

Annexe : LE MICROSCOPE

(d'après un texte de TP de Hervé SAUER)

version de mai 2004

I. Introduction

Comme l'indique son étymologie (micro- [μικρός *petit*] et -scope [σκοπεῖν *observer*]), le **microscope** est un instrument permettant l'observation visuelle de petits objets ou détails d'objets proches de l'observateur, usuellement indiscernables à l'œil nu même lorsqu'ils sont placés au *ponctum proximum*. Ainsi, à l'instar de la loupe, une des propriétés principales de cet appareil est donc son **grossissement**, c'est à dire son aptitude à fournir une image agrandie angulairement de l'objet étudié. Cependant, ce paramètre ne suffit pas à lui seul à caractériser les performances du dispositif. Il faut en effet que cette propriété s'applique à tous les détails de l'objet, y compris les plus fins. La seconde propriété clef du microscope est donc son **pouvoir de résolution** ou **pouvoir de séparation**. Ce dernier point a de très importantes conséquences pratiques puisqu'il implique de travailler avec des optiques de **grande ouverture numérique limitées par la diffraction** (*i.e. sans aberration*). Les bons microscopes sont donc obligatoirement des systèmes optiques et mécaniques complexes de haute qualité, relativement fragiles et de prix élevé.

Bien que la microscopie optique soit une science ancienne ayant pris son essor au XVI^{ème} siècle, elle n'en demeure pas moins une technologie de pointe toujours active comme le démontre le développement récent du microscope confocal à balayage laser et du microscope optique en champ proche (parfois improprement appelé "microscope tunnel optique") [Roblin 99] [Lichtman 94].

II. Structure du microscope

Un système optique d'observation visuelle de petits objets proches doit donc réaliser, d'un objet réel à distance finie, une image virtuelle, si possible à l'infini pour un observateur emmétrope, de taille angulaire supérieure à celle sous laquelle l'objet est vu à l'œil nu au *ponctum proximum*. Le système le plus simple vérifiant ce cahier des charges est donné figure 1. Il est constitué d'une unique lentille mince dont le plan focal objet coïncide avec l'objet à observer. Le grossissement est supérieur à 1 et d'autant plus grand que la focale de la lentille est plus courte que la distance objet-œil au *ponctum proximum*. C'est le principe de fonctionnement de la **loupe**.

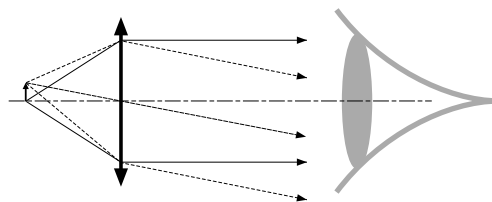
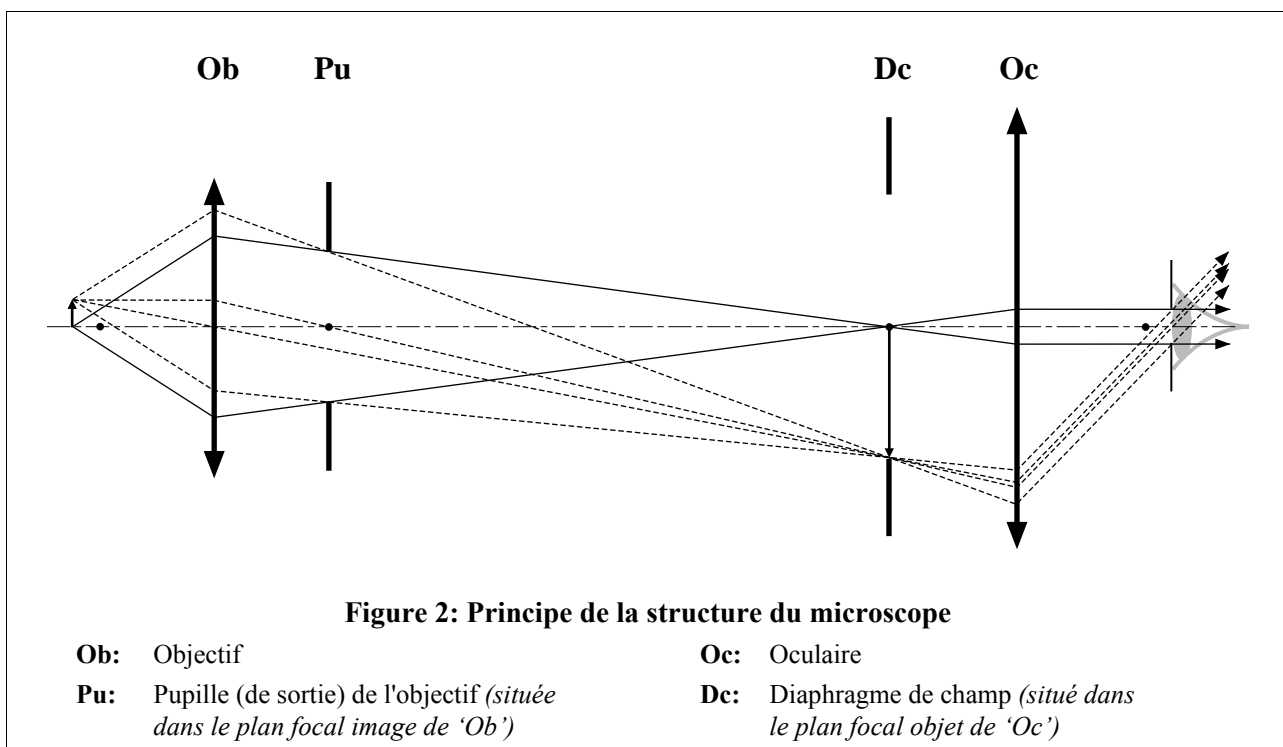


Figure 1: Principe de la loupe

Ce système, même amélioré en remplaçant la lentille simple par un singlet ou un doublet à surfaces asphériques, possède de très importantes limitations de champ, dues aux aberrations de champ qui ne peuvent être corrigées, et au vignettage introduit par la pupille d'œil qui est lucarne de champ. Les grossissements et ouvertures numériques pouvant être utilisés en pratique sont peu élevés.

Une solution aux problèmes précédemment évoqués est donnée par le schéma de la figure 2. Ce système composite, constitué d'un objectif et d'un oculaire, permet de résoudre le problème des conjugaisons pupillaires (suppression du vignettage par la pupille d'œil qui peut ici être placée sur la pupille de sortie du microscope) et celui de la correction des aberrations de champ (système global "épais" constitué de plusieurs lentilles ou multipléts). Cette structure est universellement utilisée en microscopie depuis plus d'un siècle maintenant.

Son fonctionnement est le suivant: l'objectif 'Ob' donne de l'objet une image réelle agrandie. Cette image intermédiaire est reprise par l'oculaire 'Oc' qui en donne une image virtuelle à l'infini finalement observée par l'œil. Le grossissement global du microscope est donc le produit du *grossissement de l'oculaire* par le *grandissement de l'objectif*. Par ailleurs, la pupille de l'œil est normalement placée sur la pupille de sortie du microscope qui est ici l'image par l'oculaire de la pupille de sortie de l'objectif. La pupille de sortie de l'objectif est, quant à elle, définie par le diaphragme 'Pu' et est toujours située dans le plan focal image de l'objectif 'Ob'. Ce diaphragme, pupille de l'objectif et également pupille globale du microscope, contrôle par définition le flux de lumière entrant et donc l'ouverture numérique objet du système. De ce fait, on l'appelle parfois 'diaphragme d'ouverture'. Il est à noter que la pupille d'entrée de l'objectif est rejetée à l'infini (système **télécentrique** objet). Ceci rend les différents points du champ équivalents du point de vue de leur luminance utile (i.e. la luminance moyenne sur l'angle solide des rayons transmis par le microscope). Ce point est également important lorsque l'on analyse le microscope associé à son éclairage (voir le paragraphe §III). Enfin, le diaphragme 'Dc' (diaphragme dit 'de champ'), dans le plan focal objet de l'oculaire, limite de manière nette le champ observable.



III. Éclairage

1. Rôle et propriétés

Une observation de qualité d'un objet ne peut se concevoir que si celui-ci est “bien” éclairé.

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

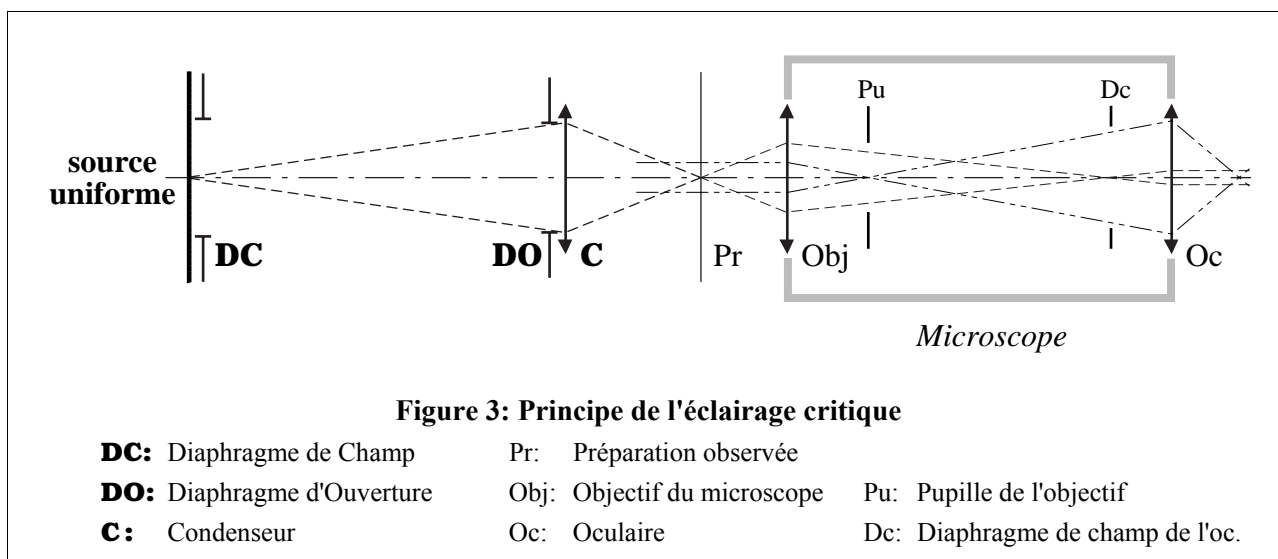
- ◆ **Uniformité de l'éclairage.** {Pour voir l'objet et non les défauts de l'éclairage}
- ◆ **Limitation de la zone éclairée au champ vu dans le microscope.** {Pour limiter la lumière parasite}
- ◆ **Contrôle de l'ouverture numérique (ou autrement dit de la cohérence partielle) de l'éclairage.** {Cf. §IV.2}
- ♣ 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.

Deux méthodes permettent de remplir, plus ou moins complètement et facilement, les conditions précédemment exposées. Il s'agit de *l'éclairage critique* et de *l'éclairage Köhler* [Köhler 1893]. Ces deux méthodes sont décrites dans les paragraphes suivant.

2. L'éclairage critique

On forme sur la préparation à observer, avec une optique annexe (un condenseur), l'image d'une source étendue uniforme très lumineuse (voir figure 3).



On peut noter (dans la version, éventuellement un peu simpliste, de l'éclairage critique présentée) que le diaphragme d'ouverture de l'éclairage n'est pas conjugué de la pupille de l'objectif du microscope. Il en résultera inévitablement un vignettage de l'éclairage et donc une mauvaise uniformité de la luminosité de l'image finale de la préparation. Mais la difficulté principale de réalisation de cet éclairage réside dans la nécessité de disposer d'une source **étendue, très lumineuse et uniforme**. Une classique lampe à incandescence, par exemple, ne respecte absolument pas les prescriptions nécessaires! La source la plus souvent utilisée est la lumière du ciel (si possible couvert d'un voile gris uniforme de stratus). Cette lumière

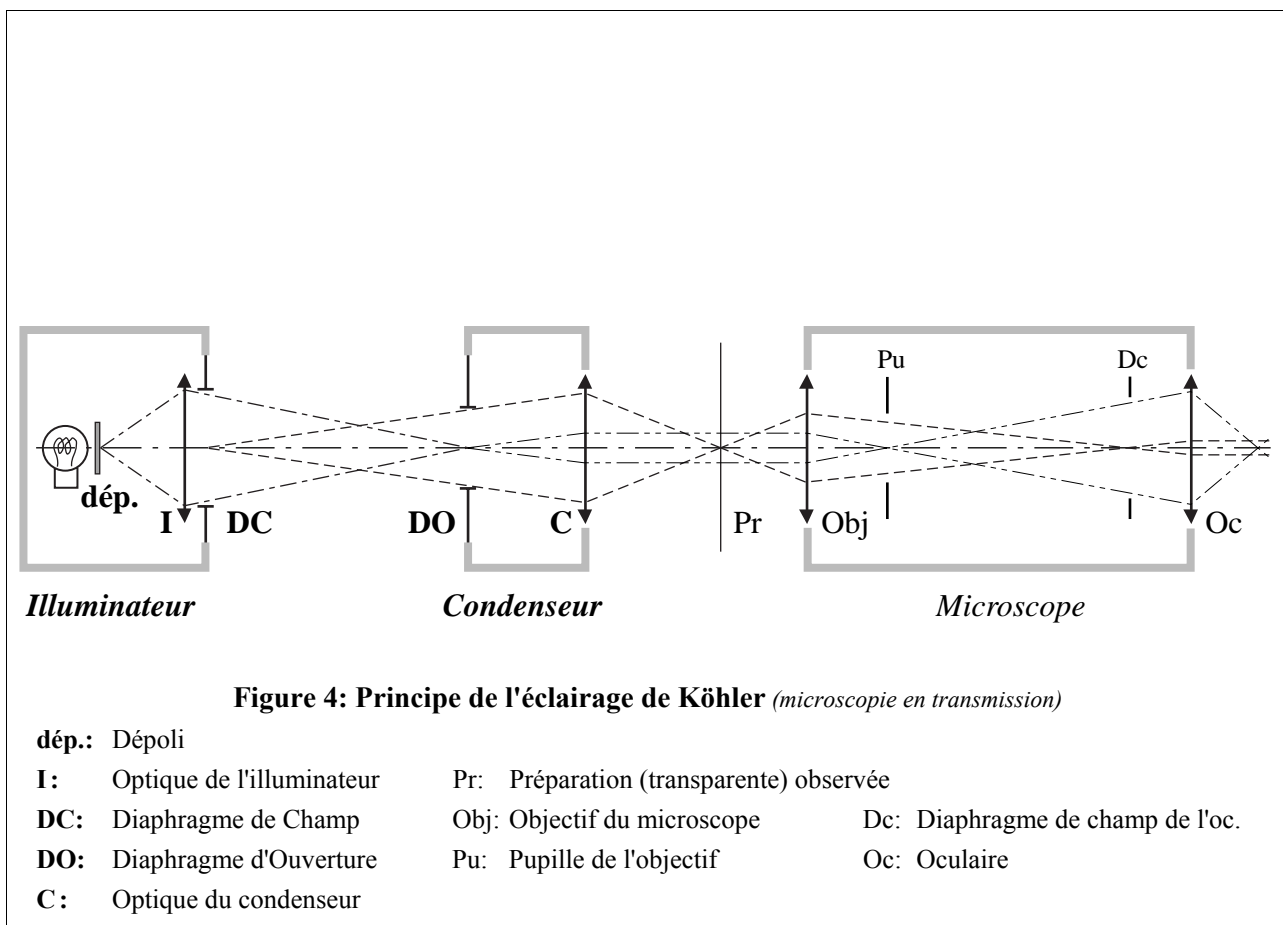
est concentrée sur la préparation à l'aide d'un miroir concave. On travaille alors sans diaphragme de champ ni diaphragme d'ouverture réglables. Il va de soit que les résultats, tributaires de surcroît de la météorologie, ne sont pas extraordinaires et ne peuvent convenir pour des observations de hautes qualités! C'est pourquoi on préfère généralement à l'éclairage critique, l'éclairage de Köhler qui permet l'utilisation d'une source non uniforme

3. L'éclairage de Köhler

Inventé par A. Köhler à la fin du XIX^{ème} siècle [Köhler 1893], il est basé sur les trois conjugaisons suivantes:

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

La figure 4 ci-dessous en donne son schéma de principe avec ses différents éléments et les indications des conjugaisons. Le diaphragme d'ouverture DO est par construction mécanique dans le plan focal objet de l'optique C du condenseur. *La deuxième conjugaison est donc toujours réalisée.*



L'optique I de l'illuminateur est éclairée très uniformément par la lampe et son dépoli, situés quelques centimètres en retrait. L'éclairage de la préparation, par l'image de la lentille I (limitée par le diaphragme de champ DC) formée par l'optique C du condenseur dans le plan de la préparation Pr est donc uniforme. Par contre, l'image du dépoli, de texture et d'éclairage plus ou moins uniformes, est formée dans le plan du diaphragme d'ouverture DO. Ce dernier étant par construction dans le plan focal objet de l'optique C du condenseur, l'image du dépoli est rejetée à l'infini et est donc le plus éloignée possible de la préparation.

Cette configuration possède des propriétés remarquables. Le diaphragme d'ouverture étant dans le plan focal du condenseur, la pupille de sortie du système (DO,C) est donc rejetée à l'infini (système télécentrique image). Ceci signifie que, en sus de recevoir le même éclairement, tous les points de la préparation sont éclairés par le **même** cône de lumière, ce qui, associé au caractère télécentrique objet de l'objectif du microscope, garantit une réponse photométrique identique pour tous les points du champ du microscope, ce qui est très important en pratique et serait difficile à obtenir dans d'autres configurations... De surcroît, l'éclairage Köhler permet de régler, de manière totalement indépendante l'une de l'autre, la taille du champ éclairé sur la préparation[∅] et l'angle du cône de lumière frappant chaque point de la préparation, ou, autrement dit, l'ouverture numérique de l'éclairage^Δ. L'éclairage Köhler assure par ailleurs, par conception même, la conjugaison des plans du diaphragme d'ouverture DO et de la pupille Pu de l'objectif. Il en va de même pour le plan du diaphragme de champ DC de l'éclairage et celui du diaphragme de champ Dc de l'oculaire. Par conséquent, l'éclairage Köhler n'introduit aucun vignettage et l'uniformité de l'illumination du champ observé peut effectivement être obtenue.

Ainsi, à l'exception des modèles de très bas de gamme, l'éclairage Köhler est systématiquement intégré dans le statif de tous les microscopes actuels. Il est souvent partiellement pré-réglé, en particulier en ce qui concerne les centrages. La conjugaison Diaphragme de Champ/Préparation (par translation du condenseur) incombe cependant toujours à l'utilisateur afin de permettre l'observation de préparations réalisées sur des lames d'épaisseurs différentes.

IV. Propriétés d'imagerie du microscope

Comme il a été rappelé dans l'introduction, le rôle premier d'un microscope est d'améliorer la vision de petits objets par un observateur humain. Les deux caractéristiques essentielles de cet instrument sont donc son *grossissement* et sa **limite de résolution**. La nature ondulatoire de la lumière relie cette dernière propriété à l'ouverture numérique (O.N.) de l'objectif. Pour un objectif **limité par la diffraction** (et non par ses défauts ou *aberrations*), la limite de résolution est de l'ordre de λ/a où λ est la longueur d'onde de travail et a son O.N. (voir votre cours de mesure optique et le paragraphe §IV.2 ci-dessous). On utilise donc en microscopie des **objectifs de très forte O.N. limités par la diffraction**. De tels objectifs, qui nécessitent de nombreuses lentilles très précisément positionnées les unes par rapport aux autres, sont

[∅] contrôlé par le diaphragme de champ DC (*Il est souvent utile, pour des problèmes de lumière parasite, de limiter la zone éclairée à celle vue ou même simplement étudiée par le microscopiste*)

^Δ contrôlé par le diaphragme d'ouverture DO (*Ceci règle la quantité de lumière totale reçue mais aussi et surtout la manière dont se forme l'image finale de l'objet observé, par son influence sur la cohérence partielle de l'éclairage ; voir le paragraphe §IV.2 sur la formation des images en éclairage partiellement cohérent*).

relativement fragiles et coûteux. Par ailleurs, pour obtenir les résolutions les plus élevées, il est intéressant de travailler dans un milieu objet d'indice supérieur à 1, comme l'eau ($n \approx 1,333$) ou surtout l'huile d'immersion (huile de cèdre ou huile synthétique, $n \approx 1,517$), afin de pouvoir utiliser des ouvertures numériques supérieures à 1. Ainsi les objectifs de plus fort grandissement ($\times 100$) sont en général des objectifs à immersion (dans l'huile) dont les ouvertures numériques dépassent couramment 1,25.

L'utilisation de tels objectifs, d'ouverture numérique élevée et dépourvus d'aberrations notables, pose quelques problèmes spécifiques que ce paragraphe se propose de vous présenter.

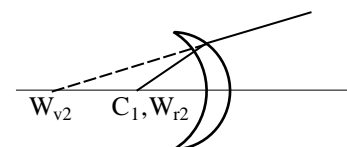
1. Contraintes de l'imagerie sous forte ouverture numérique

Le problème principal de la formation d'image sous forte O.N. provient de l'inclinaison élevée des rayons intervenant. Des O.N. de 0,70, 0,95 (dans l'air) ou 1,30 (dans l'huile d'immersion) conduisent à des rayons extrêmes formant avec l'axe optique de l'objectif des angles de respectivement 45° , 72° et 59° ! On est donc très loin des conditions de Gauss et du domaine d'utilisation du stigmatisme approché. Pour obtenir des images de qualité, il faut impérativement travailler avec des conjugaisons rigoureusement stigmatiques et aplanétiques. Ainsi, il est fait une grande utilisation dans la conception des objectifs de microscope, du centre de courbure et des points de Weierstraß des dioptrés sphériques[◇]. Par conséquent, le couple de points objet/image *optimal* de l'objectif est figé. Par ailleurs, de simples dioptrés plans peuvent avoir une influence considérable sur la qualité d'image comme le montre le paragraphe suivant.

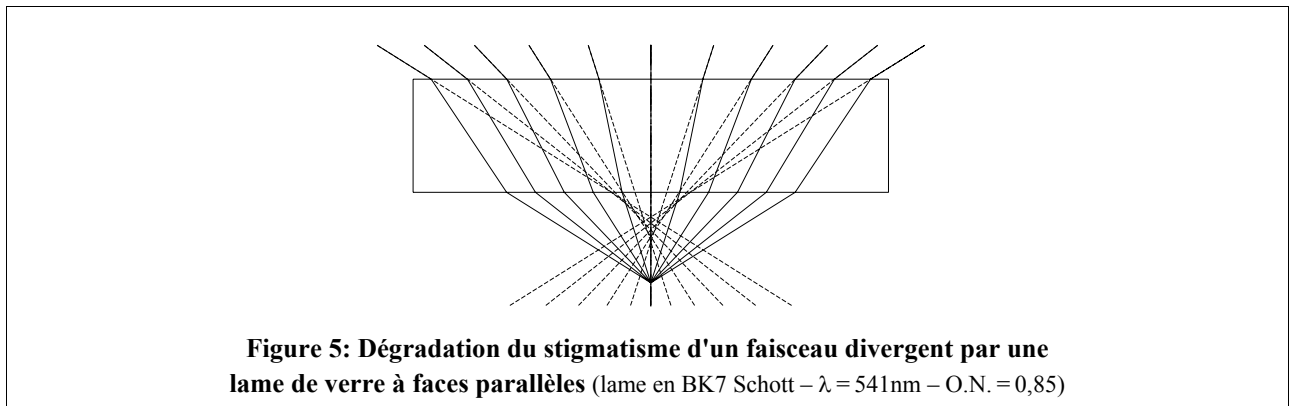
a. Influence de la lamelle couvre objet

La plupart des préparations d'objets microscopiques observées par transmission sont protégées par une fine lame de verre à faces planes et parallèles appelée *lamelle couvre objet*. Cette lamelle, bien qu'ayant une puissance optique nulle, altère cependant les rayons obliques qui la traversent (déplacement latéral). Ce phénomène, d'autant plus important que les rayons sont inclinés, se traduit par une dégradation du stigmatisme comme le montre la figure 5 (introduction d'aberration sphérique principalement).

[◇] La brique de base est le **ménisque aplanétique d'Amici** (voir Figure à droite). L'objet se trouve au centre de courbure du premier dioptré. Son image (superposée à l'objet) est au point de Weierstraß réel du second dioptré qui en donne une image virtuelle agrandie sous une O.N. diminuée.



Plusieurs ménisques de ce type sont associés entre eux (ou avec une lentille fraction de boule) puis complétés par des doublets (pour corriger l'aberration chromatique) travaillant à O.N. ([Roblin 99] ou [Born 80]). Il faut cependant souligner que les objectifs de microscope récents, conçus avec l'aide de puissants logiciels de CAO Optique, ne suivent ces prescriptions qu'en terme de schéma directeur, leurs excellents résultats, *obtenus sur de grands champs*, étant le plus souvent obtenus par de subtiles compensations d'aberrations entre composants (Voir la figure 9 au paragraphe §IV.2.d).



On considère usuellement que la lamelle provoque ainsi une chute perceptible de la qualité de l'image observée dès que l'O.N. de l'objectif dépasse 0,30. Pour des O.N. supérieures à 0,70 la dégradation de l'image est flagrante, voire dramatique.

Il est cependant possible de remédier à ce problème en engendrant dans l'objectif, par une conception judicieuse de celui-ci, une aberration opposée à celle introduite par la lamelle. Il faut bien réaliser qu'un tel objectif donne a contrario une mauvaise image d'une préparation **non** recouverte d'une lamelle. Les constructeurs proposent donc en général deux versions de tous leurs objectifs d'O.N. supérieure à 0.30, l'une, prévue pour travailler avec lamelle couvre objet, l'autre, (plutôt dédiée aux microscopes dit *métallographiques*, i.e. observant des objets opaques éclairés en réflexion à travers l'objectif. Cf. Fig.C2, dans les compléments en fin de fascicule) prévue pour travailler sans lamelle. Une gravure sur la monture permet de différencier les différents modèles (voir le §IV.1.c)

Remarque: L'aberration introduite par la lamelle dépend de son épaisseur et de son indice. La correction introduite par l'objectif n'est donc valable que pour un modèle bien précis de lamelle couvre objet. Un type standard de lamelle a donc été défini (norme ISO TC172-8255). Son épaisseur est de **0,170 mm**, son indice de **1,517** et sa constringence de ~ 64 (verre standard N-BK7 de Schott ou S-BSL7 de Ohara). Les tolérances sur les deux premiers paramètres sont d'autant plus drastiques que l'on envisage de travailler à O.N. élevée. L'épaisseur devrait, par exemple, être correcte à $\pm 5\ \mu\text{m}$ pour travailler sans perte sensible de qualité à O.N. = 0,85. Il est toutefois extrêmement difficile de se procurer de telles lamelles. (Les lamelles disponibles aux TP sont garanties par le fabricant à $\pm 30\ \mu\text{m}$!). C'est pourquoi les objectifs de haute qualité de très grande O.N. disposent d'une bague rotative permettant d'ajuster la correction à l'épaisseur effective de la lamelle utilisée.

Il est possible de faire une observation "quantitative" du phénomène en utilisant comme objet une lame aluminée présentant de minuscules trous dans l'aluminure. Ces trous, illuminés par l'éclairage Köhler, vont servir d'objets lumineux quasi-ponctuels sur fond sombre et permettre ainsi l'observation de la *réponse percutationnelle* de l'objectif. Si l'objectif est parfait et la mise au point précisément réalisée, la réponse percutationnelle est une tache d'Airy. Dans les autres cas, la tache observée et surtout son évolution avec la mise au point renseigne sur la qualité du système. Cette méthode (classique) de mesure des aberrations d'un système optique porte le nom de méthode du *point lumineux*. La figure 6 présente les réponses percutationnelles d'un système parfait (colonne **a**) et celle d'un système entaché d'aberration sphérique (colonne **b**) pour différentes mises au point de part et d'autre de l'image paraxiale.

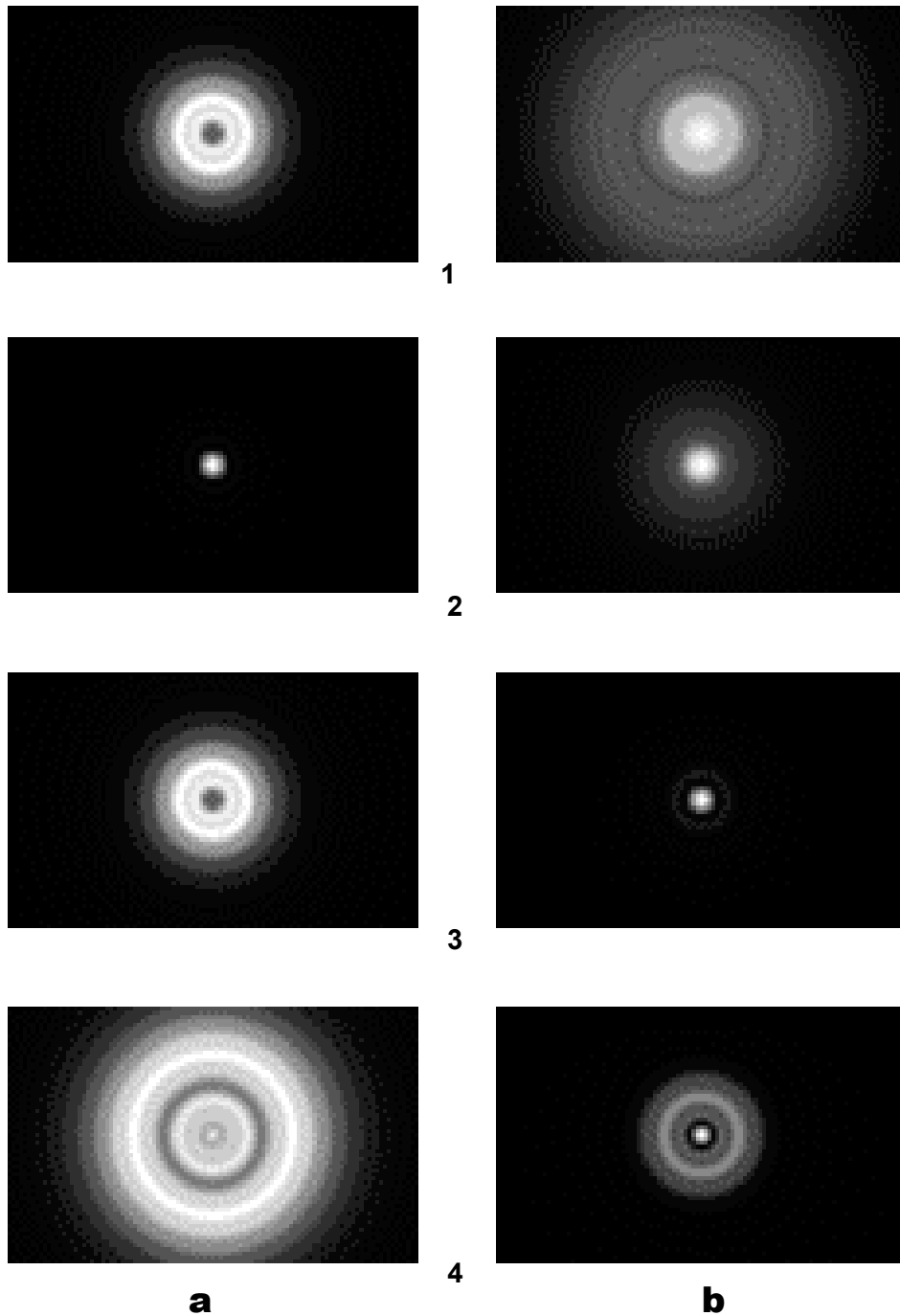


Figure 6: Évolution avec la mise au point de la réponse percussive théorique d'un système optique parfait (a) ou entaché d'aberration sphérique (b)

D'une ligne à l'autre la mise au point a varié d'une même quantité. L'image paraxiale correspond, pour les deux colonnes, à la deuxième ligne. L'image **a2** représente donc une tache d'Airy.

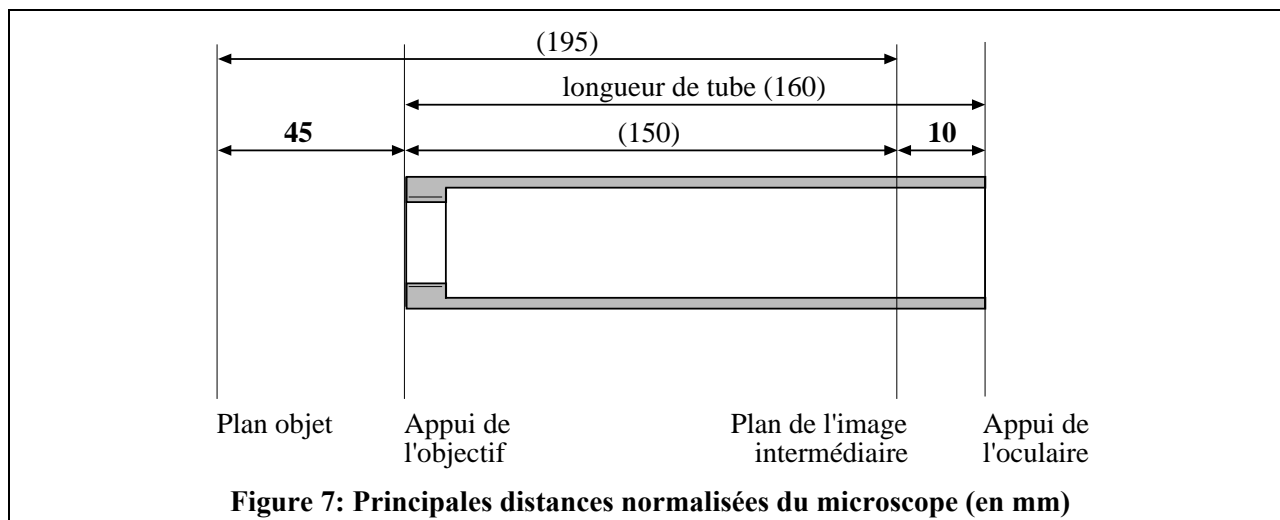
En présence d'aberration sphérique, la meilleure mise au point ne correspond plus à l'image paraxiale. La meilleure réponse percussive obtenue alors (image **b3**) possède des anneaux secondaires d'intensité très supérieure à ceux de la tache d'Airy, ce qui explique le brouillage d'une image formée avec un tel système aberrant.

Notez, colonne **a**, la symétrie de l'évolution de la réponse percussive de part et d'autre de la meilleure mise au point (**a2**) lorsque le système n'a pas d'aberration. En présence d'aberration sphérique (colonne **b**), les réponses percussives obtenues de part et d'autre de la meilleure mise au point (**b3**) sont par contre très différentes.

Remarque: la dynamique d'une image reproduite par photocopie sur papier ordinaire est très inférieure à la dynamique de l'œil, qui en observation réelle percevrait des anneaux secondaires très faibles, invisibles ici.

b. Longueur de tube et autres normes dimensionnelles du microscope

L'utilisation de conjugaisons rigoureusement stigmatiques, comme les points de Weierstraß, dans la conception des objectifs de microscope impose que l'image intermédiaire observée avec l'oculaire se trouve à une position précise et fixe relativement à l'objectif. La mise au point doit donc être faite par modification de la distance objet/objectif, la distance objectif/oculaire étant fixée. Un microscope doit donc travailler comme un viseur à frontale fixe. Afin de permettre une certaine interchangeabilité des composants (statifs, objectifs, oculaires) entre différents constructeurs des normes dimensionnelles précises ont été définies pour le microscope (ISO TC172 [8036 à 8040 + 8255 + 8578...]). Les plus importantes sont reportées Fig. 7 ci-dessous [Roblin 99].



Le plan de l'image intermédiaire doit donc être **10 mm** en dessous de l'épaule de l'oculaire et le plan objet à **45 mm** de l'épaule de l'objectif[⊕]. La *longueur de tube* (i.e. la distance séparant l'appui de l'objectif de l'appui de l'oculaire) a par ailleurs une valeur normalisée de 160 mm. Il est cependant possible de trouver d'autres longueurs ; celle de 230 mm est, par exemple, rencontrée sur les microscopes métallographiques anciens. Mais surtout, un type d'objectifs, dits *corrigés pour une longueur de tube infinie* (ou en raccourci, *corrigés à l'∞*), est proposé par la plupart des constructeurs pour leur matériel haut de gamme. Ces derniers objectifs sont prévus pour donner à l'infini une image sans aberration de l'objet observé. Cette image est ramenée à distance finie par un système optique convergent supplémentaire, dit *lentille de tube*[▲], contenue dans le statif du microscope. L'image réelle ainsi formée, équivalente à l'image intermédiaire des microscopes "conventionnels", est observée avec l'oculaire. L'intérêt de cette configuration réside dans la plus grande facilité de réalisation et d'insertion dans le trajet optique de composants supplémentaires comme ceux nécessaires aux techniques de contraste ou à l'éclairage par réflexion. (Le point clef réside dans le fait qu'une lame à faces parallèles, même oblique, n'introduit pas

[⊕] Quelques constructeurs commencent à proposer des systèmes où la distance plan objet/épaule de l'objectif (souvent appelée *distance de parfocalité*) est de 60mm ou même 95mm, en désaccord avec la norme officielle, il est vrai assez ancienne. Ces valeurs supérieures aux 45mm permettent de simplifier la conception des optiques ayant de très fortes ouvertures numériques et, simultanément, de grande frontale (voir le §IV.3.a).

[▲] en anglais 'tube lens'. Le terme '*lentille de tube*', assez couramment utilisé en français, est un peu abusif ; pour la correction des aberrations du système global, en particulier chromatiques, ce système est au minimum un doublet. Il a usuellement une focale comprise entre 200 à 250mm et un diamètre d'une trentaine de millimètres.

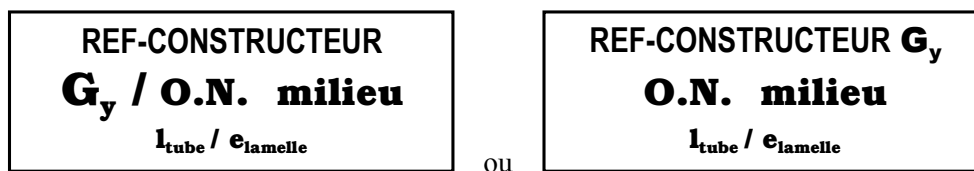
d'aberration pour et uniquement pour des objets à l'infini). Voir les deux pages de compléments à la fin de ce fascicule.

Devant la multiplicité des configurations possibles, l'utilisateur doit donc faire très attention de bien utiliser des objectifs adaptés au statif qu'il emploie[‡]. À cette fin, la longueur de tube à utiliser est normalement gravée sur la monture de l'objectif. Ce point sera détaillé au paragraphe suivant.

c. Marquage des objectifs

Les objectifs, comme on vient de le voir, sont donc fort nombreux, même chez un unique constructeur. Pour que l'utilisateur puisse s'y retrouver, un certain nombre de renseignements sont systématiquement gravés sur la monture des objectifs. Il s'agit du grandissement de l'objectif[▲], de son ouverture numérique, du milieu d'immersion (s'il est différent de l'air), de l'épaisseur de lamelle et de la longueur de tube (en mm) pour lesquelles il est corrigé. Ces informations sont en général complétées par une référence, propre à chaque constructeur, qui identifie la "classe" de l'objectif (voir le paragraphe §IV.1.d ci-dessous).

Ces informations ont le plus souvent l'une des deux dispositions suivantes, avec parfois quelques indications complémentaires, propres à chaque constructeur ou modèle d'objectif:



Voici quelques exemples extraits du catalogue d'objectifs de différents constructeurs:


<p>Achromat 63 / 0.80 160 / 0.17</p> <p>ZEISS</p>	<p>NCSPan40 0.70 160 / 0</p> <p>OLYMPUS</p>	<p>N PLAN 20X/0.40 ∞ / 0.17</p> <p>LEICA</p>	<p>PlanFl 100X/0.95 ∞ / 0.14 - 0.20</p> <p>OLYMPUS</p>	<p>Plan 100X/1.25 Oil ∞ / 0.17 WD 0.15</p> <p>NIKON</p>	<p>M Plan Apo 20 0.42 ∞ / 0 f = 200</p> <p>MITUTOYO</p>
--	--	--	--	---	--

Les milieux d'immersion sont le plus souvent référencés en anglais. **Oil** caractérise l'huile d'immersion ($n \approx 1,517$). Le mnémonique **ih** (pour *immersion homogène*) a la même signification sur les objectifs français très anciens. On peut également rencontrer **W** pour l'eau (Water) et **Gly** pour la glycérine.

On rappelle par ailleurs que l'indication ($\times Z$) gravée sur la monture d'un oculaire est le grossissement intrinsèque commercial de celui-ci. Ce nombre est parfois suivi d'un second, appelé *indice de champ*, qui indique le diamètre en millimètre de la zone effectivement observée de l'image intermédiaire (de

[‡] Bien noter que la lentille de tube peut éventuellement corriger quelques aberrations résiduelles de l'objectif. Ceci ne fonctionne évidemment que pour des objectifs et un statif (**précis**) du **même** constructeur.

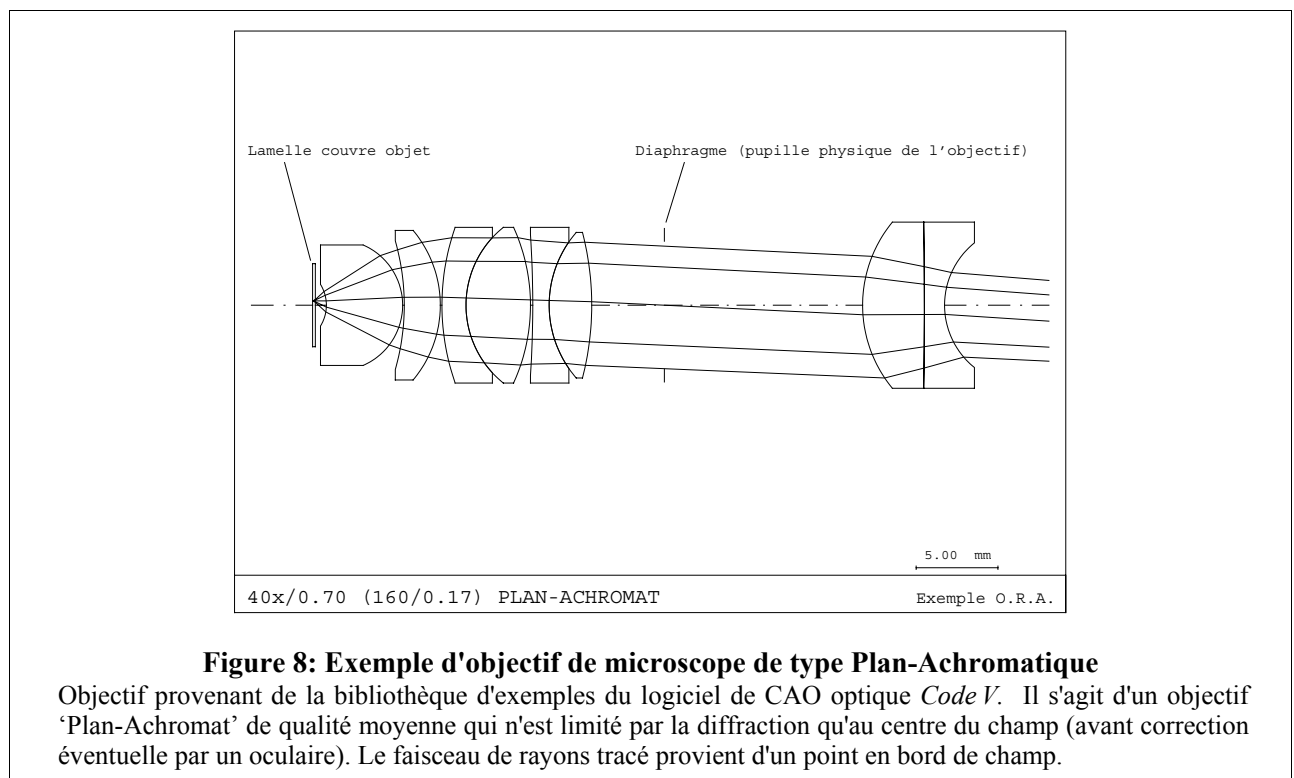
[▲] Un problème se pose en toute rigueur pour les objectifs corrigés pour une longueur de tube infinie. Il n'est en effet plus possible de définir de grandissement pour l'objectif seul lors d'un tel fonctionnement. La plupart des constructeurs (dont Olympus) donnent implicitement dans ce cas le grandissement de **l'ensemble** objectif + lentille de tube. D'autres indiquent le grossissement intrinsèque commercial de l'objectif G_α (en le faisant suivre du signe ∞ pour éviter les confusions) et inscrivent sur le statif un facteur de tube k qui vaut l'inverse du grossissement intrinsèque commercial de la lentille de tube. Le produit $k.G_\alpha$ donne le grandissement du système objectif + lentille de tube.

18 en bas de gamme, cet indice peut atteindre 26mm en très haut de gamme, avec une valeur usuelle au alentour de 22. *Les objectifs doivent évidemment être en adéquation avec l'oculaire utilisé*). Par ailleurs, un symbole de lunettes  ou la lettre **L** signifie que l'oculaire donne une pupille de sortie suffisamment éloignée du verre d'œil pour une observation confortable avec une paire de lunettes correctrices – **Ne pas oublier à contrario de mettre en service la bonnette si l'on ne porte pas de lunettes.**

d. Classes d'objectifs de microscope

Idéalement, un objectif de microscope devrait donner une image limitée par la diffraction sur l'intégralité du champ observé. Une telle qualité, qui est évidemment accompagnée d'un coût très élevé, n'est cependant pas absolument nécessaire pour toutes les applications de microscopie. C'est pourquoi les constructeurs proposent trois ou quatre “classes” d'objectifs, de performances et de prix différents. Ces classes, avec quelques variantes d'un constructeur à l'autre, se répartissent ainsi:

Classe	Corrections	Principales aberrations	Usages	Prix (suivant G_y)
Achromat	Achromatisation (simple repliement)	Forte courbure de champ (net au centre et flou sur les bords ou vice-versa). Aberration chromatique de grandeur apparente. (Astigmatisme).	Oculaire d'indice de champ ~ 18 <i>TP scolaires - Amateurs</i>	~ 100 € à ~ 400 €
Apochromat	Apochromatisation (double repliement)	(Aberration chromatique plus réduite que pour les Achromats).	—	(Obsolète)
Plan-Achromat (ou “Plan”) (Voir figure 8)	Achromatisation Champ plan	Objectifs de qualité, proches de la limite de diffraction sur une bonne partie (centrale) du champ. Certains constructeurs proposent deux niveaux de qualités dans cette classe (système “semi-apochromatique”).	Oculaire d'indice de champ 20 à ≥ 22 <i>Observations professionnelles courantes</i>	~ 250 € à ~ 2000 €
Plan-Apochromat (ou “Plan-Apo”)	Apochromatisation Champ plan	Objectifs de la plus haute qualité, quasi-limités par la diffraction sur l'intégralité du champ.	Oculaire d'indice de champ 22 à 26 <i>Microphotographie</i>	~ 1000 € à ~ 4000 €



2. Cohérence de l'éclairage et limite de résolution

Le phénomène de diffraction impose une limite physique de l'ordre de la longueur d'onde à la taille des objets que l'on peut résoudre avec un système optique comme un microscope. Pour déterminer quantitativement l'importance de la dégradation de l'image imposée par la diffraction, il est intéressant de passer dans l'espace des fréquences spatiales de l'objet observé et de raisonner sur la *fonction de transfert de modulation (FTM)* du système. (Voir les cours de *Formation des images, Optique de Fourier, Aberrations et diffraction* et les références [Maréchal 60], [Lowenthal 67], [Françon 72], [Goodman 72], [Born 80]). La théorie montre que la dégradation de l'image ne dépend pas seulement des propriétés de l'objectif (ouverture numérique, aberrations) mais dépend également de la *cohérence* de l'éclairage, propriété directement liée à l'ouverture numérique de ce dernier.

Lorsque le diaphragme d'ouverture est très fermé (source quasi-punctuelle), l'objet est éclairé par une onde quasi-plane, et l'éclairage est dit cohérent. Le formalisme de Fourier s'applique alors sur les amplitudes complexes des ondes. Un système optique sans aberration (limité par la diffraction) est dans ce cas un filtre passe-bas des fréquences spatiales qui laissent passer sans altération les fréquences inférieures à $O.N._{Obj} / \lambda$ et coupe strictement les fréquences supérieures (Cf. Fig. 9, courbe 1). Dans ces conditions les images sont bien contrastées mais les éléments de l'image sont entourés de franges liées au phénomène de Gibbs.

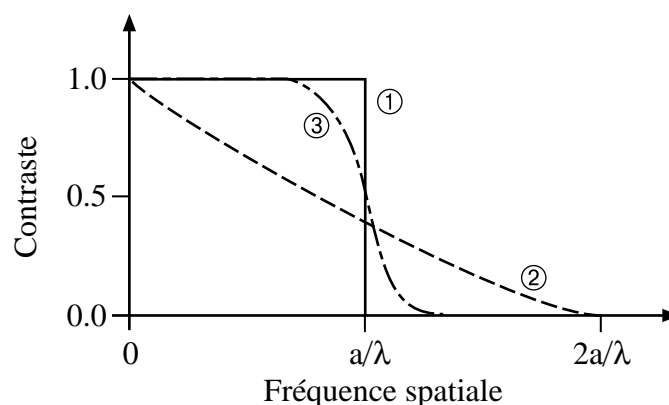


Figure 10: Courbes représentant le contraste de l'image d'une mire sinusoïdale en fonction de sa fréquence spatiale pour différente cohérence d'éclairage.

1 Éclairage cohérent. 2 Éclairage incohérent. 3 Éclairage partiellement cohérent.
 a est l'ouverture numérique de l'objectif. L'ouverture numérique de l'éclairage vaut $a/3$ dans le cas 3.

Inversement, si le diaphragme d'ouverture est très ouvert afin de rendre l'O.N. de l'éclairage supérieure à celle de l'objectif, l'éclairage est dit totalement incohérent. Le formalisme de Fourier s'applique alors à l'intensité de l'onde. Un système optique sans aberration est alors un filtre passe-bas dont la fonction de transfert décroît graduellement de 1 à 0 lorsque la fréquence croît de la valeur nulle à $2 \times O.N._{Obj} / \lambda$ (Cf. Fig. 9, courbe 2). La fréquence de coupure est donc deux fois supérieure à celle obtenue en éclairage cohérent. Cependant, le contraste d'un objet périodique est d'autant plus affaibli par le système optique que sa fréquence spatiale est élevée.

Dans les cas intermédiaires, l'éclairage est dit partiellement cohérent (Voir la référence [Born 80]). Il n'est dans ce cas plus possible de définir en toute rigueur une fonction de transfert, le système ne relevant

plus de la théorie des systèmes linéaires. On peut cependant avoir une bonne idée de l'effet du système optique sur l'image en déterminant le contraste d'une mire sinusoïdale en fonction de la fréquence spatiale (Cf. Fig. 9, courbe 3). On peut remarquer que le contraste reste à 1 pour toutes les fréquences inférieures à $(O.N._{Obj} - O.N._{Écl})/\lambda$ puis décroît graduellement pour atteindre 0 à la fréquence $(O.N._{Obj} + O.N._{Écl})/\lambda$. (La référence [Roblin 99] expose une démonstration astucieuse de cette propriété). Les observations microscopiques se font presque toujours dans ces conditions d'éclairage. Elles donnent en effet une image qui contient des hautes fréquences spatiales et dont les éléments de basses et moyennes fréquences spatiales sont très bien contrastés ce qui satisfait le sens subjectif de la vision de l'observateur. La valeur optimale de l'O.N. de l'éclairage, à ajuster pour chaque objet (et observateur), est empiriquement de l'ordre de deux tiers de celle de l'objectif.

Pour vérifier l'influence de la cohérence de l'éclairage sur la formation des images, il est intéressant d'utiliser des préparations de *diatomées* tests. Les diatomées forment une famille très vaste et diverse d'animaux aquatiques microscopiques aux squelettes constitués de structures périodiques très fines dont les dimensions des motifs s'échelonnent de $\sim 2 \mu\text{m}$ à $\sim 0,25 \mu\text{m}$ suivant les espèces. Ces 'objets' sont donc particulièrement bien adaptés pour mettre en évidence de manière directe la limite de résolution des objectifs de microscope.

3. Autres propriétés et caractéristiques du microscope

a. Frontale - Parfocalité

Un microscope étant un viseur à frontale fixe, la distance objet/lentille frontale d'un objectif donné est donc fixée lorsque la mise au point est réalisée. Cette distance, la *frontale*, ou '*Working Distance*' pour les anglo-saxons, varie usuellement de quelques millimètres pour les objectifs de faible grandissement ($\times 10$) à quelques dixièmes de millimètre pour les objectifs les plus forts ($\times 100$ à immersion). Une grande frontale facilite le travail de l'utilisateur en limitant le risque de collision entre la préparation et l'objectif et permet également l'observation d'objets spéciaux entourés de reliefs, comme les circuits intégrés avec leurs plots de connexion. Il est cependant très difficile, bien que possible mais très coûteux, de concilier grande distance frontale et forte ouverture numérique. Ainsi, les constructeurs proposent donc en général à côté de la série d'objectifs standard, des objectifs spéciaux à longue frontale pour les utilisateurs intéressés par cette propriété[Ⓣ]. Les objectifs standard récents de courte frontale possèdent en général une monture à ressort qui limite la gravité d'une collision objectif/préparation.

Par ailleurs, d'après la norme dimensionnelle imposant une distance précise (normalement 45 mm) entre le plan objet et l'appui de l'objectif (cf. Fig. 7, au §IV.1.b), la mise au point doit normalement être conservée au changement d'objectif. Il faut cependant réaliser que la profondeur de champ d'un microscope est très faible, puisqu'elle est de l'ordre de λ/a^2 où a est l'ouverture numérique de l'objectif (incertitude axiale de pointé – cf. cours de *Mesures Optiques*). Cela conduit donc à des tolérances exceptionnellement

[Ⓣ] Par exemple, Mitutoyo propose un objectif Plan Apochromatique de $200\times/0.62$ ($\infty/0$) ayant une frontale de **13mm**(!!!), mais toutefois pour le prix de $\sim 12000\text{€}$, environ 6 fois celui d'un objectif de mêmes caractéristiques mais de frontale standard de 0.1 à 0.2mm... *Cet objectif utilise une distance objet/épaulement d'objectif de 95mm.*

faibles sur les montures mécaniques des objectifs et de la tourelle porte-objectifs. La qualité effective avec laquelle la mise au point est conservée au changement d'objectif porte le nom de *parfocalité*.

b. Microphotographie et vidéo

Le microscopiste a souvent besoin de conserver une trace des observations qu'il est en train d'effectuer. La microphotographie est un moyen de choix pour effectuer cet archivage. Elle consiste à envoyer sur un film, ou maintenant beaucoup plus souvent un capteur (CCD ou CMOS) de caméra ou photoscope, une image *réelle* de l'objet observée par l'utilisateur au travers du microscope. Pour des questions de qualité d'image et d'adaptation du champ et de la résolution^{III}, il n'est pas conseillé (sauf pour des objectifs spéciaux très récents conçus pour cela) de mettre le capteur dans le plan de l'image intermédiaire ni de modifier la mise au point d'un oculaire pour observation visuelle afin qu'il donne une image réelle. La solution est d'utiliser à la place de l'oculaire standard un système optique, appelé *oculaire projectif*, qui a été spécialement conçu pour donner sur le capteur une image ayant les qualités requises (Voir la référence [Roblin 99]). Pour faciliter le travail de prise de vues, il est possible d'équiper les microscopes d'une tête dite "trinoculaire" autorisant une vision binoculaire par l'observateur et l'envoi simultané de l'image ou d'une partie de celle-ci sur l'appareil photographique ou d'enregistrement vidéo.

Hervé SAUER

^{III} Pour que l'échantillonnage introduit par le capteur ne limite pas la résolution globale des images numériques obtenues avec le microscope, il faut, idéalement, que la fréquence spatiale de Nyquist du capteur soit supérieure à la fréquence spatiale de coupure de l'image projetée sur le capteur. Il faut donc judicieusement choisir le grandissement de l'oculaire projectif en fonction de la taille des pixels du capteur (et de l'objectif de microscope utilisé). Cette adaptation nécessite souvent un compromis entre résolution et largeur de champ enregistré, le nombre de pixels des capteurs courants n'étant pas suffisant pour enregistrer tout le champ visuel sans restreindre la résolution... Pour fixer les idées, un objectif 20×/0.50 prévu pour travailler avec un oculaire d'indice de champ 22, 'résout', à la limite de la fréquence spatiale de coupure incohérente, environ $[22\text{mm}/20]/[0.5\mu\text{m}/(2\times 0.50)] = 2200$ points sur le diamètre, avec une fréquence spatiale de coupure dans le plan de l'image intermédiaire d'environ 100mm^{-1} . Pour respecter le théorème de Shannon, il faudrait donc un capteur de plus de $(4400)^2$ pixels pour couvrir sans sous-échantillonnage tout le champ observé visuellement ; ceci dépasse les performances de la plupart des capteurs de photoscopes actuels (à 4 ou 6Mpixels), et **très largement** les performances des capteurs **vidéo** standard (à ~500 lignes TV, soit environ $(500)^2$ pixels enregistrés). Plus précisément, les capteurs CCD les plus courants ont entre 5 et 9mm de (grand) côté [capteurs dit 1/3", 1/2", 2/3"], avec des pixels ayant entre 5μm et 10μm de côté (soit une fréquence de Nyquist entre 100mm^{-1} et 50mm^{-1}); on voit donc que pour conserver la résolution, l'oculaire projectif devra avoir un grandissement voisin de 1 ou 2, ce qui conduit à ne prendre qu'environ un quart en linéaire (1/16 en surface) du champ visuel observable...

BIBLIOGRAPHIE

- [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* 6ème Éd. par A. Kastler. Réimpression complétée par P. Bouchareine, MASSON, 1992.
- [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.
- [Roblin 99] G. ROBLIN. « Microscopie optique » Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur, **R6712** (tome R7), 1999.
Présentation très complète et très claire de la microscopie optique actuelle par un chercheur de l'Institut d'Optique (désormais retraité). Par ailleurs, l'article R6710 (1998), du même auteur, est une présentation générale de la microscopie, incluant, en sus de la microscopie optique, les microscopies électronique, acoustique et de champ proche; l'article R6714 (1999), également de G.Roblin, est un complément sur la microscopie optique abordant la microscopie confocale et la microscopie optique de champ proche, non traitées dans l'article R6712.
- [Wastiaux 94] G. WASTIAUX. *La microscopie optique moderne.* Lavoisier, 1994
Ouvrage de vulgarisation très complet.
- [Wastiaux 2001] G. WASTIAUX. *Initiation au microscope: bases pratiques et utilisation.* Lavoisier, 2001

Complément (1)

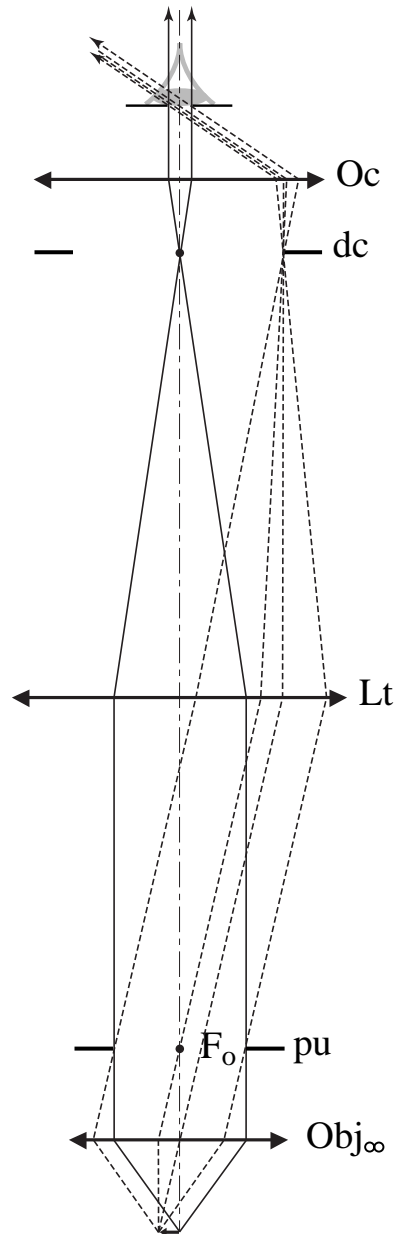


Figure C1: Principe du microscope avec *objectif corrigé pour une longueur de tube infinie*

Obj_∞: Objectif (corrigé à l' ∞)

Oc: Oculaire

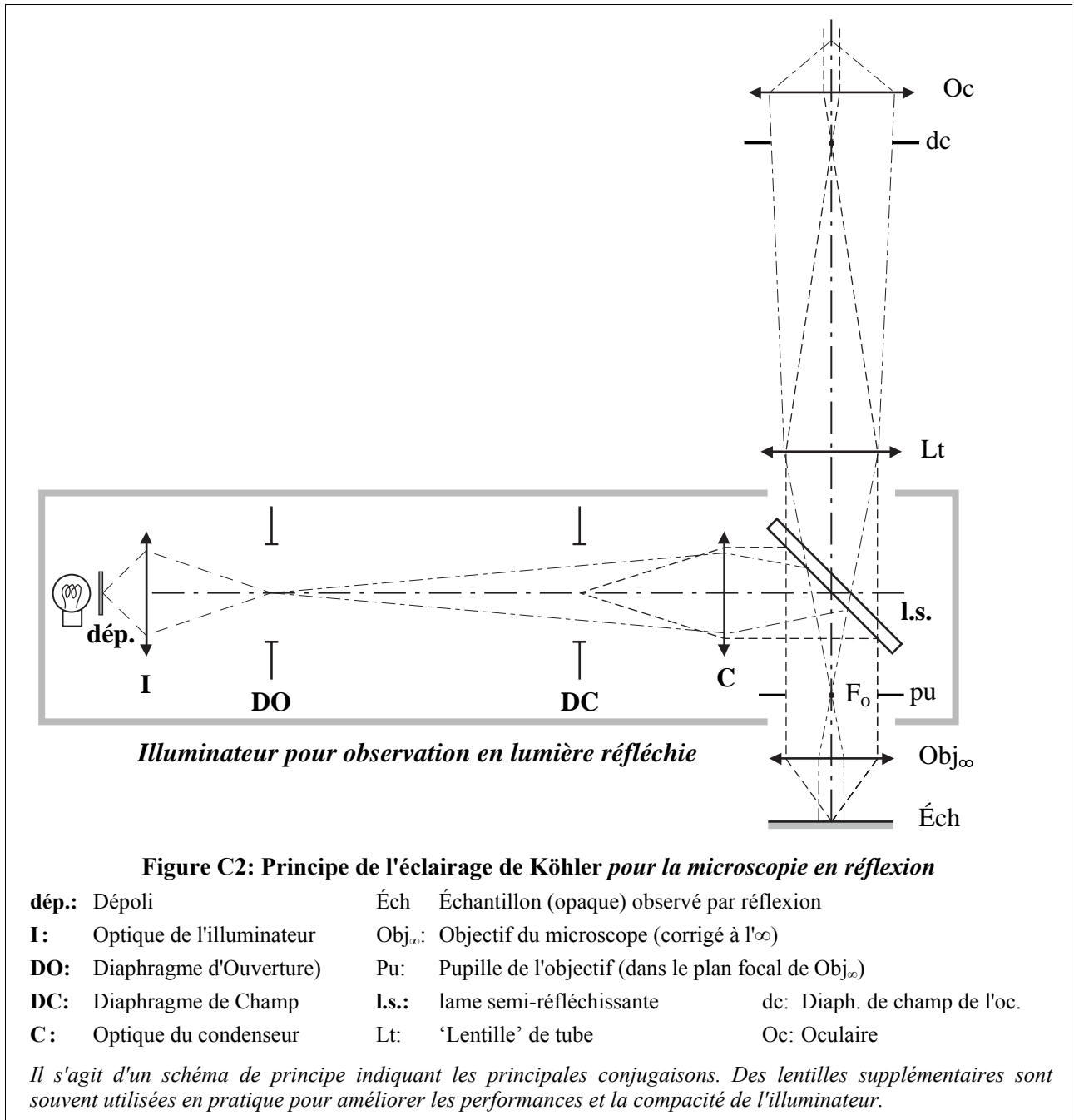
Pu: Pupille (de sortie) de l'objectif (*située dans le plan focal image de 'Obj_∞'*)

dc: Diaphragme de champ (*situé dans le plan focal objet de 'Oc'*)

Lt: 'Lentille' de tube

(Comparer à la figure 2)

Complément (2)



(Comparer à la figure 3)