

## ÉPREUVE COMMUNE DE TIPE 2008 - Partie D

### TITRE :

**Comment s'affranchir de la limite de la diffraction en microscopie optique?**

Temps de préparation : .....2 h 15 minutes

Temps de présentation devant le jury : .....10 minutes

Entretien avec le jury : .....10 minutes

### GUIDE POUR LE CANDIDAT :

Le dossier ci-joint comporte au total : 17 pages

Document principal (16 pages) : Comment s'affranchir de la limite de la diffraction en microscopie optique?

Travail suggéré au candidat :

Le candidat donnera tout d'abord le principe général de fonctionnement d'un microscope optique. Il détaillera ensuite plus particulièrement la microscopie de fluorescence. Enfin il essaiera de montrer comment la microscopie PALM a permis de s'affranchir de la limite de la diffraction pour obtenir des images avec une précision nanométrique.

### CONSEILS GÉNÉRAUX POUR LA PRÉPARATION DE L'ÉPREUVE :

\* Lisez le dossier en entier dans un temps raisonnable.

\* Réservez du temps pour préparer l'exposé devant le jury.

- Vous pouvez écrire sur le présent dossier, le surligner, le découper ... mais tout sera à remettre au jury en fin d'oral.
- En fin de préparation, rassemblez et ordonnez soigneusement TOUS les documents (transparents, etc.) dont vous comptez vous servir pendant l'oral, ainsi que le dossier, les transparents et les brouillons utilisés pendant la préparation. En entrant dans la salle d'oral, vous devez être prêts à débiter votre exposé.
- A la fin de l'oral, vous devez remettre au jury le présent dossier, les transparents et les brouillons utilisés pour cette partie de l'oral, ainsi que TOUS les transparents et autres documents présentés pendant votre prestation.

# Comment s'affranchir de la limite de la diffraction en microscopie optique?

## Introduction :

5

En science, les recherches qui ont besoin de développer des optiques de plus en plus complexes sont très nombreuses. On peut citer l'exemple des recherches en astronomie qui doivent développer des télescopes toujours de plus en plus performants pour observer toujours plus loin. Dans des domaines d'échelle d'études complètement opposés, le microscope est un instrument optique conçu pour observer des objets de très faible taille, il permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions et de séparer les détails de cette image afin qu'ils soient observable à l'œil nu. L'emploi en histoire naturelle du microscope simple, constitué d'une seule lentille convergente, remonte au XIV<sup>e</sup> siècle. C'est en 1667 que Robert Hooke présente le premier microscope composé de plusieurs optiques avec lequel il observe de nombreuses cellules végétales. Jusqu'à nos jours, de nombreux développements ont eu pour objets de corriger les aberrations optiques de l'appareil mais le principe d'un microscope optique n'a pas vraiment changé depuis sa découverte et nous verrons tout d'abord dans une première partie son principe simplifié. Nous développerons ensuite la dernière microscopie optique en vogue: la microscopie de fluorescence qui est utilisée dans plus de 80% des études en biologie.

15  
20

Dans une deuxième partie, on s'intéressera plus particulièrement à la propriété la plus importante d'un microscope : son pouvoir de résolution. Ernest Abbe a montré en 1873, par une formule qui porte son nom, que la résolution d'un microscope optique est limitée par le caractère ondulatoire de la lumière. La diffraction de la lumière au niveau de l'objet observé combinée aux propriétés des optiques composant le microscope conduit à un pouvoir de résolution de 200 nm pour un objet observé à l'aide d'une lumière dans le visible. Plus d'un siècle après la formule établie par Ernest Abbe, au début des années 2000, Stefan Hell a montré qu'il était possible en microscopie de fluorescence de s'affranchir du problème inhérent du à la diffraction de la lumière et il a obtenu des images avec une précision nanométrique. Nous reviendrons sur l'établissement de la formule du pouvoir de résolution en microscopie optique par Ernest Abbe et sur la découverte fondamentale faite par Stefan Hell qui a permis de s'affranchir d'une propriété intrinsèque à la lumière.

25  
30

# 1) Le microscope optique.

35

Une définition simplifiée du microscope optique est celle d'un instrument optique qui utilise la lumière visible pour obtenir une image grossie ou agrandie (grossissement) d'un objet en la projetant sur la rétine de l'œil ou un appareil d'imagerie pour en séparer les détails (pouvoir de résolution). Avant de voir plus en détails le principe d'un microscope optique, nous allons

40 revenir sur la notion de grandissement en étudiant la formation d'une image par une lentille convergente, le principe de fonctionnement de l'œil et la notion de grossissement en optique.

## a) Grandissement d'un objet par une lentille convergente

45 Prenons le cas d'une lentille mince convergente et plaçons-nous dans l'approximation de Gauss. La théorie de l'optique géométrique permet d'étudier la formation d'images par une lentille mince convergente. Cette théorie néglige l'aspect ondulatoire de la lumière et la construction géométrique de l'image d'un objet produite par une lentille s'effectue à l'aide de

50 trois rayons principaux (Figure 1). Selon la position de l'objet étudié par rapport au foyer de la lentille convergente, on observe la formation d'une image réelle ou virtuelle de l'objet. L'image virtuelle représente le principe de la loupe. On définit le grandissement  $\beta$  comme étant le rapport de la taille de l'image à celle de l'objet (Equation 1).

$$\beta_{\text{réelle}} = \frac{\overline{BB'}}{\overline{AA'}} = \frac{x'}{x} = \frac{x'-f}{f} \qquad \beta_{\text{virtuelle}} = \frac{\overline{CC'}}{\overline{BB'}} = \frac{y'}{y} = \frac{y'+f}{f} \qquad \text{Equation (1)}$$

55

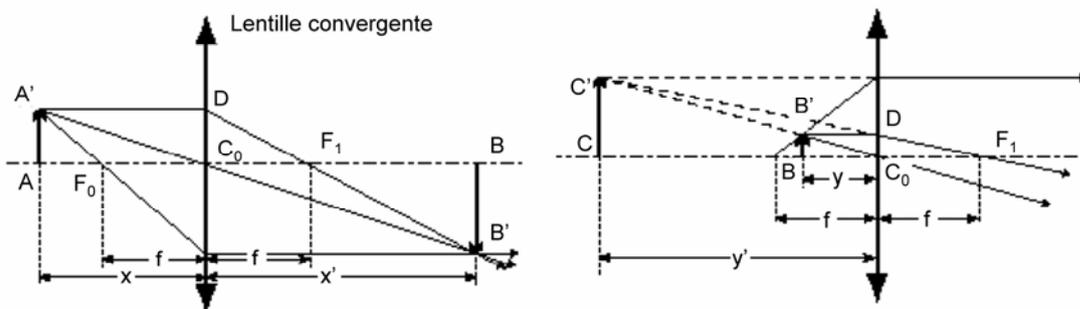


Figure 1 : Construction géométrique de l'image d'un objet produite par une lentille convergente en fonction de la distance de l'objet par rapport à la distance focale.

60

## b) L'œil

L'œil est un système optique complexe. L'œil humain n'est sensible qu'à une bande restreinte de longueurs d'onde allant de 660 nm (rouge) à 410 nm (violet); la sensibilité maximale se situe aux environs de 550 nm (jaune-vert). Un rayon lumineux qui pénètre dans l'œil traverse successivement la cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin et l'humeur vitreuse pour, finalement, tomber sur la rétine. Tous ces milieux sont caractérisés par des indices de réfraction différents. On peut cependant faire un modèle simple de l'œil en le considérant comme formé par une seule lentille convergente projetant une image réelle sur un écran (la rétine) situé à 17 millimètres du centre optique (Figure 2).

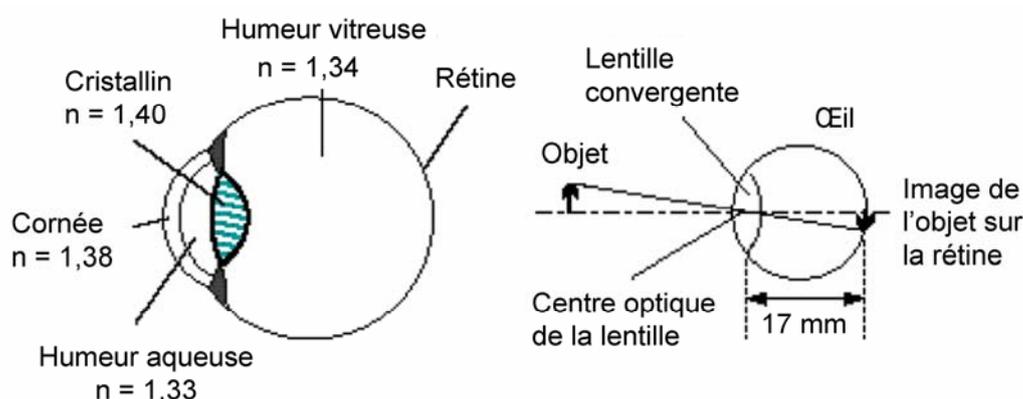


Figure 2 : Modélisation en optique de l'œil.

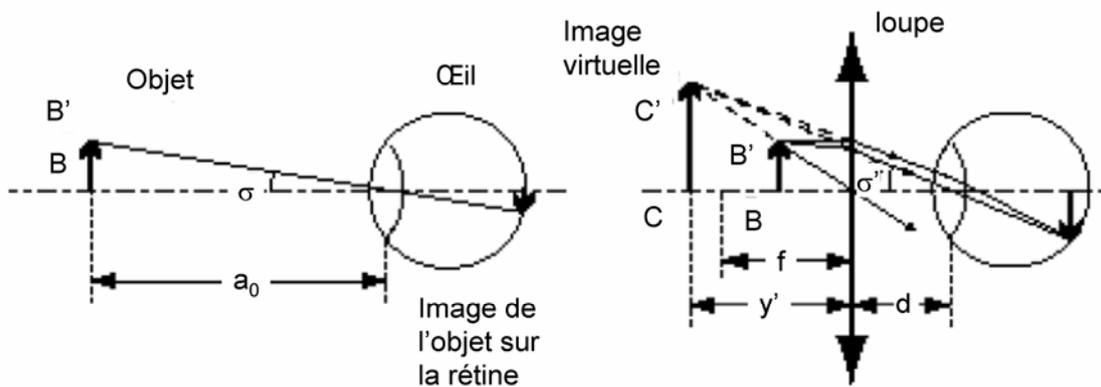
Les muscles entourant le cristallin permettent d'en modifier la courbure ce qui fait de l'œil un système optique à distance focale variable. Un œil normal permet une vision distincte entre une distance minimale  $a_0$  et l'infini. La distance minimale de vision nette  $a_0$  est égale en moyenne à 25 cm. L'ouverture angulaire sous laquelle un objet apparaît à l'œil constitue l'angle de vision,  $\sigma$ . Cet angle détermine la taille de l'image sur la rétine (Figure 3). L'angle de vision est limité inférieurement par le phénomène de la diffraction de la lumière par la pupille (voir paragraphe 3). Une personne ayant une vision normale ne peut distinguer des détails d'un objet dont la distance angulaire est inférieure à 26 secondes d'arc. Cela signifie que, pour un objet situé à la distance minimale de vision nette, des détails de moins de 30  $\mu\text{m}$  ne peuvent être résolus. Mais en utilisant une loupe avec une seule lentille, une image virtuelle agrandie est obtenue et l'œil peut alors observer des détails de dimension inférieure.

85

### c) Le grossissement

90 Pour caractériser les tailles de l'image et de l'objet, la notion de grandissement a été utilisée (paragraphe 1.a). On caractérise par contre de façon absolue l'instrument optique par son grossissement. Soit l'angle  $\sigma$  sous lequel est vu l'objet étudié lorsqu'il est placé à la distance minimale de vision nette  $a_0$  et  $\sigma'$  l'angle sous lequel est vu ce même objet lorsqu'il est observé à travers un instrument optique (Figure 3), on définit le grossissement (noté G) par le rapport  
 95 (Equation 2) :

$$G = \frac{\tan \sigma'}{\tan \sigma} \quad \text{Equation (2)}$$



100 Figure 3 : Schéma optique représentant la notion de grossissement.

Un raisonnement géométrique combiné aux équations 1 et 2 permet d'exprimer finalement le grossissement par l'Equation 3.

$$105 \quad G = \frac{a_0}{f} \times \frac{y'+f}{y'+d} \quad \text{Equation (3)}$$

Le grossissement G est d'autant plus important que le terme  $(y'+d)$  est petit. Compte tenu des caractéristiques de l'œil, le grossissement maximal est obtenu lorsque  $y' = a_0$  et  $d = 0$  : l'œil est "collé" à la loupe et l'image virtuelle est à la distance minimale de vision nette du centre optique de la lentille. Dans cette situation le grossissement vaut (Equation 4) :

$$110 \quad G = 1 + \frac{a_0}{f} \quad \text{Equation (4)}$$

En réduisant la distance focale le grossissement augmente. La lentille peut alors être utilisée  
comme une loupe très puissante placée très près de l'objet d'un côté et très près de l'œil de  
l'autre. C'est ce qui constituait au tout début de la microscopie en 1600, le microscope simple.  
Cependant les lentilles de faible distance focale  $f$  ont une forte courbure : en augmentant la  
courbure des faces et en gardant le diamètre de la lentille constant, l'épaisseur augmente et la  
lentille déforme les images et atténue fortement l'intensité des rayons lumineux. Ces  
problèmes sont résolus en diminuant le diamètre des lentilles pour des courbures de faces  
données. Mais, lorsque le diamètre de la lentille devient inférieur au diamètre de la pupille de  
l'œil (quelques millimètres), son usage en tant que loupe devient problématique car cette  
lentille de petite dimension ne recueille qu'une faible quantité de lumière. Pour ces raisons, on  
n'utilise pas de loupes dont le grossissement dépasse 30.

#### d) Principe du microscope optique

Pour obtenir des grossissements  
supérieurs à 30, on utilise des systèmes  
optiques formés de plusieurs lentilles.  
Ainsi, un microscope se compose au  
minimum de deux lentilles jouant  
respectivement le rôle d'objectif et  
d'oculaire. L'objet à étudier (Figure 4) se  
place devant l'objectif à une distance  
supérieure à la distance focale  $f_{obj}$  de  
l'objectif et ainsi une image réelle  
intermédiaire est obtenue. Cette image  
est observée à l'aide de l'oculaire qui  
travaille comme une loupe, produisant  
une image virtuelle agrandie de l'image  
réelle. Cette image virtuelle visualisée  
par l'œil est située à la distance  
minimale de vision nette. On définit la  
longueur de tube  $t$  du microscope

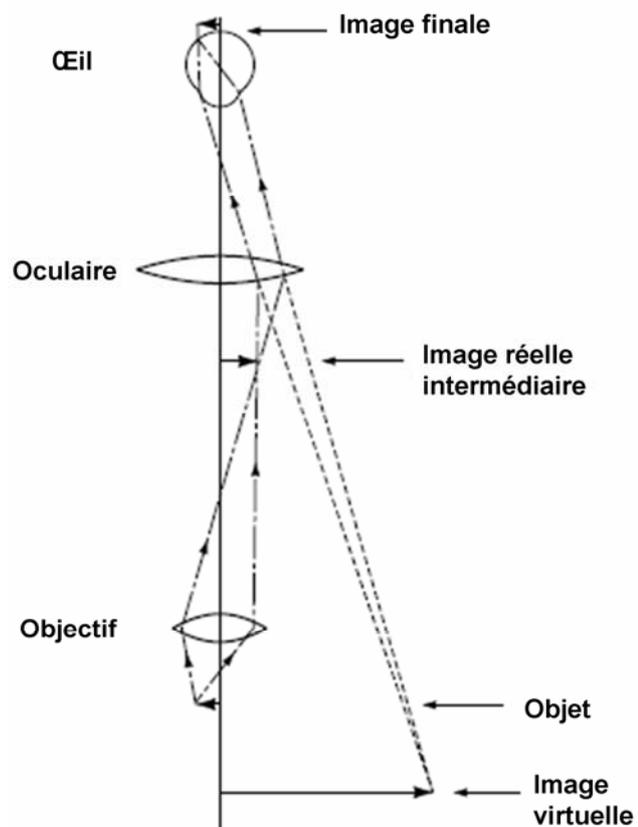
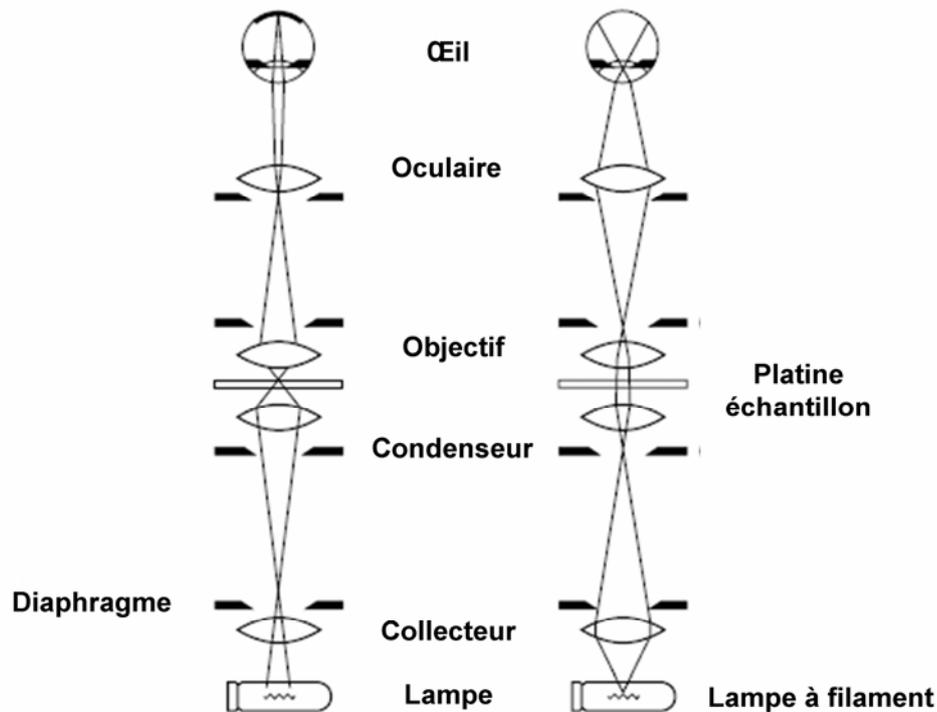


Figure 4 : Principe de formation d'une image d'un microscope.

comme la distance entre les foyers de l'objectif et de l'oculaire. Le grossissement  $G_{mic}$  d'un microscope est égal au produit du grandissement de l'objectif et du grossissement de l'oculaire.



165

Figure 5 : Eclairage d'un objet par transmission.

Les objets examinés en microscopie sont rarement lumineux par eux-mêmes et il est nécessaire de les éclairer à l'aide d'un dispositif d'éclairage qui se compose le plus couramment par une lampe blanche à filament, d'un collecteur concentrant le flux lumineux de la lampe et d'un condenseur permettant de focaliser la lumière provenant de la lampe sur une partie de l'objet à observer. La solution la plus simple, longtemps utilisée, consiste à projeter directement la source dans le plan de l'objet à l'aide du collecteur. Cet éclairage critique présente l'inconvénient de ne pas être uniforme, l'image du filament étant confondue avec celle de l'objet. Cet éclairage critique non uniforme est maintenant universellement remplacé par un système d'éclairage introduit par Köhler dès 1893. Avec cet éclairage (Figure 5) la source S est projetée dans le plan de la pupille d'entrée du microscope matérialisée par un diaphragme placé dans le plan focal objet du condenseur situé en avant de l'objet. Chaque point de celui-ci reçoit alors de la lumière de tous les points de la source et est éclairé uniformément au même titre que le collecteur. On place donc contre ce dernier un second diaphragme : le condenseur en forme une image dans le plan de l'objet, ce qui en limite les

180

dimensions et, réduisant l'étendue géométrique du faisceau, élimine la lumière parasite provenant en dehors du champ.

La Figure 6 représente le premier microscope composé de plusieurs optiques utilisé par Robert Hooke en 1667 pour observer des échantillons biologiques. Les deux composants importants d'un microscope optique sont l'objectif qui collecte la lumière contenant l'image de l'objet, et le condenseur qui permet d'éclairer l'objet. L'ensemble solide de l'objectif, tube, oculaire est pointé sur l'objet ou l'échantillon posé sur une platine dotée d'organes permettant le positionnement de l'objet dans son plan, généralement par deux mouvements de translation et/ou un mouvement de rotation. L'image réelle intermédiaire vue par l'œil a toujours une position fixe. Un dispositif de translation parallèle à l'axe optique (rapide et lent) permet de déplacer la platine pour placer l'image réelle de l'échantillon à cette position fixe. Il est possible de trouver des microscopes où l'échantillon est fixe et on réalise la mise au point en déplaçant l'ensemble objectif-tube-oculaire. La liaison de ces divers éléments, ainsi que leur stabilité, sont assurées par une monture mécanique, le statif. Le condenseur et la source, dans un microscope moderne, sont le plus souvent également solidaire du statif et logés dans son pied. La source de lumière peut prendre différentes formes suivant le type d'observation que nécessite l'objet (lampe de lumière blanche, infrarouge, ultraviolet, lumière monochromatique...). En fonction des éclairages utilisés, un récepteur adéquat (œil, caméra...) est destiné à fournir l'image de l'objet observé. Dans les microscopes optiques modernes, l'objectif et le condenseur contiennent de nombreuses lentilles qui permettent de travailler aux limites théoriques de l'optique. Nous allons ensuite définir l'ouverture numérique d'un objectif qui est une grandeur fondamentale le caractérisant.

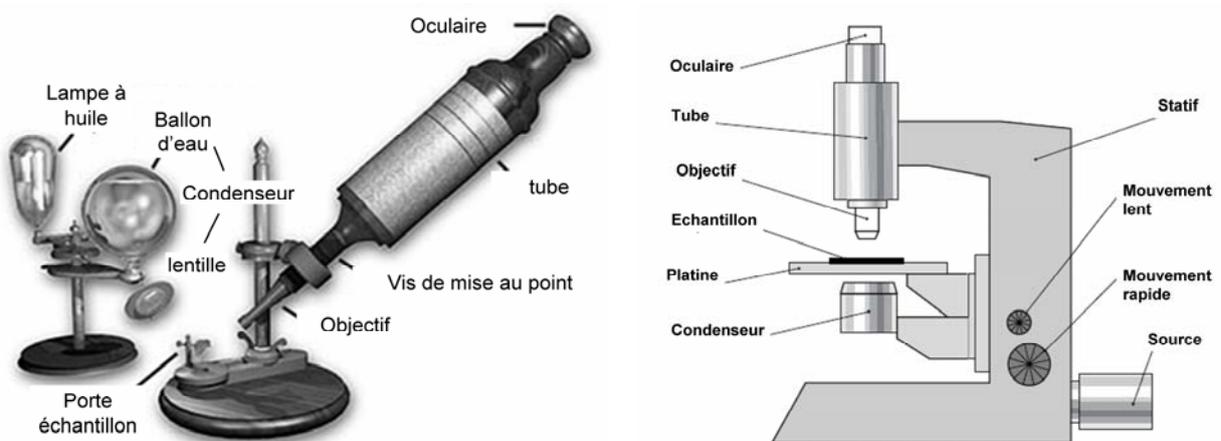


Figure 6 : Schéma descriptif d'un microscope (à gauche le premier microscope)

## e) Ouverture numérique

Pour collecter la quantité maximale de lumière et obtenir un grossissement maximal, l'objectif doit être placé le plus près de l'échantillon. Pour éviter tout contact avec l'objet, celui-ci est recouvert par une lamelle de verre très fine (environ 170  $\mu\text{m}$ ) et un liquide d'immersion assure le contact entre l'objectif et la lamelle de verre. Considérons un point A d'un objet d'indice  $n_o$ , recouvert d'une lamelle d'indice  $n_v$ , séparée de la frontale de l'objectif par un liquide d'immersion d'indice  $n$  et supposons que le rayon ABCD (Figure 7) soit le plus incliné sur l'axe entrant dans l'objectif susceptible d'en ressortir, son inclinaison à la traversée des dioptries plans séparant les milieux prend les valeurs successives  $u_o$ ,  $u_v$ ,  $U$  et vérifie l'Equation 5 :

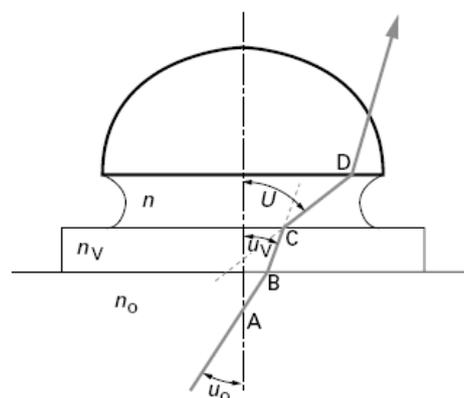


Figure 7 : Propagation des rayons optiques pour un objectif à immersion

220

$$n_o \sin u_o = n_v \sin u_v = n \sin U \quad \text{Equation (5)}$$

La quantité invariante  $n \sin U$  est l'ouverture numérique de l'objectif (ON). L'ON est une grandeur fondamentale d'un objectif qui caractérise la quantité de lumière entrante. En pratique les objectifs à immersion les plus performants ont une ON de 1.3.

225

## 2) La microscopie de fluorescence

### a) Le phénomène de fluorescence

230

Lorsqu'on irradie une molécule avec de la lumière ayant une énergie appropriée ( $E=h\nu=hc/\lambda$ ), il est possible de promouvoir la molécule qui se trouve dans son état électronique fondamental ( $E_0$ ) dans un état électronique d'énergie supérieure (état excité). Une fois la molécule portée dans un état excité par l'absorption de lumière, la molécule peut revenir à son état fondamentale soit en émettant de la lumière ( $\nu'$ ,  $\lambda'$ ) comme pour les spectres de raies d'émission de lampe, soit de façon non radiatives par relaxation vibrationnelle. L'émission de lumière a généralement lieu à partir du premier état excité et on parle alors de fluorescence (Figure 8). Les longueurs d'onde d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule

235

sont spécifiques à chaque molécule et l'émission de lumière par fluorescence a toujours lieu à  
240 des longueurs d'onde supérieures à celles de l'absorption.

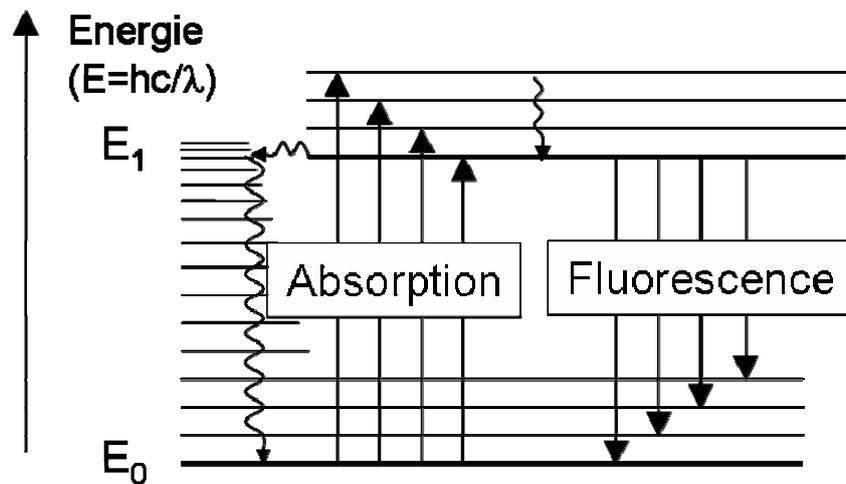


Figure 8 : Processus physique après absorption de lumière d'énergie ( $E=h\nu=hc/\lambda$ ). Traits  
horizontaux fins : niveaux d'énergie vibrationnelle. Traits horizontaux gras : niveaux  
245 d'énergie électronique. Transitions radiatives : flèches verticales droites. Transitions non  
radiatives : flèches ondulées.

### b) la microscopie de fluorescence

250 Un objet, par exemple une cellule en biologie, est en général composé de différentes régions-  
molécules (l'extérieur de la cellule, la membrane, l'intérieur de la cellule, le noyau...) qui  
absorbent et émettent de lumière par fluorescence à des longueurs différentes. Si les longueurs  
d'ondes d'absorption et d'émission sont bien différenciées, il est possible de se servir du  
phénomène de fluorescence pour observer une région spécifique de la cellule. Si les régions  
255 ne sont pas assez différenciées naturellement, on injecte une molécule fluorescente  
(marqueur), dont on connaît parfaitement les longueurs d'onde d'absorption et d'émission par  
fluorescence, qui diffuse dans l'échantillon et se fixe préférentiellement dans certains sites  
chimiques, par exemple la membrane. La fluorescence va permettre de rendre uniquement la  
membrane lumineuse. L'objectif collecte cette lumière et on obtient une image de la  
260 membrane.

L'utilisation d'un laser de rayonnement monochromatique permet d'exciter uniquement le  
marqueur fluorescent (Figure 9). Le faisceau lumineux provenant du laser passe tout d'abord  
dans un système optique (deux lentilles convergentes) pour agrandir sa taille et obtenir un

faisceau uniforme. Le faisceau du laser étant généralement polarisé linéairement, une lame  $\lambda/4$  permet l'obtention d'un faisceau polarisé circulairement pour avoir une absorption isotrope de la part des marqueurs fluorescents dans le plan de polarisation du faisceau laser. Dans un milieu isotrope, la fluorescence est émise dans toutes les directions. En microscopie, l'échantillon est généralement déposé sur une lame de verre et l'éclairage de l'échantillon se fait par le dessous pour permettre une meilleure manipulation des échantillons (Figure 6). Des chercheurs ont montré que lorsqu'une molécule est située à une interface, elle émet de la lumière par fluorescence essentiellement en direction du milieu le plus réfringent. Par conséquent, l'émission de lumière par fluorescence est émise essentiellement en direction du condenseur. Pour résoudre ce problème, la même optique, l'objectif, est utilisée pour éclairer et collecter. Le faisceau du laser est dévié vers l'échantillon par un miroir qui possède un coefficient de réflexion proche de 100% pour la longueur d'onde du laser et un coefficient de transmission proche de 100% pour les longueurs d'onde supérieures à la longueur d'onde du laser. Le faisceau réfléchi par le miroir est dirigé vers l'objectif qui permet d'illuminer l'échantillon. Pour obtenir un éclairage de type Köhler (Figure 5), une lentille est insérée dans le trajet optique du faisceau du laser pour permettre de focaliser celui-ci dans le plan focal arrière de l'objectif. Seuls les marqueurs fluorescents absorbent la lumière monochromatique du laser et émettent à une longueur d'onde supérieure en direction de l'objectif. L'émission de lumière par fluorescence de la surface éclairée par le faisceau laser est collectée par le même objectif, traverse le miroir, une lentille de tube qui joue le rôle d'oculaire et focalise l'image de l'objet lumineux sur une camera CCD qui est plus sensible que l'œil (Figure 9).

L'avantage de cette microscopie est la possibilité d'observer à l'extrême limite un seul marqueur fluorescent (une molécule) dilué dans une matrice non fluorescente. Soit un marqueur fluorescent absorbant la lumière à 532 nm ayant un diamètre caractéristique de 1 nm dilué dans une matrice polymère de polystyrène (PS), la concentration du marqueur est d'environ de  $10^{-9}$  mol.L<sup>-1</sup> pour assurer statistiquement que dans un volume de 1  $\mu\text{m}^3$  un seul marqueur fluorescent est présent. La matrice polymère utilisée est transparente et permet d'immobiliser le marqueur pendant le temps d'étude. Les différents paramètres de l'expérience sont :

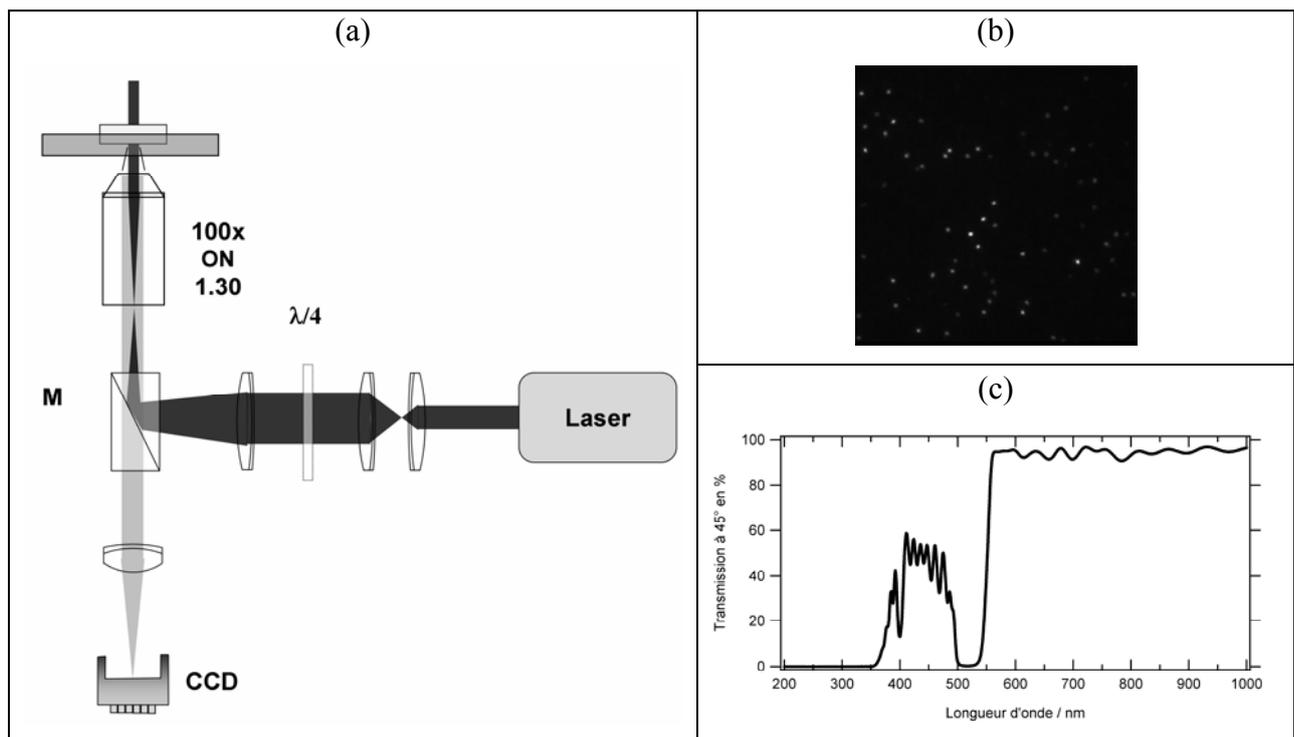
- une diode laser 532 nm polarisé linéairement de 40 mW
- une lentille convergente de focale 30 cm qui permet de focaliser le faisceau laser dans le plan focal arrière de l'objectif pour obtenir une illumination circulaire au niveau de l'échantillon de diamètre 50  $\mu\text{m}$

- un miroir qui réfléchit la longueur du laser et transmet la fluorescence émise par les marqueurs (Figure 9)
- un objectif de grossissement  $\times 100$ , immersion à huile avec une ON de 1.3
- un système optique inséré juste avant la camera CCD permettant d'agrandir l'image d'un facteur 3.3 et visualiser une surface de  $24.6 \times 24.6 \mu\text{m}^2$
- une camera CCD silicium avec  $512 \times 512$  pixels couplée à un multiplicateur de gain permettant d'obtenir un rapport signal sur bruit élevé.

300

305

La Figure 9 donne l'image obtenue d'un film polymère de moins d' $1 \mu\text{m}$  d'épaisseur contenant les marqueurs fluorescents. Chaque point lumineux représente un unique marqueur fluorescent. En regardant attentivement l'image obtenue, le diamètre des points lumineux est supérieur à  $1 \text{ nm}$ , il est égale à environ  $250 \text{ nm}$ . Ce phénomène s'explique par le pouvoir de résolution d'un microscope optique qui est de  $250 \text{ nm}$  dans cette expérience.



310

Figure 9 : (a) Microscopie de fluorescence (M : miroir) (b) Image de marqueurs fluorescent dans un film de PS (c) Courbe de transmission de la lumière à  $45^\circ$  du miroir.

### 3) Diffraction et pouvoir de résolution d'un microscope

315

Il est nécessaire à partir de maintenant de faire intervenir le caractère ondulatoire de la lumière. Soit une source ponctuelle de lumière monochromatique placée à une distance  $x$  d'une paroi percée d'une ouverture circulaire de diamètre  $D$ , sur un écran placé derrière

l'ouverture, on observe expérimentalement une figure de diffraction consistant en un disque brillant entouré d'anneaux alternativement sombres et lumineux. La Figure 10 représente le profil de l'intensité observée en fonction de la distance angulaire  $\theta$ . Le premier disque brillant, qui contient environ 84% de la lumière, s'appelle le disque d'Airy. La distance angulaire  $\theta$  du maximum central de la figure de diffraction au premier minimum est donnée par l'Equation 6 :

325 
$$\sin\theta = \frac{1,22\lambda}{D}$$
 Equation (6)

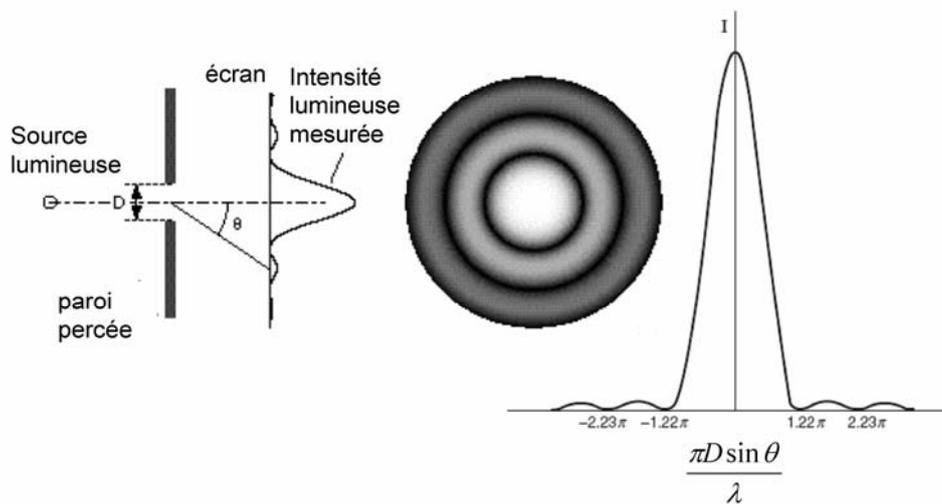


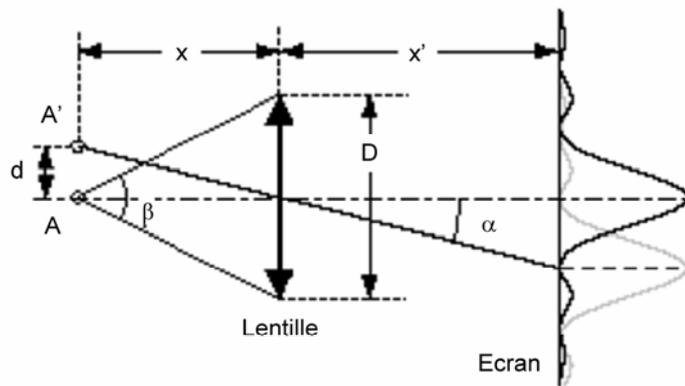
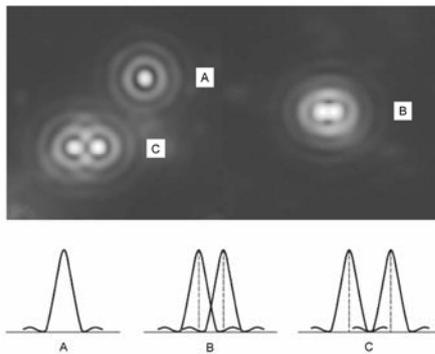
Figure 10 : Figure de diffraction d'un objet ponctuel observé à travers une ouverture circulaire.

330 Se basant sur ce fait et sachant que de la même façon un objet lumineux observé par des optiques de diamètre  $D$  sera diffracté, le physicien Rayleigh a énoncé le critère suivant pour déterminer le pouvoir de résolution d'un instrument optique (Figure 11): deux sources ponctuelles  $A$  et  $A'$  distantes de  $d$ , éclairées par une lumière monochromatique de longueur d'onde  $\lambda$  et observées à l'aide d'une lentille de diamètre  $D$ , peuvent être distinguées l'une de l'autre à condition que les maxima des figures de diffraction de  $A$  et  $A'$  produites par la lentille soient séparés par une distance angulaire  $\alpha$  supérieure ou égale à la distance angulaire du maximum central au premier minimum de la figure de diffraction d'une source ponctuelle (Figure 10, Equation 6).

335

340 Soit  $\beta$  l'ouverture angulaire sous laquelle la lentille est perçue depuis le point A, et en faisant l'hypothèse que les angles  $\alpha$  et  $\beta$  sont petits, on obtient pour la distance minimale  $d$  pouvant être résolue au moyen d'une lentille de diamètre  $D$  :

$$d \geq \frac{1,22\lambda}{\sin\beta} \quad \text{Equation (7)}$$



345

Figure 11 : Critère de Rayleigh

Dans le cas d'un microscope, l'ouverture angulaire  $\beta$  correspond à l'ON dans l'Equation 7. Il est aussi nécessaire de rendre compte que l'objet doit être éclairé ce qui donne finalement un pouvoir de résolution maximale pour un microscope optique :

350

$$d \geq \frac{1,22\lambda}{\text{ON}_{\text{objectif}} + \text{ON}_{\text{condenseur}}} \quad \text{Equation (8)}$$

Si l'ON du condenseur est supérieure ou égale à celle de l'objectif (microscopie de fluorescence), c'est l'objectif qui limite le pouvoir de résolution et celui-ci est égal à  $0,61\lambda/\text{ON}_{\text{objectif}}$ . Dans le cas de l'expérience de visualisation de marqueurs fluorescents uniques en microscopie de fluorescence, une résolution de 250 nm est obtenue ce qui explique que même si le marqueur fluorescent a une taille de 1 nm, la diffraction de la lumière implique que son image, un disque d'Airy, a un diamètre au minimum de 250 nm. Pour pouvoir différencier deux marqueurs fluorescents, ils doivent être séparés d'au moins 250 nm même si leur taille n'est que de 1 nm, ce qui justifie la concentration de marqueurs (paragraphe 2b) et l'épaisseur du film de PS pour n'observer qu'un seul marqueur à l'intérieur d'une sphère de diamètre 250 nm.

360

Avant de voir comment s'affranchir de la diffraction pour augmenter le pouvoir de résolution d'un microscope, revenons sur le principe de formation d'une image en microscopie optique si l'on considère maintenant le caractère ondulatoire de la lumière. Il pourrait apparaître que la diffraction de la lumière est une caractéristique négative en microscopie si l'on ne se réfère qu'au pouvoir de résolution. Ernest Abbe a étudié la théorie de la formation d'une image à l'aide d'un microscope optique et il observe la lumière diffractée d'un objet périodique. Celle-ci donne une image diffractée dans le plan focal de l'objectif due à l'interférence entre l'ordre 0 et les ordres supérieurs des rayons diffractés. Il faut bien remarquer que si l'objet ne diffracte pas la lumière, il n'y a pas d'image qui se forme dans le plan image (Figure 12).

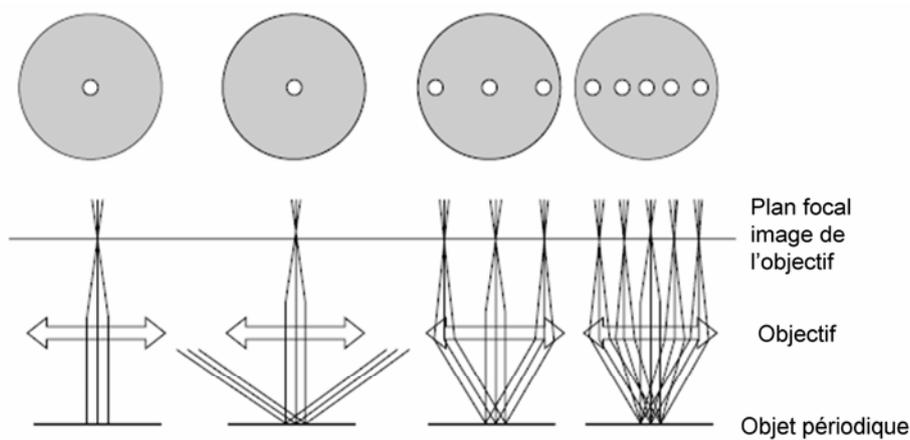


Figure 12 : Formation d'une image par l'interférence des différents ordres des rayons diffractés d'un objet périodique.

#### 4) La microscopie PALM

Au début des années 2000, Stefan Hell a développé une nouvelle microscopie de fluorescence qui permet d'augmenter « artificiellement » le pouvoir de résolution d'un microscope optique : la microscopie PALM (Photo-activation – Localisation – Microscopie).

Cette microscopie se base sur le principe qu'il est possible de déterminer précisément la position d'un objet unique dans le plan image. Reprenons le cas de l'expérience précédente avec les marqueurs fluorescents de taille caractéristique 1 nm, le maximum d'intensité de la figure de diffraction pour un seul marqueur fluorescent donne la position du marqueur fluorescent (figure 10). La précision avec laquelle la position d'une source ponctuelle peut être déterminée sera dépendante de la taille d'un pixel et du rapport entre l'intensité maximum et minimum. Il existe toujours un peu de signal au minimum, cela peut être du à la lumière environnante, aux bruit électroniques des détecteurs (les détecteurs optiques transforment un

390 signal lumineux en un signal électrique), aux molécules non fluorescentes qui absorbent et émettent toujours un peu de lumière sachant que l'intensité lumineuse du laser au niveau de l'échantillon est de l'ordre du  $\text{kW.cm}^2$ . Aujourd'hui dans le meilleur des cas, une précision de quelques nm peut être obtenue.

Considérons plusieurs marqueurs de 1 nm qui sont l'intérieur d'un cercle de diamètre  
395 inférieur au pouvoir de résolution. L'image de cet ensemble de marqueurs par microscopie de fluorescence donne une seule figure de diffraction, un seul disque d'Airy. L'idée est de pouvoir visualiser pendant un temps  $t_1$  un seul marqueur à l'intérieur du cercle et de mesurer sa position. Ensuite à un autre temps  $t_3$ , on visualise un autre marqueur et on détermine sa position. En mesurant la position des marqueurs une par une, on peut reconstruire une image  
400 précise au nanomètre près de l'objet observé (Figure 13). Le pouvoir de résolution de l'instrument ne peut pas être amélioré intrinsèquement car on ne peut s'affranchir de la diffraction de la lumière. Néanmoins la microscopie PALM permet de reconstruire une image avec une précision nanométrique.

Au début des années 2000, cette idée a pu être appliquée grâce à la découverte de nouveaux  
405 marqueurs dont les propriétés de fluorescence peuvent être photo-commutées : ces nouveaux marqueurs existent sous deux formes A (fluorescente) et B (non fluorescentes), la forme A absorbe la lumière de longueur d'onde  $\lambda_A$  et émet de la lumière par fluorescence, la forme B n'absorbe pas la lumière de longueur d'onde  $\lambda_A$  et n'émet donc aucune lumière par fluorescence. Les marqueurs peuvent passer de la forme B à la forme A en absorbant de la  
410 lumière de longueur d'onde  $\lambda_B$  (différente de  $\lambda_A$ ) et retourne rapidement à la forme B. C'est le même principe qui est utilisé pour les verres progressifs, à la lumière du soleil les verres absorbent les rayons ultra-violet et se noircissent. Lorsqu'il n'y a plus de lumière, les verres redeviennent transparents.

Le principe de la mesure est alors le suivant (Figure 13):

- 415 • tous les marqueurs sont tout d'abord dans la forme B à l'intérieur d'un cercle de diamètre inférieur au pouvoir de résolution,  $t_0$
- on éclaire l'échantillon pendant un temps court avec de la lumière de longueur d'onde  $\lambda_B$  de très faible intensité (photo-activation)
- un seul marqueur passe de la forme B à la forme A fluorescente
- 420 • avant que ce marqueur revienne à la forme B, on éclaire l'échantillon avec une lumière de longueur d'onde  $\lambda_A$  et un seul marqueur émet de la fluorescence. On détermine sa position au nanomètre près (localisation),  $t_1$

- le seul marqueur qui était dans la forme A revient à la forme B,  $t_2$

On recommence la procédure ( $t_3$ ). Statistiquement le marqueur qui passera de la forme B à la forme A ne sera pas toujours le même et en répétant suffisamment la procédure, la position de tous les marqueurs sera déterminée au nanomètre près. Le passage de la forme B vers A se nomme photo-activation car on fait passer un marqueur de la forme B qui n'émet pas de lumière à la forme A qui émet de la lumière par fluorescence en utilisant de la lumière ( $\lambda_B$ ).

## 430 5) Conclusion

La Figure 13 montre comment le principe de la microscopie PALM permet de visualiser la double hélice d'un brin d'ADN. Chaque brin d'ADN est marqué par des marqueurs fluorescents. En imageant le brin d'ADN par des marqueurs classiques, la distance entre deux brins d'ADN n'étant que de quelques dizaines de nanomètres au maximum, il n'est pas possible de différencier les deux brins. Par contre en utilisant la microscopie PALM et les nouveaux marqueurs, la double hélice du brin d'ADN peut être visualisée.

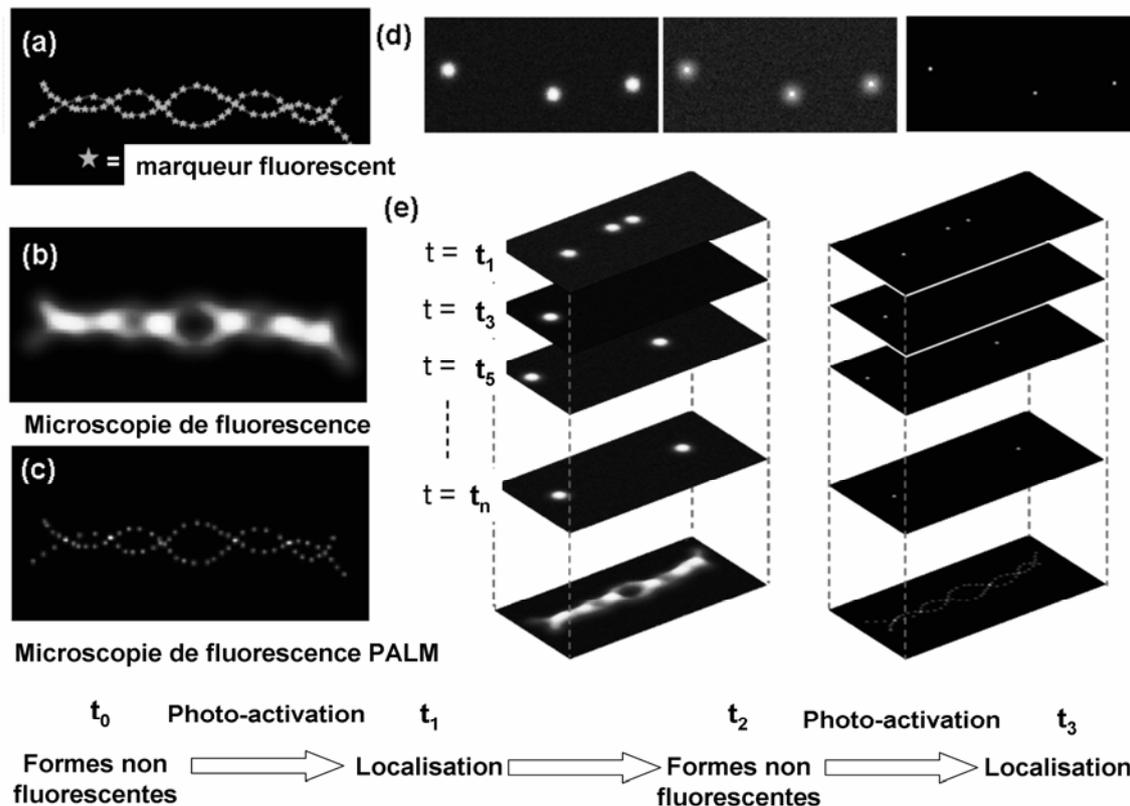


Figure 13 : Microscopie PALM appliquée pour la visualisation d'un double brin d'ADN.

## Notes aux examinateurs

Ce document a pour but de présenter une nouvelle microscopie de fluorescence, la microscopie PALM qui permet de s'affranchir de la limite de la diffraction de la lumière qui limite le pouvoir de résolution de la microscopie optique à environ 200 nm. On attend du candidat qu'il explique le principe de fonctionnement d'un microscope, de la microscopie de fluorescence et la microscopie PALM par rapport au problème du pouvoir de résolution de la microscopie optique. Adapter vos questions à chaque élève et filière, les questions de compréhension sont plus importantes que de redémontrer un relation mathématique..

- 450 • On revoit tout d'abord la construction de l'image d'un objet pour une lentille convergente, on utilise les trois rayons (au centre (non dévié) et parallèle à l'axe optique – passage par le foyer principale et réciproquement). Les formules de grandissement d'une lentille peuvent être redémontrer (Equation (1)) en utilisant le fait que les triangles (AA'Co) et (BB'Co) sont semblables, et également (CoDF<sub>1</sub>) et (BB'F<sub>1</sub>), et finalement on peut écrire :  $AA'/x=BB'/x'$  et  $AA'/f=BB'/(x'-f)$
- 455 • On détaille ensuite le principe de l'œil, demander au candidat de trouver la valeur du pouvoir de résolution de l'œil l. 80 : 1'' d'arc = 1/3600,  $\tan(\alpha)=d/a_0$  avec d le pouvoir de résolution et  $\alpha$  la distance angulaire en radian :  $\tan(\alpha)\approx\alpha= 26/3600*\Pi/180=d/a_0$ , et finalement  $d=25*10^{-2}*26*3.14/(3600*180)=31 \mu\text{m}$
- 460 • Définition du grossissement : le grandissement est calculé à partir du ratio de hauteurs alors que le grossissement, pour sa part, correspond au ratio des angles objet et image. Redémontrer l'Equation 3 :  $\tan\sigma'=CC'/(y'+d)$  et  $\tan\sigma=BB'/a_0$  d'où  $G = CC'/BB'*a_0/(y'+d) = \beta_{virtuelle} *a_0/(y'+d) = a_0/f*(y'+f)/(y'+d)$
- 465 • Principe de fonctionnement d'un microscope qui a été plus ou bien traité en cours / TP par les candidats. Ils doivent connaître le principe de l'association d'un objectif – oculaire mais le montage complet d'un microscope n'est pas connu et un grand nombre d'entre eux n'a jamais manipulé un microscope. Il est important de vérifier si le candidat a bien compris l'importance de tous les composants : collecteur, condenseur, objectif, oculaire, éclairage de Köhler (illumination uniforme), ouverture numérique (Equation 5, Figure 4-5-6). Pour collecter le maximum de lumière, on utilise des objectifs d'ouverture numérique maximale. Discuter avec le candidat de l'intérêt d'utiliser un liquide d'immersion (éviter tout contact avec l'objet). Equation 5 : application directe des lois de Descartes pour la réfraction
- 470

( $n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2$ ). Formation d'une image par un microscope, demandez lui la distance entre l'œil et l'image virtuelle : c'est  $a_0$ . Ensuite demander lui de démontrer que  $G_{mic} =$  produit du grandissement de l'objectif et du grossissement de l'oculaire (l 163) : à partir de la figure 4, si on reprend AA' (l'objet), BB' l'image réelle intermédiaire, CC' l'image virtuelle vue par l'œil,  $\tan \sigma' = CC'/a_0$  et d'après la définition du grossissement  $\tan \sigma = AA'/a_0$ . Finalement  $G_{mic} = CC'/AA' = CC'/BB' \cdot BB'/AA' = G_{oculaire} \beta_{objectif}$

480 • Principe de la microscopie de fluorescence : on donne une explication simplifiée du phénomène de fluorescence, revenir sur la Figure 8 et voir si le candidat a compris que l'émission de lumière par fluorescence se fait à une longueur d'onde supérieure (inférieure en énergie) par rapport à la longueur d'onde d'absorption. Microscopie de fluorescence : avantage (spécificité, sensibilité) / inconvénient (nécessaire d'utiliser des marqueurs). On attend que le candidat fasse un commentaire de la Figure 9 et il faudra vérifier que celui-ci a bien compris chaque paramètre, laser (monochromatique, polarisé), lentilles pour agrandir le faisceau et obtenir un faisceau uniforme (téléscope), miroir qui réfléchit la longueur du laser et transmet la fluorescence des marqueurs (figure 9c), lame quart d'onde pour obtenir une lumière polarisée  
485  
490 circulairement pour avoir une absorption isotrope dans le plan de polarisation du faisceau laser (pour les candidats très fort, on peut leur faire remarquer des objets qui absorbent dans le plan de propagation du faisceau laser ne seront pas observé par ce type de montage...), ,lentille pour obtenir l'illumination uniforme de l'échantillon de type Köhler, objectif de forte ouverture numérique pour collecter le maximale de  
495 lumière, lentille oculaire, CCD, discuter sur l'utilisation de la même optique pour le rôle d'objectif et de condenseur (fluorescence émise essentiellement vers le milieu le plus réfringent, le verre).

• L'exemple montre bien la spécificité de la microscopie de fluorescence (Figure 9), il est possible de visualiser un marqueur unique seul dilué dans une matrice polymère. Revenir sur l'expérience (pourquoi utiliser du polystyrène : non absorbant et donc non fluorescent à 532 nm, permet d'immobiliser les marqueurs à température ambiante,  $T_g$ ) et les données numériques : la concentration choisie permet d'avoir une seule molécule dans  $1 \mu m^3$  pour éviter le problème de la diffraction, nombre de molécule dans  $1 \mu m^3$  pour une concentration de  $10^9 \text{ mol.L}^{-1}$  :  $10^{-9}$  (concentration)\*  $(10^{-5})^3$  (volume)\*  $6 \cdot 10^{23}$  (Avogadro) = 0.6 molécules. Voir si le candidat a compris  
500  
505 que même si le marqueur a une taille de 1 nm, la diffraction donne une image, un

disque d'Airy de diamètre 250 nm. Pourquoi un rapport signal sur bruit est important (cf. PALM pour la détermination de la position). Si l'on fait un calcul rapide, un pixel représente  $(25 \mu\text{m (surface)} / 500 \text{ (pixels)}) = 50$  nanomètres) ce qui est largement suffisant dans ce cas car un marqueur a un diamètre due à la diffraction de 250 nm (5 pixels). Mais il sera préférable de diminuer cette valeur pour augmenter la précision de la position.

- On s'intéresse ensuite à un critère important du microscope, son pouvoir de résolution. Les candidats connaissent les phénomènes de diffraction et le disque d'Airy. A partir de la figure de diffraction d'une ouverture circulaire, on donne la définition du Critère de Rayleigh et sa formulation au niveau du microscope. Il faut bien comprendre que la diffraction limite le pouvoir de résolution d'un microscope mais sans diffraction il n'y a pas de formation d'image (Figure 12). Redémontrer l'équations (7) : pour les angles petits  $\sin\beta/2 \approx \tan \beta/2 = D/2x$  d'où  $\sin\beta \approx D/x$  et  $\alpha \approx d/x$  et en combinant avec l'équation 6 on obtient l'équation 7 en remplaçant  $\theta$  par  $\alpha$ . En utilisant l'équation 8 voir si le candidat a fait le lien avec le problème de la diffraction et la taille de 250 nm vue pour un marqueur à l'expérience précédente : en appliquant l'équation 8 à l'expérience des marqueurs dans le PS, on obtient comme pouvoir de résolution et disque d'Airy un diamètre de  $0.61 * 532 / 1.3 = 250$  nm.
- Enfin on présente une nouvelle microscopie de fluorescence PALM (Photo-activation – localisation - microscopie) qui utilise des marqueurs dont la fluorescence peut être photo-commutée réversiblement. En mesurant la position des marqueurs une par une, on peut reconstruire une image précise au nanomètre près de l'objet observé. Voir si le candidat a bien compris l'idée en explicitant la Figure 13, dans l'exemple il y a plusieurs marqueurs qui apparaissent en même temps mais cela ne pose pas de problème car les marqueurs sont à des distances supérieures au pouvoir de résolution. Pour les très bons candidats, on peut leur demander de commenter le terme « artificiellement » à l. 380 et la ligne 401. La microscopie PALM ne permet pas d'améliorer le pouvoir de résolution mais seulement d'obtenir des images de précision nanométrique, la taille d'un marqueur sera toujours de 250 nm. On peut inviter le candidat à réfléchir sur l'existence du bruit (l. 388) et l'importance d'un rapport signal sur bruit important (figure d'Airy, position du maximum d'intensité), calcul d'ordre de grandeur sur la puissance en reprenant l'exemple de la figure 9 ( $40\text{mW}/(50 * 10^{-4})^2 \approx 1600 \text{ W.cm}^2$ ).