



**TECHNIQUES**  
**DE L'INGÉNIEUR**

Réf. : **R6710 V3**

# Microscopie

Date de publication :  
**10 décembre 1998**

Cet article est issu de : **Mesures - Analyses | Mesures mécaniques et dimensionnelles**

par **Gérard ROBLIN**

**Pour toute question :**  
Service Relation clientèle  
Techniques de l'Ingénieur  
Immeuble Pleyad 1  
39, boulevard Ornano  
93288 Saint-Denis Cedex

**Par mail :**  
infos.clients@teching.com  
**Par téléphone :**  
00 33 (0)1 53 35 20 20

Document téléchargé le : **06/06/2025**

Pour le compte : **7200048087 - ecole normale superieure de lyon // 140.77.168.36**

© Techniques de l'Ingénieur | Tous droits réservés

# Microscopie

par **Gérard ROBLIN**  
Docteur  s sciences  
Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS) (ER)

<b>1. Les différentes méthodes de microscopie .....</b>	<b>R 6 710</b>	<b>2</b>
1.1 Développement de la microscopie optique .....	—	2
1.2 La microscopie électronique .....	—	3
1.2.1 Notions d'optique électronique.....	—	3
1.2.2 Le microscope électronique .....	—	4
1.2.3 Microscope électronique à balayage .....	—	5
1.2.4 Autres instruments apparentés au microscope électronique.....	—	6
1.3 La microscopie acoustique .....	—	7
1.4 Les microscopies à champ proche.....	—	7
<b>2. Les applications de la microscopie .....</b>	<b>—</b>	<b>9</b>
2.1 Microscopie optique.....	—	9
2.2 Microscopie �lectronique .....	—	10
2.3 Microscopie acoustique .....	—	10
2.4 Microscopies à champ proche .....	—	11
<b>3. Conclusions et perspectives.....</b>	<b>—</b>	<b>11</b>
3.1 Intercomparaison des différentes microscopies.....	—	11
3.2 Quelques développements possibles en microscopie.....	—	12
3.2.1 Cas de la microscopie en rayons X.....	—	12
3.2.2 Sur quelques techniques de microscopie optique .....	—	12
<b>Pour en savoir plus .....</b>	<b>Doc. R 6 710</b>	

**L**a microscopie permet d'examiner ( σκοπειν) des objets ou leurs détails trop petits (μικροσ) pour être vus à l'œil nu en en fournissant des images agrandies, c'est-à-dire de les voir sous des angles apparents plus grands, de les **grossir**. Les microscopes mettent à la portée de l'homme l'infiniment petit échappant à sa vision ordinaire.

On divisait récemment ces instruments en deux grandes classes suivant que, pour former des images, ils utilisent des faisceaux de **radiations électromagnétiques**, auxquelles on associe la notion de photon, qui s'étendent pratiquement dans ce spectre du proche infrarouge aux rayons X, ou des faisceaux de **radiations corpusculaires** :  lectrons ou particules plus lourdes tels des protons ou certains ions, auxquels la physique moderne sait associer une onde, bien qu'elle ne soit pas électromagnétique. Il s'y ajoute maintenant, outre certains instruments utilisant les propriétés des ondes acoustiques, de nouvelles familles d'instruments fonctionnant selon des principes physiques étudiés plus récemment faisant intervenir l'existence de nuages d'électrons au voisinage des surfaces conductrices (**effet tunnel**), celle de champs de forces attractives entre corps proches (**force atomique**) ou les propriétés des ondes lumineuses dites ** vanescentes**.

# 1. Les différentes méthodes de microscopie

## 1.1 Développement de la microscopie optique

C'est le **microscope optique**, certains disent **photonique** par opposition à électronique, qui est le plus ancien, surtout dans le domaine

de la lumière visible, car depuis longtemps l'homme utilise des accessoires lui permettant d'agrandir ce qu'il regarde.

Les débuts de cette microscopie sont présentés dans l'encadré 1.

L'ensemble de cette microscopie traditionnelle sera développé dans l'article [R 6 712] de ce traité [2].

Les derniers efforts des opticiens ont été guidés par les besoins de la numérisation des images pour assurer leur stockage ou en tirer des informations par des traitements appropriés. Cette *microscopie quantitative*, introduite par la technique « *flying spot* »

### Encadré 1. – Historique

En histoire naturelle, l'emploi du *microscope simple*, mettant en œuvre le pouvoir grossissant d'une seule lentille en verre ou en autre matériau transparent réfringent, date du XIV<sup>e</sup> siècle, quoique l'existence de tels instruments soit attestée bien antérieurement (ruines de Ninive, – 700). Vers – 500, Aristophane mentionne les « sphères ardentes » en cristal de roche ou en émeraude ; au 1<sup>er</sup> siècle, Sénèque remarque que les objets deviennent plus gros et plus distincts s'ils sont vus au travers d'une sphère remplie d'eau et Plinius cite l'emploi de lentilles de verre pour la mise à feu. À Rome, les vestales s'en servaient pour raviver le feu sacré, les médecins cautérisaient les plaies grâce à la lumière solaire concentrée par une lentille. On prétend parfois que des travaux très fins d'écriture ou de ciselure n'ont pu être exécutés qu'avec l'aide de loupes. Ce n'est pas évident ; qu'une loupe grossisse est indéniable, qu'elle soit de qualité telle qu'elle offre un pouvoir séparateur satisfaisant n'est pas démontré pour cette époque. Ces travaux sont peut-être seulement le fait d'artisans très myopes ou de très jeunes enfants capables de fortes accommodations. Si, vers 1100, l'arabe Alhazen-ben-Alhazen mentionne le pouvoir grossissant des lentilles plan-convexes, ce n'est qu'à la fin du XIII<sup>e</sup> siècle (en 1290) que Bacon en signale l'utilisation pour la correction des défauts de l'œil et rend compte de principes applicables au microscope.

Dès cet instant, il n'est pas douteux que l'on utilise des loupes pour examiner la nature. En 1592, Hufnagel publie un ouvrage sur l'observation des insectes et de cette époque datent les premiers microscopes simples ou composés fournissant une image agrandie d'un objet. Cela peut être obtenu avec une simple lentille. De très courte focale, c'est une loupe très puissante, appelée alors **microscope simple**. L'image peut être bonne car on n'utilise qu'une faible épaisseur de matériau transparent, la lentille étant de dimensions d'autant plus faibles que sa focale est plus courte, ce qui, par contre, ne lui permet de recueillir qu'une faible quantité de lumière utile. Il est encore possible d'utiliser un objectif moins fort, plus épais et de diamètre plus grand, recevant davantage de lumière mais présentant plus de défauts, formant une image réelle agrandie de l'objet, observée avec une loupe ou verre d'œil, constituant un oculaire avec le verre de champ destiné à rabattre les rayons lumineux. Ce **microscope composé**, longtemps de moins bonne qualité que le microscope simple, est seul en usage aujourd'hui.

Les plus anciennement connus, construits par les Jansen, datent de 1590. En 1667, Robert Hooke, dans son traité « *Micrographia* » présente un microscope à trois lentilles avec une table porte-objet, un système de mise au point, un condenseur d'éclairage constitué d'un ballon d'eau et d'une lentille, et observe des cellules végétales. Mais, c'est au Hollandais van Leeuwenhoek, fabriquant des lentilles de qualité remarquable, que l'on doit l'invention de la microscopie. Dès 1673 les nombreuses observations qu'il publie, faites avec ses microscopes simples, incitent ses contemporains à cette pratique. Il « voit » des bactéries, les protozoaires, les spermatozoïdes, observe les organes de l'abeille, les globules du sang, les fibres nerveuses, les cellules de l'épiderme ou la structure des poils. On lui connaît 247 microscopes, constitués d'une simple plaque métallique enchâssant une lentille, l'objet porté par une pointe étant mobile par translation et rotation dans son plan et suivant l'axe optique pour assurer sa mise au point. On ne réalise que peu de progrès pendant tout le XVIII<sup>e</sup> siècle, à part quelques améliorations portant sur la mécanique de l'instrument et l'éclairage de l'objet. En effet, on se heurte aux problèmes de limitation de la qualité de l'image par les aberrations et le microscope simple recueille encore la faveur des observateurs car il présente moins de chromatisme. C'est au début du XIX<sup>e</sup> siècle qu'apparaissent les premiers objectifs achromatiques. On prend aussi conscience, avec Lister en 1829, qu'il ne suffit pas de grossir le champ, mais que sa résolution dépend de l'obli-

quité des rayons lumineux issus de l'objet. À la notion de grandissement caractérisant l'objectif s'ajoute donc celle d'ouverture numérique. Les aberrations géométriques, et surtout celle de sphéricité, doivent être prises en compte, et Lister propose des doublets achromatiques stigmatiques. On améliore encore les techniques d'observation, en créant le microscope polarisant (Talbot, 1834), et de manipulation, avec le microscope inversé en chimie (Chevalier, 1839) et en biologie (Nachet, 1850), connaissant aujourd'hui un développement considérable en biotechnologie. La chambre claire en 1823 et les premiers clichés photographiques en 1840 permettent la saisie des informations. Mais, quarante ans plus tard, Roux en fait des dessins pour publication car on ne sait pas imprimer les photographies.

Le XIX<sup>e</sup> siècle est la grande époque de la microscopie. La découverte de la cellule (Purkinje, 1825), du noyau (Brown, 1831), créent la *théorie cellulaire* et la *cytologie* opposées à la théorie des fibres alors prépondérante. Parallèlement toute la *pathologie cellulaire* s'organise en contradiction avec les théories précédentes faisant de l'organe, puis du tissu, le siège de la maladie. C'est le succès de la *bactériologie* et de la *parasitologie*. La microscopie découvre l'agent pathogène et rend possible les cultures, d'où la vaccination et les traitements antimicrobiens. C'est l'œuvre de Pasteur, la découverte des bacilles de la tuberculose (Koch, 1882), de la peste (Yersin, 1894), de la lèpre (Hansen). Laveran isole le parasite du sang humain responsable du paludisme (premier prix Nobel de médecine français en 1907). Par ailleurs la structure cristalline et sa genèse sont démontrées en *minéralogie*. Cette activité pétrographique reste d'actualité en recherche pétrolière. L'examen microscopique en métallographie contribue au développement considérable de la *métallurgie*.

Ces travaux exigeants amènent les concepteurs à améliorer la production devenue industrielle des microscopes. En 1872, Abbe montre l'importance de l'éclairage et il conçoit un système condenseur. Son utilisation sera optimisée par Köhler en 1893. L'importance du rôle des rayons obliques, suggérée par Lister et devinée par Leeuwenhoek, ne sera clairement formulée que trois quarts de siècle plus tard par H.H. Hopkins et A. Maréchal suivant les travaux de P.M. Duffieux. Dès cet instant, le microscope se distingue des autres instruments d'optique parce que recueillant la lumière diffractée. Cela incite à l'emploi de courtes longueurs d'onde et Köhler, en 1904, propose le premier microscope travaillant en ultraviolet. Il offre de nouvelles voies à la cytologie du fait de l'absorption sélective de ces radiations par les éléments constitutifs du noyau des cellules. Cela amène l'apparition de la *fluorescence* en microscopie, primaire ou directement induite (Reichert, 1908), puis secondaire due aux fluorochromes (Haittinger, 1911) et contribue au développement d'objectifs à miroirs. L'optique s'améliore encore. En 1886, Abbe, avec de nouveaux verres de Schott, produit les objectifs apochromats corrigés du chromatisme primaire pour trois longueurs d'onde. L'objectif est alors presque parfait. Il faudra quatre-vingts ans pour le corriger de sa courbure, ce qui est bien utile en microcinématographie datant de 1912. Mais il existe des objets non observables en microscopie optique : de dimensions inférieures à la limite de résolution, on propose l'ultramicroscopie ou l'éclairage « fond noir » en 1903 ; constitués d'éléments invisibles car ne présentant pas de variations d'absorption ou de réflexion caractérisant les *objets d'amplitude*, on applique à ces *objets de phase* toutes les techniques d'interférométrie (Lebedev, 1930 ou Linnik, 1933). Elles évoluent vers le *contraste interférentiel* (Nomarski, 1952) aussi riche en information que le *contraste de phase* décrit par Zernicke en 1934, produit dès 1938 mais seulement connu après 1945 hors d'Allemagne, lui valant le prix Nobel en 1953.

(Roberts et Young, 1951), a conduit au développement de la **microscopie optique à balayage** (Sheppard et Choudhury, 1977) confocale ou non, laser ou non. Plus récemment sont apparus les microscopes dits à « **champ proche** », mais leur résolution latérale mal définie n'incite pas à les qualifier de microscopes mais plutôt de microrugosimètres par leur grande résolution en profondeur. Ces aspects de la microscopie optique feront plus particulièrement l'objet d'un troisième article [R 6 714] dans ce même traité [5].

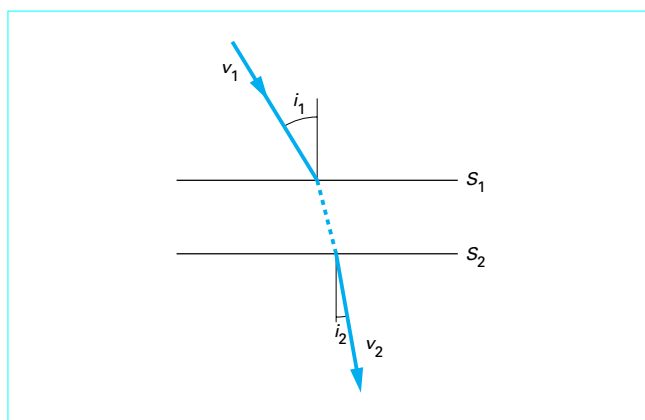
L'emploi de courtes longueurs d'onde est intéressante, car la limite de résolution du microscope, pratiquement limitée à  $0,2\ \mu\text{m}$  en optique visible, leur est proportionnelle. Malheureusement, il n'existe aucun matériau transparent au-dessous de  $0,2\ \mu\text{m}$  et encore est-il difficile d'en trouver de qualité suffisante dans ce voisinage. Il existe néanmoins de rares objectifs biologiques travaillant en ultraviolet. Pour satisfaire aux besoins récents de fabrication en micro-électronique sont apparus les objectifs « photoréducteurs », de caractéristiques dérivant de celles des objectifs de microscope qui, pour de multiples raisons, travaillent de plus en plus en ultraviolet. Améliorer encore la résolution ou avoir accès à de nouvelles informations par diminution de la longueur d'onde incite à l'emploi des rayons X. Les difficultés technologiques rencontrées ne permettent encore d'améliorer la résolution que dans un rapport de l'ordre de deux. De gros efforts sont menés pour réaliser des systèmes plus performants, mais l'implantation de tels systèmes ne peut encore se faire qu'après des anneaux de stockage d'électrons, sources intenses de rayons X. Leur développement permettrait de couvrir partiellement le grand vide qui existe entre microscopie optique et microscopie électronique.

## 1.2 La microscopie électronique

La lumière utilisée, interagissant avec l'objet qu'elle explore, la distance en deçà de laquelle aucune information ne peut être obtenue sur la structure de l'objet est de l'ordre de sa longueur d'onde. C'est donc cette grandeur qui régira la résolution du microscope comme nous le précisons dans l'article [R 6 712] de ce traité [2]. L'amélioration de cette qualité instrumentale passe donc par la diminution de la longueur d'onde. De même que Planck et Einstein ont attribué à la lumière un caractère corpusculaire (le photon), de Broglie en 1924 établit la dualité onde-corpuscule. À tout corpuscule, caractérisé par sa masse  $m$  et sa vitesse  $v$ , c'est-à-dire par son énergie cinétique, est associée une onde dont la longueur d'onde  $\lambda$  dépend de ces deux grandeurs ( $\lambda = h/mv$ ,  $h$  étant la constante de Planck valant  $6,62 \times 10^{-34}$  dans le système international d'unités SI). On obtient ainsi des longueurs d'onde infiniment plus courtes. On associe aux électrons accélérés sous 100 kV une longueur d'onde de l'ordre de  $4 \times 10^{-3}$  nm, c'est-à-dire bien inférieure à la distance interatomique qui est de l'ordre de 0,2 nm, ce qui explique que l'on voie les atomes. Le premier microscope électronique a été réalisé par Ruska en 1929 avec une résolution de 60 nm, mais les premiers bactériophages avaient déjà été vus par une optique électronique en 1917. Aujourd'hui, on atteint une résolution de 0,4 nm, mais cela ne s'applique pas aux objets biologiques trop épais pour transmettre les électrons.

### 1.2.1 Notions d'optique électronique

Pour réaliser un instrument, il ne suffit pas d'admettre qu'existent de telles longueurs d'onde plus courtes associées aux électrons. S'ils ne sont pas visibles, on sait néanmoins qu'ils sont capables d'impressionner la plaque photographique ou d'exciter la fluorescence. Former des images agrandies avec ces corpuscules implique, outre la nécessité de les produire et de les propager, de rassembler en un même point de ces récepteurs tous les électrons issus d'un même point de l'objet, ce qui impose leur déflexion. Celle-ci, appli-



**Figure 1 – Mise en évidence de la réfraction des électrons entre espaces de potentiels différents**

quée par ailleurs en oscillographie, montre une analogie certaine avec l'optique comme l'a montré H. Busch en 1927. En effet, considérons un électron, de charge  $e$  et de masse  $m$ , se propageant à la vitesse  $v_1$  dans un milieu dépourvu de champ électrique où le potentiel électrique constant vaut  $V_1$ , donc d'énergie cinétique :

$$W_1 = mv_1^2/2 = eV_1$$

atteignant une surface de séparation  $S_1$  sous un angle d'incidence  $i_1$  (figure 1). Il pénètre alors dans un espace compris entre les surfaces parallèles  $S_1$  et  $S_2$  où règne un champ électrique, cette seconde surface étant à un potentiel  $V_2$ , puis retrouve au-delà un espace à ce même potentiel constant. Entre les surfaces, soumis à un champ électrique qui leur est perpendiculaire, donc à une force de même direction, sa vitesse varie, il est défléchi et émerge avec une vitesse  $v_2$  sous un angle d'incidence  $i_2$ , donc avec une énergie cinétique :

$$W_2 = mv_2^2/2 = eV_2$$

Mais, entre les surfaces  $S_1$  et  $S_2$ , le champ électrique leur étant perpendiculaire, la composante de vitesse parallèle aux surfaces équipotentielles ne varie pas, ainsi :

$$v_1 \sin i_1 = v_2 \sin i_2$$

et, compte tenu de l'expression de l'énergie cinétique, cette relation peut s'écrire :

$$\sqrt{V_1} \sin i_1 = \sqrt{V_2} \sin i_2$$

ce qui est une loi de Descartes où  $\sqrt{V}$  est assimilable à un indice de réfraction.

Comme, du point de vue de la mécanique ondulatoire,  $mv = h/\lambda$  et que, lorsque l'électron passe d'un milieu à un autre sa vitesse  $v$  varie comme  $\sqrt{V}$ ,  $\lambda$  varie comme  $1/\sqrt{V}$ , de même qu'en optique, pour une onde de fréquence donnée, la longueur d'onde varie comme l'inverse de l'indice de réfraction. Ainsi les trajectoires d'électrons réfractés peuvent être construites, comme en optique, par application du principe de Huygens.

Le rôle des surfaces équipotentielles, perpendiculaires aux lignes de force, est donc, pour les électrons, analogue à celui des surfaces de séparation entre deux milieux différents, ou dioptries, en optique. Pour produire des images électroniques, il est donc nécessaire de disposer de surfaces équipotentielles courbes, ce qui peut être obtenu en perçant d'ouvertures circulaires deux plaques portées à des potentiels différents. Ainsi est-il possible de concevoir des

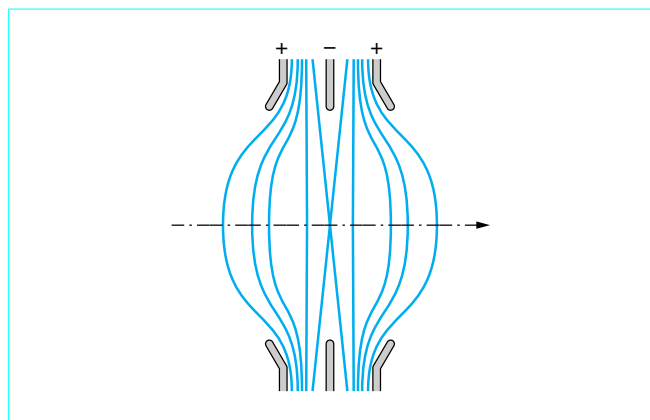


Figure 2 – Schéma de principe d'une lentille électrostatique

**lentilles électrostatiques** rendues plus efficaces en leur donnant une distribution symétrique, une électrode centrale étant portée à un potentiel différent (par exemple, 50 kV) de celui (identique) des électrodes externes (figure 2). Grâce aux surfaces équipotentielles alors produites, les électrons suivent des trajectoires analogues à celles que suivraient des rayons lumineux dans une lentille d'indice variable décroissant continûment du centre vers les faces, ce dont ne profitent que très rarement les opticiens.

Il est également possible de concevoir des **lentilles magnétiques**. Ce sont d'ailleurs de telles lentilles qui équipent les microscopes électroniques actuels. En effet, les électrons soumis à l'action d'un champ magnétique subissent une force qui modifie moins simplement leur trajectoire, cette force étant perpendiculaire au plan des vecteurs vitesse de l'électron et induction magnétique. Ces lentilles (figure 3) sont de gros électroaimants  $P_1$  et  $P_2$  à très faible entrefer percé d'un trou permettant le passage des électrons. La configuration des lignes de champ est telle que tous les électrons issus d'un point A d'un objet puissent converger en un même point A' du plan image, de même que toutes les trajectoires incidentes parallèles inclinées sur l'axe convergeraient en un même point du plan focal de la lentille.

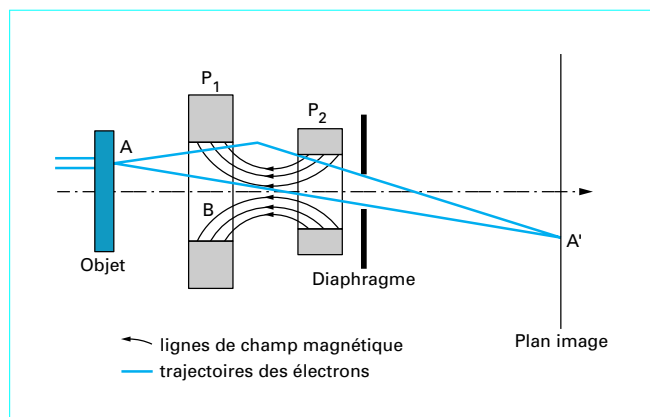


Figure 3 – Schéma de principe d'une lentille magnétique

## 1.2.2 Le microscope électronique

### 1.2.2.1 Description de l'instrument

Le schéma du microscope électronique (figure 4) est parfaitement analogue à celui du microscope optique.

Les électrons sont émis par un **filament** de tungstène (ou d'hexaborure de lanthane à travail d'extraction plus faible) porté à une température de l'ordre de 2 000 °C dans un canon à électrons (il existe également des canons à émission de champ fonctionnant sur un principe différent). Ce filament est, par rapport à une **anode**, porté à une tension négative de 100 à 200 kV pour les microscopes les plus courants et jusqu'à 3 MV pour des instruments assez rares. Ce potentiel définit l'énergie des électrons émis, c'est-à-dire leur vitesse ou leur longueur d'onde associée (de 40 à  $25 \times 10^{-4}$  nm pour les instruments courants). Le filament est entouré d'un cylindre, le **wehnelt**, dont le fond est percé d'un trou. Portée à un potentiel différent d'une centaine de volts de celui du filament, cette électrode est destinée, comme la grille dans le cas d'une lampe triode, à régler l'intensité du faisceau d'électrons. Celui-ci, au-delà de cette électrode, comporte une partie rétrécie (**cross-over**) constituant une source ponctuelle d'électrons placée au foyer d'une première lentille magnétique, le **condenseur**. Les lentilles magnétiques utilisées sont des électroaimants de révolution percés d'un canal axial à travers lequel passent les électrons. Elles sont constituées d'un bobinage de fils de cuivre parcourus par un courant créant un champ magnétique concentré dans l'entrefer grâce à la carcasse et aux pièces polaires.

En sortie du condenseur, le faisceau éclaire l'objet placé dans la **chambre objet**. Un porte-objet permet son déplacement dans son plan et son orientation. Un second système de lentilles magnétiques de courte distance focale (de l'ordre du millimètre), l'**objectif**, donne de l'objet une première image, agrandie de quelques dizaines de fois, portée au grandissement final par l'action des systèmes qui sont la **lentille intermédiaire** et la **lentille de projection**. L'image définitive, au grandissement de l'ordre de 10 000, se forme dans la chambre d'observation sur un **écran fluorescent** pouvant être observé visuellement, éventuellement à travers un système optique augmentant encore le grossissement, à moins qu'elle ne soit recueillie sur une **plaque photographique**.

Afin que la propagation des électrons se fasse suivant les lois qui ont été succinctement évoquées et ne soit pas perturbée par des molécules d'air ou de gaz, cet ensemble doit être enfermé dans une enceinte étanche où la pression soit au plus de l'ordre de  $10^{-5}$  hPa. Ce vide est généralement obtenu à l'aide d'une pompe primaire à palettes et d'une pompe secondaire à diffusion d'huile. La dégradation par les électrons des molécules organiques issues de la pompe à diffusion est source de contamination pour l'objet. Aussi est-il nécessaire de l'entourer de parois refroidies à l'azote liquide pour éviter cette contamination.

### 1.2.2.2 Performances de l'instrument et limitations

Utilisant une longueur d'onde environ dix à vingt mille fois plus petite que celles que met en œuvre le microscope optique, on pourrait s'attendre à ce que la résolution du microscope électronique soit améliorée dans le même rapport. Or, pratiquement, il n'en est rien et, dans les meilleurs des cas, on ne peut se satisfaire que d'une amélioration d'un facteur mille, soit une limite de résolution de l'ordre de 0,4 nm. Quelles sont les raisons de cet écart à la limite théorique ?

Comme tout instrument d'« optique », le microscope électronique n'est pas dénué d'aberrations provenant de celles, tant chromatiques que géométriques, de ses composants.

Les défauts d'alimentation électrique des lentilles font que leurs lignes de champ (ou leurs surfaces équipotentielles) ne sont pas réparties comme prévues par le calcul. Selon leur trajectoire, les électrons ne subissent pas tous le même champ de forces et, soumis à des potentiels différents, ils n'atteignent pas tous le récepteur



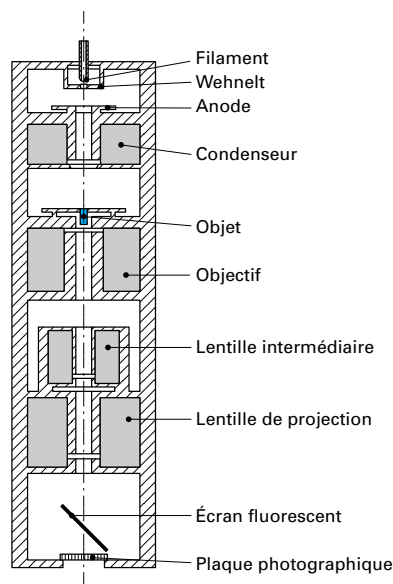


Figure 4 – Vue en coupe d'un microscope électronique par transmission

fluorescent ou photographique avec la même vitesse, donc avec une longueur d'onde associée identique. Le système n'est pas achromatique, mais présente des **aberrations chromatiques** tant de grandeur que de position. Avec des grossissements et des plans de mise au point différents (la distance focale, d'où le tirage d'une lentille, variant avec la longueur d'onde), ils contribuent à la formation d'une tache de diffusion autour de l'image de Gauss. La réduction de ces aberrations exige de sérieuses stabilisations des courants électriques produisant les champs.

Les lentilles entrant dans la composition du microscope électronique présentent également des aberrations géométriques. Théoriquement à symétrie axiale, elles transmettent des défauts de sphéricité des surfaces d'onde qui sont à l'origine de l'**aberration sphérique** contribuant au diamètre de la tache de diffusion proportionnellement à leur distance focale et au cube de leur ouverture numérique. La diminution de cet effet passe par celle de l'ouverture numérique du système, ce qui est également favorable à la correction du chromatisme, mais, réduisant le nombre d'électrons qui pourrait la former, ne l'est pas à l'intensité de l'image. Par ailleurs, à la construction, ces lentilles ne peuvent être réalisées de révolution parfaite. Ces écarts à la symétrie de révolution sont à l'origine d'un **astigmatisme** entraînant une dispersion de la mise au point de part et d'autre de son plan théorique. On tente parfois d'y remédier, au prix fort, par l'adjonction de lentilles supplémentaires, des *stigmatisateurs* de type cylindrique, alimentées par des courants de compensation réglables afin de rétablir la symétrie de révolution du système complet.

Mais, comme pour le principe optique, l'image n'est formée avec résolution que parce que l'objet, éclairé par une onde plane d'électrons, les diffracte dans toute l'ouverture de l'objectif. Or, pour tout système « optique » de demi-angle d'ouverture  $U$ , la limite de résolution, ou encore le rayon de la tache de diffraction qui en est très voisin, est égale à  $\lambda / 2n \sin U$ , si l'objet éclairé par une longueur d'onde  $\lambda$  est immergé dans un milieu d'indice  $n$  [2]. Ainsi, avec une ouverture totale  $2U$ , réduite à environ  $1^\circ$  pour les raisons évoquées ci-dessus, la limitation due à la **diffraction** (qui n'est pas une aberration mais une limite fondamentale) ne peut être meilleure que

soixante fois la longueur d'onde, soit environ 0,2 nm pour les instruments les plus courants.

Enfin, la limitation est également d'ordre mécanique. Pour obtenir une résolution donnée, il est évident que la stabilité de l'objet dans son plan doit être au moins du même ordre. On conçoit aisément la difficulté d'y parvenir, d'autant plus qu'à l'occasion de l'interaction électron-matière, le choc de l'électron peut provoquer la déformation de l'objet.

### 1.2.2.3 Préparation des échantillons

■ L'observation d'**échantillons biologiques** en microscopie électronique par transmission n'est pas sans poser quelques problèmes et impose certaines limites. Placés dans une enceinte où règne un vide poussé, ne pourront être examinés que ceux qui auront perdu leurs éléments volatils, notamment la grande quantité d'eau qu'ils contiennent normalement. De plus, aux fortes tensions d'accélération utilisées, les électrons n'ont que de faibles puissances de pénétration, ce qui implique des épaisseurs d'objet inférieures à 100 nm, plus faibles que celle des cellules biologiques en général. D'autre part, le contraste des images obtenues, lié à la profondeur de pénétration des électrons inversement proportionnelle au numéro atomique des éléments rencontrés, reste faible, comme l'est la faible quantité d'atomes lourds que contient l'objet. Il est donc très difficile, sinon impossible, dans ces conditions d'examiner des cellules vivantes en microscopie électronique.

Pour l'examen, les cellules préalablement déshydratées sont soumises à une **fixation**, par un aldéhyde par exemple, afin que leur structure soit consolidée, les molécules les composant étant maintenues en place les unes par rapport aux autres. Réalisées avec un ultramicrotome, les coupes assez fines de l'objet, nécessitent que celui-ci présente une dureté suffisante acquise par **inclusion** de résine. De même qu'en microscopie optique les objets sont rendus visibles par absorption de colorants, on améliore le contraste des images électroniques par une **coloration** de la préparation à l'aide de sels de métaux lourds (argent, plomb, tungstène, uranium). La préparation finalement obtenue est déposée sur une grille de cuivre introduite dans le microscope. Si les objets en examen sont d'épaisseur compatible avec la profondeur de pénétration des électrons (macromolécules, organites cellulaires isolés par fractionnement, virus ou bactéries par exemple), ils sont observés directement après dépôt sur une grille recouverte de carbone et coloration à l'acide phosphotungstique, ce qui permet une observation en fond noir favorable au contraste de l'image.

■ L'examen de la structure superficielle des **métaux** passe par l'obtention de **répliques** de leur surface par moulage sous pression d'une matière plastique ou évaporation d'une solution de collodion. Sur ce moulage, pouvant être épais et ultérieurement dissous, est déposée par évaporation sous vide une couche mince de silice constituant finalement la réplique observée en place de l'objet. La visibilité du relief ainsi enregistré est augmentée par la technique d'**ombrage** obtenu par métallisation sous vide de cette réplique à l'aide de métaux lourds (or ou chrome) très opaques aux électrons. Ce dépôt étant réalisé sous incidence rasante n'affecte que les pentes du relief faisant face à la direction d'évaporation, d'où une observation mettant en évidence la topographie de la surface par des ombres fictives dues à l'absorption des électrons par la couche métallique. Notons que cette technique d'ombrage s'applique également aux petits objets biologiques, déposés sur une membrane de collodion, dont les constituants organiques très transparents aux électrons sont aisément reconnaissables par la longueur de leur ombre.

### 1.2.3 Microscopie électronique à balayage

Si les microscopes électroniques que nous venons d'évoquer fournissent, dans leur mode de fonctionnement le plus courant, des images formées simultanément de tous les points d'un champ

objet, il en existe également formant les images point par point, le champ étant balayé par un pinceau d'électrons très fin. Schématiquement, dans un tel microscope électronique à balayage (MEB), fonctionnant en transmission par exemple (figure 5), un objectif forme une image très fine (de l'ordre de 0,2 nm) du *cross-over* du faisceau d'électrons fourni par un canon à électrons sur l'objet. Des bobines défectrices assurent la déviation périodique du faisceau dans deux directions perpendiculaires, de telle sorte que ce spot électronique balaie la partie observée de l'objet. Les électrons transmis, de nouveau soumis à l'action de bobines défectrices pour être dirigés dans une direction fixe, atteignent alors un multiplicateur d'électrons ou une surface photosensible émettant des photons transmis par l'intermédiaire d'un guide d'onde à un photomultiplicateur. L'intensité fournie par ce récepteur module le faisceau de balayage d'un moniteur à balayage synchrone de celui du faisceau d'électrons.

Ce type d'instrument est probablement plus répandu dans sa version travaillant par réflexion (figure 6) [3]. L'objet y est placé sur un porte-échantillon permettant son déplacement et son orientation, assurant son insensibilité aux vibrations et, parfois, peut être refroidi ou chauffé jusqu'à 1 000 à 1 500 K, éventuellement dans une enceinte de préparation annexe.

Les images les plus couramment produites sont formées par les électrons secondaires émis par la cible au cours de son bombardement par le faisceau d'électrons incidents.

D'autres types d'informations peuvent être également obtenues :

- images fournies par les électrons rétrodiffusés dans une direction donnée ;
- images fournies par les électrons absorbés, obtenues par différence entre courants incident et réémis ;
- analyse du rayonnement X émis par l'échantillon spectralement ou en énergie ;
- détection du rayonnement photonique ou infrarouge émis par l'échantillon bombardé par le faisceau d'électrons (phénomène de cathodoluminescence).

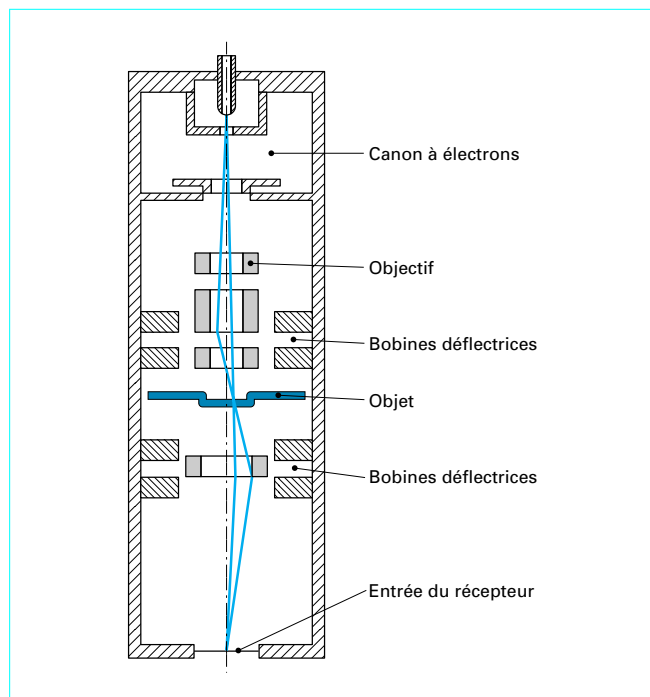


Figure 5 – Vue en coupe d'un microscope électronique à balayage par transmission

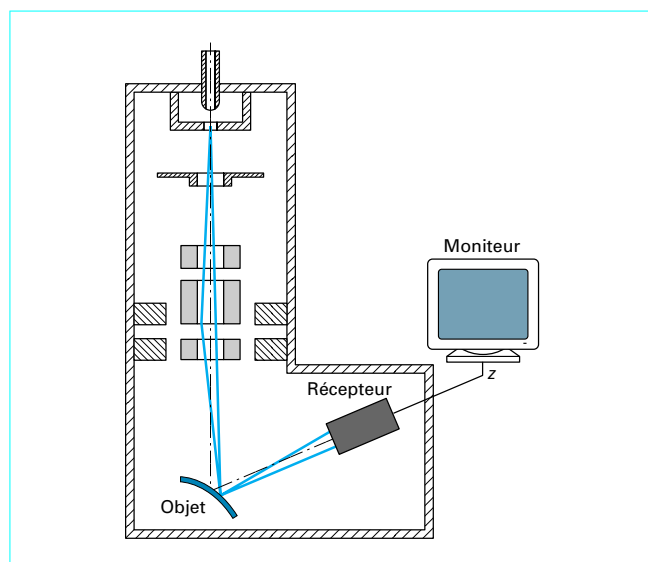


Figure 6 – Vue en coupe d'un microscope électronique à balayage par réflexion

Les échantillons isolants en observation sont fixés avec une colle conductrice à un porte-échantillon mis à la masse. Ils sont métallisés pour éviter les effets de charge mais, néanmoins, une perte de résolution est à noter à cause des charges résiduelles existant sous la couche métallisée, de même que les colles conductrices sont source de contamination. Leur observation, sauf à entraîner des difficultés d'interprétation, doit être faite sous des tensions assez basses de l'ordre de 1 à 3 kV. Quant aux échantillons métalliques, il est préférable de les soumettre à un effluage préalable qui a pour effet d'éroder les couches superficielles de contamination. Ils sont tenus entre des mors métalliques.

Dans ces instruments, les tensions d'accélération des électrons incidents sont en général réglables dans une gamme allant environ de 100 V à 30 kV afin d'être compatible avec le type d'analyse effectué. La résolution est donc également variable et dépend aussi du type de détection. Si, à faible tension, elle est déterminée par le diamètre du spot relativement important eu égard à la faible ouverture du faisceau et à la grande valeur de la longueur d'onde, à forte tension, elle est définie par la surface d'échappement des électrons rétrodiffusés. Sa valeur optimale est de l'ordre de 20 nm pour des tensions comprises entre 1 et 10 kV.

#### 1.2.4 Autres instruments apparentés au microscope électronique

On connaît d'autres instruments ou méthodes d'observation microscopique mettant en œuvre des faisceaux d'électrons ou de particules chargées incidents :

- la **sonde de Castaing** mise au point en 1951, analogue au microscope à balayage, plus particulièrement destinée au recueil des rayons X émis par la cible bombardée par les électrons ;
- le **microscope protonique** dû à Magnan dans les années 1950, peu répandu, utilisant des protons, particules plus lourdes donc auxquelles sont susceptibles d'être associées des longueurs d'onde plus courtes, à la place des électrons. Il est néanmoins difficile d'obtenir de petites sources intenses de protons. Ceux-ci sont, d'autre part, très absorbés et ne peuvent être recueillis sur un écran fluorescent ; une conversion protons-électrons est donc nécessaire. Notons que, dans le même ordre d'idée, a été développé par Müller en 1969 un microscope à émission ionique d'excellente résolution mais à champ objet limité à quelques dizaines de nanomètres ;

— le **microscope électroacoustique** pour lequel le faisceau d'électrons d'un MEB est pulsé à une fréquence de 10 kHz à 2 MHz. Son énergie étant absorbée près de la surface de l'échantillon, celui-ci s'échauffe périodiquement et donne naissance à une onde thermique se propageant dans le matériau qui se dilate, créant ainsi une pression générant une onde acoustique à la fréquence de la pulsation transmettant à un transducteur des informations sur les défauts du matériau. La résolution spatiale de ce type d'instrument est du domaine du micromètre.

### 1.3 La microscopie acoustique

Un nouveau type de microscopie fait son apparition dans les années 1970 sous l'impulsion de Quate. Elle ne s'intègre pas aux classes que nous avons évoquées. Ni corpusculaire, ni électromagnétique, elle utilise des vibrations acoustiques. Sa résolution latérale n'est pas encore très bonne, de l'ordre de celle de la microscopie optique, mais elle permet l'obtention d'images en profondeur. Les ultrasons offrent l'avantage d'apporter des informations sur les propriétés mécaniques de la matière. À une fréquence de l'ordre du gigahertz, eu égard à la vitesse du son dans les milieux solides ou liquides, leur longueur d'onde est de l'ordre du micromètre, ce qui fixe celui de leur domaine de résolution. Pratiquement (figure 7), un faisceau d'ultrasons est produit en soumettant à un signal électrique modulé, en provenance d'un générateur G, un transducteur constitué d'un cristal piézoélectrique très mince placé entre électrodes métalliques. Cet ensemble  $T_1$  est collé à une lentille Cd, par exemple en saphir particulièrement transparent aux ultrasons, servant de condenseur afin de focaliser le faisceau d'ultrasons sur l'objet A immergé dans une goutte de liquide comme de l'eau. Ce faisceau est repris par une lentille objectif Ob pour redonner par l'intermédiaire d'un transducteur  $T_2$  un signal électrique servant à moduler le faisceau d'un tube moniteur M dont on peut assurer un balayage synchrone avec celui de l'objet. Sous réserve de balayer un faible champ, de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, des images au grandissement de 10 000 peuvent être obtenues.

Notons que l'onde acoustique réfléchiée par l'objet peut également être recueillie par le transducteur  $T_1$  et fournir une image par réflexion de l'objet, complémentaire de la précédente, analogue aux images classiquement observées en échographie médicale, offrant l'intérêt de déceler les parties de l'objet entièrement transparentes aux ultrasons apparaissant alors en noir dans les images par réflexion positives. Ce type de microscopie, avec objet immergé dans l'eau, se prête particulièrement bien aux observations biologiques. Malheureusement, si ce liquide peut être utilisé en faible épaisseur, il présente l'inconvénient d'être très absorbant aux ultrasons, ce qui limite la résolution dans le meilleur des cas à 0,1  $\mu\text{m}$ . D'autres fluides peuvent être utilisés, permettant de diminuer la longueur d'onde. Certains auteurs signalent l'emploi de l'hélium superfluide à 0,45 K et jusque 0,05 K, température à laquelle les ultrasons ne sont plus pratiquement absorbés, sans avoir obtenu d'amélioration très sensible de la résolution. À cette température, il n'est plus question d'observer des objets biologiques, mais des observations ont été mentionnées sur des tissus congelés immergés dans de l'argon cryogénique.

En fait, la limitation due à l'absorption trouve son explication dans la notion d'*impédance acoustique*, produit de la masse volumique du milieu par la vitesse de l'onde qui s'y propage. Littéralement, dans les expressions d'énergie transmise et réfléchiée à l'interface de deux milieux, cette quantité spécifique à chaque milieu est strictement analogue à l'indice de réfraction en optique. Pour que la transmission soit optimale, ce qui permet une investigation interne d'objets épais, notamment recherchée pour l'inspection des micro-circuits électroniques, les impédances acoustiques de l'objet et du fluide d'immersion doivent être adaptées, ce qui semble possible par l'emploi de métaux liquides tels le gallium ou le mercure.

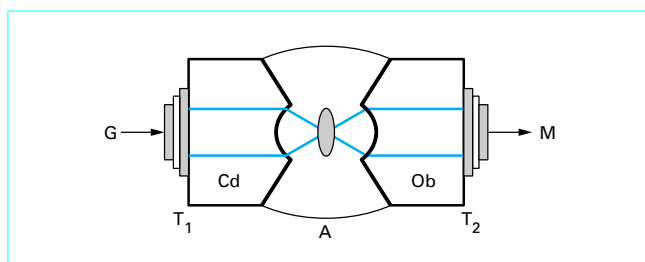


Figure 7 – Schéma du système de lentilles (condenseur et objectif) d'un microscope acoustique

### 1.4 Les microscopies à champ proche

Le développement de ces microscopies est encore très récent. C'est en 1982 que Binnig et Rohrer en démontrent les premières possibilités, ce qui leur vaudra le prix Nobel en 1986. Leurs travaux portent sur le premier type d'instrument de cette nouvelle famille mettant en œuvre l'**effet tunnel** qui se manifeste lorsqu'une particule doit traverser une barrière de potentiel où son énergie totale est inférieure à son énergie potentielle. Cela est une conséquence de la mécanique quantique pour laquelle l'électron d'un atome métallique est décrit par une fonction d'onde périodique au sein du métal et exponentiellement décroissante à l'extérieur. Si deux métaux sont suffisamment proches l'un de l'autre (à quelques dixièmes de nanomètre), les fonctions d'onde de leurs électrons situés de part et d'autre de la barrière se recouvrent partiellement. Ils ont donc une probabilité non nulle de traverser l'isolant, ce qui leur est rigoureusement interdit par la mécanique classique. Si l'on applique une différence de potentiel  $V$  entre les deux métaux, un courant électrique  $I$  circule par effet tunnel et, en première approximation, pour le cas de deux surfaces métalliques planes, il est de la forme :

$$I \propto V \exp(-ks)$$

où la constante  $k^2$  est, pour de faibles tensions et de faibles distances  $s$ , une moyenne des travaux de sortie caractéristiques des deux électrodes. Cette expression, qui met en évidence la dépendance exponentielle du courant tunnel  $I$  avec la distance  $s$  entre électrodes, est à la base de la conception de cette nouvelle microscopie.

■ En **microscopie par effet tunnel** (STM : *scanning tunnelling microscopy*), la surface d'un conducteur ou d'un semi-conducteur est « palpée » avec une pointe très fine à une distance de l'ordre du nanomètre [4]. En appliquant une différence de potentiel de l'ordre de un volt entre la surface et cette pointe, des électrons transitent par effet tunnel depuis l'échantillon vers la pointe et donnent naissance à un courant électrique de l'ordre de un nanoampère, porteur d'information sur la distance de la pointe à l'échantillon permettant donc, par balayage, d'établir sa topographie. La réalisation de l'instrument, qui servira de modèle à celles des instruments qui en découleront suivant d'autres principes, fait donc appel à des composants permettant d'assurer des déplacements à l'échelle nanométrique (figure 8).

La pointe, en tungstène par exemple, est soumise à une différence de potentiel  $V$  par rapport à l'échantillon. Effilée électrochimiquement afin de ne pas présenter d'aspérités et d'être si possible monoatomique, elle est solidaire d'un trièdre de céramiques piézo-électriques  $C_x C_y C_z$  assurant le balayage dans les deux directions  $x$ ,  $y$  et le positionnement de la pointe par rapport à l'échantillon. En effet, outre l'approche nécessaire de la pointe, qui peut faire appel en premier lieu à un autre système, pour établir la topographie de l'échantillon on ne procède pas à la mesure du courant tunnel à hauteur de pointe constante, mais on préfère, par sécurité et pour une meilleure sensibilité, opérer à courant constant et asservir la posi-



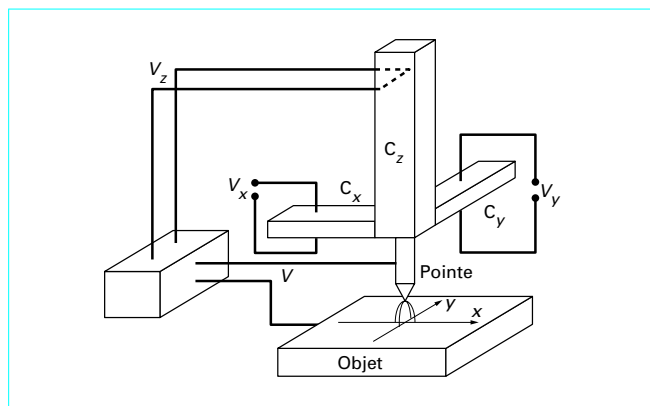


Figure 8 – Schéma de principe d'un microscope à effet tunnel

tion de la pointe par l'intermédiaire de la tension  $V_z$  appliquée à la céramique  $C_z$  pour assurer une distance constante entre pointe et échantillon, la topographie étant déduite de l'enregistrement de cette tension de commande. Notons que, pour une distance de 0,5 à 0,7 nm, suivant la tension appliquée  $V$ , le courant de consigne est de l'ordre du nanoampère et que, du fait de sa variation exponentielle avec la distance, il décroît d'un ordre de grandeur si la distance augmente de 0,1 nm. Le maintenir à une valeur à 10 % près assure une incertitude sur la distance de l'ordre de 5 pm pouvant être considérée comme l'ordre de grandeur de la résolution longitudinale du procédé. La résolution latérale dépend évidemment de la qualité de la pointe ; qu'elle présente des aspérités et chacune d'elle se comportera comme une pointe et apportera sa contribution au courant tunnel ; que son rayon de courbure soit trop grand et plusieurs de ses atomes interagiront avec ceux de l'échantillon. L'interprétation théorique est assez délicate et les auteurs s'intéressent surtout à la résolution longitudinale tout en pouvant constater sur leurs résultats expérimentaux que l'on « voit » les atomes, ce qui indique une résolution latérale du domaine du nanomètre. La topographie obtenue par cette méthode de microscopie doit néanmoins être considérée avec quelques réserves. En effet, le courant tunnel ayant pris naissance ne dépend pas seulement de la distance pointe-échantillon, mais aussi des propriétés électroniques de la surface. Les forces pouvant être produites par l'action d'un champ électrique intense obtenu en approchant davantage la pointe peuvent même lui permettre de « saisir » un atome de l'échantillon pour aller le déposer en un autre site, d'où une possibilité pour l'instrument d'être un outil dans le domaine de la nanotechnologie.

■ La nécessité de séparer ces différents effets afin d'interpréter les images obtenues, le fait que la technique n'est pas applicable aux matériaux non conducteurs, la constatation qu'à ces faibles distances l'intervention de forces d'attraction-répulsion ne pouvait être négligée, ont amené Binnig, Quate et Germer à introduire la **microscopie à force atomique** (AFM : *Atomic force microscopy*). Aux distances de quelques dixièmes de nanomètre utilisées en STM, des forces s'exercent entre les atomes de la pointe et ceux de la surface. D'abord répulsives, elles s'annulent à une distance  $\sigma$  puis deviennent d'autant plus répulsives que la distance  $s$  décroît, le potentiel d'interaction  $V$  entre deux particules étant en première approximation :

$$V \propto (\sigma/s)^2 - (\sigma/s)^6$$

Les forces exercées, observées en AFM, sont de quelques nanonewtons en attraction et peuvent atteindre une centaine de nanonewtons en répulsion.

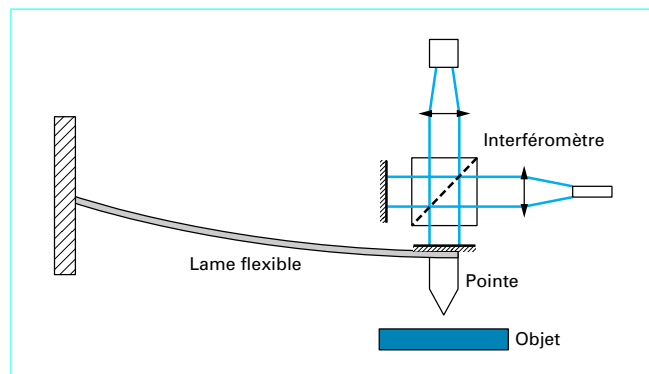


Figure 9 – Schéma de principe d'un microscope à force atomique doté d'un interféromètre optique pour le contrôle de la distance de la sonde à l'échantillon

Les instruments issus de ce concept (figure 9) restent très proches des précédents, les mouvements dans les trois directions agissant sur l'objet comme ce peut être le cas en STM et l'asservissement du signal recueilli à une consigne fixe traduisant une distance constante étant réalisés suivant les mêmes principes. La pointe que l'on souhaite de même qualité qu'en STM, en diamant ou plus généralement en silicium monocristallin, est solidaire d'une lame flexible dont les déplacements sont enregistrés pour rendre compte de la topographie de l'échantillon. La saisie de ces déplacements peut être le type *électrique* par effet capacitif ou bien souvent en les suivant à l'aide d'un STM, ou de type *optique* par la détection de la déflexion d'un faisceau lumineux ou par interférométrie normale ou différentielle. Cet instrument, même pour des échantillons isolants, ne donne pas nécessairement uniquement des informations sur la seule topographie. L'effet, surtout dans le mode répulsif, peut induire une déformation de l'objet ou de la pointe et, en cas d'existence d'une couche de contamination, celle-ci participe également à la déflexion de la lame flexible. Par contre, appliqué aux matériaux conducteurs, associé à un STM, il complètera utilement l'ensemble des informations sur les propriétés d'un matériau, qu'elles soient intrinsèques ou relatives à ses interactions avec un champ de potentiel.

■ Certaines propriétés des matériaux ne sont pas accessibles directement à ces instruments comme notamment les propriétés optiques des diélectriques pour lesquelles une sonde optique peut être utilisée. S'il ne lui est pas interdit par ailleurs d'être à l'origine d'interactions lumière-matière, si celles-ci ne sont pas violentes la sonde optique permet de déterminer la topographie d'une surface quelle que soit la nature du matériau qu'elle limite. Ces considérations ont milité en faveur de la **microscopie optique en champ proche** (STOM : *scanning tunnelling optical microscopy*) apparue sous l'impulsion de Fisher peu après le STM. Cette méthode est plus amplement détaillée dans l'article [R 6 714] de ce traité [5].

■ Moins développés, mais adaptés à des recherches particulières concernant les propriétés de la matière, existent d'autres instruments tels les **microscopes à force magnétique** (MFM : *magnetic force microscope*) ou les **microscopes à flux d'ions** (IFM : *ionic flux microscope*) plus particulièrement adaptés pour l'étude des solutions. Mais ce qui est le plus remarquable aujourd'hui, c'est l'association de plusieurs de ces microscopes donnant naissance à des **systèmes hydrides** permettant une meilleure interprétation des images obtenues par discrimination des différents effets. On peut citer couramment, comme déjà évoqué plus haut, des instruments associant STM et AFM, ou AFM et STOM utilisant une pointe unique en nitrure de silicium permettant d'atteindre la topographie de la surface par AFM et la distribution du champ lumineux en son voisinage perturbé par le relief par STOM.

## 2. Les applications de la microscopie

### 2.1 Microscopie optique

Le microscope optique, compte tenu de ses possibilités en matière de résolution (inférieure au micromètre) et de champ (environ entre 0,2 et 2 millimètres) et de son ancienneté historique, est utilisé dans nombre de disciplines variées.

■ C'est probablement dans tout ce qui concerne la **biologie** que son usage est le plus répandu. Pour l'étude des cellules, des tissus, des microbes tant en recherche que pour aider au diagnostic, les objets, dont les dimensions intéressantes vont de quelques micromètres au demi-millimètre, se présentent sous forme de coupes très minces ou de milieux très aplatis entre deux lames. Ainsi ces *préparations*, rendues transparentes, nécessitent un **éclairage par transmission**. Elles sont alors visibles par leurs variations d'absorption naturelle à moins qu'elles ne doivent être provoquées par *fixation* de colorants spécifiques. La préparation est donc obtenue par le procédé dit de *coupe* et *coloration*, la coupe, après enrobage dans un milieu comme la paraffine, étant effectuée à l'aide d'un *microtome*, sorte de « machine à découper le jambon » susceptible de fabriquer des tranches d'une épaisseur de l'ordre de quelques micromètres, les micromanipulations éventuelles (découpes, incisions, injections...) se faisant avec un *micromanipulateur*, loupe binoculaire associée à un dispositif porte-outils assurant leur maniement sous objectif. Le traitement par coloration n'a pas seulement pour effet de modifier, ou d'apporter, des variations de transmission, mais, notamment en **histologie**, les colorants choisis ont des effets spécifiques sur les différentes structures permettant effectivement de les différencier et de déterminer leur nature chimique (*histochimie*). Il est ainsi possible de suivre les modifications expérimentales ou pathologiques que subissent les tissus ou les cellules. Si, en **cytologie**, les cellules à étudier sont naturellement en suspension, tels les globules sanguins, ou susceptibles de mobilité, telles les cellules de la rate, on en pratique un *frottis* ou une *empreinte d'organe* sur une lame de verre subissant fixation et coloration, afin d'obtenir une couche monocellulaire, ce qui est important en **hématologie**, mais non sans risque de déformation des cellules. La **parasitologie** et la **microbiologie** sont aussi des secteurs riches d'application, les prélèvements étant là aussi étalés sur une lame, fixés et colorés, leur capacité de fixation ainsi que l'étude morphologique permettant de déceler et d'identifier les micro-organismes contenus dans la préparation. Les techniques de **manipulation génétique** sont en pleine expansion. En utilisant un **statif inversé**, les ovocytes sont observés et manipulés au fond de leurs cuves de culture. Si la majorité de ces applications sont l'œuvre de laboratoires de recherche, on connaît pour nombre d'entre elles un développement non négligeable pour l'aide au diagnostic au sein des très nombreux laboratoires d'analyse médicale qui ont d'ailleurs adopté pour emblème le serpent du caducée s'enroulant autour d'un microscope. Ils pratiquent quantité de *numérations* afin, par exemple, d'estimer le nombre d'hématies par millimètre cube de sang ou travaillent sur des coupes histologiques de tissus obtenues à partir des biopsies. À ce titre, le microscope optique est également un auxiliaire précieux de la salle d'opération, de même que la **loupe binoculaire**, instrument associant deux corps de microscope observant l'objet, en l'occurrence le champ opératoire, sous deux angles de vue convergents afin d'en recueillir une représentation stéréoscopique.

Ce **microscope biologique** n'a pas que des usages d'observation. Associé à un laser par exemple, il permettrait l'irradiation ponctuelle des cellules sous radiation donnée afin de provoquer des interactions lumière-matière locales (excitation de fluorescence, par exemple), de permettre la microchirurgie, d'assurer la coagulation... La

longueur d'onde de la lumière utilisée peut également être choisie pour ses effets particuliers. Il en est ainsi de l'utilisation de l'ultraviolet, pas seulement pour améliorer la résolution, mais aussi parce que les propriétés d'absorption de certaines de ses longueurs d'onde, non sans danger pour la matière biologique, sont spécifiques à certains constituants. C'est le cas de l'absorption spécifique dans la *bande de Soret* de l'hémoglobine. Le proche ultraviolet est également utilisé pour exciter la *fluorescence* [2], qu'elle soit *primaire*, apparaissant spontanément, ou *secondaire*, après coloration à l'aide de *fluorochromes* spécifiques, permettant, par exemple, de marquer les protéines dans la recherche des antigènes.

Si l'**éclairage fond noir** [2] est peu utilisé, quoiqu'il permette de visualiser de très petits objets de faible contraste tels les tréponèmes ou les flagelles bactériens, d'autres méthodes de visualisation ont eu un succès retentissant en biologie et y connaissent un développement universel. Les différences locales de facteurs de transmission des objets biologiques sont pratiquement inexistantes à l'état naturel. Pour fabriquer des **objets d'amplitude** présentant de telles différences, la coloration nécessaire, qui modifie bien entendu la nature de l'objet, est souvent un procédé destructif ne permettant pas de conserver la matière biologique en vie. Par contre, les variations d'épaisseur locale et d'indice de réfraction en font des **objets de phase**. C'est surtout à la biologie que l'on doit la découverte et le développement de leurs méthodes d'observation que sont le **contraste de phase** et le **contraste interférentiel** [2]. Le **microscope polarisant** [2] peut être également utilisé par le biologiste, les anomalies de certaines structures amorphes (fibrillaires, lamellaires ou granulaires), formées de molécules ou de micelles orientées dans des directions préférentielles, pouvant être détectées par la mesure de la biréfringence provoquée par ces arrangements.

■ D'autres grands domaines d'utilisation du microscope optique sont ceux de la **métallographie** et de la **mécanique** pour l'examen des surfaces, que les matériaux soient massifs ou en couche mince. Celles-ci, préalablement *polies*, sont soumises à une *attaque chimique* acide ou basique pour mettre en évidence, par formation de sels de colorations spécifiques, les différents constituants, leurs grains et joints de grain, leurs discontinuités, les figures cristallines. L'examen impose un **éclairage par réflexion** et l'examen en fond noir permet souvent seul de détecter certains défauts. La mécanique, pour sa part, s'intéresse à l'étude des états de surface, c'est-à-dire à leur microgéométrie (*rugosité*), ce qui entraîne l'application de méthodes de mesure particulières telles la *coupe optique* et surtout la *micro-interférométrie*, ou à leur dureté (*microdureté*), calibrée à l'aide de *microduromètres* [2]. Dans ces usages, les objets, qui à l'état naturel ne présentent que de faibles variations de facteur de réflexion, ne sont visibles que grâce à cette coloration résultant de l'attaque chimique, qui a donc la propriété de modifier localement les caractéristiques du matériau. Par contre, le relief de ces objets en fait des **objets de phase** redevables de ces méthodes d'observation que nous avons évoquées précédemment. Ainsi le **microscope à contraste interférentiel par réflexion** ainsi que la loupe binoculaire sont-ils des instruments très répandus dans les salles blanches des laboratoires de recherche et ateliers de fabrication de l'industrie de la **microélectronique**, les microcircuits actuels étant de dimension et exigeant une résolution auxquelles les caractéristiques du microscope optique sont bien adaptées. Le **microscope polarisant** trouve application soit pour les études de l'état cristallin des matériaux, soit pour la détermination de la partie imaginaire de leur indice de réfraction par mesure de leur *biabsorbance*. Enfin cet instrument qu'est le **microscope métallographique** est parfois aussi un outil permettant, en association avec un laser, les micro-usinages (perçages, découpes), ou les asservissements de position ou de suivi.

■ Nous n'insisterons pas sur les utilisations du microscope optique en **minéralogie**, **pétrographie**, **cristallographie**, **chimie**, ou, notamment, la mesure des biréfringences, le repérage et la mesure des directions d'axe, la détermination des retards optiques locaux concernant les divers cristaux constituant l'objet sont les tâches du **microscope polarisant**, qu'il travaille en transmission ou par réflexion. Elles sont encore d'importance non négligeable en recher-

ches minières et pétrolières et dans les industries s'y rattachant. Enfin, en **métrologie**, outre les applications sous-entendues dans ce qui précède, le microscope contribue à la détermination des *dimensions* des objets observés et de leurs constituants y compris leurs épaisseurs, à leur *réfractométrie*, à leur *analyse spectrale* d'absorption, de transmission ou d'émission naturelle ou stimulée.

## 2.2 Microscopie électronique

■ Le **microscope électronique**, avec une résolution comprise environ entre 0,4 et 2 nm pour un champ nécessairement limité, par le nombre de points par ligne séparés sur un écran fluorescent classique, de 0,2 à 1 µm, travaille par rapport au microscope optique à échelle en moyenne 1 000 fois plus grande. Il faut remarquer qu'il n'existe pas, au niveau instrumental, de possibilité d'effectuer de manière progressive ce passage à l'observation d'un objet qui aurait comme dimension celle de l'image fournie par la méthode précédente aux mêmes conditions d'agrandissement. Dans ces conditions, le franchissement d'un tel pas amène au seuil d'un autre monde.

● En **biologie**, les objets, constitués de macromolécules contenant surtout des atomes relativement légers, sont d'épaisseur compatible avec la distance de pénétration des électrons, encore qu'un compromis soit nécessaire quant à leur énergie pour limiter leur effet destructeur. Grâce au changement d'échelle, il est possible d'étudier beaucoup plus finement l'organisation des structures biologiques et l'arrangement de leurs édifices macromoléculaires. Dans cette discipline, l'usage du microscope électronique est plus du domaine de la recherche que de celui de la routine. En **cytologie**, **histologie**, **pathologie**, l'anatomie des cellules observées sera mieux connue. Outre que l'on détaille les plus petits organites détectés en microscopie optique telles les mitochondries, il en a été découvert d'autres beaucoup plus petits tels les ribosomes apparaissant avec leur anatomie propre que l'on qualifiera d'*ultrastructure*. Certains états pathologiques entraînant la modification morphologique de certains organites peuvent être alors expliqués et c'est à l'échelle des ultrastructures que l'on peut situer le lieu de synthèse de certaines macromolécules comme les protéines dont on peut suivre les déplacements. C'est la microscopie électronique qui a permis de découvrir que les cellules sont formées de compartiments, séparés par des parois ou membranes, délimitant des domaines d'activité physiologique différents, et en examinant les tissus que les cellules pouvaient adapter leur anatomie aux fonctions qu'elles devaient remplir. Des méthodes cytochimiques ou immunochimiques permettent la localisation de constituants chimiques comme les polysaccharides ou la détection d'anticorps. En **biochimie**, on utilise le microscope électronique pour vérifier la pureté des fractions cellulaires et en reconnaître les constituants ; en **biologie moléculaire**, on a accès à la forme des macromolécules, qu'il s'agisse des ADN, des protéines fibreuses, d'édifices macromoléculaires ; en **virologie**, on met en évidence la morphogenèse des virus et on a pu découvrir le rôle de certains virus dans la tumorigénèse de cancers animaux.

Dans les autres secteurs que la biologie, le microscope électronique est riche d'applications, notamment grâce à ses différents modes de fonctionnement. En effet, outre sa capacité de fournir directement des images formées par le faisceau d'électrons, il peut fournir dans un plan pupillaire, c'est-à-dire dans le plan focal image de son objectif, le spectre de diffraction de l'objet mettant en évidence ses périodicités, permettre la spectroscopie des électrons transmis traduisant les pertes d'énergie locales ou la spectroscopie des rayons X produits par le bombardement d'électrons.

● En **métallurgie**, le microscope électronique est davantage entré dans les pratiques industrielles. Parmi ses usages, nous citerons la visualisation des *dislocations*, le repérage des différentes *phases cristallines*, l'analyse de la *structure cristalline*, l'étude de la *résistance des alliages à la température*, la détection d'*inclusions de*

*graphite*, le contrôle du *trempe des alliages d'acier*, l'observation de leurs *transformations austéniques* et de leur *structure perlée*, l'étude des phénomènes de *recristallisation*, des mécanismes de *fracture*, des *déformations plastiques*. De nombreuses autres applications industrielles peuvent être mentionnées comme la mise en évidence des phénomènes de *nucléation* et de *croissance des cristaux*, des *réactions de surface* des métaux, d'*hydratation des silicates*. De façon générale, la microscopie électronique concerne encore des matériaux aussi différents que les silicones, le papier, le diamant, les fibres de nylon, les plastiques ou l'amidon.

● En **physique du solide**, dont certains laboratoires travaillent en mettant au point des **microscopes électroniques à haute tension** (de 1,5 à 3 MV), on cherche essentiellement à « voir » les atomes. Avec une résolution pouvant atteindre 20 pm, on a obtenu, par exemple, de très belles images des atomes les plus lourds (cuivre et chlore) des cristaux de phtalocyanine chlorée du cuivre, de ceux de réseaux cristallins de silicium ou de niobium. À ce niveau, il est possible de visualiser les défauts existant dans un réseau cristallin, que ce soient des défauts ponctuels par manque d'un atome, des défauts de linéarité traduisant une dislocation due au glissement d'un plan cristallin sur un autre ou des défauts de surface tel le joint de grain séparant deux cristaux désorientés. La détection des différentes phases cristallines est bien entendu également accessible de même que celle de la présence d'atomes étrangers.

■ Le **microscope électronique à balayage** [3] n'a que très peu d'application en *biologie* si l'on excepte l'observation après métallisation, grâce à l'émission d'électrons secondaires, de la forme superficielle de divers objets tels des lymphocytes, des grains de pollen, des protozoaires ou des organes de petits animaux. Grâce à la grande profondeur de champ, les images, avec une résolution latérale de 10 nm, offrent une impression de relief saisissante. Par contre en *métallographie*, avec des matériaux conducteurs, il offre un grand champ d'application au stade industriel. Il permet, par la réception des électrons secondaires, la visualisation avec une résolution de 5 nm de la topographie d'échantillons pouvant être de volume non négligeable. L'analyse des rayons X émis à l'occasion du balayage permet d'en déterminer la composition. Sur une surface propre dénuée de relief, l'image due aux électrons secondaires est une représentation de ses variations de potentiel, traduisant celles de ses propriétés physico-chimiques entre points voisins. Ce type de résultat intéresse également les matériaux semi-conducteurs si l'on opère un filtrage en énergie. En *cristallographie*, les effets sur le signal provenant des interférences entre ondes électroniques directe et diffractée permettent d'atteindre certaines propriétés du cristal : distribution des orientations de grains d'échantillons laminés ou frittés, mesure des paramètres de sa maille, existence de dislocations ou de macles. Outre la microanalyse X, celle des électrons Auger est possible, de même que la mesure des cathodoluminescences.

■ La **sonde de Castaing** a été plus particulièrement développée pour les besoins de la *métallurgie* afin de déterminer, par analyse spectrale des rayons X émis par un échantillon métallique soumis à bombardement électronique, les différents constituants de cet échantillon et en mesurer la concentration. Elle peut être utilisée en *biologie* pour déterminer, au niveau des microstructures, la nature des concrétions minérales ayant pu s'accumuler dans les cellules à l'occasion, notamment, de pathologies pulmonaires et rénales.

## 2.3 Microscopie acoustique

Ce type de microscopie ne connaît pas encore de développement très spectaculaire. Nous avons vu dans sa présentation les quelques avantages qu'en attendent ses auteurs (cf. § 1.3). Ils semblent surtout, afin de démontrer les avantages de cette instrumentation par rapport aux microscopies optique et électronique, insister d'une part sur le fait qu'il est possible d'effectuer des observations sur des spécimens sans qu'il soit nécessaire de procéder à une attaque chi-

mique ou à une coloration, d'autre part sur l'absence d'interaction d'une onde acoustique avec la matière, ce qui n'est peut-être pas évident à toute fréquence pour les matériaux biologiques. Une résolution latérale meilleure qu'en optique semble difficile à atteindre mais, par contre, l'analyse en profondeur de matériaux optiquement opaques est possible. Cela est un avantage d'un intérêt certain pour l'inspection des microcircuits implantés sur plusieurs couches dont il est possible de vérifier l'adhérence et dont on peut suivre les migrations d'atomes, dues aux fortes densités de courant transitant dans les circuits de faible section, provoquant des zones d'accumulation. Cette profondeur de champ peut être également mise à profit dans l'observation de matériaux transparents, notamment dans le secteur biomédical pour l'observation d'organes ou de tissus. Dans ce domaine, le microscope acoustique peut entrer en concurrence avec le microscope optique pour l'analyse des biopsies en salle d'opération, les acteurs étant devenus familiers de l'interprétation des échographies et sa mise en œuvre étant plus simple *in situ* que celle d'un microscope optique à balayage pouvant offrir une bien meilleure résolution. Par contre, l'observation de cellules ou de coupes biologiques sans coloration ne peut être un argument en sa faveur sauf à ignorer les méthodes de contrastes de phase et interférentiel permettant l'observation de la *matière vivante* à la température du corps ou ambiante, ce qui est plus significatif qu'en état de congélation à 85 K nécessité par le choix de l'argon liquide comme milieu d'immersion transmetteur du son.

## 2.4 Microscopies à champ proche

L'emploi des divers microscopes à champ proche n'est pas encore du domaine de la routine. Il reste au stade des laboratoires de recherche qui, le plus souvent, n'utilisent pas les rares instruments commerciaux existants mais préfèrent construire leur propre matériel, ce qui tend à prouver que les solutions les mieux optimisées ne sont pas encore disponibles. Eu égard à l'échelle d'ordre atomique à laquelle il travaille, on cherche notamment à rendre l'instrument moins sensible aux vibrations d'origine mécanique en faisant appel à des techniques de modulation de la tension électrique, de la distance de la pointe ou du flux lumineux. On conçoit des instruments travaillant sous vide ou à l'intérieur d'un cryostat, associant deux ou trois méthodes de champ proche, ou l'une d'elle à un microscope optique. En ce qui concerne les applications, elles intéressent plus particulièrement la **physique des surfaces** et la vocation des divers microscopes à champ proche est la topographie, pas seulement au sens dimensionnel du terme, des surfaces observées avec une résolution de l'ordre de l'atome.

■ En **STM**, outre la **topographie des surfaces métalliques** à l'échelle atomique, d'intérêt évident car les arrangements atomiques en surface sont différents de ceux des plans cristallographiques, on a accès à la cartographie de leurs **états électroniques** (vides ou pleins). Localement, il est possible de déterminer les constantes **diélectriques** ou **potentiométriques**, d'étudier la structure des **domaines ferroélectriques**. Dans le domaine des **semi-conducteurs**, on construit les images des **bandes interdites** ou celles des **états vides ou pleins** à leur surface. Ces divers accès à des informations différentes, souvent simultanées, imposent des besoins d'interprétation ou de correction d'images faisant appel à des modèles utilisant les propriétés de la chimie théorique. En **biologie**, secteur encore peu utilisateur, des images ont déjà été obtenues de **chaînes d'ADN** ou de **têtes de virus** sous réserve de les corriger d'un « facteur de forme » propre à celle de l'apex de la pointe qui a pour action de déformer la surface de l'objet.

■ En **AFM**, les interprétations peuvent être délicates, compte tenu des différentes forces pouvant intervenir : *Van der Waals, électrostatique, magnétostatique, capillarité, hydrodynamique*. La distance de la pointe devant être plus faible qu'en STM, atteindre la **topographie** des surfaces ne pose pas de problème s'il existe une forte cohésion locale. Par exemple, l'arrangement des adsorbats est mis en évidence s'ils sont chimiquement liés à la surface ou stabilisés sous

forme de couche. Par contre, l'action de la pointe peut entraîner la déformation si la cohésion du matériau n'est assurée que par des forces à longue portée comme pour les cristaux ioniques (KBr, NaCl...). Avec ce type d'instrument, la **double chaîne d'ADN** et certaines **protéines** ont pu être topographiées.

■ Le **STOM** est particulièrement bien adapté à la topographie des surfaces de **matériaux non conducteurs**. Si la rugosité de la surface peut être localement négligeable ou connue par ailleurs, l'accès aux **variations de l'indice de réfraction** d'un matériau transparent est une possibilité intéressante. Enfin, par sa conception, apte à capter des ondes lumineuses émises par des sources de dimension submicronique, il apporte sa contribution en **physique des solides**, permettant par exemple de discriminer la photoluminescence émise par un « fil quantique » de celle provenant du « puits quantique » l'entourant.

Si, avec ces instruments (plus particulièrement STM ou AFM), des études sont menées afin d'établir localement une **spectroscopie électronique**, on s'intéresse beaucoup à la possibilité de **marquage de bits** de surface de l'ordre de un nanomètre carré ou de **déplacements d'atomes** en cours de balayage, d'intérêt certain dans les techniques de **nanoélectronique** ou **nanochimie**. Ces modifications locales que sont ces déplacements se font sous l'action de contraintes apportées par chauffage local par le courant tunnel, interaction mécanique ou variation de polarisation sous l'effet du champ électrique existant entre pointe et surface.

## 3. Conclusions et perspectives

### 3.1 Intercomparaison des différentes microscopies

La microscopie est censée donner des images agrandies d'objets transparents ou réfléchissants avec des résolutions latérale et longitudinale en variation inverse de cet agrandissement. Classiquement, quand le microscope utilise une onde électromagnétique vraie (lumière ou rayons X) ou associée à des particules en mouvement (généralement des électrons), ou encore une onde propagative longitudinale (acoustique), ces résolutions sont de l'ordre de la longueur d'onde si les systèmes formateurs d'image sont suffisamment bien corrigés des aberrations pour que leur qualité soit limitée par la diffraction. Pour les systèmes de type champ proche n'obéissant pas aux lois de la diffraction classiques, la résolution dépend essentiellement de la dimension et de la qualité de la pointe de la sonde. L'ensemble des solutions aujourd'hui à la disposition des utilisateurs (figure 10) offre la possibilité d'une résolution latérale couvrant un domaine continu d'environ quatre ordres de grandeur.

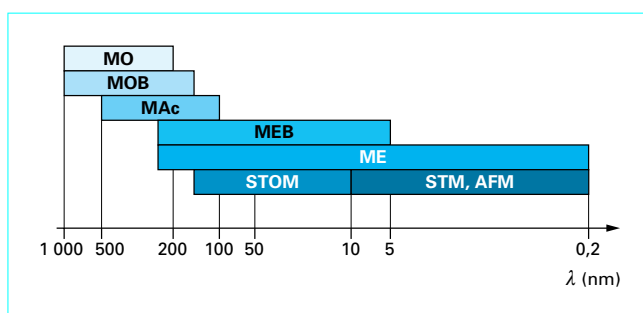


Figure 10 – Tableau comparatif des domaines de résolution latérale des différents types de microscopie



En réalité, ces différents dispositifs n'obéissent pas tous à ces règles que nous venons d'évoquer. Les microscopes optiques (**MO**) sont en général limités par la diffraction pour des ouvertures importantes, ce qui leur permet d'atteindre, l'immersion aidant, des résolutions meilleures que la demi-longueur d'onde, encore améliorées (cf. [5]) en microscopie confocale à balayage laser (**MOB**). Cette limitation dans le domaine des ondes lumineuses pourrait encore être repoussée au-delà de ces quelque 150 nm par l'emploi de longueurs d'onde plus courtes (dans la mesure où les objets observés en supporteraient l'effet) dans le domaine UV, telles celles des rayonnements émis par les lasers excimères. Une réelle microscopie en rayons X très attendue repousserait encore cette limite. Pour ce qui est de la microscopie acoustique (**MAc**), la difficulté d'obtenir des longueurs d'onde suffisamment courtes réduit son domaine de résolution qui, de plus, est limité par l'aberration sphérique des systèmes « optiques » élémentaires qu'elle met en œuvre. Si les microscopes électroniques (**ME**) sont dotés de systèmes formateurs d'image assez bien corrigés des aberrations géométriques, les faibles ouvertures auxquelles ils travaillent ne leur permettent pas d'atteindre des résolutions latérales qui soient de l'ordre des longueurs d'onde qui leur sont associées. Par contre, elles leur définissent une profondeur de champ qui pourrait être un handicap en transparence si le pouvoir de pénétration des électrons n'imposait pas aux objets d'être sous forme de coupes ultraminces. Avec les microscopes électroniques à balayage (**MEB**), pour lesquels ce dernier point est un avantage permettant des effets saisissants de relief, le domaine de résolution est d'étendue intéressante, quoique pour la plupart de ses modes de fonctionnement elle soit plutôt limitée par l'aire d'interaction des électrons incidents avec la surface de l'objet. Les systèmes à champ proche, de résolution difficile à exprimer théoriquement, dépendent des dimensions de la pointe du palpeur et de sa distance à la surface. Par effet tunnel électronique ou effet de force atomique (**STM** ou **AFM**), les effets réciproques possibles du palpeur et de la surface peuvent avoir une influence sur la nature même de cette dernière, modifiant ainsi son image et sa résolution. Quant à la microscopie optique à champ proche (**STOM**), dont les performances sont actuellement comparables à celles du MEB, sa résolution, qui dépend du diamètre de la source sonde, atteint le domaine moléculaire. Elle pourrait atteindre le domaine atomique si, idéalement, la source était un atome unique excité pour émettre de la lumière.

Mais cette apparente continuité dans le domaine de la résolution ne doit pas faire illusion. En effet, il n'est pas envisageable d'examiner un même objet successivement par des différentes méthodes pour en recueillir, simplement à des échelles différentes, des informations de même nature. On a vu dans ce qui précède qu'en général chacune d'entre elles exige une préparation particulière de l'objet et qu'elles peuvent fournir des informations aussi différentes que ses transmissions d'ondes lumineuses ou acoustiques, sa réponse à une excitation lumineuse, son état électrique ou magnétique, la spectroscopie de son émission électronique ou sa simple topographie. En outre, économiquement, ces différentes méthodes sont de coûts très différents tant en équipement qu'en fonctionnement. Sur ce point, un hypothétique microscope à rayons X exigerait probablement actuellement les moyens les plus importants. Seuls de rares grands laboratoires de recherche, principalement en milieu industriel, peuvent justifier de besoins nécessitant l'emploi de leur panoplie complète.

## 3.2 Quelques développements possibles en microscopie

Nous avons déjà mentionné les principaux axes suivis dans certains domaines. En microscopie électronique, où l'amélioration de la résolution passe par la réduction de la longueur d'onde, les efforts portent en de très rares endroits sur l'étude de microscopes à très haute tension. En microscopie acoustique, les problèmes posés sont en particulier au niveau des matériaux entrant dans la conception de l'instrument aptes à transmettre le son à haute fré-

quence avec des absorptions minimales ou optimisées en fonction de l'impédance acoustique. En champ proche, les problèmes de réduction des vibrations et d'obtention de pointes fines à fiabilité résultant de leur conservation sont la préoccupation des laboratoires. Nous voudrions, pour conclure, exposer quelques domaines en cours d'exploration ou ayant fait l'objet d'études non encore suivies de développement, dans le secteur de la microscopie optique.

### 3.2.1 Cas de la microscopie en rayons X

L'emploi des rayons X est avantageux en microscopie, du fait de leurs courtes longueurs d'onde qui permettraient une meilleure résolution. Celle-ci pouvant atteindre une valeur de l'ordre de 10 nm, la microscopie X rejoindrait le domaine actuel de la microscopie électronique et permettrait, à l'encontre de cette dernière, l'observation de préparations biologiques vivantes, le rayonnement X pouvant traverser une enceinte d'épaisseur non négligeable contenant de l'air (pour  $\lambda = 4,5$  nm, une épaisseur d'air de 500 nm transmet 70 % du flux incident), ce que ne peuvent faire les électrons. Certes, sous l'effet du rayonnement, les cellules biologiques meurent, mais les substances tels les lipides et les protéines étant plus absorbantes que l'eau qu'elles contiennent, il n'est pas nécessaire de les dessécher et leur structure n'est pas détruite. Pour des longueurs d'onde comprises entre 2,3 et 4,4 nm, des images ont été obtenues avec une résolution de 100 nm. Si la résolution n'est pas meilleure, c'est que se pose le problème de réalisation d'objectifs d'ouverture numérique suffisante.

À ces longueurs d'onde, l'indice de réfraction de tous les matériaux étant de l'ordre de l'unité, il est exclu de concevoir des systèmes optiques constitués de lentilles ou de miroirs travaillant au voisinage de l'incidence normale. On a imaginé des systèmes travaillant en réflexion sous incidence rasante, ce qui contribue fortement à réduire leur ouverture numérique et exige des surfaces présentant une rugosité résiduelle difficile à obtenir. Les projets actuels sont orientés dans deux directions :

- d'une part, des progrès considérables ont été accomplis dans l'étude et la réalisation de multicouches de facteur de réflexion élevé en incidence normale dans le domaine X-UV. Cela permet la conception d'objectifs à deux miroirs sphériques (cf. [2]). Le problème de la correction de leurs aberrations n'est pas pour autant résolu. Si l'on s'en tient à la seule aberration sphérique, la correction de son terme du troisième ordre exige que la surface d'onde convergeant vers un point de l'objet ne soit pas déformée de plus de  $\lambda/4$  par rapport à une sphère, ce qui entraîne un défaut de forme au plus de  $\lambda/16$  pour chacun des miroirs,  $\lambda$  étant bien entendu la longueur d'onde de travail égale à quelques nanomètres. La résolution obtenue n'est guère meilleure que le micromètre pour une longueur d'onde de l'ordre de 10 nm et l'objectif doit plutôt être considéré comme un condenseur concentrant le faisceau X dans le plan de l'objet ;

- d'autre part, des lentilles diffractives dites **réseaux zonés de Fresnel** sont étudiées. Constituées d'anneaux concentriques alternativement opaques et transparents de largeur inversement proportionnelle à la racine carrée de leur rayon, leur résolution est de l'ordre de la largeur de l'anneau du bord. Les réalisations actuelles situant cette largeur de l'ordre de 100 nm, leur résolution n'est pas meilleure.

Il y a donc encore beaucoup à faire pour qu'existe une véritable microscopie X, la principale difficulté restant encore la mise au point d'une source de rayons X opérationnelle sur le site d'emploi, les expériences ne pouvant encore être menées qu'auprès d'anneaux de stockage d'électrons fournissant un rayonnement synchrotron.

### 3.2.2 Sur quelques techniques de microscopie optique

#### ■ Microscopie holographique

Un microscope holographique a été proposé par van Lighten et Osterberg dès 1966. Dans ce modèle original (figure 11), l'onde



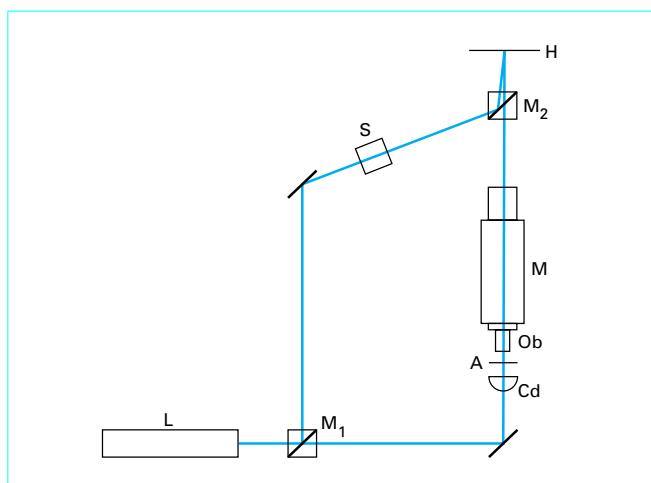


Figure 11 – Schéma de principe d'un microscope holographique

émise par un laser L est séparée par un miroir semi-transparent  $M_1$  en deux ondes, une onde de référence atteignant la plaque holographique H par l'intermédiaire d'un système optique auxiliaire S et d'un miroir semi-transparent  $M_2$ , et une onde objet transmise par  $M_1$  et  $M_2$  éclairant la préparation A placée entre condensateur Cd et objectif Ob d'un microscope M formant l'image de l'objet sur la plaque holographique. Un hologramme est obtenu par interférences entre ces deux ondes et, après développement, peut être relu par un autre système optique produisant une onde de reconstruction cohérente. Ultérieurement, d'autres schémas ont été proposés permettant l'enregistrement et la reconstruction de l'hologramme, d'où son observation à l'aide de l'oculaire du microscope, dans le plan de l'image intermédiaire.

Les méthodes holographiques appliquées à la microscopie, éventuellement étendues à leurs possibilités interférométriques en temps réel ou par double exposition, ont été appliquées en **biologie**, par exemple, pour mettre en évidence des phénomènes cinématiques ou dynamiques, des déformations ou modifications de cellules ; en **physique des matériaux**, notamment pour examiner la croissance des cristaux, tester les microcircuits, étudier les mécanismes de diffusion, observer des plasmas. Elles sont encore un outil efficace pour étudier la distribution spatiale ou la répartition dimensionnelle de particules : brouillards, condensations, pollutions, explosions.

### ■ Microscopie non linéaire

Parmi les objets de phase transparents non visibles en microscopie ordinaire, il en existe dont les variations locales d'indice de réfraction dues à leurs inhomogénéités sont trop faibles pour être détectées par les méthodes de contraste de phase ou contraste interférentiel. C'est notamment le cas de matériaux non linéaires tels les composés III-V ou II-VI (ZnSe, GaAs, CdTe ou CdS) dont les applications en physique du solide ne sont plus à préciser qui, microscopiquement d'indice de réfraction uniforme, présentent, du fait de leurs inhomogénéités, des variations locales dans leur réponse à une excitation lumineuse, c'est-à-dire dans leur capacité de transformer en partie une onde incidente de forte puissance en une onde harmonique de fréquence double, soit de longueur d'onde moitié. Hellwarth et Christensen ont proposé une solution (figure 12) permettant de mettre en évidence ces distorsions. Une onde monochromatique infrarouge de longueur d'onde 1 064 nm

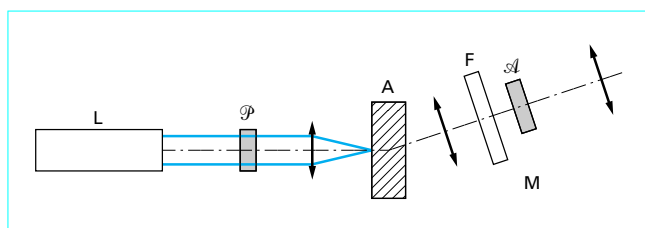


Figure 12 – Schéma de principe d'un microscope optique non linéaire

émise par un laser solide Nd/YAG L de forte puissance est focalisée sur un matériau non linéaire A susceptible de produire une onde harmonique de fréquence double, donc de longueur d'onde 532 nm. L'onde incidente est polarisée par un polariseur  $\mathcal{P}$  et l'objet est observé sous un angle différent à l'aide du microscope M, l'onde harmonique étant filtrée par un analyseur  $\mathcal{A}$  et un filtre de coupure F supprimant l'onde infrarouge diffusée par l'échantillon.

### ■ Microscopies optoacoustique et photothermique

Si une onde laser modulée en intensité est focalisée sur un échantillon solide, celui-ci est soumis à un chauffage périodique résultant de l'absorption de lumière créant une *onde thermique* à sa surface. La longueur de cette onde fortement amortie, solution d'une équation de diffusion thermique périodique, est déterminée par la distance de diffusion thermique du matériau. Cette onde thermique, entraînant alternativement des dilatations et contractions dans la structure du matériau, donne naissance à une *onde acoustique*. Ces deux ondes, tant thermique qu'acoustique, de même période que la modulation optique, sont susceptibles de fournir des informations sur les propriétés thermiques ou mécaniques du matériau pouvant être détectées par un récepteur thermique ou acoustique. Cette procédure, associée à un balayage de l'objet, constitue l'*imagerie photothermique* ou *optoacoustique* (encore appelée **photoacoustique**).

Schématiquement (figure 13), l'onde lumineuse émise par un laser L, modulée en intensité à l'aide d'un modulateur acousto-optique Mao et soumise à déflexion par un déflecteur acousto-optique Dao est focalisée sur l'échantillon A par le microscope M. Le récepteur R, soit détecteur infrarouge pour la détection thermique, soit microphone pour la détection acoustique, fournit un signal modulé à la fréquence de modulation de l'onde lumineuse. Traité par un détecteur synchrone DS, le signal résultant peut être utilisé pour moduler l'intensité du faisceau d'inscription d'un récepteur video TV, à balayage synchrone de celui du déflecteur Dao, affichant l'image thermique ou acoustique.

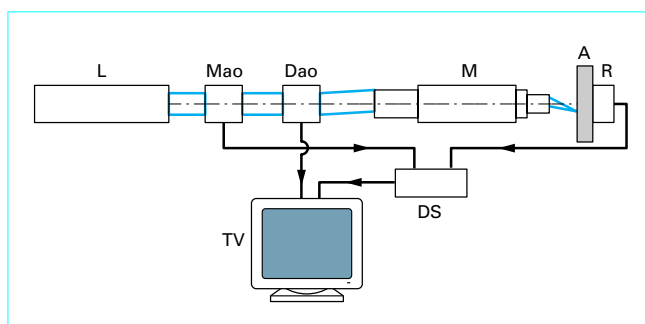


Figure 13 – Schéma de principe d'un microscope photothermique ou optoacoustique

# Microscopie

par **Gérard ROBLIN**

Docteur es-sciences

Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS) (ER)

## Bibliographie

TERRIEN (J.). – *De la loupe au microscope électronique*. 128 p. 41 fig. PUF (1951).

VICKERS (A.E.J.). – *Modern methods of microscopy*. Recueil de 13 articles issus de la revue Research, 114 p. Butterworths Scientific Publications (1956).

BOURRET (A.) et PORTIER (R.). – *Voir les atomes*. La Recherche (F) 14 n° 144, p. 650-663 (1983).

HAWKES (P.). – *Electrons et microscopes*. 160 p. 156 fig. 161 réf. CNRS Éditions (1995).

ATTAL (J.). – *L'âge adulte du microscope acoustique*. La Recherche 12 n° 121, p. 478-481 (1981).

ATTAL (J.). – *La microscopie acoustique*. La Recherche 14 n° 144, p. 664-667 (1983).

PATZELT (W.J.). – *Leitz-Akustomikroskop ELSAM, technische Realisierung des Serienmodells*. Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. Sonderheft Achema, p. 3-8 (juin 1985).

ANSELMETTI (D.), GERBER (Ch.), MICHEL (D.), GÜNTHERODT (H.-J.) et ROHRER (H.). – *Compact, combined scanning tunneling/force microscope*. Rev. Sci. Instrum. 63 n° 5, p. 3003-3006 (1992).

GROBER (R.D.), HARRIS (T.D.), TRAUTMAN (J.K.) et BETZIG (E.). – *Design and implementation of a*

*low temperature near-field scanning optical microscope*. Rev. Sci. Instrum. 65 n° 3, p. 626-631 (1994).

SCHMAHL (G.), RUDOLPH (D.) et NIEMANN (B.). – *Un nouveau regard sur la matière : la microscopie X*. La Recherche 12 n° 126, p. 1136-1137 (1981).

PLUTA (M.). – *Advanced light microscopy* ; vol. 1 *Principles and basic properties* 464 p., 286 fig., 8 pl., 270 réf. ; vol. 2 *Specialized methods* 494 p., 224 fig., 46 pl., 746 réf. ; vol. 3 *Measuring techniques* 702 p., 325 fig., 22 pl., 1286 réf. PWN-Polish Scientific Publishers (Varsovie) (PL) & Elsevier (Amsterdam) (1989).

VAN LIGTEN (R.F.) et OSTERBERG (H.). – *Holographic microscopy*. Nature 211, p. 282-283 (1966).

HELLWARTH (R.) et CHRISTENSEN (P.). – *Nonlinear optical microscope using second harmonic generation*. Appl. Opt. 14, p. 247-248 (1975).

ROSENCWEIG (A.) et BUSSE (G.). – *High-resolution photoacoustic thermal-wave microscopy*. Appl. Phys. Lett. 36, p. 725-727 (1980).

BUSSE (G.). – *Photothermal transmission imaging and microscopy*. Opt. Comm. 36, p. 441-443 (1981).

ZHAROV (V.P.) et LETOKHOV (V.S.). – *Laser Optoacoustic Spectroscopy*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1986).

## Dans les Techniques de l'Ingénieur

[1] LOUCHET (F.) et coll. – *Microscopie électronique en transmission. Transmission conventionnelle et balayage en transmission*. P 875. Traité Analyse et Caractérisation, vol. P1 (1988).

[2] ROBLIN (G.). – *La Microscopie optique*. R 6 712. Traité Mesures et Contrôle, vol. R6 (1999).

[3] LEGRESSUS (C.). – *Microscopie électronique à balayage*. P 865. Traité Analyse et Caractérisation, vol. P1 (1995).

[4] SALVAN (F.). – *Microscopie par effet tunnel*. P 895. Traité Analyse et Caractérisation, vol. P1 (1989).

[5] ROBLIN (G.). – *La Microscopie à champ proche et à balayage laser*. R 6 714. Traité Mesures et Contrôle, vol. R6 (1999).

# Microscopie

## Bibliographie

### Ouvrages et articles

- TERRIEN (J.). – *De la loupe au microscope électronique*. PUF (1951).
- VICKERS (A.E.J.). – *Modern methods of microscopy*. Recueil de 13 articles issus de la revue Research, Butterworths Scientific Publications (1956).
- BOURRET (A.) et PORTIER (R.). – *Voir les atomes*. La Recherche (F), 14, n° 144, 650-663 (1983).
- HAWKES (P.). – *Électrons et microscopes*. CNRS Éditions (1995).
- ATTAL (J.). – *L'âge adulte du microscope acoustique*. La Recherche, 12, n° 121, 478-481 (1981).
- ATTAL (J.). – *La microscopie acoustique*. La Recherche, 14, n° 144, 664-667 (1983).
- PATZELT (W.J.). – *Leitz-Akustomikroskop ELSAM, technische Realisierung des Serienmodells*. Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn. Sonderheft Achema, 3-8 (juin 1985).
- ANSELMETTI (D.), GERBER (Ch.), MICHEL (D.), GÜNTHERODT (H.-J.) et ROHRER (H.). – *Compact, combined scanning tunneling/force microscope*. Rev. Sci. Instrum., 63, n° 5, 3003-3006 (1992).

- GROBER (R.D.), HARRIS (T.D.), TRAUTMAN (J.K.) et BETZIG (E.). – *Design and implementation of a low temperature near-field scanning optical microscope*. Rev. Sci. Instrum., 65, n° 3, 626-631 (1994).
- SCHMAHL (G.), RUDOLPH (D.) et NIEMANN (B.). – *Un nouveau regard sur la matière : la microscopie X*. La Recherche, 12, n° 126, 1136-1137 (1981).
- PLUTA (M.). – *Advanced light microscopy*; vol. 1 *Principles and basic properties*; vol. 2 *Specialized methods*; vol. 3 *Measuring techniques*. PWN-Polish Scientific Publishers (Varsovie) (PL) & Elsevier (Amsterdam) (1989).
- VAN LIGTEN (R.F.) et OSTERBERG (H.). – *Holographic microscopy*. Nature, 211, 282-283 (1966).
- HELLWARTH (R.) et CHRISTENSEN (P.). – *Nonlinear optical microscope using second harmonic generation*. Appl. Opt., 14, 247-248 (1975).
- ROSENCEWIG (A.) et BUSSE (G.). – *High-resolution photoacoustic thermal-wave microscopy*. Appl. Phys. Lett., 36, 725-727 (1980).
- BUSSE (G.). – *Photothermal transmission imaging and microscopy*. Opt. Comm., 36, 441-443 (1981).

- ZHAROV (V.P.) et LETOKHOV (V.S.). – *Laser Opto-acoustic Spectroscopy*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1986).

### Dans les Techniques de l'Ingénieur

- [1] LOUCHET (F.) et coll. – *Microscopie électronique en transmission. Transmission conventionnelle et balayage en transmission*. [P 875], Analyse et Caractérisation (1988). Épuisé.
- [2] ROBLIN (G.). – *Microscopie optique*. [R 6 712], Mesures mécaniques et dimensionnelles (1999).
- [3] LE GRESSUS (C.). – *Microscopie électronique à balayage*. [P 865], Analyse et caractérisation (1995).
- [4] SALVAN (F.) et THIBAUDAU (F.). – *Microscopie à sonde locale*. [P 895], Analyse et caractérisation (1999).
- [5] ROBLIN (G.). – *Microscopies optiques à balayage*. [R 6 714], Mesures mécaniques et dimensionnelles (1999).

## Gagnez du temps et sécurisez vos projets en utilisant une source actualisée et fiable !

### 15 DOMAINES D'EXPERTISE

- ✓ Automatique - Robotique
- ✓ Biomédical - Pharma
- ✓ Construction et travaux publics
- ✓ Électronique - Photonique
- ✓ Énergies
- ✓ Environnement - Sécurité
- ✓ Génie industriel
- ✓ Ingénierie des transports
- ✓ Innovation
- ✓ Matériaux
- ✓ Mécanique
- ✓ Mesures - Analyses
- ✓ Procédés chimie - bio - agro
- ✓ Sciences fondamentales
- ✓ Technologies de l'information



Articles de référence  
disponibles en français  
et en anglais

Détails des offres et sommaires  
à retrouver sur le site

[www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)

Les offres Techniques de l'Ingénieur permettent d'accéder à une **base complète et actualisée d'articles** rédigés par les meilleurs experts et validés par des comités scientifiques, avec :

+ de 10 000 articles de référence et 1 000 fiches pratiques opérationnelles.

3 000 quiz dans + de 1 000 articles interactifs.

+ de 550 bases documentaires, 8 Parcours Pratiques répartis dans plus de 90 offres.

1 280 auteurs contribuent chaque année à enrichir cette ressource.

Service de Questions aux experts.

Les Archives, technologies anciennes et versions antérieures des articles.

+ de 300 000 utilisateurs de [techniques-ingenieur.fr](http://techniques-ingenieur.fr) chaque mois !

NOS ÉQUIPES SONT  
À VOTRE DISPOSITION

Par téléphone  
 33 (0)1 53 35 20 20

Par email  
 [infos.clients@teching.com](mailto:infos.clients@teching.com)