

A. POLICARD - M. BESSIS - M. LOCQUIN

TRAITÉ DE MICROSCOPIE

INSTRUMENTS
ET
TECHNIQUES

A. POLICARD - M. BESSIS - M. LOCQUIN

TRAITÉ DE MICROSCOPIE

INSTRUMENTS
ET
TECHNIQUES

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, boulevard Saint-Germain, PARIS-VI^e

1957

TRAITE DE MICROSCOPIE

*Tous droits d'adaptation,
de traduction, et de reproduction,
même par procédés photographiques,
réservés pour tous pays.*

© 1957 BY MASSON ET C^{IE}.

(Printed in France.)

MASSON ET C^{IE} - EDITIONS

LIBRAIRIE DE LA FACULTE DE MEDECINE

155, boulevard Saint-Germain, PARIS-VI

1957

L'EXPOSÉ, même sommaire, de l'histoire du microscope demanderait de nombreuses pages. Cette histoire d'un très grand intérêt a, du reste, été faite bien souvent, dans son ensemble et dans ses divers chapitres. Les lignes qui suivent ont pour seul but de rappeler brièvement ses principales phases.

Sur l'origine première du microscope composé règne une obscurité profonde. Qui, le premier, a eu l'idée d'assembler ces deux lentilles qui sont devenues l'oculaire et l'objectif ? Doit-on attribuer cette découverte à l'illustre Galilée ? Ou à ces modestes artisans lunetiers de Middelburg, en Hollande, Hans Janssen et son fils Zacharias (environ 1620) ? Ou encore au physicien italien Fontana ? Ou à d'autres peut-être ? Nous l'ignorons et l'ignorerons sans doute toujours.

A la vérité, l'usage du microscope pour des études scientifiques systématiques date de l'Anglais Robert Hooke qui, au milieu du XVII^e siècle, avait construit et utilisé à Londres un microscope capable de montrer les détails d'un objet éclairé en lumière incidente par l'emploi d'une lentille condensatrice accessoire. Il faut rappeler ici que le plus ancien et le plus célèbre des micrographes de jadis, Leeuwenhoek (1632-1723), n'avait jamais utilisé que des loupes qu'il fabriquait lui-même.

Dans l'histoire du microscope il faut distinguer deux grandes périodes.

Aux XVII^e et XVIII^e siècles, les efforts portèrent surtout sur la partie mécanique de l'instrument, sur le statif. Ce fut l'époque des microscopes luxueux, ciselés et ornementés. Cet instrument était, en effet, recherché beaucoup moins par les savants de l'époque que par les gens du monde, les « Curieux de la Nature », si nombreux au XVIII^e siècle spécialement.

C'est en ce siècle que se dessina l'orientation des types de statifs vers le modèle d'aujourd'hui. Microscopes sur trépied, microscopes sur boîte, microscopes horizontaux, cédèrent peu à peu le pas aux microscopes fixés sur tige verticale métallique, portant au-dessous d'eux la platine percée d'un trou et le miroir.

Dans ces microscopes anciens, la partie mécanique était parfois excellente et de grande précision. A cette époque également furent successivement créés un grand nombre de dispositifs accessoires, dont quelques-uns furent redécouverts un siècle après.

Le fâcheux, dans ces microscopes anciens, était leur insuffisance au point de vue optique. Les lentilles utilisées, non achromatiques, fournissaient des images déformées par des aberrations considérables ; aussi les savants de l'époque n'avaient-ils aucune confiance dans les résultats qu'ils fournissaient. Ils s'en servaient peu.

Les perfectionnements optiques du microscope datent seulement du XIX^e siècle, après la découverte des lois de l'achromatisme.

La fabrication d'objectifs achromatiques était rendue difficile par la petitesse des lentilles qu'il fallait souder ensemble. L'habileté des artisans opticiens put vaincre tous les obstacles techniques. Vers les années 1830 naissaient les premiers objectifs achromatiques.

A partir du milieu du XIX^e siècle, de grands progrès furent dus à la collaboration de physiciens d'université, comme le célèbre Abbe, et de constructeurs comme Leitz, Nachet, Verick, Zeiss, etc. Parmi ces progrès, il convient de signaler le condensateur, l'objectif à immersion, l'objectif apochromatique, etc. Ainsi, par étapes successives, furent réalisés les microscopes classiques de haute précision qui sont ceux d'aujourd'hui et dont on trouvera la description dans la première partie de cet ouvrage.

Au XX^e siècle, les perfectionnements continuèrent, mais dans des directions beaucoup plus variées.

Le microscope classique utilise la lumière visible. On tenta de substituer à cette dernière des radiations différentes. Ainsi naquirent la microscopie en ultraviolet, en infrarouge et plus récemment la microscopie électronique. Dès le début du XIX^e siècle, la lumière polarisée avait été adaptée à la microscopie. Demain, nous verrons peut-être le microscope protonique conquérir la microscopie.

Dans d'autres directions, on a récemment recherché l'application à la microscopie d'une série de phénomènes optiques : interférences, contraste de phase, rayons X, etc.

Dans les pages qui suivent seront exposées, au moins dans leur principe, ces méthodes nouvelles. Ces problèmes sont en pleine évolution et l'on peut s'attendre, dans les années qui viennent, à de nouveaux perfectionnements. Ainsi s'agrandira de plus en plus le domaine déjà si étendu de la microscopie.

PREMIÈRE PARTIE

LES INSTRUMENTS

CHAPITRE PREMIER

PRINCIPES FONDAMENTAUX

I. — DE LA LOUPE AUX MICROSCOPES

Le microscope est un instrument qui, dans son principe, est destiné à rendre possible la vision d'objets trop petits pour que leur examen à l'œil nu puisse être fait. La dimension du plus petit objet que nous pouvons voir à l'œil nu est limitée par notre acuité visuelle. Cette acuité visuelle, dans les conditions normales d'observation, c'est-à-dire lorsque l'éclairage est correct, l'œil non fatigué et placé à sa distance minimum de mise au point, est de l'ordre de la minute d'angle. A titre d'exemple, deux traits parallèles sont séparés lorsque l'angle dont le sommet est notre œil et dont les deux côtés s'appliquent sur ces traits dépasse 1 minute. Naturellement, ce pouvoir séparateur angulaire n'exprime pas de façon immédiate le pouvoir séparateur linéaire qui est la distance mesurée sur l'objet lui-même. En effet, ce pouvoir séparateur linéaire dépend étroitement de la distance à laquelle l'objet est vu par l'œil et cette distance dépend elle-même des caractéristiques de l'œil de l'observateur. Si l'observateur est jeune ou s'il est atteint de myopie, il peut voir nettement un objet très rapproché situé à moins de 20 cm de son œil. Le pouvoir séparateur est alors le pouvoir séparateur angulaire, soit 1 minute exprimée en radians, multipliée par la distance d'observation exprimée en centimètres. A 20 cm, par exemple, le pouvoir séparateur est de $20 \times 0,0003$, soit 0,006 cm, soit 60 μ .

Conventionnellement, un observateur à vue normale et d'âge moyen doit placer l'objet à une distance dite distance minimum de vision distincte qui est de 25 cm. Le pouvoir séparateur calculé dans ce cas sera de 75 μ . Une loupe simple permet d'améliorer ce pouvoir séparateur en diminuant la distance minimum d'observation de l'objet, en augmentant donc l'angle sous lequel on le regarde. Mais cette amélioration ne permet pas d'atteindre des grossissements élevés. Il faut, en effet, que la pupille de sortie de l'instrument d'observation soit suffisamment éloignée de la face de sortie du système

optique pour qu'elle coïncide avec la pupille d'entrée de l'œil de l'observateur et dès qu'une loupe simple atteint un grossissement de $20\times$, cette condition n'est plus réalisable.

Le microscope, en reportant la pupille de sortie à l'aide d'un système composé en dehors d'un système optique compliqué, permet actuellement en lumière visible d'atteindre un seuil de l'ordre de $0,2\ \mu$. Lorsqu'on utilise, en transposant ces méthodes, des électrons au lieu de photons qui constituent les particules élémentaires de la lumière, ce seuil est reporté à quelques Angströms (dix-millièmes de μ). Lorsqu'on utilise les protons, ce seuil est reporté à quelques fractions d'Angströms. Fonctionnant ainsi, le microscope est considéré comme un instrument qui donne d'un objet une image autant que possible homothétique, c'est-à-dire qui reproduit à l'aide d'un simple agrandissement la structure intime de l'objet. Il existe d'autres méthodes permettant d'atteindre la structure intime d'un objet, méthodes indirectes qui font appel à l'étude des phénomènes de diffraction produits par l'objet. Le microscope est alors utilisé d'une façon indirecte.

La lumière, comme tout rayonnement permettant d'obtenir une image, présente deux aspects : un aspect corpusculaire et un aspect ondulatoire. Pour former une image, on peut faire appel à tous les rayonnements présentant un aspect ondulatoire ; ces rayonnements dans la pratique sont désignés sous le nom — par ordre décroissant de longueur d'onde — de lumière infrarouge, lumière visible, lumière ultraviolette, électrons, protons. En pratique, seuls les rayonnements que nous venons de citer ont été utilisés bien que d'autres rayons, rayons X et γ , neutrons, appartiennent à la série que nous venons de mentionner. Il n'a pas été possible jusqu'ici de trouver de dispositif permettant de les réfracter ; par contre, ces rayonnements ont pu être utilisés pour donner des informations très précises et très poussées sur la structure intime de la matière en étudiant simplement leur diffraction à la traversée de celle-ci. Du fait qu'ils n'ont été utilisés qu'en diffraction pure, ils sont exclus du cadre de cet ouvrage.

Conventionnellement, pour les besoins de la pratique, on peut donc distinguer une première catégorie de microscopie, la *microscopie* classiquement appelée *optique* (terme impropre en réalité, car elle serait mieux qualifiée de *photonique*), qui s'étend de l'infrarouge à l'ultraviolet en passant par la lumière visible. Dans ces trois cas, ce sont les photons du rayonnement lumineux qui sont utilisés pour former les images. Une seconde catégorie d'instruments appartient à la *microscopie électronique* qui fait appel aux électrons pour former une image. Une troisième catégorie peut être appelée *microscopie ionique*, faisant appel à des ions dont le plus simple peut être considéré comme le proton et qui peuvent être également des ions d'atome léger comme le lithium. La distinction entre la première catégorie de microscopie, microscopie photonique du ressort de l'optique ondulatoire classique et la microscopie cor-

pusculaire, microscopie électronique et microscopie ionique, est beaucoup moins tranchée qu'on n'avait pu le croire au début puisque, suivant l'ordre de grandeur des phénomènes, c'est tantôt l'aspect corpusculaire, tantôt l'aspect ondulatoire de la particule qui prédomine.

Rappelons sommairement qu'à tout corpuscule de masse m et de vitesse v , on peut faire correspondre un phénomène ondulatoire dont la longueur d'onde est donnée par la relation $\lambda = \frac{h}{mv}$, h étant la constante de Plank.

Examinons ce qui se passe dans le cas de corpuscules comme les électrons. La masse existe même si le corpuscule est immobile. Si, à l'aide d'un procédé quelconque, on lui applique une vitesse restreinte par rapport à celle de la lumière, la masse ne varie pas, mais, pour les grandes vitesses, elle augmente rapidement.

La longueur d'onde d'un corpuscule animé d'une telle vitesse est extrêmement petite. On le voit immédiatement en se référant à la formule ci-dessus. Par conséquent, la nature ondulatoire du corpuscule de l'expérience sera difficile à mettre en évidence, tandis que son aspect corpusculaire, c'est-à-dire l'énergie qu'il transporte, sera immédiatement perceptible, par exemple à l'aide d'une simple plaque photographique.

Examinons maintenant ce qui se passe lorsqu'on considère un photon. Son aspect ondulatoire est connu depuis plus d'un siècle, et sa longueur d'onde est immédiatement accessible à l'expérience et mesurable à l'aide d'un système interférométrique. Connaissant la vitesse de la lumière, on peut essayer de calculer la masse du corpuscule, mais cette masse a un aspect purement théorique. On ne peut examiner de photons au repos. Dans le domaine des longueurs d'onde de la lumière visible, cette masse est très faible. Le caractère corpusculaire des photons est donc difficile à mettre en évidence, bien qu'il l'ait été à l'aide de l'expérience classique de la pression des radiations de la lumière qui, en dernier ressort, est due au choc des photons sur la matière. En première approximation, on peut donc dire que les photons qui sont accessibles à notre expérience possèdent tous la même vitesse dans le spectre visible et ont des masses différentes, tandis que les électrons ont des masses presque semblables et des vitesses différentes, du moins tant que l'accélération qui leur est donnée n'approche pas la vitesse de la lumière. Une autre différence que l'on peut constater entre les photons et les électrons provient du fait que les premiers sont dépourvus de charges électriques, et par conséquent insensibles aux champs statiques et magnétiques, tandis que les seconds possèdent tous une charge électrique directement mesurable. C'est la présence de cette charge qui permet par des moyens relativement simples de leur communiquer une accélération en leur faisant subir une chute de potentiel électrique. Sur la figure 1, nous avons rassemblé les données concernant la longueur d'onde des différentes radiations électromagnétiques et des différents corpuscules dont nous venons de parler.

Tout microscope qui utilise des photons, des électrons ou des ions fait appel à un certain nombre de lois simples que, pour la commodité de l'exposé, nous nous permettons de rappeler.

Tout d'abord, une source de photons, d'électrons ou d'ions peut être

considérée comme un point qui émet des corpuscules suivant un ensemble de trajectoires rectiligne que l'on appelle *rayon*. Ces trajectoires sont perpen-

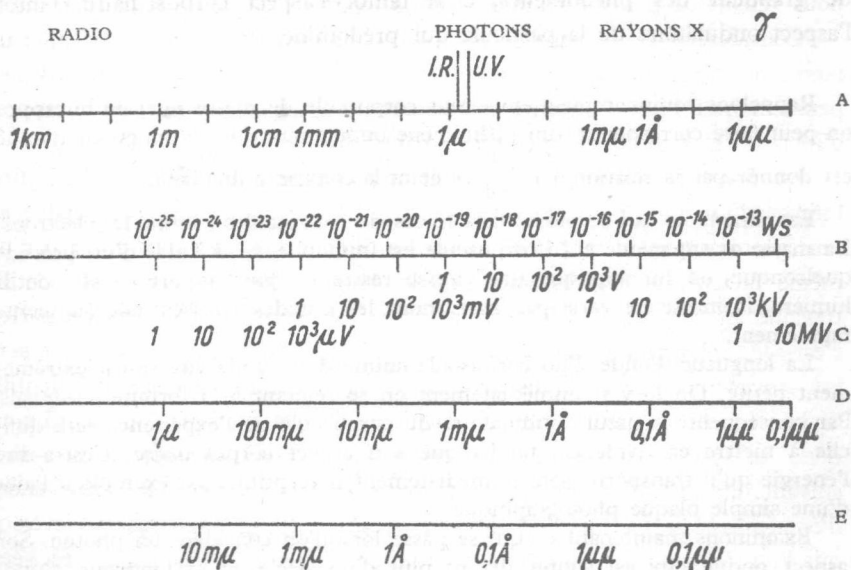


FIG. 1. — Données numériques sur les ondes et les particules utilisées en microscopie.

A, longueur d'onde; B, quanta d'énergie; C, accélération des électrons; D, longueur d'onde associée aux électrons; E, longueur d'onde associée aux protons.

diculaires aux ondes issues du point rayonnant. Prenons un point objet *S*, source de corpuscules qui tombent sur une lentille que nous supposons mince. Cette lentille produit une déviation des rayons que nous supposons de révolution par rapport à l'axe. L'intersection entre l'axe et le centre de la

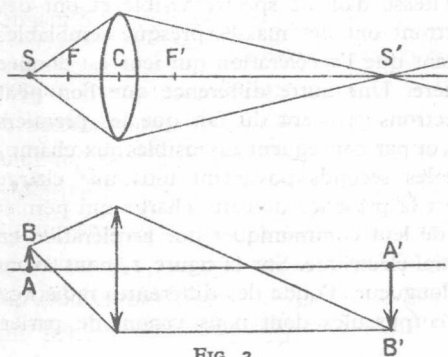


FIG. 2.

que l'on appelle *image* de *S*.

Dans le système optique, certains points peuvent être considérés comme privilégiés pour une certaine position *F* de la source. Si l'image est repoussée

la lentille est appelé conventionnellement *centre optique*. La déviation produite par la lentille est fonction de la distance du point d'incidence du rayon sur la lentille avec l'axe. La constante qui exprime l'effet de la lentille sur les rayons est appelée *puissance de la lentille*. Le rayon dévié recoupe l'axe en un point *S'* et, si l'angle du faisceau est petit, tous les rayons issus de *S* convergent sur le même point *S'*

à l'infini, ce point s'appelle le *foyer objet*. Inversement, si la source est à l'infini, elle forme son image en un point F' appelé *foyer image*. La puissance dont nous venons de parler est l'inverse de la longueur focale de la lentille.

Considérons maintenant ce qui se passe lorsque la source n'est plus un point, mais un objet de grandeur finie, par exemple une petite droite AB perpendiculaire à l'axe. Conventionnellement, on appelle *grandissement* le rapport d'image $A'B'$ que donne la lentille à l'objet AB .

En première approximation, pour une lentille mince d'ouverture petite, l'image d'un objet plan perpendiculaire à l'axe est une image semblable au sens géométrique du mot dont toutes les dimensions sont multipliées par un même facteur, le grandissement de la lentille. Dans le cas où la lentille travaille au voisinage de la position privilégiée dont nous venons de parler, c'est-à-dire lorsqu'on place l'objet au voisinage du foyer, le grandissement est sensiblement égal à la distance de l'image au centre optique de la lentille divisée par la longueur focale de cette lentille. En pratique, une lentille est donc un système qui permet de dévier les corpuscules issus de la source suivant une loi qui se rapproche le plus des lois simples que nous venons d'énoncer. Mais dès que l'on cherche à réaliser des grandissements élevés ou que l'on s'éloigne des conditions d'ouverture petite que nous avons précisées, le problème se complique et, dans le cadre de ce traité, nous ne l'aborderons pas dans toute sa complexité.

Une lentille simple pour des photons est un système réfringent limité par des faces sphériques centrées sur l'axe. La puissance de cette lentille dépend de la courbure de ces faces et de l'indice de réfraction de la substance dans laquelle elle est taillée. Pour les électrons, une lentille simple ne peut plus être réalisée dans une substance matérielle, puisque l'épaisseur que les corpuscules sont capables de traverser ne dépasse pas une fraction de micron. Par contre, ces corpuscules sont déviés par des champs électrostatiques ou magnétiques, puisqu'ils sont porteurs d'une charge électrique.

Supposons qu'un électron passe entre deux plaques également minces entre lesquelles règne un champ ayant une symétrie de révolution autour de l'axe, nous aurons ainsi l'analogie d'une lentille mince pour des photons, que nous avons envisagée au paragraphe précédent. En réalité, les véritables lentilles électrostatiques ne peuvent pas être réalisées sur ce schéma simple, puisque les plaques devraient être matérielles et ne seraient pas traversées par les électrons. Elles font une structure géométrique plus compliquée, que nous aborderons lorsque nous étudierons le microscope électronique lui-même. La déviation par une lentille magnétique peut être également envisagée. Elle est un peu plus complexe que celle que produit une lentille électrostatique. En effet, sans nous étendre sur les forces qui agissent sur l'électron dans ce cas, nous signalons qu'une lentille magnétique produit non seulement une déviation des électrons dans un plan parallèle à l'axe, mais également une

rotation de l'ensemble de l'image autour de cet axe. Abstraction faite de cette rotation qui peut, du reste, être annulée par construction d'une lentille complexe, les trois types fondamentaux de lentille en première approximation peuvent être considérés comme analogues dans leurs effets.

Les lentilles électrostatiques peuvent également être utilisées pour dévier les protons ou des ions mais, dans ce cas, la charge des particules étant de signe inverse à la charge de l'électron, il faut inverser les conditions de potentiel pour obtenir une image comme avec les électrons.

Les éléments communs à tous les microscopes, quelles que soient la nature de leurs lentilles et la nature des corpuscules utilisés pour former les images, sont une source qui émet des corpuscules dont le trajet est dévié par une première lentille appelée condensateur qui les concentre sur l'objet à examiner, une seconde lentille appelée objectif donne de l'objet une image agrandie qui est elle-même reprise comme objet par une seconde lentille appelée oculaire, suivie ou non de lentilles d'agrandissement successives.

Le dispositif récepteur est soit l'œil, soit un écran fluorescent, soit un dispositif d'enregistrement photographique. Si c'est l'œil qui reçoit directement l'image, il ne faut jamais oublier qu'il fait partie intégrante du système optique et qu'il constitue en lui-même un instrument d'optique dont les caractéristiques doivent être connues et dont on doit tenir compte pour le calcul des constituants optiques du microscope. Si l'œil est placé, comme nous l'avons dit, au voisinage du foyer de l'oculaire, on calcule aisément le grandissement total du système optique. Le grandissement total est simplement le produit des grandissements partiels des deux systèmes optiques considérés séparément, l'objectif et l'oculaire. Dans le cas où le microscope est utilisé directement avec l'œil de l'observateur, l'usage est de définir un paramètre nouveau : le *grossissement* de l'appareil, qui s'écarte du *grandissement* qui devrait être dans ce cas le produit du grandissement de l'objectif par celui de l'oculaire par celui de l'œil de l'observateur. Ce dernier étant inaccessible à une expérience directe, le grossissement est conventionnellement défini par rapport au grandissement qu'aurait l'image si l'objet était regardé à une distance conventionnellement fixée à la distance minimum de vision distincte d'un œil adulte et normal, soit 25 cm. Ce grossissement s'obtient en multipliant le grandissement de l'objectif par 25 cm, divisé par la longueur focale de l'oculaire exprimée en centimètres. En microscopie électronique, on utilise parfois, par analogie avec le microscope optique, le terme de grossissement pour désigner le grandissement final de l'objet sur l'écran fluorescent ou la plaque photographique.

II. — LES ABERRATIONS

1° L'aberration chromatique. — Dès que l'on s'écarte des conditions énumérées au paragraphe précédent, l'image d'un point, donnée par une lentille ou par un système de lentilles, n'est pas toujours un point géométriquement semblable. En effet, la source peut émettre des corpuscules n'ayant pas tous la même longueur d'onde. Comme la longueur focale d'une lentille simple est une fonction de cette longueur d'onde, les grandissements pour les différents corpuscules varient. L'image n'est au point que pour une seule longueur d'onde. Le mot chromatisme vient de ce qu'en lumière blanche l'image d'un point donné par un système entaché d'aberrations chromatiques est un point bordé d'un liséré coloré. De plus, dans les cas de corpuscules matériels comme les électrons, la longueur d'onde est fonction étroite de la vitesse. Elle est modifiée de façon irréversible à la traversée de l'objet. Il y a donc ce qu'on appelle une perte chromatique au passage à travers la matière. On peut y remédier dans une certaine mesure :

1° En n'utilisant que des corpuscules d'une seule longueur d'onde ;

2° En éliminant les corpuscules qui ont subi une perte de vitesse à travers la matière à l'aide d'un filtre ;

3° En calculant des systèmes qui, à l'aide de trajets dans les milieux complexes, compensent en les annulant les différences de trajets optiques pour les différentes longueurs d'onde. Ceci est relativement facile avec des photons et se révèle très difficile à faire avec des électrons.

L'achromatisme d'un système optique en optique photonique est un problème dont la difficulté croît avec la puissance du système. Uniquement dans le cas de certains systèmes à miroir dans lesquels les lois de la réflexion sont indépendantes de la longueur d'onde, on obtient de façon simple un système entièrement achromatique. Suivant le degré de la correction du système on a défini différentes catégories d'objectifs dont les caractéristiques seront spécifiées page 30 : Objectifs monochromatiques — Objectifs achromatiques — Objectifs semiapochromatiques — Objectifs apochromatiques.

2° L'aberration sphérique. — L'image d'un point émettant des radiations monochromatiques peut, malgré cela, n'être pas un point si les rayons traversant les lentilles près de l'axe ou en dehors de l'axe ne convergent pas exactement au même point. Cette aberration sphérique, qu'il ne faut pas confondre avec la courbure de champ, peut se corriger en optique photonique par association de lentilles convergentes et divergentes d'indices différents, les aberrations de signes opposés s'annulant.

En optique électronique, la correction de l'aberration sphérique est chose

beaucoup plus difficile qui ne peut être résolue qu'en faisant appel à des systèmes non de révolution. En pratique, elle n'est pas réalisée dans les microscopes électroniques. On se contente de rendre son effet négligeable en utilisant des ouvertures de lentilles extrêmement petites.

III. — LE POUVOIR RÉSOLVANT

Les qualités d'un système optique ne dépendent pas de son grandissement, mais sont une résultante d'un ensemble de variables, c'est-à-dire en dernier

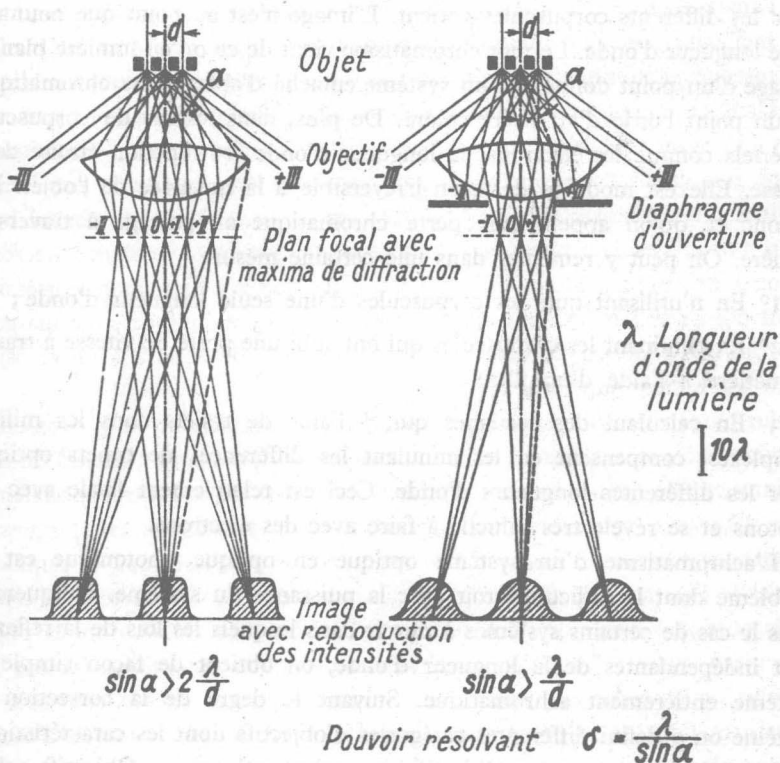


FIG. 3. — Influence de l'ouverture de l'objectif sur la fidélité de reproduction et sur le pouvoir résolvant.

Les chiffres romains désignent l'ordre des faisceaux diffractés. Ici $\sin \alpha$ remplace $2n \sin u$, car on a supposé l'indice égal à 1.

ressort de la perfection avec laquelle les aberrations ont été corrigées. Le grandissement ne doit intervenir que comme un facteur limite permettant, s'il est fixé à une valeur convenable, de tirer le maximum d'information de l'image. S'il est trop grand, l'image est floue. S'il est trop faible, l'œil ne peut percevoir les détails les plus fins qui existent cependant dans l'image géométrique. Dans un instrument moderne dont la correction des aberrations a été

poussée au maximum compatible avec nos connaissances techniques, il existe un troisième facteur qui vient limiter de façon absolue les informations apportées par l'image, c'est la diffraction. Depuis Abbe, on admet la relation générale qui lie le pouvoir résolvant y à la longueur d'onde λ de la radiation utilisée et à l'ouverture de l'objectif u .

$$\text{On a : } y = \frac{1,22 \lambda}{2 n \sin u}$$

Lorsqu'on sait corriger l'aberration sphérique, et c'est le cas du microscope photonique, on peut utiliser des angles relativement élevés, tels que le sinus de l'angle d'ouverture atteigne ou même dépasse 1,3. Dans les conditions les meilleures, on voit immédiatement que le pouvoir résolvant du meilleur microscope photonique ne dépassera pas 0,2 μ pour les radiations visibles.

Dans les conditions optimales de l'éclairage, l'œil peut séparer 75 microns à 25 cm. Si on voulait que la plus petite distance séparable par l'œil au microscope soit environ 0,2 micron et soit vue dans ces conditions par l'œil, il suffirait d'un grossissement de 375. Mais les contrastes sont en général beaucoup plus faibles dans une image microscopique que dans une image macroscopique. De plus, pour diminuer la fatigue, il y a intérêt à augmenter le grossissement pour que l'œil puisse séparer les structures avec une certaine marge de sécurité. En adoptant une marge de sécurité de 3, on aboutit à un grossissement légèrement supérieur à 1.000.

La plupart des usagers reconnaissent qu'en augmentant le grossissement certains phénomènes dus à l'œil de l'observateur deviennent gênants. En effet, à l'intérieur de l'œil, il existe certaines irrégularités de structure, spécialement dans l'humeur aqueuse, connues sous le nom de défauts entoptiques ou « mouches volantes ». Lorsque l'on augmente le grossissement, la pupille de sortie de l'instrument d'observation diminue ; elle ne couvre plus la totalité de la pupille d'entrée de l'œil, surtout si l'éclairage est faible, donc la pupille largement dilatée. Dans ces conditions, les défauts entoptiques voient leur visibilité augmenter et, comme leur contraste atteint vite le contraste des structures fines de la préparation, la visibilité de ceux-ci diminue. Pour les rendre plus visibles, on a le choix entre deux solutions : soit augmenter le diamètre de la pupille de l'instrument d'observation en utilisant, comme l'a proposé Arntlf, un oculaire dont le verre d'œil a été excentré et tourne à grande vitesse, soit en projetant l'image sur un écran et en la regardant avec les deux yeux. Mais, dans ce dernier cas, on est vite limité par la faible intensité lumineuse d'une projection à fort grossissement. Si on reçoit l'image sur un récepteur photographique, il faut prendre en considération un phénomène annexe qui est la granularité de l'émulsion. Cette granularité constitue une sorte de « bruit de fond » qui limite le contraste du plus fin détail perceptible et qui perturbe localement la finesse des images. On peut diminuer les effets de

