

TECHNIQUES DE CONTRASTE EN MICROSCOPIE

I.	INTRODUCTION	1
II.	PRISE EN MAIN DU MICROSCOPE OLYMPUS BX 50 – <i>MICROSCOPIE ORDINAIRE (FOND CLAIR)</i>	2
	1. Présentation du matériel	2
	2. Microscopie en transmission	3
	a. Rappel sur l'éclairage Köhler	3
	b. Éclairage Köhler en transmission sur le microscope OLYMPUS BX 50	4
	c. Premières observations par transmission - Réglages pratiques	5
	3. Microscopie en réflexion.....	6
	a. Éclairage Köhler en réflexion sur le microscope OLYMPUS BX 50	6
	b. Premières observations par réflexion - Réglages pratiques	7
III.	MISE EN EVIDENCE DES OBJETS BIREFRINGENTS	8
	1. Microscope polarisant en éclairage orthoscopique	8
	a. Microscopie en réflexion	8
	b. Microscopie en transmission	9
	2. Polarisation quantitative [POUR INFORMATION]	9
IV.	MISE EN EVIDENCE DES OBJETS DE PHASE PAR FILTRAGE DES FREQUENCES SPATIALES	10
	1. Principe	10
	2. Défaut de mise au point en éclairage cohérent.....	11
	a. Description du filtrage	11
	b. Observations en transmission	12
	3. Contraste de phase.....	12
	a. Description du filtrage	12
	b. Mise en œuvre pratique.....	13
	c. Microscopie en transmission	14
	d. Microscopie en réflexion [POUR INFORMATION]	14
	4. Fond noir	14
	a. Description de la méthode	14
	b. Microscopie en transmission	15
	c. Microscopie en réflexion [POUR INFORMATION]	16
V.	MISE EN EVIDENCE DES OBJETS DE PHASE PAR INTERFEROMETRIE	16
	1. Généralités.....	16
	2. Interféromètre à large dédoublement	17
	3. Contraste Interférentiel Différentiel (CID) – Brevet Nomarski	20
	a. Description	20
	b. CID Nomarski en réflexion sur le microscope Olympus BX 50	21
	c. CID Nomarski en transmission [POUR INFORMATION]	22
VI.	MISE EN EVIDENCE DES OBJETS FLUORESCENTS	23
	1. Principe de l'épifluorescence	23
	2. Mise en œuvre et observations	26
VII.	CONCLUSION	26
	BIBLIOGRAPHIE	27
	ANNEXE: Liste des réglages du microscope Olympus BX 50	28

TECHNIQUES DE CONTRASTE EN MICROSCOPIE

I. Introduction

De nombreux objets microscopiques d'intérêt biologique ou technologique sont intrinsèquement transparents ou de réflectivité similaire à leur entourage et donnent donc en observation simple au travers d'un microscope une image quasi-uniforme inexploitable. Des techniques de coloration ou de révélation "chimiques" peuvent éventuellement être utilisées mais leur emploi est restreint par des difficultés de mise en œuvre et surtout par les modifications de l'objet étudié qu'elles entraînent inéluctablement (altération du métabolisme des cellules vivantes, attaque irréversible des surfaces...)

Cependant ces "imperceptibles" objets bruts, s'ils modifient peu l'intensité de la lumière d'éclairage qu'ils transmettent ou réfléchissent, changent usuellement de manière tangible d'autres propriétés de celle-ci, comme la phase ou la polarisation. Des dispositifs appropriés insérés dans le microscope peuvent donc transformer ces variations invisibles en modulation de l'intensité lumineuse perceptible par l'œil ou les détecteurs usuels. Il existe ainsi de multiples systèmes "de contraste" en microscopie, fondés sur un nombre plus restreint d'idées ou de principes de base. Quelques méthodes sont maintenant très "classiques" et les dispositifs pour les mettre en œuvre sont proposés par tous les grands constructeurs de microscope, tant pour l'observation par transmission (microscope dit "biologique") que pour l'observation par réflexion (microscope dit "métallographique").

Les techniques de contraste sont couramment utilisées par de nombreux observateurs. Elles sont même indispensables dans de nombreux domaines scientifiques, techniques ou industriels allant de l'analyse médicale de routine au contrôle de matériaux de pointe. Tout ingénieur opticien se doit donc de connaître ces techniques, tant pour leur intérêt direct en observation (de composants optiques le cas échéant), que pour les méthodes optiques sous-jacentes très diverses et intéressantes qu'elles mettent en œuvre. Le présent TP a pour objet de contribuer à votre formation dans ce domaine.

Les observations seront effectuées sur un microscope mixte biologique/métallographique haut de gamme OLYMPUS *BX 50*. Il s'agit d'un matériel de haute performance constitué d'optique et de mécanique de très grande précision qui devra donc être manipulé avec un **soin extrême**.

II. Prise en main du microscope Olympus BX 50 – *Microscopie ordinaire (Fond clair)*

1. Présentation du matériel

Une première séance de TP, en première année, vous a présenté les éléments clés d'un système de microscopie lors d'observations "ordinaires". Aujourd'hui, vous allez découvrir les puissantes techniques de visualisation à la disposition des microscopistes. Pour cela, vous allez utiliser le "gros" microscope *Olympus BX50* qui autorise, avec grande simplicité, la mise en œuvre de la plupart des techniques de contraste. Il s'agit d'un microscope de très haut de gamme prévu pour utiliser des objectifs corrigés pour une longueur de tube infinie (revoir le texte du TP de 1^{ère} année). Il dispose d'une tête d'observation binoculaire inclinée équipée d'oculaires à champ large (indice de champ 22) donnant un très grand confort d'observation à l'utilisateur, que celui-ci porte des lunettes correctrices ou non, grâce à la conception optique du système et aux bonnettes caoutchoutées rétractables. Les objectifs dont vous disposez sont de type *plan-achromatique* avec lentilles en fluorine. Ces dernières permettent une excellente correction de l'aberration chromatique et une excellente luminosité, même aux plus courtes longueurs d'onde. La plupart des objectifs disposent par ailleurs, malgré leur frontale relativement importante pour des objectifs "standard", d'une monture à ressort limitant usuellement la gravité, tant pour l'objectif que la préparation, d'une collision entre ces deux éléments au cours d'une mise au point mal réalisée. (*Il vous est rappelé qu'il reste malgré tout hautement souhaitable d'éviter ce genre d'accident ; la mise au point doit pour cela toujours être réalisée en **éloignant** la préparation de l'objectif, celle-ci ayant été préalablement amenée au **quasi**-contact de ce dernier sous contrôle d'une observation latérale*).

Le microscope Olympus BX50 des TP permet également, en plus de l'observation visuelle, une observation par caméra grâce à la sortie dédiée[#] et l'usage d'un oculaire spécialisé dit *oculaire projectif* conçu pour former à distance finie sur le capteur, une image, très bien corrigée des aberrations, de l'image intermédiaire formée par l'objectif et la lentille de tube [Roblin 87].

Vous allez maintenant prendre en main ce microscope en faisant dans un premier temps quelques observations simples (dites en "fond clair") en transmission et réflexion.

[#] POUR INFORMATION: La manette permet à l'utilisateur le choix de la répartition de la lumière entre la sortie visuelle (binoculaire) et la sortie caméra. Trois répartitions (sortie visuelle /sortie caméra) sont possibles: 100% /0%, 20% /80% et 0% /100%.

2. Microscopie en transmission

a. Rappel sur l'éclairage Köhler

Une observation de qualité d'un objet ne peut se concevoir que si celui-ci est “bien” éclairé. Le problème de l'éclairage a été abordé (pour le microscope biologique uniquement) lors du TP de microscopie de 1^{ère} année. Voici quelques rappels généraux:

Les propriétés d'un bon éclairage en microscopie sont les suivantes:

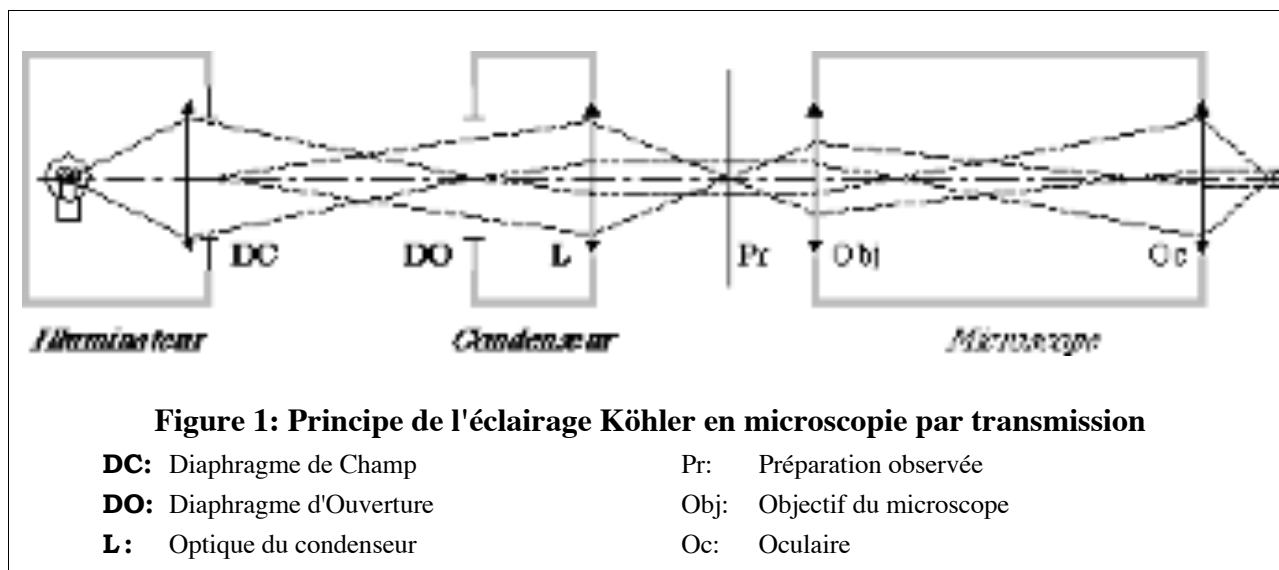
- **Uniformité de l'éclairage.** {Pour voir l'objet et non les défauts de l'éclairage}
- **Limitation de la zone éclairée au champ vu dans le microscope.** {Pour limiter la lumière parasite}
- **Contrôle de l'ouverture numérique (ou autrement dit, de la cohérence partielle) de l'éclairage.** {Cf. TP 1^{ère} a.}
- ⇓ Contrôle “souple” de la luminosité de l'éclairage. {Confort d'utilisation}
- ⇓ Contrôle de la température de couleur de l'éclairage. {Reproductibilité des couleurs. Important en photographie couleur}

Les deux derniers points, marqués du symbole ⇓, sont des impératifs à connotation plus “pratique” que les trois premiers.

Il faut par ailleurs souligner que l'éclairage a une grande importance dans la plupart des méthodes de contraste.

La figure 1 ci-dessous rappelle le principe de l'éclairage Köhler pour le microscope biologique [Köhler 1893]. Il permet de réaliser les trois conjugaisons suivantes:

- Diaphragme de champ × Préparation *via l'optique du condenseur.*
- Diaphragme d'ouverture × pupille d'entrée de l'objectif (qui est toujours à l'infini) *via l'optique du condenseur.*
- Filament de la lampe × Diaphragme d'ouverture *via l'optique de l'illuminateur.*



b. Éclairage Köhler en transmission sur le microscope OLYMPUS BX 50

L'éclairage Köhler est évidemment intégré dans le statif du microscope Olympus BX50. Un certain nombre de centrages sont réglés de construction et ne sont pas accessibles à l'utilisateur.

Les trois réglages de base de l'éclairage Köhler en transmission sont gouvernés sur le microscope OLYMPUS BX 50 par les manettes **Kt1** (diamètre du diaphragme de champ), **Kt2** (diamètre du diaphragme d'ouverture) et **Kt3** (mise au point du condenseur). Voir le schéma annoté du microscope.

Des réglages annexes sont évidemment disponibles. La luminosité de l'éclairage peut être réglée par le potentiomètre **G1**. Le poussoir **G2** permet d'imposer une luminosité pré-réglée de température de couleur fixe, très utile pour avoir des résultats constants en microphotographie couleur. Les manettes **Kt4** et **Kt4'** permettent de jouer sur le centrage du condenseur (le diaphragme de champ est par contre fixe, précentré en usine). Les manettes **Kt6**, **Kt7** et **Kt8** permettent la mise en service de filtres sur le faisceau d'éclairage. ND25 signifie 'Neutral Density 25%'. Il s'agit d'un filtre gris neutre de transmission 0,25 permettant d'abaisser la luminosité de l'image sans changer la température de couleur de l'éclairage. ND6 a un rôle similaire mais avec une transmission de 6%. Leurs effets peuvent être cumulés pour une très forte atténuation. Ces filtres sont très utiles pour éviter l'éblouissement lorsque l'on passe d'une observation en contraste de phase ou fond noir à une observation en fond clair beaucoup plus lumineuse. Enfin le filtre LBD 'Light Blue Density' est un filtre de conversion lumière artificielle vers lumière du jour nécessaire pour prendre des photographies avec des films couleurs courants équilibrés pour la lumière du jour (~5900 K) et non pour l'éclairage par lampe halogène (~3200 K).

Par ailleurs, comme le condenseur disponible sur le microscope des TP est un modèle dit "universel" qui autorise le travail avec des objectifs de tout grandissement et qui permet la réalisation des éclairages spéciaux pour les différentes méthodes de contraste par transmission, il

faut également s'assurer que les réglages de **[Kt5]** , **[Ct1]** , **[Pt1]** et **[Pt2]** sont corrects pour le type d'observation désiré. Pour les objectifs de grandissement supérieur à 4 (c'est le cas de **tous** les objectifs disponibles au TP) la manette **[Kt5]** du condenseur doit être abaissée pour avoir une couverture correcte par l'éclairage du champ observé. Enfin, pour une **observation simple par transmission** (“fond clair”), le sélecteur **[Ct1]** du condenseur doit être sur la position 1 (UBF – Universal Bright Field) {éclairage “normal”}, et les molettes **[Pt1]** et **[Pt2]** doivent être visibles à l'avant du condenseur {polariseur hors service}. *Sur le microscope, il faut par ailleurs que la lampe soit placée en position basse, le sélecteur **[I]** du bloc illuminateur par réflexion soit sur une position sans label {transmission}, les glissières **[A1]** et **[C1]** soient en position tirée {pas d'analyseur ni de prisme biréfringent en service}, et la manette **[V]** complètement enfoncée {observation purement visuelle}.*

c. Premières observations par transmission - Réglages pratiques

Alimentation coupée, vous placerez le bloc support de lampe en position basse (**Voir avec l'enseignant au démarrage**). Vous placerez le potentiomètre **[G1]** en position basse et le bouton **[G2]** en position sortie {off} puis vous mettrez l'éclairage sous tension et vous augmenterez doucement la luminosité de la lampe en glissant doucement vers le haut la manette du potentiomètre jusqu'aux graduations 6 à 8. **NB:** *Le potentiomètre **[G1]** doit toujours être manipulé doucement afin de préserver la lampe à iode de l'éclairage.* Vous placerez également le sélecteur **[I]** du bloc illuminateur métallographique sur une position sans label, vous placerez en position tirée les glissières **[C1]**^s et **[A1]** et vous repousserez à fond la tirette **[V]** .

Ensuite, abaissez au maximum le plateau avec la molette **[M1]** puis placez (avec précaution) une préparation pour observation ordinaire en transmission avec lamelle couvre objet (par exemple, une coupe transverse de Lombric en coloration trichrome) dans le porte échantillon **[G4]** . Centrez la préparation avec les deux manettes concentriques **[G3]** . Par rotation de la tourelle **[B]** amenez en service l'objectif “biologique” UPlanFl 20×/0,50 ∞/0,17. Effectuez la mise au point en remontant, dans un premier temps, le plateau avec **[M1]** **en regardant latéralement la scène afin d'éviter toute collision préparation/objectif**, puis dans un deuxième temps, en redescendant lentement le plateau avec **[M1]** et **[M2]** tout en observant à travers le microscope. **RAPPEL: NE JAMAIS APPROCHER LA PRÉPARATION DE L'OBJECTIF TOUT EN REGARDANT AU TRAVERS DU MICROSCOPE.** (Pour information: la frontale de l'objectif 20∞ est de l'ordre de 2 mm). Réglez également l'oculaire micrométrique **[Oc2]** à votre vue ainsi que la balance gauche/droite **[Oc1]** et l'espacement interoculaire du tube binoculaire pour une vision confortable. Ne pas oublier de rentrer ou déployer les bonnettes des oculaires suivant que vous portez ou non des lunettes correctrices.

Réglez alors l'éclairage Köhler afin d'avoir un éclairage uniforme couvrant juste le champ observé: assurez-vous tout d'abord que les molettes **[Pt1]** et **[Pt2]** sont bien visibles à l'avant du condenseur {polariseur hors service} et que le sélecteur **[Ct1]** est sur la position 1

^s **ATTENTION:** La glissière **[C1]** est bloquée en position rentrée ou sortie par la vis **[C4]** .

(UBF – Universal Bright Field). Fermez le diaphragme de champ (molette **Kt1**) et rendez son image nette sur la préparation en jouant sur la mise au point du condenseur (bouton **Kt3**). Si nécessaire, centrez cette image via les manettes **Kt4** et **Kt4'**. Ouvrez ensuite le DC jusqu'à couvrir le champ observé et ajustez la taille du diaphragme d'ouverture (molette **Kt2**) pour obtenir un contraste optimal des détails intéressants de l'objet. Réglez la luminosité via **G1**, **Kt6**, **Kt7** et **Kt8** (Cf. §II.2.b).

Observez la préparation en la déplaçant à l'aide des mouvements micrométriques **G3**. Observez un détail particulier de celle-ci avec l'objectif UPlanFl **40** \times /**0,75** ∞ /**0,17**. Jugez la qualité de la parfocalité et du centrage au changement d'objectif.

Vous pouvez également vérifier, comme lors du TP de première année, l'influence de la correction des aberrations introduites par la lamelle couvre-objet; observez pour cela un même détail de la préparation avec les objectifs, biologique UPlanFl **40** \times /**0,75** ∞ /**0,17**, et métallographique UPlanFl **50** \times /**0,80** ∞ /**0**. De même, vous pouvez observer l'influence de la cohérence de l'éclairage en faisant varier le diamètre du diaphragme d'ouverture (molette **Kt2**) et en regardant la variation de contraste d'objets périodiques; utilisez pour cela les objectifs 20 \times et 40 \times "biologiques" et une préparation bien choisie de diatomées tests. (*Rappel: prenez grand soin de ces préparations qu'il est très difficile de se procurer*).

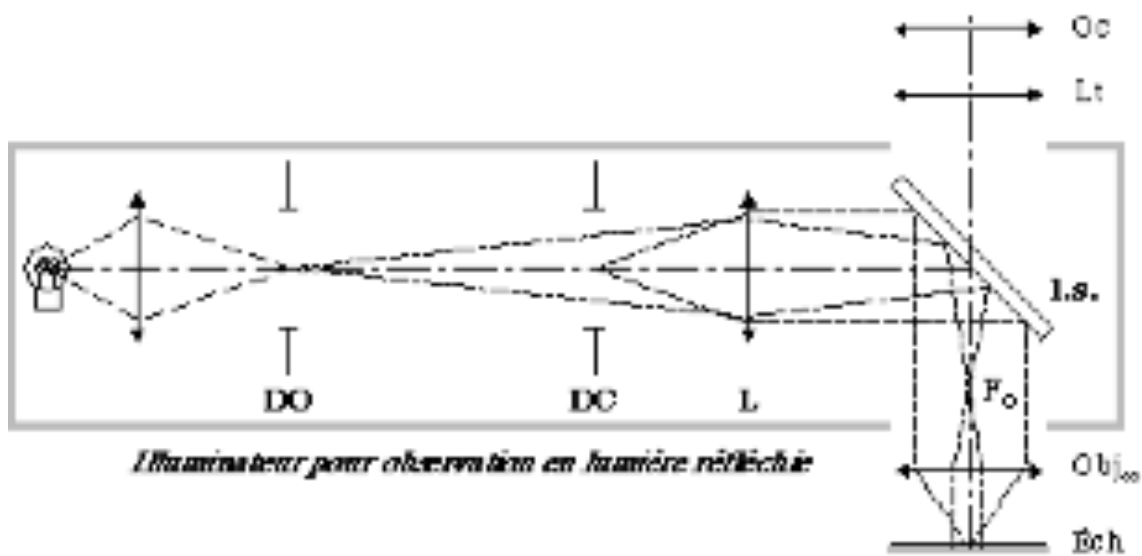


Figure 2: Principe de l'éclairage Köhler en microscopie par réflexion

DO: Diaphragme d'Ouverture	Oc: Oculaire
DC: Diaphragme de Champ	Lt: Lentille de tube
L: Optique de l'illuminateur	Obj _∞ : Objectif corrigé à l'infini, de foyer image F ₀
l.s.: Lame semi-réfléchissante	Éch: Échantillon observé

Remarque: La figure est un schéma de principe indiquant les différentes conjugaisons. Des lentilles supplémentaires (usuellement accolées aux deux diaphragmes DO et DC) sont souvent ajoutées en pratique pour améliorer les performances de l'illuminateur.

3. Microscopie en réflexion

a. Éclairage Köhler en réflexion sur le microscope OLYMPUS BX 50

L'éclairage Köhler peut également être réalisé pour les observations par réflexion d'objets opaques. La lumière doit dans ce cas être transmise via l'objectif d'observation lui-même, un éclairage latéral indépendant étant impossible avec les objectifs de microscope usuels par suite de leurs très courtes distances frontales (voir toutefois le paragraphe §IV.4.c). La figure 2 donne le schéma de principe de la réalisation de l'éclairage Köhler sur un microscope métallographique. Il permet, de manière très similaire à celui par transmission, de réaliser les trois conjugaisons suivantes:

- Diaphragme de champ ↔ Préparation
- Diaphragme d'ouverture ↔ pupille de sortie de l'objectif (qui est toujours au foyer image de l'objectif)
- Filament de la lampe ↔ Diaphragme d'ouverture

Les réglages de base de l'éclairage Köhler par réflexion sont gouvernés sur le microscope OLYMPUS BX 50 par les manettes :

Kr1 (diamètre du diaphragme d'ouverture – AS 'Aperture Stop'), **Kr2** (diamètre du diaphragme de champ – FS 'Field Stop'). Les manettes **Kr3**, **Kr4** et leurs symétriques **Kr3'**, **Kr4'** permettent le centrage du diaphragme associé. La manette **Kr5** commande un obturateur. On ne dispose pas en lumière réfléchie d'une commande de mise au point de l'éclairage Köhler, celle-ci étant réalisée par principe avec la mise au point du microscope sur l'échantillon à observer.

Comme pour l'éclairage en transmission, il faut s'assurer qu'un certain nombre de dispositifs sont correctement positionnés ou hors service. Pour une observation simple en réflexion ("fond clair"), le sélecteur **I** du bloc illuminateur par réflexion doit être sur la position **BF** (pour 'Bright Field'). Les glissières **C1**, **A1** et **Pr** doivent par ailleurs être en position tirée {polariseurs et prisme de CID hors service}, et la manette **V** complètement enfoncée. Les commandes **G1** et **G2** permettent comme précédemment de régler la puissance de l'éclairage.

b. Premières observations par réflexion - Réglages pratiques

Abaissez doucement la luminosité de la lampe via le potentiomètre **G1** puis coupez l'alimentation. Après une ou deux minutes de refroidissement, installez la lampe sur l'illuminateur par réflexion. Mettez en place un échantillon pour observation par réflexion (sans lamelle couvre objet) comme par exemple l'échantillon de bitume enchâssé dans une gangue caoutchoutée. Placez le sélecteur **I** de l'illuminateur métallographique sur la position **BF** (pour 'Bright Field'). Comme précédemment, les glissières **C1**, **A1** et **Pr** doivent être en position tirée {hors service} tandis que la manette **V** doit être complètement repoussée. L'obturateur commandé par **Kr5** doit être en position ouvert.

Mettez en place l'objectif métallographique UMPlanFl 20 \times /0,46 ∞ /0 puis faites la mise au point sur l'échantillon. Réglez le diamètre du diaphragme de champ (FS – 'Field Stop') par la tirette **Kr2** et le diamètre du diaphragme d'ouverture (AS – 'Aperture Stop') par la tirette **Kr1**. Les manettes **Kr4** et **Kr4'** permettent le centrage du diaphragme de champ tandis que les manettes **Kr3** et **Kr3'** permettent le centrage du diaphragme d'ouverture[◇].

Observez ensuite un détail de l'échantillon avec l'objectif UMPlanFl 50 \times /0,80 ∞ /0 puis observez-le avec l'objectif UPlanFl 40 \times /0,75 ∞ /0,17. Quelle est la qualité de l'image dans le dernier cas ?

[◇] Le centrage éventuel du diaphragme d'ouverture peut être effectué lorsque l'échantillon est très éloigné de l'objectif. L'image du DO encadrant celle du filament de la lampe se projette dans ce cas sur l'objet. Il faut alors centrer le DO sur l'image du filament qui coïncide (normalement) avec l'axe du microscope. (Cf. Fig. 2).

III. Mise en évidence des objets biréfringents

Les objets biréfringents et plus généralement tous les objets qui modifient la polarisation de la lumière incidente (par pouvoir rotatoire, dichroïsme, réflexion, ...) forment une classe importante d'objets transparents ou réfléchissants qu'il est utile de mettre en évidence ou de différencier, voire d'identifier par mesure précise des propriétés optiques. Les exemples les plus courants sont les coupes ultra-minces de cristaux, très utilisées pour l'identification chimique ou géologique de matériaux, et les surfaces polies de métaux ou matériaux polycristallins, souvent observées à des fins de caractérisation métallographique. Suivant les buts visés (visualisation ou identification), différentes méthodes de polarisation de complexité variable peuvent être mise en œuvre.

1. Microscope polarisant en éclairage orthoscopique

C'est une méthode très simple à mettre en œuvre, qui permet la mise en évidence et la différenciation des matériaux altérant la polarisation de la lumière incidente. Le faisceau d'éclairage, collimaté et normal à la surface de l'échantillon (d'où le nom *d'éclairage orthoscopique* – il s'agit simplement en fait d'un éclairage Köhler avec le D.O. fermé), est polarisé rectilignement par un polariseur inséré dans le bloc d'éclairage Köhler. Un analyseur est placé dans le microscope. Le plus souvent polariseur, analyseur et échantillon sont orientables. Dans le cas général, la biréfringence de l'objet se traduit alors en lumière blanche par l'apparition de couleurs, les teintes de Newton (*voir vos cours et TP sur la polarisation*), qui sont donc parfaitement visibles à l'œil.

a. Microscopie en réflexion

Le microscope Olympus BX 50 se transforme très simplement en microscope polarisant:

Il suffit de pousser la glissière **Pr** pour polariser linéairement l'éclairage. Ce polariseur est **fixe**, la direction de polarisation étant TE sur la lame semi-réfléchissante de l'illuminateur par réflexion (voir. Fig. 2). Ceci est rendu nécessaire par l'influence d'une lame semi-réfléchissante traitée sur la polarisation, toute polarisation autre que TE ou TM étant généralement transformée en polarisation elliptique (voir le TP de 1^{ère} année « Production et analyse de lumière totalement polarisée – Ellipsométrie » et votre cours sur les couches minces).

L'analyseur est mis en service en poussant la glissière **A1** et il est orienté dans une direction quelconque par la molette **A2**.

Observez ainsi l'échantillon de bitume et une puce électronique. On travaille le plus souvent entre polariseur et analyseur croisés.

b. Microscopie en transmission

La mise en œuvre est également très simple en transmission. Après avoir replacé la lampe sur l'illuminateur par transmission (COUPEZ L'ALIMENTATION LORS DU DÉPLACEMENT),

mettez en place une préparation de cristaux d'acide citrique ou une coupe mince de roche. Faites alors tourner la partie basse du condenseur afin d'amener les molettes **Pt1** et **Pt2** à l'arrière de celui-ci pour mettre le polariseur en service. La molette **Pt1** permet d'orienter ce dernier. La vis **Pt2** permet de bloquer la molette **Pt1** (et donc le polariseur) dans une orientation fixée. L'analyseur est toujours gouverné par la glissière **A1** et la molette **A2**.
NOTA: le plateau porte objet est également orientable. La vis **G5** sert au blocage/déblocage de ce mouvement.

Observez différentes préparations biréfringentes et regardez l'influence de l'orientation du polariseur et de l'analyseur.

2. Polarisation quantitative [POUR INFORMATION]

Il est également possible de faire des **mesures** de polarisation (biréfringence, orientation des axes, ...) sur les objets observés. Ces mesures peuvent fournir des renseignements très riches pour analyser ou identifier un échantillon. Cependant la polarisation quantitative en microscopie est un travail délicat demandant du matériel très spécialisé. En particulier, il faut travailler avec des objectifs spéciaux dit “sans tension” dont les lentilles réalisées par des méthodes spécifiques sont montées sans contrainte afin de ne pas posséder de biréfringence induite qui fausserait les mesures.

En éclairage orthoscopique, le microscope polarisant s'apparente à un polariscope et toutes les méthodes classiques d'analyse de la polarisation peuvent y être transposées (voir les différents TP sur la polarisation): on trouve ainsi l'association lame $\lambda/4$ - polariseur (compensateur de Sénarmont), le compensateur de Soleil, etc...

Cependant, l'axe optique des cristaux pouvant être dans une direction quelconque, il peut être nécessaire de travailler avec une platine théodolite permettant d'orienter dans une direction quelconque de l'espace la normale à la préparation, qui doit alors être enchassée entre deux demi-sphères de verre, ou encore de travailler en éclairage convergent (*éclairage conoscopique*) et d'observer la figure obtenue au foyer de l'objectif (la “figure d'axe”) grâce à une lentille additionnelle amovible appelée *lentille de Bertrand*^ø (Voir le TP ÉSO 2.1 « Polarisation A »).

Voir la référence [Roblin 87] et sa bibliographie pour approfondir ce sujet assez ardu.

IV. Mise en évidence des objets de phase par filtrage des fréquences spatiales

Les objets de phase, comme les organites d'une cellule vivante ou les défauts de surface d'un matériau poli, forment également une très grande classe d'objets microscopiques transparents

^ø Le viseur auxiliaire Olympus U-CT30 (voir le §IV.3.c sur le contraste de phase) est en fait un “viseur de Bertrand” dans la mesure où il est équivalent à l'association lentille de Bertrand + oculaire.

ou réfléchissants qu'il est important de pouvoir observer avec précision. De nombreuses méthodes existent pour transformer ces variations de phases invisibles à l'œil en variations d'amplitude observables. Dans la plupart des cas, cette transformation repose soit sur les interférences soit sur le filtrage des fréquences spatiales. Le présent paragraphe s'intéresse à trois méthodes couramment utilisées exploitant cette dernière technique. Le paragraphe suivant (§V) présentera quant à lui quelques techniques de contraste basées sur l'interférométrie.

1. Principe

Seules les grandes lignes des techniques de filtrage des fréquences spatiales utilisées en microscopie seront présentées dans ce texte de TP. Le lecteur est supposé connaître le principe du filtrage des fréquences spatiales par le montage classique de double diffraction. Pour tout renseignement sur les fondements et les détails de cette méthode nous renvoyons le lecteur à ses cours et aux références [Lowenthal 67], [Goodman 72] et [Born 80] ainsi qu'au TP «Filtrage des fréquences spatiales».

Soit une préparation microscopique formant un objet de transmittance complexe t .

Cet objet est éclairé par une onde plane provenant de l'éclairage Köhler en condition d'éclairage cohérent (i.e. D.O. quasi-ponctuel) (Voir la figure 1).

Dans le premier plan de convergence du montage de double diffraction, appelé *plan de Fourier* et qui correspond en microscopie au plan focal image de l'objectif du microscope, on obtient donc à une homothétie et un facteur de phase près la transformée de Fourier \tilde{t} de t :

$$t \longrightarrow \tilde{t}$$

Dans le cas qui nous intéresse ici, l'objet est usuellement un pur objet de phase, i.e.:

$$\vec{t}(\vec{M}) = \exp(i \Phi(\vec{M}))$$

où Φ est une fonction à valeur réelle représentant le déphasage introduit par l'objet en chaque point de celui-ci. (Nota: la phase globale de l'onde étant sans importance, on choisit Φ afin que sa valeur moyenne soit nulle). Si les variations de phase sont faibles ($|\Phi| \ll 1$), l'exponentielle peut être développée au premier ordre et l'on obtient :

$$\vec{t}(\vec{M}) \approx 1 + i \Phi(\vec{M}) \quad (|\Phi| \ll 1)$$

Dans ce cas, l'on obtient donc dans le plan de Fourier :

$$1 + i \Phi \longrightarrow \delta + i \tilde{\Phi}$$

où δ est la distribution de Dirac, et $\tilde{\Phi}$ la transformée de Fourier de Φ . (Cela signifie en pratique que l'on a un point très lumineux au centre du plan de Fourier (δ) et de la lumière diffractée dans tout le plan ($\tilde{\Phi}$). On rappelle que l'œil est sensible à l'éclairement, proportionnel au **module carré** de l'amplitude complexe).

Pour le montage de double diffraction, **sans filtrage** dans le plan de Fourier, on a donc :

$$t = \exp(i \Phi) \longrightarrow \sim \delta + i \tilde{\Phi} \longrightarrow a \propto \exp(i \Phi) \begin{pmatrix} \text{Observation visuelle:} \\ |a|^2 \propto 1 \end{pmatrix}$$

Un pur objet de phase est vu comme une plage uniformément éclairée.

En fait ce résultat n'est pas tout à fait exact car l'O.N. finie de l'objectif conduit à une extension limitée de la lumière dans le plan de Fourier (cette limite est par définition la pupille de sortie de l'objectif). Par conséquent l'image finale est donc l'objet convolué par la réponse percussive de l'objectif (la fonction d'Airy si l'objectif est "limité par la diffraction") et l'image peut présenter quelques variations d'amplitude (phénomène de Gibbs).

2. Défaut de mise au point en éclairage cohérent

a. Description du filtrage

Un défaut de mise au point peut être vu comme un terme de phase multiplicatif intervenant sur la pupille de l'objectif $\tau(\vec{M}) \approx \exp\left(i \cdot \alpha \cdot \|\vec{M}\|^2\right)$ où α est une constante réelle quantifiant l'importance du défaut de mise au point [Goodman 72] [Born 80].

L'objet t donne donc dans ce cas dans le plan de Fourier l'amplitude complexe: $\sim \delta + i \cdot \tilde{\Phi} \times \tau$

$$t = \exp(i \Phi) \approx 1 + i \Phi \longrightarrow \sim \delta + i \cdot \tilde{\Phi} \propto \tau \longrightarrow \sim 1 + \left(i \cdot \tilde{\Phi} \times \tau\right)$$

τ étant une fonction à valeur complexe, la seconde transformation de Fourier n'a aucune raison de restituer une fonction de phase pure. Par conséquent, l'objet de phase donne dans ces conditions une image ayant une modulation d'amplitude apte à être observée par l'œil. Cependant, la forme de cette image n'est que très indirectement reliée à celle de l'objet. Par conséquent cette méthode a une utilité pratique assez limitée. Elle peut toutefois servir à localiser des objets de phase sur une préparation avant de mettre en œuvre des techniques de contrastes plus performantes.

N.B.: En éclairage incohérent, un défaut de mise au point donne un résultat fort différent puisque le formalisme du filtrage des fréquences spatiales doit être appliqué aux intensités (ou, plus rigoureusement, aux éclairissements). Puisque l'objet de départ est uniforme de ce point de vue, l'image l'est également.

b. Observations en transmission

Mettez hors service le polariseur et l'analyseur. Installez une préparation d'objets de phase (diatomées ou protozoaires vivants par exemple). Regardez l'influence combinée de la mise au point et de la cohérence de l'éclairage sur ces objets.

3. Contraste de phase

a. Description du filtrage

Dans le cas du contraste de phase, le filtrage dans le plan de Fourier consiste à déphaser de $\pm \pi/2$ radians et à atténuer le point lumineux central. Le montage par double diffraction donne alors, si γ représente le coefficient d'atténuation (en amplitude) du point lumineux central

($\gamma \in]0,1]$) :

$$t \approx 1 + i\Phi \longrightarrow \sim \pm i\gamma\delta + i\tilde{\Phi} \longrightarrow a \propto \sim \pm i\gamma + i\Phi \quad \left(\begin{array}{l} \text{Observation visuelle:} \\ |a|^2 \propto \gamma^2 \pm 2\gamma\Phi \end{array} \right)$$

Les variations de phase de l'objet sont alors perçues comme des variations de luminosité sur un fond plus ou moins clair.

Les variations de luminosité de l'image sont **proportionnelles** aux variations de phase de l'objet. Remarque : suivant que le point lumineux central verra sa phase retardée ou respectivement avancée, un retard de phase dans le front d'onde (chemin optique parcouru dans l'objet plus grand ; Φ négatif en convention $e^{+i\omega t}$) sera perçu comme plus ou respectivement, moins lumineux que le fond, et vice versa pour une avance de phase[†].

Le contraste C de l'image obtenue, rapport des variations de luminosité sur la valeur moyenne de cette dernière, s'exprime par :

$$C = \frac{2\gamma \Delta\Phi}{\gamma^2} = \frac{2 \Delta\Phi}{\gamma}$$

Il est d'autant meilleur que γ est petit.

NOTA : Les résultats donnés ci-dessus ne s'appliquent pas lorsque γ est nul. (On tombe en fait sur le cas de la strioscopie – Voir le TP « filtrage des fréquences spatiales, contraste de phase et strioscopie »).

NOTA 2 : Dans le cas, courant, d'objets de phase et d'amplitude, le filtrage optimal dans le plan de Fourier diffère légèrement de celui précédemment exposé (cf. [Françon 50] et [Françon 54]).

b. Mise en œuvre pratique

Le formalisme précédemment exposé s'applique pour un éclairage cohérent, c'est à dire pour un éclairage Köhler dont le diaphragme d'ouverture est a priori très fermé. La luminosité de l'image est dans ce cas très basse puisque la plus grande partie du flux entrant, particulièrement faible, est absorbée par le filtre placé dans le plan de Fourier. Il est donc nécessaire, au-delà de

[†] On parle dans le premier cas (*détail plus lumineux pour un retard de phase*) de contraste de phase *négatif* et dans le second de contraste de phase *positif* (cf. [Françon 50]). Les anglo-saxons parlent eux respectivement de contraste de phase "brillant" (*bright phase contrast*) ou "sombre" (*dark ph. ctr.*) en se référant à la manière dont apparaît un excès de chemin optique dans l'objet (cf. [Born 80]).

l'utilisation d'un éclairage puissant (100W dans le cas du microscope Olympus BX 50), de disposer d'une astuce. Utiliser un diaphragme d'ouverture plus ouvert et filtrer sur une zone plus large (couvrant l'image du D.O. dans le plan pupillaire de l'objectif – Voir Fig.1) conduit à une altération notable des basses fréquences spatiales de l'image si l'on veut remonter suffisamment la luminosité et cette méthode n'est donc pas adaptée. Une autre solution consiste à utiliser une fente comme diaphragme d'ouverture. La surface de celle-ci, et donc le flux final formant l'image, sont nettement supérieurs à ceux obtenus pour un trou de même largeur. Cependant cette méthode introduit une sensibilité à la direction des fréquences spatiales de l'objet puisque les modulations dans une direction perpendiculaire à la fente ne sont pas mises en évidence. En fait, la solution la plus couramment adoptée consiste à utiliser un diaphragme d'ouverture **annulaire**, généralement appelé *anneau de phase*, et de filtrer dans le plan de Fourier avec un filtre ayant également une forme annulaire. L'épaisseur de ces deux couronnes peut être faible pour préserver les basses fréquences spatiales alors même que la surface du diaphragme d'ouverture annulaire peut être importante afin de conférer une bonne luminosité à l'image. De surcroît cette configuration conserve la symétrie de révolution du système ce qui permet à la méthode de ne pas dépendre de l'orientation de l'objet.

La lame de phase (i.e. le dispositif physique réalisant le filtrage dans le plan de Fourier – il s'agit en général d'une lame de verre à faces parallèles sur laquelle est déposée une fine couche absorbante et déphasante {très souvent de l'aluminium} en forme de couronne) doit être positionnée dans le plan de Fourier qui, comme il a déjà été signalé, coïncide avec le plan de la pupille de sortie de l'objectif (Voir Fig. 1). Cependant, ce plan est, sur les objectifs normaux, le plus souvent mécaniquement inaccessible (il est virtuel ou au niveau de la monture mécanique). Deux solutions sont apportées à ce problème par les constructeurs de microscope. La première consiste à intégrer la lame de phase dans l'objectif dès sa construction, créant ainsi une gamme spéciale d'objectifs dédiés au contraste de phase. (Cette méthode ne peut cependant pas être utilisée sur les microscopes métallographiques (Voir Fig.2) – Pourquoi ?). La seconde, utilisée sur les microscopes de très haut de gamme (microscope de recherche) et sur les microscopes métallographiques, consiste à faire une image du plan de Fourier par une optique supplémentaire (un *véhicule pupillaire*) dans un plan suffisamment éloigné des montures afin qu'il soit possible d'insérer sans difficulté particulière la lame de phase, généralement amovible dans ce cas (Voir Fig. 3). Cette méthode permet l'utilisation des objectifs normaux en contraste de phase, mais la réalisation d'un bon véhicule pupillaire qui n'altère pas la qualité des images données par le microscope est très délicate et donc fort coûteuse.

Notez bien par ailleurs que les diamètres et les largeurs de l'anneau de phase et de la couronne de la lame de phase doivent être correctement adaptées les uns aux autres pour permettre un fonctionnement correct du système. Cette adéquation n'est évidemment valable que pour un couple condenseur-objectif donné (Pourquoi ?).

c. Microscopie en transmission

Le contraste de phase est obtenu sur le microscope Olympus BX 50 par un jeu d'objectifs dédiés. Ceux-ci sont repérés par la couleur verte de leur marquage et par le mnémonique **Phx**

gravé à la suite des indications de grossissement et d'ouverture numérique. x représente un nombre (1, 2 ou 3) indiquant le numéro de l'anneau de phase à utiliser pour cet objectif. Le sélecteur **Ct1** du condenseur permet d'insérer l'anneau de phase approprié dans le plan du diaphragme d'ouverture à iris qui devra être complètement ouvert (molette **Kt2** sur 0.9).

Choisissez un objet de phase puis mettez en place l'objectif pour contraste de phase UPlanFl 40 \times /0,75 **Ph2**. Mettez le sélecteur **Ct1** du condenseur sur la position 4 [Ph2]. Retirez un oculaire et insérez à la place le viseur auxiliaire U-CT30 (viseur de Bertrand). En vision monoculaire, ajustez la mise au point de ce viseur afin de voir net l'anneau et la lame de phase. Dévissez les manettes **Ct2** puis insérez-les dans les deux trous à 120° prévus à cet effet à l'arrière du condenseur et centrez doucement l'anneau de phase sur la couronne de la lame de phase (Voir avec l'enseignant). Remettez immédiatement les manettes **Ct2** à leur place. Remettez l'oculaire en place et observez la préparation.

Comparez les observations en contraste de phase et en fond clair en tournant simplement le sélecteur **Ct1**. (Il pourra être utile de jouer avec les filtres neutres ND6 et ND25 manipulés par les boutons **Kt6** et **Kt7** afin d'éviter les éblouissements. Voir le §II.2.b)

Matière à réflexion: Y a-t-il une différence (théorique et/ou pratique) sur les images d'un même objet données par les objectifs 40 \times /0,75 standard et 40 \times /0,75 **Ph2** tous deux utilisés en **éclairage fond clair** ? Quel rôle joue la cohérence de l'éclairage ? Conclure quant à l'utilisation d'un objectif pour contraste de phase en éclairage fond clair.

d. Microscopie en réflexion [POUR INFORMATION]

Il n'est pas possible sur le microscope Olympus BX50 de faire des observations par réflexion en contraste de phase. Il existe cependant des microscopes métallographiques permettant de réaliser ce type d'observation. Le problème, soulevé au paragraphe §IV.3.b précédent, réside dans la nécessité absolue de placer la lame de phase **hors** du chemin de la lumière incidente, c'est à dire entre la lame semi-réfléchissante et l'oculaire (Voir la figure 2), ce qui implique l'utilisation d'une optique supplémentaire (un véhicule pupillaire) coûteuse et assez encombrante qui oblige généralement à modifier considérablement le parcours des faisceaux. Le contraste de phase en réflexion n'est donc usuellement disponible que sur les microscopes de recherche.

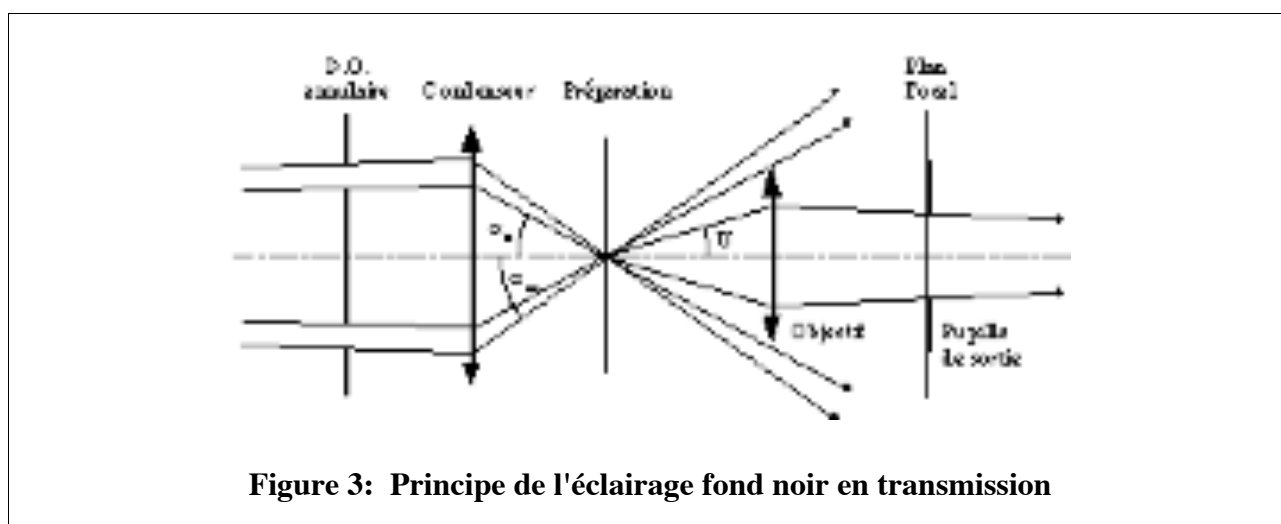
4. Fond noir

a. Description de la méthode

L'éclairage de la préparation à observer est réalisé uniquement par des rayons très inclinés par rapport à l'axe du système optique compris entre deux angles limites α_m et α_M ($0 < \alpha_m < \alpha_M$). Dans l'espace des directions ces rayons forment donc une sorte de nappe conique. Ceci est réalisé en introduisant une obscuration centrale dans le plan du diaphragme d'ouverture de l'éclairage Köhler. L'angle α_m est choisi de manière à dépasser l'angle maximal d'acceptance de l'objectif de

microscope utilisé, c'est à dire que $n \cdot \sin(\alpha_m) > ON_{obj} = n \cdot \sin(U)$ où n est l'indice de réfraction du milieu objet de l'objectif (voir la figure 3). Si la préparation observée est uniforme, aucune lumière ne sort de l'objectif: le fond est donc noir. Par contre, s'il y a de petits objets, ceux-ci vont diffracter la lumière dans toutes les directions et ils seront donc vus dans l'image finale sous forme de traces lumineuses sur un fond très sombre. Cette méthode fonctionne tant pour des objets de phase que pour des objets d'amplitude ou des objets mixtes. En terme de filtrage des fréquences spatiales, cette méthode revient à faire une sorte de filtrage passe-haut de l'objet (ou en fait un filtrage passe-bande si on prend en compte la limite supérieure de l'objectif). La description mathématique précise de ce filtrage est laissée en exercice au lecteur.

Notez que pour les objectifs à immersion dont les ouvertures numériques dépassent couramment 1,25, le condenseur d'éclairage fond noir doit être particulièrement performant puisque l'éclairage doit être compris entre des ouvertures numériques de 1,3 et 1,4! De telles caractéristiques imposent en particulier que le condenseur soit à immersion.



b. Microscopie en transmission

La mise en œuvre du fond noir en transmission sur le microscope Olympus BX 50 est très similaire à celle du contraste de phase. Il faut placer le selecteur **Ct1** du condenseur sur la position 5 [DFA –'Dark Field Aperture'] et impérativement ouvrir à fond le diaphragme d'ouverture à iris en plaçant la molette **Kt2** sur 0.9. Le condenseur universel utilisé ayant une ouverture numérique maximale de 0,9, et compte tenu de la taille de l'obscurisation centrale de l'éclairage Köhler (du module 'DFA'), il n'est possible de travailler en fond noir qu'avec des objectifs d'ouverture numérique inférieure ou égale à 0,75, ce qui limite la mise en œuvre du fond noir aux objectifs de grandissement inférieur ou égal à $40\times$.

Comparez les observations fond clair, contraste de phase et fond noir sur différents objets.

c. Microscopie en réflexion [POUR INFORMATION]

Il est également possible de travailler en fond noir sur les objets opaques observés par réflexion. Ce mode de fonctionnement est même très souvent utilisé en contrôle métallurgique ou pour l'observation des circuits intégrés microélectroniques. L'éclairage à travers l'objectif complique toutefois sérieusement la méthode. Un objectif métallographique pour fond noir est en fait constitué d'un objectif métallographique standard entouré d'une optique annulaire permettant l'éclairage oblique. La lame semi-réfléchissante du bloc illuminateur (cf. Fig.2) est par ailleurs remplacée par un miroir annulaire.

De tels objectifs sont commercialisés par Olympus pour le microscope BX 50. Leur diamètre supérieur à celui des objectifs standard impose l'utilisation d'une tourelle revolver spécifique. Nous ne disposons pas pour l'instant de ce matériel au service des TP.

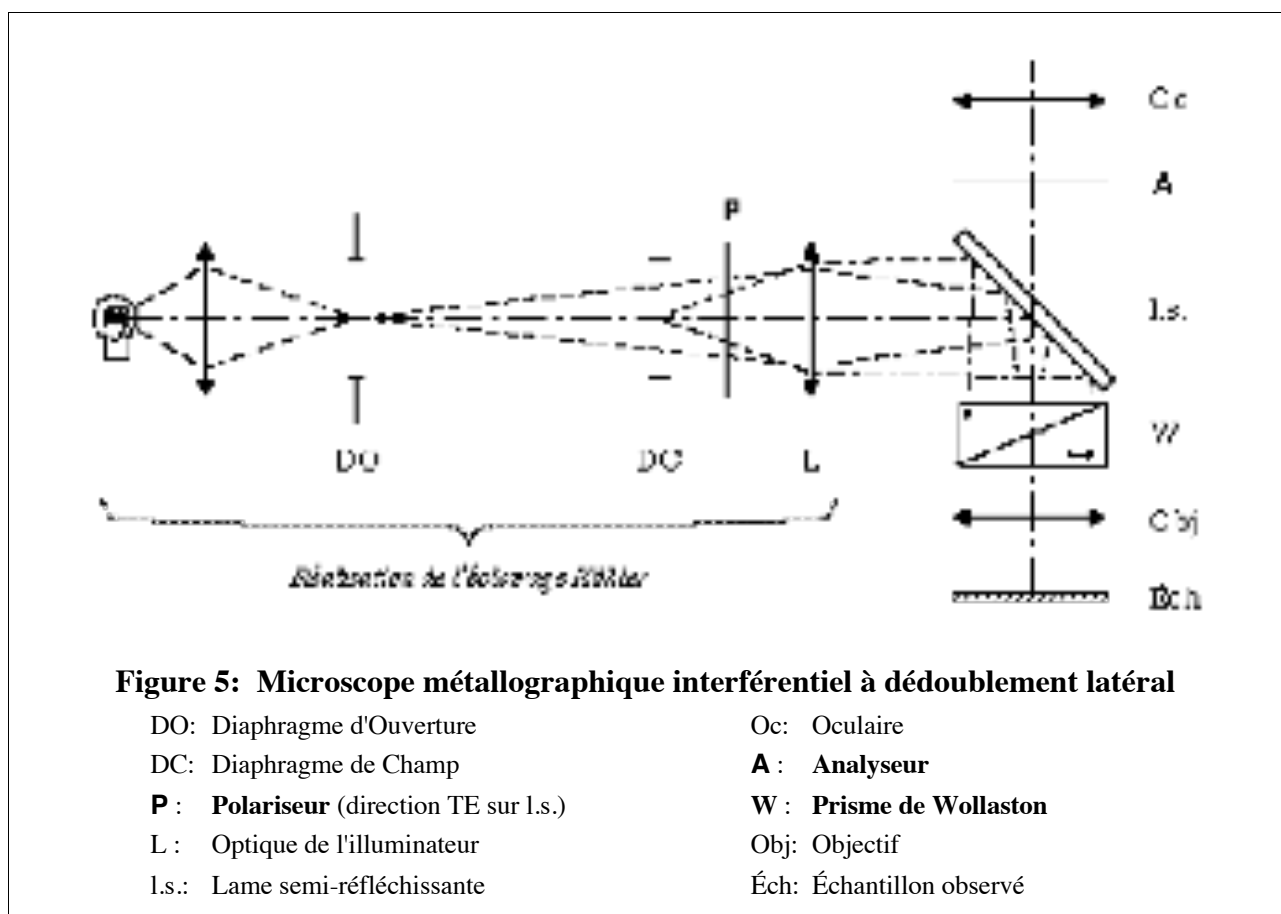
V. Mise en évidence des objets de phase par interférométrie

1. Généralités

L'interférométrie est une méthode classique de mise en évidence des défauts de phase d'un front d'onde. La plupart des schémas d'interféromètres "macroscopiques" peuvent être transposés à la microscopie. C'est entre autres le cas des interféromètres de Mach-Zehnder, Michelson, Fabry-Pérot, Jamin,[#] ... Deux grandes classes d'interféromètres sont à distinguer en microscopie. L'une correspond à l'*interférométrie normale* où l'on compare deux fronts d'onde différents, l'un servant en général de référence (c'est le cas des méthodes de Michelson-Linnik, Watson, Mirau). Elle a une diffusion commerciale relativement restreinte et nous ne l'étudierons pas dans ce TP. La seconde classe correspond à l'*interférométrie différentielle* par dédoublement longitudinal ou latéral de front d'onde. Nous nous restreindrons dans ce TP à l'interférométrie différentielle par dédoublement latéral qui dans sa version *contraste interférentiel différentiel Nomarski*[□] est extrêmement répandu.

[#] Les microscopistes appellent souvent ces interféromètres du nom du physicien qui l'a adapté à la microscopie. Ainsi on parle de dispositif 'Michelson-Linnik', 'Mirau' (Michelson), 'Watson' (Michelson), 'Tolansky' (Fabry-Pérot), 'Jamin-Lebedeff', ... Voir la référence [Roblin 87] pour les détails de ces adaptations.

[□] Georges NOMARSKI est un chercheur de l'I.O.T.A. en retraite. Il a déposé pendant sa carrière de très nombreux brevets (ANVAR/CNRS) dont celui du contraste interférentiel différentiel (CID).



2. Interféromètre à large dédoublement

Cet instrument est basé sur un prisme biréfringent de Wollaston travaillant entre polariseur et analyseur croisés. Son schéma de principe est donné figure 5 [Nomarski 55].

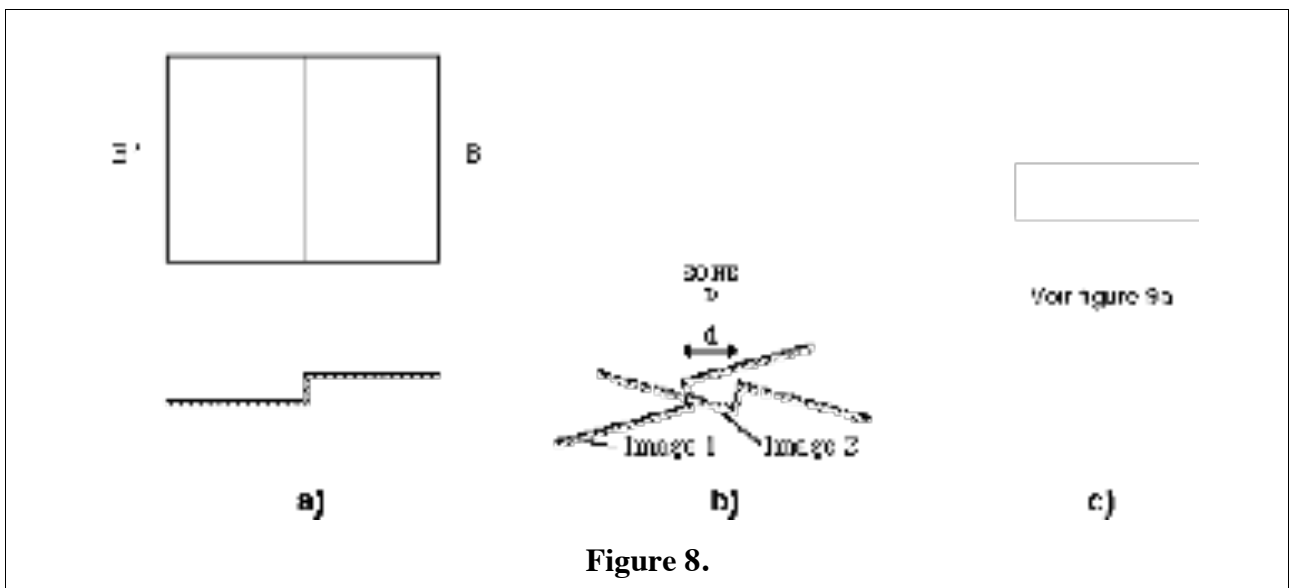
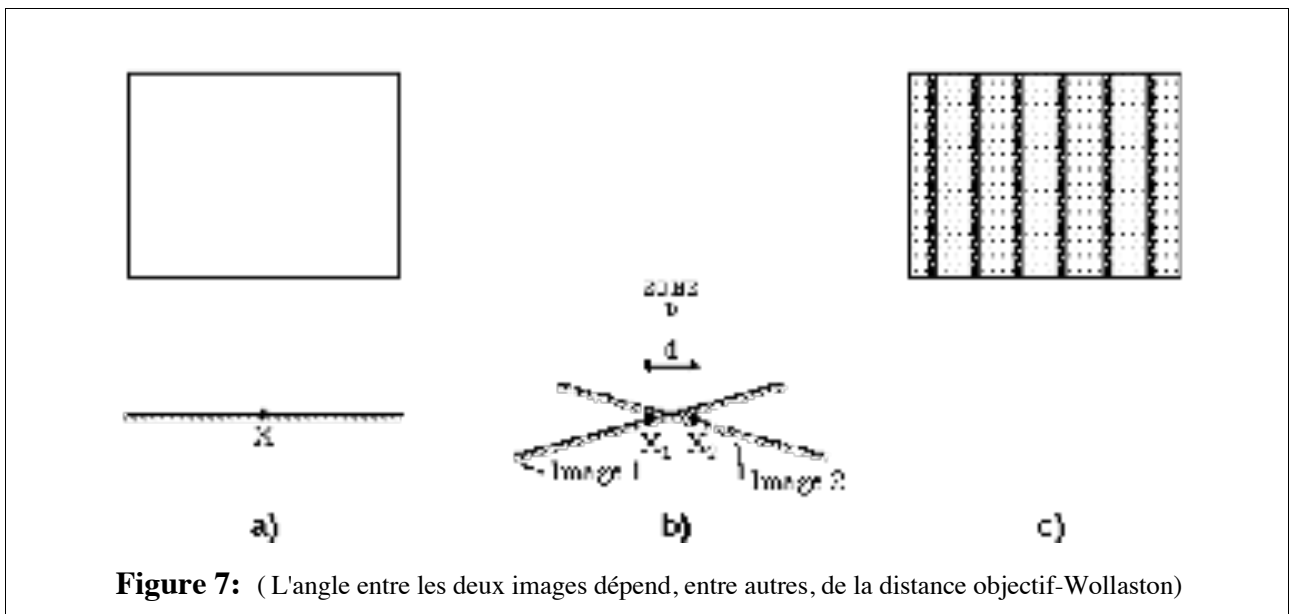
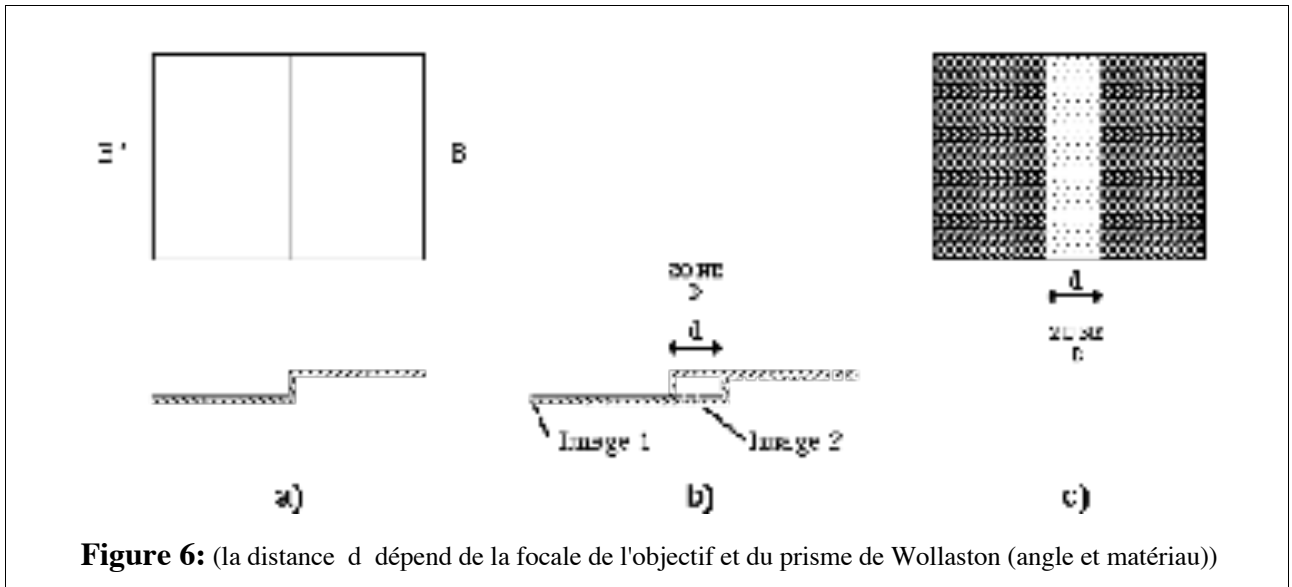
Le prisme de Wollaston donne deux images distinctes et de polarisations orthogonales, d'un même objet. Grâce au polariseur et à l'analyseur il est possible de faire interférer ces deux images et ainsi d'obtenir des informations sur l'objet observé. Considérons comme objet un miroir comportant une marche (Figure 6a):

Σ Si le Wollaston est au foyer de l'objectif Obj, celui-ci donne deux images décalées par une simple translation (Figures 10a et 6b). L'interférence de ces deux images va donner (entre polariseur et analyseur croisés) une image constituée de trois zones "à teinte plate" (deux noires, encadrant une bande étroite en général plus lumineuse, colorée pour un éclairage en lumière blanche. Cf. Fig. 6c).

Σ Si le Wollaston n'est pas au foyer de l'objectif Obj, les deux images, en plus d'être décalées, sont également inclinées l'une par rapport à l'autre. Ainsi un simple miroir plan (Fig. 7a) donne les deux images représentées Fig. 7b. Lorsque ces deux images interfèrent en lumière monochromatique, elle donne des franges (de coin d'air) équidistantes (Fig. 7c). En lumière blanche, elles donnent un système de franges irisées à frange centrale noire.

Σ Dans les mêmes conditions, le miroir comportant une marche (Fig. 8a) donne les deux images représentées Fig. 8b. Le système de franges est décalé dans la zone D. On peut montrer que la visibilité du décalage des franges est optimale si la marche est à 45° de l'arête du Wollaston (Fig. 9).

Le rapport de la hauteur du saut des franges sur l'interfrange permet de remonter à la hauteur de la marche si l'on connaît la longueur d'onde de travail ($e = \lambda a / 2i$ — méthode de mesure dite “par franges”).



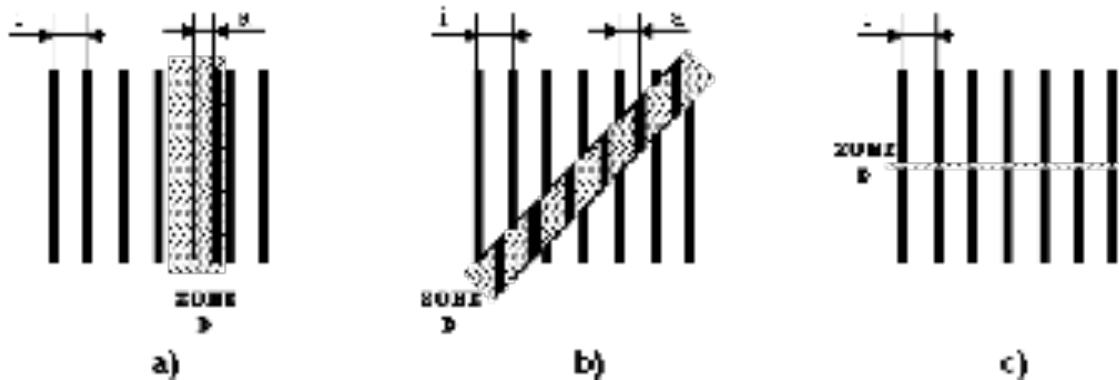


Figure 9: Un échelon réfléchissant vu en lumière monochromatique au microscope interférentiel différentiel à large dédoublement latéral

Le prisme de Wollaston est fixe ; l'échantillon tourne.

- a) Marche de l'échantillon à 0° de l'arête du Wollaston. [OBSERVATION TRÈS DIFFICILE].
 b) Marche de l'échantillon à 45° de l'arête du Wollaston. [OBSERVATION OPTIMALE].
 c) Marche de l'échantillon à 90° de l'arête du Wollaston. [OBSERVATION IMPOSSIBLE].

Remarque: a et i ne changent pas lorsque l'on passe de a) à b) (et même c)).

Nota: sur cette figure, la partie grisée NE représente PAS un assombrissement localisé de l'image observée, mais seulement une indication "logique" de la position de la ZONE D.

3. Contraste Interférentiel Différentiel (CID) – Brevet Nomarski

a. Description

L'interférométrie différentielle par dédoublement latéral 'avec franges', telle que décrite dans le paragraphe précédent, est assez peu usitée de nos jours en microscopie au même titre que l'interférométrie normale. Par contre l'interférométrie différentielle en teinte plate (cf. Fig. 6) avec un dédoublement latéral (d) inférieur à la limite de séparation de l'objectif est très utilisée car elle donne une image de haute résolution dont l'intensité locale est reliée à la pente du front d'onde (dérivée partielle selon la direction du dédoublement) beaucoup plus facile à lire (les images ainsi obtenues ressemblent à celles d'une surface ondulée observée en éclairage rasant). Cette méthode porte le nom de *contraste interférentiel différentiel* (CID ou DIC pour les anglo-saxons pour 'Differential Interference Contrast'). Elle peut être réalisée avec un prisme de Wollaston d'angle approprié placé au foyer image de l'objectif (Fig. 10a). Cependant, comme il a été souligné dans le paragraphe sur le contraste de phase (§IV.3.b), le foyer image de l'objectif est un endroit d'accès mécanique difficile. Georges NOMARSKI (de l'I.O.T.A.) a eu l'idée de modifier le prisme de Wollaston comme indiqué figure 10b [Nomarski 55]. Cette nouvelle configuration permet d'éloigner le prisme du foyer de l'objectif tout en conservant un fonctionnement identique. Le prisme peut dès lors être monté sur glissière et être facilement inséré ou enlevé. Ce dispositif, connu sous le nom de

CID Nomarski (ou *Nomarski DIC*), a fait l'objet d'un brevet exploité par tous les constructeurs de microscope.

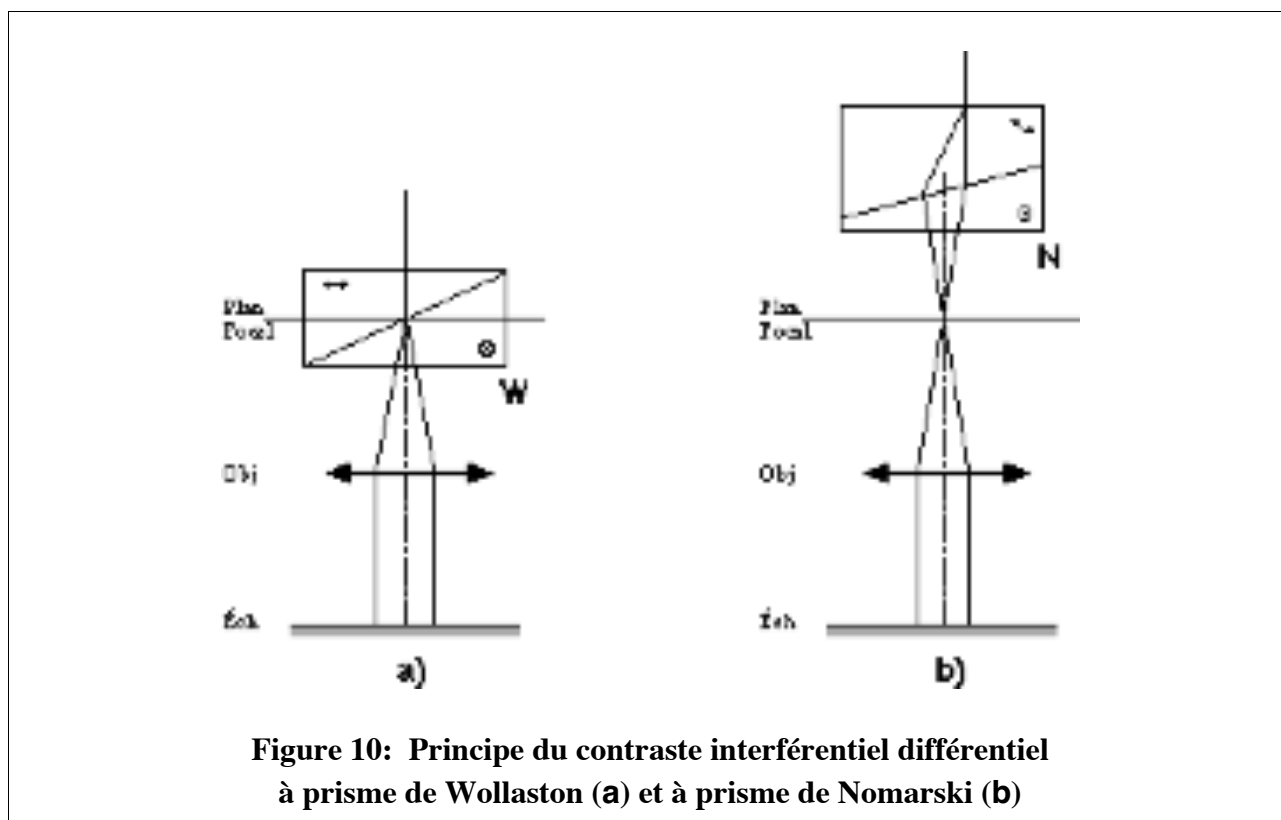


Figure 10: Principe du contraste interférentiel différentiel à prisme de Wollaston (a) et à prisme de Nomarski (b)

b. CID Nomarski en réflexion sur le microscope Olympus BX 50

(Mettre la lampe sur l'illuminateur par réflexion, et le sélecteur **I** sur BF). La mise en œuvre du contraste interférentiel différentiel Nomarski en réflexion sur le microscope Olympus BX 50 est très simple. Il suffit de mettre en service le polariseur et l'analyseur en enfonçant les glissières **Pr** et **A1**, de croiser l'analyseur et le polariseur en tournant la molette **A2** puis de mettre en service le prisme de Nomarski en enfonçant la glissière U-DICR **C1**. ATTENTION: la glissière doit être verrouillée en position tirée ou enfoncée par la vis **C4**, et évidemment déverrouillée pour les changements de position. La tirette **C3** doit par ailleurs être enfoncée en position UMPL pour les objectifs métallographiques (UMPlan) disponibles au TP.

La vis **C2** permet de translater le prisme dans son plan. Un tel déplacement a pour conséquence de briser l'auto-compensation automatique de chemin optique des deux ondes qui interfèrent, lors des traversées aller et retour du prisme biréfringent (Voir figure 11 et le TP de 2^{ème} année 1^{er} semestre « Interférences en lumière polarisée »). On introduit donc dans le chemin optique l'équivalent d'une lame biréfringente $x\lambda$, x étant réglable. Ceci a pour conséquence de faire apparaître des teintes de Newton puisque l'on travaille usuellement en lumière blanche. En plaçant le fond de l'image à la teinte sensible, il est ainsi possible de voir en contraste coloré la moindre variation de pente sur le front d'onde.

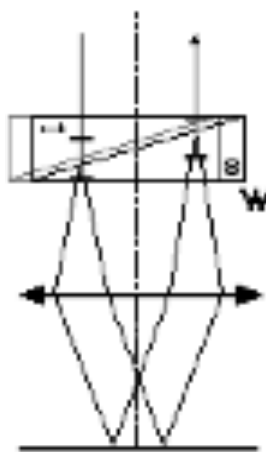


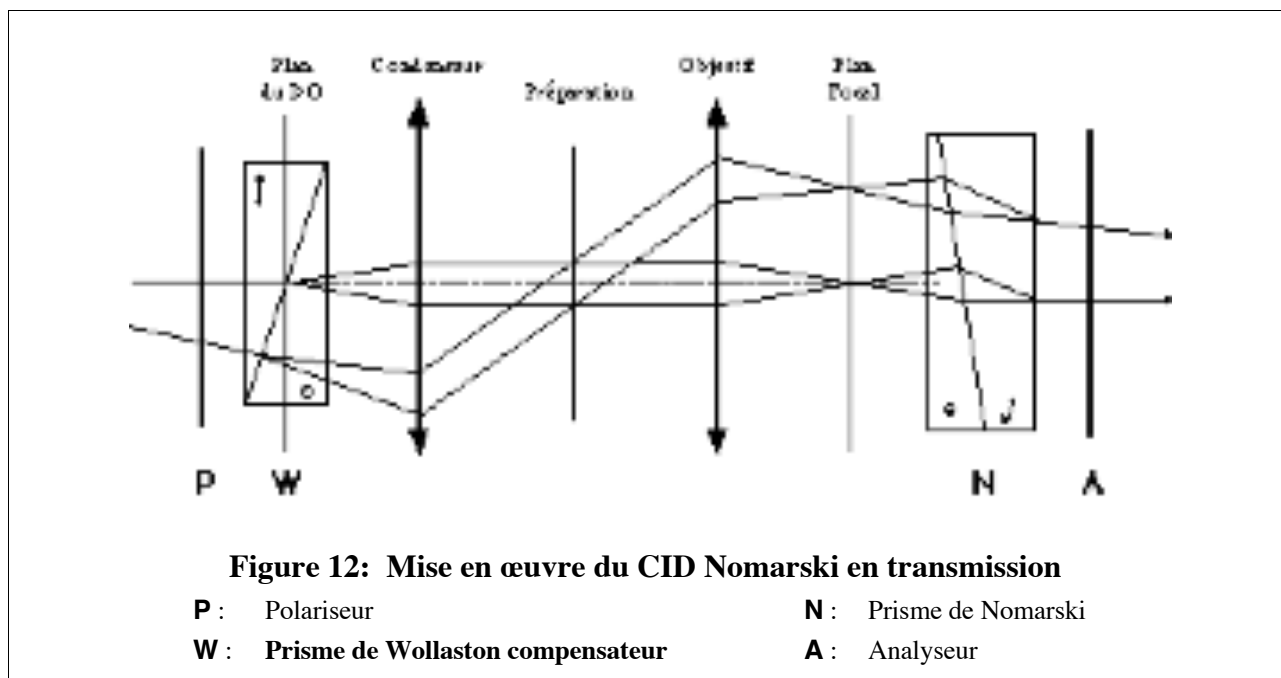
Figure 11: Autocompensation de l'interféromètre en réflexion
(et décompensation volontaire par translation du prisme de Wollaston dans son plan)

Observez différents échantillons, comme la surface d'une coupe de bitume ou des circuits intégrés microélectroniques, en contraste interférentiel différentiel. Jouez sur la décompensation pour observer le contraste coloré. Vérifiez la sensibilité de la méthode à l'orientation des objets. Comparez les images d'un même objet, en CID, en polarisation simple et en fond clair.

c. CID Nomarski en transmission

Il est également possible d'utiliser le contraste interférentiel différentiel en transmission. Cependant, le prisme n'étant dans ce cas traversé qu'une seule fois par la lumière, il est nécessaire d'introduire une compensation externe. Ceci est usuellement réalisé en introduisant un prisme de Wollaston de caractéristique appropriée dans le plan du diaphragme d'ouverture de l'éclairage Köhler (Voir figure 12).

Olympus commercialise à cet effet un ensemble de prismes de Wollaston qui peuvent être insérés dans le barillet du condenseur universel. Le sélecteur Ct1 permet alors de choisir le prisme adapté à l'objectif utilisé. Le prisme de Nomarski est lui unique (mais différent de celui utilisé en CID par réflexion). D'autres constructeurs travaillent avec un prisme de Wollaston unique et des prismes de Nomarski différents pour chaque objectif (ou parfois avec un prisme de Wollaston et un prisme de Nomarski pour chaque objectif).



VI. Mise en évidence des objets fluorescents

Certains objets microscopiques d'apparence banale avec les techniques de contraste précédemment décrites présentent la propriété d'être *fluorescents*, c'est à dire de réémettre sur une bande de longueurs d'onde fixée l'énergie lumineuse reçue sur une certaine plage de longueurs d'onde plus courtes. La mise en évidence de ces émissions par fluorescence s'avère souvent d'un grand intérêt car elle permet de différencier des objets apparemment identiques pour tout autre technique de visualisation. Certaines préparations sont naturellement fluorescentes. C'est souvent le cas des objets d'origine végétale (la chlorophylle, par exemple, est fluorescente). D'autres matériaux, comme certains polymères, présentent également cette propriété. Dans les autres cas l'adjonction de produits spéciaux (les 'fluorochromes') permettent de "marquer" certaines parties spécifiques de la préparation sur lesquelles ils se fixent préférentiellement. De nombreux domaines scientifiques et techniques de pointes, comme l'immunobiologie ou l'industrie des plastiques, font un grand usage de cette technique de visualisation.

L'observation de la fluorescence des objets microscopiques pose toutefois des problèmes délicats qui ne peuvent être surmontés que par la mise en œuvre de méthodes très spécialisées comme *l'épifluorescence* décrite dans le paragraphe suivant.

1. Principe de l'épifluorescence

Un premier problème provient des longueurs d'onde de la source d'excitation qui doivent toujours être courtes si l'on veut utiliser des substances qui fluorescent dans le visible. L'utilisation de sources fournissant une importante quantité de bleu, de violet et même très souvent d'ultraviolet

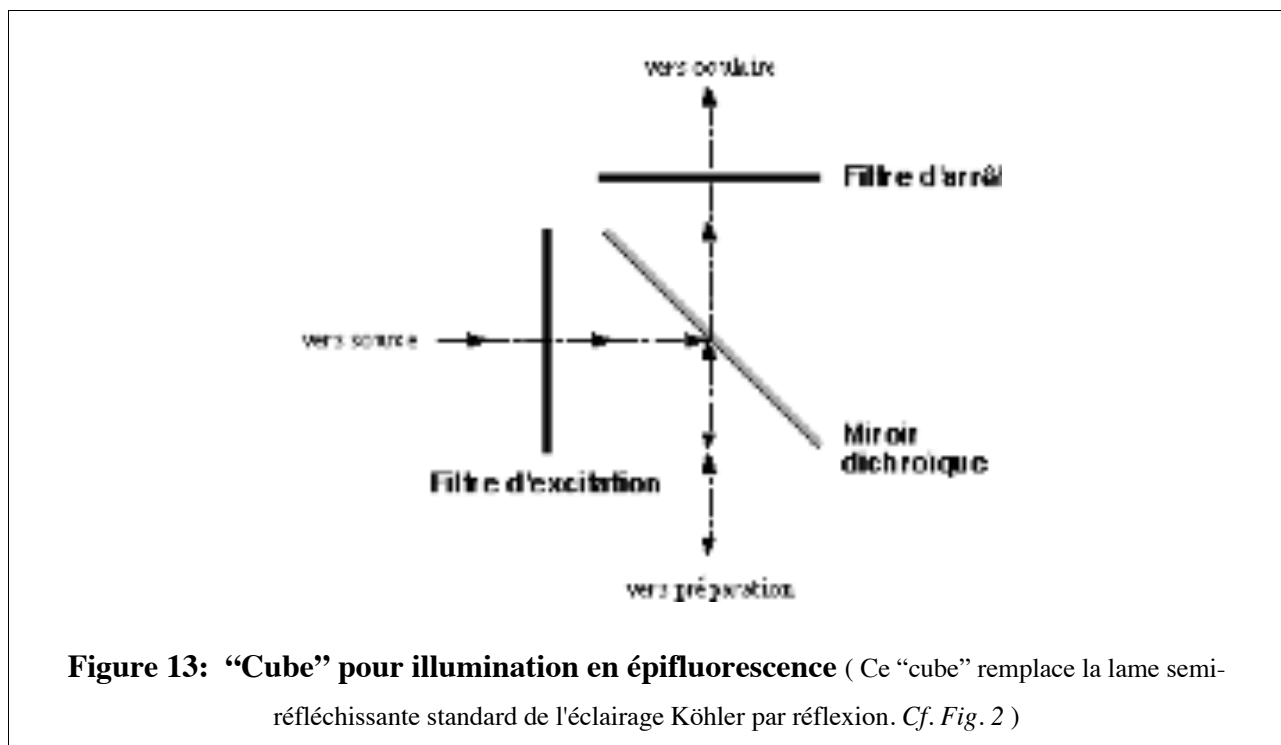
est donc requise. Il faut alors généralement remplacer la simple lampe à incandescence (lampe à iode) par un ‘brûleur’ au Xénon ou un ‘brûleur’ HBO à vapeur de mercure. De surcroît, ces courtes longueurs d'onde imposent l'usage d'optiques en matériaux spéciaux tels la fluorine ou le quartz, les verres optiques standard absorbant fortement dans ce domaine spectral, la plupart étant même opaque dans l'ultraviolet. (Tous les constructeurs proposent de telles optiques incorporant des éléments en fluorine, matériau qui permet par ailleurs d'améliorer la correction chromatique des objectifs en raison de sa dispersion très faible et spéciale. C'est par exemple le cas d'Olympus avec sa série UPlanFI dont nous disposons au TP. Certains constructeurs proposent en plus des objectifs faits avec des matériaux de très grande pureté n'ayant aucune fluorescence propre qui pourrait voiler les images).

Le second et principal problème de la détection de la fluorescence des objets microscopiques provient du très faible rendement énergétique de ce mécanisme de conversion de longueur d'onde de flux lumineux. Les flux que l'on veut détecter sont extrêmement faibles alors même que l'éclairage, et sa diffusion standard par la préparation, sont violents. Pour rendre l'observation possible il faut amener le rapport signal sur bruit à un niveau acceptable. Pour cela on met usuellement à profit la séparation spectrale de l'excitation et du signal utiles qu'il est donc possible de séparer par des filtrages appropriés.

Une méthode permettant de surmonter les difficultés précédemment évoquées est l'*épifluorescence* (du grec ‘epi’ (επι) — *sur, par-dessus* — et fluorescence): la préparation est éclairée par le dessus avec un illuminateur de type métallographique et l'observation de la fluorescence est effectuée dans une configuration de type microscopie par réflexion.

Un des avantages de ce “rétro-éclairage” provient du fait que les préparations observées sont usuellement plus transparentes que réfléchissantes. La lumière d'excitation réfléchiée et rétro-diffusée, qui forme ici le flux lumineux parasite à éliminer, est donc nettement plus faible que la lumière transmise et diffusée vers l'avant qui formerait le flux parasite dans une configuration d'éclairage en ligne. Comme l'émission par fluorescence est un phénomène usuellement isotrope, le signal utile ne dépend pas du sens de l'éclairage, et le rapport signal sur bruit est donc nettement meilleur en épiscopie. Cet avantage est encore renforcé si l'on prend en compte la traversée de la préparation. Dans un cas l'excitation ne doit traverser que la lamelle couvre objet (0,17 mm), qui peut fort utilement être en quartz (ou même absente) si l'on travaille avec de l'UV, alors que dans l'autre cas elle doit traverser la lame porte objet (~1 mm) quasiment toujours en verre.

Un deuxième avantage de la configuration épiscopique réside dans la possibilité de réaliser un filtrage spectral efficace de l'excitation et du signal utile au niveau du bloc illuminateur. Pour travailler en épifluorescence on remplace la lame semi-réfléchissante de l'éclairage Köhler par réflexion (voir Fig.2) par un “cube” constitué de deux filtres et d'un miroir dichroïque dont le schéma est donné sur la figure 13 suivante.



Le *filtre d'excitation* sélectionne dans le flux lumineux issu de la source les seules longueurs d'onde appropriées à l'excitation de la fluorescence de l'échantillon. Le *miroir dichroïque* réfléchit les courtes longueurs correspondant à l'excitation et transmet les plus longues longueurs d'onde. Il renforce donc dans un premier temps l'effet du filtre d'excitation. La lumière issue de l'échantillon, qui contient la lumière de fluorescence et la lumière parasite de rétro-diffusion de l'excitation, frappe le miroir dichroïque. La fluorescence est transmise avec très peu de pertes alors que la majeure partie de la lumière parasite est réfléchi. Le faisceau lumineux atteint ensuite le *filtre d'arrêt* qui, par définition, bloque la lumière d'excitation parasite résiduelle et laisse passer la fluorescence. Avec des filtres et des miroirs de grande qualité, cette disposition permet d'obtenir d'excellents résultats avec une mise en œuvre très simple et très sûre pour l'utilisateur. Les constructeurs proposent en général de très nombreuses combinaisons de filtres et de miroirs dichroïques adaptées aux substances et fluorochromes couramment utilisés (Olympus propose par exemple plus d'une quinzaine de cubes d'épifluorescence pour le microscope BX 50).

L'épifluorescence possède également l'avantage de permettre l'utilisation conjointe de la lumière transmise. Les images obtenues en fluorescence sont en effet généralement constituées de petites zones émissives disséminées dans un champ sombre. Il est dans ces conditions très difficile d'identifier les objets à l'origine de la fluorescence. C'est pourquoi, il est utile de pouvoir simultanément observer la préparation en transmission, si possible en contraste de phase ou en contraste interférentiel. (*Remarque: la réalisation d'observations mixtes ne pose aucun problème sur le microscope Olympus BX 50. Cependant, comme nous ne disposons pour l'instant que d'une seule lampe sur le microscope des TP, vous ne pourrez pas en effectuer*).

2. Mise en œuvre et observations

La mise en œuvre est très simple. Mettez hors service les polariseurs et le prisme de contraste interférentiel. Placez alors le sélecteur 1 sur la position **WB** ('Wide Blue' – Cube d'épifluorescence ayant un filtre d'excitation à **large bande bleue** [450-480 nm], un miroir dichroïque ayant sa longueur d'onde de coupure à 500 nm et un filtre d'arrêt passe-haut λ ayant sa longueur d'onde de coupure à 515 nm. L'excitation est compatible avec une source standard à lampe halogène). Tous les autres réglages sont identiques à ceux d'une observation fond clair par réflexion.

Observez les préparations de spécimens végétaux ou un papier coloré avec des feutres fluorescents de différentes couleurs.

VII. Conclusion

Cette séance de TP vous a permis de manipuler un microscope haut de gamme et d'observer la grande qualité d'image que ses optiques permettent d'obtenir. Elle vous a également introduit dans le monde très riche des techniques de contraste en microscopie, tant du point de vue de l'observateur que du physicien concerné par les principes sous-jacents des méthodes utilisées. Ce TP vous a ainsi donné des bases solides pour utiliser ultérieurement avec profit et compétence ce fabuleux outil qu'est le microscope moderne.

L'auteur de ce texte souhaite par ailleurs profiter de ce dernier paragraphe pour vivement remercier Monsieur Gérard ROBLIN, responsable du groupe de recherche « Microscopie et micro-mesures » de l'I.O.T.A., pour les nombreuses heures de discussion qu'il lui a accordées et l'aide précieuse que son article de l'Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur sur la microscopie [Roblin 87], cité à de très nombreuses reprises, lui a apportée.

H.S.

BIBLIOGRAPHIE

- [Bennett 51] A. H. BENNETT, H. OSTERBERG, H. JUPNIK, O.W. RICHARDS. *Phase microscopy - Principles and applications*. JOHN WILEY & SONS, 1951.
- [Born 80] M. BORN, E. WOLF. *Principles of Optics* 6th Ed., PERGAMON PRESS, 1980.
Excellent ouvrage présentant, entre autres, la théorie de la cohérence partielle.
- [Bruhat 92] G. BRUHAT. *Optique* 6^{ème} Éd. par A. Kastler. Réimpression complétée par P. Bouchareine, MASSON, 1992.
- [Françon 50] M. FRANÇON. *Le contraste de phase en optique et en microscopie*. Édition de la revue d'optique théorique et instrumentale, 1950.
- [Françon 54] M. FRANÇON. *Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel*. Édition du CNRS, 1954.
- [Françon 72] M. FRANÇON. *OPTIQUE Formation et traitement des images* MASSON, 1972
- [Goodman 72] J. W. GOODMAN. *Introduction à l'optique de Fourier et à l'holographie*. MASSON, 1972.
(Traduction française de *Introduction to Fourier optics*. MCGRAW-HILL, 1968).
- [Köhler 1893] A. KÖHLER « Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke » Z. Wiss. Mikr, **67H4**, 1893, p.244++
- [Lichtman 94] J. LICHTMAN. « La microscopie confocale » POUR LA SCIENCE, n°**204**, 1994 (octobre).
- [Lowenthal 67] S. LOWENTHAL, Y. BELVAUX. « Progrès récents en optique cohérente: filtrage des fréquences spatiales, holographie » Revue d'optique théorique et instrumentale, **46**(1), 1967, p.1-64.
- [Maréchal 60] A. MARÉCHAL, M. FRANÇON. *Diffraction - Structure des images*. Édition de la revue d'optique théorique et instrumentale, 1960.
- [Nomarski 55] G. NOMARSKI, A.R. WEIL « Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées » Revue de Métallurgie, **52**, 1955.
Décrit le fonctionnement du microscope interférentiel différentiel à dédoublement latéral à prisme biréfringent.
- [Roblin 87] G. ROBLIN. « Microscopie. Micromesures » Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur, **R6710++**, 1987 + actualisation 1993.
Présentation exhaustive et d'une grande clarté de la microscopie moderne. L'actualisation concerne la microscopie confocale à balayage laser et la microscopie optique en champ proche (parfois improprement appelée 'microscopie par effet tunnel optique').
- [Wastiaux 94] G. WASTIAUX. *La microscopie optique moderne*. TEC&DOC, Lavoisier, 1994
Ouvrage de vulgarisation très complet.

ANNEXE

Liste des réglages du microscope Olympus BX 50

Tête trinoculaire:

- V** Tirette permettant le choix du partage de la lumière entre le binoculaire et le tube photo (3 positions).
- Oc1** (À gauche) Balance gauche/droite de mise au point du binoculaire.
- Oc2** Mise au point sur le réticule pour l'oculaire micrométrique.
 - + Réglage de l'écartement interpupillaire du binoculaire.
 - + Abaissement ou déploiement des bonnettes caoutchoutées suivant que l'on porte ou non des lunettes correctrices.

Illuminateur par réflexion et attachement haut:

- Kr1** (D.O.) Tirette réglant le diamètre du diaphragme d'ouverture. [AS – 'Aperture Stop'].
- Kr2** (D.C.) Tirette réglant le diamètre du diaphragme de champ. [FS – 'Field Stop'].
- Kr3&3'** Vis réglant le centrage du diaphragme d'ouverture.
- Kr4&4'** Vis réglant le centrage du diaphragme de champ.
- Kr5** Tirette commandant l'obturateur de l'éclairage par réflexion.
- Pr** Glissière du polariseur de l'éclairage par réflexion. (Poussée: en service – Tirée: hors service).
- A1** Glissière de l'analyseur (pour éclairage réfléchi et transmis). (Poussée: en service – Tirée: hors service).
- A2** Molette permettant l'orientation de l'analyseur.
- I** Sélecteur de mode d'illumination (BF: Fond clair par réflexion – WB: Épifluorescence "bleue large bande" – Rien: transmission).

Barillet porte objectifs:

- C1** Glissière du prisme de contraste interférentiel différentiel. (Poussée: en service – Tirée: hors service).
- C2** Vis réglant la coloration du contraste interférentiel différentiel.
- C3** Tirette d'adaptation aux différents objectifs. (Doit être en position poussée pour les objectifs UMPlan).
- C4** Vis de blocage du prisme de contraste interférentiel différentiel.
- B** Molette pour rotation de la tourelle-révoluer d'objectifs.

Statif et platine:

- G1** Potentiomètre de réglage de la puissance d'éclairage.
- G2** Bouton de sélection d'éclairage à température de couleur fixée (pour microphotographie couleur).
- G3** Double bouton concentrique de déplacement XY de la préparation.
- G4** Porte préparation.
- G5** Vis de blocage de la rotation (dégauchissage) de la platine.

Mise au point:

- M1** Gros bouton de mise au point rapide.
- M2** Petit bouton de mise au point fine.
- M3** Bague d'ajustement du freinage de la mise au point.
- M4'** (À gauche) Manette permettant la mise en place d'une butée personnalisée de mise au point.

Illuminateur de l'éclairage Köhler par transmission:

- Kt1** (D.C.) Molette de réglage du diamètre du diaphragme de champ.
- Kt6** Manette de mise en ou hors service d'un filtre neutre 25%. [ND25]
- Kt7** Manette de mise en ou hors service d'un filtre neutre 6%. [ND6]
- Kt8** Manette de mise en ou hors service d'un filtre bleu de conversion lumière artificielle \varnothing lumière du jour. [LBD]

Condenseur:

- Kt2** (D.O.) Molette de réglage du diamètre du diaphragme d'ouverture.
- Kt3** Bouton de mise au point du condenseur.
- Kt4&4'** Vis réglant le centrage du condenseur.
- Kt5** Manette de mise en ou hors service d'une optique amovible. (Doit être en service pour les objectifs de $G_y \geq 4\infty$).
- Ct1** Sélecteur de type de contraste en transmission. (UBF: fond clair – Ph2: contraste de phase ($n^{\circ}2$) – DFA: fond noir).
- Ct2** Deux vis servant au centrage de l'anneau de phase. (Position de stockage).
- S1** ✗ Vis de blocage/débloccage du condenseur pour démontage. *Usage interdit.*
- S2** ✗ Vis de fixation du couvercle du condenseur. *Usage interdit.*
- Pt1** Molette d'orientation du polariseur pour éclairage par transmission.
- Pt2** Vis de blocage du polariseur pour éclairage par transmission.
- + Le polariseur est mis en/hors service par rotation de 120° du support de **Pt1** autour de l'axe du condenseur.
(Le polariseur est en service lorsque **Pt1** **Pt2** sont à l'arrière du condenseur).

