

## La FORMATION du HALO dans le CONTRASTE de PHASE

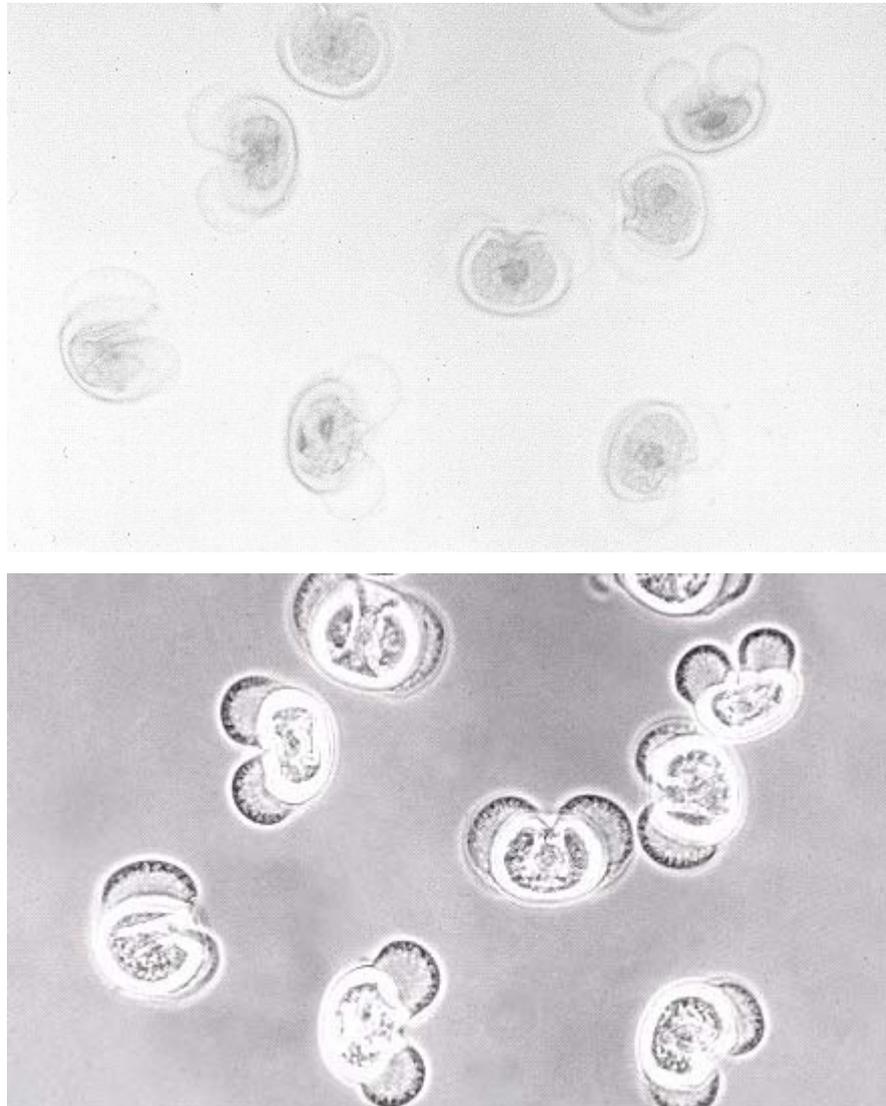


Fig. 1 – *Pinus silvestris*, pollen. (100: 1 sur la pellicule 24 × 36)

Chaque grain est fourni de deux sacs pleins d'air, avec une paroi très mince, qui lui permettent de mieux être traîné par le vent; ces parois sont à peine visibles en champ clair (image en haut).

En contraste de phase (au dessous), à l'intérieur des parois des sacs, sont bien visibles, en étant très sombres, les minces nervures internes qui servent de renforcement. À l'extérieur des sacs, bien visible le bord clair, caractéristique de cette technique d'observation: le célèbre "halo". La parois du grain apparaît par contre en contraste de phase (positif) comme plus claire du fond: ceci est un excellent exemple de la "inversion de contraste" dont nous parlerons encore (voir aussi, dans ce site, l'art. n° 33, pag. 14-15 – pour le moment en italien).

Tous ceux qui s'occupent de microscopie, tôt ou tard, auront la possibilité d'observer, directement ou reproduite dans quelques photos, une image obtenue avec la technique du "contraste de phase"; il s'agit d'une des "techniques de contraste", c'est-à-dire des dispositifs optiques qui s'appliquent à un microscope normal, pas stéréoscopique, pour augmenter dans l'image le contraste par respect au contraste de l'objet. Ces techniques sont utiles dans l'observation d'objets très transparents, par ex., cellules ou micro-organismes, qu'on veut suivre dans leurs ac-

tivités vitales, ou de toute façon sans coloration.

Mais, toujours en observant n'importe quelle image en contraste de phase, on sera frappé par les bords de l'objet, qui sont marqués par un double halo, d'habitude sombre à l'intérieur et clair à l'extérieur de l'objet. Si un tel halo est utile pour rendre en fort contraste les contours de l'objet, par contre, comme nous verrons, il cache les détails présents en correspondance de ce même halo.

Mais quelle en est la cause?

Dans la littérature, telle cause technique vient d'habitude ignorée: par ce qu'elle est trop compliquée ou pourquoi personne ne s'en soigne.

Nous voulons proposer ici une explication qualitative, intuitive, mais il faut avant tout rappeler quelques notions d'optique ondulatoire, ainsi que le principe fondamental du contraste de phase.

Il faut dire avant tout que les images de la fig. 1, comme il arrive dans la grande majorité des cas, sont obtenues avec la technique plus répandue: "contraste de phase positif normal"; nous mentionnerons en effet des autres variantes de la méthode, même si commercialement peu exploitée. Le contraste de phase peut être en effet réalisé de beaucoup de manières différentes, chacune avec des avantages et des désavantages; c'est le marché, à la fin, qui décide quel est la version la plus agréée par les praticiens et les autres viennent délaissées. Nous nous limiterons de toute façon aux principes fondamentaux sans entrer dans les aspects mathématiques. Nous supposerons aussi qu'on ait toujours à faire avec des objets minces; en effet, si l'objet est épais ou très réfringent<sup>1</sup>, il peut arriver que le contraste s'inverse<sup>2</sup>: un objet plus réfringent du moyen qui l'entoure n'apparaît plus sombre mais plus clair du fond, comme il se voit dans la deuxième photo de la fig. 1, en correspondance du bord de la partie centrale du grain.

Déjà depuis 1941 elle a été mise au point dans les usines Zeiss de Jena, sur la base des calculs du 1932 de Fritz Zernicke, que valurent à l'auteur le prix Nobel pour la Physique en 1953, une technique d'observation microscopique qui, malgré le prix de fabrication considérable, a de plus en plus assumée une large diffusion dans tous les genres de recherche basée sur l'usage du microscope optique.

Presque tous les constructeurs se sont immédiatement consacrés dans les années suivantes à la fabrication de dispositifs de ce genre: en 1948-49, Wild et Koristka, en 1951 Leitz, etc.

La méthode consiste à appliquer à un microscope normal une série d'objectifs spéciaux ("de phase") et un condensateur muni de diaphragmes annulaires adéquats.

Au point de vue de l'application, le contraste de phase essentiellement produit, d'un objet très transparent et plongé dans un milieu d'index de réfraction semblable au sien, une image aux marges très nettes, en général plus sombres et entouré par un halo plus clair du fond. Le contraste de phase classique montre en effet la plus grande partie des objets ou leurs marges, plus sombres en rapport à un fond plus lumineux.

Si l'objet est petit, il peut apparaître entièrement plus sombre du champ qui l'entoure, car le halo intérieur sombre en occupe entièrement la surface, le tout entouré par le halo plus clair. Si l'objet a une structure complexe, constituée par nombreux détails, chaque détail apparaîtra sombre ou bordée par des lignes sombres, et le recouvrement des halos clairs respectifs pourra faire

---

<sup>1</sup> En réalité, ce qui est important est le déphasage produit par l'objet sur la radiation qui le traverse; tel déphasage dépend de la longueur d'onde de la radiation et du chemin optique de l'objet. Le chemin optique est le produit de l'épaisseur de l'objet par son index de réfraction. Dire "objet épais et/ou très réfringent" équivaut à dire "objet avec un chemin optique plus grand du milieu environnant". "Objet mince et/ou peu réfringent" = "objet avec un chemin optique très peu supérieur à celui ...".

<sup>2</sup> Pour l'exactitude, l'inversion du contraste arrive quand le déphasage introduit par l'objet (voir plus loin, note 7 à la pag. 7, comment va compris et comme s'exprime le déphasage) dépasse 35 - 50°; la valeur exacte dépend de la transparence de l'anneau de phase: un anneau plus absorbant provoque l'inversion pour valeurs plus petites du déphasage de l'objet. Quand le déphasage arrive à 360° - une longueur d'onde - le contraste s'annule, mais cette condition est sans importance car un objet semblable est visible aussi sans contraste de phase à cause d'autres phénomènes, réfraction, réflexions internes, etc., qui peuvent se résumer avec le terme de "ligne de Becke".

apparaître l'objet dans son ensemble plus clair du champ.

Dans l'observation avec des systèmes optiques normaux, en "champ clair", un objet peu ou point coloré, très transparent, et avec un index de réfraction semblable à celui du moyen dans lequel il se trouve immergé, apparaît presque invisible.

Telle situation est très fréquente dans l'observation microscopique:

1) En biologie, quand on observe une cellule, un fragment de tissu, bactéries, protozoaires, petits métazoaires, gamètes, etc. "*in vivo*", c'est-à-dire quand on veut éviter de tuer, fixer et colorer l'objet, et cette chose comporte souvent une technique de préparation longue et complexe.

On rappelle que l'observation *in vivo*, au-delà d'être considérablement plus simple et plus rapide, permet d'observer un objet vivant dans son activité vitale normale, d'en étudier donc les fonctions, et ne demande pas de manipulation ou addition de substances étrangères à la préparation. En plus, elle donne la garantie que ce qu'on observe n'est pas en général un contrefait de la préparation, mais une structure qui existe normalement dans l'objet.

2) En chimie, dans l'industrie alimentaire, etc. quand on doit observer des émulsions, suspensions colloïdales ou de toute façon de particules solides, corps hétérogènes, matières synthétiques, poussières.

3) Dans l'industrie des verres optiques, pour l'observation des inhomogénéités du verre ou des irrégularités de ses surfaces.

4) Dans l'industrie des fibres textiles, spécialement synthétiques.

5) Dans l'industrie papetière.

6) En cristallographie, pour l'étude des microcristaux et de leur accroissement.

En tous ces cas, la méthode du contraste de phase peut permettre d'observer des objets ou structures autrement invisibles, d'observer des objets à l'état frais ou *in vivo*, ou des structures qui seraient autrement visible seulement après une convenable coloration.

Le contraste qu'on obtient avec cette méthode est en général très remarquable, et l'image résulte toujours d'interprétation facile. La mise au point du système est simple et pas critique, espèce si les tolérances dans la construction mécanique du statif sont suffisamment serrées.

Le prix d'un équipement "de phase" est en général le double d'un système correspondant pas de phase, composé par les mêmes objectifs avec les mêmes caractéristiques. Un équipement de phase peut être utilisé en général sur un statif de microscope normal, pourvu qu'il soit mécaniquement prédisposé.

Les objectifs spéciaux pour contraste de phase peuvent, sauf rares exceptions (épiscopie, fluorescence, etc.), être utilisés pour des observations en fond clair et fond noir, car ils sont constitués par un système de lentilles normal. Cependant, une limitation reste quant au contraste général de l'image: un objectif "de phase", utilisé en champ clair, présente un contraste inférieur à celui d'un objectif normal correspondant, c'est-à-dire pour champ clair. Ceci dérive du fait que dans le "centrique" (voir plus loin) produite par l'objectif de phase, les anneaux périphériques sont plus intenses pour la présence de l'"anneau de phase" (voir tout de suite dessous) et la superposition de tous les anneaux de diffraction, correspondants à tous les points de l'image, crée un voile de lumière diffuse qui baisse le contraste.

Ils existent, près de chaque producteur, des objectifs de phase et des objectifs normaux complètement identiques au point de vue de l'agrandissement, ouverture, corrections, etc. Aussi le condensateur de phase peut être utilisé pour champ clair, en union à un diaphragme iris, et en certains cas aussi pour champ noir. Ce qui distingue l'objectif de phase de l'objectif normal c'est la présence, dans le plan focale postérieur du système objectif, d'une "**anneau de phase**", c'est-à-dire une zone annulaire centrée par respect à l'axe du système<sup>3</sup>, en général constituée par une couche d'un matériel transparent diélectrique à index de réfraction élevé, en gré donc de retarder la phase de l'onde qui la traverse, et d'une couche métallique semi-transparente avec un coeffi-

---

<sup>3</sup> "La plaque de phase" de forme annulaire est aujourd'hui universellement acceptée, mais d'autres formes ont été utilisées: à ruban, en forme de croix, etc., toutes délaissées car elles produisent un contraste directionnel, pas symétrique par respect au centre du champ, et pour la plus grande difficulté de centrage.

cient de transmission plutôt bas (de 10 % à 40% selon le constructeur)(d en fig. 3). L'anneau de phase est d'habitude déposé par évaporation sous vide sur une lame plan-parallèle de verre ou sur la surface d'une des lentilles de l'objectif, même à l'intérieur d'un doublet collé. Si le déphasage qu'il opère est en retard, comme il arrive d'habitude, un tel retard peut être égal à  $\lambda/4$ <sup>4</sup> ou à  $3/4 \lambda$ ; ce dernier retard est équivalent cependant à une avance de  $\lambda/4$ . On peut obtenir donc avec la même méthode, en changeant l'épaisseur de l'anneau, des retards ou des avances de phase. La technologie des anneaux de phase est de toute façon très complexe.

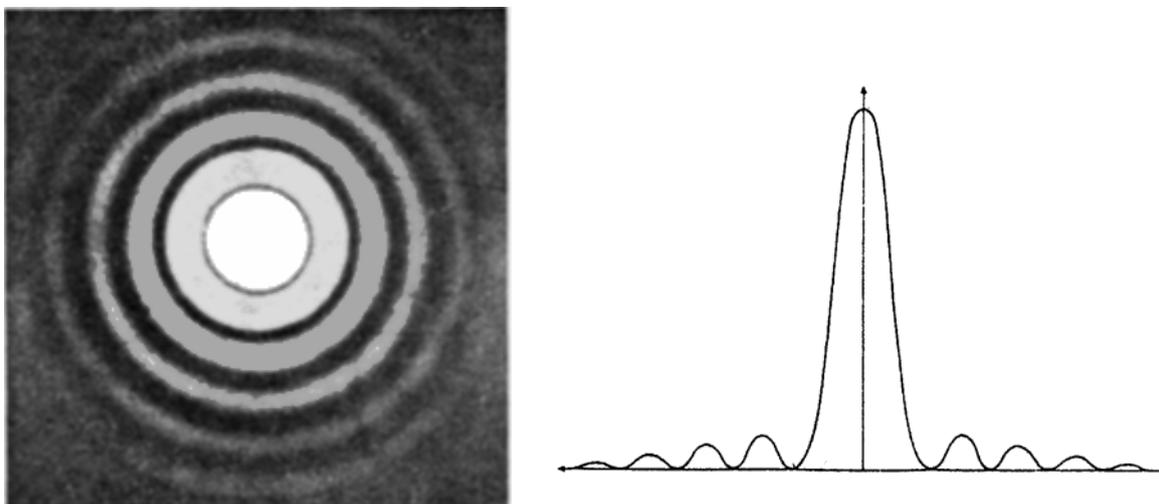


Fig. 2 a/b - Aspect d'un "centrique" ou "image de diffraction d'Airy", image d'un objet optiquement ponctuel<sup>5</sup> fourni par un système optique en conditions idéales (a) et son profil photométrique (b).

NB: Le disque d'Airy, le premier anneau et le deuxième semblent peut-être presque de la même intensité, mais ceci est dû à la mauvaise linéarité de la réponse de l'émulsion photographique qui n'arrive pas à enregistrer les forts contrastes présents dans la centrique.

(De: V. Ronchi, "Théories Energétiques de la vision", Atti Fondaz. Ronchi, 5, XXIII, p. 596-598; Florence, 1968).

=== Avant de procéder, il faut alors rappeler quelque détail sur la formation des images en optique.

En brève, toutes les fois qu'un onde (optique) rencontre une discontinuité (variation de transparence, d'épaisseur, d'index de réfraction, etc.) dans son chemin, elle ne continue pas en ligne droite, mais elle dévie suivant des lois qui dépendent du type de discontinuité, de la longueur d'onde, de la forme de l'onde, etc. et qui ne dépendent plus des simples règles de l'optique géométrique: on pourrait dire qu'elle vient éparpillé. En argot, l'onde vient «diffractée» et le phénomène s'appelle "diffraction". Il en dérive que, indépendamment du système optique qu'on utilise pour créer une image d'un objet, l'image n'est plus semblable géométriquement à l'objet: n'importe quel objet montre des discontinuités (de couleur, de transparence, d'épaisseur, etc.), et ces discontinuités, ses bords ou les bords de ses détails apparaissent "nuancés", ne pas définis.

Dans le cas d'une arête vive, par ex. le bord d'un corps opaque, son image apparaîtra bordée, accompagnée, par une série de quelques minces lignes parallèles ("franges"), nuancées, qui s'atténuent à mesure qu'elles s'éloignent de l'ombre géométrique de l'arête. Si l'objet se présente comme une série de lignes alternées de même largeur, de différente transparence ou épaisseur, etc., les choses se compliquent parce que les systèmes de franges créés par chaque bord de chacune des lignes se superposent, (en argot on dit qu'"elles interfèrent") et le résultat est une autre série de franges, plus nombreuses, plus régulières et en général plus fines. Un objet avec une structure donnée par des lignes parallèles et régulières s'appelle, généralement, "réseau". Comme «pas du réseau» on entend la largeur d'un couple de lignes, transparente et opaque par ex., c'est-à-dire la largeur de la structure qui se répète périodiquement quand on traverse le

<sup>4</sup> Avec la lettre  $\lambda$  (lettre l minuscule de l'alphabet grec ou "lambda") on indique la longueur d'onde d'une onde quelconque, comme celle optique. Dans le spectre optique, différents valeurs de  $\lambda$  donnent à l'œil "moyen" différentes sensations de couleur; dans le spectre acoustique on a d'ailleurs différentes sensations d'"hauteur" des sons.

<sup>5</sup> En optique on considère ponctuel un objet dont l'image géométrique est plus petite du disque d'Airy qui lui correspond dans son image de diffraction.

réseau en direction perpendiculaire aux lignes.

Dans le cas d'un objet quelconque, avec une structure complexe et donc avec un fort entrelacement de discontinuités, tout l'ensemble des ondes diffractées peut présenter une structure très irrégulière et une ouverture presque à toute espace, dans le sens qu'elle occupe presque toute l'espace devant et derrière le front de l'onde incidente.

Si nous considérons par contre un objet "ponctuel", c'est-à-dire de dimensions négligeables, les choses sont plus simples: les "franges" citées plus haut, qui accompagnent l'image d'un objet avec des bords nets, dans un certain sens se replient sur elles mêmes et elles forment une image caractéristique, comme on voit dans la fig. 2a qui précède, image nommée "de diffraction" ou "image d'Airy" ou "**centrique**". En elle, la grande partie de l'énergie se concentre dans un disque central ("disque d'Airy", aux bords nuancés) mais ce disque est entouré d'une série d'anneaux concentriques de diamètre croissant et d'intensité décroissante. Le profil photométrique de cette image, la variation de l'intensité qu'on relève en la traversant le long d'un quelconque de ses diamètres, est visible dans la fig. 2b.

La centrique représente donc l'image d'un objet ponctuel comme elle est imposée par les seuls phénomènes de diffraction. Dans la réalité, un système optique quelconque ne fournit jamais d'un "point objet" une image du tout identique à la centrique comme celle à peine décrite; il peut y avoir des défauts de projet lié à la réfraction ("aberrations du point" = chromatique, sphérique, coma, astigmatisme), défauts de fabrication, défauts dans les matériels ou dans l'assemblage, etc. à cause desquels à la centrique et à la diffraction se superposent des autres phénomènes et les choses s'aggravent toujours. De toute façon, pour différentes raisons techniques, dans un microscope de qualité même modeste, si correctement utilisé, on peut reconnaître, au moins dans la région centrale du champ, une centrique presque parfaite.

On comprend comme, le plus petite la centrique, meilleur sera la résolution, c'est-à-dire la capacité de distinguer dans l'image les points-image voisins, c'est-à-dire les fins détails. Le diamètre de la centrique représente donc la limite de la résolution d'un système optique. Pour en calculer le rayon, ou au moins le rayon du disque d'Airy, on peut utiliser la bien connue formule

$$r = 0,6 \lambda / NA \quad (1)$$

dans laquelle  $\lambda$  est la longueur d'onde de la radiation utilisée et NA est l'"ouverture numérique" du système optique.

Tout ce que nous avons dit pour une source "ponctuelle" on peut le répéter pour chacun des infinis points dont on peut considérer constitué un objet étendu; donc l'image d'un tel objet sera constituée par la superposition d'une infinité de centriques d'intensité différente, mais complètement superposées et ensuite indiscernables entre elle. ===

Un problème à part concerne le pouvoir résolutif d'un objectif de phase; il faut se rappeler que l'anneau de phase provoque un déphasage dans une petite partie de l'onde qui traverse l'objectif; telle partie résultera en général en quadrature de phase par respecte à la partie restante. Un déphasage semblable représente dans un certain sens une aberration "*sui generis*", et il doit en résulter une altération de la forme de la centrique donnée par l'objectif de phase: le diamètre de la tache centrale de l'image de diffraction (disque d'Airy) résulte dans les normaux objectifs de phase un peu plus petit que celui obtenu par l'objectif correspondant normal, non de phase. Donc, un objectif de phase, utilisé en contraste de phase ou en champ clair, a un pouvoir résolutif légèrement plus grand que celui de l'objectif correspondant non de phase.

Par contre, l'image de diffraction donnée par un objectif de phase montre une augmentation d'intensité des anneaux, spécialement du troisième et du quatrième, par respect à l'image normale; donc un objectif de phase produit un contraste légèrement inférieur à celui d'un objectif équivalent normal. Ça a déjà été mentionné. Le phénomène du contraste de phase, naturellement, compense largement cette perte de contraste, et ensuite on a ce désavantage seulement quand on utilise l'objectif de phase pour des observations en champ clair. On rappelle de toute façon que telle diminution du contraste devient appréciable seulement avec des objectifs forts.

Dans le condensateur de phase il existe une série de diaphragmes annulaires interchangeablebles (chaque diaphragme peut fonctionner jumelé avec 1 ou 2 objectifs de phase de différent agrandissement) qui laissent entrer la lumière dans le condensateur seulement en correspondance d'une bande annulaire centrée (voir la fig. 3).

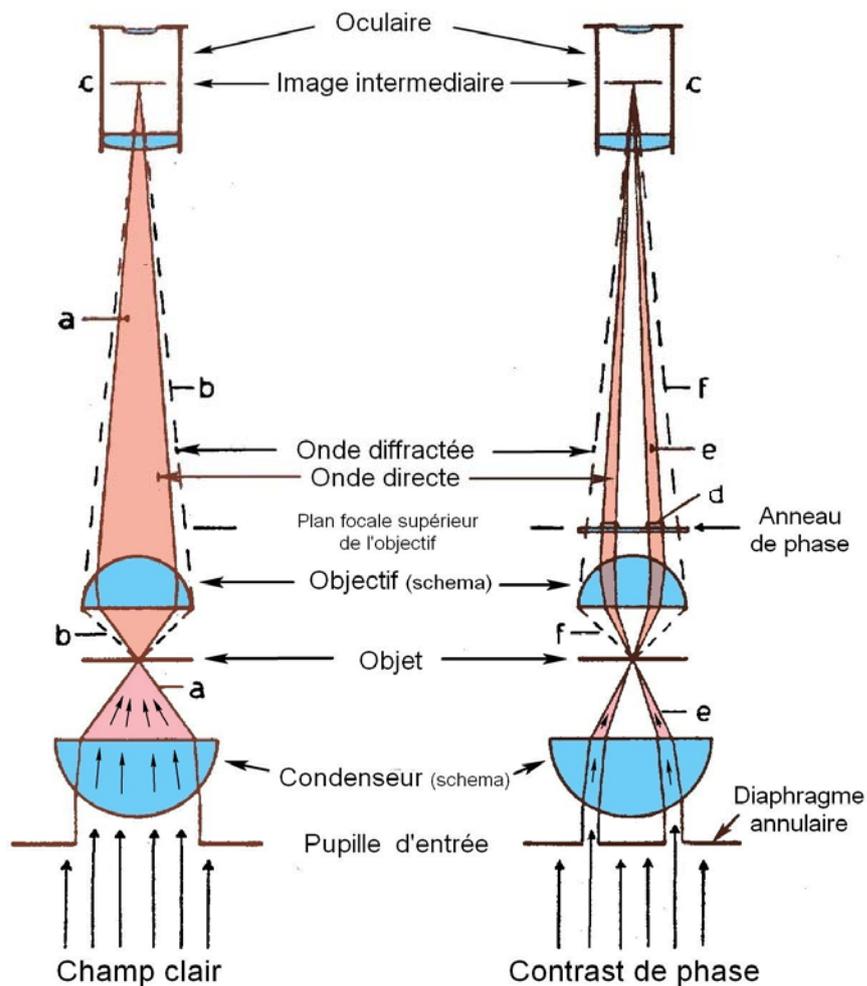


Fig. 3 - Schéma de microscope normal et en contraste de phase.

Le diaphragme annulaire se trouve au niveau de la pupille d'entrée, c'est-à-dire du plan focale antérieur, du condensateur et ensuite, quand la distance entre condensateur et objectif est correcte, avec une large tolérance, l'image du diaphragme annulaire apparaît dans le plan focal postérieur de l'objectif (B, fig. 4).

En choisissant opportunément le diaphragme en relation au type d'objectif utilisé et en corrigeant éventuellement le centrage avec des vis spéciales (fig. 5), on a un recouvrement parfait entre image du diaphragme et anneau de phase de l'objectif (fig. 4).

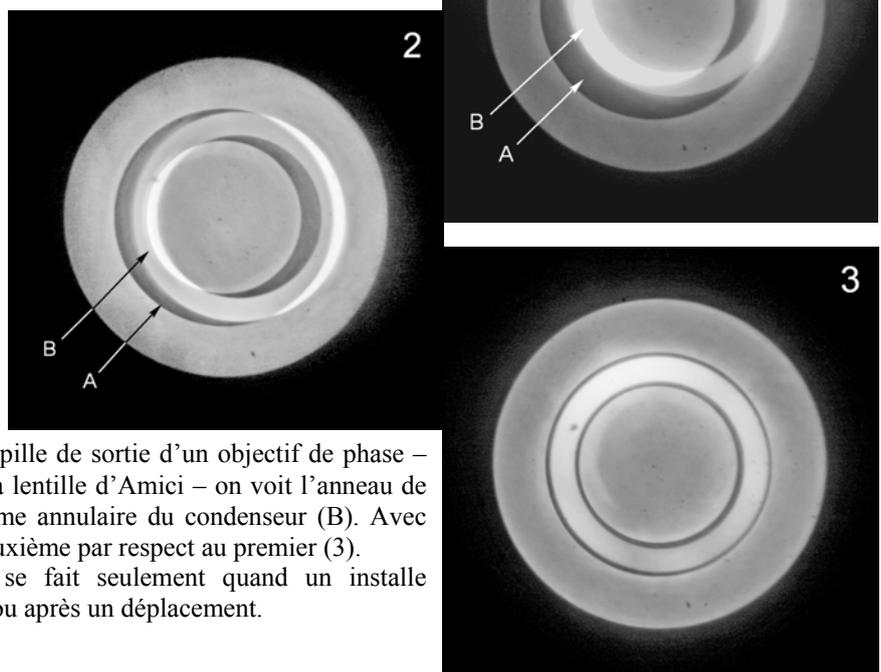


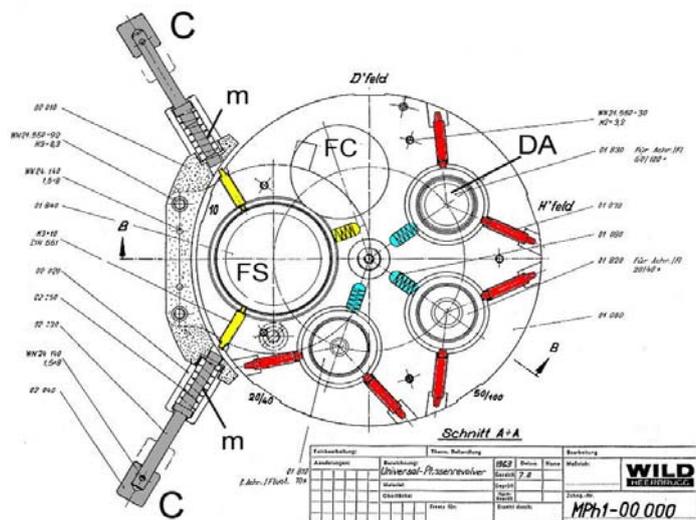
Fig. 4 - Si on observe la pupille de sortie d'un objectif de phase - avec le microscope auxiliaire ou la lentille d'Amici - on voit l'anneau de phase (A) et l'image du diaphragme annulaire du condensateur (B). Avec des vis opportunes, on centre la deuxième par respect au premier (3).

Ce centrage, généralement, se fait seulement quand on installe l'instrument pour la première fois ou après un déplacement.

L'opération se fait mieux mettant au point une préparation légèrement diffusante pour rendre le champ visuel partiellement clair.

Fig. 5 – Dessin mécanique d'un condensateur de phase (prod. Wild). On voit les vis de centrage des différents diaphragmes (en rouge), les ressorts (en bleu) qui poussent les diaphragmes contre les vis de centrage, le vis et le ressort en position de travail (en jaune) et les boutons (C, en gris) pour agir sur les vis.

Souvent, les boutons C ne sont pas fixes; pour agir sur les vis on utilise des boutons séparés qu'on doit chaque fois appliquer à chaque vis.



Le principe de fonctionnement du contraste de phase est connu, et il se base sur la théorie des images microscopiques d'Ernst Abbe: dans un microscope normal, correctement mis au point, on a un faisceau de lumière convergente qui émerge du condensateur et a une ouverture égale ou de peu d'inférieure à celle de l'objectif (a, en fig. 3).

Tel faisceau, après avoir traversé l'objet, est entièrement accueilli par l'objectif, et il concourt à former l'image intermédiaire (c) qui sera après recueillie par l'oculaire. Nous appellerons ce faisceau "onde directe."

Maintenant, on doit considérer que l'objet, pour ses dishomogénéités, se conduit comme un "réseau", comme on l'a défini, soit même irrégulier, et il provoque une diffraction de la lumière qui le traverse. L'onde diffractée (b, fig. 3) en général à un forte ouverture<sup>6</sup>, elle est accueillie par l'objectif seulement en partie, selon une ouverture égal à l'ouverture utile de l'objectif même et, en s'additionnant avec l'onde directe (a), contribue à la formation de l'image intermédiaire (c).

L'objet peut alors être reconduit à un réseau de diffraction, mais il faut distinguer:

a) Si l'objet est constitué d'éléments différemment transparents ou différemment colorés, dans un milieu transparent ayant leur même index de réfraction, les ondes directes et diffractée (a et b dans la fig. 3) qui émergent de l'objet après l'avoir traversé, ont différentes amplitudes et phase opposée. On parle de "RÉSEAU D'AMPLITUDE". À ce type de "réseau" se rapprochent les sections histologiques colorées, incluses dans des milieux comme le baume du Canada, ayant le même index du verre. Tels objets comprennent des détails plus ou moins transparents ou colorés, en général entourés par un milieu transparent.

L'onde directe qui traverse les zones claires et sombres de l'objet (a) peut changer d'amplitude mais elle conserve la même phase. Par contre, l'onde directe et l'onde diffractée qui de l'objet entrent dans l'objectif ont une phase opposée et, en se rencontrant (en "interférant") dans l'image intermédiaire de l'instrument (c), donnent un phénomène d'interférence négative, c'est à dire donnent un résultat plus faible de l'onde qui n'a pas traversé l'objet. Ce sont ces phénomènes d'interférence qui confèrent l'aspect définitif à l'image observée: les zones les moins transparentes de l'objet apparaissent avec l'intensité la plus petite, c'est-à-dire plus sombres. L'objet est donc visible pas simplement pour le fait d'être opaque ou coloré, mais par un phénomène de diffraction, au niveau de l'objet, et d'interférence, au niveau de l'image intermédiaire.

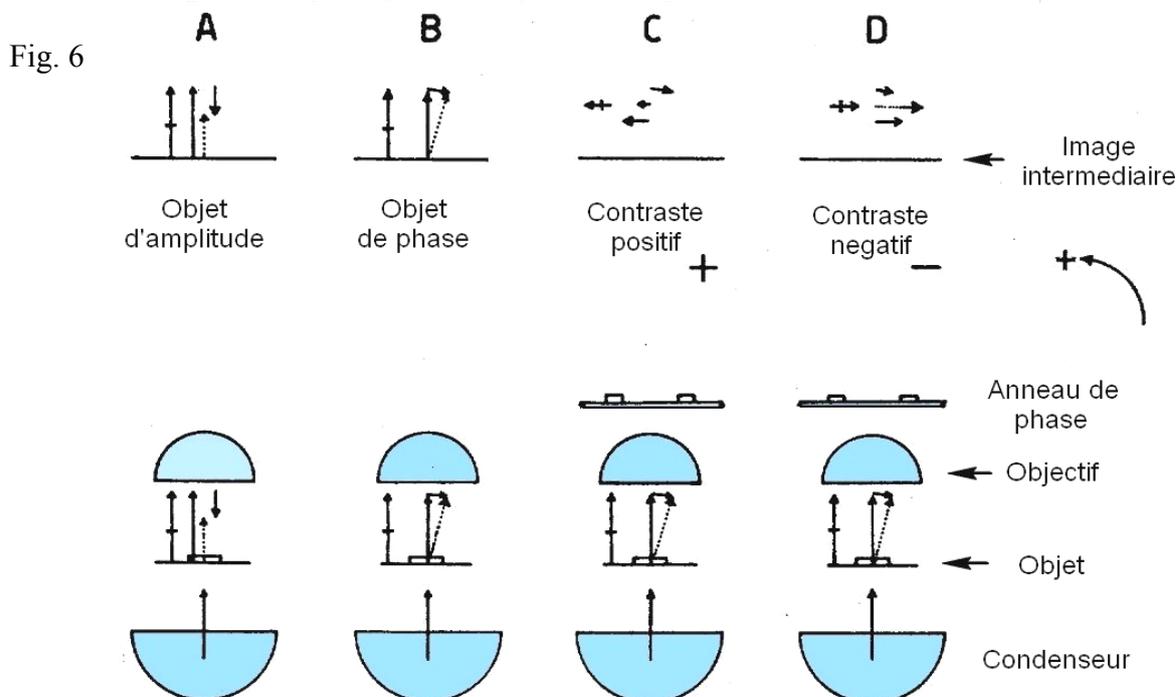
b) Si l'objet est constitué par contre d'éléments avec un différent index de réfraction, mais également transparents et ne pas colorés, on peut montrer que l'onde directe a la même phase et

<sup>6</sup> L'ouverture de l'onde diffractée, regardée dans son ensemble, est d'autant plus grande que plus fines sont les structures de l'objet, c'est-à-dire que plus petit est le pas du réseau équivalent. Pour réseau équivalent on entend l'objet dans lequel on reconnaît la répétition pour deux ou plusieurs fois de la même structure, par ex., une zone sombre et une zone claire contiguës.

la même amplitude partout (elle ne vient pas absorbée, vu que l'objet est transparent), mais l'onde directe et l'onde diffractée sont déphasées entre elles de  $\lambda/4$  environ; alors on parle de "RÉSEAUX DE PHASE". Dans ce cas, l'onde directe et celle diffractée, quand elles se rencontrent au niveau de l'image intermédiaire, à cause de leur déphasage "en quadrature", ne peuvent pas produire des phénomènes d'interférence<sup>7</sup>; l'image de l'objet est constitué donc par une onde résultante en tout semblable à l'onde directe qui donne l'image du champ; il en dérive que l'objet résulte invisible, au moins dans la mesure dans laquelle il est assimilable à un réseau de phase idéale.

En réalité, l'onde primaire qui vient de la source de lumière vient déphasée légèrement après avoir traversé l'objet (en retard si l'objet a un index de réfraction plus haut du milieu qui l'entoure) et, à partir de ce déphasage, pour la décomposition vectorielle de la radiation, se forme l'onde diffractée (voir la fig. 6 B). Mais pour la compréhension des résultats pratiques on peut négliger le léger déphasage de l'onde directe et supposer que, pour les objets normalement observés en microscopie, l'onde diffractée soit retardée de  $\lambda/4$  par respect à l'onde directe.

Dans le dispositif à contraste de phase l'onde directe sort du condensateur, et entre dans l'objectif, sous forme de faisceau annulaire conique (fig. 3); elle va ensuite tomber sur l'anneau de phase de l'objectif (d); dans cette position elle est atténuée et déphasée de  $\lambda/4$ ; l'onde diffractée ne passe pas par contre (en grand partie) à travers l'anneau de phase qui est plutôt étroit, et donc elle ne subit pas de déphasages remarquable (f, fig. 3).



<sup>7</sup> Si nous représentons chaque onde optique comme un vecteur de champ électrique qui oscille avec loi sinusoïdale, les variations périodiques d'ampleur du vecteur peuvent se représenter comme effet de la projection d'un vecteur de longueur constante sur une droite coplanaire pendant que le vecteur même effectue une rotation périodique autour de son origine. Une période entière de l'onde, correspondante à la longueur d'onde  $\lambda$ , alors correspond à la rotation du vecteur de  $360^\circ$ . Si on suit cette représentation, un déphasage, un retard ou une avance, d'une onde par respect à une autre d'égal  $\lambda$  est représenté-comme une différente position angulaire du vecteur. Ainsi, un déphasage de  $\lambda/4$  correspond à une rotation de  $90^\circ$ .

À ce moment là, cependant, il est clair comme deux vecteurs déphasés entre eux de  $90^\circ$  ne puissent pas interférer: chacun des deux vecteurs est perpendiculaire par respect à l'autre et il n'admet pas en conséquent aucune composante dans la direction de l'autre; les deux vecteurs s'ignorent réciproquement. N'étant pas possible l'interférence, le vecteur résultant ne change pas d'ampleur et donc l'objet transparent apparaît ni plus sombre ni plus clair que le champ environnant.

Si deux ondes sont décalées de  $180^\circ$  ( $\lambda/2$ ), elles sont en opposition de phase et l'ampleur résultante est la différence des amplitudes des deux ondes interférentes. Si le déphasage est un entier multiple de  $360^\circ$  ( $m\lambda$ , avec  $m$  entier), les deux ondes sont en phase et leurs amplitudes s'ajoutent.

Fig. 6 - Les rapports de phase dans la formation de l'image au microscope. La flèche recourbée à droite en haut indique une rotation du vecteur, un déphasage, en avance.

A - *Objet d'amplitude observé par un microscope normal.* L'onde qui traverse le champ (flèche à gauche coupée) peut être considérée prive d'atténuation et déphasage. L'onde qui traverse l'objet (flèche courte pointillée à la troisième place à partir de la gauche) est atténuée car l'objet est absorbant et on peut la considérer constituée par une onde directe non atténuée (flèche entière, à la deuxième place à partir de la gauche) et par une onde diffractée plus petite en opposition de phase, qui se dérobe de l'onde directe (flèche raccourcie, dirigée en bas, à la quatrième place à partir de la gauche). L'image de l'objet est moins lumineuse que le fond étant constituée par une onde moins ample.

B - *Objet de phase observé par un microscope normal.* L'objet n'est pas absorbant, donc il n'atténue pas l'onde directe qui le frappe mais, à cause d'une différence d'index, il provoque un déphasage (négatif dans la figure, indiqué par une rotation en sens horaire du vecteur) de la lumière qui le traverse. L'onde déphasée (flèche pointillée légèrement inclinée à droite) peut être décomposée encore dans une onde directe non déphasée et une onde diffractée, très petite, environ en quadrature avec l'onde directe (petit vecteur horizontal). L'image de l'objet est constituée par une onde déphasée de la même amplitude de l'onde qui donne l'image du champ: en étant l'œil insensible aux déphasages, l'objet de phase est invisible.

C - *Objet de phase en contraste positif.*

L'onde directe qui traverse le champ et l'objet est avancée de  $\lambda/4$  au niveau de l'anneau de phase et donc dans l'image intermédiaire (graphique en haut, sous la lettre C, flèches entière et coupée directes à gauche) elle se trouve environ en opposition de phase avec l'onde diffractée, qui a été retardée par l'objet mais n'est pas altérée par l'anneau de phase (flèche directe à droite). L'onde résultante qui donne l'image de l'objet (courte flèche directe à gauche) dérive d'une interférence négative, et donc est plus faible que l'onde qui donne l'image du champ (flèches longues à gauche). Un objet plus réfringent du milieu environnant apparaît donc plus sombre du fond, comme si ce fût un objet d'amplitude. L'onde directe est non seulement avancée mais aussi atténuée par l'anneau de phase et son amplitude est ensuite semblable à celle de l'onde diffractée; la résultant de deux ondes est alors très petite (image de l'objet très sombre).

D - *Objet de phase en contraste négatif.*

L'anneau de phase atténue et retarde de  $\lambda/4$  l'onde directe (en haut: flèches coupée à gauche et entière en bas) qui vient donc avoir la même phase de l'onde diffractée (petite flèche en haut) provoquée par un objet plus réfringent du milieu. Dans l'image intermédiaire on a une interférence positive entre onde diffractée et onde directe, et ensuite la résultante, qui fournit l'image de l'objet (flèche plus longue vers la droite) est plus ample que l'onde qui donne l'image du champ. L'objet apparaît plus clair que le fond.

Si l'objet observé en contraste de phase était assimilable à un réseau d'amplitude, l'onde directe et celle diffractée étaient en opposition de phase à la sortie de l'objet même, mais elles sont en quadrature à la sortie de l'anneau de phase; l'image observé en résulte différemment altérée. Si par contre l'objet pouvait être reconduit à un réseau de phase, l'onde diffractée produite par cet objet était déphasée par respect à l'onde directe, mais cette dernière vient déphasée de la même quantité à l'œuvre de l'anneau de phase, et par conséquent dans l'image intermédiaire les deux ondes résultent en phase ou en opposition de phase et elles peuvent produire phénomènes d'interférence et contrastes semblables à ce qu'on a vu avec les réseaux d'amplitude.

On peut confirmer que le déphasage opéré par l'anneau de phase sur l'onde directe peut être en avance ou en retard. En supposant d'observer un objet à index de réfraction plus haut du milieu environnant, le cas plus probable, l'onde diffractée rejoint le plan focal postérieur de l'objectif en retard de phase sur la directe.

1) Si l'onde directe est avancée par l'anneau de phase, les deux ondes sortent de l'anneau de phase en opposition ( $-\lambda/4$  sur l'onde diffractée et  $+\lambda/4$  sur l'onde directe porte à un déphasage total de  $\lambda/2$ ). Donc les deux ondes qui vont constituer l'image de l'objet s'élident partiellement et l'objet apparaîtra sombre sur fond clair.

2) Si l'onde directe est retardé, elle se retrouve en phase avec l'onde diffractée au niveau de l'image intermédiaire. À ce moment-là les deux ondes s'ajoutent et l'objet apparaîtra plus clair du fond de l'image.

Dans le premier cas on parle de CONTRASTE POSITIF; dans le deuxième de CONTRASTE NÉGATIF. On remarque que les termes "Positifs" et "Négatifs" sont du tout conventionnels, et ils se réfèrent de toute façon au fonctionnement de l'anneau de phase de

l'objectif, pas aux caractères de l'image obtenue. Ces derniers sont liés aussi aux caractéristiques de l'objet. On a en effet supposé plus haut que l'objet provoque un retard dans l'onde qui le traverse; mais le déphasage opéré par l'objet est proportionnel à son "chemin optique", c'est-à-dire au produit de son épaisseur par son index de réfraction, plus exactement par la différence entre son index et celui du milieu environnant. Si l'objet a un index inférieur à celui du milieu, le déphasage qu'il opère sur l'onde directe est en avance, et d'habitude très léger, et par conséquent l'onde diffractée, selon la composition des vecteurs, sera aussi en avance. Comme on voit, le comportement du système s'inverse et avec lui le contraste.

En tout cas, comme montrent le calcul et l'expérience, on obtient le meilleur contraste en faisant de façon que les phénomènes d'interférence portent à une onde résultante très petite ou très grande, c'est-à-dire de façon que les ondes directes et diffractées aient une amplitude semblable; étant donné que l'onde diffractée est en général très faible, il faut atténuer l'onde directe. On obtient ce résultat, comme on a déjà dit, au niveau de l'anneau de phase, au moyen d'une couche, en général métallique, semi-transparente, superposée à l'anneau déphasant. En conséquence, la source de lumière doit être plus intense que dans les observations en champ clair (lampe selon Kohler avec collecteur, par ex.).

Un autre problème: on a vu que dans le contraste de phase classique l'anneau de phase provoque une absorption partielle et un déphasage de la lumière qui le traverse; telle absorption et déphasage sont presque indépendants de la longueur d'onde, et cette méthode donne par suite presque les mêmes résultats, avec n'importe quel couleur de la source d'illumination. Mais quelque chose change en fonction de la longueur d'onde, en particulier le déphasage, soit pour la "dispersion" de l'index de l'anneau de phase, soit parce que le déphasage est donné par le rapport entre le chemin optique et la longueur d'onde: les conditions de contraste sont donc variables à l'intérieur du spectre optique et, en somme, on obtient le recouvrement d'infinies images légèrement différentes entre elles, correspondantes à toutes les valeurs de  $\lambda$  présentes dans la radiation utilisée. Ce fait réduit le contraste et compromet la définition. C'est pour cette raison que beaucoup de constructeurs fournissent dans l'équipement de phase un filtre vert: en l'introduisant dans l'illuminateur, on fait travailler le système dans cette partie du spectre pour laquelle l'œil est plus sensible et pour laquelle, donc, le projecteur a calculé le système.

Il y a encore le problème de comment optimiser le système: comment obtenir le contraste le plus fort, comment réduire les halos (voir plus loin), comment réduire la perte photométrique causée par l'absorption du diaphragme et de l'anneau de phase (perte de luminance de l'image), etc. À ce propos, chaque constructeur cherche quelque solution "du meilleur compromis", mais il s'agit toujours de choix relatifs parce que le résultat final dépend AUSSI des caractéristiques de l'objet. Le constructeur cherche donc d'optimiser le système (diamètre de l'anneau, sa largeur, sa transparence, son déphasage, etc.) en vue de l'objet qui sera observé le plus probablement avec ses instruments. Le système optique, en autres mots, est projeté sur mesure d'un certain objet.

Pour rendre plus souple cette technique, donc, beaucoup de constructeurs ont proposé des systèmes flexibles dans lesquels il est possible de changer quelque accessoire afin de les adapter au mieux aux caractéristiques de l'objet. Nous mentionnons quelques-uns de ceux-ci.

En somme: l'objet observé peut être extrêmement différent dans ses caractéristiques physiques, surtout l'index et l'épaisseur, et le déphasage de l'onde diffractée n'est pas nécessairement de  $\lambda/4$ ; il peut résulter donc très avantageux de pouvoir changer l'absorption et le déphasage de l'onde directe opérés par l'anneau de phase pour adapter le système optique aux caractéristiques de l'objet et obtenir, cas par hasard, le meilleur contraste. En autres mots, on pourra tâcher de reporter les deux ondes qui confluent dans l'image intermédiaires en conditions de déphasage nul ou  $\lambda/2$  exacts, et avec amplitude très semblable.

Ceci a été tenté par différentes maisons constructrices de différentes manières; une première manière (Leitz, etc.) consiste à construire, pour chaque système objectif, des modèles différents contenant des anneaux de phase apte à déphaser et absorber en mesure différente le faisceau qui

les traverse; le changement d'objectif permet de modifier les conditions du système et chercher cas par hasard le rendement meilleur. De cette façon, il devient possible, par ex., de passer d'un contraste "positif", le plus utilisé, à celui "négatif", avec les claires et le foncés inversés.<sup>8</sup> On peut utiliser aussi un anneau de phase plus transparent (contraste inférieur, halo plus faible, solution la plus indiquée pour les objets plus grands et/ou plus réfringents) ou moins transparent (contraste plus grand, halo plus fort, pour augmenter la visibilité d'objets plus petits).<sup>9</sup>

Cette méthode cependant demande un grand numéro d'objectifs; à part les considérations économiques, ceci impose souvent de démonter un objectif pour le remplacer et, de toute façon, même en faisant usage des seuls objectifs monté au domicile sur le revolver, l'observation *in vivo* peut résulter difficile, surtout si on doit retrouver un objet mobile après la rotation du revolver.

Autre solution au problème d'un contraste de phase variable a été cherchée par différents auteurs (4) (7) et réalisée par PZO, par ex., en exploitant certains effets de la lumière polarisée; mais aussi cette solution présente une limitation, parce qu'elle rend complexe l'interprétation des images d'objets biréfringents, lesquels se présentent très souvent, soit en biologie qu'en différentes technologies industrielles (amidon, celluloses, fibres, substances cristallines, etc.). La réalisation des anneaux de phase polarisants ou biréfringents est en outre très difficile, et il réussit souvent impossible d'insérer des telles anneaux dans les objectifs de fort agrandissement.

Une maison allemande (Zeiss Jena) a construit dans le passé des objectif avec un double anneau de phase (deux anneaux concentriques de différent diamètre et largeur: système "PhV"); en changeant le diamètre du diaphragme d'ouverture, on peut éclairer un seul ou les deux anneaux et avec ça changer le contraste. Cela demande, pour ce système, un condensateur spécial avec des diaphragmes annulaires doubles.

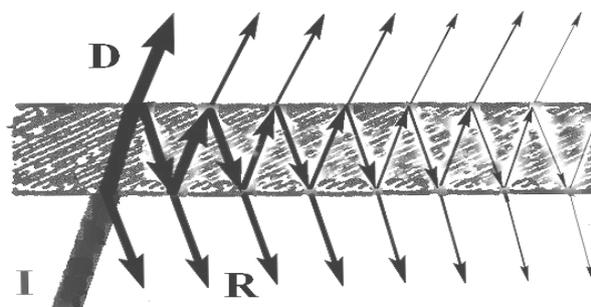
Plus utile est un dispositif du passé qui est inséré dans le tube du microscope et permet de remplacer l'anneau de phase sans remplacer l'objectif. Ceci demande une complication du système optique, et en outre le comportement de l'anneau de phase peut être changé par échelons, pas de manière continue (système "Contrast" de Zeiss, Jena). D'ailleurs, avec cette technique, on peut utiliser des objectifs normaux et, au-delà du contraste de phase, il est possible de réaliser avec le même système le champ noir («central»<sup>10</sup>) et le contraste interférentiel (DIC).

Même certains systèmes interférentiels comme l'"Interphako", toujours de Zeiss Jena, permettent avec quelque accessoire en plus de réaliser le contraste de phase variable et réversible, même à couleurs (images colorées d'un objet incolore, sans halo).

Le système "Varicolor" (brevet Wild, mis en commerce en 1950) résout de la manière la plus rationnelle le problème du contraste variable; il obtient le résultat de changer le déphasage et l'absorption de l'onde directe (**e**, fig. 3), d'une façon continue, au niveau de l'anneau de phase (**d**), en donnant à ce dernier, selon les études de M. Locquin, la structure d'un filtre interférentiel.

Un tel filtre est constitué par une couche de matériel diélectrique transparent mis entre deux couches métalliques minces semi-réfléchissantes; le tout soutenu par un lame de verre, plan-parallèle. Il applique le principe de l'interféromètre de Pérot-Fabry:

les réflexions multiples que l'onde incidente (**I**) subit dans la couche diélectrique, dont l'épaisseur est de l'ordre de la longueur d'onde de la lumière, portent à tels déphasages entre les ondes directes (**D**) et réfléchies (**R**) que, pour une certaine longueur d'onde, la lumière traverse à peine atténuée le filtre, pendant que pour toutes les autres elle est



<sup>8</sup> En réalité, le contraste négatif n'est pas le «négatif photographique» du contraste positif: c'est plus compliqué – voie l'article n° 33, pag. 13 et suivantes (pour le moment en italien).

<sup>9</sup> La transmission des anneaux de phase, selon le choix du constructeur, change de 10% à 40%.

<sup>10</sup> Le fond noir "centrale" est donné par un anneau dans l'objectif semblable à celui de phase, mais complètement opaque. Diaphragme annulaire dans le condenseur comme en contraste de phase.

réfléchi en arrière.

Par rapport à un filtre à absorption, c'est-à-dire à verre coloré, le filtre interférentiel présente l'avantage d'une bande spectrale beaucoup plus étroite et d'un réchauffement beaucoup plus petit, car il réfléchit presque tout ce qui ne vient pas transmis. Avec un filtre de ce genre on peut obtenir des coefficients de transmission, pour la longueur d'onde "passante", c'est-à-dire de meilleure transmission, égal même à 30-40% avec un rapport entre maximum et minimum de transmission au-delà 300 et une largeur de bande "à moitié hauteur" de 8-20 nm (0,008 - 0,020 $\mu$ ).

En plus, le filtre interférentiel provoque dans la lumière transmise un déphasage qui va de  $+\lambda/4$  pour longueurs d'onde plus petites de celle passante à  $-\lambda/4$  pour longueurs d'onde plus grandes, avec un passage graduel aux alentours de la longueur d'onde de meilleure transmission. Ce phénomène permet d'utiliser l'anneau de phase des objectifs Varicolor en contraste positif pour longueurs d'onde basses et en contraste négatif pour longueurs d'onde élevées.

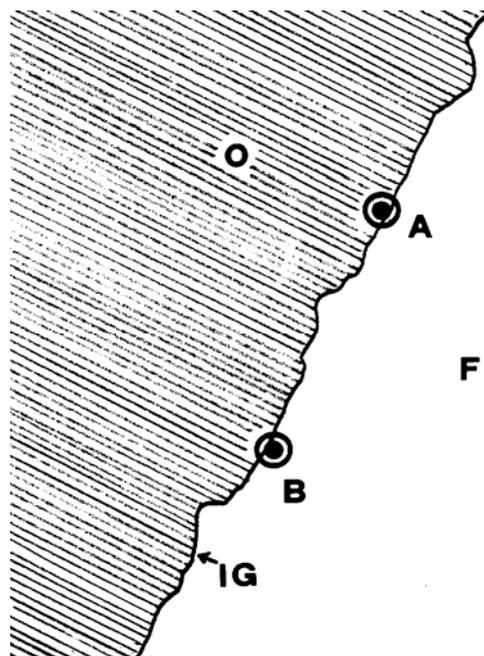
En utilisant un simple dispositif dans le système éclairant (qui permet d'incliner un filtre interférentiel et de changer sa bande passante, qui dépend de l'angle d'incidence) il est possible de changer la longueur d'onde de la source et ensuite changer dans des amples limites les conditions de contraste. Avec un filtre "didyme", qui présente une large bande d'absorption dans la région du vert, on obtient un beau contraste coloré.

Aussi ce système avait quelque limite, les filtres interférentiels avec le temps s'altèrent, et lui aussi, comme presque tous les systèmes de ce type, est sorti de la production depuis beaucoup d'années et jamais repris.

Cette longue introduction permet maintenant d'affronter le sujet des **halos**: l'inconvénient le plus fort du contraste de phase.

Au concret, une tentative de réduire l'intensité des halos a été effectuée par la maison Reichert de Vienne selon les études d'A. Wilska (système "Anoptral"), au moyen d'anneaux de phase diffusants en contraste négatif, mais sur cette trouvaille nous ne nous arrêtons pas à cause d'avantages concrets insuffisants.

Fig. 7 - Schéma pour expliquer la formation des halos en contraste de phase.



Nous parlons pour simplicité seulement du contraste de phase "positif" pour lequel un objet de phase (petit, autrement il se vérifie l'inversion du contraste) plus réfringent du milieu environnant apparaît plus sombre du champ qui l'entoure. Dans le cas du contraste de phase négatif, le discours que nous ferons s'applique encore, en inversant les signes des déphasages et du contraste.

Dans le contraste de phase positif nous savons que l'image de l'objet (plus réfringent que le milieu) naît d'interférence négative et ensuite de diminution d'intensité, par recouvrement de l'onde diffractée par l'objet - qui est retardée d'environ  $90^\circ$  pour les petits objets. - avec l'onde "directe", inaltéré, qui constitue le faisceau éclairant, qui est avancée de  $90^\circ$  quand elle traverse l'anneau de phase. C'est cette avance de phase de l'onde directe qui la met en opposition de phase avec l'onde diffractée, qui contient les renseignements sur la structure de l'objet; et c'est cette opposition de phase qui réduit, ou annule, l'intensité dans l'image de l'objet.

Mais nous devons ici considérer la structure de l'image de diffraction, la « centrée », créé

par l'objectif pour chaque point bien focalisé de l'objet, nous supposons en absence d'aberrations - se rapporter à les images 2 et 7, ici au dessus.

Nous savons que dans une telle centrique il y a un disque central ("disque d'Airy") contenant à peu près 84% de l'énergie totale de la centrique<sup>11</sup>; au delà d'un anneau sombre qui entoure le disque, il y a un anneau clair de diamètre environ double du disque d'Airy, contenant le 7,1% de l'énergie. Il suit un deuxième anneau clair avec le 2,8% de l'énergie, et puis des autres que nous pouvons négliger à cause de leur intensité décroissante.

Eh bien, le 2°, 4°, 6° etc. anneau sont constitués par une onde qui a la même phase du disque d'Airy, pendant que le 1°, le 3°, 5° etc. anneau ont phase opposée, et le premier ne peut pas être négligé au point de vue de l'intensité.

Donc, l'opposition de phase décrite au début, qui est l'essence du contraste de phase et qui rend l'image plus sombre de l'objet, vaut pour le disque d'Airy, tandis que pour le 1°, 3°, 5° etc. anneau on a concordance de phase et en conséquence augmentation d'intensité.

En autres mots, pour chaque point d'un objet observé en contraste de phase il y a une centrique GLOBALEMENT plus sombre (car le disque d'Airy est affaibli), mais entourée par un anneau (nous considérons seulement le premier, car les autres sont trop faibles) plus clair que celui qu'on aurait sans contraste de phase. L'atténuation du disque prévaut sur l'intensification du premier anneau (nous avons vu que le disque contient la plus grande partie de l'énergie de la centrique) pour lequel phénomène, à l'intérieur d'un objet étendu, la luminosité est plus faible.

Donc, dans l'observation d'un objet de phase étendu en contraste de phase positif, nous avons cette situation: à l'intérieur de l'image de l'objet on a une luminosité plus petite à cause de l'atténuation du disque d'Airy correspondant à chaque point de l'objet; l'intensification du premier anneau s'oppose seulement en partie à cette atténuation. Au dehors de l'image de l'objet la radiation diffractée par l'objet ne parvient pas, donc il n'y a aucune opposition de phase ni aucune atténuation d'intensité, à part l'atténuation générale de l'onde directe, opérée par le pouvoir absorbant de l'anneau de phase, qui vaut aussi à l'intérieur de l'image de l'objet.

Mais maintenant nous considérons le bord de l'image d'un objet de phase étendu (O dans la fig. 7) observé en contraste de phase et qui apparaît plus sombre que le fond (F) en supposant qu'il soit plus réfringent du milieu qui l'entoure.

En O, pour les raisons dites plus haut, l'intensité est plus petite qu'en F.

Occupons nous des points de l'objet (A, par ex.) dans l'image desquels le disque d'Airy est tangent (de l'intérieur) au bord de l'image géométrique de l'objet total (IG dans la fig. 7). Nous considérons aussi ces points du fond de l'image dans l'oculaire (B par ex.) l'image desquels se trouve tout de suite au dehors de O, de manière que leur disque d'Airy soit encore tangent à IG, mais de l'extérieur.

Eh bien, nous considérons cette région de l'image de l'objet (O) qui reste tout de suite à l'intérieur d'IG et qui court le long d'IG comme un bord interne; la largeur de ce bord soit égal à la largeur (pas au diamètre) du premier anneau des points comme A et B. Rappelons nous que telle largeur dépend de la structure de l'objectif et elle est ensuite la même pour tous les points comme A, et en plus elle est environ égal au rayon des disques d'Airy.

Bon, ce bord intérieur à IG est formé essentiellement par les disques d'Airy des points comme A, qui sont atténués à cause du contraste de phase, plus les premiers anneaux des points comme B, qui ne sont pas exaltés car pour eux il ne se vérifie pas le contraste de phase.

Ce bord intérieur à IG est plus sombre que les autres régions d'O car, dans ces dernières, aux disques d'Airy atténués se superposent les premiers anneaux de chaque point, qui sont intensifiés pour les raisons déjà exposées.

En autres mots, l'image de l'objet dans ces conditions termine avec un bord sombre.

Mais maintenant nous considérons un bord extérieur à IG, de la même largeur du bord interne.

Il est formé essentiellement par les disques centraux des points comme B, non atténués par le

---

<sup>11</sup>. En réalité, dans un objectif à contraste de phase, à cause de la présence de l'anneau de phase, ce pourcentage est plus petit; pour les anneaux autour du disque d'Airy, plus grand.

contraste de phase, plus les premiers anneaux des points comme A, qui sont exaltés, comme on a démontré.

Ce bord extérieur à IG apparaît plus lumineux du fond F car, dans toutes les autres régions de F, les anneaux ne sont pas exaltés, n'existant pas ici un contraste de phase.

Ce bord plus clair, accompagné par le bord sombre à l'intérieur d'IG, qui entoure l'image de tous les objets en contraste de phase, c'est le célèbre "halo", le plus grand inconvénient du contraste de phase.

Il est nuisible car un objet qui résulte si petit à donner une image géométrique de dimensions analogues à la centrique et l'image duquel tombe à l'intérieur du halo, peut résulter invisible parce que il est caché par ce dernier.

La largeur du halo dépend donc de la forme et des dimensions de la centrique et par suite des caractéristiques de l'objectif et de l'anneau de phase. On comprend donc comme les constructeurs tâchent de minimiser le halo en modifiant ces caractéristiques.

Rappelons-nous cependant qu'une réduction du halo est accompagnée en générale à une diminution du contraste, donc à une sensibilité plus petite de la méthode quand il s'agit de révéler la présence d'objets très petits et/ou faiblement réfringents.

On se rappelle aussi de ce qu'on a dit plus haut: indépendamment du jeu des déphasages, la présence de l'anneau de phase dans la pupille de l'objectif modifie de toute façon la structure de la centrique, dans le sens de rendre plus petit et moins intense le disque d'Airy (augmentation possible de résolution) mais en exaltant l'intensité des anneaux (perte de contraste). On peut trouver des détails à ce sujet dans l'article n° 21 (« Le star test »).

Ce fait cependant ne rentre pas dans les discours faits jusqu'à présent sur les causes du halo car il intéresse soit les points de l'objet, soit ceux du fond.

Le phénomène des halos est le motif pour lequel beaucoup de praticiens choisissent, comme technique de contraste, le contraste interférentiel (voit la bibliographie). La technique interférentielle cependant peut être réalisée selon beaucoup de manières différentes. Les instruments les plus complets permettent, au-delà de l'accentuation du contraste, des mesures du chemin optique de l'objet, et ensuite, indirectement, de l'épaisseur, de l'index de réfraction, de la concentration - dans le cas des solutions - etc. Mais tels instruments sont presque tous sortis du commerce à cause du coût élevé, de la complexité et de l'instabilité des régulations. En grande majorité, les systèmes interférentiels actuels se réduisent au système DIC ("Differential Interference Contrast") inventé par G. Nomarski (1951) en France (voir l'article n° 17, en italien pour le moment).

Le DIC fournit des images agréables, même colorées, avec une apparence de relief, mais il a quelque limite:

- le système est d'usage assez simple, mais il est cher;
- il utilise la radiation polarisée, avec les complications habituelles quand on observe des objets biréfringents;
- l'apparence de relief dans les images n'est pas due à la forme de l'objet mais à ses variations de chemin optique (voir la note 1, pag. 2). Donc, l'interprétation des images du DIC n'est pas simple.

## BIBLIOGRAPHIE

K. ANTENEN - Variabler Phasenkontrast mit Farben (Wild-Varicolor) - Schweizer Brauerei-Rundschau, Nr. 4 (1956).

K. ANTENEN - Vom klassischen zum variablen Phasenkontrast – Mikroskopie - Band 11, Sept. 1956, S. 129-135.

A. H. BENNET, H. JUPNIK, H. OSTERBERG et O.W. RICHARDS - Phase microscopy. Principles and applications. New York, John Wiley & Sons. London, Chapman & Hall Ltd. (1951) (*texte exhaustif avec riche bibliographie sur le contraste de phase en général*)

H. BEYER et H. RIESENBERG - Handbuch der Mikroskopie - Veb Verlag Technik, Berlin, 1988 - 455 pagg. *Un des textes les plus rigoureux et complets dans le champ de la microscopie optique.*

C. DUFOUR und M. LOCQUIN - Comptes rendus des séances de l'Académie des sciences, 232 (1951): 2087.

M. FRANCON - Le microscope à contraste de phase et les microscopes interférentiels - Ed. du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, 1954.

M. LOQUIN und M. BESSIS - Revue d'optique, 1952, 237.

G. P. SINI - Il contrasto di fase interferenziale "Wild Varicolor", Atti della Fondazione G. Ronchi, Florence, XX, 4, Juillet - Août 1965, pagg. 374-393.

G. P. SINI - Microscopia interferenziale - Fondation "Giorgio Ronchi", XI; Baccini & Chiappi, Florence, 1968. 87 pagg. Reporté comme art. n° 17 dans ce site.

J. P. VIRET - Du contraste de phase normal au supercontraste de phase. Rapport interne de la maison WILD HEERBRUGG, Heerbrugg, S. Gallen, Suisse, IX. 59 Vi/lw.