LP30 : Microscopies optiques

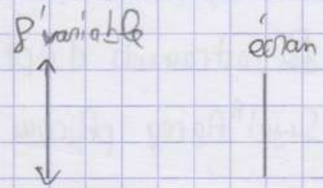
Introduction : Micro = petit et scopie = observer ⇒ Microscopie : ensemble de techniques d'imagerie

On a principalement optique et électronique, resp. faisceau lumineux ou d'électrons.

I - Principe d'un microscope optique

a) L'oeil humain

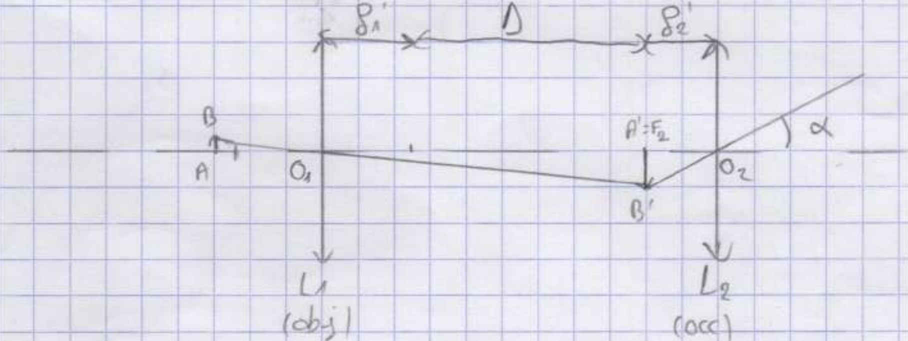
→ Capteur de l'information 

⇒ 

→ Vision sans accomoder, donc sans fatiguer, à l'infini. On peut aller jusqu'à $d_m = 25$ cm
punctum prox.

b) Principe du microscope composé

Montrer un vrai modèle de microscope. On a une source de lumière ≡ optique.
On peut voir occulaire et objectif. **Composés de différentes lentilles, diaphragme.**
→ On modélise par des lentilles simples. 2 Systèmes optiques centré (m̂ axe optique) :



On veut que les rayons sortent à l'infini (pas d'accomodation)
Δ étant fixe, c'est sur la position de l'objet que l'on va jouer

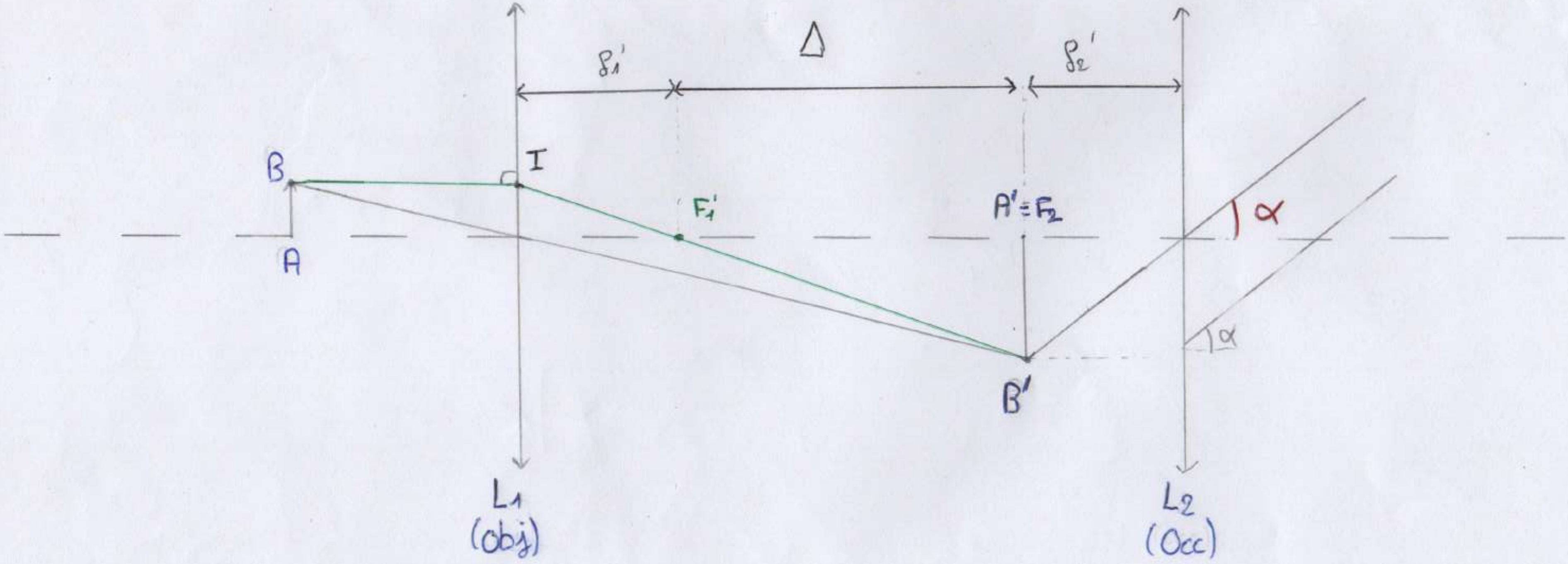
- $\overline{O_1A'} = f_1' + \Delta$ ①
- $\dfrac{1}{\overline{O_1A'}} - \dfrac{1}{\overline{O_1A}} = \dfrac{1}{f_1'}$ ②

② → $\overline{O_1A'} = \left(\dfrac{1}{\overline{O_1A}} + \dfrac{1}{f_1'}\right)^{-1} = \dfrac{\overline{O_1A}\, f_1'}{\overline{O_1A} + f_1'}$

① $\left(\dfrac{1}{\overline{O_1A}} + \dfrac{1}{f_1'}\right) = \dfrac{1}{f_1' + \Delta} \rightarrow \dfrac{1}{\overline{O_1A}} = \dfrac{1}{f_1'+\Delta} - \dfrac{1}{f_1'} = \dfrac{f_1' - \Delta}{f_1' + \Delta}$

$$\boxed{\overline{O_1A} = -\frac{f_1'(f_1' + \Delta)}{\Delta}}$$

Dans notre cas, $\overline{O_1A} = -0,1\,m = -10$ cm

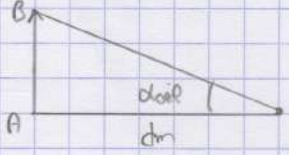


B
A
I
f_1'
Δ
f_2'
F_1'
$A' = F_2$
B'
α
α
L_1
(obj)
L_2
(Occ)

II - Caractéristiques d'un microscope composé

1) Grossissement et puissance d'un microscope

Déf : $\boxed{G = \left|\frac{\alpha}{\alpha_{oeil}}\right|}$



- $\tan(\alpha_{oeil}) = \frac{AB}{d_m}$ Gauss : $\alpha < 10°$ → $AB < 4{,}3$ cm .. On peut considérer que vrai

$$\alpha_{oeil} = \frac{AB}{d_m}$$

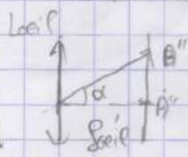
Et $\alpha = \frac{\overline{A'B'}}{f_2'}$ or $\frac{\overline{A'B'}}{\overline{AB}} = \frac{f_1'+\Delta}{\overline{O_1A}}$ et $\overline{O_1A} = -\frac{f_1'(f_1'+\Delta)}{\Delta}$

J'obtiens donc $\overline{A'B'} = -\overline{AB}\,\frac{\Delta}{f_1'}$ et donc $\alpha = -\overline{AB}\,\frac{\Delta}{f_1'f_2'}$ (*)

$$\boxed{G = \frac{\alpha}{\alpha_{oeil}} = +\frac{d_m\Delta}{f_1'f_2'}}$$

Étude de notre modèle $f_1' = 50$ mm $f_2' = 100$ mm $f_{oeil} = 250$ mm $\Delta = 50$ mm

taille de l'objet initial : $\overline{AB} = 1$ cm donc $\alpha_{oeil} = \frac{\overline{AB}}{d_m} = 4\overline{AB}$



donc $\alpha = \frac{\overline{A''B''}}{f_{oeil}}$ donc en mesurant $\alpha = \frac{\overline{A''B''}}{250\cdot 10^{-3}}$) f_{oeil}

$|G_{théo}| = -\frac{d_m\Delta}{f_1'f_2'} = 2{,}5$ $G_{mesuré} \simeq \frac{\alpha}{\alpha_{oeil}} = \frac{d_m}{f_{oeil}}$ $\frac{\overline{A''B''}}{\overline{AB}} = \frac{A''B''}{AB}$

En microscopie optique, on parle souvent de puissance

Déf : $P = \left|\frac{\alpha}{\overline{AB}}\right|$ or on a vu (*) $|\alpha| = \frac{\overline{AB}\Delta}{f_1'f_2'}$

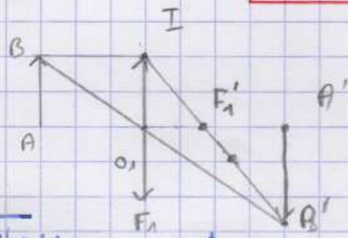
$$\boxed{P = \frac{\Delta}{f_1f_2} = 4|G| \text{ en } m^{-1}}$$

II-2) Oculaire et objectif commerciaux

· Sur les microscopes qu'on utilise, objectifs et oculaire x10, x20.. → Commercial

Def : $G_{oc} = \dfrac{\text{Angle sous lequel on voit l'objet à l'infini}}{\alpha_{oeil}}$ = sur le plan focal objet

$$G_{oc} = \left(\frac{AB}{f_2'}\right)\left(\frac{AB}{d_m}\right)^{-1} \quad \text{donc} \quad \boxed{G_{oc} = \frac{d_m}{f_2'}}$$



Def $\gamma_{obj} = \left|\dfrac{\overline{A'B'}}{\overline{AB}}\right|$

Donc $\gamma_{obj} = \left|\dfrac{\overline{A'B'}}{\overline{O_1I}}\right| \overset{\text{Thalès}}{=} \left|\dfrac{\overline{F_1'A'}}{\overline{F_1'O_1}}\right| = \dfrac{\Delta}{f_1'}$

On a vu $G = \left|\dfrac{d_m\Delta}{f_1'f_2'}\right|$ donc $\boxed{G_{com} = \gamma_{obj} \times G_{oc}}$

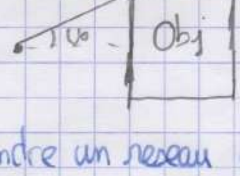
Quelques exemples : $10 \times 40 = 400$, $20 \times 50 = 1000$

II-3) Limite due à la diffrac° : pouvoir de résolution

Diffrac° → L'image d'un point est une tache (d'Airy)

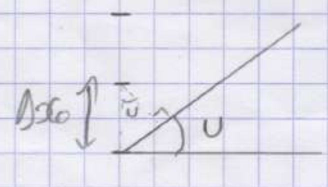
Def : Pouvoir de résolu° ≡ Capacité à imager distinctement 2 détails proches de l'objet

Limité par diffrac° ⇒ Vient de l'ouverture de l'oculaire



O.N : $n_0 \sin(u_0)$

→ On va prendre un réseau de paramètre Δx_0 et chercher le $(\Delta x_0)_{min}$ que l'on peut distinguer au microscope



On sait que ~~répond~~ à :

$$\Delta x_0 \sin(u) = \lambda$$

Au max : $(\Delta x_0)_{min} \sin(u_0)\ \lambda$

d'où $\boxed{(\Delta x_0)_{min} = \dfrac{n_0\lambda}{O.N.} = \dfrac{\lambda_0}{O.N.}}$

Rq : - Plus λ est petit, plus on peut distinguer les détails

- Plus O.N est grande, moins on diffracte → meilleurs détails

Ex : O.N ≃ 0,8 , pour $\lambda_0 = 550$ nm $(\Delta x_0)_{min} \simeq 69$ µm

Cellules végétales ≃ 100 µm

→ Ce calcul nous donne un $(\Delta x_0)_{min}$. En utilisant les propriétés des taches d'Airy et les relations d'Abbe, on peut aboutir à une valeur théorique limite plus fine.

$$\boxed{(\Delta x_0)_{min} = \frac{0,61\lambda}{O.N.}}$$

m̂ ordre de grandeur

$(\Delta x_0) \simeq 42$ µm

Démo assez longue et pas plus intéressante que ça

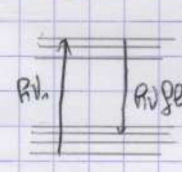
Peut on atteindre des précisions meilleures en microscopie optique

(Bactérie ~ µm, cellule animal ~ 20 µm ?

III - La microscopie de fluorescence

a) Phénomène de fluorescence

Une molécule est excité lumineusement (électron) puis réemet à une autre longueur d'onde, généralement plus grande. (Processus de photoluminescence).



→ $E = \hbar\nu = \frac{\hbar c}{\lambda}$ donc $\lambda_{fluo} > \lambda_{inc}$

b) Présentation du microscope de fluorescence

Image sujet A agreg phys 2015

· On envoie de la lumière sur un filtre d'excitation permettant de sélectionner la bonne longueur d'onde d'excitation. Cette longueur d'onde est bien réfléchie mais peu transmise par le miroir dichroïque

b) Taille des pixels du capteur

Projection du schéma

· Pas des points mais des taches d'Airy qui se forment sur le capteur. Plus précis dans le cas 2, importance du choix des capteurs.

c) Pouvoir de résolution

Comme l'image n'est plus à l'infini mais focalisée sur le capteur (on parle de microscope projectif, plutôt que visuel), on définit plutôt un grandissement transversal $g = \frac{r'}{r_0}$ ← Image ← Objet. En général, $g \sim 10^3$

À partir des t. d'Airy, on avait $r_{min} = 0{,}61 \frac{\lambda}{O.N.} = 42\,\mu m$ donc on calcule $r' = g\, r_{min}$

A.N : $r' \simeq 42\,\mu m$ pour $\lambda = 560$ nm (vert/jaune)

Thompson a démontré que si les bruits ne sont pas gênants :

taille de l'image sur le capteur

Précision sur la posi$^\circ$ du centre de la tache d'Airy → $\Delta x' = \sqrt{\frac{r'^2 + a^2/12}{N}}$ — taille d'un pixel

N ← Nombre de photons détectés

Expérimentalement, on peut avoir $N = 10^4$ photon par image et $a = 8\ \mu m$

→ $\Delta x' = \frac{r'}{100}$ donc $\Delta x' \simeq 42\,\mu m$ ← Sur l'image du capteur

Or on sait que $r' = g\, r \approx 10^3 r$ donc $\boxed{\Delta x_0 = 420\,nm}$

C'est mieux !

CCL :

Bonus : Latitude de mise au point

Nous avons étudié le cas où l'on place l'objet de manière à ce que les rayons sortent de l'occulaire à l'infini. Néanmoins l'oeil sait accommoder jusqu'à $d_m = 25$ cm. De combien au max peut on décaler l'objet et le voir encore bien ?

• Autre cas extrême : $\overline{A''B''}$, image virtuelle de $\overline{A'B'}$ par L_2, se situe à 25 cm de O_2.

• $\frac{1}{\underbrace{\overline{O_2A''}}_{-d_m}} - \frac{1}{\overline{O_2A'}} = \frac{1}{f_2'} \rightarrow \frac{1}{\overline{O_2A'}} = -\frac{1}{4} - \frac{1}{f_2'}$ $\quad \overline{O_2A'} =$

• $\frac{1}{\overline{O_1A'}} - \frac{1}{\overline{O_1A}} = \frac{1}{f_1'}$ $\quad$ On a $\overline{O_1A'} = \overline{O_1O_2} + \overline{O_2A'} = f_1' + f_2' + \Delta + \overline{O_2A}$

$\overline{O_1A'} =$

$$\overline{O_1A} = \left(\frac{1}{\overline{O_1A'}} - \frac{1}{f_1'}\right) = -9{,}77 \text{ cm}$$

(avant, -10 cm)

latitude $\simeq 2{,}33$ mm