

COMPRENDRE

Contraste interférentiel différentiel Nomarski en microscopie

Hervé SAUER¹, Joëlle SURREL²

¹Institut d'Optique Graduate School,
Palaiseau, France

²Retraitée, IUT & ISTASE,
Saint-Étienne, France

herve.sauer@institutoptique.fr

Le *contraste interférentiel différentiel* (CID) est une technique utilisée en microscopie, tant par réflexion que par transmission, pour faire apparaître, à l'instar du contraste de phase, des contrastes dans des objets microscopiques sans coloration ou préparation spécifique. Cet article présente les bases de son fonctionnement et de sa mise en œuvre pratique (CID « Nomarski », inventé à l'*Institut d'Optique* en 1952) dans les microscopes commerciaux standard.

De nombreux objets microscopiques d'intérêt biologique ou technologique sont intrinsèquement transparents ou de réflectivité similaire à leur environnement et donnent donc en observation simple avec un microscope une image quasi-uniforme inexploitable. Des techniques de coloration ou de révélation « chimiques » peuvent éventuellement être utilisées mais leur emploi est restreint par des difficultés de mise en œuvre ou par les modifications de l'objet étudié qu'elles entraînent inéluctablement (altération du métabolisme des cellules vivantes, attaque irréversible des surfaces...). Cependant ces « imperceptibles » objets bruts, s'ils modifient peu l'intensité de la lumière d'éclairage qu'ils transmettent ou réfléchissent, changent usuellement de manière tangible d'autres propriétés de celle-ci, comme la phase. Des dispositifs appropriés insérés dans le microscope peuvent donc transformer ces variations, non décelables par l'œil ou les détecteurs usuels, en modulation visible de l'intensité lumineuse. Quelques méthodes sont maintenant très classiques, comme le *contraste de phase* ou le *contraste interférentiel différentiel*, et les dispositifs pour les mettre en œuvre sont proposés par tous

les grands constructeurs de microscope, tant pour l'observation par transmission (*diascopie*) que pour l'observation par réflexion (*épiscopie*). Cet article a pour objet de présenter les bases de cette deuxième méthode.

Interférométrie à décalage latéral et contraste interférentiel différentiel

Le contraste interférentiel différentiel (CID, DIC en anglais pour *differential interference contrast*) est un cas particulier de l'interférométrie à décalage latéral (*lateral shearing interferometry*) où l'on fait interférer un front d'onde avec lui-même décalé transversalement. Lorsque le décalage est grand (*figure 1a*), cela conduit usuellement à l'apparition de franges d'interférence [1], très

difficiles à interpréter sur des objets complexes et aux détails denses comme rencontrés en microscopie. Dès lors, on lui préfère une version où le décalage latéral entre les deux fronts d'onde est plus petit que la résolution de l'objectif de microscope. Chaque point de l'image est alors modulé par un terme d'interférence à deux ondes de la forme $\frac{1}{2}(1+\cos(\Delta\varphi+\varphi_0))$ où le déphasage local $\Delta\varphi$ est en fait directement proportionnel à la pente locale (gradient) du front d'onde dans la direction du décalage (*figure 1b*). On transforme donc des gradients de phase en variations d'éclairement perceptibles par l'œil ou un détecteur. C'est cette propriété qui est à l'origine de la dénomination de « *contraste interférentiel différentiel* ». Le terme φ_0 est un paramètre, usuellement identique pour tous les points du champ observé, introduit par la mise

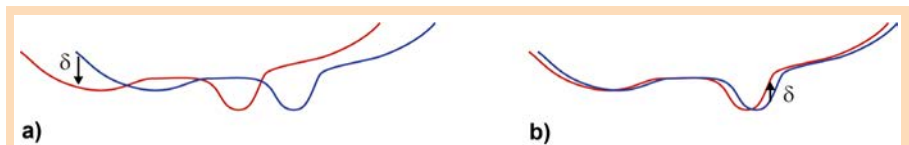


Figure 1. Représentation schématique de l'interférométrie à décalage latéral. (a) Fronts d'onde dédoublés pour un large décalage. (b) Fronts d'onde dédoublés pour un petit décalage. L'écart local d'altitude δ entre les deux surfaces est proportionnel à la pente locale (au gradient) du front d'onde dans la direction du dédoublement. La différence de marche δ entre les deux fronts d'onde donne un déphasage local de $\Delta\varphi = 2\pi\delta/\lambda$. δ et $\Delta\varphi$ sont des grandeurs algébriques. Dans le cas (b) le signe de $\Delta\varphi$ dépend donc du signe du gradient.

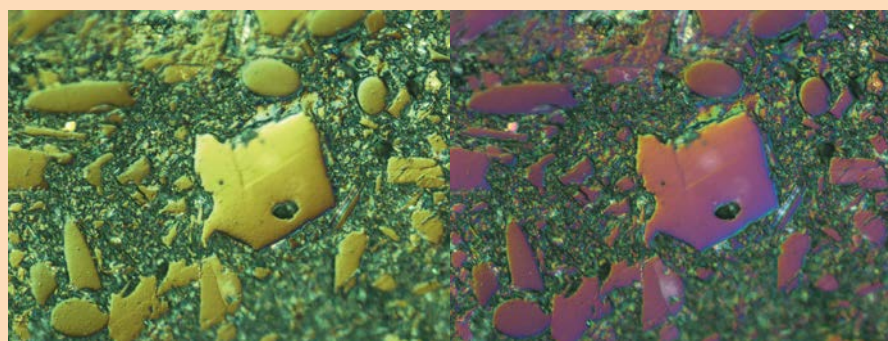


Figure 2. Microphotographies en contraste interférentiel différentiel. Microphotographies en lumière blanche avec un objectif 50×/0,80 avec contraste interférentiel différentiel pour deux réglages différents du paramètre φ_0 . La direction du décalage est à 45° de l'horizontal (NW-SE).

en œuvre technique de la méthode. Il est souvent ajustable par un réglage disponible sur le microscope permettant à l'observateur de faire varier l'apparence de l'image qu'il observe. Une valeur de $\pm\pi/2$ (modulo π) radians est particulièrement intéressante car elle permet de directement visualiser le signe du gradient de phase de l'objet dans la direction du décalage, par une sur- ou une sous-brillance dans l'image sur un fond de luminosité moyenne, qui donne artificiellement l'impression de voir le relief de l'objet sous un éclairage latéral rasant.

Dans le cas d'un éclairage en lumière blanche et non pas monochromatique comme implicitement considéré dans les lignes précédentes, il faut prendre en compte la superposition incohérente des différentes contributions monochromatiques. Comme $\Delta\varphi$ et φ_0 dépendent, dans le cas général, tous les deux de λ , l'image apparaît alors colorée par suite de la présence de spectres cannelés (teintes de Newton, usuellement d'ordres faibles et donc de couleurs vives). Les contrastes de couleurs mettent en évidence les gradients de phase produits par l'objet, et donc, dans un certain sens, le « relief » de l'objet observé (voir figure 2).

La mise en œuvre « classique » de l'interférométrie à décalage latéral en microscopie est réalisée à l'aide de prismes biréfringents utilisés en lumière polarisée. Le dispositif clef de la méthode est un (bi-)prisme de Wollaston placé au foyer image

de l'objectif ou un (bi-)prisme de Nomarski placé en aval de ce même foyer image. Les deux prismes ont pour propriété de dédoubler un rayon incident en deux rayons, de polarisations rectilignes orthogonales, formant un petit angle $\Delta\alpha$ entre eux. Repris de manière appropriée par l'objectif du microscope, ce dédoublement angulaire est transformé en déplacement latéral $|f| \Delta\alpha$ où f est la focale objet de l'objectif. Pour fixer les ordres de grandeur, pour un objectif 50×/0,80¹ de ~4 mm de focale et de résolution $r \approx 0,4 \mu\text{m}$ (rayon de la tache d'Airy dans le visible), un déplacement des rayons dans le plan objet inférieur à la résolution pour bien être en mode de contraste interférentiel différentiel conduit à un angle $\Delta\alpha < r/|f| \approx 10^{-4} \text{rad} \approx 0,3'$ bien inférieur à la minute d'arc !

Réalisation pratique en microscopie par réflexion

La figure 3a présente le schéma de principe du fonctionnement du CID utilisant un (bi-)prisme de Wollaston. Ce composant est constitué de l'assemblage en forme de lame à faces parallèles de deux prismes d'un matériau biréfringent uniaxe, souvent du quartz ici, assemblés avec leurs axes optiques croisés à 90° dans un plan parallèle aux faces de la lame. En épiscopie (*i.e.* observation par réflexion), l'éclairage

Un bond dans le nano positionnement par système piezoélectrique -

Lancement de la série Q d'Aerotech: nano-positionneur piezo électrique QNP et Piezo contrôleur QLAB



Les tables QNP présentent une raideur hors norme grâce à une fréquence de résonance très élevée et une résolution sub-nanométrique. Elles sont donc idéales pour les applications pointues à faible encombrement telles que l'interférométrie, la microscopie et les alignements d'extrême précision. Le contrôleur associé QLAB dispose d'un écran tactile et peut fonctionner de manière indépendante ou peut être connecté à un PC via Ethernet, ce qui le rend extrêmement flexible dans toutes les situations. Avec des performances sub-nanométriques et un environnement de contrôle et de programmation très convivial, obtenir un positionnement nanométrique n'aura jamais été aussi facile.



Entièrement dévoué à la science du positionnement.

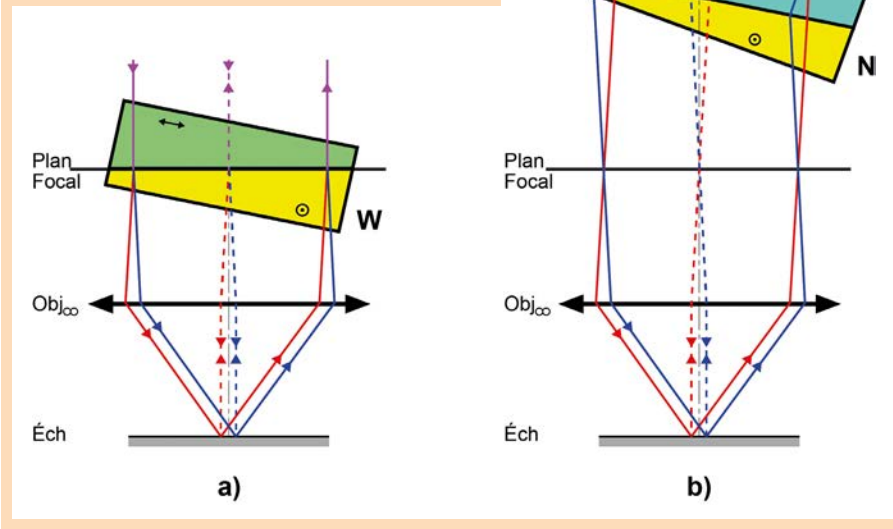
Téléphone: +33 2 37 21 87 65
Email: cmonnier@aerotech.com
www.aerotech.co.uk

WORLD HEADQUARTERS: USA
THE AMERICAS •
EUROPE & MIDDLE EAST •
ASIA-PACIFIC

AT276A-040-FR

¹ Cette notation G_y×/ON donne le grandissement et l'ouverture numérique objet de l'objectif.

Figure 3. Principe de la mise en œuvre du CID par prismes biréfringents en épiscopie. (a) Prisme de Wollaston. (b) Prisme de Nomarski. Obj_{∞} : objectif de microscope corrigé à l'infini. Éch : Échantillon. Les tracés des rayons dans les prismes sont simplifiés à l'essentiel et les angles de déviation très fortement exagérés. Les flèches représentées par \leftrightarrow et \odot indiquent la direction de l'axe optique du matériau biréfringent uniaxe utilisé. Le basculement des prismes permet une localisation correcte du plan de séparation des rayons. Il a aussi l'intérêt d'éviter que les réflexions parasites de la lumière de l'éclairage épiscopique sur les faces du composant ne perturbent directement l'image observée dans l'oculaire. Pour obtenir le contraste interférentiel, il faut par ailleurs (non-représentés ici) un polariseur en amont dans l'éclairage Köhler, et un analyseur en aval du côté de l'oculaire.



de l'échantillon est réalisé à travers l'objectif grâce à un éclairage Köhler² adapté (non représenté *figure 3* ; voir [2,3]). Un rayon provenant de l'éclairage est séparé angulairement par le prisme biréfringent. Le plan de localisation du dédoublement est placé dans le plan focal image de l'objectif du microscope, ce qui conduit au dédoublement transversal recherché dans le plan objet. Après réflexion spéculaire ou rétrodiffusion sur l'échantillon, les rayons dédoublés sont *automatiquement* recombinaison par le même prisme et le rayon résultant repart dans une direction parallèle au rayon incident. Pour faire apparaître le contraste interférentiel optimal, il faut placer un polariseur dans l'éclairage Köhler et un analyseur dans la voie d'imagerie du microscope, chacun orienté à $\pm 45^\circ$ des axes optiques du prisme de Wollaston.

Malencontreusement, le plan focal image de l'objectif est un endroit mécaniquement inaccessible puisqu'il coïncide avec le filetage des objectifs des microscopes commerciaux actuels.

Georges Nomarski³ a eu l'idée (en 1952) de modifier le prisme de Wollaston comme indiqué à la *figure 3b* avec l'axe optique du matériau uniaxe d'un des prismes basculé hors plan de l'interface [4,5]. Cette nouvelle configuration permet d'éloigner le prisme biréfringent du foyer de l'objectif tout en conservant un fonctionnement identique. Le prisme peut dès lors être monté sur glissière et être facilement inséré ou enlevé. Ce dispositif, connu sous le nom de CID Nomarski (ou Nomarski DIC en

anglais), est commercialement proposé par tous les constructeurs de microscope (cf. *figure 4*).

Il est à noter qu'une translation dans un plan horizontal du prisme de Wollaston ou du prisme de Nomarski ne modifie pas la séparation angulaire ni la recombinaison automatique des rayons dédoublés, mais change par contre la distance parcourue dans le prisme en tant qu'onde ordinaire ou onde extraordinaire, ce qui modifie globalement la différence de marche et donne le moyen pratique pour ajuster le paramètre φ_0 .

CID Nomarski en transmission

Il est également possible d'utiliser le contraste interférentiel différentiel en diascopie (*i.e.* observation par transmission). Cependant, le prisme de Nomarski n'étant dans ce cas traversé qu'une seule fois par la lumière, il est nécessaire d'introduire un décalage préalable des rayons au niveau de l'éclairage pour que les rayons ultérieurement recombinaison soient bien cohérents entre eux et puissent interférer. Ceci est généralement réalisé en introduisant un second prisme biréfringent, dit « compensateur », dans l'éclairage Köhler. Ce prisme est usuellement un prisme de Wollaston placé dans le plan focal objet du condenseur (qui coïncide avec le plan du diaphragme d'ouverture) car ce plan est mécaniquement assez facilement accessible (cf. *figure 5*). Les caractéristiques du prisme de Wollaston à insérer dans l'éclairage dépendent évidemment du condenseur, de l'objectif du microscope et du prisme de Nomarski utilisés. Pour couvrir leurs

² L'éclairage Köhler est un dispositif comportant une source spatialement incohérente (typiquement une lampe halogène), deux diaphragmes à iris réglables, le diaphragme de champ (DC) et le diaphragme d'ouverture (DO), ainsi qu'un ensemble de lentilles (condenseur...) permettant de réaliser un éclairage très uniforme sur une zone de taille ajustable par le DC, chaque point de la préparation étant éclairé par un cône de lumière, d'angle ou encore d'ouverture numérique réglable par le DO (même cône pour tous les points – propriété de télécentricité, adaptée à la télécentricité objet des objectifs de microscope) [2,3]. Il peut être réalisé pour l'éclairage des objets observés tant en transmission qu'en réflexion, en utilisant dans ce dernier cas une lame semi-réfléchissante pour envoyer la lumière à travers l'objectif du microscope. Il est fourni en standard sur tous les microscopes actuels.

³ (1919-1997). Diplômé de l'École Polytechnique de Varsovie (Pologne) et de l'École Supérieure d'Optique (1949), Georges Nomarski est un ancien chercheur de l'Institut d'Optique (IOTA à Paris puis Orsay, devenu l'IOGS à Palaiseau depuis). Il a déposé plusieurs dizaines de brevets au cours de sa carrière.



Figure 4. Photographies d'un CID Nomarski commercial (modèle pour épiscopie). (a) Le composant dans son boîtier d'utilisation. (b) Le composant en position dans la tête du microscope juste au-dessus de la tourelle porte-objectifs. Le prisme de Nomarski, qui se présente en pratique comme une simple lame à faces parallèles de forme circulaire, n'est pas directement visible sur les photographies. Il est positionné en contre-bas de l'ouverture circulaire visible sur la photographie (a). La grande molette sur la droite permet le réglage du paramètre φ_0 .

gammes d'objectifs et de condenseurs, les fabricants de microscope commercialisent à cet effet un ensemble approprié de paires de prisme de Wollaston et de prisme de Nomarski.

Conclusion

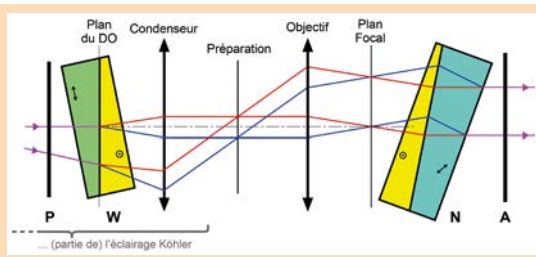
Alors qu'il travaillait à l'Institut d'Optique de Paris avec des collègues comme Maurice Françon⁴, Georges Nomarski avait-il anticipé en 1952 la diffusion mondiale et la pérennité au fil des décennies de cette technique de contraste interférentiel différentiel qui porte désormais son nom? Son dispositif, qui peut être associé à tous types d'objectif sans réduction d'ouverture numérique utile ni modification du microscope autre que l'insertion du ou des prismes,

a en tout cas séduit tous les fabricants de microscopes qui le proposent toujours en bonne place dans leurs catalogues respectifs. Cette invention de plus de soixante ans d'âge a encore actuellement des dizaines de milliers d'utilisateurs dans le monde et reste incontournable pour certaines observations, de la science des matériaux à la biologie.

⁴ (1913-1996)

NOTA: Cet article est directement dérivé d'un chapitre du cours Techniques microscopiques des mêmes auteurs, disponibles sur le site Web Optique pour l'ingénieur (<http://www.optique-ingenieur.org/fr/ressources/modules?module=03>) de ressources numériques en ligne de l'université du Maine diffusées sous licence ouverte GNU FDL.

Figure 5. Principe de mise en œuvre du CID Nomarski en diascopie. P : polariseur. W : prisme de Wollaston compensateur. N : prisme de Nomarski. A : analyseur. Les tracés des rayons dans les prismes sont simplifiés à l'essentiel et les déviations angulaires très fortement exagérées.




POUR EN SAVOIR PLUS

- [1] D. Malacara (Ed.), *Optical Shop Testing*, 3rd edn., Wiley (2007), Chapter 4, M. Strojnik, G. Páez and M. Mantravadi, Lateral Shear Interferometers.
- [2] H. Sauer, J. Surrel, *Microscopie : fondamentaux* (2007), *Techniques microscopiques* (2008), *Cours Web Optique pour l'ingénieur*, Ressources numériques ouvertes de l'Université du Maine. <http://www.optique-ingenieur.org/fr/ressources/modules?module=03>
- [3] G. Roblin, *Microscopie optique (R6712+R6710+R6714)*, *Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur* (tome R7), 1999.
- [4] G. Nomarski, Brevet Français (n° 1059124) 1952, Brevet US (n° 2924142) 1953, Brevet Allemand (n° 1037174) 1953, Brevet Suisse (n° 317182) 1953.
- [5] G. Nomarski, A.R. Weil, *Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées*, *Revue de Métallurgie*, 52 (1955).

PLUS DE SPECTRES SUR UN TEMPS PLUS COURT

Le Spectromètre **OCEAN FX** bénéficie d'acquisitions rapides, d'interfaces de communication fiables et d'une mémoire tampon



ACQUISITIONS RAPIDES
INTERFACES FIAILES
MÉMOIRE TAMPON



www.oceanoptics.com

Pour plus d'information sur nos offres, contactez notre distributeur français
T: 02 96 05 40 20
info@idil.fr | www.idil.fr

