



**TECHNIQUES**  
**DE L'INGÉNIEUR**

Réf. : **R6714 V1**

Date de publication :  
**10 septembre 1999**

# Microscopies optiques à balayage

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

par **Gérard ROBLIN**

**Résumé** La microscopie optique à balayage est une technique qui évolue sans cesse, en fonction des progrès réalisés dans le domaine de la saisie des informations avec des moyens télévisuels de plus en plus élaborés, mais également vers une microscopie dite quantitative avec l'obtention de données numériques. Cette évolution impose une technique de balayage, pour saisir le champ point par point, tout à fait assimilable à celle de la télévision à balayage électronique. Cet article dresse le bilan actuel de la microscopie optique à balayage.

**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

# Microscopies optiques à balayage

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

|   |                     |
|---|---------------------|
| <b>1. Évolutions vers la microscopie optique à balayage .....</b> | <b>R 6 714 - 2</b>  |
| 1.1 Télévision associée à la microscopie .....                    | — 2                 |
| 1.2 Microscopie quantitative .....                                | — 2                 |
| <b>2. Microscopie confocale à balayage laser .....</b>            | <b>— 3</b>          |
| 2.1 Présentation de la méthode.....                               | — 3                 |
| 2.2 Avantages de la microscopie confocale .....                   | — 4                 |
| 2.3 Conception instrumentale.....                                 | — 6                 |
| 2.4 Exemples de réalisation de microscopes confocaux.....         | — 8                 |
| 2.5 Domaines d'application du microscope confocal.....            | — 9                 |
| <b>3. Microscopie optique en champ proche.....</b>                | <b>— 11</b>         |
| 3.1 Principe de la méthode .....                                  | — 11                |
| 3.2 Exemples de réalisation.....                                  | — 12                |
| 3.3 Conclusions.....  | — 13                |
| <b>Pour en savoir plus .....</b>                                  | <b>Doc. R 6 714</b> |

L'observation à travers le microscope, a été longtemps effectuée uniquement à l'aide de l'œil humain. La photographie, dès son apparition, lui a été rapidement appliquée permettant de conserver un document en mémoire, ainsi que la cinématographie donnant accès à l'étude de phénomènes temporellement variables. D'autres informations ont également pu être acquises grâce à l'étude spectroscopique ou spectrophotométrique des objets qui, associée aux techniques photographiques, permet notamment l'obtention d'images dans une « couleur » donnée, ce qui est un moyen d'analyse des propriétés d'une préparation ou de reconnaissance de certains de ses éléments.

Il faut donc noter que la microscopie est une technique que les utilisateurs sont toujours prêts à faire évoluer en fonction des progrès réalisés dans le domaine de la saisie des informations. C'est ainsi qu'ils ont profité des possibilités apportées par les moyens télévisuels, leur permettant à la fois une observation collective (plusieurs expérimentateurs pouvant simultanément observer un même champ) et une acquisition d'informations variables en temps réel (à la fréquence de prise de vue près). Mais les besoins du microscopiste sont aussi d'obtenir des informations numériques : comptage d'éléments particuliers préalablement reconnus, tri de constituants de forme caractéristique ou de niveau donné, ainsi que leurs mesures spatiales de surface, de périmètre, de longueur ou de distance... Cette microscopie, dite quantitative, impose de repérer les points du champ par leurs coordonnées spatiales et de leur affecter à chacun un nombre représentatif de leur niveau photométrique. Il y a donc lieu de saisir le champ **point par point** par une technique de balayage, ce qui est le cas de la télévision résultant d'un balayage électronique, d'en acquérir le niveau individuel par le moyen d'un récepteur photoélectrique, qui peut être le photorécepteur employé en télévision, et de saisir, par des moyens informatiques, l'ensemble de ces données pouvant ainsi être traitées pour fournir l'information souhaitée. Ce besoin

de balayage a donné lieu à l'émergence de techniques optiques permettant de l'effectuer en conservant toute la résolution qu'elles permettent, voire en l'améliorant notablement.

Après une présentation sommaire du procédé télévisuel et de la microscopie quantitative, cet article fait le point sur les **microscopies optiques à balayage** actuelles.

Pour de plus amples renseignements sur la microscopie optique, le lecteur pourra se reporter à l'article R 6 712 de cette rubrique.

## 1. Évolutions vers la microscopie optique à balayage

### 1.1 Télévision associée à la microscopie

Pour l'observation télévisuelle couramment utilisée en microscopie, la caméra de télévision reprend l'image fournie par le microscope suivant un schéma analogue à celui de la photographie (cf. § 4.3 de l'article R 6 710. En général, un objectif de prise de vue réglé sur l'infini placé derrière l'oculaire forme une image sur la surface photosensible d'un tube analyseur de type vidicon [ou sur une mosaïque CCD (*Charge Coupled Devices*)]. Les électrons émis par cette photocathode, focalisés sur une cible (ou stockés dans chaque élément de la mosaïque), y créent une répartition de charges électriques analogue à celle des éclaircissements dans l'image optique. Le signal analogique obtenu par lecture de la cible (ou décharge des condensateurs que sont chaque élément de la mosaïque) balayée ligne après ligne sert à moduler le faisceau d'électrons d'inscription d'un tube moniteur balayé en synchronisme. On obtient sur son écran une image agrandie pouvant bénéficier d'un gain de luminosité appréciable et permettant l'observation collective et de longue durée.

Il faut bien noter que cette procédure n'améliore en rien la résolution qui devrait toujours être celle que limite l'optique du microscope. Trop souvent cette observation s'opère au contraire à son détriment. Une chaîne de télévision présente une définition de l'ordre de 400 points par ligne pour 312,5 paires de lignes, alors qu'un objectif de microscope, suivant son grandissement et son ouverture numérique, résout de 1 000 à 2 000 points sur le diamètre de son champ. Il est donc utile de réduire le champ en conséquence par la bonne adaptation des distances focales de l'oculaire et de l'objectif de prise de vue, et surtout de ne pas, compte tenu de ses dimensions, être tenté de placer la surface photosensible du tube analyseur directement dans le plan de l'image intermédiaire, à moins que l'on utilise un objectif réputé parfaitement corrigé de la courbure de champ (planapochromat).

### 1.2 Microscopie quantitative

L'observation d'une image n'étant pas toujours suffisante, sa numérisation permet de quantifier l'information qu'elle contient en affectant à chacun des points du champ analysé, repéré par sa position sur une ligne (abscisse) et le rang de cette dernière (ordonnée), un nombre représentatif de son niveau photométrique. Le signal analogique fourni par la caméra de télévision, dont le niveau élec-

trique à chaque instant est caractéristique du niveau photométrique en un point de l'objet, est à la base du développement de cette procédure.

Grâce à un système d'horloge (dont la fréquence est définie par le temps de balayage et le produit du nombre de points par ligne et du nombre de lignes) permettant d'échantillonner le champ suivant une trame de points et à un convertisseur analogique-digital ou à un ensemble de circuits comparateurs agissant sur le signal vidéo, chaque point est représenté par une succession de bits correspondant au nombre de niveaux analysés. Il est fréquent d'effectuer l'analyse suivant 256 niveaux (8 bits), voire 512 niveaux (16 bits), ce qui est assurément surabondant.

La suite de bits délivrés pour l'ensemble d'une image est alors mise en mémoire. Cela en permet la restitution en temps différé, ou le traitement de l'information à l'aide d'un ordinateur qui peut être préprogrammé pour fournir des mesures de longueurs, de périmètres, de surfaces, pour effectuer le comptage de structures de même forme, de même dimension ou de même niveau, les localiser dans le champ, comparer des images enregistrées successivement pour déceler les variations de ces grandeurs ou la mobilité de constituants en direction et en vitesse, etc.

Ce traitement peut être fait en temps réel, pourvu que la capacité mémoire de l'ordinateur soit suffisante et que sa vitesse d'acquisition soit compatible avec celle du balayage. Des tests d'intercomparaison locale peuvent alors être introduits pour compenser les éventuels défauts d'éclairage du champ. Grâce à ce traitement, il est possible de reconstruire des images spécifiques, par exemple des contours, par niveau ou par isolement de forme ou de dimension.

Les équipements fournis aux utilisateurs, ayant tendance à évoluer fort rapidement, sont dotés de logiciels de plus en plus nombreux dont l'utilité n'est pas toujours avérée, alors que certains problèmes spécifiques exigeraient d'en créer de plus particuliers. Il serait souhaitable que ces matériels évoluent vers une forme laissant plus d'initiative à l'utilisateur. Ils gagneraient aussi à être associés à des méthodes purement optiques aussi classiques que le filtrage des fréquences spatiales en grandeur et en direction ou l'analyse des couleurs autorisant un prétraitement économisant la capacité mémoire de l'ordinateur et simplifiant les procédures de calcul.

La caméra de télévision classique, limitée en définition, n'est pas toujours la solution retenue. L'analyse de l'image peut se faire ligne par ligne à l'aide d'une barrette de 1 024 ou 2 048 photodétecteurs associée au déplacement de la platine dans une direction perpendiculaire afin de couvrir l'ensemble du champ, à une cadence de prise de vue évidemment plus faible. Le développement des caméras à mosaïques CCD trouve là aussi une application de choix, sous réserve que la définition soit suffisante et en tenant compte du fait que, comme pour les barrettes, les points de la trame sont physiquement séparés de vides non analysés. Il faut donc, en toute rigueur, diminuer la capacité réelle du récepteur afin que plusieurs de ses éléments successifs correspondent à un point résolu du champ.

## 2. Microscopie confocale à balayage laser

### 2.1 Présentation de la méthode

Contrairement à la microscopie traditionnelle où le champ est uniformément éclairé, en **microscopie optique à balayage** celui-ci est balayé de manière continue par l'image d'un point lumineux fournie par l'objectif lui-même, donc par un « spot » dont la dimension est du même ordre que la limite de résolution. Le flux lumineux transmis ou réfléchi en chaque point de l'objet, donc à un instant donné, est recueilli par un photorécepteur unique fournissant un signal portant information sur le niveau photométrique au point considéré, alors qu'en microscopie traditionnelle correspond à chaque point du champ un élément photosensible du récepteur (rétine de l'œil, émulsion photographique, tube de télévision, mosaïque CCD), chacun d'eux pouvant être de sensibilité différente à une même excitation, voire de dimensions différentes, donc fournissant une résolution différente, si le récepteur est constitué d'éléments discrets.

La **microscopie flying-spot** est à l'origine de cette procédure. L'image du spot d'un tube à rayons cathodiques, ou *tube analyseur*, balayé dans deux directions est projetée dans le champ par le microscope complet (figure 1). L'information sur le facteur de transmission en chaque point de l'objet est véhiculée par le signal photoélectrique fourni par un photorécepteur placé dans la pupille du condenseur. Une image peut alors être affichée en utilisant ce signal pour moduler l'intensité du faisceau d'électrons (Z) d'un *tube moniteur* à mémoire à entretien d'image dont le balayage est synchrone de celui du tube analyseur. Il est encore possible d'ajouter ce signal, et à l'origine ce fut probablement l'usage le plus fréquent en microscopie flying-spot, au signal de balayage image (Y) du moniteur fonctionnant ainsi en tube oscilloscope et d'afficher, pour chaque ligne, une courbe représentative de ses variations photométriques. Les deux types d'information, par application du signal photoélectrique tant en Z qu'en Y, peuvent également être affichées simultanément. Avec ce mode d'éclairage, mis à part l'énergie résiduelle dans les pieds de la tache de diffraction, rien ne vient éclairer les autres points du champ qui ne diffusent donc pas de lumière parasite constituant un fond lumineux tendant à diminuer le contraste de l'image.

Ce contraste peut être modifié et ses faibles valeurs peuvent être augmentées en jouant sur le gain d'un amplificateur, en accumulant les signaux pendant plusieurs balayages, ou, ce à quoi se prêtait bien la méthode flying-spot en adaptant par *contre-réaction* la luminosité du spot à la transparence de l'objet. Cette méthode, dans la mesure où elle utilisait des tubes à déflection électrostatique offrait l'avantage d'une grande souplesse de gamme de fréquences de balayage possible permettant leur adaptation aux caractéristiques d'un objet tant spatiales que temporelles. Par contre, ce type de réalisation présentait les inconvénients d'utiliser un spot inhomogène dans le champ en dimension et intensité ; de ne pas éliminer toute lumière parasite à cause de la rémanence du phosphore de l'analyseur ; d'être faiblement lumineux, la pupille du microscope ne prélevant qu'une très faible part de la lumière émise ; enfin, à l'époque de son développement, d'être difficile à mettre en œuvre. En fait l'intérêt premier du balayage, en l'absence de récepteurs à balayage électronique (tube TV, dissecteur d'image), a certainement été de permettre la **microscopie quantitative**, le signal photoélectrique n'étant porteur à chaque instant que de l'information relative à un seul point résolu dans le champ. En effet, cette méthode permet à l'évidence de quantifier l'information que contient l'image, chacun des points du champ analysé étant aisément repéré par la position temporelle du spot sur une ligne et le rang de cette dernière, l'intensité de celui-ci (en Z) ou sa déviation (en Y) étant représentatives de son niveau photométrique. Le flying-spot était donc tout à fait adapté à cette métrologie, le tube moniteur pouvant effectuer

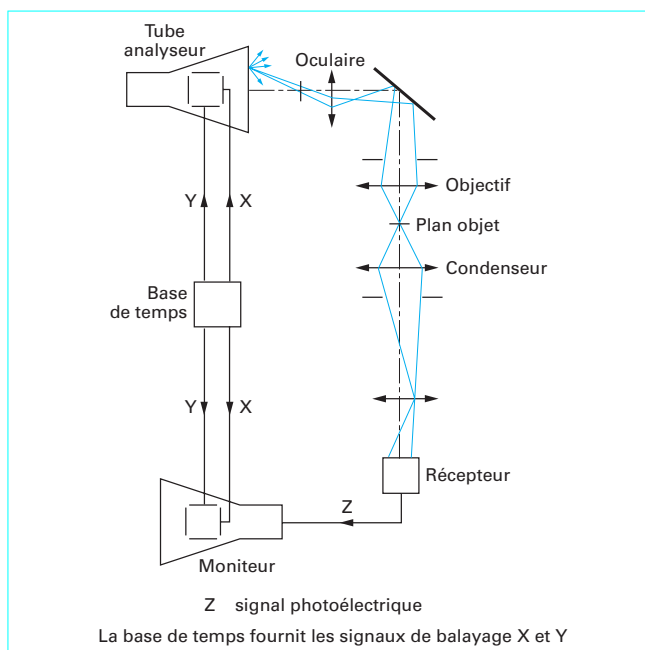


Figure 1 - Bloc-diagramme du système flying-spot

l'oscilloscopie du signal délivré, et il permet les toutes premières applications en *analyse d'image* ou microscopie quantitative.

Ses inconvénients masquant, au point de les oublier, ses avantages, cette méthode fut détrônée au profit du balayage électronique de l'image permis par le développement et les progrès des tubes récepteurs de télévision, tout d'abord pour faciliter la visualisation collective par plusieurs observateurs, plus récemment pour atteindre la numérisation. Cette technique et son analogue basée sur l'emploi d'une barrette de récepteurs couplée à un déplacement perpendiculaire de l'objet ou plus généralement d'une mosaïque de récepteurs, si elle tend à s'améliorer, présente néanmoins encore des inconvénients rejoignant d'ailleurs ceux du procédé flying-spot. La limitation du nombre de points d'analyse, en tout état de cause inférieur au nombre de points résolus dans le champ de l'objectif du microscope, conduit soit à celle du format, soit à une perte de résolution et, bien souvent, au choix d'un compromis entre ces deux défauts de qualité. Les variations de sensibilité entre les éléments d'un récepteur multiple, ou de la surface photosensible d'un tube récepteur de télévision, d'effet analogue aux variations de luminosité du spot du tube à rayons cathodiques, perturbent la linéarité de la réponse. De plus, la fréquence de balayage reste pratiquement imposée soit à une valeur élevée dans le cas de la télévision pure, soit à une valeur relativement faible quand l'objet doit être déplacé dans une direction, à l'encontre de la gamme étendue que permettait le flying-spot. Par contre, les possibilités actuelles ou attendues des moyens informatiques, la tendance des constructeurs, à la demande des utilisateurs, à produire des objectifs de microscope à champ plan toujours plus grand (atteignant au moins 2 500 points sur un diamètre), militent en faveur d'un traitement de l'information pour l'ensemble des points résolus de ce champ (ce qui est encore loin d'être atteint). L'illuminer par l'image d'un point lumineux, de dimension conforme à la résolution de l'objectif, revient alors naturellement en faveur, sans compter que son excitation par une radiation lumineuse spécifique peut être à l'origine d'effets porteurs d'information.

On a vu alors deux tendances se dessiner au niveau des recherches qui, au stade du développement, compte tenu de leurs intérêts respectifs, se sont pratiquement réunies.

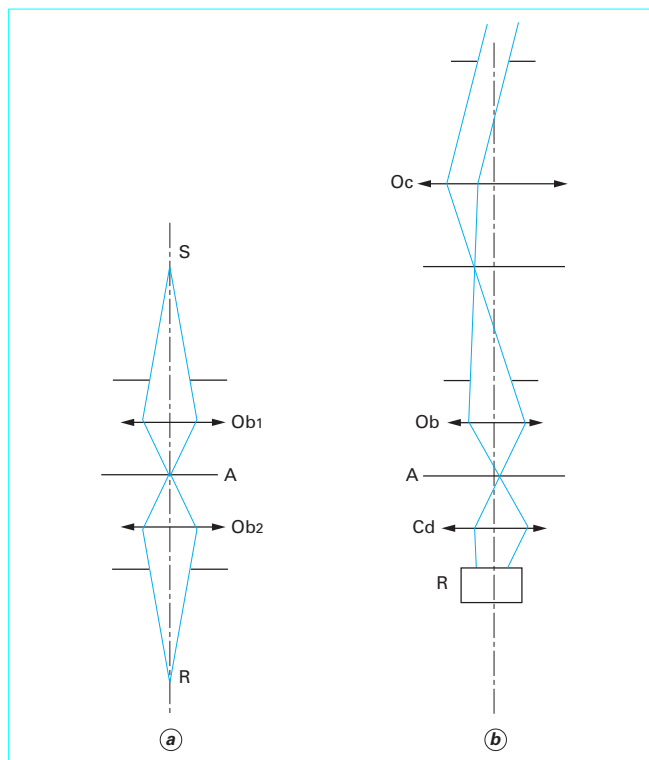


Figure 2 – Microscopes optiques à balayage

La première de ces tendances, présentant de nouveaux avantages que nous précisons au paragraphe suivant, adoptant une configuration dite **confocale**, consiste en l'emploi de deux objectifs identiques Ob conjuguant (figure 2 a), par l'intermédiaire du plan objet A, une source S et un récepteur R, tous deux ponctuels, c'est-à-dire de structures dans le plan objet analogues à celle de la tache de diffraction commune aux deux objectifs. L'objet est animé d'un double mouvement de translations orthogonales par rapport à l'ensemble des deux microscopes. La seconde tendance, plus proche du système flying-spot, utilise un faisceau lumineux issu d'un laser focalisé dans le plan de l'objet à travers le microscope (figure 2 b). Ce faisceau étant défléchi dans deux directions orthogonales autour du centre de la pupille, le flux lumineux transmis est recueilli par un photorécepteur unique R placé dans la pupille du condenseur Cd. Cette méthode de **balayage laser** offre pratiquement l'avantage d'applications liées à l'irradiation ponctuelle par un faisceau laser intense.

## 2.2 Avantages de la microscopie confocale

### ■ Premier avantage : amélioration de la limite de séparation

Les avantages mis en évidence récemment de la **confocalité**, loin d'être négligeables, sont à l'origine de nouvelles potentialités en microscopie optique. Projeter un point lumineux dans le plan objet revient à l'éclairer localement suivant une répartition  $S(\rho)$  identique à la tache de diffraction de l'objectif :

$$S(\rho) = [2 J_1(Z)/Z]^2$$

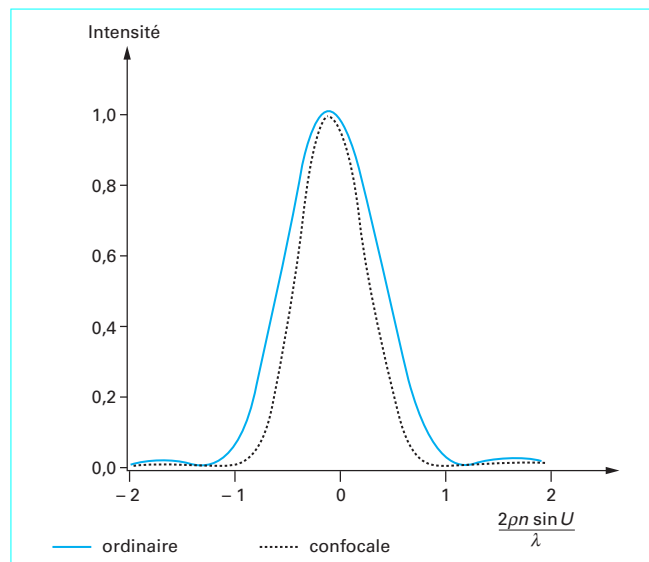


Figure 3 – Comparaison des taches d'analyses élémentaires en microscopies ordinaire et confocale

avec  $Z = (2 \pi \rho n \sin U)/\lambda$ ,

$\rho$  coordonnée radiale dans la tache de diffraction,

$J_1(Z)$  fonction de Bessel de première espèce d'ordre 1,

$n \sin U$  ouverture numérique de l'objectif.

Capter cette énergie, par un récepteur également ponctuel par l'intermédiaire d'un objectif identique, revient à l'analyser dans ce même plan objet avec une sensibilité  $R(\rho)$  variant spatialement selon la même loi :

$$R(\rho) = [2 J_1(Z)/Z]^2$$

Ainsi, globalement, tout se passe comme si le « point résolu » du champ avait la structure beaucoup plus fine du carré d'une tache de diffraction (figure 3) :

$$E_c(\rho) = S(\rho) R(\rho) = [2 J_1(Z)/Z]^4$$

Dans le cas de cette microscopie, l'objet n'étant éclairé instantanément qu'en un seul point, plutôt que la *limite de résolution* définie précédemment, semble-t-il plus logique de considérer la classique **limite de séparation** entre deux points définie en adoptant le critère de Lord Rayleigh selon lequel deux points sont séparés, en éclairage incohérent, si leur distance est égale au rayon de la tache de diffraction, soit :

$$\rho_i = 1,22 \lambda / 2 n \sin U$$

ce qui entraîne, dans l'image globale des deux points, une baisse de contraste de 25 %. En adoptant ce même critère de baisse de contraste entre deux points de même transmission balayés successivement en microscopie confocale, la limite de séparation est nettement améliorée puisqu'elle correspond (figure 4) à une distance entre deux points réduite à :

$$\rho_c = 0,875 \lambda / 2 n \sin U$$

soit une limite au moins 1,4 fois meilleure car, en fait, on peut admettre que le récepteur photoélectrique présente une meilleure sensibilité au contraste que l'œil.

**Nota :**  $\rho$  est la distance au centre de la tache de diffraction (de révolution si l'ouverture est circulaire), exprimée en unités de longueur comme  $\lambda$ .  $Z$  devient une ordonnée normalisée en  $\rho/\lambda$ . Il n'empêche que  $S$ ,  $R$  et  $E$  sont des fonctions de  $\rho$ , ordonnée spatiale.

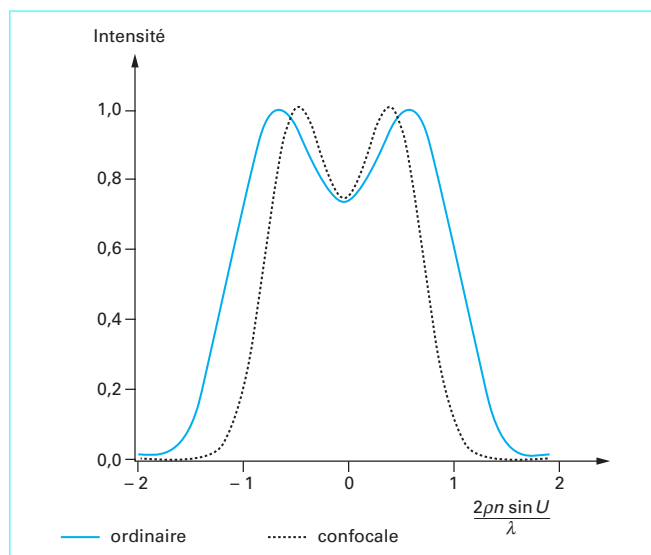


Figure 4 – Comparaison des limites de séparation en microscopies ordinaire et confocale

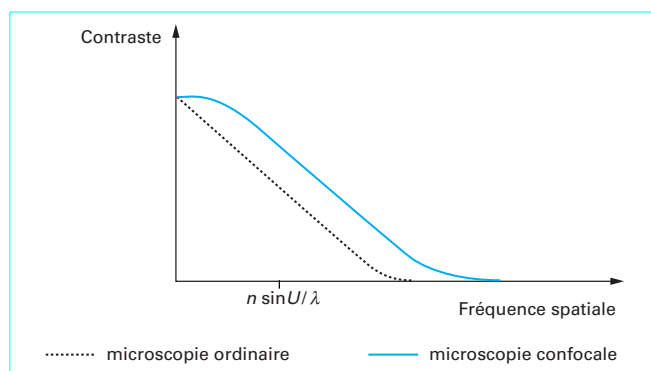


Figure 5 – Comparaison des fonctions de transfert en microscopies ordinaire et confocale

Si le concept de limite de résolution, qui fait appel à la notion de fréquence spatiale, est difficile à retenir puisqu'il se rapporte à un objet étendu, de répartition spatiale périodique en amplitude ou en intensité, diffractant la lumière dans toute l'ouverture de l'instrument, il est néanmoins possible de l'appréhender.

En calculant par intégration la modulation du signal temporel, c'est-à-dire la structure de l'image, lorsqu'un tel spot  $E_c(\rho)$  balaie une structure périodique en intensité, on montre que pour une période égale à la **limite de résolution absolue**  $\lambda / 2 n \sin U$  définie précédemment, le contraste est encore de 16 % au lieu d'être nul, alors qu'il devient négligeable pour une période 1,4 fois plus faible (figure 5). Il y a donc une amélioration sensible du **facteur de modulation** pour les fréquences spatiales voisines de la **fréquence de coupure** classique rencontrée en microscopie ordinaire.

#### ■ Second avantage de choix : réduction de la profondeur de champ

Un avantage beaucoup plus significatif résulte de l'amélioration du rapport signal à bruit dû au fait que les autres points du champ ne sont pas éclairés et ne peuvent donc diffuser de lumière. Il faut bien comprendre qu'il ne s'agit pas seulement des points d'un

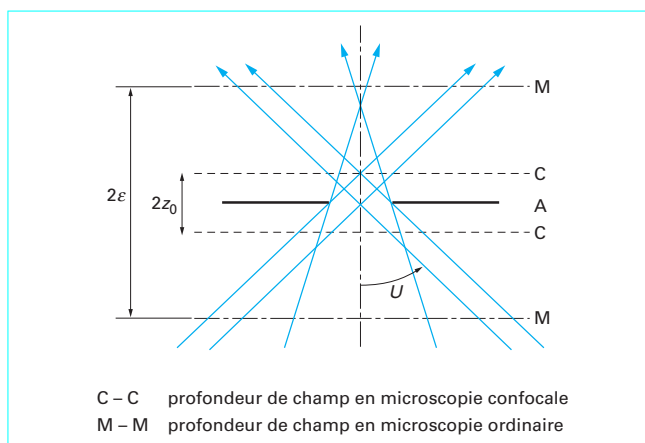


Figure 6 – Réduction de la profondeur de champ due à la présence d'un diaphragme

même plan de mise au point, mais que cet effet en microscopie ordinaire est produit par tout point de l'épaisseur de la préparation. L'effet n'est donc pas totalement supprimé pour les points de l'objet épais observés situés (figure 6) à l'intérieur du cône d'éclairage d'ouverture  $U$ . Il est néanmoins notablement diminué pour deux raisons.

La première est qu'il n'existe pas physiquement de source et de récepteur ponctuels. Matériellement, pour les réaliser, on les limite en plaçant dans leur plan un petit trou devant avoir un diamètre égal à une fraction de celui du premier anneau de la tache de diffraction (de l'ordre de 1/5 à 1/10 est suffisant, soit des trous, pour une fraction  $1/k = 1/5$ , de diamètre 5 à 10  $\mu\text{m}$  suivant que l'objectif est faible ou fort) afin que leur image géométrique dans le plan de l'objet soit assimilable à un point lumineux. Ce diaphragme a pour effet de limiter très fortement l'étendue géométrique en dehors du plan de mise au point A, donc l'énergie rayonnée relative aux points objets situés à l'extérieur des plans CC distants de A de :

$$z_0 = \pm \rho_i / k n \sin U = \pm 1,22 \lambda / 2 k n^2 \sin^2 U$$

La seconde raison est que, lorsqu'une pupille diffracte l'onde émise par un point lumineux (source cohérente), l'énergie transportée dans la direction de l'axe optique varie selon la loi suivante :

$$S(z) = [\sin(\pi \Delta / \lambda)] / (\pi \Delta / \lambda)]^2$$

où  $\Delta$  est l'écart aberrant de l'onde convergeant dans un plan de défaut de mise au point  $z$  par rapport à une surface d'onde sphérique théorique :

$$\Delta = n z (1 - \cos U)$$

Par analogie, on peut considérer que le long de l'axe  $z$ , la sensibilité  $R(z)$  du récepteur varie dans les mêmes proportions et qu'ainsi l'éclairement en un point de l'axe est de la forme :

$$E(z) = S(z) R(z) = [(\sin Kz) / Kz]^4$$

avec  $K = n \pi (1 - \cos U) / \lambda$ .

Cette loi de variation, rapidement décroissante, contribue fortement à l'amélioration du rapport signal à bruit et, pour ces deux raisons, la microscopie confocale présente sur la microscopie ordinaire un avantage indéniable. En effet, pour cette dernière, nous avons admis que tout défaut de mise au point n'entraînant pas d'écart aberrant supérieur à  $\lambda/4$  (cf. article R 6 712) est sans



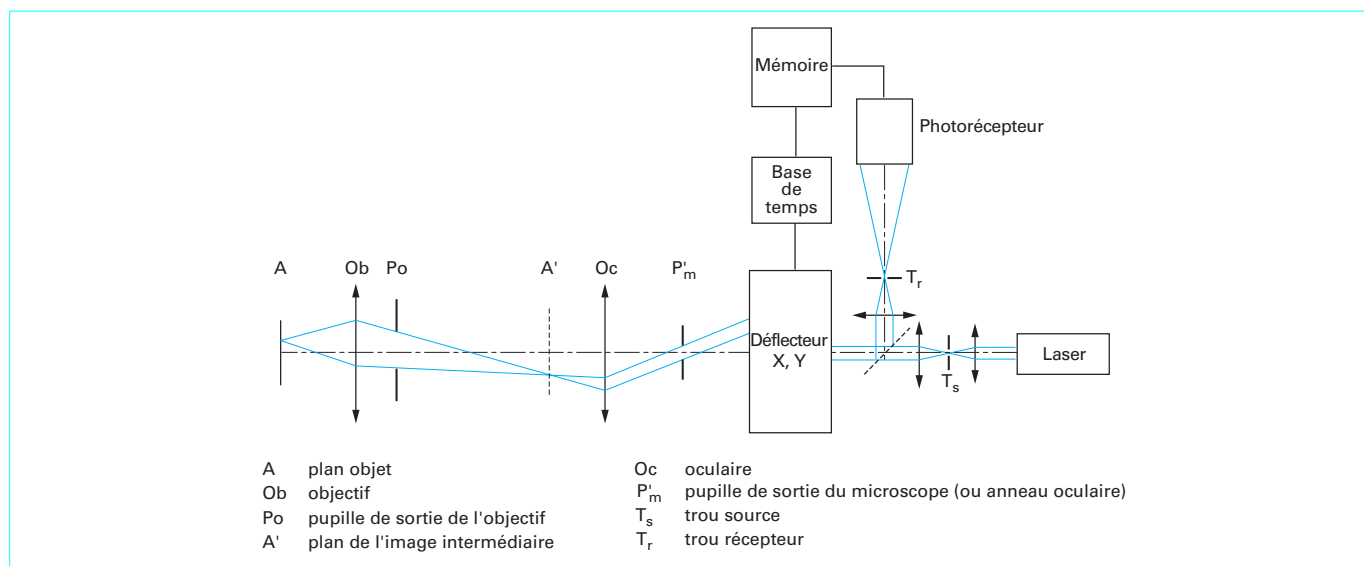


Figure 7 – Bloc-diagramme d'un microscope confocal à balayage laser en réflexion

influence détectable sur la qualité de l'image, ce qui définit en fait une profondeur de champ limitée aux plans MM distants de A de

$$\varepsilon = \pm \lambda / 4n(1 - \cos U)$$

En microscopie confocale par contre, pour cette valeur de  $\varepsilon$ ,  $E(z)$  est déjà diminué d'un tiers et, pour des trous source et récepteur de diamètre égal au cinquième de celui de la tache de diffraction, l'étendue géométrique est réduite dans un rapport de l'ordre de 20. On peut donc admettre une profondeur de champ, c'est-à-dire une **résolution longitudinale**, de l'ordre de  $z_0$  comprise entre 1 (objectif 10/0,25) et 0,04  $\mu\text{m}$  (objectif 100/1,25), donc 4 à 5 fois plus faible qu'en microscopie ordinaire.

Cette possibilité d'analyser un objet suivant des coupes beaucoup plus fines pour des plans de mise au point plus rapprochés permettant sa reconstruction en trois dimensions est l'avantage essentiel de cette microscopie.

## 2.3 Conception instrumentale

La conception d'un instrument conforme à la figure 2 a est particulièrement difficile en lumière transmise car elle implique que deux corps de microscope identiques soient centrés avec une incertitude inférieure d'un ordre de grandeur à leur tache de diffraction commune et que leurs plans objets restent toujours simultanément confondus. D'autre part, dans un tel projet, le balayage ne peut se faire que par double déplacement de l'ensemble des deux corps de microscope, ou de la platine, ensembles mécaniques encombrants et lourds, ce qui en limite nécessairement la fréquence et nuit à la stabilité de l'instrument. Il n'en est pas de même en lumière réfléchie où, un seul microscope étant utilisé, il est plus aisé d'assurer la conjugaison de deux trous de dimensions raisonnables dans l'espace intermédiaire (figure 7). Sous réserve de faire retraverser le double système déflecteur par la lumière réfléchie afin de la ramener dans une direction fixe, il est alors possible, en microscopie confocale par réflexion, de ne pas procéder au balayage de l'objet par son propre déplacement, mais d'utiliser la double déflexion d'un faisceau laser qui peut s'effectuer dans une

large gamme de fréquences pouvant atteindre de grandes valeurs. C'est sur ce schéma, qui impose un besoin supplémentaire d'éléments optiques, que sont aujourd'hui construits la plupart des instruments existants.

■ La **source de lumière** utilisée est un laser à gaz peu divergent émettant un faisceau monochromatique de faible puissance (de l'ordre de un milliwatt) suffisante pour que sa focalisation dans le plan de l'objet crée un éclairement énergétique s'avérant souvent trop intense et qu'il faudra donc atténuer. Dans la zone du spectre visible pour laquelle les optiques sont couramment corrigées, on utilise les lasers à gaz à émission continue He-Cd (442 nm),  $\text{Ar}^+$  (9 raies entre 454 et 514 nm), He-Ne (633 et, plus rarement, 543 et 594 nm). Dans la mesure où l'on dispose d'une optique le permettant, l'extension est possible vers le domaine du proche ultraviolet avec le laser He-Cd (325 nm), notamment pour exciter la fluorescence, ce que permettent également sa raie bleue et les raies les plus courtes de l'argon ionisé, ou vers le proche infrarouge avec le laser He-Ne (1 152 nm). Cette lumière est successivement focalisée sur le trou source  $T_s$  conjugué du plan objet, collimatée avec un diamètre compatible avec celui de la pupille  $P'_m$  du microscope, défléchi angulairement dans deux directions perpendiculaires autour du centre de la pupille puis, après réflexion sur l'objet et retraversée du déflecteur, focalisée sur le trou récepteur  $T_r$  conjugué du trou source, reçue par un photorécepteur.

■ Le **système déflecteur** est composé de deux éléments assurant respectivement les balayages X ou *ligne* et Y ou *image*. Ces deux composantes doivent être simultanément conjuguées d'un plan pupillaire. Les conditions requises sont qu'ils n'affectent pas la résolution du microscope, qu'ils permettent de couvrir l'ensemble de son champ (ce qui n'est en général pas encore réalisé car trop exigeant en capacité informatique, incompatible avec les possibilités des systèmes de visualisation, ou plus simplement en contradiction avec la conservation de la résolution), qu'ils n'interdisent pas l'emploi alternatif ou simultané en microscopie traditionnelle en lumière transmise ou réfléchie. Plusieurs types de dispositifs sont disponibles et peuvent être utilisés seuls ou en association pour assurer les deux balayages.

● L'utilisation (figure 8) d'un **déflecteur acousto-optique linéaire** AO, au moins pour le balayage ligne, permet une fréquence variable atteignant une valeur de l'ordre de celle de la télévision (environ 60  $\mu\text{s}$  par ligne), un repérage répétitif des points sans dépasser une

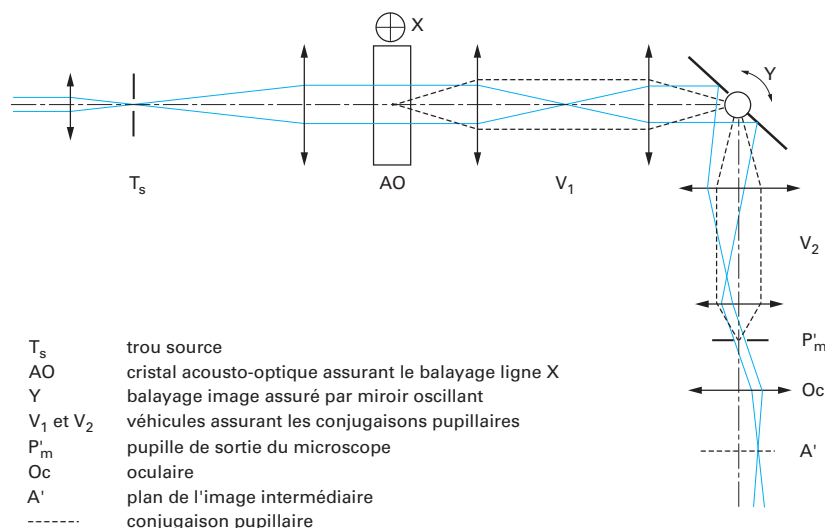


Figure 8 – Balayage ligne au moyen d'un dispositif acousto-optique

résolution d'environ 450 points par ligne, suffisante si l'on se limite à une trame carrée de 512 x 512 pixels. Outre un défaut d'encombrement, ce système impose, si l'on ne veut pas perdre trop d'énergie lumineuse, l'emploi d'une optique cylindrique destinée à élargir le faisceau au niveau du cristal actif dans la seule direction du réseau induit pour augmenter la zone d'interaction phonon-photon et faire que la dispersion par le réseau soit effective, ce qui rend difficile, par la suite, d'assurer la double conjugaison pupillaire et objective et la correction parfaite de l'astigmatisme introduit. Un second défaut provient du fait que la déflexion fournie par le réseau optique induit dans le cristal est produite sous un angle dépendant du pas variable de ce réseau alors que son inclinaison par rapport au faisceau incident reste fixe. Dans ces conditions, l'efficacité du réseau varie et la perte d'énergie transmise dans l'ordre diffracté utile peut atteindre 50 % pour la déflexion maximale. L'éclairement dans le plan objet n'est donc pas constant, ce qui impose une correction au niveau du traitement de signal et interdit la quantification des effets d'interaction lumière-matière au niveau de l'objet. Au cas où la lumière de retour est de longueur d'onde différente (en fluorescence, par exemple), elle sera défléchie à la traversée du système et reviendra donc finalement dans une direction non fixe dépendant de la longueur d'onde, ce qui est un inconvénient suffisamment majeur pour interdire l'emploi de ce système pour l'application considérée.

● L'emploi (figure 9) d'un **miroir tournant multiface** permet d'obtenir une fréquence ligne assez grande, mais une fréquence image limitée, du fait des temps morts causés par une trop grande déflexion. Il présente un premier inconvénient du fait que la position du centre instantané de rotation du faisceau lumineux, qui doit être dans la pupille, varie avec l'angle de déflexion, ce qui crée une aberration pupillaire parfois sensible. Pratiquement, l'inconvénient le plus grave provient des défauts de « pyramidité » propres à chacune des facettes conduisant à limiter le nombre de lignes afin qu'elles ne soient pas jointives pour ne pas risquer qu'elles se coupent. Il est bien sûr possible d'y remédier au prix d'un composant coûteux, éventuellement à facettes individuellement réglables, ce qui, augmentant l'encombrement et le poids, risque d'être source de vibrations.

● La solution la plus généralement adoptée (figure 10) est l'utilisation de miroirs solitaires d'équipages **galvanométriques** sous deux formes distinctes :

— les **galvanomètres résonants**, employés pour le balayage ligne à 8 kHz par exemple, permettent d'atteindre, pour une image de

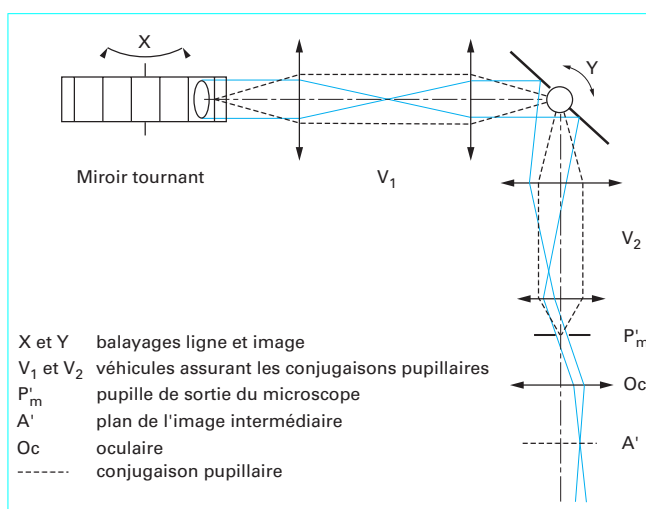


Figure 9 – Balayage ligne au moyen d'un miroir tournant multiface

512 lignes de 512 points, la fréquence cinéma (16 images par seconde). Ce balayage, dont la fréquence ne peut être modifiée, n'est pas linéaire, ce qui implique que son générateur doit piloter l'ensemble des autres composants électroniques du montage et de longs temps morts entre lignes pour éliminer les portions à vitesse trop lente (elle s'annule en extrémité de ligne). Cette non-linéarité entraîne une *variation de résolution* si les points sont définis par une horloge régulière assurant des temps de vol du spot constants, donc des luminations constantes, ou, au contraire, une *variation de l'excitation lumineuse* si l'horloge varie sinusoïdalement pour conserver même dimension spatiale aux points analysés ;

— les **galvanomètres asservis**, au contraire, permettent un balayage linéaire avec une fréquence de l'ordre de 250 Hz au mieux qui les rend aptes à être associés, pour le balayage image, à tous les systèmes qui viennent d'être évoqués. En balayage ligne, ils permettent un temps de vol de l'ordre de 8  $\mu$ s en chaque point d'une



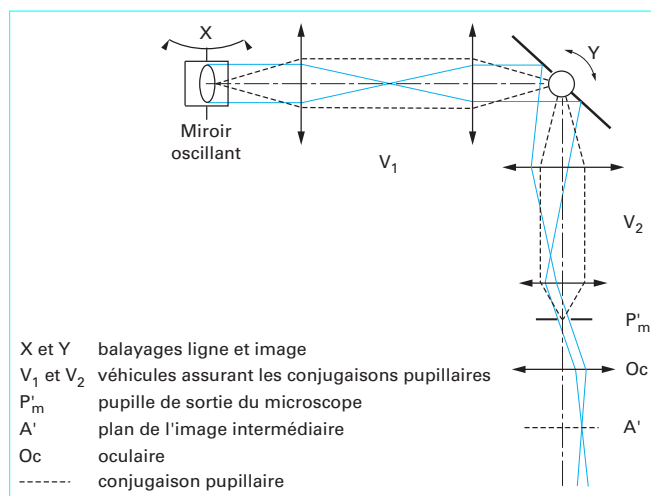


Figure 10 – Balayage ligne au moyen d'un miroir oscillant

ligne de 512 points, ce qui n'est pas incompatible avec les exigences d'excitation ou d'analyse de signal propres à certaines applications. Le temps de saisie d'une image de 512 lignes est alors de deux secondes. Les temps morts (nécessaires à l'amortissement des rebonds en fin de chaque période) sont relativement beaucoup plus courts qu'avec les systèmes résonants.

■ Les **objectifs** utilisés sont ceux qui assurent classiquement la résolution souhaitée. Ils doivent être associés à un oculaire de caractéristiques telles que le diamètre de la pupille de sortie du microscope ainsi constitué soit compatible avec celui du faisceau laser dans cet espace, afin que la pupille de l'objectif soit effectivement couverte. Compte tenu de ce mode d'éclairage, l'emploi d'objectifs corrigés pour un champ plan (planachromats ou planapochromats) est nécessaire.

■ Le choix du **détecteur** ne doit pas poser de problèmes. Si le balayage est lent, compte tenu des grandes valeurs d'éclairement, il ne doit pas être nécessairement sophistiqué. Néanmoins, si les flux lumineux sont faibles, par exemple en épifluorescence, ou pour l'observation en lumière réfléchie d'objets réputés transparents et/ou si cette lumière est de bande spectrale large, l'emploi d'un photomultiplicateur risque de s'imposer et reste préférable dans tous les cas. Servant seulement à recueillir un flux lumineux, il n'est pas nécessaire que sa surface photosensible soit placée dans un plan image, donc confondue avec le trou récepteur du système confocal, mais seulement suffisant que ses dimensions ne viennent pas limiter l'étendue du faisceau définie par ce trou et la pupille située dans le même espace.

Cet instrument d'optique est associé à certains **éléments périphériques** de caractéristiques compatibles avec celles du balayage, pilotés par ses générateurs, ou le pilotant eux-mêmes. Ces éléments doivent permettre le traitement du signal analogique fourni par le photorécepteur afin notamment de le numériser soit pour le soumettre à des opérations en temps réel, soit pour le stocker en vue d'un traitement ultérieur ou d'un transfert à une fréquence différente compatible avec celle d'un affichage.

## 2.4 Exemples de réalisation de microscopes confocaux

Dès l'origine sont apparus sur le marché d'une part, au Royaume-Uni, un instrument mis au point par Brakenhoff et son équipe (1979),

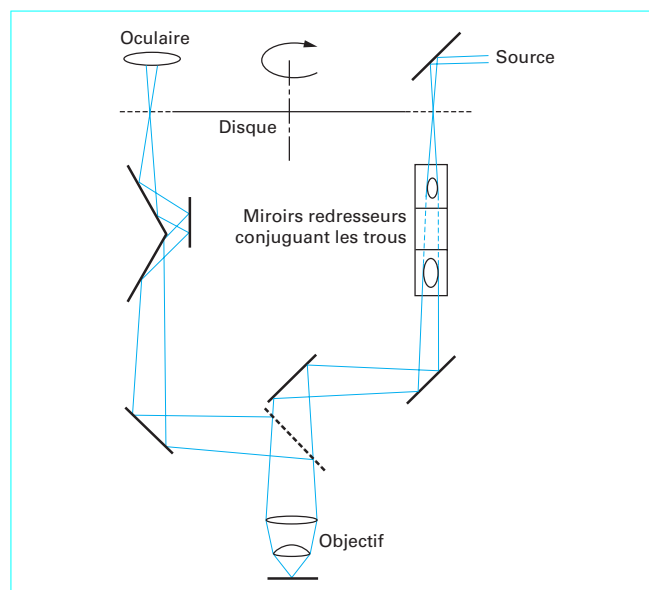


Figure 11 – Exemple de microscope confocal à balayage multitrou permettant l'observation visuelle. (Tandem Scanning microscope, Tracor France)

conçu suivant le schéma de la figure 2 a, construit par Lasersharpe Ltd ; d'autre part, en Allemagne, un instrument proposé par Wilcke (1983) suivant le schéma de la figure 7, construit par Carl Zeiss. Ils ont été suivis par des équipements notamment fournis par Leica GmbH en Allemagne ou Waterloo Scientific Inc. au Canada.

Il nous faut encore mentionner un système de balayage original adopté dans l'instrument confocal par réflexion le plus anciennement connu (Petran, 1968), fabriqué par Tracor Northern (USA).

Muni (figure 11) d'un **disque tournant** partagé en secteurs percés de multiples trous disposés le long de spirales d'Archimède (disque de Nipkow), à chaque instant les trous éclairés d'un secteur sont conjugués de ceux du secteur opposé. Le champ est entièrement couvert par un secteur et balayé autant de fois par tour que le nombre de secteurs. La vitesse de rotation peut être réglée de telle sorte que l'impression d'une observation totale tant visuelle que photographique ou vidéo soit obtenue. Cette solution à multiples trous source et récepteur ne permet pas l'éclairage par un faisceau laser focalisé mais au contraire met en œuvre une source et un système d'éclairage classique de Köhler pour illuminer l'ensemble du champ. Moins bien adapté à la microscopie par fluorescence, il possède tous les autres avantages de la microscopie confocale tout en permettant l'observation visuelle.

Des publications font encore état d'instruments mis au point en laboratoire n'ayant pas nécessairement fait l'objet de développement industriel. Ainsi inspiré du précédent, un montage est proposé par Svishchyov (1969) permettant également l'observation visuelle. Nous le qualifierons de pseudo-confocal en ce sens qu'il utilise deux fentes conjuguées à la place de deux trous source et récepteur et qu'ainsi il ne peut bénéficier des qualités de la confocalité que dans une direction. Il est vrai qu'il a été plus particulièrement destiné à l'étude de la diffusion des matériaux. Néanmoins, malgré un schéma complexe, il présente l'intérêt d'une économie de balayage, celui-ci n'étant nécessaire que dans la direction perpendiculaire aux fentes, et il pourrait être avantageux de remplacer la fente réceptrice par une barrette de photodiodes pour en faire un instrument photoélectrique. Schématiquement (figure 12), éclairée par la source S, la fente d'entrée  $F_1$  est projetée sur l'objet par l'objectif du microscope Ob en traversant annulairement un cube séparateur R. Le

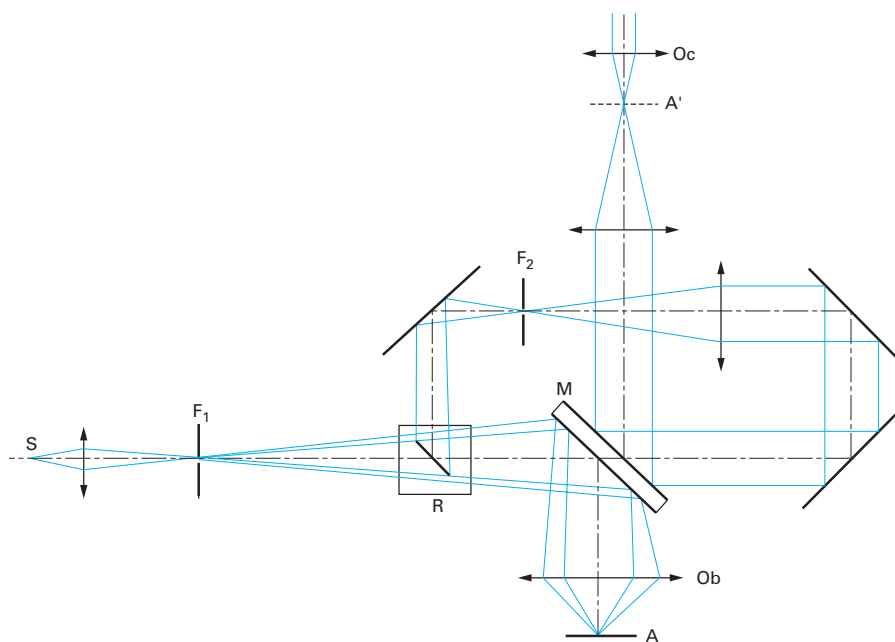


Figure 12 – Schéma du microscope pseudo-confocal utilisant des fentes source et récepteur

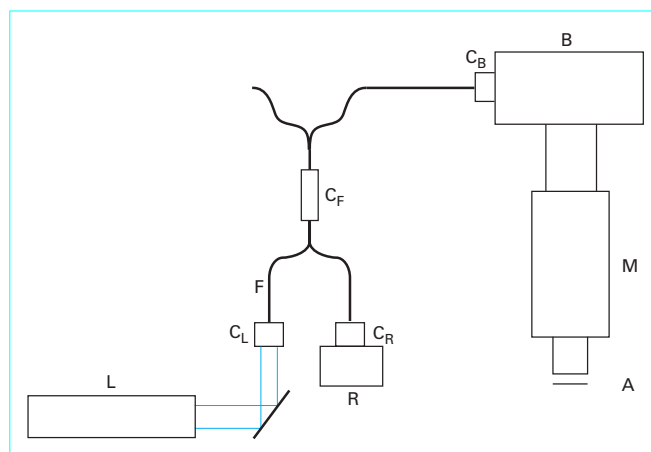


Figure 13 – Schéma d'un microscope optique à balayage laser confocal utilisant une fibre optique

balayage de la préparation est assuré par le miroir M. Après réflexion sur l'objet, déflexion par le miroir M, puis réflexion par le miroir central du cube séparateur, le faisceau lumineux vient former par autocollimation l'image de la fente  $F_1$  sur la fente réceptrice  $F_2$ . Le faisceau subissant à nouveau la réflexion sur le miroir à deux faces réfléchissantes M, l'image de la ligne balayée se forme dans le plan objet de l'oculaire Oc.

Une solution intéressante par la simplicité de sa réalisation a été récemment (1992) proposée par Kenneth et al. (figure 13). L'onde émise par un laser L est couplée par le coupleur  $C_L$  à une fibre optique monomode F. Cette fibre est couplée à une seconde fibre monomode par le coupleur de fibres  $C_F$ . En sortie de ce coupleur, l'une des fibres est dirigée vers le générateur de double balayage B,

associé au microscope M, auquel elle est couplée par le coupleur  $C_B$ . La sortie de fibre, source aux dimensions de la tache de diffraction, est conjuguée du plan objet A. La lumière réfléchie par l'objet suit le trajet inverse, la sortie de fibre étant autoconjuguée, et après traversée du coupleur de fibres  $C_B$  est dirigée par la seconde fibre vers le récepteur R qui lui est couplé par le coupleur  $C_R$ . La fibre libre en sortie du coupleur  $C_F$  peut être dirigée vers un second montage ou vers un dispositif de référence contrôlant l'intensité de l'onde incidente.

D'autres propositions existent, de même que des solutions particulières sont proposées appliquant notamment des techniques d'hétérodynage. Une solution qui pourrait améliorer les performances des instruments multisources a été récemment publiée par Juskaitis et Wilson (1996), mais il est encore prématuré de la présenter, eu égard au délai probable nécessaire à son développement.

## 2.5 Domaines d'application du microscope confocal

### ■ Accès à la dynamique d'un phénomène. Visualisation 3D

Nous avons déjà mentionné que le signal photoélectrique peut être utilisé pour l'affichage Z d'une image résolue d'un champ objet ou de sa répartition photométrique Y en temps réel si les caractéristiques du balayage sont compatibles avec celles du moniteur, sinon par l'intermédiaire d'un stockage en mémoire Mém (figure 14). Susceptible de tout traitement actif (modification de contraste, effacement de niveaux sélectionnés, discrimination de contours...) par contre-réaction CR sur le niveau d'émission de la source, échantillonné par les impulsions d'une horloge Cpt dont le comptage fournit l'adresse des points résolus, il peut recevoir tout traitement passif après réception. Si un seul balayage suffit à saisir l'information pour un objet statique, le balayage continu ou d'images successives, sous réserve d'adapter sa fréquence à la vitesse d'évolution, donne accès à la dynamique d'un phénomène : mobilité d'une cel-

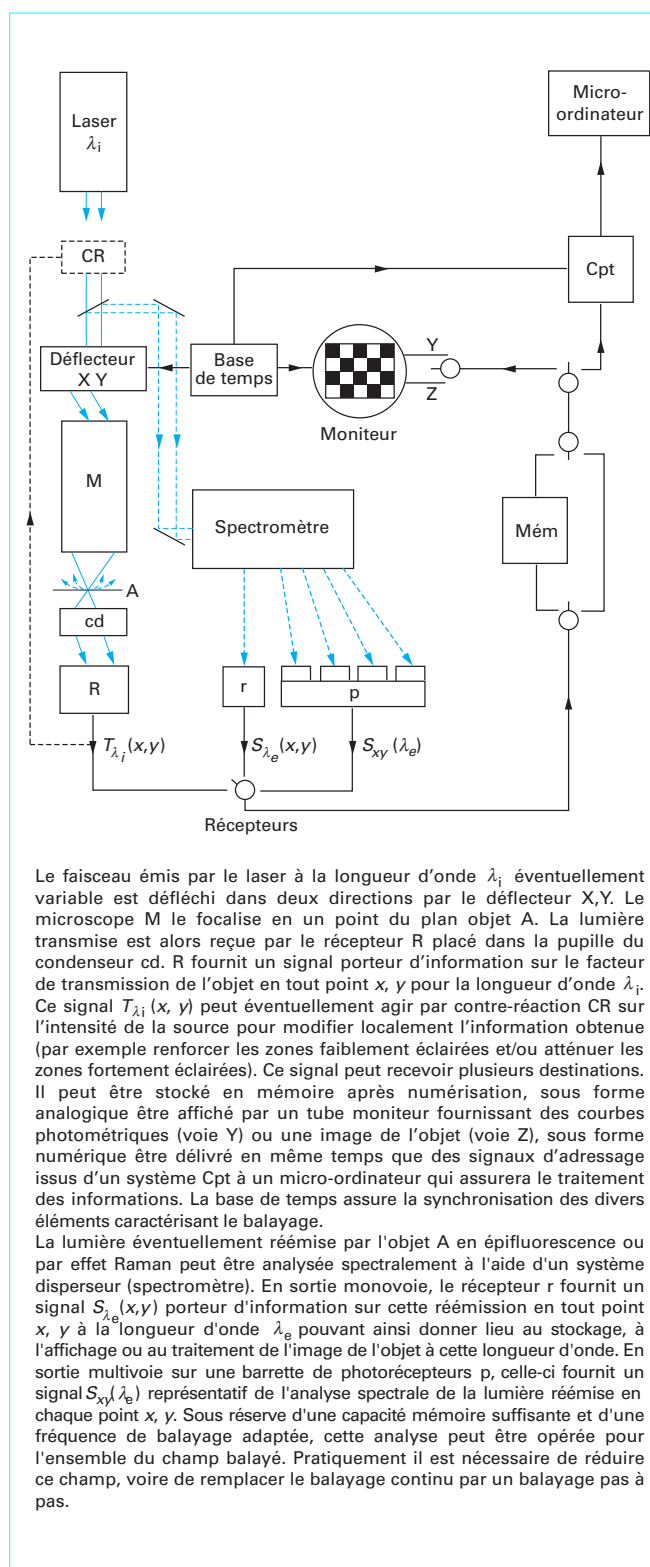


Figure 14 – Bloc-diagramme de fonctions accessibles en spectrométrie à un microscope confocal à balayage laser

lule, transfert d'une information, croissance ou décroissance d'un effet induit... Grâce à la très faible profondeur de champ de l'instrument, ces potentialités peuvent s'appliquer à un ensemble de plans d'analyse faiblement équidistants conduisant à leur étude en trois dimensions.

#### Interaction lumière-matière : fluorescence, effet Raman

L'emploi d'une irradiation ponctuelle par un faisceau laser intense offre un intérêt supplémentaire. La monochromaticité du spot permet l'étude photométrique par l'accès au facteur de transmission  $T_{\lambda_i}(x, y)$  à longueur d'onde donnée, pour un ensemble de longueurs d'onde discrètes (avec plusieurs lasers ou un laser multi-raie), une bande de faible largeur spectrale (avec un laser accordable). De plus, le schéma confocal permettant de ramener la lumière réémise par fluorescence ou effet Raman dans une direction fixe après traversée du modulateur XY, il est possible d'en faire l'analyse spectrale en fonction des coordonnées de l'objet à longueur d'onde donnée  $S_{\lambda_e}(x, y)$  ou de la longueur d'onde en un point donné  $S_{xy}(\lambda_e)$  en l'introduisant dans un spectromètre mono ou multicanal dont la fente d'entrée est conjuguée du trou source.

Ce type d'irradiation présente par ailleurs un avantage indéniable sur les méthodes d'excitation habituellement utilisées.

En effet, s'il est possible d'adapter la longueur d'onde excitatrice à la spécificité du phénomène, le spectre de lumière réémise (figure 15) est parfaitement caractéristique de cette longueur d'onde car il n'est pas l'effet de l'ensemble des radiations transmises par le filtre d'excitation habituellement associé à une source spectralement continue utilisée en microscopie ordinaire. D'autre part, le spectre analysé est bien caractéristique de la seule fluorescence car il ne s'y superpose pas les résidus de celui de la source transmis par le filtre d'arrêt au-delà de sa fréquence de coupure, en quantité bien sûr faible, mais parfois non négligeable devant celle de la lumière réémise. Par ailleurs, certains phénomènes de fluorescence ou Raman sont si faibles qu'ils ne sont détectés en microscopie ordinaire qu'en prolongeant la durée d'excitation, ce qui masque par intégration toutes informations évolutives. L'irradiation ponctuelle laser permet d'augmenter notablement la densité spatiale de puissance énergétique qui, suivant l'objectif utilisé, atteint de 0,5 à 10 MW/cm<sup>2</sup> quand le flux émis par un laser monochromatique de puissance 20 mW est concentré dans la tache de diffraction alors que, pour les mêmes objectifs dont le champ est éclairé uniformément par une lampe à arc au mercure de forte luminance (40 000 stilbs), dont environ 2 % de la puissance totale peut être estimée utilisée pour l'irradiation, les densités spatiales de puissance sont 10<sup>6</sup> fois plus faibles. À rendement égal, il est donc possible d'envisager un effet identique pour des temps d'excitation réduits dans le même rapport.

Nota : on rappelle que 1 sb (stilb) = 10<sup>4</sup> cd/m<sup>2</sup> (candelas par mètre carré).

#### Étude des défauts des matériaux. Étude des couches minces

Outre cette application très importante dans le secteur biomédical, la microscopie confocale permet l'étude d'une autre interaction lumière-matière se traduisant par l'induction d'un courant électrique par irradiation lumineuse ou OBIC (Optical Beam Induced Current). Le balayage à l'aide d'un spot lumineux d'un matériau semi-conducteur, par exemple, permet d'y localiser les zones photosensibles par superposition de l'image passive de l'objet obtenue en lumière réfléchie et de son image active obtenue en captant le courant photoélectrique qu'il produit s'il est illuminé, l'analyse de ce signal permettant d'apprécier le rendement de cette transformation. De façon générale, séparer grâce à la faible profondeur de champ les défauts de volume de ceux de surface, repérer les dislocations sur un composant fini, contrôler leur microgéométrie dans trois directions sont des moyens répondant aux préoccupations du secteur de la microélectronique. Il en est de même en science de matériaux où cette microscopie est appliquée à l'étude de leur structure, à la détection des défauts et impuretés, à la caractérisation des états de surface et d'interface, au repérage des dislocations et joints de grain. La possibilité d'analyser de très fines tranches en microscopie confocale favorise l'étude des matériaux en couches

### 3. Microscopie optique en champ proche

Au début des années 1980 sont apparues de nouvelles générations de microscopes à balayage dont les résolutions latérale et longitudinale sont à l'échelle atomique. Le premier en date de ces instruments (**STM** ou *Scanning Tunneling Microscope*) met en œuvre l'**effet tunnel électronique**. Si l'on considère la surface d'un conducteur, il y existe un nuage d'électrons dont la densité décroît exponentiellement avec la distance à la surface. En approchant à quelques dixièmes de nanomètre une autre surface conductrice et, en particulier, une pointe de dimension théoriquement monoatomique, les nuages d'électrons correspondant aux deux conducteurs se mélangeant, il leur est possible de franchir une *barrière de potentiel* (**effet tunnel**). Cela donne naissance à un courant électrique décroissant exponentiellement avec la distance, ce qui permet de mesurer par balayage le profil de la surface au centième de nanomètre près avec une résolution latérale de quelques dixièmes de nanomètre. La mesure avec un tel dispositif des flexions d'une lame portant à son extrémité libre un stylet soumis aux *très faibles forces interatomiques* avec une surface balayée a conduit tout naturellement à la conception de **microscopes à forces atomiques (AFM** ou *Atomic Forces Microscope*) pouvant, avec les mêmes résolutions longitudinale de 10 pm et latérale de 0,3 nm, travailler sur des matériaux tant conducteurs qu'isolants. Ces deux types d'instruments, mettant en œuvre des interactions matière-matière, sont aujourd'hui développés industriellement.

Pour ce qui concerne l'optique, les méthodes conventionnelles, consistant à détecter, à une distance grande devant la longueur d'onde de la lumière (en « *champ lointain* »), les ondes se propageant après diffraction par l'objet, voient leur résolution latérale nécessairement limitée à la demi-longueur d'onde de la lumière utilisée, ce qui est une conséquence du fait que la direction de propagation des ondes est limitée à l'incidence rasante. Or l'onde diffractée par un objet plus petit que la demi-longueur d'onde possède des composantes non radiatives de fréquence supérieure à cette fréquence égale à  $2/\lambda$ , c'est-à-dire ne se propageant pas et restant localisées au voisinage de l'objet (constituant le **champ proche**) avec une amplitude décroissant exponentiellement avec la distance à sa surface (**onde évanescence**). Après une présentation succincte du phénomène, nous décrivons les conceptions d'instruments capables de capter ces ondes porteuses d'information sur les plus hautes fréquences spatiales d'un objet.

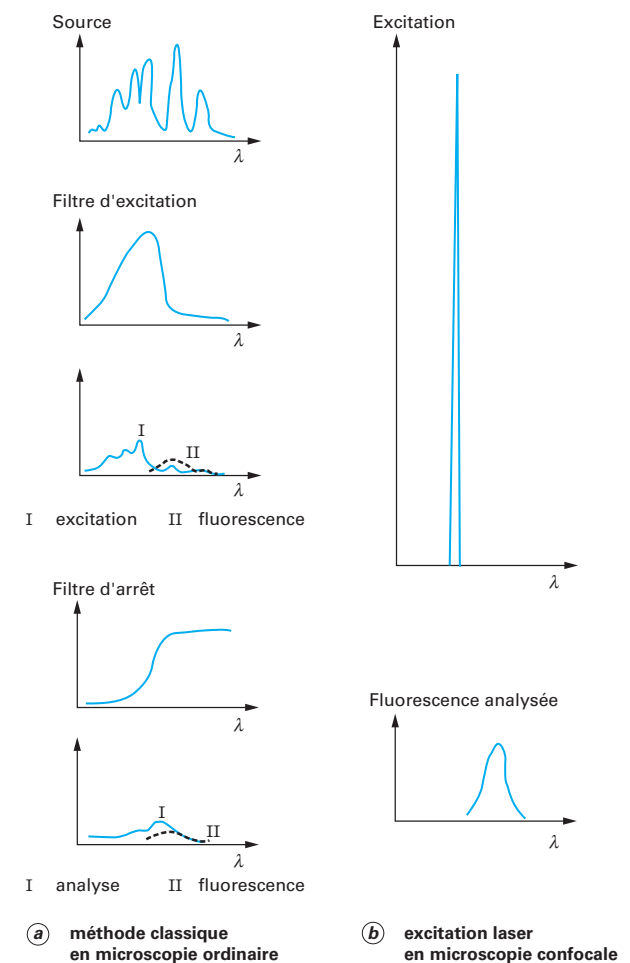
#### 3.1 Principe de la méthode

Considérons un objet transmettant ou réfléchissant une onde lumineuse plane de longueur d'onde  $\lambda$  avec un facteur d'amplitude  $E(x, y, 0)$ . Il possède un spectre de fréquences spatiales  $F(u, v)$  comprenant toutes les fréquences comprises entre  $-\infty$  et  $+\infty$  lié par transformation de Fourier à cette amplitude :

$$E(x, y, 0) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} F(u, v, 0) \exp[+i 2\pi (ux + vy)] du dv$$

$$F(u, v, 0) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} E(x, y, 0) \exp[-i 2\pi (ux + vy)] dx dy$$

signifiant que l'onde diffractée est un ensemble d'ondes planes de directions  $(\lambda u, \lambda v)$ .



En ordonnées sont données les intensités pour les spectres d'émission de la source, d'excitation, de fluorescence réémise et de lumière analysée ou les facteurs de transmission des filtres d'excitation et d'arrêt.

Figure 15 - Comparaison des méthodes d'observation en fluorescence par excitation classique en microscopie ordinaire et excitation laser en microscopie confocale

minces. En lumière polarisée, ce qu'émet souvent naturellement un laser, on a accès à l'existence de biréfringences et activités, qu'elles soient naturelles ou provoquées sous l'action d'un champ électrique ou d'une induction magnétique (effets Pockels ou Faraday).

#### ■ Observation d'objets transparents

Notons encore que le microscope confocal à balayage laser utilisant une source de lumière cohérente est tout à fait adapté à l'examen des **objets de phase** s'il lui est associé une méthode classiquement mise en œuvre comme le *contraste de phase* ou le *contraste interférentiel*. L'amélioration du contraste, la faible profondeur de champ, la diminution du bruit rendent possible avec un instrument confocal en réflexion l'examen d'objets typiquement **transparents** dont on peut mettre en évidence les différents interfaces (membranes biologiques, par exemple).

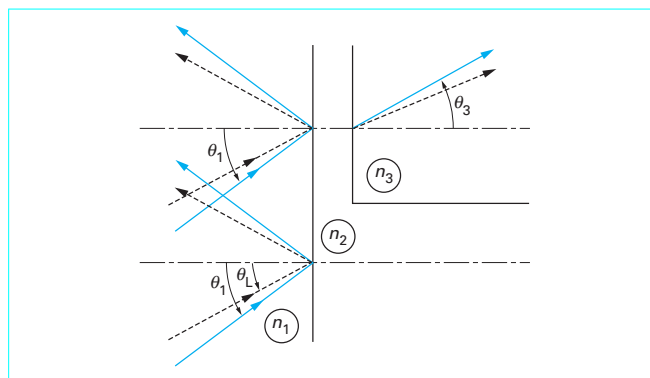


Figure 16 – Problème de la réflexion totale interne

### ■ Création d'une onde évanescente

L'expression de  $E$  étant l'équation d'une onde, celle de  $F$  satisfait la relation de propagation :

$$F(u, v, z) = F(u, v, 0) \exp \left[ - (2 \pi z / \lambda) \sqrt{(\lambda^2 u^2 + \lambda^2 v^2 - 1)} \right]$$

Cette expression montre que les composantes diffractées respectant la condition  $\lambda^2 u^2 + \lambda^2 v^2 < 1$  se propagent dans la direction  $z$ , alors que celles qui sont telles que  $\lambda^2 u^2 + \lambda^2 v^2 > 1$  donnent naissance, dans cette direction, à une **onde évanescente** d'amplitude rapidement décroissante dont la profondeur de pénétration au-delà de l'objet, définie par la distance à laquelle son amplitude est égale à  $1/e$ , tend vers 0 lorsque la fréquence augmente.

Il est donc possible de produire une onde évanescente relative à de hautes fréquences spatiales en éclairant, avec une onde plane, un trou de dimension très inférieure à la longueur d'onde.

### ■ Réflexion totale frustrée

Un autre moyen (figure 16) d'obtention d'une onde évanescente confinée au voisinage d'une surface résulte du phénomène de réflexion totale. Si une onde se propageant dans un milieu d'indice  $n_1$  subit une réflexion totale interne à l'interface avec un milieu d'indice  $n_2$  inférieur à  $n_1$  quand l'angle d'incidence  $\theta_1$  est supérieur à l'angle limite  $\theta_L$  tel que :

$$\sin \theta_L = n_2 / n_1$$

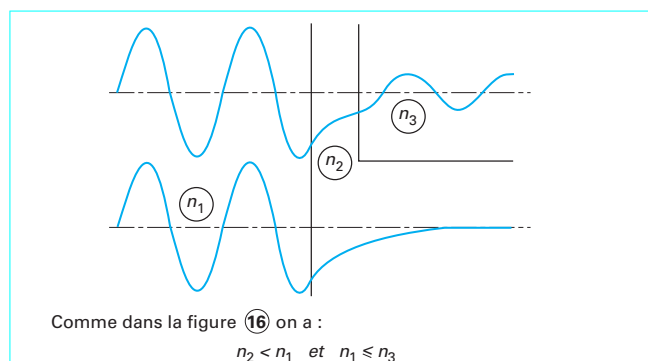
une onde évanescente est produite dans le milieu d'indice plus faible et reste confinée au voisinage de l'interface (figure 17), son amplitude décroissant exponentiellement avec la distance dans la direction  $z$  de la normale au dioptré, suivant

$$E(z) = E(0) \exp \left[ - (2 \pi n_1 z / \lambda) \sqrt{(\sin^2 \theta_1 - \sin^2 \theta_L)} \right]$$

Cette expression, strictement analogue à la précédente, se rapporte de même à des directions (ou des fréquences spatiales) ne pouvant réellement exister. Cette onde évanescente peut redonner naissance à une onde susceptible de propagation par le phénomène dit de **frustration de l'onde évanescente**, sorte d'*effet tunnel optique* relatif aux photons, si l'on approche suffisamment près de l'interface [à une distance inférieure à la distance de pénétration égale à  $\lambda / 2 \pi n_1 \sqrt{(\sin^2 \theta_1 - \sin^2 \theta_L)}$ ] un milieu d'indice  $n_3$  au moins égal à  $n_1$ . L'onde s'y propage (figures 16 et 17), avec une amplitude plus faible que celle de l'onde initiale, dans une direction  $\theta_3$  telle que :

$$n_1 \sin \theta_1 = n_3 \sin \theta_3$$

Ces deux modes de production d'une onde évanescente ont donné naissance à deux types de conceptions instrumentales. Dans



Comme dans la figure 16 on a :

$$n_2 < n_1 \text{ et } n_1 \leq n_3$$

Les périodes des sinusoïdes représentatives de l'onde sont respectivement égales à  $\lambda/n_1$  et à  $\lambda/n_3$  dans les milieux d'indice  $n_1$  et  $n_3$ .

Dans le milieu d'indice  $n_2$ , l'onde est représentée par une exponentielle décroissante dans la direction de propagation, d'amplitude tendant vers 0 quand la distance à l'interface tend vers l'infini.

Figure 17 – Aspect ondulatoire de la réflexion totale interne

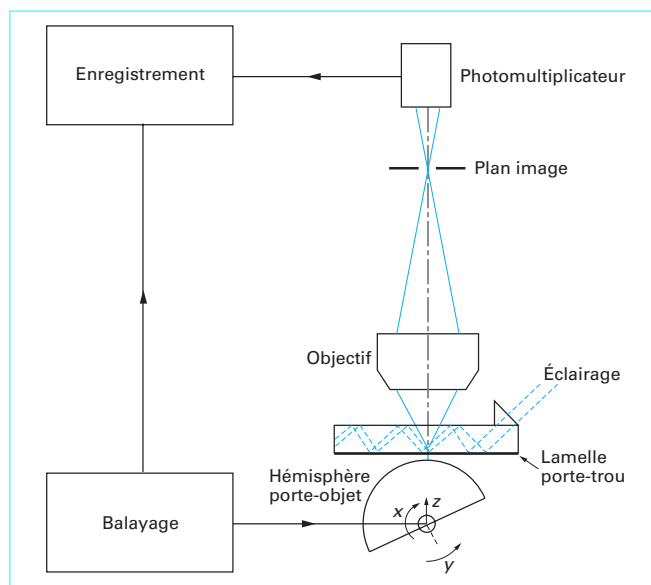
la première, un petit trou est illuminé. L'onde évanescente confinée en son voisinage éclaire un objet très proche avec des ondes relatives à des fréquences spatiales élevées. Par principe de réciprocité, si un petit objet placé dans une onde propagative donne naissance à une onde évanescente, à l'inverse, placé dans une onde évanescente, il en transforme une partie en onde propagative qui peut être détectée par une optique conventionnelle. C'est ce principe qui est appliqué pour visualiser l'objet éclairé par le petit trou qui définit alors la résolution latérale, la résolution longitudinale l'étant par le niveau du signal recueilli. Dans la seconde conception, plus récente, l'objet est l'interface sur laquelle se produit la réflexion totale. Dans le milieu d'indice faible est approchée l'extrémité d'une pointe d'un milieu diélectrique (fibre optique) définissant la résolution latérale, frustrant l'onde évanescente convertie en onde propagative excitant les modes de la fibre. Les réalisations qui en découlent sont plus proches de celles des STM ou AFM et peuvent profiter en partie des mêmes éléments périphériques.

## 3.2 Exemples de réalisation

Il n'existe encore que peu d'instruments décrits dans la littérature, ne semblant d'ailleurs pas voir de réel développement industriel.

■ Dans un instrument de **première génération** (1984), un petit trou de diamètre de l'ordre du dixième de micromètre est obtenu par évaporation d'une couche mince de Ta/W sur une lamelle couvre-objet supportant préalablement une petite sphère en latex de même diamètre. L'épaisseur de la couche, de l'ordre de 30 nm, étant inférieure au rayon du trou et très petite devant la longueur d'onde, les caractéristiques de ce trou satisfont les conditions d'obtention d'une onde évanescente (trou d'« épaisseur » nulle) quand il est éclairé, comme en éclairage fond noir, par un faisceau de lumière produit par un laser He-Ne (figure 18). La surface d'un hémisphère en verre de diamètre 15 mm, dont la zone en regard du trou peut être assimilée à une portion de plan, supporte l'objet. Lamelle porte-trou et sphère porte-objet sont solidaires d'un ensemble mécanique permettant différents réglages : centrage et alignement des deux éléments, réglage de leur distance par contrôle interférométrique ou, plus récemment, par association d'un dispositif STM, ajustement ou asservissement de cette distance à une valeur constante et commande du balayage de la sphère par double rotation au moyen de trois commandes piézoélectriques. Après diffraction par l'objet réfléchissant, l'onde propagative obtenue est normalement



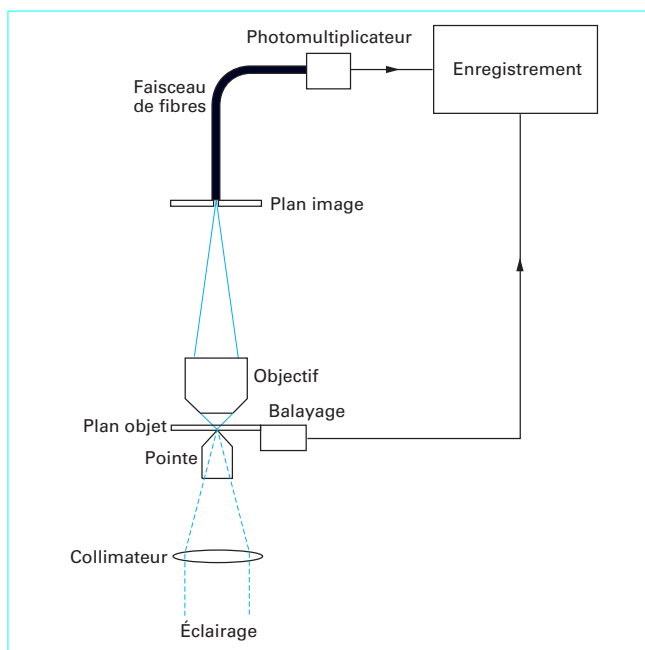


**Figure 18 – Microscope optique en champ proche utilisant un trou d'éclairage qui produit l'onde évanescente** (d'après U. Ch. Fisher)

recueillie par un objectif de microscope ordinaire, mis au point dans le plan de l'objet, fournissant une image dans le plan d'un diaphragme conjugué du trou source afin d'éliminer la lumière parasite en provenance de l'extérieur du trou. Le signal qui en résulte, produit par un photomultiplicateur, est enregistré, affiché ou mis en mémoire. La résolution latérale de l'instrument est de l'ordre de 20 nm.

Dans un autre instrument de première génération (1986) permettant une résolution latérale du même ordre (figure 19), l'onde filtrée et élargie émise par un laser  $\text{Ar}^+$  est focalisée sur un trou placé au sommet d'une pointe de rayon inférieur à 10 nm en extrémité d'un barreau de quartz. Ce barreau a été préalablement métallisé sur sa face externe par une couche d'aluminium d'épaisseur de l'ordre du micromètre, puis pressé au niveau de sa pointe contre une lame de verre, ou contre une partie transparente de l'objet, afin d'amincir localement l'épaisseur de cette couche pour qu'elle offre une transparence suffisante suivant le diamètre de la pointe. Le barreau est solidaire d'un double mouvement de déplacement longitudinal  $z$  produit par un moteur micrométrique d'une part et par un élément piézoélectrique agissant à l'échelle nanométrique d'autre part. La distance de la pointe à l'objet peut être contrôlée au moyen d'un dispositif STM associé. L'objet est solidaire d'une platine assurant son balayage dans deux directions orthogonales  $x, y$  par l'intermédiaire de deux éléments ferroélectriques avec des courses de 50  $\mu\text{m}$  mesurées à l'aide de détecteurs à quatre quadrants. L'onde propagative est recueillie par un objectif de microscope ordinaire qui forme une image de l'objet isolé par le trou sur la face d'entrée d'un faisceau de fibres optiques qui guide la lumière vers la surface photosensible d'un photomultiplicateur. Le signal qu'il produit est utilisé dans les mêmes conditions que précédemment.

■ Les microscopes de **seconde génération** (1989) utilisent une onde évanescente produite par réflexion totale et sa frustration par l'extrémité amincie d'une fibre optique monomode. Par rapport aux précédents connus sous la dénomination de NFOS (*Near Field Optical Scanning microscopes*), ils se désignent maintenant sous le vocable STOM (*Scanning Tunneling Optical Microscope*) ou PSTM (*Photon Scanning Tunneling Microscope*). Dans une première réalisation (figure 20), l'objet transparent ou déposé sur un guide d'onde plan est éclairé par une onde évanescente produite par



**Figure 19 – Microscopie optique en champ proche à éclairage par extrémité amincie d'un barreau de quartz** (d'après D.W. Pohl, W. Denk et M. Lanz)

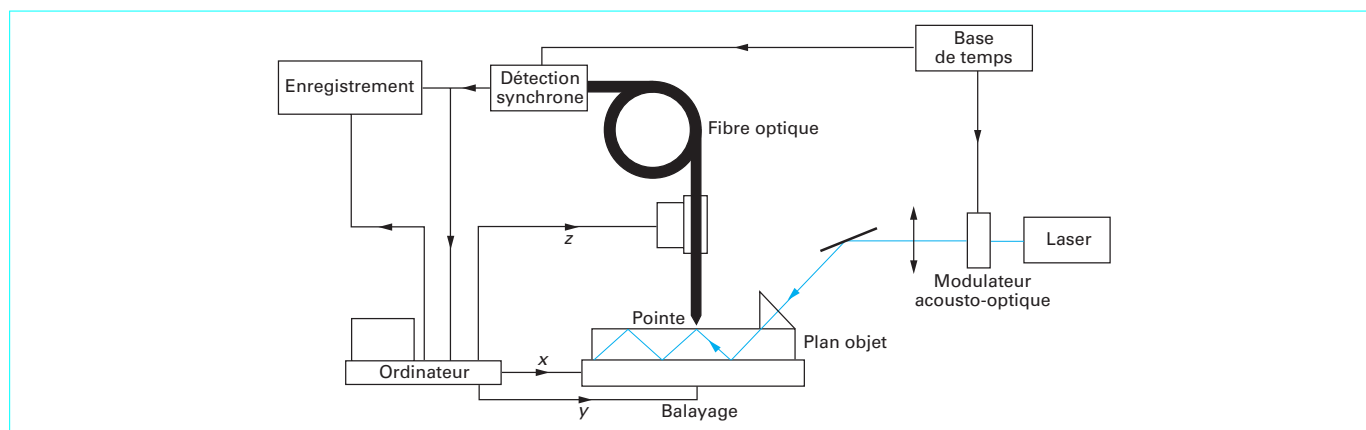
réflexion totale interne d'une onde émise par un laser He-Ne focalisée dans le plan objet. L'onde évanescente est frustrée par la pointe de la fibre qui propage la lumière vers le récepteur. Son signal est soumis à une détection synchrone, la lumière d'éclairage étant modulée en intensité au moyen d'un élément acousto-optique afin d'éliminer l'influence de toute lumière parasite. Le balayage de l'objet de même que son positionnement par rapport à la pointe sont assurés par des mouvements entraînés par des commandes piézoélectriques. Notons que, dans tous les systèmes décrits, la position de la pointe peut être asservie soit pour travailler à signal constant (ses déplacements mesurent le profil), soit à distance constante (le niveau de signal mesure le profil). Cet instrument permet des résolutions latérale et longitudinale respectivement inférieures à 10 nm et 1 nm.

Un autre instrument (figure 21) diffère essentiellement du précédent par son système d'éclairage. L'objet est déposé sur la face plane d'un prisme hémicylindrique, l'onde émise par un laser He-Ne l'illuminant au travers de ce support de telle sorte qu'il est possible de faire varier l'angle d'incidence supérieur à l'angle limite afin d'adapter la distance de pénétration à l'épaisseur de l'objet. Un polariseur permet, comme cela est d'ailleurs possible dans le montage précédent, de faire varier l'état de polarisation du faisceau d'éclairage afin d'optimiser le niveau lumineux de l'onde recueillie par la pointe de la fibre optique de rayon de courbure inférieur à 50 nm. Des commandes piézoélectriques pilotent le déplacement de la fibre dans trois directions afin d'assurer pointage et balayage. Pour une résolution latérale inférieure à 10 nm, les auteurs annoncent une résolution longitudinale inférieure à 0,5 nm.

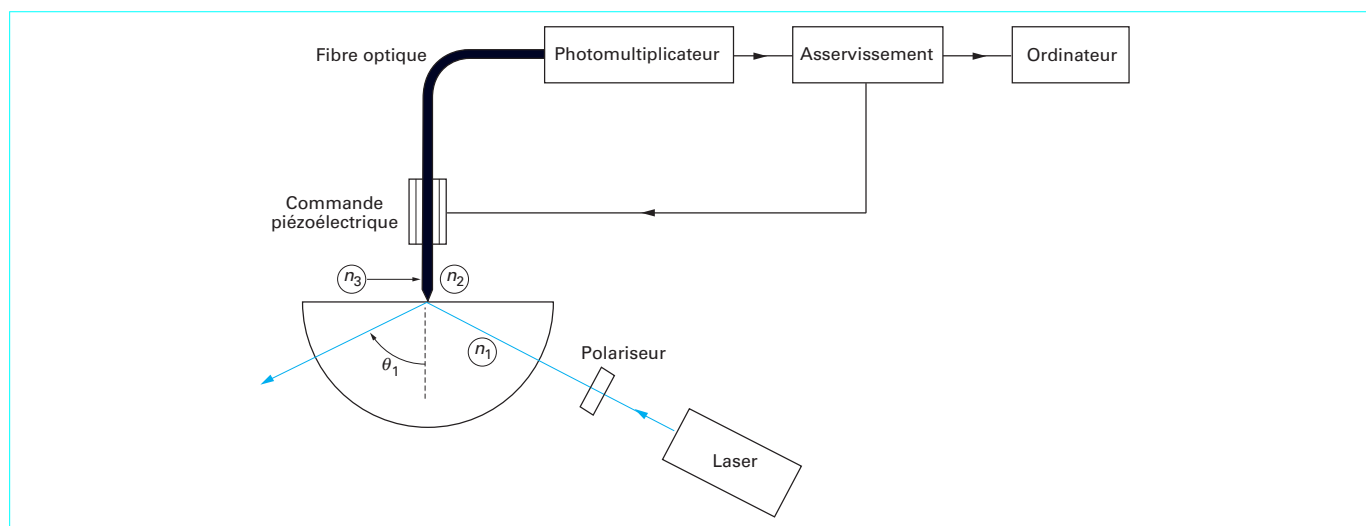
### 3.3 Conclusions

Ces instruments, encore peu développés et mal définis au plan de leur résolution latérale, dont l'étude théorique reste difficile, qui





**Figure 20 – Microscopie optique en champ proche utilisant une onde évanescente produite par réflexion totale frustrée par l'extrémité amincie d'une fibre optique** (d'après D. Courjon, K. Sarayeddine et M. Spajer)



**Figure 21 – Microscopie optique en champ proche utilisant une onde évanescente produite par réflexion totale réglable en incidence** (d'après L. Salomon, F. De Fornel, G. Chabrier et J.-P. Goudonnet)

dépend étroitement de la qualité et de la conservation du trou source ou de la pointe de lecture, semblent devoir constituer un progrès sensible en microscopie. La gamme dimensionnelle dans laquelle ils travaillent, qui est celle de la **microscopie électronique à balayage**, couvre une zone intermédiaire entre celles de la microscopie optique traditionnelle et de la microscopie à effet tunnel électronique et de ses dérivés. Sans présenter certains inconvénients de la microscopie électronique à balayage (préparation d'échantillons, travail sous vide), ils offrent les avantages toujours appréciés de l'emploi d'une onde lumineuse : **faible interaction avec la matière, propagation possible dans l'air ou d'autres milieux homogènes**

**transparents, choix de la longueur d'onde, adaptation ou usage de l'état de polarisation.** Leur emploi à l'échelle des grosses molécules pourrait concerner des domaines d'application aussi variés que la biologie, l'étude des matériaux, la chimie, ou encore permettre des traitements optiques par chauffage ou photolithographie à l'échelle nanométrique. Pourtant, si l'on en juge par l'important article de revue que vient de leur consacrer D.W. Pohl, l'absence totale de références au-delà de la seconde moitié des années 80, pendant lesquelles ils firent l'objet d'un intérêt évident, ne semble pas favorable à leur avenir.

# Microscopies optiques à balayage

## Bibliographie

- DE HOFF (R.T.) et RHINES (F.N.). – *Microscopie quantitative*. Masson (1972).
- ROBERTS (F.) et YOUNG (J.Z.). – *A flying spot microscope*. *Nature*, 167, 231 (1951).
- BOX (H.C.) et FREUND (H.). – *Flying-microscope adapted for quantitative measurements*. *Rev. Sci. Instr.*, 30, 28-30 (1959).
- PLUTA (M.). – *Advanced Light Microscopy*. Vol. 1 *Principles and basic properties*. Vol. 2 *Specialized methods*. Vol. 3 *Measuring techniques*. PWN-Polish Scientific Publishers & Elsevier (1989).
- WILSON (T.) et SHEPPARD (C.). – *Theory and practice of scanning optical microscopy*. Academic (1984).
- SHEPPARD (C.) et CHOUDHURY (A.). – *Image formation in the scanning microscope*. *Optica Acta*, 24, n° 10, 1051-1073 (1977).
- BRAKENHOFF (G.J.), BLOM (P.) et BARENDIS (P.). – *Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses*. *J. Microscopy*, 117, 219-232 (1979).
- WILKE (V.), GÖDECKE (Ü.) et SEIDEL (P.). – *Laser-Scan-Mikroskop*. *Laser und Optoelektronik*, n° 2, 93-101 (1983).
- PETTRAN (M.), HADRAVSKY (M.), EGGER (D.) et GALAMBOS (R.). – *Tandem-scanning reflected-light microscope*. *J. Opt. Soc. Am.*, 58, 661-664 (1968).
- SVISHCHYOV (G.M.). – *Microscope for the study of transparent highly scattering objects in incident light*. *Optika i spektroskopiya*, 26, 313-315 (1969).
- GHIGGINO (K.P.), HARRIS (M.R.) et SPIZZIRRI (P.G.). – *Fluorescence lifetime measurements using a novel fiber-optic laser scanning confocal microscope*. *Rev. Sci. Instrum.*, 63, n° 5, 2999-3002 (1992).
- JUSKAITIS (R.), WILSON (T.), NEIL (M.A.A.) et KOZUBEK (M.). – *Efficient real-time confocal microscopy with white light sources*. *Nature*, 383, 804-806 (1996).
- ROBLIN (G.), BERNSTEIN (L.), PRÉVOST (M.) et SLUCKI (G.). – *Étude d'un microscope optique à balayage appliqué à la fluorimétrie*. *J. Optics (F)*, 17, n° 6, 259-269 (1986).
- PRÉVOST (M.) et ROBLIN (G.). – *Localisation des surfaces photosensibles dans les semi-conducteurs*. *L'onde électrique*, 60, n° 5, 34-38 (1980).
- DIXON (A.J.), DOE (N.) et PANG (T.-M.). – *Industrial applications of confocal scanning optical microscopy*. *Scanning Imaging Technology, SPIE*, 809, 36-43 (1987).
- ROBLIN (G.), BERNSTEIN (L.), PRÉVOST (M.) et ALLAIN (M.). – *L'apport de la microscopie aux techniques de contrôle des composants micro et optoélectroniques*. Actes des conférences Opto 82 (Paris), p. 224-227 (1982).
- POHL (D.W.). – *Scanning near-field optical microscopy (SNOM)*. 32 fig. 93 réf in *Advances in optical and electron microscopy* édité par C. Sheppard & T. Mulvey, Academic Press Ltd (1997).
- FISHER (U.Ch.). – *Optical characteristics of 0,1 µm circular apertures in metal film as light sources for scanning microscopy*. *J. Vac. Sci. Technol.*, B3, 386-390 (1985).
- POHL (D.W.), DENK (W.) et LANZ (M.). – *Optical stethoscopy: image recording with resolution λ/20*. *Appl. Phys. Lett.*, 44, 651-653 (1984).
- DÜRIG (U.), POHL (D.W.) et ROHNER (F.). – *Near-field optical-scanning microscopy*. *J. Appl. Physics*, 59, 3318-3327 (1986).
- COURJON (D.), VIGOUREUX (J.M.), SPAJER (M.), SARAYEDDINE (K.) et LEBLANC (S.). – *External and internal reflection near field microscopy: experiments and results*. *Applied Optics*, 29, 3734-3740 (1990).
- SALOMON (L.), DEFORNEL (F.), CHABRIER (G.) et GOUDONNET (J.P.). – *Microscopie à effet tunnel photonique, optimisation des paramètres*. Actes des conférences Opto 91 (Paris), p. 71-79 (1991).

## Constructeurs

(liste non exhaustive)

### Carl Zeiss

<http://www.zeiss.fr>

### Leica Microsystems

<http://www.leica-microsystems.com>

### Thermo Electron Corp.

<http://www.thermo.com>

### Danish Micro Engineering (DME)

<http://www.dme-spm.dk>

### Nanonics Imaging Ltd

<http://www.nanonics.co.il>

### Optoprim

<http://www.optoprim.com>

### Oxford Instruments

<http://www.oxinst.com>

### RHK Technology

<http://www.rhk-tech.com>

## 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)