

# **Microscopie : Fondamentaux**

HERVÉ SAUER - JOËLLE SURREL

# Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. Présentation</b>   | <b>3</b>  |
| <b>II. Cours</b>   | <b>4</b>  |
| 1. Structure du microscope.....                                      | <b>4</b>  |
| 1.1. Structure du microscope.....                                    | <b>4</b>  |
| 2. Éclairage.....  | <b>6</b>  |
| 2.1. Rôle et propriétés.....   | <b>6</b>  |
| 2.2. L'éclairage de Köhler.....                                      | <b>6</b>  |
| 3. Propriétés d'imagerie du microscope.....                          | <b>8</b>  |
| 3.1. Contraintes de l'imagerie sous forte ouverture numérique.....   | <b>8</b>  |
| 3.2. Cohérence de l'éclairage et limite de résolution.....           | <b>13</b> |
| 3.3. Autres propriétés et caractéristiques du microscope.....        | <b>15</b> |
| 4. Compléments.....  | <b>16</b> |
| 4.1. Complément 1.....   | <b>16</b> |
| 4.2. Complément 2.....   | <b>17</b> |
| <b>III. Etude de cas</b>   | <b>19</b> |
| 1. Mise en œuvre d'un microscope en transmission.....                | <b>19</b> |
| 1.1. Réglages du microscope pour une observation visuelle.....       | <b>19</b> |
| 1.2. Détermination de quelques caractéristiques d'un microscope..... | <b>23</b> |
| 2. Utilisation d'un microscope métallographique.....                 | <b>27</b> |
| 2.1. Présentation.....   | <b>27</b> |
| 2.2. Réglages.....   | <b>28</b> |
| 2.3. Limite de résolution.....                                       | <b>31</b> |
| 3. Microphotographie numérique.....                                  | <b>32</b> |
| 3.1. Microphotographie numérique.....                                | <b>32</b> |
| <b>IV. Exercices</b>   | <b>33</b> |
| 1. Exercices.....  | <b>33</b> |
| <b>Solution des exercices</b>  | <b>36</b> |
| <b>Glossaire</b>   | <b>40</b> |
| <b>Bibliographie</b>   | <b>41</b> |
| <b>Webographie</b>   | <b>42</b> |

# I.Présentation

## *Module :*

---

Optique instrumentale, microscopie

## *Auteur(s) :*

---

Hervé SAUER<sup>1</sup>&Joëlle SURREL<sup>2</sup> - Institut Optique Graduate School & IUT St Étienne

## *Résumé :*

---

Présentation de la structure du microscope optique (objectif, oculaire, pupille et diaphragme de champ) et des spécificités de la formation d'image sous forte ouverture numérique. L'éclairage Köhler est également détaillé.

## *Mots-clés :*

---

Microscopie, Éclairage Köhler, Imagerie sous forte ouverture numérique

## *Pré-requis :*

---

Optique géométrique. (Des connaissances d'optique physique sur la limite de résolution des objectifs peuvent être utiles, mais ne sont pas absolument indispensables)

## *Objectif(s) pédagogique(s) :*

---

Faire comprendre le fonctionnement pratique d'un microscope et permettre à l'étudiant ayant suivi ce module de manipuler en connaissance de cause un microscope actuel simple (compréhension du marquage des objectifs, choix de ceux-ci en fonction de la préparation à observer, réglages de base de l'éclairage Köhler et du microscope...)

## *Plan du cours :*

---

- Introduction
- Structure du microscope
- Éclairage
- Propriétés d'imagerie du microscope
- Compléments
- Conclusion

## *Conception & production :*

---

PRN - Le Mans Université

## *Licence :*

---

Licence GNU<sup>3</sup>

1 - herve.sauer@institutoptique.fr

2 - joelle.surrel@univ-st-etienne.fr

3 - <http://www.gnu.org/licenses/fdl.txt>

# II. Cours

Comme l'indique son étymologie (micro- [ *μικρός* petit ] et -scope [ *σκοπεῖν* observer ] ), le **microscope** est un instrument permettant l'observation visuelle de petits objets ou détails d'objets proches de l'observateur, usuellement indiscernables à l'œil nu même lorsqu'ils sont placés au *punctum proximum*. Ainsi, à l'instar de la loupe, une des propriétés principales de cet appareil est donc son **grossissement**, c'est à dire son aptitude à fournir une image agrandie angulairement de l'objet étudié. Cependant, ce paramètre ne suffit pas à lui seul à caractériser les performances du dispositif. Il faut en effet que cette propriété s'applique à tous les détails de l'objet, y compris les plus fins. La seconde propriété clef du microscope est donc son pouvoir de résolution ou pouvoir de séparation. Ce dernier point a de très importantes conséquences pratiques puisqu'il implique de travailler avec des optiques de **grande ouverture numérique limitées par la diffraction** (i.e. sans aberration).

Bien que la microscopie optique soit une science ancienne ayant pris son essor au XVI<sup>ème</sup> siècle, elle n'en demeure pas moins une technologie de pointe, très utilisée dans de nombreux secteurs de la recherche et de l'industrie, et faisant toujours l'objet de nombreuses améliorations techniques comme, par exemple dans ces dernières années, l'extension du fonctionnement vers l'ultraviolet ou la mise à la disposition des utilisateurs de systèmes conviviaux de microphotographie numérique.

Ce premier grain du module de *microscopie optique* a pour objectif de présenter en détail les concepts de base d'optique instrumentale (optique géométrique et diffraction) sur lesquels sont fondés tous les systèmes de microscopie<sup>1</sup>. Un deuxième grain présente plus spécifiquement les nombreuses techniques permettant d'améliorer le contraste des objets observés.

## 1. Structure du microscope

### 1.1. Structure du microscope

Un système optique d'observation visuelle de petits objets proches doit donc réaliser, d'un objet réel à distance finie, une image virtuelle, si possible à l'infini pour un observateur emmétrope, de taille angulaire supérieure à celle sous laquelle l'objet est vu à l'œil nu au *punctum proximum*. Le système le plus simple vérifiant ce cahier des charges est donné figure 1. Il est constitué d'une unique lentille mince dont le plan focal objet coïncide avec l'objet à observer. Le grossissement est supérieur à 1 et d'autant plus grand que la focale de la lentille est plus courte que la distance objet-œil au *punctum proximum*. C'est le principe de fonctionnement de la **loupe**.

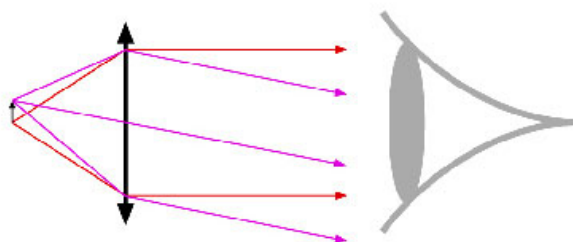


Figure 1: Principe de la loupe

Ce système, même amélioré en remplaçant la lentille simple par un singlet ou un doublet à surfaces asphériques, possède de très importantes limitations de champ, dues aux aberrations de champ qui ne peuvent être corrigées, et au vignettage introduit par la pupille de l'œil qui est lucarne de champ. Les grossissements et ouvertures numériques pouvant être utilisés en pratique sont peu élevés.

Une solution aux problèmes précédemment évoqués est donnée par le schéma de la figure 2. Ce système composite, constitué d'un objectif $\Rightarrow$  et d'un oculaire $\Rightarrow$ , permet de résoudre le problème des conjugaisons pupillaires (suppression du vignettage par la pupille de l'œil qui peut ici être placée sur la pupille de sortie du microscope) et celui de la correction des aberrations de champ (système global "épais" constitué de plusieurs lentilles ou multipléts). Cette structure est universellement utilisée en microscopie depuis plus d'un siècle maintenant.

Son fonctionnement est le suivant: l'objectif '*Ob*' donne de l'objet une image réelle agrandie. Cette image intermédiaire est reprise par l'oculaire '*Oc*' qui en donne une image virtuelle à l'infini finalement observée par l'œil. Le grossissement global du microscope est le produit du *grossissement de l'oculaire* par le *grandissement de l'objectif*. La pupille de l'œil doit être impérativement placée sur la pupille de sortie de l'instrument, appelée "cercle oculaire $\Rightarrow$ ", pour éviter toute limitation par l'iris de l'œil du champ perçu. De ce fait, la distance séparant le cercle oculaire du dioptré de l'oculaire le plus proche, appelée "tirage du cercle oculaire $\Rightarrow$ " (*en anglais, "eye relief"*) doit avoir une valeur minimale pour permettre une observation confortable (15 à 20mm pour un œil nu, 20 à 25mm pour une observation avec lunettes de correction de la vue). Le cercle oculaire est l'image par l'oculaire de la pupille de sortie de l'objectif. La pupille de sortie de l'objectif est, quant à elle, définie par le diaphragme '*Pu*' et est toujours située dans le plan focal image de l'objectif '*Ob*'. Ce diaphragme, pupille de l'objectif et également pupille globale du microscope, contrôle par définition le flux de lumière entrant et donc l'ouverture numérique objet du système. De ce fait, on l'appelle parfois 'diaphragme d'ouverture'. Il est à noter que la pupille d'entrée de l'objectif est rejetée à l'infini (système dit "**télécentrique** objet") ; c'est une propriété très importante des objectifs de microscope qui a pour conséquence de rendre tous les points du champ objet équivalents du point de vue du cône de rayons servant à former l'image. Ce point est également important lorsque l'on analyse le microscope associé à son éclairage (voir le paragraphe §III). Enfin, le diaphragme '*Dc*' (diaphragme dit 'de champ'), dans le plan image intermédiaire, confondu avec le plan focal objet de l'oculaire (pour un observateur emmétrope), limite de manière nette le champ observable.

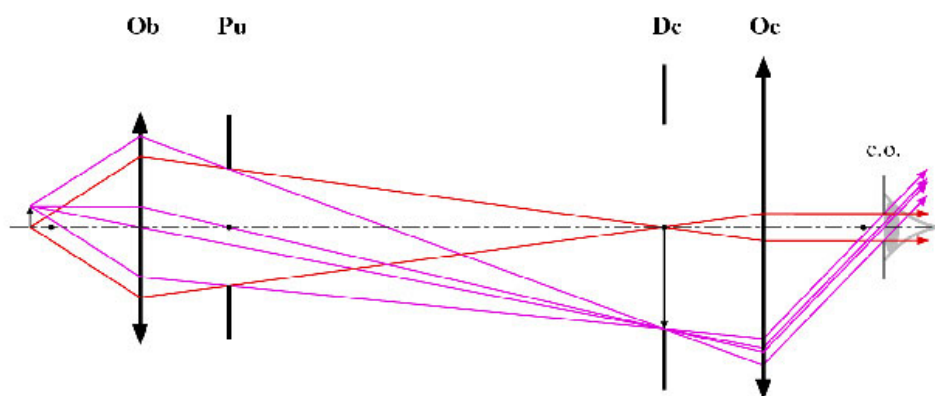


Figure 2: Principe de la structure du microscope

## 2. Éclairage

### 2.1. Rôle et propriétés

Une observation de qualité d'un objet ne peut se concevoir que si celui-ci est "bien" éclairé.

Les propriétés d'un bon éclairage en microscopie sont les suivantes:

- Uniformité de l'éclairage. {Pour voir l'objet et non les défauts de l'éclairage}
- Limitation de la zone éclairée au champ vu dans le microscope. {Pour limiter la lumière parasite}
- Contrôle de l'ouverture numérique (ou autrement dit de la cohérence partielle) de l'éclairage. {Cf. la sous-partie « Cohérence de l'éclairage et limite de résolution »}

L'éclairage doit par ailleurs pouvoir fonctionner dans deux situations d'observation très différentes:

- celle d'objets essentiellement transparents qui seront éclairés **en transmission** ; on parle dans ce cas de *microscopie en transmission* ou "diascopie" (du grec 'dia-', à travers).
- celle d'objets opaques qui seront éclairés par réflexion, en général au travers de l'objectif d'observation lui même qui joue alors un rôle double ; on parle dans ce cas de *microscopie par réflexion* ou "épiscopie" (du grec 'épi-', par dessus).

Différentes méthodes permettent de remplir, plus ou moins complètement et facilement, les conditions précédemment exposées. La méthode la plus performante, universellement utilisée sur les microscopes professionnels est l'éclairage Köhler [ [Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke] ]. Cette méthode est présentée dans le paragraphe suivant pour la diascopie ; sa version pour l'épiscopie est présentée dans la figure C2 des compléments à la fin de la séquence de cours.

### 2.2. L'éclairage de Köhler

Inventé par A. Köhler à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle [ [Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke] ], il est basé sur les trois conjugaisons suivantes:

- Diaphragme de champ de l'éclairage ↔ Préparation via l'optique du condenseur.

- Diaphragme d'ouverture de l'éclairage  $\leftrightarrow$  pupille d'entrée de l'objectif (**à l'infini**) via l'optique du condenseur.
- Dépoli devant la lampe  $\leftrightarrow$  Diaphragme d'ouverture via l'optique de l'illuminateur.

La figure 3 ci-dessous en donne son schéma de principe avec ses différents éléments et les indications des conjugaisons. Le diaphragme d'ouverture  $DO$  est par construction mécanique dans le plan focal objet de l'optique  $C$  du condenseur. **La deuxième conjugaison est donc toujours réalisée.**

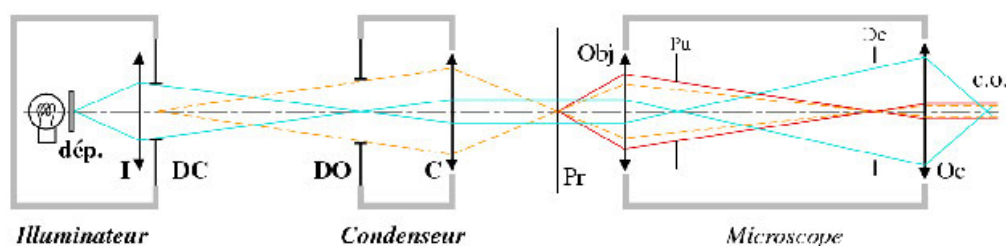


Figure 3: Principe de l'éclairage de Köhler (en diascope)

L'optique  $I$  de l'illuminateur est éclairée très uniformément par la lampe et son dépoli, situés quelques centimètres en retrait. L'éclairage de la préparation, par l'image de la lentille  $I$  (limitée par le diaphragme de champ  $DC$ ) formée par l'optique  $C$  du condenseur dans le plan de la préparation  $Pr$  est donc uniforme. Par contre, l'image du dépoli, de texture et d'éclairage plus ou moins uniformes, est formée dans le plan du diaphragme d'ouverture  $DO$ . Ce dernier étant par construction dans le plan focal objet de l'optique  $C$  du condenseur, l'image du dépoli est rejetée à l'infini et est donc le plus éloignée possible de la préparation.

Cette configuration possède des propriétés remarquables. Le diaphragme d'ouverture étant dans le plan focal du condenseur, la pupille de sortie du système ( $DO, C$ ) est donc rejetée à l'infini (système télécentrique image). Ceci signifie que, en sus de recevoir le même éclairement, tous les points de la préparation sont éclairés par le **même** cône de lumière, ce qui, associé au caractère télécentrique objet de l'objectif du microscope, garantit une réponse photométrique identique pour tous les points du champ du microscope, ce qui est très important en pratique et serait difficile à obtenir dans d'autres configurations... De surcroît, l'éclairage Köhler permet de régler, de manière totalement indépendante l'une de l'autre, la taille du champ éclairé sur la préparation [contrôlé par le diaphragme de champ  $DC$  (Il est souvent utile, pour des problèmes de lumière parasite, de limiter la zone éclairée à celle vue ou même simplement étudiée par le microscopiste)] et l'angle du cône de lumière frappant chaque point de la préparation, ou, autrement dit, l'ouverture numérique de l'éclairage [contrôlé par le diaphragme d'ouverture  $DO$  (Ceci règle la quantité de lumière totale reçue mais aussi et surtout la manière dont se forme l'image finale de l'objet observé, par son influence sur la cohérence partielle de l'éclairage ; voir la sous-partie « Cohérence de l'éclairage et limite de résolution » sur la formation des images en éclairage partiellement cohérent)]. L'éclairage Köhler assure par ailleurs, par conception même, la conjugaison des plans du diaphragme d'ouverture  $DO$  et de la pupille  $Pu$  de l'objectif. Il en va de même pour le plan du diaphragme de champ  $DC$  de l'éclairage et celui du diaphragme de champ  $Dc$  de l'oculaire. Par conséquent, l'éclairage Köhler n'introduit aucun vignettage et l'uniformité de l'illumination du champ observé peut effectivement être obtenue.

Ainsi, à l'exception des modèles de très bas de gamme, l'éclairage Köhler est systématiquement intégré dans le statif de tous les microscopes actuels. Il est souvent partiellement pré-réglé, en particulier en ce qui concerne les centrages. La conjugaison Diaphragme de Champ/Préparation (par translation du condenseur) incombe cependant toujours à l'utilisateur afin de permettre l'observation de préparations réalisées sur des lames d'épaisseurs différentes.

### 3. Propriétés d'imagerie du microscope

Comme il a été rappelé dans l'introduction, le rôle premier d'un microscope est d'améliorer la vision de petits objets par un observateur humain. Les deux caractéristiques essentielles de cet instrument sont donc son grossissement et sa **limite de résolution**. Pour un objectif '**limité par la diffraction et non par ses défauts ou aberrations**', la limite de résolution  $r$  est proportionnelle à la longueur d'onde (moyenne) de travail  $\lambda$  et inversement proportionnelle à son ouverture numérique objet  $NA_{obj}$ , soit  $r = Cte \cdot \lambda / NA_{obj}$ . La valeur précise de la constante  $Cte$  est quelque peu arbitraire ; pour le critère de Rayleigh en éclairage incohérent, celle-ci vaut  $\sim 0,61$  (voir cours d'optique de base ou [ [Principles of Optics]]). On rappelle que l'ouverture numérique objet de l'objectif est définie par  $NA_{obj} = n \cdot |\sin(\alpha_{obj,max})|$  où  $n$  est l'indice de réfraction du matériau entre l'objet et l'objectif et  $\alpha_{obj,max}$  est l'angle maximal par rapport à l'axe optique des rayons issus de l'objet entrant utilement dans l'objectif. On utilise donc en microscopie **des objectifs de très forte ouverture numérique particulièrement bien corrigés des aberrations**. De tels objectifs, qui nécessitent de nombreuses lentilles très précisément positionnées les unes par rapport aux autres, sont relativement fragiles et très coûteux. Par ailleurs, pour obtenir les meilleures résolutions, il est intéressant de travailler dans un milieu objet d'indice supérieur à 1, comme l'eau ( $n \simeq 1,33$ ) ou surtout l'huile d'immersion (huile de cèdre ou huile synthétique,  $n \simeq 1,52$ ), afin de pouvoir utiliser des ouvertures numériques supérieures à 1. Ainsi les objectifs de plus fort grandissement (100) sont en général des objectifs à immersion (dans l'huile) dont les ouvertures numériques dépassent couramment 1,25.

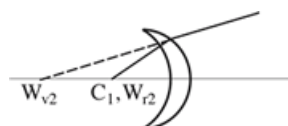
L'utilisation de tels objectifs, d'ouverture numérique élevée et dépourvus d'aberrations notables, pose quelques problèmes spécifiques que ce paragraphe se propose de vous présenter.

#### 3.1. Contraintes de l'imagerie sous forte ouverture numérique

##### a) Introduction

Le problème principal de la formation d'image sous forte ouverture numérique provient de l'inclinaison élevée des rayons intervenant. Des ouvertures numériques de 0,70 ; 0,95 (dans l'air) ou 1,30 (dans l'huile d'immersion) conduisent à des rayons extrêmes formant avec l'axe optique de l'objectif des angles de respectivement 45, 72 et 59 ! On est donc **très loin** des conditions de Gauss et du domaine d'utilisation du stigmatisme approché. Pour obtenir des images de qualité, il faut impérativement travailler avec des conjugaisons rigoureusement stigmatiques et aplanétiques. Ainsi, il est fait une grande utilisation dans la conception des objectifs de microscope, du centre de courbure et des points de Weierstrass des dioptrés sphériques

Remarque : La brique de base est le **ménisque aplanétique d'Amici** (voir figure ci-dessous). L'objet se trouve au centre de courbure du premier dioptré. Son image (superposée à l'objet) est au point de Weierstrass réel du second dioptré qui en donne une image virtuelle agrandie sous une ouverture numérique diminuée.



Par conséquent, le couple de points objet/image optimal de l'objectif est figé. Par ailleurs, de simples dioptrés plans peuvent avoir une influence considérable sur la qualité d'image comme le montre le paragraphe suivant.

## b) Influence de la lamelle couvre objet

La plupart des préparations d'objets microscopiques observées par transmission sont protégées par une fine lame de verre à faces planes et parallèles appelée lamelle couvre objet<sup>2</sup>. Cette lamelle, bien qu'ayant une puissance optique nulle, altère cependant les rayons obliques qui la traversent (déplacement latéral). Ce phénomène, d'autant plus important que les rayons sont inclinés, se traduit par une dégradation du stigmatisme comme le montre la figure 4 (introduction d'aberration sphérique).

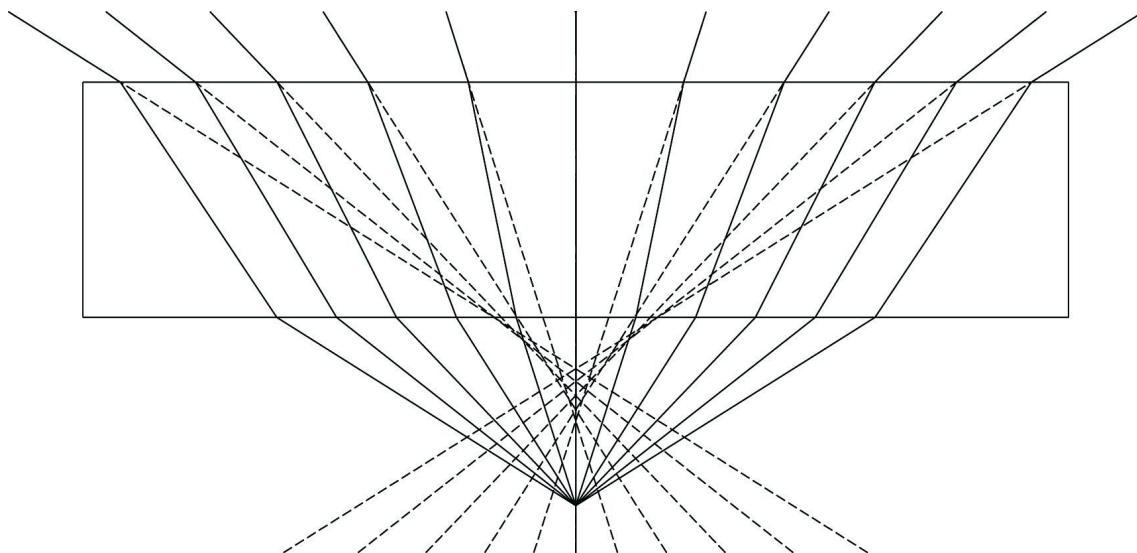


Figure 4: Dégradation du stigmatisme d'un faisceau divergent par une lame de verre à faces parallèles

On considère usuellement que la lamelle provoque ainsi une chute perceptible de la qualité de l'image observée dès que l'ouverture numérique de l'objectif dépasse 0,30. Pour des ouvertures numériques supérieures à 0,70 la dégradation de l'image est flagrante, voire dramatique.

Il est cependant possible de remédier à ce problème en engendrant dans l'objectif, par une conception judicieuse de celui-ci, une aberration opposée à celle introduite par la lamelle. Il faut bien réaliser qu'un tel objectif donne a contrario une mauvaise image d'une préparation **non recouverte** d'une lamelle. Les constructeurs proposent donc en général deux versions de tous leurs objectifs d'ouverture numérique supérieure à 0,30, l'une, prévue pour travailler avec lamelle couvre objet, l'autre, (plutôt dédiée aux microscopes dit *métallographiques*, i.e. observant des objets opaques éclairés en réflexion à travers l'objectif (Cf. Fig.12, dans les compléments à la fin de ce cours) prévue pour travailler sans lamelle. Une gravure sur la monture permet de différencier les différents modèles (voir la sous-partie « Marquage des objectifs »)

### Remarque

L'aberration introduite par la lamelle dépend de son épaisseur et de son indice. La correction introduite par l'objectif n'est donc valable que pour un modèle bien précis de lamelle couvre objet. Un type standard de lamelle a donc été défini (norme ISO TC172-8255). Son épaisseur est de 0,170 mm, son indice de 1,517 à 588 nm et sa constringence<sup>3</sup> de  $\approx 64$  (verre standard N-BK7 de Schott ou S-BSL7 de Ohara). Les tolérances sur les deux premiers paramètres sont d'autant plus drastiques que l'on envisage de travailler à ouverture numérique élevée. L'épaisseur devrait, par exemple, être correcte à  $\pm 5 \mu\text{m}$  pour travailler sans perte sensible de qualité à ouverture numérique 0,85. Il est toutefois extrêmement difficile de se procurer de telles lamelles. (Les lamelles couramment disponibles dans le commerce sont le plus souvent garanties par le fabricant à  $\pm 0,030 \text{ mm}$  !). C'est pourquoi certains objectifs de haute qualité de très grande ouverture numérique disposent d'une bague rotative permettant d'ajuster la correction à l'épaisseur effective de la lamelle utilisée.

Il est possible de faire une observation qualitative du phénomène en utilisant comme objet une lame aluminée présentant de minuscules trous dans l'aluminure. Ces trous, illuminés par l'éclairage Köhler, vont servir d'objets lumineux quasi-ponctuels sur fond sombre et permettre ainsi l'observation de la *réponse percussionnelle* de l'objectif. Si l'objectif est parfait et la mise au point précisément réalisée, la réponse percussionnelle est une tache d'Airy. Dans les autres cas, la tache observée et surtout son évolution avec la mise au point renseigne sur la qualité du système. Cette méthode (classique) de mesure des aberrations d'un système optique porte le nom de *méthode du point lumineux*. La figure 5 présente les réponses percussionnelles d'un système parfait (colonne a) et celle d'un système entaché d'aberration sphérique (colonne b) pour différentes mises au point de part et d'autre de l'image paraxiale.

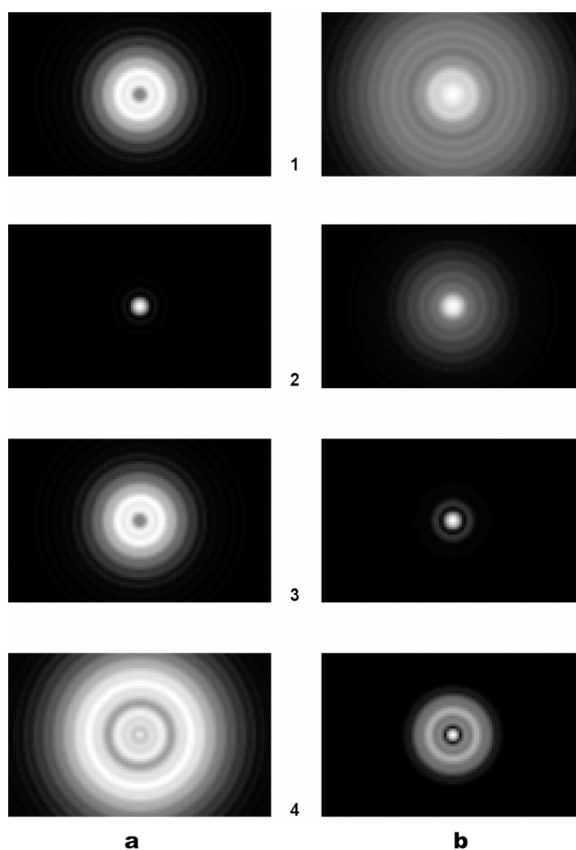


Figure 5: Évolution avec la mise au point de la réponse percussionnelle théorique d'un système optique parfait (a) ou entaché d'aberration sphérique (b)

D'une ligne à l'autre la mise au point a varié d'une même quantité. L'image paraxiale correspond, pour les deux colonnes, à la deuxième ligne. L'image a2 représente donc une tache d'Airy. En présence d'aberration sphérique, la meilleure mise au point ne correspond plus à l'image paraxiale. La meilleure réponse percussionnelle obtenue alors (image b3) possède des anneaux secondaires d'intensité très supérieure à ceux de la tache d'Airy, ce qui explique le brouillage d'une image formée avec un tel système aberrant. Notez, colonne a, la symétrie de l'évolution de la réponse percussionnelle de part et d'autre de la meilleure mise au point (a2) lorsque le système n'a pas d'aberration. En présence d'aberration sphérique (colonne b), les réponses percussionnelles obtenues de part et d'autre de la meilleure mise au point (b3) sont par contre très différentes.

### Remarque

La dynamique d'une image (8 bits) reproduite sur un écran est très inférieure à la dynamique de l'œil, qui en observation réelle percevrait des anneaux secondaires très faibles, invisibles ici.

### c) Longueur de tube et autres normes dimensionnelles du microscope

L'utilisation de conjugaisons rigoureusement stigmatiques, comme les points de Weierstrass, dans la conception des objectifs de microscope impose que l'image intermédiaire observée avec l'oculaire se trouve à une position précise et fixe relativement à l'objectif. La mise au point doit donc être faite par modification de la distance objet/objectif, la distance objectif/oculaire étant fixée. Un microscope doit donc travailler comme un viseur à frontale fixe. Afin de permettre une certaine interchangeabilité des composants (statifs, objectifs, oculaires) entre différents constructeurs des normes dimensionnelles précises ont été définies pour le microscope ( ISO TC172 [8036 à 8040 + 8255 + 8578...] ). Les plus importantes sont reportées Fig. 6 ci-dessous [ [Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur]].

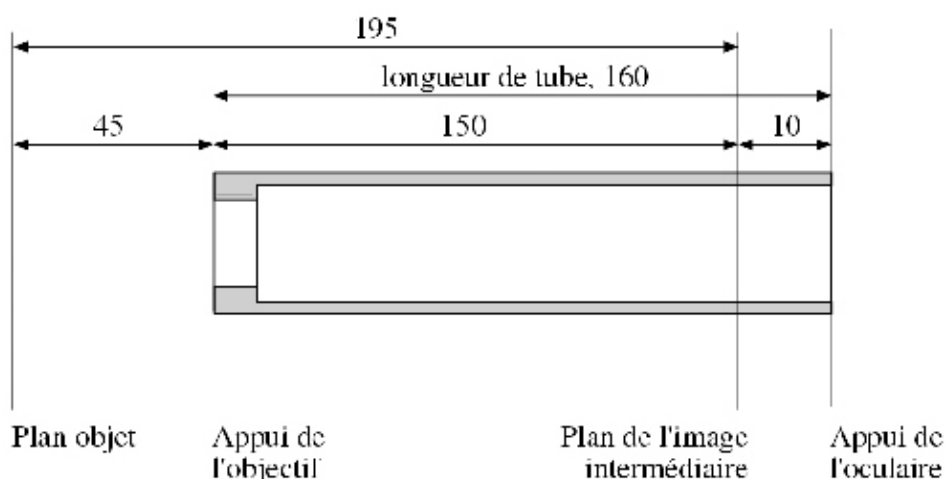


Figure 6: Principales distances normalisées du microscope (en mm)

**Le plan de l'image intermédiaire doit donc être 10 mm en dessous de l'épaulement de l'oculaire et le plan objet à 45 mm de l'épaulement de l'objectif<sup>1</sup>.** La longueur de tube (i.e. la distance séparant l'appui de l'objectif de l'appui de l'oculaire) a par ailleurs une valeur normalisée de 160 mm. Il est cependant possible de trouver d'autres longueurs ; celle de 230 mm est, par exemple, rencontrée sur les microscopes métallographiques anciens. Mais surtout, un type d'objectifs, dits **corrigés pour une longueur de tube infinie** (ou en raccourci, *corrigés à l' $\infty$* ), est proposé par la plupart des constructeurs pour leur matériel haut de gamme. Ces derniers objectifs sont prévus pour donner à l'infini une image sans aberration de l'objet observé. Cette image est ramenée à distance finie par un système optique convergent supplémentaire, dit **lentille de tube<sup>2</sup>**, contenue dans le statif du microscope. L'image réelle ainsi formée, équivalente à l'image intermédiaire des microscopes "conventionnels", est observée avec l'oculaire. L'intérêt de cette configuration réside dans la plus grande facilité de réalisation et d'insertion dans le trajet optique de composants supplémentaires comme ceux nécessaires aux techniques de contraste ou à l'éclairage par réflexion.

Le point clef réside dans le fait qu'une lame à faces parallèles, même oblique, n'introduit pas d'aberration pour et uniquement pour des objets à l'infini (voir les deux pages de compléments à la fin de ce grain).

Devant la multiplicité des configurations possibles, l'utilisateur doit donc faire très attention de bien utiliser des objectifs adaptés au statif qu'il emploie<sup>3</sup>. À cette fin, la longueur de tube à utiliser est normalement gravée sur la monture de l'objectif. Ce point sera détaillé au paragraphe suivant.

### d) Marquage des objectifs

Les objectifs, comme on vient de le voir, sont donc fort nombreux, même chez un unique constructeur. Pour que l'utilisateur puisse s'y retrouver, un certain nombre de renseignements sont systématiquement gravés sur la monture des objectifs. Il s'agit du grandissement de l'objectif<sup>4</sup>, de son ouverture numérique, du milieu d'immersion (s'il est différent de l'air), de l'épaisseur de lamelle et de la longueur de tube (en *mm*) pour lesquelles il est corrigé. Ces informations sont en général complétées par une référence, propre à chaque constructeur, qui identifie la "classe" de l'objectif (voir la sous-partie suivante " Classes d'objectifs de microscope ").

Ces informations ont le plus souvent l'une des deux dispositions suivantes, avec parfois quelques indications complémentaires, propres à chaque constructeur ou modèle d'objectif :

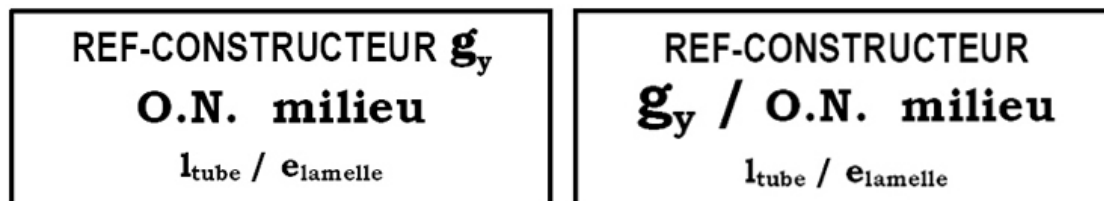


Figure 7

Voici quelques exemples extraits du catalogue d'objectifs de différents constructeurs:

|   |   |  |  |   |   |
|---|---|--|--|---|---|
| Achromat<br><b>63 / 0.80</b><br>160 / 0.17<br>ZEISS | NCSPlan40<br>0.70<br>160 / 0<br>OLYMPUS | N PLAN<br><b>20x/0.40</b><br>∞ / 0.17<br>LEICA | PlanFI<br><b>100x/0.95</b><br>∞ / 0.14 - 0.20<br>OLYMPUS | Plan<br><b>100x/1.25 Oil</b><br>∞ / 0.17 WD 0.15<br>NIKON | <b>M Plan Apo 20</b><br>0.42<br>∞ / 0 f = 200<br>MITUTOYO |
|---|---|--|--|---|---|

Figure 8

Les milieux d'immersion sont le plus souvent référencés en anglais. *Oil* caractérise l'huile d'immersion ( $n \approx 1,517$  à  $588nm$ ). Le mnémotechnique *ih* (pour *immersion homogène*) a la même signification sur les objectifs français très anciens. On peut également rencontrer *W* pour l'eau (Water) et *Gly* pour la glycérine.

On rappelle par ailleurs que l'indication ( $\times Z$ ) gravée sur la monture d'un oculaire est le **grossissement intrinsèque commercial** de celui-ci. Ce nombre est parfois suivi d'un second, appelé *indice de champ*, qui indique le diamètre en millimètre de la zone effectivement observée de l'image intermédiaire (de 18 en bas de gamme, cet indice peut atteindre 26 *mm* en très haut de gamme, avec une valeur usuelle aux alentours de 22. *Les objectifs doivent évidemment être en adéquation avec l'oculaire utilisé*). Par ailleurs, un symbole de lunettes ou la lettre *L* signifie que l'oculaire donne une pupille de sortie suffisamment éloignée du verre d'œil pour une observation confortable avec une paire de lunettes correctrices.

### Attention

**Ne pas oublier à contrario de mettre en service la bonnette si l'on ne porte pas de lunettes.**

### e) Classes d'objectifs de microscope

Idéalement, un objectif de microscope devrait donner une image limitée par la diffraction sur l'intégralité du champ observé. Une telle qualité, qui est évidemment accompagnée d'un coût très élevé, n'est cependant pas absolument nécessaire pour toutes les applications de microscopie. C'est pourquoi les constructeurs proposent trois ou quatre "classes" d'objectifs, de performances et de prix différents. Ces classes, avec quelques variantes d'un constructeur à l'autre, se répartissent ainsi :

| Classe   | Corrections                           | Principales aberrations   | Usages   | Prix (suivant Gy)   |
|--|---------------------------------------|---|--|---------------------|
| <b>Achromat</b>                                  | Achromatisation (simple repliement)   | Forte courbure de champ (net au centre et flou sur les bords ou vice-versa). Aberration chromatique de grandeur apparente. (Astigmatisme).  | Oculaire d'indice de champ ~18<br>TP scolaires - Amateurs                            | ~ 100 € à ~ 400 €   |
| <b>Apochromat</b>                                | Apochromatisation (double repliement) | (Aberration chromatique plus réduite que pour les Achromats).   | —  | (Obsolète)          |
| <b>Plan-Achromat (ou "Plan") (Voir figure 9)</b> | Achromatisation<br>Champ plan         | Objectifs de qualité, proches de la limite de diffraction sur une bonne partie (centrale) du champ. Certains constructeurs proposent deux niveaux de qualités dans cette classe (objectifs "semi-apochromatiques"). | Oculaire d'indice de champ 20 à $\geq 22$<br>Observations professionnelles courantes | ~ 250 € à ~ 2000 €  |
| <b>Plan-Apochromat (ou "Plan-Apo")</b>           | Apochromatisation<br>Champ plan       | Objectifs de la plus haute qualité, quasi-limités par la diffraction sur l'intégralité du champ.  | Oculaire d'indice de champ 22 à 26<br>Microphotographie                              | ~ 1000 € à ~ 4000 € |

Tableau des différentes classes d'objectif de microscope

Un exemple de combinaison optique d'un objectif  $\times 40$  de qualité moyenne (catégorie "Plan-Achromat") est donné figure 9.

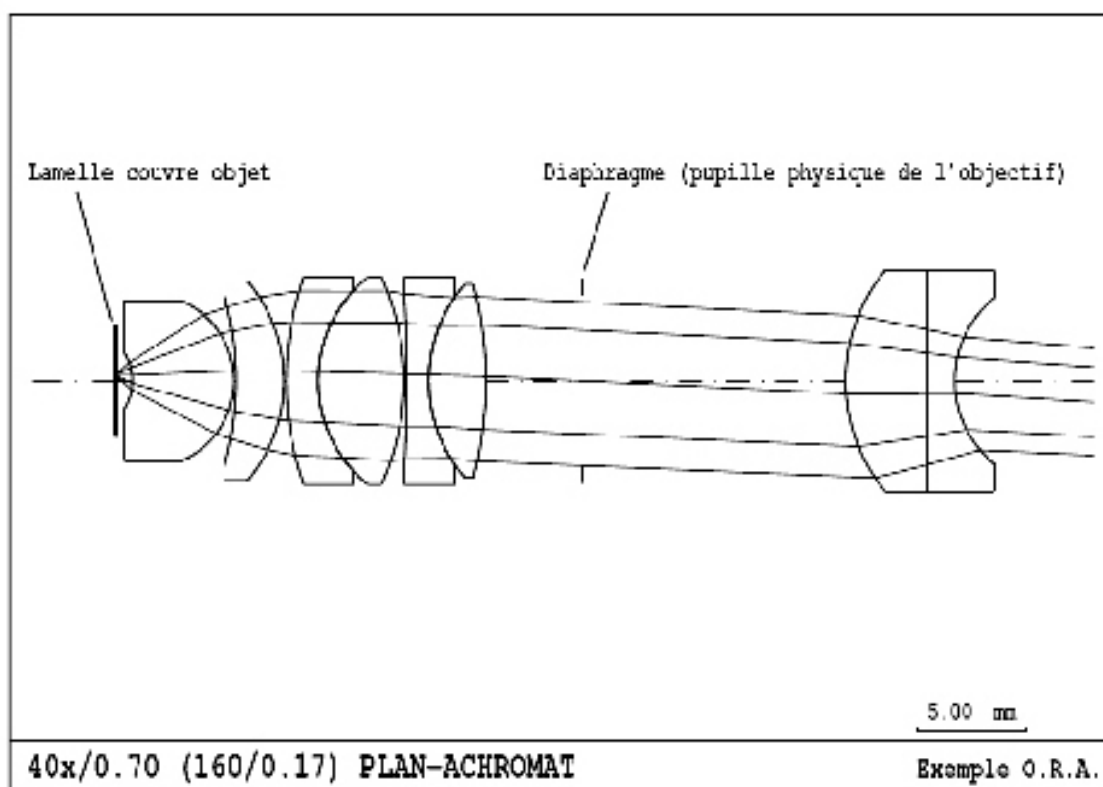


Figure 9: Exemple d'objectif de microscope de type Plan-Achromatique

### 3.2. Cohérence de l'éclairage et limite de résolution

Le phénomène de diffraction impose une limite physique de l'ordre de la longueur d'onde à la taille des objets que l'on peut résoudre avec un système optique comme un microscope. Pour déterminer quantitativement l'importance de la dégradation de l'image imposée par la diffraction, il est intéressant de passer dans l'espace des fréquences spatiales de l'objet observé et de raisonner sur la *fonction de transfert de modulation (FTM)* du système. (Voir le

cours de Formation des images dans le module d'Optique de Fourier, ou les références [ [Introduction à l'optique de Fourier et à l'holographie]], [ [Principles of Optics]] ). La théorie montre que la dégradation de l'image ne dépend pas seulement des propriétés de l'objectif (ouverture numérique, aberrations) mais dépend également de la *cohérence spatiale* de l'éclairage, propriété directement liée à l'ouverture numérique de ce dernier.

Lorsque le diaphragme d'ouverture est très fermé (source quasi-ponctuelle), l'objet est éclairé par une onde quasi-plane, et l'éclairage est dit spatialement cohérent. Le formalisme de Fourier s'applique alors sur les amplitudes complexes des ondes. Un système optique sans aberration (limité par la diffraction) est dans ce cas un filtre passe-bas des fréquences spatiales qui laissent passer sans altération les fréquences inférieures à  $NA_{obj}/\lambda$  où  $NA_{obj}$  représente **l'ouverture numérique objet** de l'objectif et coupe strictement les fréquences supérieures (cf. Fig. 10, courbe 1). Dans ces conditions les images sont bien contrastées mais les éléments de l'image sont entourés de franges liées au phénomène de Gibbs.

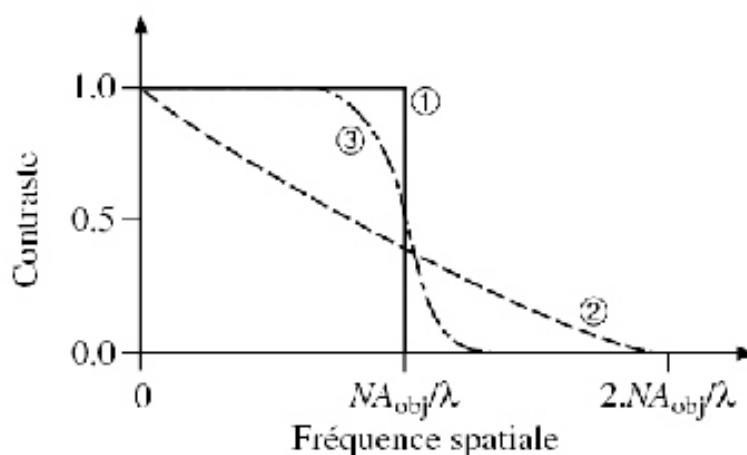


Figure 10: Courbes représentant le contraste de l'image d'une mire sinusoïdale en fonction de sa fréquence spatiale pour différente cohérence d'éclairage.

Inversement, si le diaphragme d'ouverture est très ouvert afin de rendre l'ouverture numérique de l'éclairage supérieure à celle de l'objectif, l'éclairage est dit totalement incohérent. Le formalisme de Fourier s'applique alors à la puissance surfacique de l'onde (module carré de l'amplitude complexe). Un système optique sans aberration est alors un filtre passe-bas dont la fonction de transfert décroît graduellement de 1 à 0 lorsque la fréquence spatiale croît de la valeur nulle à  $2XNA_{obj}/\lambda$  (cf. Fig. 10, courbe 2). La fréquence de coupure est donc deux fois supérieure à celle obtenue en éclairage cohérent. Cependant, le contraste d'un objet périodique est d'autant plus affaibli par le système optique que sa fréquence spatiale est élevée.

Dans les cas intermédiaires, l'éclairage est dit partiellement cohérent (Voir la référence [ [Principles of Optics]] ). Il n'est dans ce cas plus possible de définir en toute rigueur une fonction de transfert, le système ne relevant plus de la théorie des systèmes linéaires. On peut cependant avoir une bonne idée de l'effet du système optique sur l'image en déterminant le contraste d'une mire sinusoïdale en fonction de la fréquence spatiale (Cf. Fig. 10, courbe 3). On peut remarquer que le contraste reste à 1 pour toutes les fréquences inférieures à  $(NA_{obj} - NA_{Écl})/\lambda$  puis décroît graduellement pour atteindre 0 à la fréquence  $(NA_{obj} + NA_{Écl})/\lambda$  où  $NA_{Écl}$  est l'ouverture numérique de l'éclairage déterminée par le réglage du diaphragme d'ouverture du condenseur ; la référence [ [Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur]] expose une démonstration astucieuse de cette propriété. Les observations microscopiques se font presque toujours dans ces conditions d'éclairage. Elles donnent en effet une image qui contient des hautes fréquences spatiales et dont les éléments de basses et

moyennes fréquences spatiales sont très bien contrastés ce qui satisfait le sens subjectif de la vision de l'observateur. La valeur optimale de l'ouverture numérique de l'éclairage, à ajuster pour chaque objet (et observateur), est empiriquement de l'ordre des deux tiers de celle de l'objectif.

Pour vérifier l'influence de la cohérence de l'éclairage sur la formation des images, il est intéressant d'utiliser des préparations de *diatomées* tests. Les diatomées forment une famille très vaste et diverse d'animaux aquatiques microscopiques aux squelettes constitués de structures périodiques très fines dont les dimensions des motifs s'échelonnent de  $\sim 2 \mu\text{m}$  à  $\sim 0,25 \mu\text{m}$  suivant les espèces. Ces 'objets' sont donc particulièrement bien adaptés pour mettre en évidence de manière directe la limite de résolution des objectifs de microscope.

### 3.3. Autres propriétés et caractéristiques du microscope

#### a) Frontale - Parfocalité

Un microscope étant un viseur à frontale fixe, la distance objet/lentille frontale d'un objectif donné est donc fixée lorsque la mise au point est réalisée. Cette distance, la frontale  $\Rightarrow$ , ou 'Working Distance' pour les anglo-saxons, varie usuellement de quelques millimètres pour les objectifs de faible grandissement ( $\times 10$ ) à quelques dixièmes de millimètre pour les objectifs les plus forts ( $\times 100$  à immersion). Une grande frontale facilite le travail de l'utilisateur en limitant le risque de collision entre la préparation et l'objectif et permet également l'observation d'objets spéciaux entourés de reliefs, comme les circuits intégrés avec leurs plots de connexion. Il est cependant très difficile, bien que possible mais très coûteux, de concilier grande distance frontale et forte ouverture numérique. Ainsi, les constructeurs proposent donc en général à côté de la série d'objectifs standard, des objectifs spéciaux à longue frontale pour les utilisateurs intéressés par cette propriété<sup>1</sup>. Les objectifs standard récents de courte frontale possède en général une monture à ressort qui limite la gravité d'une collision objectif/préparation.

Par ailleurs, d'après la norme dimensionnelle imposant une distance précise (normalement 45 mm) entre le plan objet et l'appui de l'objectif (cf. Fig. 6 de la sous-partie « Longueur de tube et autres normes dimensionnelles du microscope » ), la mise au point doit normalement être conservée au changement d'objectif. Il faut cependant réaliser que la profondeur de champ d'un microscope est très faible, puisqu'elle est de l'ordre de  $\lambda / (NA_{obj})^2$  où  $NA_{obj}$  est l'ouverture numérique objet de l'objectif (incertitude axiale de pointé – cf. cours d'optique de base). Cela conduit donc à des tolérances exceptionnellement faibles sur les montures mécaniques des objectifs et de la tourelle porte-objectifs. La qualité effective avec laquelle la mise au point est conservée au changement d'objectif porte le nom de parfocalité.

#### b) Microphotographie et vidéo

Le microscopiste a souvent besoin de conserver une trace des observations qu'il est en train d'effectuer. La microphotographie est un moyen de choix pour effectuer cet archivage. Elle consiste à envoyer sur un film, ou maintenant beaucoup plus souvent un capteur (CCD ou CMOS) de caméra ou photoscope, une **image réelle** de l'objet observée par l'utilisateur au travers du microscope. Pour des questions pratiques (et éventuellement de qualité d'image, *champ insuffisamment plan*), il n'est pas prévu sur les microscopes actuels de mettre le capteur dans le plan de l'image intermédiaire ; il est par ailleurs déconseillé de modifier la mise au point d'un oculaire pour observation visuelle afin qu'il donne une image réelle. La solution est d'utiliser à la place de l'oculaire standard un système optique, appelé *oculaire projectif*, qui a été spécialement conçu pour donner sur le capteur une image ayant les qualités requises (Voir la référence [ [Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur]] ). Il faut dans tous les cas faire attention à l'adéquation entre la résolution du capteur et la résolution de l'image pour obtenir des résultats optimaux (voir la troisième étude de cas). Pour faciliter le travail de prise de vues, il est possible d'équiper les microscopes d'une tête dite "trinoculaire" autorisant une

vision binoculaire par l'observateur et l'envoi simultané de l'image ou d'une partie de celle-ci sur l'appareil photographique ou d'enregistrement vidéo.

## 4. Compléments

### 4.1. Complément 1

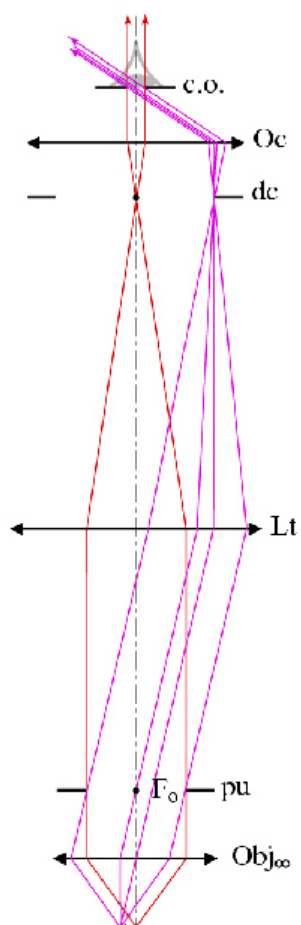


Figure 11: Principe du microscope avec objectif corrigé pour une longueur de tube infinie  
Comparer à la figure 2

## 4.2. Complément 2

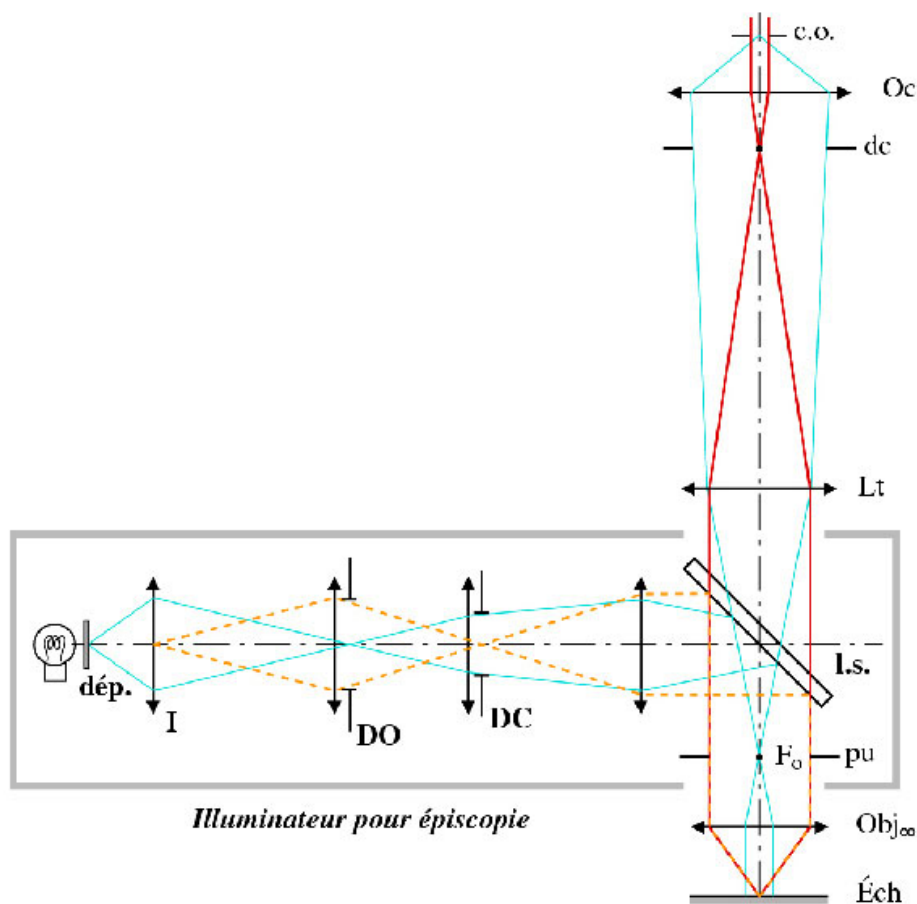


Figure 12: Principe de l'éclairage Köhler pour la microscopie en réflexion (épiscopie)  
Comparer à la figure 3

\* \*  
\*

Les principes de base et les spécificités clés de la constitution de l'instrument optique "microscope" et de son éclairage ont été vus en détail dans cette séquence de cours. Les trois études de cas qui suivent présentent des exemples pratiques et illustrés, basés sur des situations et du matériel réels typiques, afin d'explicitier et de rendre concrètes les notions et descriptions précédemment introduites.

La lecture des ouvrages [ [Optique]], [ [Optique géométrique et ondulatoire]] et [ [Optique instrumentale Optique de Fourier]] peut apporter des éléments complémentaires très utiles en optique général. Celle de [ [La microscopie optique moderne]], [ [Initiation au microscope: bases pratiques et utilisation]] ou encore [ [Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur]] des

informations complémentaires dans le domaine de la microscopie ; l'article de [ [La microscopie confocale]] est une ouverture intéressante vers la microscopie confocale, non abordée dans ce module. Les sites Web <http://www.molecularexpressions.com/><sup>4</sup>, <http://www.microscopyu.com/><sup>5</sup> ou encore, <http://www.olympusmicro.com/><sup>6</sup>(tous trois en langue anglaise) présentent également des éléments de microscopie de manière très imagée et pédagogique.

Le grain suivant (n°2) du module de *microscopie optique* aborde, en s'appuyant largement sur les éléments présentés dans ce présent grain (n°1), les techniques complémentaires couramment mises en œuvre pour améliorer le contraste des objets à observer, comme le contraste de phase ou le contraste interférentiel différentiel, très important, par exemple en biologie pour permettre de voir des détails des systèmes biologiques vivants étudiés sans les perturber par l'adjonction de colorants toxiques ou dans certains domaines techniques pour mettre en évidence le microrelief d'objet opaque totalement invisible en microscopie ordinaire...

4 - <http://www.molecularexpressions.com/>

5 - <http://www.microscopyu.com/>

6 - <http://www.olympusmicro.com/>

# III. Etude de cas

## 1. Mise en œuvre d'un microscope en transmission

### 1.1. Réglages du microscope pour une observation visuelle

#### a) Introduction

On se propose d'étudier plus précisément ici l'usage et la caractérisation pratique d'un microscope 'biologique' **simple** disposant d'un éclairage Köhler en transmission intégré dans son statif (cf. Fig.13).

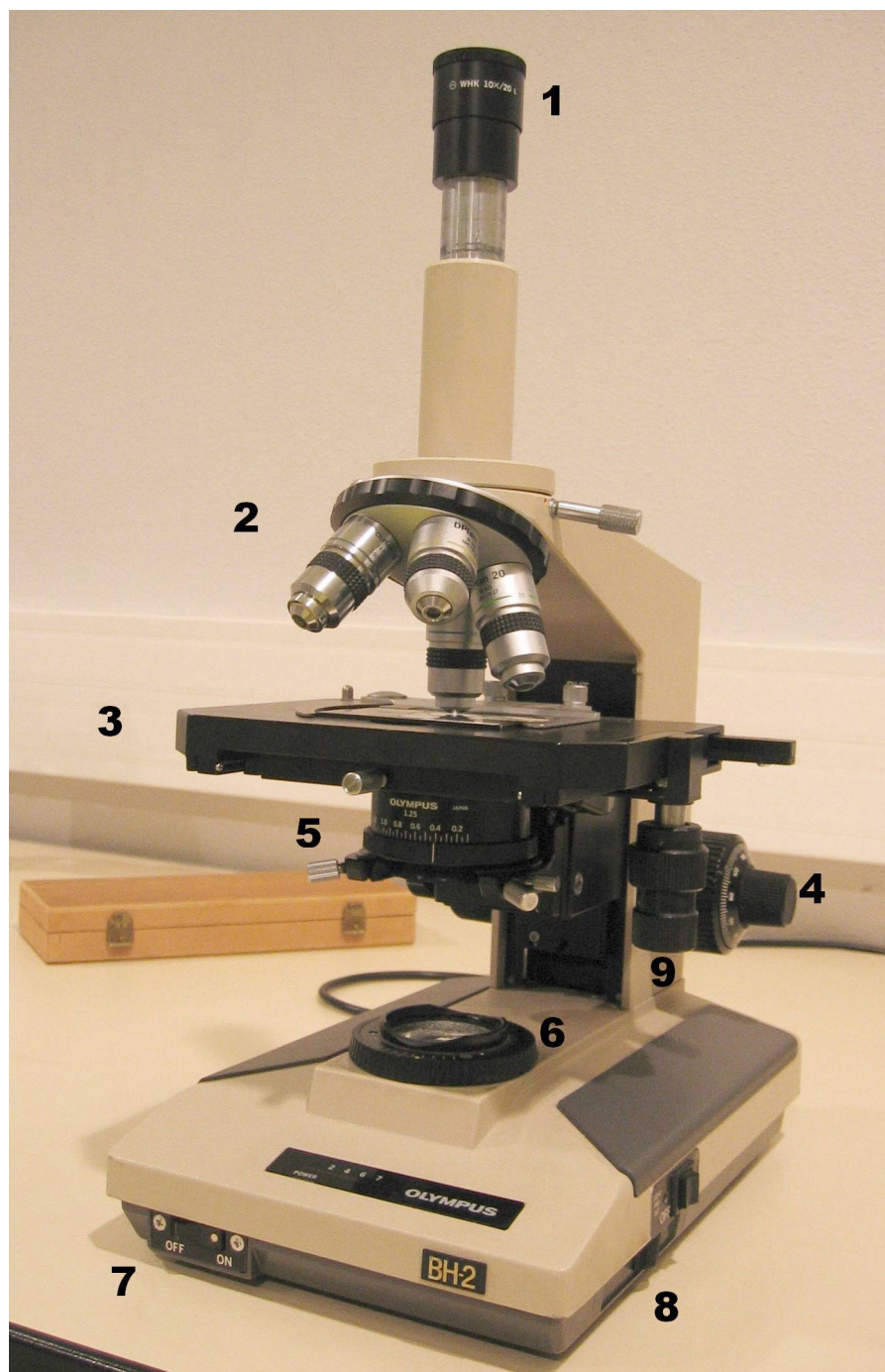


Figure 13 : Microscope biologique simple

Il s'agit d'un microscope à longueur de tube de  $160\text{mm}$  équipé d'une sortie monoculaire. Le tube porte oculaire est équipé d'un oculaire micrométrique  $10\times/20L$ , de grossissement intrinsèque commercial 10 et d'indice de champ 20 d'usage confortable pour un porteur de lunette.

### b) Mise en route

On met en marche l'éclairage intégré en fermant l'interrupteur approprié du statif (7) puis on règle dans un premier temps la puissance de l'éclairage à une valeur faible à l'aide de la commande du variateur (8). On abaisse ensuite le plateau porte échantillon à l'aide des grosses molettes latérales de mise au point (4) et on place la préparation transparente avec lamelle couvre objet à observer (ce sera une coupe de lombric colorée ici) sur le plateau porte

échantillon. On ouvre complètement le diaphragme de champ avec la bague (8) sur le pied du statif et le diaphragme d'ouverture avec la bague (5) sur le bloc condenseur en dessous du plateau porte échantillon. Par rotation de la tourelle porte objectif (2) (voir aussi Fig. 14), on place dans l'axe du tube un objectif de faible grandissement, par exemple un  $\times 10$ , prévu pour travailler avec lamelle couvre objet (marquage 160/0,17) ; normalement les objectifs passent largement au-dessus de la préparation lorsque le plateau porte échantillon est en position basse.

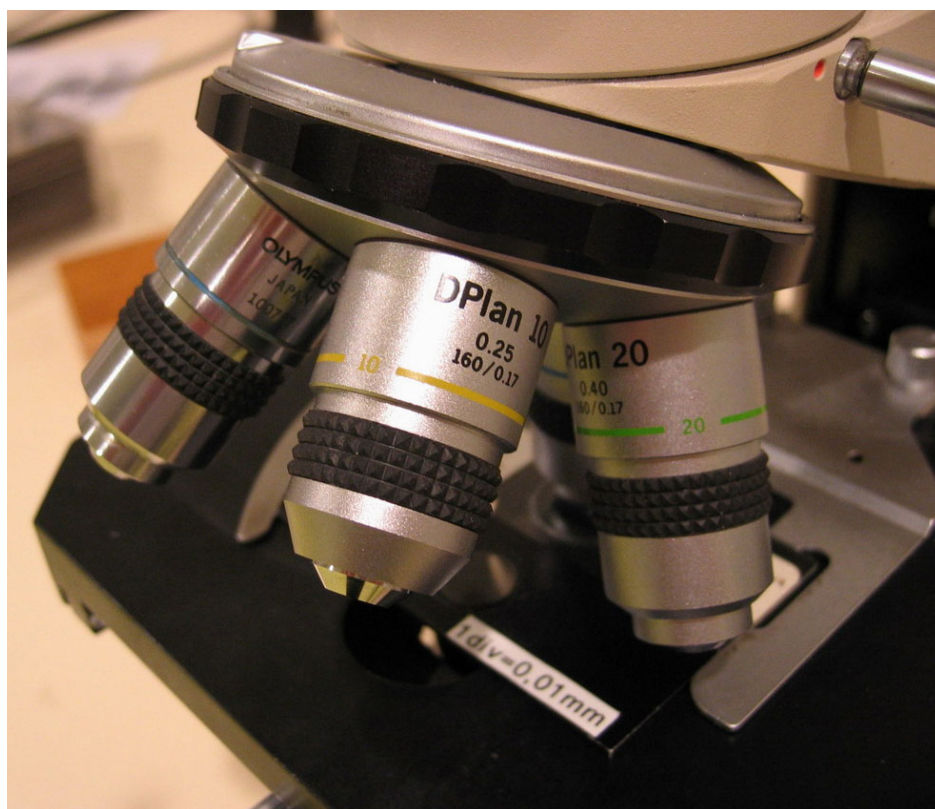


Figure 14 : Tourelle avec jeux d'objectif

On centre ensuite sommairement l'échantillon sous l'objectif avec les manettes de déplacement horizontal du plateau (9), puis, **en faisant bien attention d'éviter toute collision entre la préparation et l'objectif du microscope** [qui pourrait endommager la préparation et l'objectif !], on remonte doucement le porte échantillon avec la molette de mise au point (4) pour amener la préparation à quelques dixièmes de millimètre de la lentille frontale de l'objectif. On porte ensuite l'œil à l'oculaire<sup>1</sup> et **en éloignant doucement** la préparation de l'objectif avec la molette de mise au point, on cherche à voir nets quelques éléments de l'échantillon à observer.

### Remarque

À ce stade, l'observation est usuellement de mauvaise qualité car l'éclairage Köhler n'est pas encore correctement réglé.

#### c) Réglage de l'éclairage Köhler

Une grande partie de l'éclairage Köhler intégré dans le statif est préréglé, mais cependant quelques réglages sont accessibles et doivent être retouchés pour chaque observation (cf. Fig. 15).

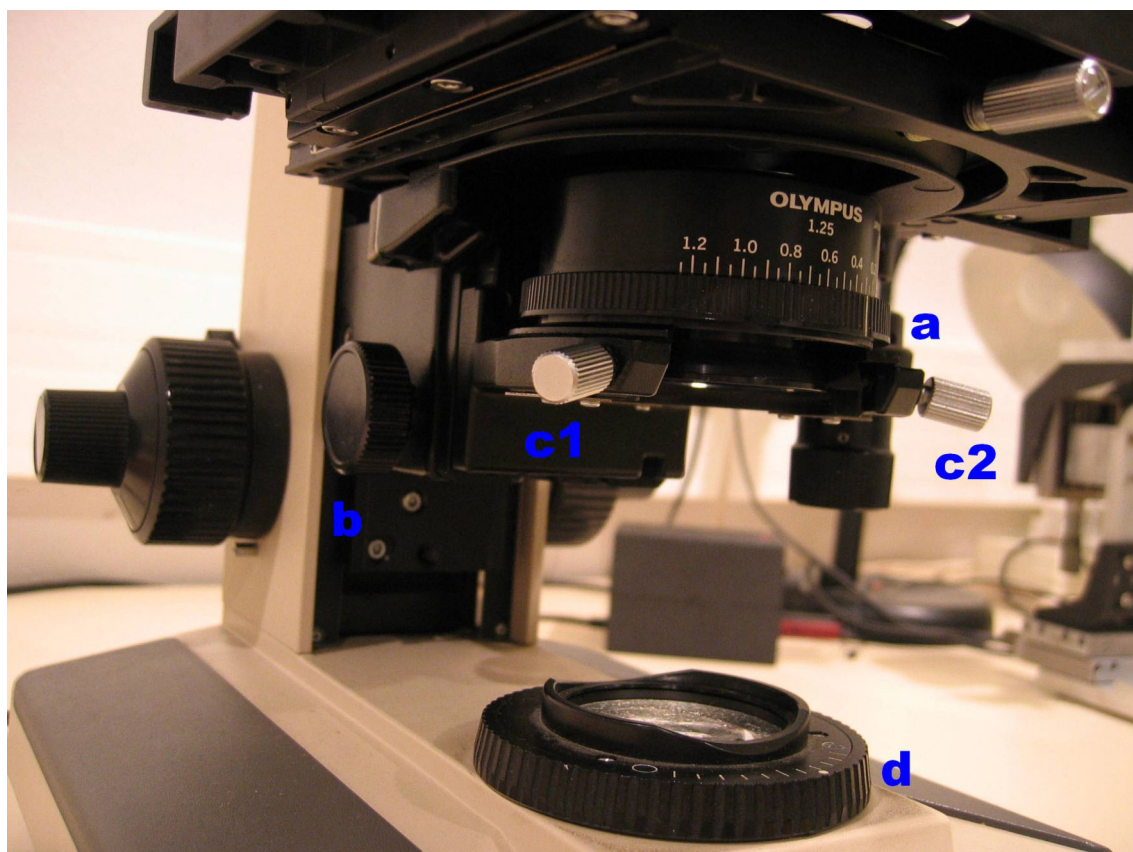


Figure 15 : Vue de l'éclairage Köhler intégré

Pour régler l'éclairage Köhler, il faut tout d'abord fermer presque complètement le diaphragme de champ avec la bague (**d**) sur le pied du statif puis déplacer axialement le condenseur sous la platine porte échantillon avec la molette (**b**) afin de voir nette l'image du diaphragme de champ simultanément avec la préparation, qui n'est alors éclairée que sur une faible surface de forme polygonale (Voir Fig. 16a). On peut, si c'est nécessaire, centrer le diaphragme de champ dans le champ du microscope à l'aide des deux vis à 120° (**c1-2**) permettant le centrage du condenseur sur l'axe du microscope.

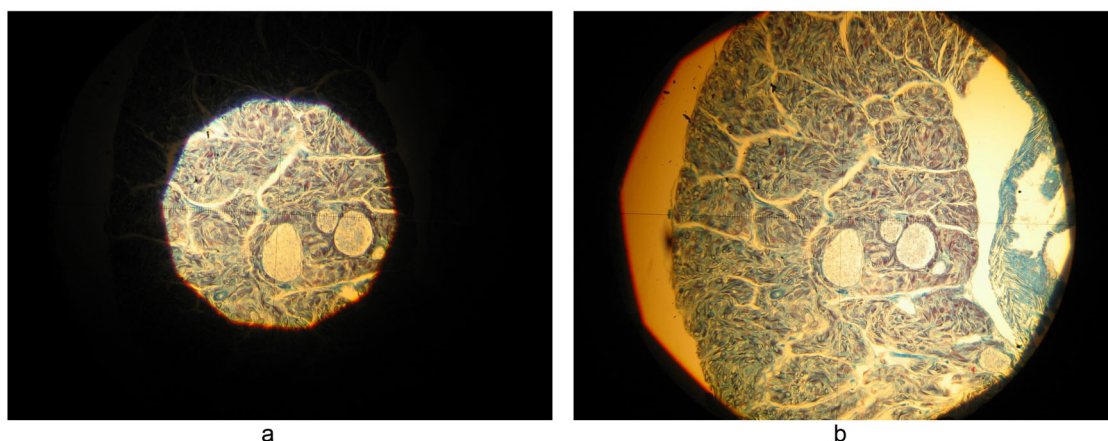


Figure 16 : Vue dans le microscope pour deux réglages différents du diaphragme de champ

#### d) Finalisation des réglages

Pour terminer les réglages, il suffit alors d'ouvrir le diaphragme de champ pour éclairer **juste** le champ d'observation du microscope (voire la seule zone d'intérêt de la préparation si elle est plus petite) (Cf. Fig. 16b) et parfaire la mise au point sur la préparation. On peut alors jouer

sur la cohérence de l'éclairage via le diaphragme d'ouverture du condenseur (**a**) pour optimiser le contraste des objets d'intérêt de la préparation et ajuster la puissance de l'éclairage via le variateur électronique (**8**) pour se placer dans des conditions confortables d'observation.

## 1.2. Détermination de quelques caractéristiques d'un microscope

### a) Introduction

Il est possible de déterminer ou vérifier simplement quelques caractéristiques optiques d'une configuration objectif et oculaire donnée d'un microscope. Pour cela, il faut tout d'abord régler le microscope (comme indiqué précédemment par exemple) sur une préparation particulière appelée "**micromètre objectif**" qui est constituée d'une graduation calibrée, usuellement au  $1/100^{\text{ème}}$  de millimètre, gravée sur une lame de verre transparente et recouverte d'une lamelle de verre d'épaisseur  $0,17 \text{ mm}$  standard.

### b) Mesure de la puissance totale du microscope

Après réglage du microscope, on observe donc à l'œil derrière l'oculaire la graduation du micromètre fortement grossie. En regardant cette même image située à l'infini au travers d'une lunette à oculaire micrométrique préalablement calibrée angulairement sur un collimateur grand champ étalonné, il est possible de déterminer la taille angulaire  $\Delta\theta$  de l'image de  $N$  intervalles du micromètre objectif (voir Fig.17 et Fig.18). Si l'écart entre deux graduations successives du micromètre objectif vaut  $\Delta x$ , on en déduit immédiatement que la puissance totale du microscope vaut :

$$P_{micro} = \frac{\Delta\theta}{N \cdot \Delta x}$$

$\Delta\theta$  et  $\Delta x$  étant respectivement exprimés en radian et en mètre, la puissance  $P_{micro}$  en dioptrie.

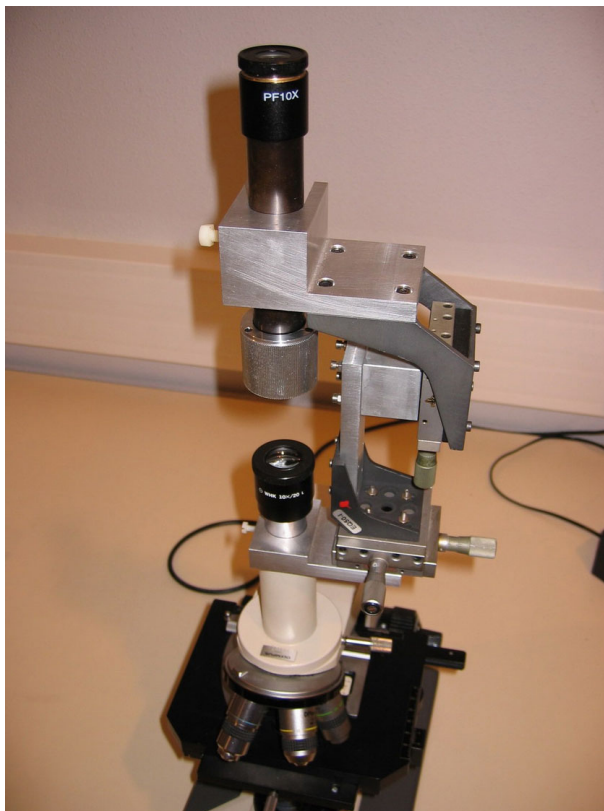


Figure 17 : Lunette afocale placée au dessus de l'oculaire du microscope pour la mesure de la puissance du microscope

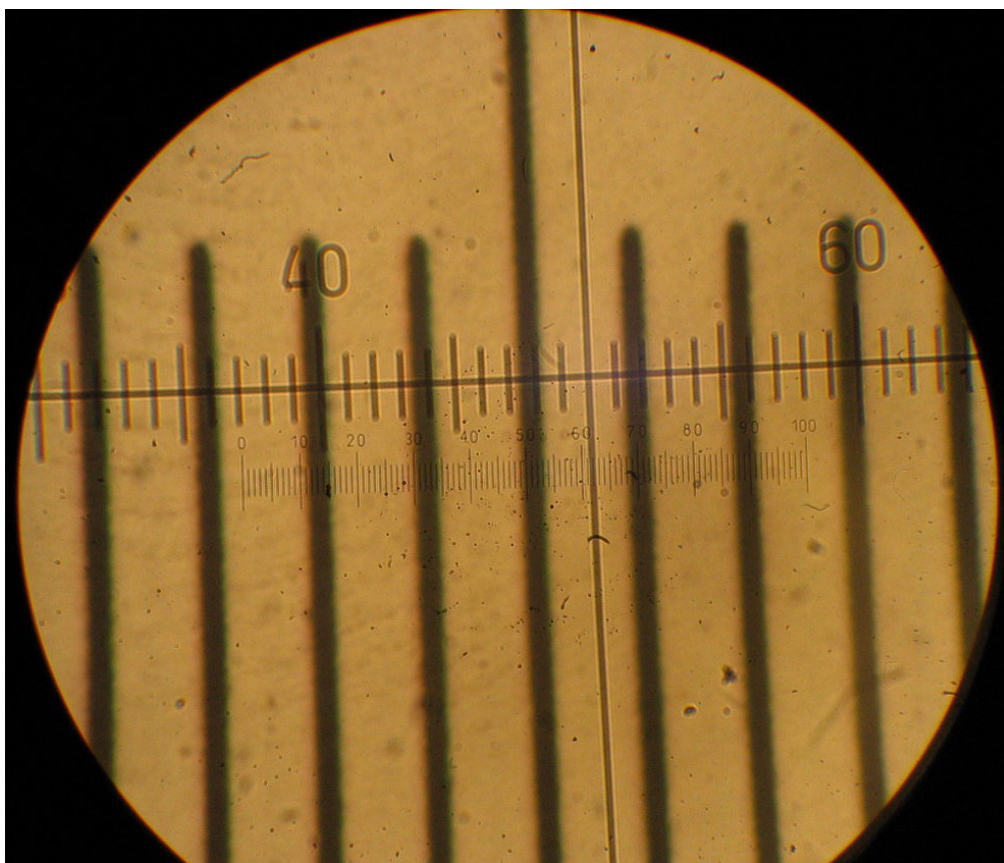


Figure 18 : Image vue derrière la lunette lors de la mesure de la puissance du microscope

Sur la figure 18, on peut lire que 4 intervalles de la graduation du micromètre (au  $1/100 \text{ mm}$ ), soit donc  $0,040 \text{ mm}$ , vont de la graduation  $11(\pm \sim \frac{1}{2})$  à la graduation  $87(\pm \sim \frac{1}{2})$  de la lunette (en prenant dans les deux cas le bord gauche des traits du micromètre), soit donc  $76 \pm \sim 1$  intervalles angulaires élémentaires de la lunette. La calibration préalable de la lunette sur un collimateur étalonné ayant donnée qu'un intervalle du micromètre de la lunette représentait  $0,0482 \pm 1\%$ , en en déduit que  $\Delta\theta = 3,66 \pm \sim 2,3\%$  et la puissance totale du microscope vaut donc :

$$P_{\text{micro}} = \frac{3,66 \times \pi/180}{0,040 \times 10^{-3}} = 1598 \delta \pm \sim 2,3\% \approx 1600 \delta \pm 40 \delta$$

Par définition, le grossissement intrinsèque commercial du microscope est :

$$G_{c, \text{micro}} \stackrel{\text{def}}{=} \frac{P_{\text{micro}}}{(1/d_{\text{norm}})}$$

où  $d_{\text{norm}}$  représente la valeur **normalisée** de distance minimale de vision nette pour un observateur emmétrope standard, fixée à  $0,25 \text{ m}$ .

Des formules 2 et 3 on déduit que le grossissement intrinsèque commercial du microscope est de  $400 \pm 10$ . Ce résultat est en parfait accord avec la valeur  $G_{c, \text{micro}} = |g_{y, \text{obj}}| \cdot G_{c, \text{oc}}$  attendue pour un objectif  $40\times$  et un oculaire  $\times 10$ .

Il est ainsi possible de vérifier facilement, aux incertitudes de mesure près, les indications constructeur des optiques. Il est à noter que si l'oculaire est micrométrique, ce qui est le cas ici, on peut déterminer indépendamment le grandissement de l'objectif  $|g_{y, \text{obj}}|$  par comparaison directe de la graduation de l'image du micromètre objectif avec la graduation du micromètre de l'oculaire, au  $1/10^{\text{ème}}$  de  $\text{mm}$  ici, et la puissance de l'oculaire  $P_{\text{oc}}$  en mesurant avec la lunette auxiliaire calibrée l'écart angulaire  $\Delta\theta_{\text{oc}}$  de  $N_{\text{oc}}$  intervalles  $\Delta x_{\text{oc}}$  des graduations du micromètre

de l'oculaire,  $P_{oc} = \Delta\theta_{oc} / (N_{oc} \cdot \Delta x_{oc})$ . Les mesures et vérifications correspondantes à partir des informations de la figure 18 sont laissées en exercice au lecteur.

### c) Ouverture numérique de l'objectif et cercle oculaire

Le lien entre l'ouverture numérique objet  $NA_{obj}$  et le diamètre du cercle oculaire  $\phi_{c.o.}$  peut être vu sur le tracé du rayon d'ouverture pour le point objet sur l'axe de la figure 2 de la partie cours. Le schéma ci-dessous en reprend les éléments essentiels.

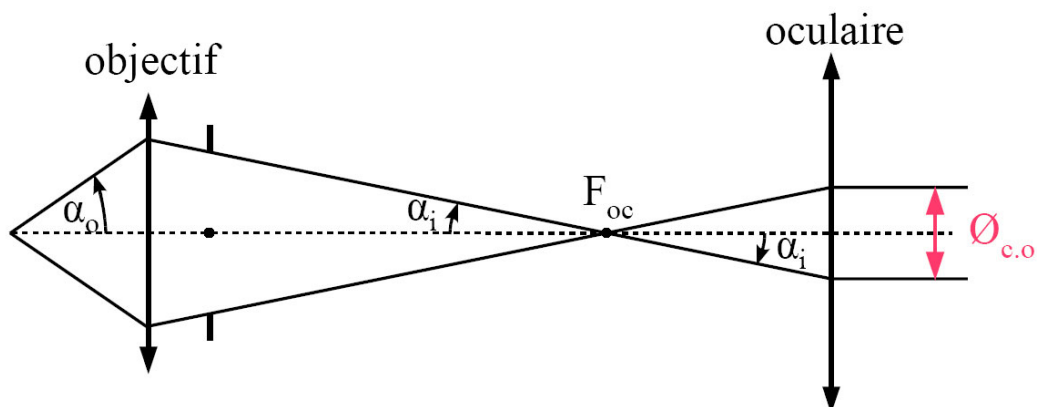


figure 19

L'objectif et l'oculaire étant supposés aplanétiques pour leurs conjugaisons respectives, il est possible d'appliquer la relation des sinus d'Abbe (cf. cours de base d'optique géométrique). Celle pour l'objectif indique que les ouvertures numériques objet et image de celui-ci (ayant l'air d'indice 1 pour les deux milieux objet et image),  $NA_{obj} = |\sin\alpha_o|$  et  $NA_{im} = |\sin\alpha_i|$ , sont reliées au grandissement de l'objectif,  $g_y$  par :

$$NA_{im} = \frac{NA_{obj}}{|g_{y,obj}|}$$

Par ailleurs, la relation des sinus d'Abbe pour la conjugaison **foyer/infini** (cf. cours de base d'optique géométrique ou la référence [ [Principles of Optics]]) de l'oculaire s'écrit, en remarquant que l'ouverture numérique objet pour l'oculaire est l'ouverture numérique image de l'objectif, par :

$$\frac{\phi_{c.o.}}{2} = f'_{oc} \cdot |\sin\alpha_i| = f'_{oc} \cdot NA_{im}$$

où  $f'_{oc}$  est la distance focale image de l'oculaire.

En utilisant alors la relation reliant par définition le grossissement intrinsèque commercial de l'oculaire à sa focale ( $G_{c,oc} \stackrel{def}{=} d_{norm}/f'_{oc}$ ), on obtient :

$$\phi_{c.o.} = NA_{obj} \cdot \frac{2 \cdot d_{norm}}{G_{c,oc} \cdot |g_y|}$$

On remarque que le diamètre du cercle oculaire est proportionnel à l'ouverture numérique objet du microscope et inversement proportionnel au grossissement intrinsèque commercial du microscope.

Le diamètre du cercle oculaire peut être mesuré à l'aide d'un viseur auxiliaire étalonné (cf. Fig.20 et Fig. 21a).

### Attention

**pour faire correctement la mesure du diamètre du cercle oculaire avec le viseur auxiliaire, il faut suffisamment ouvrir le diaphragme d'ouverture du condenseur de l'éclairage Köhler, car sinon c'est l'image de ce diaphragme (qui se forme dans le**

même plan que le cercle oculaire) que l'on voit et mesure avec le viseur (cf. Fig. 8b). (Revoir la figure 3 de la partie cours sur laquelle les différentes conjugaisons en jeux sont indiquées)

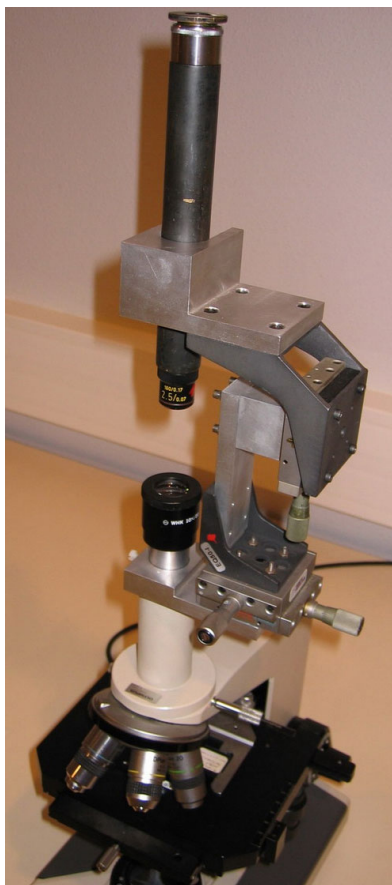


Figure 20 : Viseur à frontale fixe placée au dessus de l'oculaire du microscope

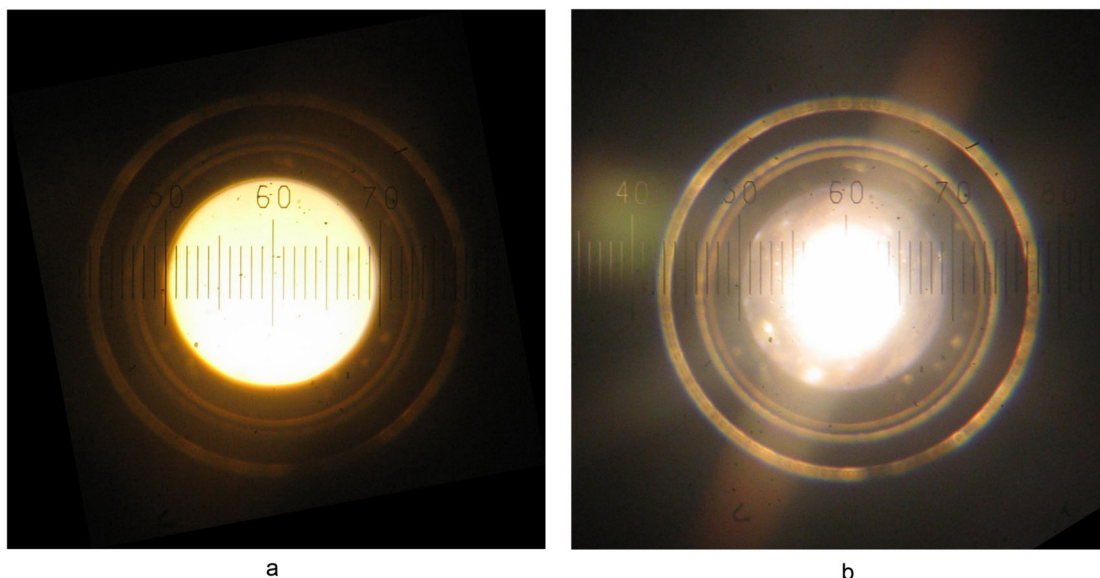


Figure 21 : Images vues derrière le viseur lors de la mesure du diamètre du cercle oculaire

Sur la figure 21a, on note que le diamètre du cercle oculaire représente  $19,5 \pm \sim 1$  intervalles des graduations du viseur. Un étalonnage préalable du viseur sur un micromètre a permis de déterminer qu'un intervalle de la graduation du viseur représentait  $42,9 \mu\text{m} \pm \sim 0,5\%$ . Par conséquent, le diamètre du cercle oculaire vaut donc :

$$\phi_{c.o.} = (19,5 \pm 5,1\%) \times (42,9 \pm 0,5\%) = 837 \mu\text{m} \pm 5,6\% \approx 0,84 \text{ mm} \pm \sim 0,05 \text{ mm}$$

En utilisant la formule 6, on peut remonter à l'ouverture numérique de l'objectif, le grossissement intrinsèque commercial du microscope  $G_{c, oc} \cdot |g_{y, obj}|$  valant  $400(\pm 10)$ , d'après la mesure du paragraphe précédent réalisée avec le même couple objectif/oculaire ; on obtient :

$$NA_{obj} = \frac{\phi_{c.o.} \cdot G_{c, oc} \cdot |g_{y, obj}|}{2 \cdot d_{norm}} \approx 0,67 \pm \sim 8\% \approx 0,67 \pm 0,05$$

avec  $d_{norm} = 250 \text{ mm}$ .

Cette valeur est tout à fait compatible avec l'indication  $0,65$  portée sur la monture de l'objectif  $40\times$  utilisé.

## 2. Utilisation d'un microscope métallographique

### 2.1. Présentation

La photographie de la figure 22 représente un microscope professionnel permettant l'observation par réflexion d'échantillons opaques grâce à son illuminateur Köhler épiscopique. Ce microscope haut de gamme, travaillant avec des objectifs *corrigés à l'infini*, possède par ailleurs une sortie dite "trinoculaire" permettant une observation binoculaire confortable et la microphotographie de qualité grâce à sa sortie dédiée utilisant un oculaire projectif.

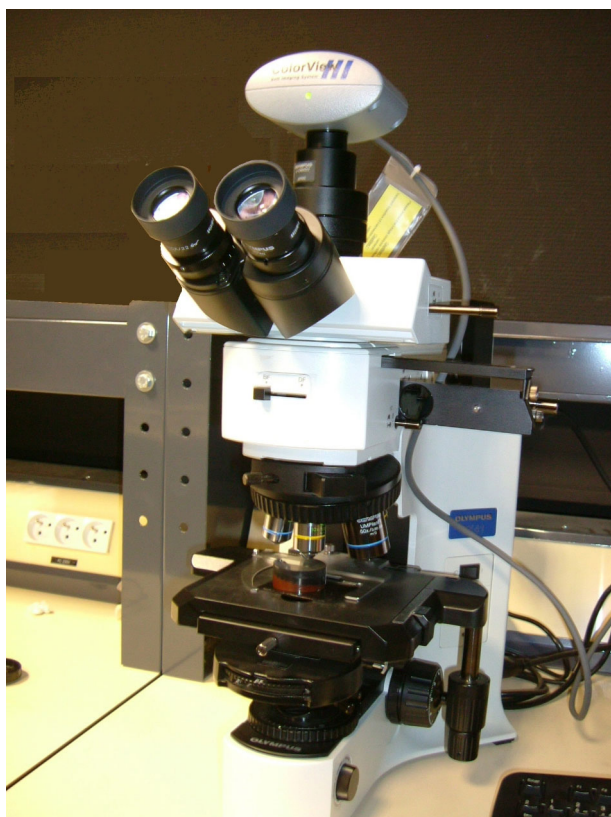


Figure 22: Microscope Olympus BX-41

La figure 23 présente les photographies de deux objectifs et d'un des oculaires de cet appareil:

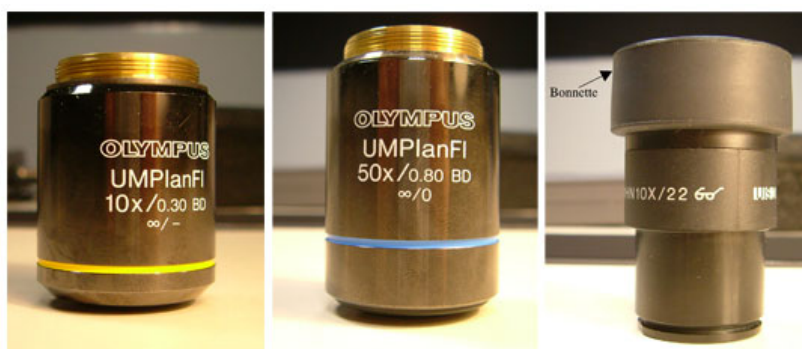


Figure 23: Objectifs et oculaire pour le microscope représenté figure 1

On notera la correction  $\infty/0$  de l'objectif  $50 \times / 0,80$ , indiquant son adéquation avec un statif avec lentille de tube et un usage sans lamelle couvre objet, classique en épiscopie. L'indication  $50 \times$  indique la valeur absolue du grandissement de l'ensemble objectif et lentille de tube. L'indication  $\infty/-$  pour l'objectif  $10 \times / 0,30$  indique qu'il est également corrigé pour une 'longueur de tube infinie'; toutefois, son ouverture numérique objet relativement faible de  $0,30$  permet de l'utiliser indifféremment pour observer des préparations avec ou sans lamelle couvre objet. Les deux objectifs, de modèle UM Plan FI, sont des objectifs de classe *Plan-Achromatique* prévu pour un usage métallographique universel (UM) ; l'indication FI indique qu'ils sont spécialement conçus pour pouvoir être utilisés dans le proche ultraviolet grâce à des verres spéciaux (comme la fluorine) transparents dans ce domaine de longueur d'onde et à très faible fluorescence propre. L'oculaire  $10 \times / 22$  est lui un modèle de grossissement intrinsèque commercial de  $10$  prévu pour observer une image intermédiaire de diamètre  $22 \text{ mm}$ . Il est spécialement prévu pour pouvoir être utilisé confortablement par un porteur de lunette (en repliant la bonnette caoutchoutée), c'est à dire que le *tirage du cercle oculaire* ('eye relief' en anglais, la distance entre le dernier dioptré de l'oculaire et le plan du cercle oculaire) est de l'ordre de  $25 \text{ mm}$ .

## 2.2. Réglages

L'observation en épiscopie nécessite peu de réglage, la mise au point de l'éclairage Köhler étant pré-réglé en usine pour être confondu avec le plan de mise au point de l'objectif. Il suffit donc de mettre en marche le bloc d'éclairage, de régler l'oculaire micrométrique à sa vue, puis de faire la mise au point sur l'échantillon en faisant, comme toujours, attention d'éviter toute collision entre l'objectif et l'échantillon à observer (on part d'un échantillon à quelques dixièmes de millimètre de la lentille frontale de l'objectif puis on éloigne doucement la préparation avec la molette de mise au point). Il suffit ensuite de régler le diaphragme de champ de l'éclairage Köhler pour éclairer juste la zone vue ou la seule zone d'intérêt si celle-ci est plus petite, afin de limiter la lumière parasite et de parfaire la mise au point sur les objets à étudier.

On prendra soin aussi de régler le diaphragme d'ouverture, en effet si ce dernier est ouvert au maximum le contraste n'est pas optimum. Ainsi le contraste de la photographie 24 b) est bien meilleur que celui de la photographie a). Dans le cas c) le diaphragme d'ouverture a été trop fermé.

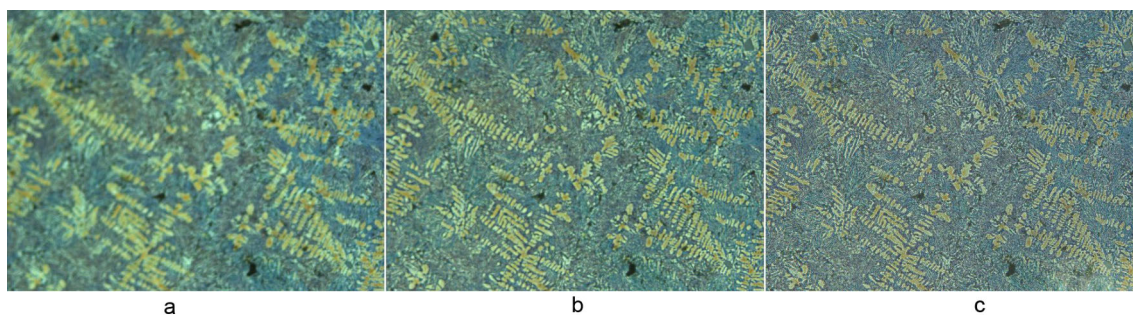


Figure 24 : Image d'un alliage d'aluminium et de silicium

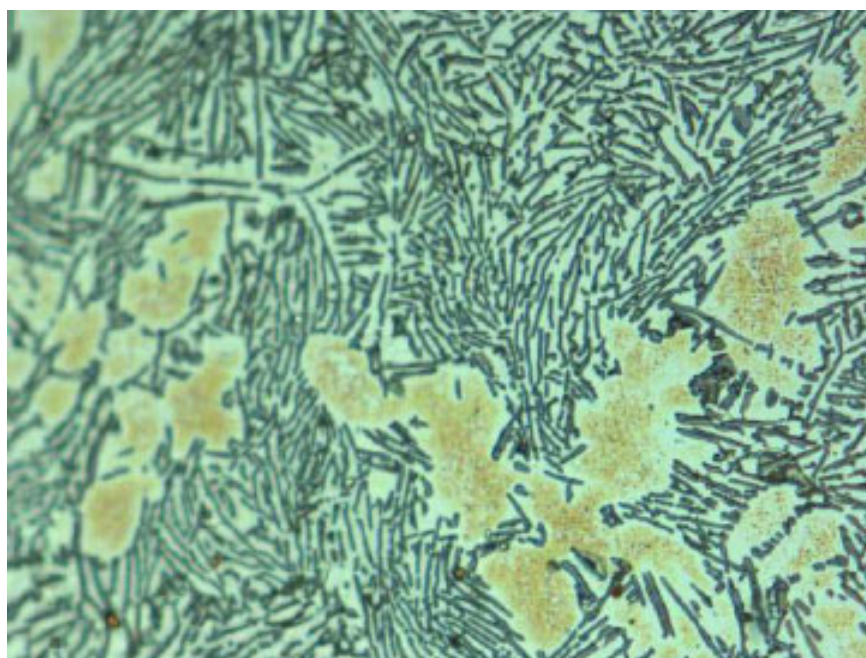


Figure 25 : Image du même alliage d'aluminium précédent

Sur la photographie 25 on remarque que lors de la phase de refroidissement primaire lente il y a eu formation de gros grains correspondant à une solution solide  $Al(Si)$  puis, la température continuant à diminuer le palier eutectique ( $577C$ ) a été atteint avec formation d'aiguilles de silicium.

Ce procédé d'analyse est utilisé pour l'observation de plans polis de matériaux dont les phases présentent des différences de réflexions. Les applications concernent principalement l'examen d'alliages de métaux, de structures corrodées et de mesure de dureté.

Pour mesurer la dureté Vickers, une empreinte est faite avec un indenteur sous une charge donnée pendant  $15 s$ . La force appliquée est comprise entre  $1$  et  $120 N$ . L'indenteur en diamant a une forme pyramidale à base carré dont les faces opposées font un angle de  $136$ .

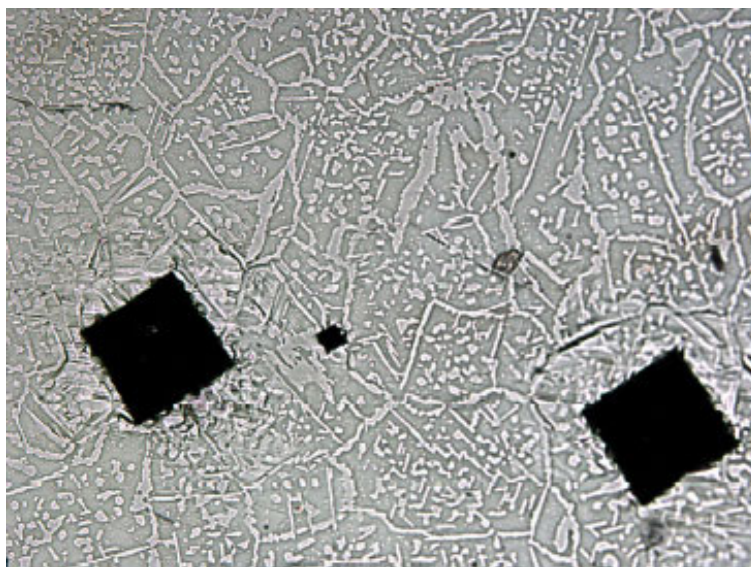


Figure 26 : Image d'un cordon de soudure carbonné sur lequel sont faites des mesures de dureté Vickers

Dans l'exemple présenté figure 26, une force de  $49\text{ N}$  est appliquée pendant  $15\text{ s}$ . La mesure des diagonales de l'empreinte permet de calculer la dureté Vickers du cordon de soudure. La valeur moyenne des mesures des diagonales donne  $185\text{ }\mu\text{m}$ , ce qui correspond à une dureté Vickers de :

$$HV_{49} = 0,1854 \frac{F}{d^2} = 265$$

La force  $F$  est exprimée en newton et la diagonale  $d$  de l'empreinte en millimètre. Dans le cas particulier traité la valeur obtenue correspond à un matériau mi-dur.

Avec un objectif de grandissement  $50$  et d'ouverture numérique  $0,80$ , la mise au point ne peut être faite simultanément à la surface de l'échantillon et au fond de l'empreinte (figure 27).

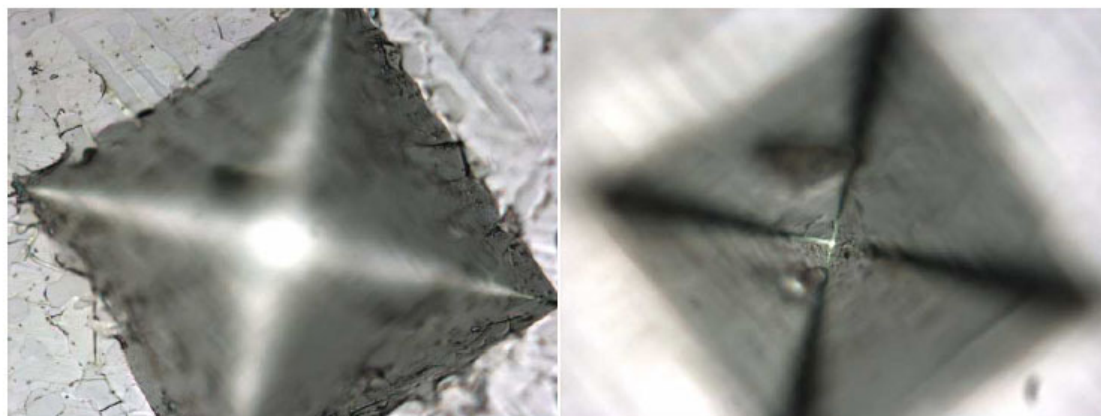


Figure 27 : La surface et le fond de l'empreinte ne peuvent être nets simultanément

Un microscope équipé d'un objectif  $\times 50$  et d'un oculaire de grossissement  $10$  a un grossissement intrinsèque, commercial de  $500$  ce qui correspond à une puissance de  $2000\delta$  d'où une distance focale de  $0,5\text{ mm}$  puisque :

$$f'_{micro} = \frac{1}{P_{micro}} = \frac{d_{norm}}{G_{norm}}$$

On rappelle que  $d_{norm}$  représente la distance minimale normalisée de visée distincte qui est égale à  $25\text{ cm}$  pour un œil emmétrope.

De la valeur de la distance focale du microscope, on en déduit une profondeur de champ de l'ordre de  $1 \mu\text{m}$  pour un œil emmétrope d'amplitude dioptrique  $a = 4\delta$  puisque :

$$|A_{\text{remotum}}A_{\text{proximum}}| = |ff'|a = \frac{a}{P_{\text{micro}}^2}$$

Un réglage fin de positionnement du plateau support permet de mesurer l'ordre de grandeur de la profondeur de l'empreinte, elle est d'une vingtaine de micromètres. On constate que cet ordre de grandeur correspond à la valeur calculée puisque la profondeur de pénétration est liée à la mesure de la diagonale  $d$  par la relation :

$$H = \frac{d}{7} = 1857 = 26, \mu\text{m}$$

$$H = \frac{d}{7} = \frac{185}{7} = 26 \mu\text{m}$$

### 2.3. Limite de résolution

Avec l'objectif  $50 \times / 0,80$  d'ouverture numérique objet  $0,80$ , la fréquence spatiale de coupure objet en éclairage cohérent pour une radiation verte de  $0,55 \mu\text{m}$  en milieu du spectre visible est  $0,80/(0,55 \mu\text{m}) \approx 1450 \text{ mm}^{-1}$ . Elle atteint le double soit  $2900 \text{ mm}^{-1}$  en éclairage totalement incohérent. Une mire sinusoïdale qui permettrait de tester directement ces limites devrait donc avoir des périodes de respectivement  $\sim 0,70 \mu\text{m}$  et  $\sim 0,35 \mu\text{m}$ , totalement irréalisables. En éclairage totalement incohérent, la limite de résolution au sens du critère de Rayleigh est, par définition, donnée par le rayon de la tache d'Airy dans l'image intermédiaire fournie par l'objectif et la lentille de tube (l'oculaire n'apportant pas de limitation supplémentaire) :

$$r' = \frac{1,22\lambda}{2NA_{im}}$$

où  $NA_{im}$  est l'ouverture numérique **image** du système objectif et lentille de tube. Pour ramener cette valeur dans l'espace objet, il suffit d'utiliser la relation des sinus d'Abbe appliquée à la conjugaison *objet/image intermédiaire* du système objectif plus lentille de tube, supposé aplanétique ; en appelant  $NA_{obj}$  l'ouverture numérique **objet** de ce système :

$$\frac{NA_{obj}}{NA_{im}} = |g_y|$$

on obtient dans l'espace objet :

$$r = \frac{1,22\lambda}{2NA_{obj}}$$

L'application numérique donne  $0,42 \mu\text{m}$  pour l'objectif  $50 \times / 0,80$  dans le visible, en accord avec l'indication de la documentation constructeur.

### 3. Microphotographie numérique

#### 3.1. Microphotographie numérique

On souhaite enregistrer numériquement, à l'aide d'un capteur CCD ou CMOS, les images obtenues avec un microscope, par exemple équipé d'un objectif  $10 \times / 0,25$  ou  $40 \times / 0,70$  pour oculaire d'indice de champ 22. Il faut former à distance finie sur le capteur une image réelle de l'objet observé. On peut pour cela, soit envisager d'utiliser directement l'image intermédiaire formée par l'objectif (et la lentille de tube le cas échéant), soit reprendre cette image avec une optique adaptée appelée **oculaire projectif**. La première solution étant rarement retenue sur les microscopes actuels pour diverses raisons pratiques (mauvaise accessibilité mécanique du plan image intermédiaire, souhait de disposer *simultanément* d'une observation visuelle standard et d'une acquisition numérique, éventuelles aberrations résiduelles de l'image intermédiaire, ...), on ne s'intéressera qu'aux caractéristiques requises pour l'oculaire projectif. Le problème est de trouver le bon compromis entre champ observé et résolution. En effet, l'image formée sur le capteur doit, en toute rigueur, respecter le théorème d'échantillonnage de Shannon pour être correctement enregistrée sans artéfact ('aliasing'), c'est à dire que la fréquence spatiale de coupure de l'image doit être inférieure à la fréquence de Nyquist du capteur, c'est à dire à la moitié de la fréquence d'échantillonnage de celui-ci. En notant  $g_{y, ocProj}$  le grandissement de l'oculaire projectif dans sa conjugaison *image intermédiaire* → *capteur*, on doit donc avoir :

$$\frac{2 \cdot NA_{obj}}{\lambda} \times \frac{1}{|g_y| \cdot |g_{y, ocProj}|} \leq F_{NyquistSensor} = \frac{F_{Sampl.Sensor}}{2}$$

Pour un capteur 'vidéo' classique, par exemple de format dit  $\frac{1}{2}$  pouce de  $6,4 \text{ mm} \times 4,8 \text{ mm}$  de  $752582 \text{ pixels}$  de pas  $\sim 9 \mu\text{m}$ , la fréquence spatiale d'échantillonnage du capteur est de  $\sim 110 \text{ mm}^{-1}$  et sa fréquence de Nyquist de  $\sim 55 \text{ mm}^{-1}$ . La fréquence de coupure de l'image intermédiaire,  $2 \cdot NA_{obj} / (\lambda \cdot |g_y|)$ , étant de  $\sim 90 \text{ mm}^{-1}$  pour l'objectif  $10 \times / 0,25$  et de  $65 \text{ mm}^{-1}$  pour l'objectif  $40 \times / 0,70$ , on voit donc que  $|g_{y, ocProj}|$  doit être voisin de (supérieur à)  $\sim 1,6$  dans le premier cas et de  $\sim 1,2$  dans le second cas. Dans le premier cas, pour que le capteur couvre le champ vu avec l'oculaire d'indice de champ 22, celui-ci devrait donc avoir une largeur de  $1,6 \times 22 \text{ mm} \simeq 35 \text{ mm}$ ! Ainsi, avec un tel capteur vidéo  $\frac{1}{2}$ " de largeur  $6,4 \text{ mm}$ , on ne doit prendre, respectivement, qu'environ le  $1/5$  ou le  $1/4$  en linéaire ( $1/25$  ou  $1/16$  en surface) de l'image observée visuellement si on ne veut pas sous-échantillonner l'image et bien bénéficier de la pleine résolution de l'objectif.

Pour un capteur d'appareil photo numérique de  $8 \text{ Mpixels}$  (e.g.  $2448 \times 3264$ ) d'environ  $\sim 10,8 \text{ mm} \times 8,1 \text{ mm}$  ( $\sim 13,5 \text{ mm}$  de diagonale) et de pas  $\sim 3,3 \mu\text{m}$ , la fréquence spatiale d'échantillonnage est de  $\sim 300 \text{ mm}^{-1}$  et la fréquence de Nyquist de  $\sim 150 \text{ mm}^{-1}$ . Le grandissement de l'oculaire projectif,  $|g_{y, ocProj}|$ , doit donc être de l'ordre de (ou supérieur à)  $\sim 0,61$  pour l'objectif  $10 \times / 0,25$  et de l'ordre de  $\sim 0,43$  pour l'objectif  $40 \times / 0,70$  pour respecter le théorème d'échantillonnage de Shannon. Le champ de diamètre  $22 \text{ mm}$  de l'image intermédiaire serait alors projeté sur, respectivement, des dimensions de  $13,4 \text{ mm}$  et  $9,5 \text{ mm}$ , dimensions inférieures à la diagonale du capteur. Dans un tel cas, le grandissement sera augmenté pour que l'image circulaire couvre juste le capteur rectangulaire, ce qui revient à adapter le champ de l'image intermédiaire à la diagonale du capteur ; la même valeur de  $13,5/22 \simeq 0,62$  pour le grandissement de l'oculaire projectif serait donc bien adaptée ici pour les deux objectifs considérés.

# IV. Exercices

## 1. Exercices

Un microscope est constitué d'un objectif que l'on assimile à une lentille mince de distance focale  $f' = 5,25 \text{ mm}$  et d'un oculaire de Huygens (3,2,1) de distance focale  $f'_{oc} = 16,5 \text{ mm}$ .

Les caractéristiques d'un tel oculaire sont résumées sur la figure 28.

- $\phi_1$  et  $\phi'_1$  sont les foyers objet et image du verre de champ  $L_1$ , de distance focale  $f'_1$ .
- $\phi_2$  et  $\phi'_2$  sont les foyers objet et image du verre d'œil  $L_2$ , de distance focale  $f'_2$ .
- $F_2$  et  $F'_2$  sont les foyers objet et image de l'oculaire.

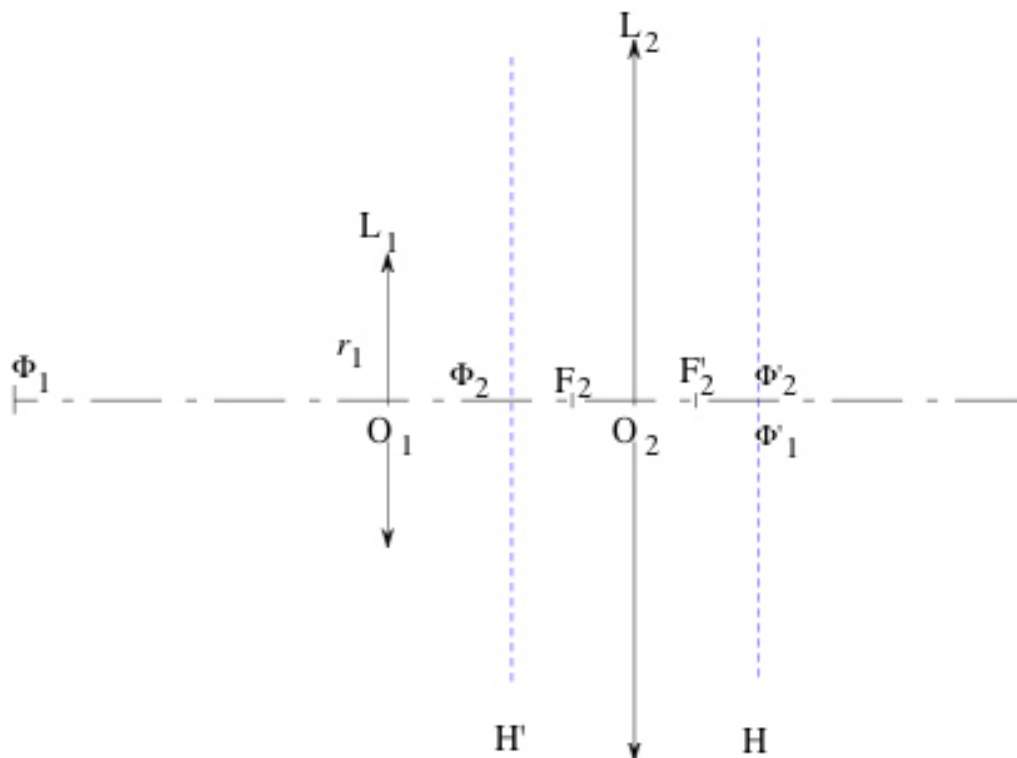


Figure 28 : Schéma de l'oculaire de Huygens

On rappelle que le 'symbole'  $(m, p, q)$  caractérise un oculaire à deux lentilles minces par  $\frac{f'_1}{m} = \frac{e}{p} = \frac{f'_2}{q} = \mathcal{E}$  où  $e$  est l'interstice du doublet  $\overline{O_1 O_2}$ . Pour un oculaire de Huygens (3,2,1),

on a les propriétés particulières :  $f'_{oc} = \frac{3}{2}\mathcal{E}$ ,  $\overline{O_1 O_2} = 2\mathcal{E} = \frac{4}{3}f'_{oc}$ ,  $\overline{O_1 F_2} = \frac{3}{2}\mathcal{E} = f'_{oc}$  et

$$\overline{O_2 F'_2} = \frac{\mathcal{E}}{2} = \frac{1}{3}f'_{oc},$$

avec ici  $\mathcal{E} = \frac{2}{3} \times 16,5 \text{ mm} = 11,0 \text{ mm}$ .

Le schéma de l'ensemble du microscope est représenté figure 29.

Le rayon de la lentille  $L_1$  de l'oculaire est  $r_1 = 6 \text{ mm}$  et le rayon  $r_2$  de la lentille  $L_2$  est tel qu'aucun rayon ayant traversé  $L_1$  n'est arrêté par  $L_2$ . L'image d'un point objet  $A$  donnée par

l'objectif est un point  $A'$  confondu avec le foyer objet  $F_2$  de l'oculaire. Dans l'air, l'objectif est aplanétique pour le couple de points  $(A, A')$  situé sur l'axe optique. L'ouverture numérique est limitée par le diaphragme circulaire  $D$  situé dans le plan focal image de l'objectif, elle est égale à  $0,65$ .

L'intervalle optique du microscope, c'est à dire la distance entre le foyer image de l'objectif  $F'_1$  et le foyer objet de l'oculaire  $F_2$  est  $\Delta = 210 \text{ mm}$ . Cette valeur de l'intervalle optique est utilisée dans certains microscopes métallographiques de longueur de tube  $230 \text{ mm}$ .

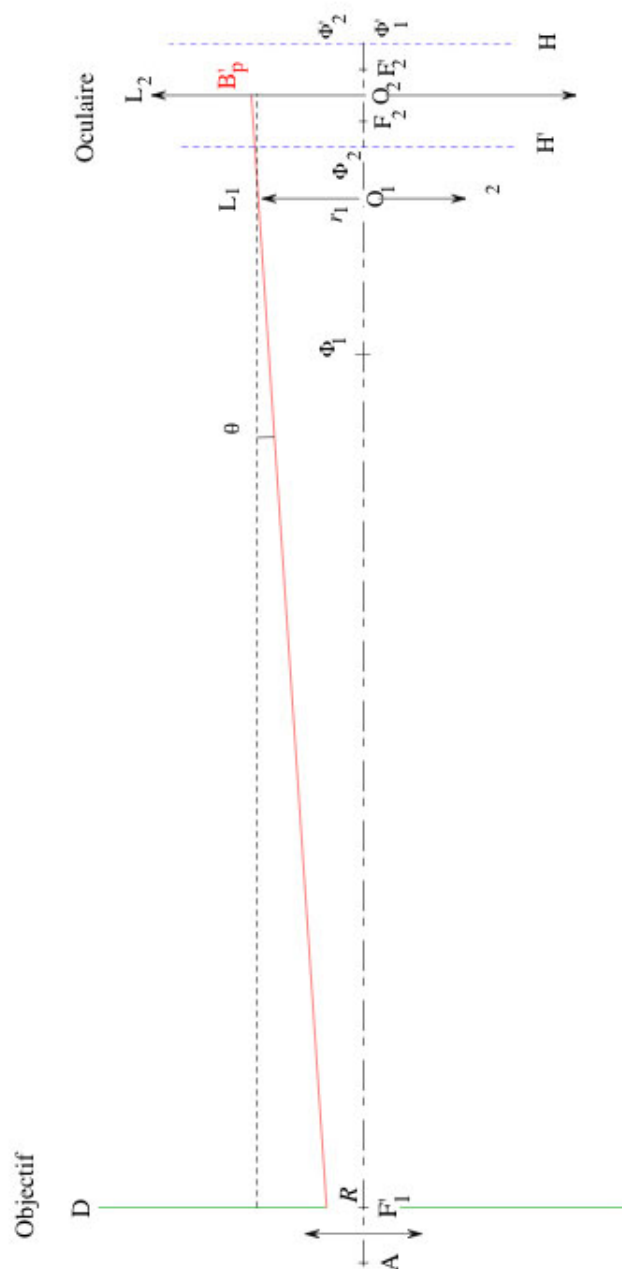


Figure 29 : Schéma du microscope

---

**Question 1**[\[Solution n°1 p 36\]](#)

Pourquoi se place-t-on dans le cas où l'image objective est située en  $F_2$  foyer objet de l'oculaire ?

---

**Question 2**[\[Solution n°2 p 36\]](#)

Que signifie « l'objectif est aplanétique pour le couple de points  $(A, A')$  » ?

---

**Question 3**[\[Solution n°3 p 36\]](#)

Déterminer le grandissement de l'objectif.

---

**Question 4**[\[Solution n°4 p 36\]](#)

Quelle est la valeur de la puissance intrinsèque du microscope complet ?

---

**Question 5**[\[Solution n°5 p 36\]](#)

Calculer le grossissement commercial du microscope, l'exprimer en fonction de la valeur absolue du grandissement de l'objectif  $g_{y, obj}$  et du grossissement intrinsèque commercial de l'oculaire  $G_{c, oc}$

---

**Question 6**[\[Solution n°6 p 37\]](#)

Déterminer le rayon  $R$  du diaphragme d'ouverture  $D$  ; en déduire la position et le rayon  $R'$  du cercle oculaire. Quel est le tirage du cercle oculaire ? Est-il suffisant pour une observation par un porteur de lunette ?

---

**Question 7**[\[Solution n°7 p 38\]](#)

Déterminer le champ de pleine lumière objet, le champ angulaire image correspondant, la position et le rayon du diaphragme à insérer pour supprimer le champ de contour.

---

**Question 8**[\[Solution n°8 p 39\]](#)

Évaluer la latitude de mise au point.

# Solution des exercices

## >Solution n°1 (exercice p. 35)

Pour ne pas fatiguer l'œil l'observateur règle la position de l'oculaire de telle façon que l'image donnée par l'ensemble du microscope soit à l'infini. L'image intermédiaire donnée par l'objectif est donc située au niveau du foyer objet de l'oculaire.

## >Solution n°2 (exercice p. 35)

Ceci signifie que les deux plans de front passant respectivement par les points  $A$  et  $A'$  sont conjugués, la condition des sinus d'Abbe est vérifiée pour ce couple de plans.

## >Solution n°3 (exercice p. 35)

Le système étudié est ici l'objectif, pour les plans conjugués passant par  $A$  et  $A'$  choisis pour origines, le grandissement transversal de ce système correspond au grandissement nominal de l'objectif  $g_{y, obj}$  :

$$\overline{A'F'_1} = g_{y, obj} f'_1$$

soit :

$$g_{y, obj} = \frac{\overline{A'F'_1}}{f'_1} = \frac{\overline{F_2F'_1}}{f'_1} = \frac{-\Delta}{f'_1} = \frac{-210}{5,25} = -40$$

Le signe "moins" signifie que l'image au niveau de  $A'$  est renversée.

## >Solution n°4 (exercice p. 35)

En appliquant les relations de définition de la puissance et de la puissance intrinsèque la puissance du microscope peut s'exprimer sous la forme :

$$P_{i, micro} = \frac{\Theta''}{AB} = \frac{1}{f'_{micro}}$$

où  $f'_{micro}$  représente la distance focale image du microscope c'est à dire de l'ensemble objectif-oculaire ;  $\theta''$  est l'angle sous lequel est vue l'image définitive et  $AB$  représente la dimension de l'objet. En faisant intervenir la dimension  $A'B'$  de l'image intermédiaire :

$$P_{i, micro} = \frac{\Theta''}{AB} \cdot \frac{A'B'}{A'B'} = P_{i, oc} \cdot g_{y, obj}$$

$P_{i, oc}$  représentant la puissance intrinsèque de l'oculaire. La puissance intrinsèque du microscope  $P_{i, micro}$  est égal au produit du grandissement de l'objectif par la puissance intrinsèque de l'oculaire.

En exprimant la puissance intrinsèque de l'oculaire en fonction de sa distance focale  $f'_2$  :

$$P_{i, micro} = g_{y, obj} \cdot \frac{1}{f'_2} = 40 \cdot \frac{1}{16,5 \cdot 10^{-3}} = 2424\delta$$

## >Solution n°5 (exercice p. 35)

Le grossissement commercial est donné par :

$$G_{c, micro} = P_{i, micro} \cdot d_{norm} = 2424 \times 0,25 = 606$$

ou encore :

$$G_{c, micro} = g_{y, obj} \cdot d_{norm} P_{i, oc} = g_{y, obj} \cdot G_{c, oc}$$

Le grossissement commercial  $G_{c, micro}$  du microscope est égal au produit du grandissement de l'objectif par le grossissement commercial de l'oculaire. Ces deux grandeurs sont indiquées respectivement sur l'objectif et l'oculaire utilisés.

### >Solution n°6 (exercice p. 35)

En appliquant la relation des sinus d'Abbe au couple de points  $A$  et  $A'$  :

$$n \cdot \overline{AB} \cdot \sin \alpha_m = n' \cdot \overline{A'B'} \cdot \sin \alpha_i$$

on obtient :

$$\sin \alpha_i = \frac{n}{n'} \frac{\overline{AB}}{\overline{A'B'}} \sin \alpha_m = -\frac{\sin \alpha_m}{g_{y, obj}}$$

puisque ici,  $n = n' = 1$ .

Sur la figure 30 on remarque :

$$\tan \alpha_i = \frac{-R}{F'_1 F_2} = \frac{-R}{\Delta}$$

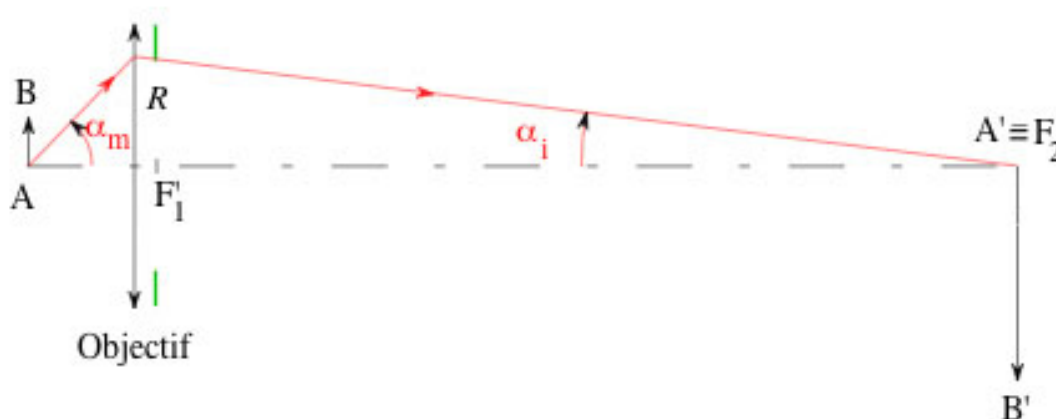


Figure 30 : Détermination de l'ouverture numérique du microscope

Dans un microscope la valeur de l'angle  $\alpha_m$  est grande puisque l'ouverture numérique d'un l'objectif de microscope est généralement la plus grande possible pour avoir une excellente résolution des détails de l'objet. Par contre l'angle  $\alpha_i$  est petit en valeur absolue d'après la formule 1 par suite de la division par la valeur absolue du grandissement de l'objectif (40 ici) ; par conséquent on peut faire l'approximation  $\tan \alpha_i \approx \sin \alpha_i$ , d'où :

$$\frac{R}{\Delta} \approx \frac{\sin \alpha_m}{g_{y, obj}} = \frac{NA_{obj}}{g_{y, obj}}$$

soit :

$$R = \frac{\Delta \cdot NA_{obj}}{g_{y, obj}} = \frac{210 \times 0,65}{40} \approx 3,4 \text{ mm}$$

Le cercle oculaire est l'image  $D'$  du diaphragme  $D$  donné par l'oculaire ; c'est la pupille de sortie de l'instrument. En appliquant la relation de Newton au couple  $(D, D')$  :

$$\overline{DF_2} \cdot \overline{D'F'_2} = ff' = -(f'_{oc})^2$$

On obtient donc, en notant que  $\overline{DF_2} = \Delta$  :

$$\overline{F'_2 D'} = \frac{(16,5)^2}{210} = +1,3 \text{ mm}$$

Le cercle oculaire et le foyer image de l'oculaire sont toujours très proches l'un de l'autre.

Puisque la pupille de l'œil doit être placée sur le cercle oculaire pour une observation optimale sans vignettage, il est intéressant de déterminer *le tirage du cercle oculaire*, c'est à dire la distance séparant le cercle oculaire de la lentille d'œil de l'oculaire. En utilisant la propriété de l'oculaire de Huygens (3,2,1) que  $\overline{O_2F'_2} = f'_{oc}/3$  on en déduit que le tirage du cercle oculaire :

$$\overline{O_2D'_2} = \overline{O_2F'_2} + \overline{F'_2D'} = \frac{16,5}{3} + 1,3 = 6,8 \text{ mm}$$

Cette valeur **très faible, est insuffisante** pour permettre une observation avec des verres correcteurs. C'est un des inconvénients de l'oculaire de Huygens qui est supplanté sur les microscopes de qualité actuels par des combinaisons plus complexes à 4 ou 5 lentilles ayant un tirage de cercle oculaire bien supérieur.

Le rayon du cercle oculaire est donné par la formule des grandissements associée au couple de points  $(D, D')$  :

$$g_{y,oc}(D,D') = -\frac{\overline{F'_2D'}}{f'_{oc}} \approx -\frac{1,3}{16,5} \approx -0,079$$

d'où un rayon du cercle oculaire de  $0,27 \text{ mm}$ . On peut noter que ce cercle oculaire est plus petit que la pupille de l'œil (diamètre  $\sim 2 \text{ mm}$  en observation de jour par forte lumière) ; par conséquent l'œil n'introduit pas de limitation supplémentaire, l'ouverture du système est bien fixé par l'ouverture numérique objet de l'objectif.

### >Solution n°7 (exercice p. 35)

L'espace intermédiaire du microscope avec le diaphragme  $D$ , l'image intermédiaire  $A'B'$  et le verre de champ de l'oculaire  $L_1$  est représenté sur la figure 31. Quand l'objet  $A$  est situé sur l'axe optique son image se forme en  $A'$ . Si l'objet s'écarte de l'axe, son image se déplace en direction de  $B'_t$ . Un rayon plus incliné par rapport à l'axe que celui en bleu est arrêté par le verre de champ de l'oculaire. La lentille  $L_1$  est donc diaphragme de champ puisque par hypothèse aucun rayon ayant traversé  $L_1$  n'est arrêté par  $L_2$ . Le diaphragme d'ouverture et l'unique lucarne de champ étant situés entre l'objectif et le verre de champ de l'oculaire, nous avons intérêt pour rechercher le champ de pleine lumière à nous placer dans cet espace intermédiaire.

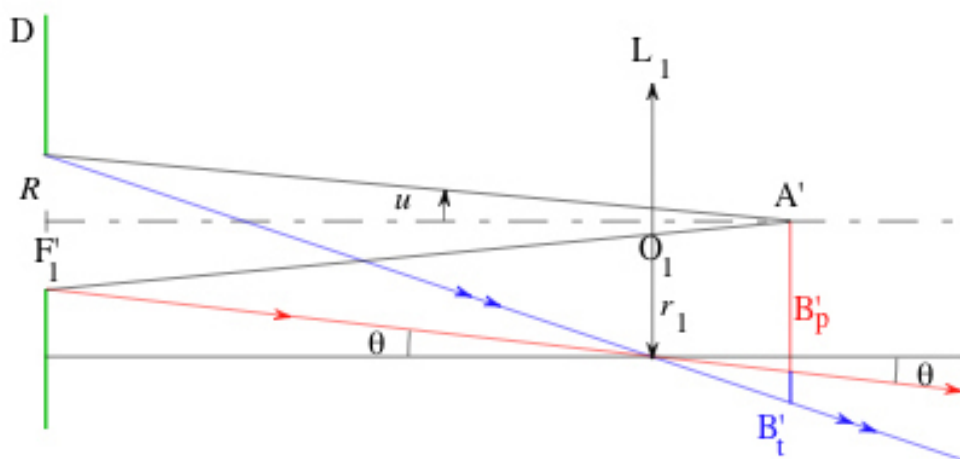


Figure 31 : Champ de pleine lumière et champ total déterminés dans l'espace intermédiaire

Sur la figure 31 les rayons en rouge et bleu correspondent respectivement, à la limite du champ de pleine lumière et du champ total. En appliquant les relations trigonométriques :

$$\tan \Theta = \frac{A'B'_p - r_1}{O_1A'} = \frac{r_1 - R}{F'_1O_1}$$

Soit, en se rappelant que  $\overline{F'_1F_2} \stackrel{def}{=} \overline{F'_1A'} \stackrel{def}{=} \Delta$  et que compte tenu des propriétés de l'oculaire de Huygens  $\overline{O_1A'} = \overline{O_1F_2} = f'_{oc}$  (figure 29) :

$$A'B'_p = \frac{r_1 - R}{F'_1O_1} \cdot O_1A' + r_1 = \frac{r_1 - R}{\Delta - f'_{oc}} \cdot + r_1 \approx \frac{6 - 3,4}{210 - 16,5} \cdot 16,5 + 6 \approx 6,22 \text{ mm}$$

Dans l'espace objet :

$$|AB_p| = \frac{A'B'_p}{g_{y,obj}} = \frac{6,22}{40} = 0,155 \text{ mm}$$

Le diamètre du champ de pleine lumière objet est donc égal au double de cette valeur, soit environ  $0,31 \text{ mm}$ . Pour déterminer le champ de pleine lumière image du microscope, on peut calculer le demi-angle de champ pour l'oculaire de  $A'B'_p$  par :

$$\Theta''_{1/2} = \arctan \left( \frac{A'B'_p}{f'_{oc}} \right) \approx 20,6^\circ$$

On en déduit que le champ de pleine lumière image  $\theta'$  vaut sensiblement  $41,2$ .

Pour supprimer le champ de contour, un diaphragme doit être positionné au niveau d'une image réelle ; il n'est donc pas possible de le situer dans le plan de l'image objective car celle-ci est une image virtuelle puisqu'elle est située derrière le verre de champ de l'oculaire. Il est placé au niveau de l'image de  $A'$  donnée par le verre de champ. La relation de conjugaison des lentilles minces appliquée au verre de champ  $L_1$  donne :

$$\frac{1}{\overline{O_1A''}} = \frac{1}{\overline{O_1A'}} + \frac{1}{\overline{O_1\Phi'_1}}$$

$A''$  étant l'image de  $A'$  donnée par  $L_1$  ; vu les propriétés de l'oculaire de Huygens rappelé en début d'énoncé et en se souvenant que  $A'$  est confondu avec  $F_2$ , on trouve une distance de  $+11 \text{ mm}$  pour  $\overline{O_1A''}$ .

Le grandissement transversal associé au couple de plans conjugués passant par  $A'$  et  $A''$  est égal à

$$g_{y, L_1 (A', A'')} = \frac{\overline{O_1A''}}{\overline{O_1A'}} \approx 0,67$$

Le diaphragme doit avoir un rayon  $r$  égal au rayon correspondant au champ de pleine lumière calculé dans l'espace intermédiaire situé entre le verre de champ et le verre d'œil de l'oculaire :

$$r = g_{y, L_1 (A', A'')} \cdot A'B'_p \approx 4,17 \text{ mm}$$

## > Solution n°8 (exercice p. 35)

La latitude de mise au point représente la distance dont on peut déplacer axialement l'objet sans altérer de façon notable l'image. Elle dépend de l'amplitude dioptrique  $a$  de l'observateur et de la distance focale du système considéré :

$$|\overline{A_{remotum}A_{proximum}}| = |ff'|a = \frac{a}{(P_{micro})^2} \approx 0,68 \mu\text{m}$$

pour "  $4\delta$  d'accommodation".

La latitude de mise au point diminue quand la puissance du microscope augmente.

# Glossaire

## **cercle oculaire**

Pupille de sortie du microscope, située à un ou deux centimètres derrière le dernier dioptre de l'oculaire et où on doit placer la pupille de l'œil.

## **Constringence**

La constringence (ou nombre d'Abbe) évalue la dispersion d'un matériau. Elle peut varier entre les valeurs 20 et 95, pour les matériaux usuels dans le visible. Plus elle est faible, plus le matériau est dispersif.

## **diascopie**

Microscopie d'objets transparents éclairés en transmission.

## **épiscopie**

Microscopie d'objets opaques éclairés en réflexion.

## **frontale**

(ou distance frontale) Distance séparant l'objet observé de la lentille frontale (de tête) de l'objectif. Elle est usuellement de quelques dixièmes de millimètre pour les objectifs courants de fort grandissement ('working distance' en anglais).

## **lamelle couvre-objet**

Fine lame de verre placée au dessus d'une préparation pour la protéger. Elle a une épaisseur normalisée de 0,170mm.

## **objectif**

Système optique convergent formant une image agrandie de l'objet à observer. Il a usuellement une grande ouverture numérique objet afin de permettre au microscope de résoudre des détails de taille voisine de la longueur d'onde.

## **oculaire**

Système optique convergent formant une image à l'infini observée par l'œil de l'image intermédiaire de l'objet formé par l'objectif.

## **Pouvoir de résolution**

Le pouvoir de résolution est la capacité qu'à un instrument d'optique à distinguer deux objets distincts très proche l'un de l'autre. Plus le pouvoir de résolution est élevé, plus la limite de résolution (la distance entre les deux objets) est faible.

## **tirage du cercle oculaire**

Distance entre le cercle oculaire et le dioptre de l'oculaire le plus proche de l'œil ('eye relief' en anglais).

# Bibliographie

[**Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke**] KÖHLER A., *Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke* (p.p.244++), Z. Wiss. Mikr, 1893--, n° 67H4, .

[**Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur**] ROBLIN G., *Encyclopédie des Techniques de l'Ingénieur*, -, -, 1999, *Microscopie optique* (p.tome R7 R6712 (+ R6710 + R6714)), .

[**Initiation au microscope: bases pratiques et utilisation**] WASTIAUX G., *Initiation au microscope: bases pratiques et utilisation*, Lavoisier, -, 2001.

[**Introduction à l'optique de Fourier et à l'holographie**] GOODMAN JOSEPH W., *Introduction à l'optique de Fourier et à l'holographie*, Traduction française de "Introduction to Fourier Optics", MASSON & Cie, Paris, 1972 (2006 3ème éd. anglaise).

[**La microscopie confocale**] LICHTMAN J., *La microscopie confocale*, POUR LA SCIENCE, 1994octobre-, n° n° 204.

[**La microscopie optique moderne**] WASTIAUX G., *La microscopie optique moderne*, Lavoisier, -, 1994.

[**Optique**] HEICHT EUGÈNE, *Optique*, Pearson, Paris X, 2005.

[**Optique géométrique et ondulatoire**] PÉREZ JOSÉ-PHILIPPE, *Optique géométrique et ondulatoire*, Masson, Paris, 1994.

[**Optique instrumentale Optique de Fourier**] SURREL JOËLLE, *Optique instrumentale Optique de Fourier*, Ellipses, Paris, 1996.

[**Principles of Optics**] BORN MAX, WOLF EMIL, *Principles of Optics*, 7th Ed., PERGAMON PRESS, Oxford - New York - Toronto - Sydney - Paris - Frankfurt, 1999.

# Webographie

[] <http://www.olympusmicro.com/> (consultation - - 2007).