

Application de l'interaction rayonnement matière



Le microscope optique

Introduction

La microscopie est un ensemble de techniques d'imagerie des objets de petites dimensions.

L'appareil utilisé pour rendre possible cette observation est appelé un microscope.

Il existe différents types de microscopes et la physique qui est concernée n'est pas la même.

La physique qui est derrière les différents types de microscopes est fondée sur des effets électriques, magnétiques, optiques, électroniques, ioniques, photoniques, quantiques (tunnel), etc.

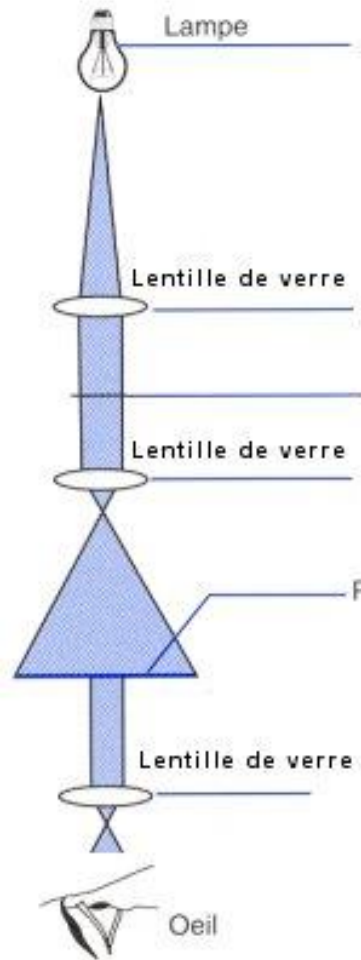
On distingue principalement trois types de microscopies:

I- Microscope optique: interaction d'un faisceau lumineux avec l'objet.

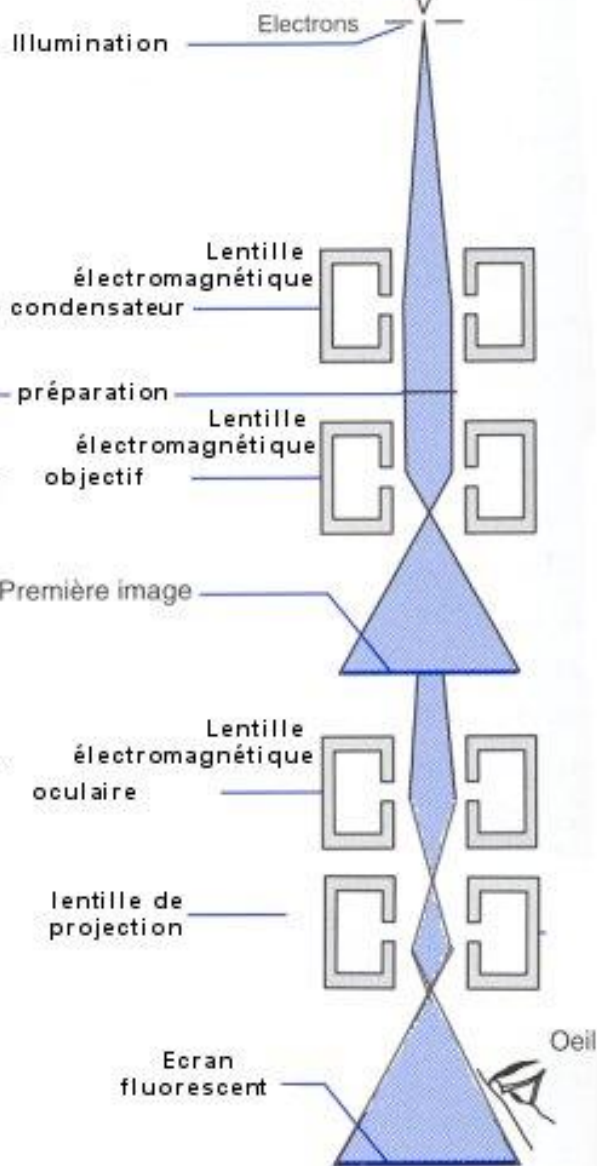
II- Microscope électronique: interaction d'un faisceau électronique avec l'objet.

III- Microscope à sonde locale: un capteur sonde directement la surface de l'objet. On peut citer le microscope à force atomique (AFM), le microscope à effet tunnel, microscope optique en champ proche, etc.

Microscope optique



Microscope électronique



Toutefois, il est possible de comparer les valeurs caractéristiques des microscopes comme :

✓ **Le grossissement**

✓ **Le pouvoir de résolution déterminé par la distance minimale pour distinguer les images de deux points séparés.**

✓ **La netteté des images**

✓ **La valeur des aberrations sphériques des lentilles.**

✓ **L'angle d'ouverture**

✓ **La longueur d'onde des émissions utilisées**

- ❑ Le microscope optique est appelé aussi microscope photonique parce qu'il utilise des photons.
- ❑ Le microscope est un instrument que l'on utilise pour l'examen d'objets trop petits pour être visibles à l'œil nu.
- ❑ L'œil humain ne peut distinguer des objets d'une taille inférieure à 0,1 mm (100 μm).
- ❑ Le microscope optique donne une image grandie d'un objet en général transparent.
- Les observations au microscope demandent une préparation de l'échantillon, et certains réglages du microscope.

Composantes mécanique du microscope optique

- Une base.
- Une potence qui supporte le revolver porte-objectif, le tube porte-oculaires.
- La platine qui se déplace dans deux/trois dimensions.
- Le support du condensateur.
- Des systèmes de crémaillères permettent de réaliser une mise au point rapide et fine. Différentes mécaniques existent pour réaliser ces réglages.

Composantes optiques du microscope optique

Les objectifs sont les éléments les plus critiques d'un microscope. Ils déterminent sa qualité optique.

Un objectif est un système à lentille convergente plus ou moins complexe avec une distance focale courte, qui projette l'image agrandie et inversée de l'échantillon vers le plan focal inférieur de l'oculaire, de sorte que celui-ci puisse "voir" et grossir encore l'image.

Les objectifs sont placés dans une tourelle porte-objectifs ou tourelle revolver qui comporte six ou sept objectifs avec des grossissements différents.

Il existe un certain nombre de constantes :

- l'ouverture numérique ou l'angle maximum sous lesquels les rayons issus de l'objet peuvent pénétrer dans le système optique.**
- Le grandissement.**
- Contraste de phase ou pas.**
- Immersion.**
- Longueur du tube.**
- Epaisseur de la lamelle couvre-objet.**

Principe du microscope optique

L'échantillon est éclairé par une lampe. Les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons :

Soit en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière. C'est la microscopie en lumière directe.

Soit en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux. C'est la microscopie en contraste de phase.

Soit en émettant de la lumière à une autre longueur d'onde que celle d'origine. C'est la microscopie à fluorescence.

- ✓ L'objectif transforme l'objet en une image réelle.
- ✓ L'image se forme au plan focal d'un oculaire qui va pouvoir en donner ensuite une image virtuelle située à l'infini.
- ✓ Le grossissement de l'appareil dépend :
 - des objectifs;
 - des oculaires;
 - des distances qui séparent les composants.

Les oculaires

Tête optique

***La tourelle
porte-objectif***

La platine porte-lame

Le condenseur

Le diaphragme de champ

La molette de mise au point



□ La tête optique

Elle renferme le système optique des oculaires à l'objectif, porte la sortie trinoculaire et la tourelle porte-objectif.

□ Les oculaires

Ensemble de plusieurs lentilles, assimilable à une loupe à fort grossissement. Il grossit l'image fournie par l'objectif. Ils sont généralement caractérisés par deux chiffres qui sont le grossissement et l'indice de champ.

□ La tourelle porte-objectif

La tourelle (ou revolver) peut accueillir 3 ou 4 objectifs selon le modèle de microscope. Ceux-ci sont simplement vissés sur la tourelle et peuvent être facilement changés.

❑ La molette de mise au point

Elle nous permet de régler la netteté de l'image d'un échantillon.

❑ Le condenseur

Constitué d'une lentille, le condenseur est l'élément qui concentre et dirige le faisceau de lumière sur l'échantillon.

Il est situé sous la platine du microscope et peut être déplacé vers le haut ou vers le bas, donc plus ou moins proche de la platine. Son bon réglage est très important.

❑ Le diaphragme de champ

Il contrôle la taille du champ éclairé sur l'échantillon.

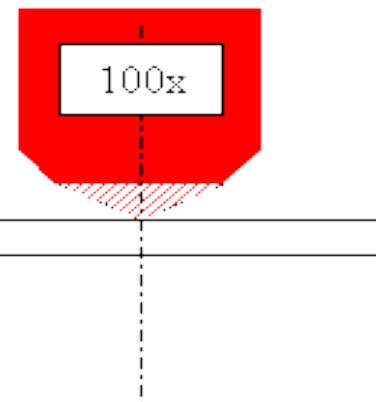
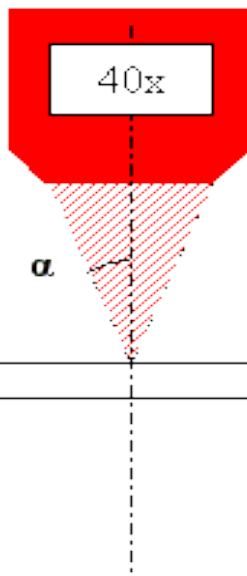
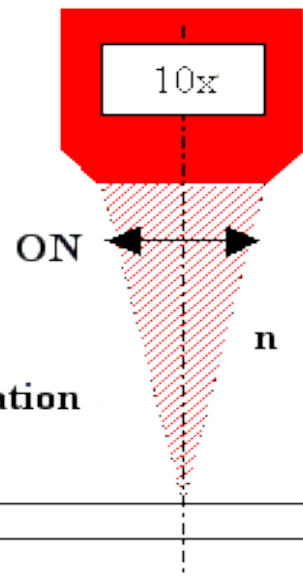
Les objectifs

- ✓ Ce sont des pièces maîtresses du microscope.
- ✓ Ils donnent une image réelle, inversée et agrandie de l'objet.
- ✓ Ce sont des éléments essentiels dans la constitution des images.
- ✓ Ils sont définis par leur ouverture numérique, capacité à capter les rayons lumineux diffractés (envoyés obliquement pour simplifier à l'extrême) par l'objet éclairé.

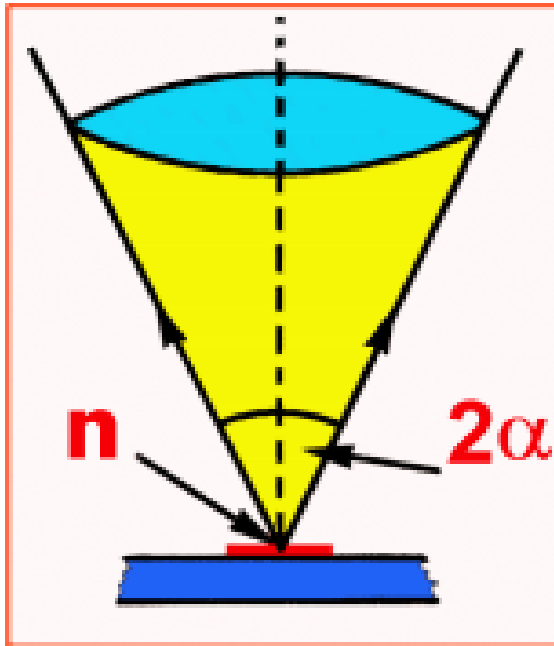


- ✓ Les objectifs sont définis par plusieurs caractéristiques, certaines étant gravées sur la monture de l'objectif.
- ✓ L'objectif d'un microscope fonctionne de la même manière qu'un objectif photo.
- ✓ C'est un système de lentilles qui collectent la lumière renvoyée par un objet pour la focaliser sur un plan, point par point, afin de créer une image de l'objet qui sera grossie par les lentilles de l'objectif et des oculaires.
- ✓ Un oculaire est caractérisé par le grossissement, l'ouverture numérique et le pouvoir séparateur .

De la qualité de l'objectif dépend la qualité de l'image.



Plus l'objectif est puissant, plus son Ouverture Numérique est grande, plus son angle de capture augmente.



Ouverture numérique

- ✓ Plus l'angle de capture est grand, plus les objectifs sont aptes à montrer les petits détails.
- ✓ L'ouverture numérique, ON , est donné par la formule suivante :

$$ON = n \sin \alpha$$

Cette expression indique la largeur maximale du cône de lumière pénétrant dans la lentille.

Où n est l'indice de réfraction du milieu dans lequel travaille l'objectif.

L'ouverture numérique est directement proportionnelle à l'indice de réfraction n du milieu situé entre l'échantillon et la lentille de l'objectif.

$n=1$ pour l'air ;
 $n= 1,515$ pour le verre ordinaire ;
 $n= 1,515$ ou $1,518$ pour l'huile à immersion.

α est l'angle formé par l'axe de l'objectif et les rayons extrêmes le traversant et participant à la formation de l'image.

➤ **Plus l'objectif grandit l'image, plus ON augmente.**

L'ouverture numérique est une dimension sans unité qui caractérise les objectifs de microscope.

L'ouverture numérique représente la gamme d'angles pour laquelle l'objectif est capable d'émettre et de recevoir de la lumière.

Ce paramètre influence WD, la profondeur de champ et le pouvoir séparateur de l'objectif.

Plus l'ouverture numérique est élevée, plus WD et la profondeur de champ sont faibles et plus le pouvoir séparateur est important.

□ *Profondeur de champ*

La profondeur de champ correspond à l'épaisseur de l'échantillon pour laquelle l'image est nette.

Plus le grossissement est grand, moins la profondeur de champ est importante.

□ *Champ observé*

Le champ observé (plage d'observation) dépend de l'indice de champ de l'oculaire et correspond sur l'échantillon au diamètre (en mm) de la zone que vous pouvez voir à travers les oculaires.

L'indice de champ des oculaires est le deuxième chiffre présent sur l'oculaire.

- Par exemple, des oculaires avec l'inscription **10X/22** indiquent un indice de champ de **22 mm**.

Pour calculer le champ observé, il suffit de diviser l'indice de champ de l'oculaire par le grossissement de l'objectif utilisé.

Exemple: pour un indice de champ des oculaires de 20, avec l'objectif 4X, alors le diamètre de la zone observée est égal à $20/4$ soit 5 mm

Plus le grossissement est important, moins le champ observé est grand.

□ Distance de travail

La distance de travail (**working distance, WD**) est la distance entre l'objectif et l'échantillon pour laquelle l'image est nette.

WD dépend de l'ouverture numérique de l'objectif.

□ Calcul du grossissement

Le grossissement de ce que est observé est égal au grossissement des oculaires multiplié par le grossissement de l'objectif utilisé.

$$\text{Grossissement} = G_{\text{objectif}} \times G_{\text{oculaires}}$$

Par exemple, pour un microscope dont les oculaires grossissent **10X** et l'objectif utilisé grossit **4X**, le grossissement final est égal à **$10 \times 4 = 40X$** .

Le grandissement

Le grandissement est le rapport entre la taille de l'image formée par l'objectif et la taille réelle de l'objet.

Le terme grossissement désigne un rapport entre des valeurs angulaires et non entre des valeurs linéaires.



Un anneau de couleur permet d'identifier le grandissement de l'objectif.

Code coloré d'identification des grossissements des objectifs pour microscope

Grandissement

Code coloré

1x

Noir

2x

Marron

4x

Rouge

10x

Jaune

20x

Vert

40x

Bleu clair

50x

Bleu clair

60x

Bleu cobalt

100x

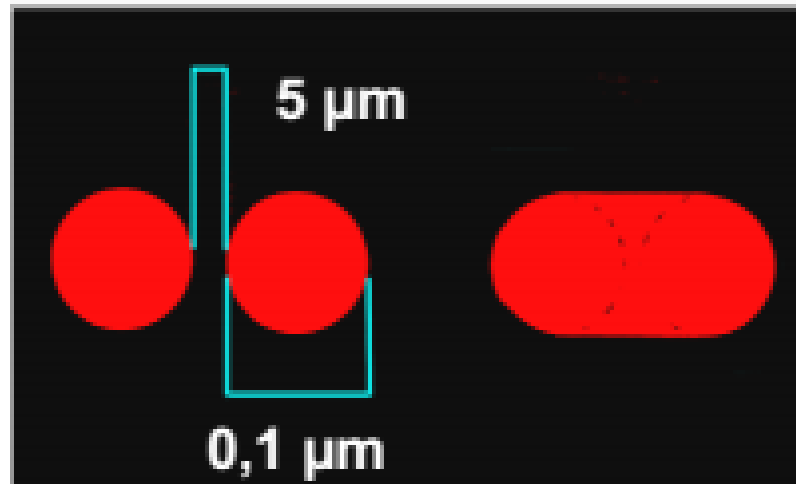
Blanc

□ *Le pouvoir séparateur ou résolution*

C'est la capacité d'un objectif à distinguer deux points distincts.

L'œil a la capacité de distinguer des particules d'un diamètre pouvant atteindre $0.1 \mu\text{m}$.

Les particules doivent être séparées entre elles d'une distance d'au moins $5 \mu\text{m}$. Le pouvoir séparateur de l'œil est de $5 \mu\text{m}$.



Il est définie comme la distance angulaire minimale entre deux éléments qui permet d'en obtenir deux images distinctes.

La résolution maximale qu'il est possible d'obtenir aujourd'hui en microscopie optique est de $0,24 \mu\text{m}$, c'est-à-dire que l'on peut distinguer sur un échantillon deux points distants l'un de l'autre de $0,24 \mu\text{m}$.

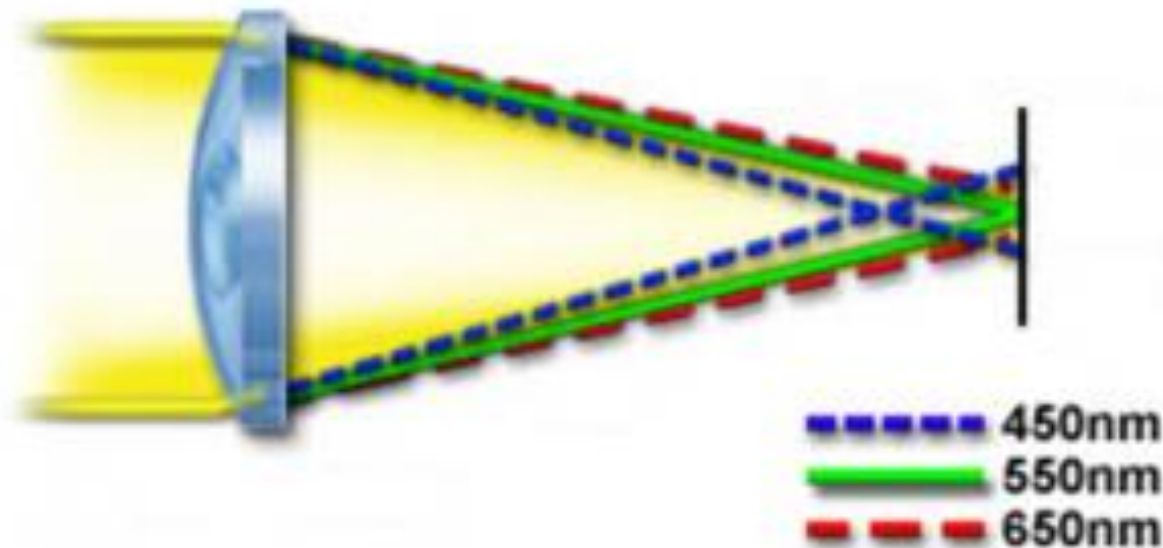
Si deux points sont distants l'un de l'autre de seulement $23 \mu\text{m}$, ils seront alors vus comme un seul point.

La qualité d'un microscope ne dépend pas du grossissement mais du pouvoir séparateur.

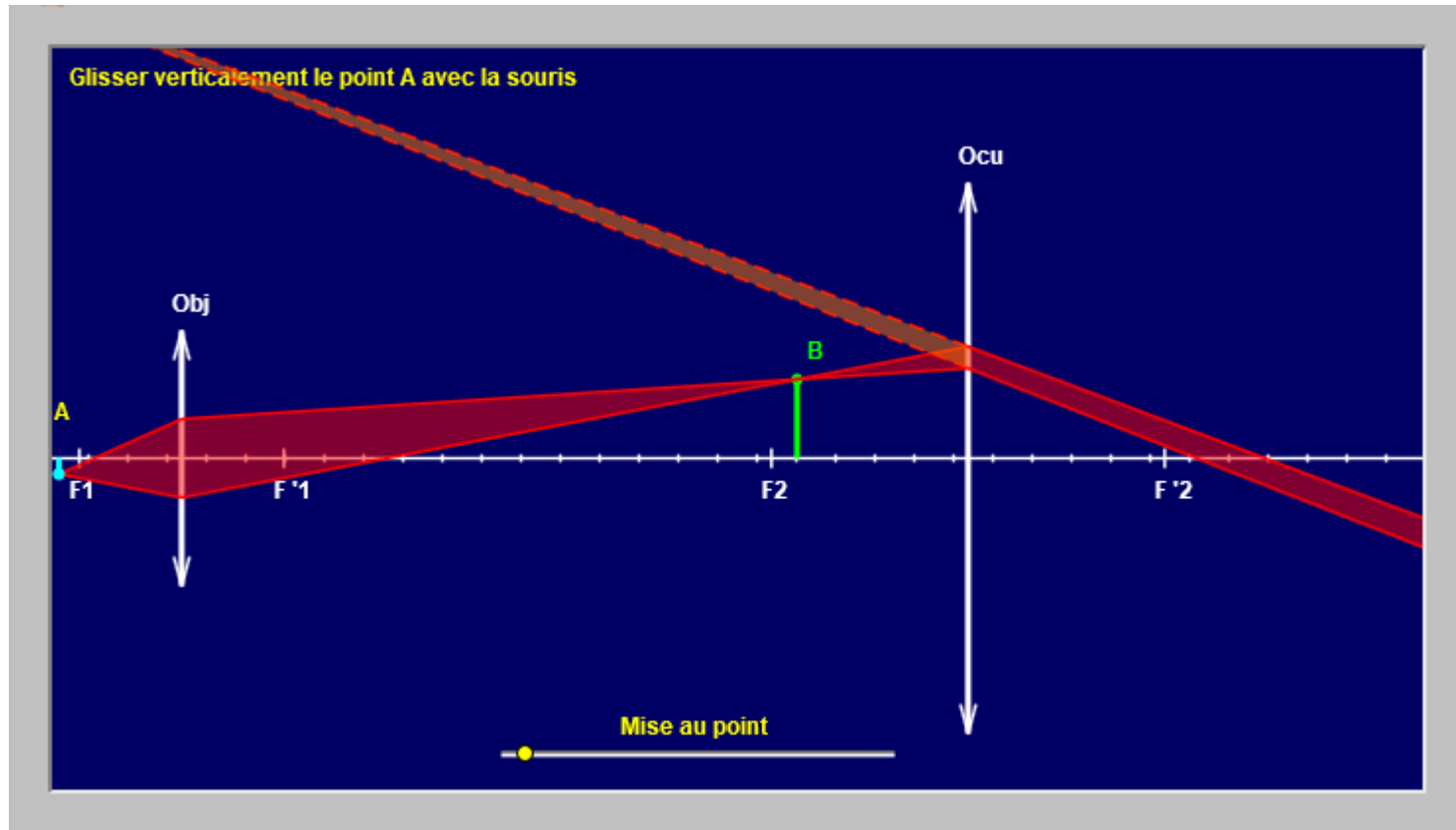
Aberration chromatique

La lumière blanche qui passe à travers une lentille se décompose en différentes λ (différentes couleurs) qui ne se projettent pas sur le même plan focal. *C'est ce que l'on appelle une aberration chromatique.*

Certains objectifs peuvent corriger cette aberration. On les appelle objectifs achromatiques (*corrigés sur deux couleurs*) et apochromatiques (*corrigés sur trois couleurs*).



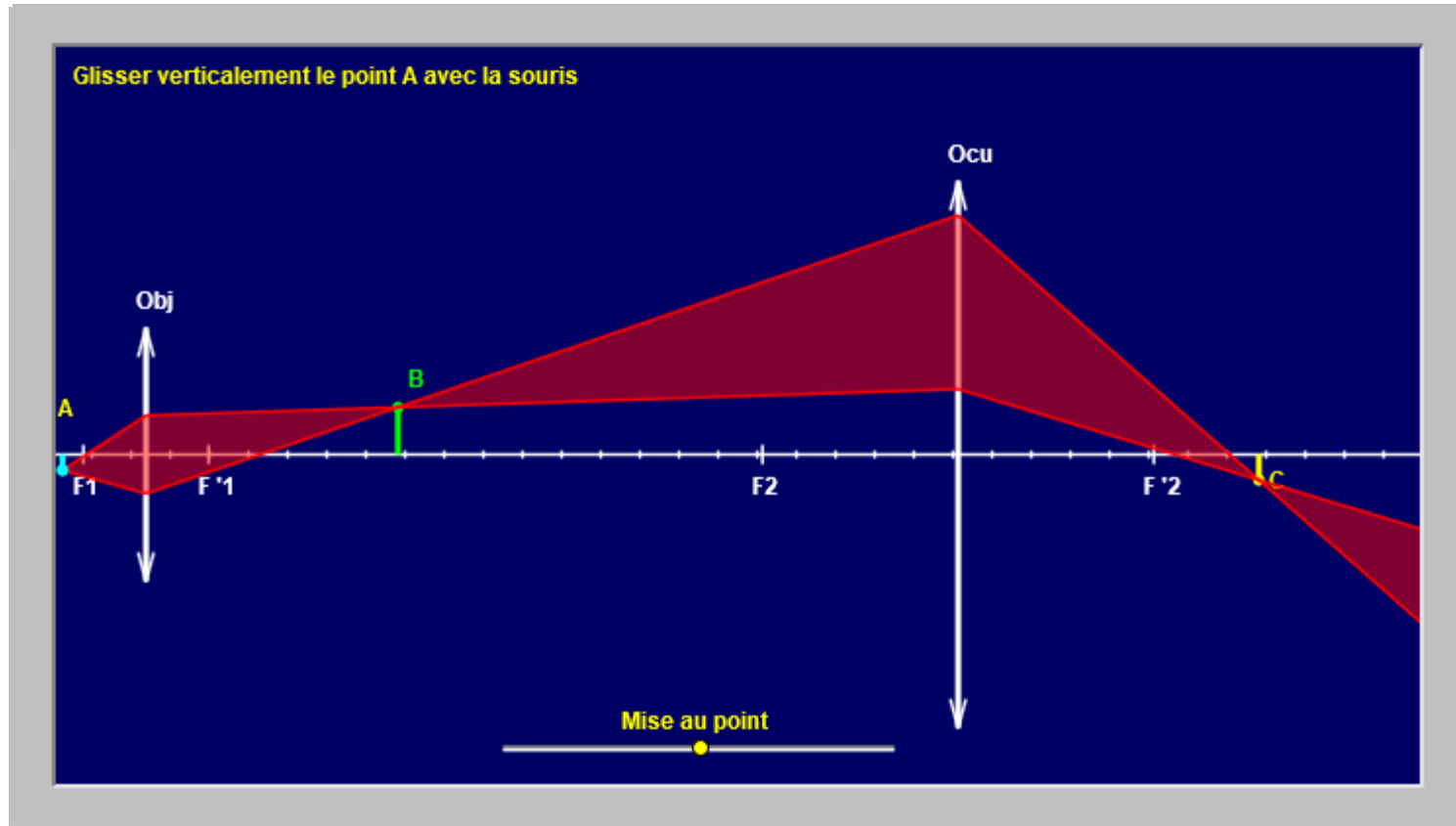
L'image intermédiaire est tracée **en vert**. L'image finale est tracée en jaune. Si celle-ci se forme dans le plan focal objet de l'oculaire, l'image finale est située à l'infini.



Objectif x5

Oculaire x5

Oculaire x5



Objectif x2,5

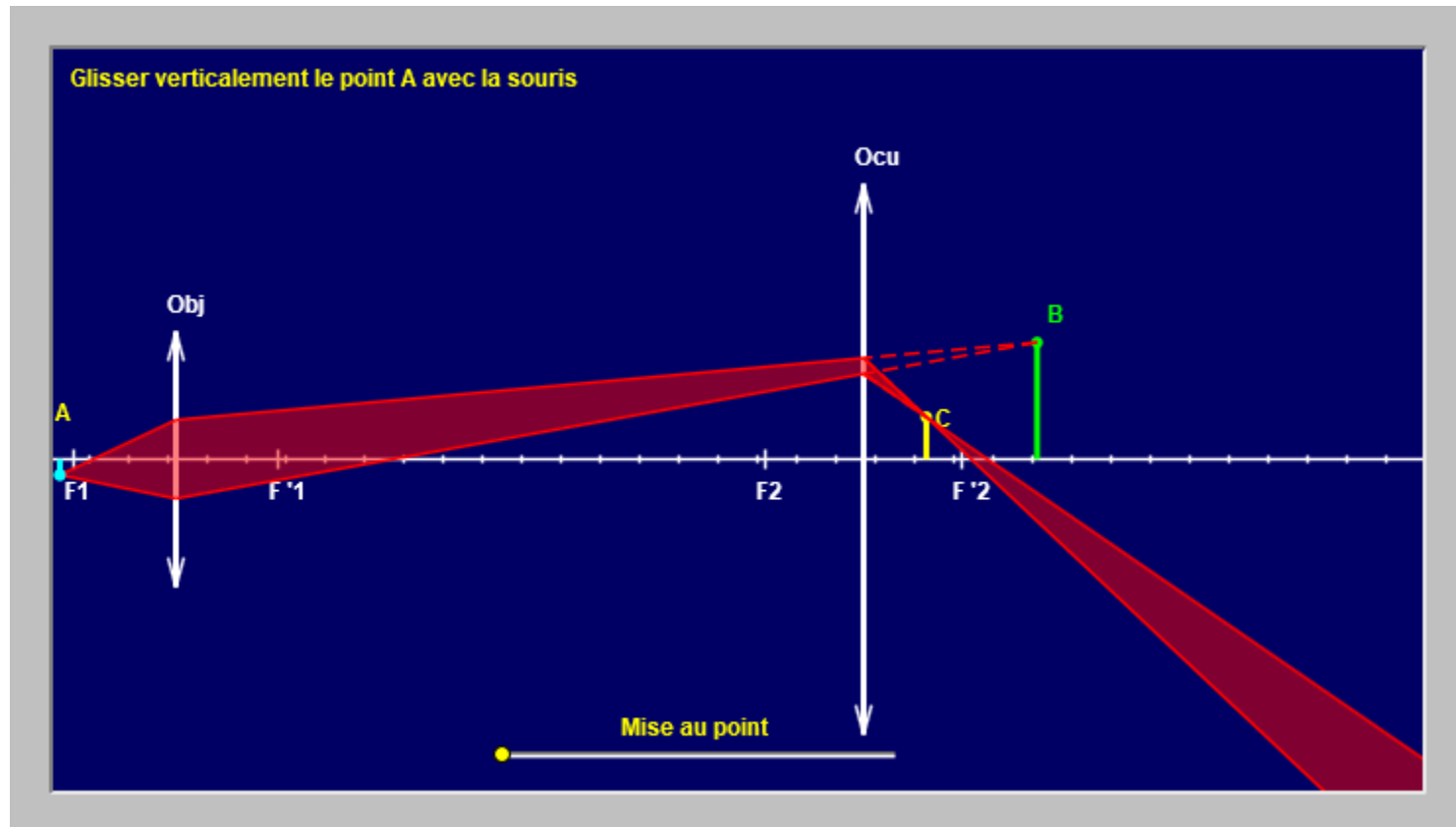
Objectif x5

Objectif x10

Objectif x5

Image intermédiaire en vert

Image finale en jaune



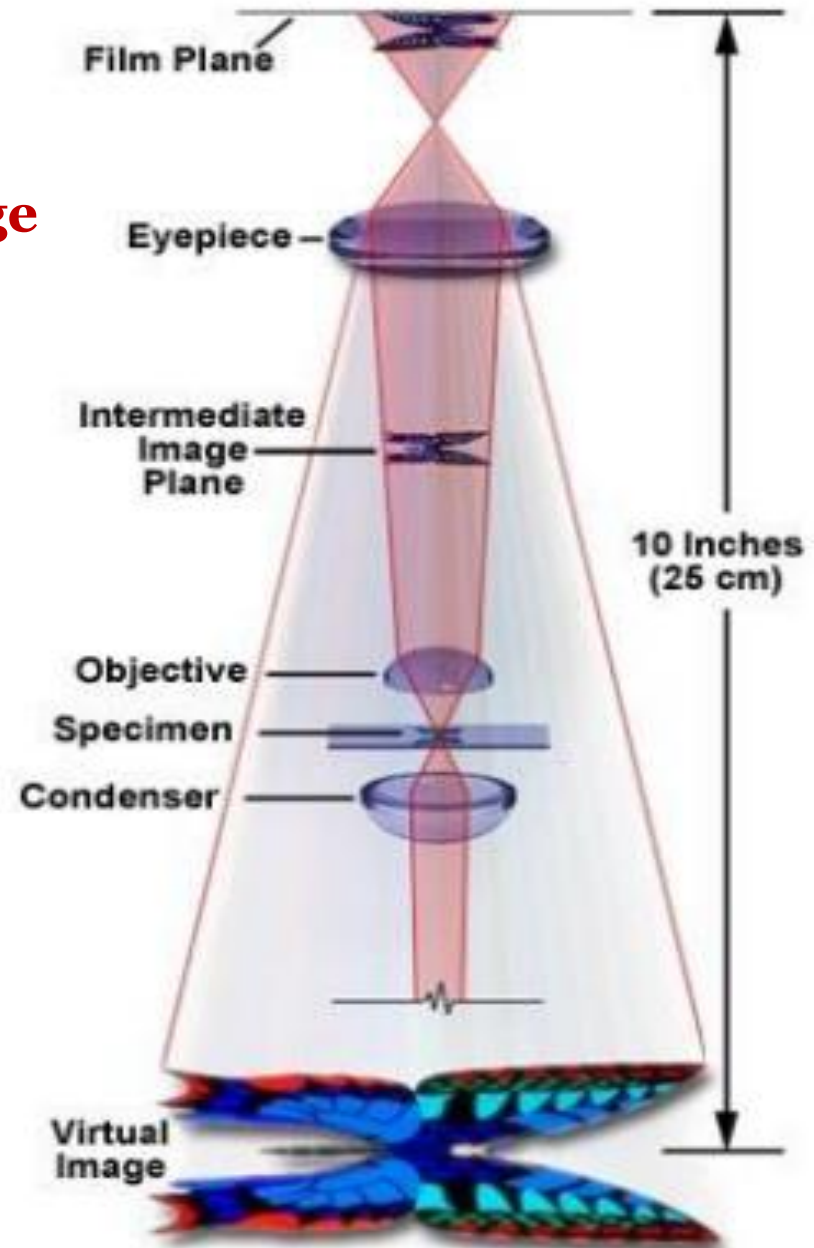
Oculaire x5

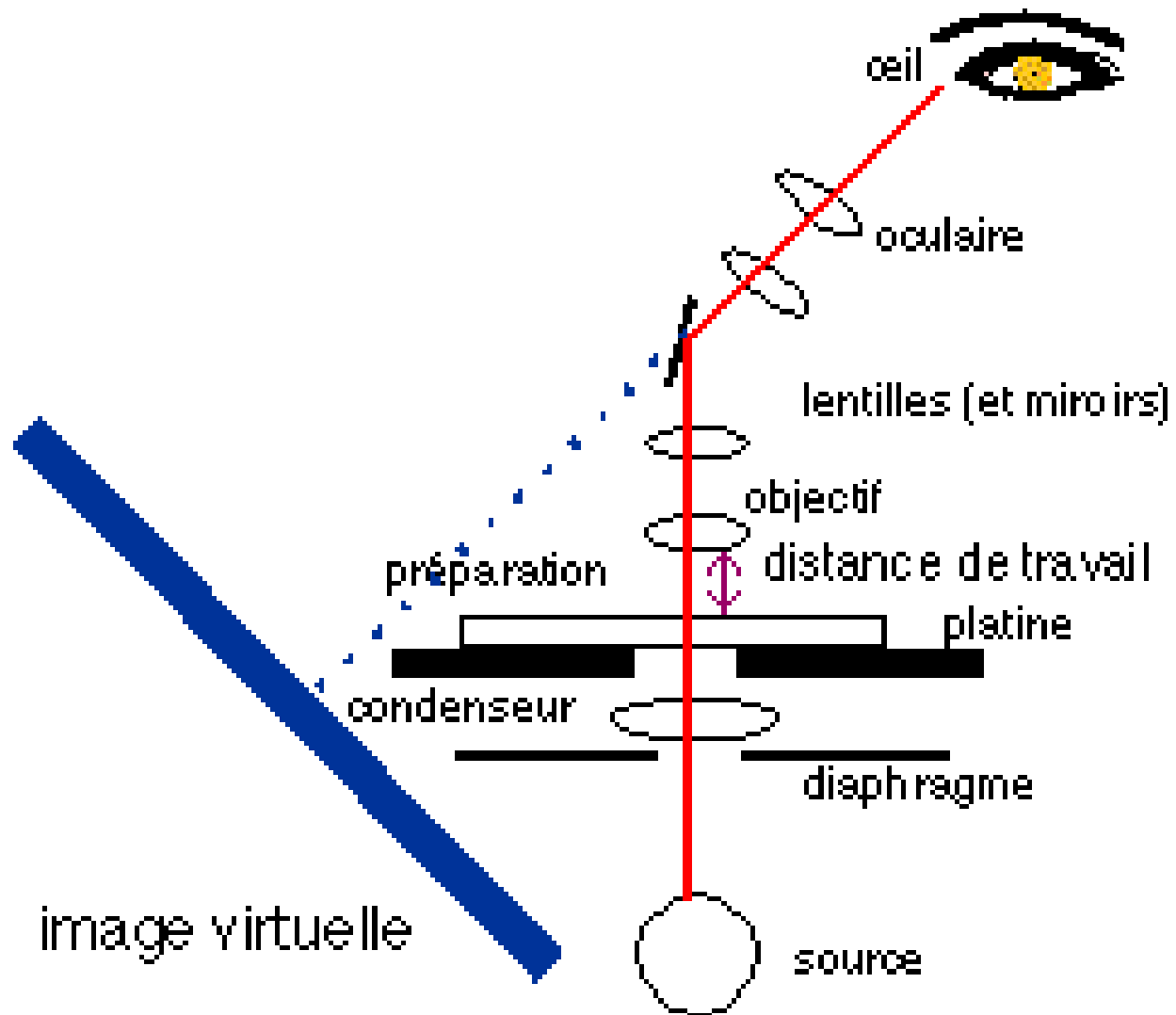
Oculaire x10

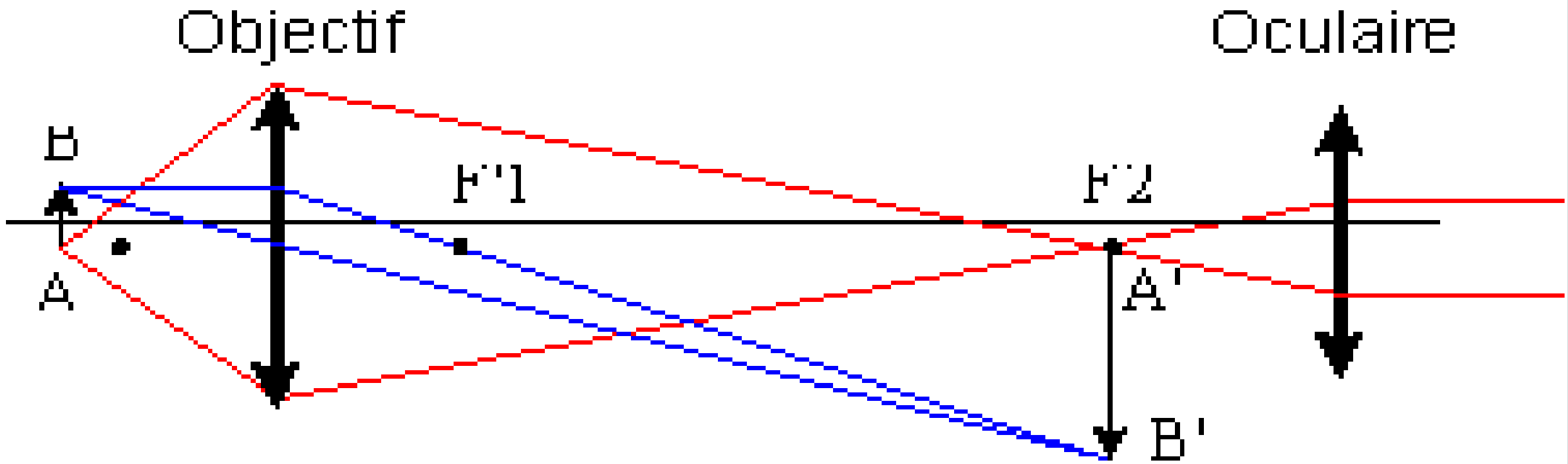
Formation de l'image

❖ L'objet est transformé en une image réelle à l'aide d'un objectif.

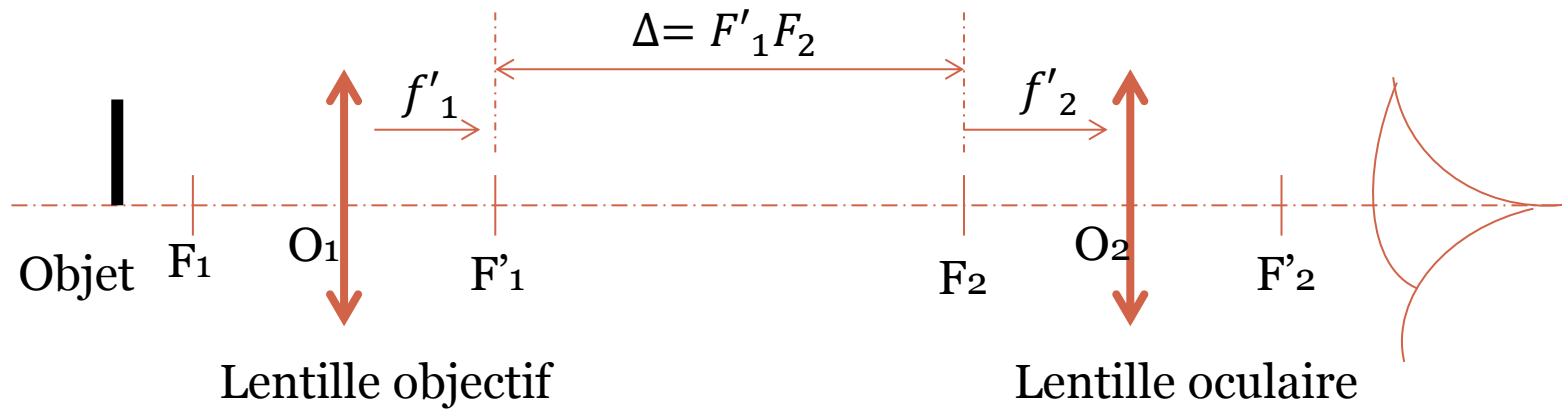
❖ L'image se forme au plan focal d'un oculaire qui va pouvoir en donner ensuite une image virtuelle située à l'infini.







- ✓ L'objectif assimilable à une lentille convergente de petite distance focale f'_1 , son rôle est de faire converger la lumière issue de l'objet observé à l'intérieur du tube du microscope.
- ✓ L'objectif donne d'un objet AB situé en avant de son foyer objet une image réelle A'B'.
- ✓ L'oculaire est assimilable à une lentille convergente de distance focale f'_2 de quelques centimètres. Il est utilisé comme une loupe.
- ✓ L'oculaire convergent permet d'observer l'image intermédiaire.



- **La distance focale de l'objectif $f'_1 = O_1F'_1$.**
- La lentille objectif est de très courte distance focale (f'_1 est très petit).
- **La distance focale de l'oculaire $f'_2 = O_2F'_2$.**
- La lentille oculaire a une distance focale de l'ordre de quelques cm.
- **La distance qui sépare les deux lentilles ou intervalle optique est notée $\Delta = F'_1F'_2$.**