d'onde différentes, on peut ainsi filtrer les photons selon leur longueur d'onde et donc ne sélectionner que les photons émis par les fluorophores de plus faible longueur d'onde que les autres pour obtenir une cartographie de l'emplacement des fluorophores. On utilise beaucoup ce principe en biologie où on marque les tissus à observer (par exemple la membrane d'un virus) avec des fluorophores. Cependant, on a toujours les problèmes de profondeur de champ et de

2.2 Microscopie confocale



Le but du microscope confocal est de se débarrasser du problème de profondeur de champ. En effet, on est capable de focaliser le rayon sur une toute petite zone de l'échantillon et, à l'aide d'un second diaphragme appelé *sténopé*, on peut alors n'observer qu'un point de l'échantillon. Ainsi, puisque l'image observée ne correspond qu'à une toute petite partie de l'échantillon, on s'est affranchi du problème de la profondeur de champ.

On peut recommencer l'opération et faire un balayage 3D pour tous les points de l'espace. On obtient alors une image nette pour tout l'échantillon, observable en 3D.

Notons cependant deux choses :

- En diminuant le diaphragme de sortie, on peut ajuster l'épaisseur z de la tranche observée, mais il y a un compromis à trouver entre le flux lumineux reçu et la résolution axiale souhaitée. En effet, la largeur de la lentille diaphragmante induit une limite de résolution axiale. On peut montrer expérimentalement que cette limite est autour de 600 nm.
- On est toujours bloqué en résolution par la limite de diffraction donc le microscope confocal ne descend pas sous la centaine de nanomètres en résolution.

Remarque

En vrai il existe deux types de microscope confocal :

- le 'vrai' microscope confocal où il n'y a que le sténopé. La fluorescence provient de tout l'échantillon et on parle d'excitation monophotonique, puisqu'un seul photon arrive sur chaque fluorophore.
- le microscope confocal qui utilise l'excitation multiphotonique. C'est pour ce type de microscope confocal qu'on dirige le faisceaux d'excitation en un seul point.

Il n'y a pas de réels avantages pour l'un ou pour l'autre... Les grosses différences sont résident dans le fait que pour le deuxième cas on utilise des plus hautes longueurs d'onde, qui vont donc plus loin ; et qu'en excitant moins l'échantillon, on limite le photoblanchiment (le fluorophore peut perdre sa fluorescence en entrant dans une réaction chimique lorsqu'il est excité).

2.3 Microscopie PALM

➤ <https://cours.espci.fr/site.php?id=265&fileid=982>

La microscopie PALM (photo-activated localization microscopy) est un type de microscopie qui arrive à repousser la limite de diffraction. Cette technologie a valu le prix Nobel de 2014 à Eric Betzig, Stefan Hell et William Moerner.

Pour comprendre comment c'est possible, il faut se rappeler que le critère de Rayleigh est un critère à satisfaire pour distinguer 2 points sources différents. Cependant, si l'on sait avec certitude qu'il n'y a qu'un seul point source, on peut alors réussir à déterminer la position du centre de la figure d'Airy avec précision.

Pour prendre avantage de cette subtilité, on envoie un pulse très faible et délocalisé sur l'échantillon. Cela signifie qu'on envoie un petit nombre de photons qui vont donc exciter un petit nombre de fluorophores qui vont ensuite réémettre des photons de plus basses énergies. Sur l'image récupérée, on voit donc quelques taches d'Airy, chacune correspondant à un seul fluorophore parmi le petit nombre de fluorophores excités. Ainsi, on peut ignorer les taches d'Airy en retrouvant l'emplacement exact de chaque fluorophore par déconvolution d'une gaussienne en 2D. On répète l'opération et on obtient la position de tous les fluorophores avec une résolution pouvant descendre jusqu'à 20 nm.

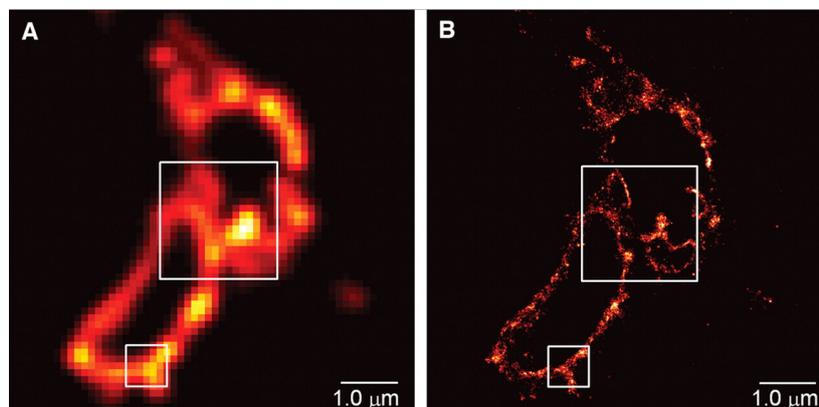


FIGURE 5 – Image par microscopie d'un lysosome : à gauche, on voit l'image obtenue avant traitement et à droite on voit l'image traitée (Betzig, Science 2006).

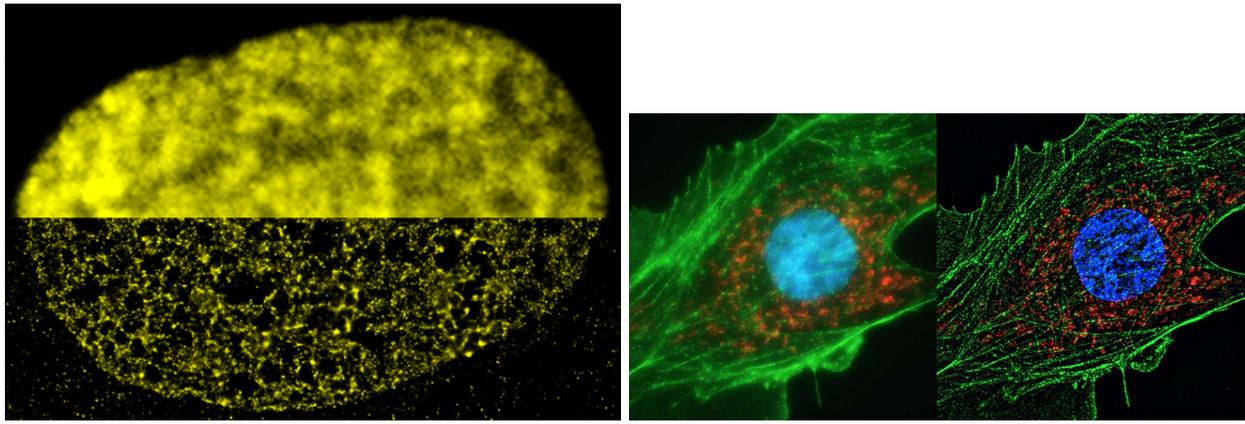


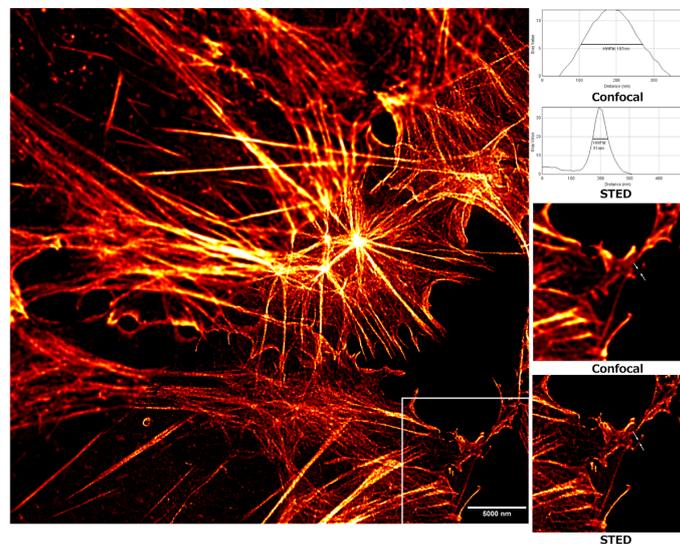
FIGURE 6 – Image par microscopie PALM de cellules.

La limite de résolution de la microscopie PALM vient alors des dérives du microscope qui ne doit absolument pas bouger entre les mesures. L'échantillon doit donc être immobile pendant toute l'acquisition qui peut être longue de temps de faire les N cycles.

2.4 Microscopie STED

➤ https://en.wikipedia.org/wiki/STED_microscopy

C'est semblable au PALM, mais on fait de photoblanchiment partout sauf au centre de l'image avec un deuxième laser. On peut préférer cette technique au PALM car elle nécessite directement le confocal.



3 Microscopie à champ proche

➤ Aigouy

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.

3.1 Nécessité des ondes évanescentes

Pour comprendre l'importance des ondes évanescentes dans l'imagerie des détails d'un objet, on repart des bases de l'optique ondulatoire en considérons une onde EM incidente monochromatique se propageant selon z et ayant la forme

$$E_i(x, y, z, t) = E_i(x, y, z)e^{j\omega t} \quad (12)$$

Dans la suite, on ne s'intéresse qu'à l'amplitude de l'onde. Quand l'onde rencontre un objet en $z = 0$ de transmittance $\tau(x, y)$, l'expression de l'onde devient

$$E_0(x, y) = E_i(x, y, z = 0)\tau(x, y) \quad (13)$$

Ce facteur $\tau(x, y)$ dépend des caractéristiques de l'objet et contient donc les informations qui nous intéressent. On veut donc capter l'onde $E_0(x, y)$ et l'analyser. Or cela implique que l'onde doit se propager jusqu'au capteur, donc son expression est modifiée. Pour connaître cette expression, on applique Huygens-Fresnel en décomposant $E_0(x, y)$ en transformée de Fourier

$$E_0(x, y) = \iint F_0(k_x, k_y) e^{j(k_x x + k_y y)} dk_x dk_y \quad (14)$$

E_0 est ainsi décomposée en une somme d'ondes planes d'amplitude $F_0(k_x, k_y)$. Lorsque l'onde se propage selon z , on écrit donc

$$E_0(x, y, z) = \iint F_0(k_x, k_y) e^{j(k_x x + k_y y + k_z z)} dk_x dk_y \quad (15)$$

On a représenté la propagation dans l'espace selon z par l'ajout du terme $k_z z$ dans l'exponentielle. En ce plaçant dans l'air ($n = 1$ donc $k = \frac{\omega}{c}$), on obtient

$$k_z = \sqrt{\left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_x^2 - k_y^2} \quad (16)$$

On peut donc directement lier la propagation de l'onde à k_x et k_y . On distingue alors deux cas :

- $\frac{\omega}{c} \gg k_x, k_y$: k_z est réel et l'onde se propage via le déphasage $e^{jk_z z}$. L'onde est alors soumise à la limite de résolution de Rayleigh comme vu dans la première partie.
- $\frac{\omega}{c} \ll k_x, k_y$: k_z est imaginaire pur et l'onde est atténuée : on dit que l'onde est **évanescence**. Elle décroît exponentiellement sur une longueur caractéristique

$$L = \frac{1}{k_z}$$

Cette décroissance est d'autant plus forte que k_x , et k_y sont importants : les ondes évanescentes sont alors situées à une distance très faible de l'objet (typiquement la centaine de nanomètres). Cette zone pour laquelle les ondes évanescentes ne sont pas négligeables est appelée **champ proche**.

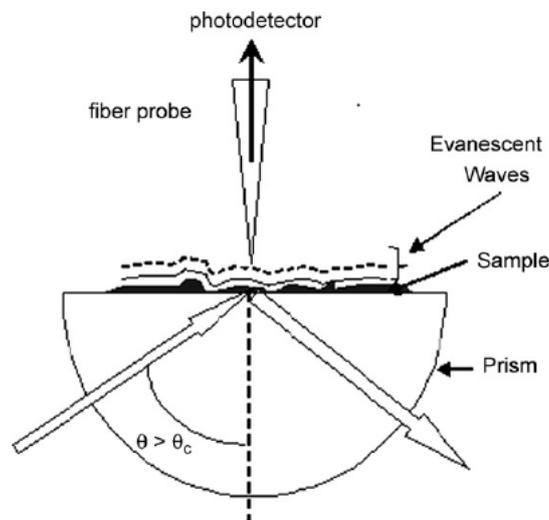


FIGURE 7 – Schéma de principe du microscope à ondes évanescentes.

Mise en évidence expérimentale des ondes évanescentes

on peut s'amuser à faire la manip suivante :

On considère un demi-hémisphère en plexiglas dans lequel on envoie un laser vert $\lambda = 532nm$. On se place en réflexion totale à la sortie de l'interface plexiglas-air tel que l'angle de réflexion totale soit $\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$, où n_2 est l'indice de l'air et n_1 celui du plexiglas.

On peut alors montrer par 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 !

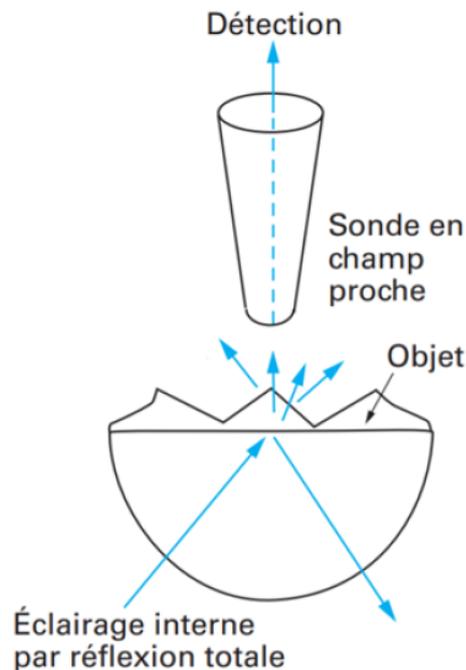
*Il faut garder à l'esprit que l'on s'intéresse dans cette leçon aux microscopies **optiques** : il faut donc dans cette expérience utiliser une lumière de longueur d'onde **visible** pour qu'elle soit pertinente (la mise en évidence d'ondes évanescentes centimétriques est certes plus simple car la décroissance exponentielle est moins violente, mais elle est complètement hors-sujet).*

A ce moment-là, il est essentiel de se rappeler de la relation d'indétermination de Heisenberg qui nous dit :

$$\Delta x \Delta k_x = 2\pi \quad (17)$$

Cette relation est également valable sur y , et nous dit que lorsque l'on veut étudier les détails les plus fins de notre objet, il faut avoir accès aux fréquences spatiales les plus élevées. On voit alors toute l'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**. On peut alors théoriquement descendre en-dessous du critère de Rayleigh...

3.2 Microscope STOM



La microscopie STOM (scanning tunneling optical microscope) repose sur la détection d'ondes évanescentes pour descendre sous le critère de Rayleigh.

Reprenons notre expérience en échangeant le deuxième hémisphère de plexiglas par l'objet à étudier, fixé sur le premier hémisphère de plexiglas. On sait que par effet tunnel optique, les ondes incidentes se propagent à l'intérieur

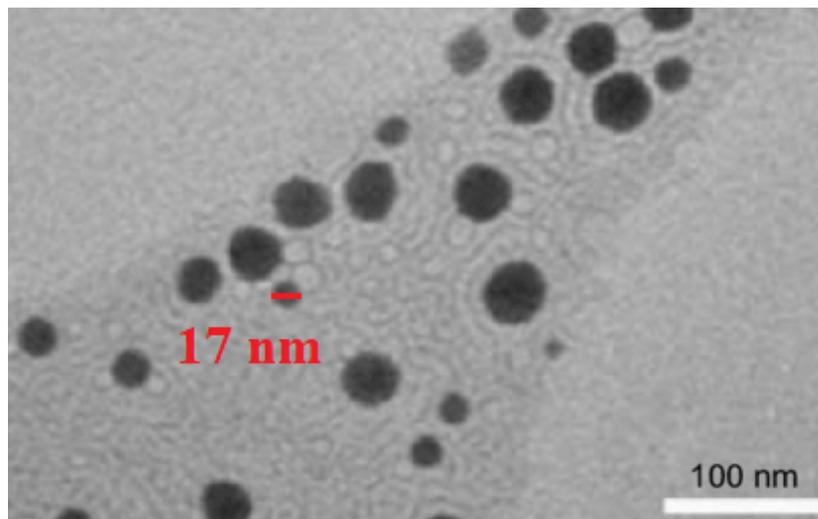
de notre objet qui a remplacé le deuxième hémisphère de plexiglas. En sortie de l'objet, les ondes propagatives sont alors modifiées par le coefficient de transmission de l'objet comme expliqué dans la sous-partie précédente. Il est alors possible d'accéder aux détails de l'objet en récupérant les ondes 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 a l'avantage de ne pas atténuer l'onde incidente dans la fibre, même si c'est une onde évanescente.

Pour obtenir la limite de résolution du STOM, considérons un détail de l'objet de taille $\delta < \lambda$. Dans le cas classique, ce détail n'est donc pas visible car on est limité par le critère de Rayleigh. En revanche, il est visible en utilisant un STOM et en récupérant l'onde évanescente correspondante. La fréquence correspondante à l'onde évanescente est alors $k_z = \frac{2\pi}{\delta}$ et donc la sonde doit être placée à une distance

$$L = \frac{1}{k_z} = \frac{\delta}{2\pi}$$

La limite de résolution du STOM est donnée par la distance entre la sonde et l'objet et est indépendante de la longueur d'onde. Elle est de l'ordre d'un sixième du détail de l'objet. Il n'y a donc théoriquement pas de limite inférieure au détail de l'objet étudié, mais les limites techniques prennent alors le relais. 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. En pratique, la limite de résolution est de l'ordre de la dizaine de nanomètres voire du nanomètre.

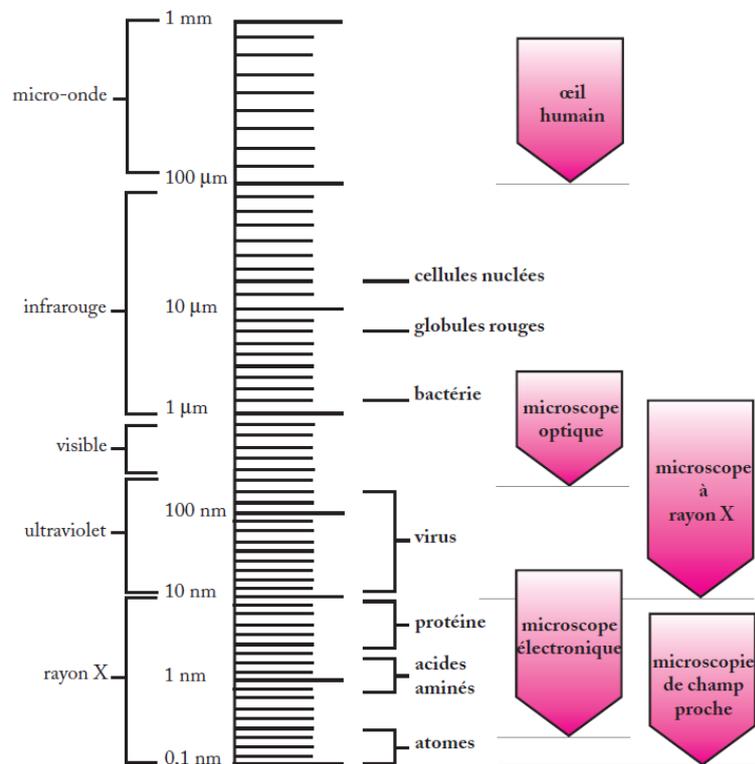
On peut prendre l'exemple de cette photo de micelle observée au STOM :



(18)

Cet exemple est très intéressant car il est extrait d'un article de biologie. Si la microscopie n'avait pas fait autant d'avancées ces dernières décennies, l'étude de cellules en biologie aurait été impossible (d'ailleurs, on utilise plutôt en biologie la technique de microscopie confocale couplée à de la fluorescence car elle nous permet d'avoir une vue 3D de nos échantillons). On peut donc dire que la microscopie est une problématique commune à toutes les sciences, et que son utilisation requiert une attention particulière en fonction des attentes de l'expérience.

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.

Aujourd'hui, les techniques de microscopie se sont largement élargies au domaine non optique (microscope 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.