



**TECHNIQUES**  
**DE L'INGÉNIEUR**

Réf. : **R6712 V1**

# Microscopie optique

Date de publication :  
**10 juin 1999**

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

par **Gérard ROBLIN**

**Pour toute question :**  
Service Relation clientèle  
Techniques de l'Ingénieur  
Immeuble Pleyad 1  
39, boulevard Ornano  
93288 Saint-Denis Cedex

**Par mail :**  
infos.clients@teching.com  
**Par téléphone :**  
00 33 (0)1 53 35 20 20

Document téléchargé le : **06/06/2025**

Pour le compte : **7200048087 - ecole normale superieure de lyon // 140.77.168.36**

© Techniques de l'Ingénieur | Tous droits réservés

Parution : juin 1999 - Ce document a été délivré pour le compte de 7200048087 - école normale supérieure de Lyon // 140.77.168.36

# Microscopie optique

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

<b>1. Optique géométrique du microscope.....</b>	<b>R 6 712 - 2</b>
1.1 Schéma du microscope simplifié .....	— 2
1.2 Caractéristiques du microscope : puissance et grossissement .....	— 3
1.3 Principales normes .....	— 4
<b>2. Objectif de microscope .....</b>	<b>— 5</b>
2.1 Caractéristiques de l'objectif.....	— 5
2.2 Classes d'objectifs .....	— 8
2.3 Contrôle de qualité des objectifs .....	— 13
<b>3. Oculaire de microscope.....</b>	<b>— 13</b>
3.1 Caractéristiques de l'oculaire.....	— 13
3.2 Types d'oculaire .....	— 13
<b>4. Association objectif-oculaire.....</b>	<b>— 15</b>
4.1 Grossissement optimal du microscope .....	— 15
4.2 Latitude de mise au point du microscope .....	— 15
4.3 La photographie en microscopie.....	— 16
<b>5. Éclairage du microscope.....</b>	<b>— 16</b>
5.1 Besoin et moyens .....	— 16
5.2 Éclairage fond clair .....	— 17
5.3 Éclairage fond noir et ultramicroscopie .....	— 18
<b>6. Microscopie des objets de phase .....</b>	<b>— 19</b>
6.1 Objet de phase .....	— 19
6.2 Contraste de phase.....	— 20
6.3 Interférométrie en microscopie .....	— 21
<b>7. Méthodes particulières de microscopie .....</b>	<b>— 23</b>
7.1 Microscope polarisant .....	— 23
7.2 Microscopie en fluorescence .....	— 24
7.3 Microscopie des métaux .....	— 25
7.4 Photométrie et spectrométrie en microscopie .....	— 25
<b>Pour en savoir plus .....</b>	<b>Doc. R 6 712</b>

**L**e microscope optique est essentiellement constitué de deux composants optiques : l'**objectif** et l'**oculaire** (figure **A**). Cet ensemble solidaire d'un **tube** est pointé sur l'objet ou **préparation** posé sur une table ou **platine** dotée d'organes permettant le positionnement de l'objet dans son plan, généralement par deux mouvements de translation et/ou un mouvement de rotation. La mise au point est assurée par deux dispositifs de translation parallèle à l'axe optique : les **mouvements rapide** et **lent** (il peut exister dans les instruments très sophistiqués en usage dans les laboratoires de recherche un mouvement ultra-lent et inversement certains microscopes d'enseignement peuvent n'être dotés que d'un seul mouvement d'amplitude et de vitesse intermédiaires aux valeurs habituelles). La liaison de ces divers éléments, ainsi que leur stabilité, sont assurées

par une monture mécanique, le **statif**, pour lequel on peut souvent distinguer un pied et une potence. L'éclairage de l'objet est assuré par un ensemble **condenseur** et **source**, celle-ci étant le plus souvent aujourd'hui également solidaire du statif (et logée dans son pied). Cet éclairage peut prendre différentes formes suivant le type d'observation que nécessite l'objet.

Mais un instrument ne serait pas complet sans un récepteur destiné à recueillir l'information, c'est-à-dire à saisir l'image qu'il fournit. Le microscope optique étant susceptible de fournir des images à l'aide de lumière visible ou proche infrarouge et ultraviolet (pour des longueurs d'onde comprises entre 0,22 et 1,7  $\mu\text{m}$ ), l'œil de l'observateur ne pourra pas toujours constituer le récepteur direct et il lui faudra faire appel à des intermédiaires tels l'émulsion photographique, l'écran fluorescent, le convertisseur d'image électronique, moyens justifiant la présence éventuelle de plusieurs « sorties image », permettant par ailleurs la conservation, la diffusion, l'observation collective de l'image.

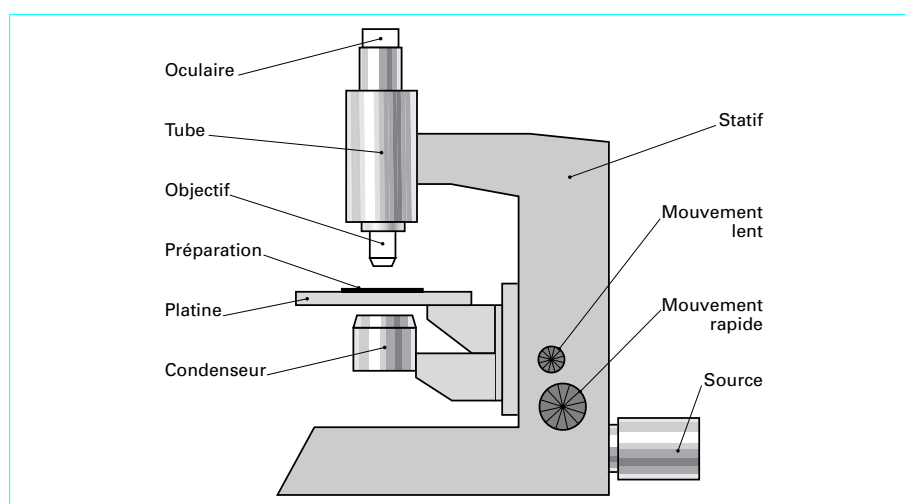


Figure A – Schéma descriptif d'un microscope

## 1. Optique géométrique du microscope

### 1.1 Schéma du microscope simplifié

Le microscope simplifié (figure 1) est constitué de l'objectif  $O_b$  et de l'oculaire  $O_c$ , assimilés à des lentilles minces convergentes, et des diaphragmes  $P'_o$  et  $D'_c$  respectivement pupille de sortie de l'objectif et diaphragme de champ de l'oculaire placés dans l'espace intermédiaire situé entre objectif et oculaire.

L'objectif donne de l'objet une image réelle agrandie examinée par l'oculaire jouant le rôle de loupe. Pour que cet agrandissement soit suffisamment appréciable, l'objet  $AB$  doit être placé très près en avant du foyer objet  $F_{ob}$  de l'objectif. Néanmoins pour limiter l'encombrement de l'instrument tant pour des raisons de stabilité que d'ergonomie (l'observateur doit placer l'œil derrière l'oculaire et pouvoir déplacer manuellement l'objet sur la platine), ce grandis-

sement nécessite que la distance focale de l'objectif soit la plus courte possible. L'objet très proche de son foyer objet est donc à une distance de la lentille voisine de sa distance focale et, dans le cas réel, très proche de la face avant de l'objectif. La distance de l'objet au premier dioptré de l'objectif ou **distance frontale** est très faible.

Dans le plan de l'image intermédiaire  $A'B'$ , image réelle renversée donnée par l'objectif, se trouve le diaphragme de champ  $D'_c$  (ou l'image d'un diaphragme réel situé dans un autre espace), diaphragme vu du centre de la pupille  $P'_o$  sous l'angle le plus faible. Il limite le **champ de pleine lumière** et a aussi pour effet de supprimer la lumière parasite engendrée par la lumière diffusée par la partie de l'objet située hors de ses limites. Cette image intermédiaire est toujours par construction (de conception fondamentale) dans le plan focal objet  $F_{oc}$  de l'oculaire. L'image définitive  $A''B''$  donnée par l'oculaire est donc à l'infini. Ainsi le **plan objet du microscope**  $F_m$  est son **plan focal objet**.

Tous les rayons issus de l'objectif contribuant au champ de pleine lumière limité par le diaphragme de champ passent par la pupille de l'objectif  $P'_o$ , diaphragme vu du centre du champ sous l'angle le plus faible, matérialisée par un diaphragme (ou une image de diaphragme) placé par construction dans le plan focal image de

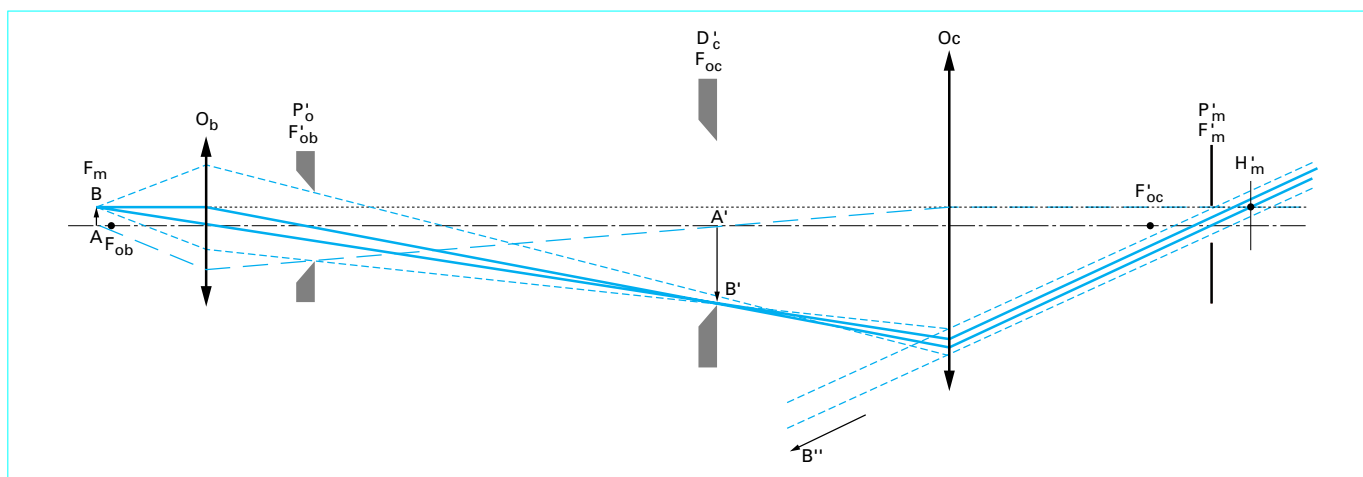


Figure 1 – Organisation d'un microscope simplifié

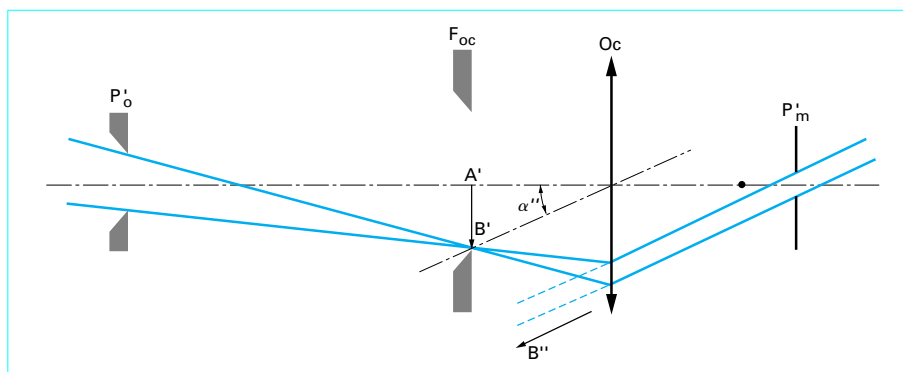


Figure 2 – Définition du diamètre apparent de l'image définitive

l'objectif, la pupille d'entrée d'un microscope étant toujours par définition située à l'infini. Ainsi le plan focal image du microscope  $F'_m$  est confondu avec le plan de sa pupille de sortie  $P'_m$ . C'est l'anneau oculaire du microscope où l'observateur doit placer la pupille de son œil.

## 1.2 Caractéristiques du microscope : puissance et grossissement

Nous notons d'après la figure 1 que le plan principal image du microscope  $H'_m$ , lieu des points de rencontre des rayons incidents parallèle à l'axe optique et des rayons émergents correspondants, est situé au-delà du plan focal  $F'_m$ . Le microscope est donc, à l'inverse de la loupe, un **instrument de puissance négative** (de distance focale négative) fournissant une image renversée. Par définition (figure 2), cette puissance  $P_m$  est égale au rapport du diamètre apparent  $\alpha''$  de l'image définitive à la dimension  $y = AB$  de l'objet.

On a alors :

$$\begin{aligned} P_m &= \alpha''/y \\ \alpha'' &= A'B'/f'_{oc} = y'/f'_{oc} \\ P_m &= (y'/y)(1/f'_{oc}) = g_{ob}P_{oc} \end{aligned}$$

avec  $f'_{oc}$  distance focale de l'oculaire,  
 $g_{ob}$  et  $P_{oc}$  respectivement le grossissement de l'objectif et la puissance de l'oculaire.

Dans ces conditions, le grossissement commercial  $G_m$  du microscope, rapport du diamètre apparent de l'image définitive à celui  $\alpha$  de l'objet observé à l'œil nu à la distance conventionnelle de 250 mm est :

$$G_m = \alpha''/\alpha = (y'/f'_{oc})/(y/250) = (y'/y)(250/f'_{oc}) = g_{ob}G_{oc}$$

les longueurs étant exprimées en millimètres et  $G_{oc}$  étant le grossissement commercial de l'oculaire.

Ainsi puissance et grossissement caractérisent le microscope et sont respectivement égaux aux produits du grossissement de l'objectif et de la puissance et du grossissement de l'oculaire.

Il y a lieu ici d'examiner le cas particulier du système optique tel qu'il tend à se généraliser. Nous avons considéré dans ce qui précède que l'objectif fournit directement une image dans le plan focal objet de l'oculaire, ce qui a été pendant très longtemps la seule solution adoptée. On dit alors que l'objectif est **corrigé** (au sens de la correction des aberrations) **pour une longueur de tube finie**. Or, la conception tendant à prévaloir est que les objectifs soient calculés pour fournir une image à l'infini, c'est-à-dire que l'objet soit placé dans leur plan focal objet. Dans ces conditions (figure 3), le schéma du microscope est complété par une **lentille de tube**  $L_T$ , solidaire du statif, ramenant l'image intermédiaire à distance finie dans son plan focal  $F'_T$  confondu avec le plan focal  $F'_{oc}$  de l'oculaire.

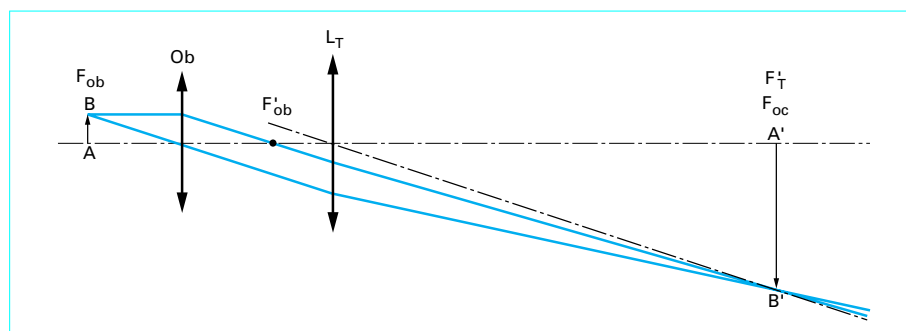


Figure 3 – Formation de l'image intermédiaire donnée par un objectif corrigé pour l'infini

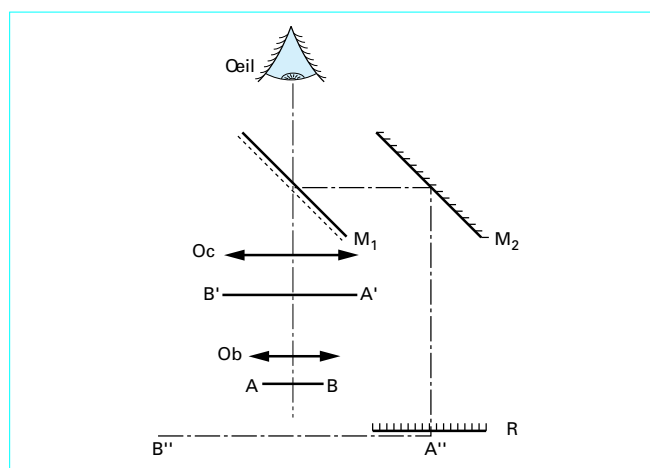


Figure 4 – Schéma de la chambre claire

L'objectif, dans ces conditions, n'est alors plus caractérisé par un grandissement, mais l'est par son grossissement commercial :

$$G_{ob} = 250/f'_{ob}$$

si sa distance focale  $f'_{ob}$  est exprimée en millimètres. Le grandissement  $g_{ob}$  correspondant à l'ensemble objectif-lentille de tube, si cette dernière est de distance focale  $f'_T$ , a pour valeur :

$$g_{ob} = y'/y = f'_T/f'_{ob} = (f'_T/250) G_{ob}$$

et le grossissement du microscope est alors :

$$G_m = G_{ob} G_{oc} (f'_T/250) = k G_{ob} G_{oc}$$

le facteur  $k$  ou *facteur de tube*, égal à l'inverse du grossissement commercial de la lentille de tube, étant une caractéristique du microscope. La grandissement de l'objectif est égal au produit de son grossissement par ce facteur  $k$ .

**Nota** : il n'est pas indispensable à l'utilisateur de mesurer ces différentes caractéristiques pour connaître les conditions d'emploi de son instrument. Certes, il est possible de mesurer le grossissement commercial du microscope à l'aide d'une chambre claire (figure 4) composée de deux miroirs  $M_1$  (semi-transparent) et  $M_2$  permettant l'observation simultanée d'un micromètre AB à travers le microscope et d'une règle R placée à une distance de 250 mm de l'œil O. Avec un micromètre gradué en centièmes de millimètre et une règle graduée en millimètres, le grossissement est donné par  $G_m = 100 (n'/n)$  si  $n$  traits du micromètre recouvrent  $n'$  traits de règle. Cette mesure est peu significative, le microscope ne travaillant pas dans ses meilleures conditions de correction (l'image définitive n'étant pas à l'infini, le microscope n'est pas au point pour son meilleur plan objet) et l'encombrement de la chambre claire ne permettant pas de placer la pupille de l'œil dans le plan de la pupille de sortie.

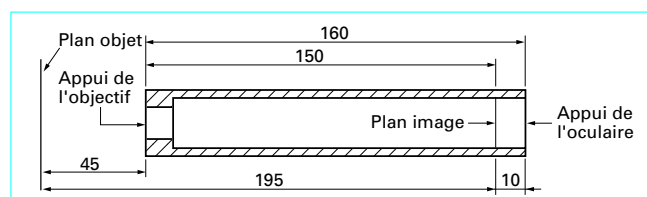


Figure 5 – Principales distances normalisées en millimètres

En fait, les valeurs de grandissement ou grossissement portées par chaque composant du microscope, de même que celle du facteur de tube indiquée sur le statif, peuvent être considérées avec suffisamment de confiance pour effectuer le calcul du grossissement commercial de l'ensemble. Néanmoins, si un doute subsiste, notamment s'il y a hésitation pour l'objectif entre grandissement et grossissement, ces grandeurs peuvent s'obtenir séparément. Un grandissement se déduit de l'observation de l'image d'un micromètre objectif à l'aide d'un oculaire micrométrique par une formule analogue à celle de la chambre claire ; un grossissement est obtenu par mesure de la distance focale par une méthode de focométrie classique.

### 1.3 Principales normes

Les conjugaisons optiques exposées au paragraphe 1.1 répondent à des conditions de stigmatisme rigoureux tant pour l'objectif que pour l'oculaire. Il en résulte que l'ensemble objectif-oculaire doit rester impérativement solidaire pour que l'image intermédiaire donnée par l'objectif, qui impose la position de l'objet, soit toujours au foyer objet de l'oculaire. La mise au point sur l'objet ne peut donc s'effectuer que par déplacement de cet ensemble, modifiant ainsi seulement la distance objectif-objet. Par souci de standardisation, afin de permettre éventuellement l'interchangeabilité des composants entre les différents constructeurs des normes dimensionnelles précises ont été définies pour le microscope (figure 5).

Le plan de l'image intermédiaire doit être à  $10 \pm 0,3$  mm en avant du plan d'appui de l'oculaire, celui de l'objet à 45 mm en avant du plan d'appui de l'objectif. La distance objet-image, tout au moins pour les objectifs biologiques (elle est plus longue pour les objectifs métallographiques) corrigés à distance finie, est fixée à  $195 \pm 0,5$  mm. Il en résulte (pour les objectifs corrigés à distance finie) que la distance entre plans d'appui, ou **longueur mécanique de tube**, est de 160 mm (couramment 230 en métallographie), que la distance entre plan d'appui de l'objectif (voisin de son plan de pupille de sortie) et plan de l'image intermédiaire, ou **longueur optique du tube**, est de 150 mm. Cette règle peut souffrir des exceptions qui seront toujours mentionnées sur les composants.

**Tableau 1 – Valeurs usuelles des grandissements et grossissements d'objectifs**

Grandissement	1	1,6	2,5	4	6,3	10	16	25	40	63	100
Grossissement	1,25	2	3,2	5	8	12,5	20	32	50	80	125

**Nota :** le fait de normaliser la distance objet-plan d'appui des objectifs présente de l'intérêt. En effet, un microscope est en général doté d'une série d'objectifs de grandissements différents portés par un revolver dont les plans d'appui sont sensés occuper la même position quand ils sont en place. Leurs distances frontales et leurs champs linéaires objet décroissent avec leur grandissement, d'où des difficultés croissantes d'effectuer la mise au point et de centrer la partie intéressante du champ. Il convient donc de commencer l'observation avec l'objectif le plus faible et d'augmenter progressivement son grandissement en améliorant le centrage de l'objet jusqu'à obtenir grandissement et résolution souhaitées. Grâce à la normalisation imposée (**parfocalité**), la mise au point est pratiquement conservée et ne nécessite que de légères retouches au mouvement lent à chaque changement d'objectif.

De même, les valeurs usuelles des grandissements des objectifs (ou de leurs grossissements s'ils sont corrigés pour une distance image infinie) sont en progression géométrique de base 1 pour les grandissements, 1,25 pour les grossissements (on obtient ainsi les mêmes valeurs de grossissements de microscope si la distance focale de la lentille de tube est de 200 mm, ce qui n'est pas une généralité) et de rapport, non vraiment justifié,  $\sqrt{2}, 5$ . Ces valeurs sont rassemblées dans le tableau 1.

Ces valeurs, qui n'existent pas nécessairement toutes dans les catalogues des constructeurs, sont gravées sur la monture des objectifs, accompagnées de celle de leur ouverture numérique que nous définirons au paragraphe 2.1.2. Ainsi un objectif de grandissement 40 et d'ouverture numérique 0,65 est-il marqué 40/0,65. Si cette information concerne évidemment un objectif corrigé à distance finie, elle peut malheureusement, chez certains constructeurs, concerner sans autre précision un objectif corrigé pour une distance infinie, c'est-à-dire sans informer l'utilisateur de la présence d'une lentille de tube dans le statif. Plus généralement, dans ce cas est indiquée la valeur du grossissement suivie du signe  $\infty$  complétée de l'indication du facteur de tube  $k$  portée par le statif. Notons qu'il n'est pas souhaitable d'utiliser de tels objectifs avec un statif de constructeur différent, la correction de leurs aberrations pouvant prendre en compte l'existence de la lentille de tube. La correction des objectifs biologiques dépendant de l'épaisseur de la lamelle couvre-objet, sa valeur en millimètres est une information pouvant être portée sur la monture de l'objectif. Ainsi, suivant qu'un objectif biologique est corrigé à distance finie ou infinie trouvera-t-on à caractéristiques équivalentes :

40/0,65	ou	50x/0,65
160/0,17		$\infty/0,17$

D'autres indications, tels le type de correction de l'objectif, le milieu d'immersion, peuvent encore être mentionnées sur les montures. Nous donnons ici quelques exemples empruntés à différents constructeurs :

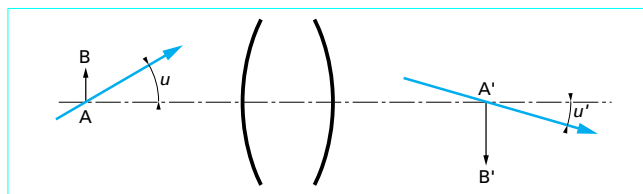
UPlanFI 20x/0,50 $\infty/0,17$	Achromat 63 / 0,80 160 / 0,17	UMPlanFI 50 x / 0,80 $\infty / 0$	NCSPan 40 0,70 160 / 0	160 / - EF 10 / 0,25	Plan-APOCHROMAT 100 x / 1,30 Oil $\infty / 0,17$
Olympus	Zeiss	Olympus	Olympus	Leitz	Zeiss

En ce qui concerne les oculaires, ils portent gravés la valeur de leur grossissement commercial appartenant à une série progressive généralement adoptée (tableau 2).

Cette information est éventuellement complétée d'une indication caractérisant une propriété particulière : *grand champ*, *compensateur* (du chromatisme de l'objectif), *pour porteurs de lunettes* par exemple.

**Tableau 2 – Valeurs usuelles des grossissements d'oculaires**

Grossissement	5	6,3	8	10	12,5	16	20	25	32
---------------	---	-----	---	----	------	----	----	----	----

**Figure 6 – Définition de l'aplanétisme**

## 2. Objectif de microscope

### 2.1 Caractéristiques de l'objectif

#### 2.1.1 Aplanétisme : condition essentielle

L'objectif d'un microscope doit former une image d'un objet situé dans un plan perpendiculaire à son axe optique. Non seulement stigmatique pour un couple de points objet-image A-A' situés sur l'axe, il doit également l'être pour un couple de points B-B' infiniment voisins de A-A' situés dans des plans perpendiculaires à l'axe en ces points (figure 6). S'il respecte ces conditions, l'objectif est dit **aplanétique** et il satisfait à la **condition d'Abbe** ou **condition des sinus** :

$$n \gamma \sin u = n' \gamma' \sin u'$$

avec  $n$  et  $n'$  indices de réfraction des milieux objet et image,  
 $\gamma$  et  $\gamma'$  grandeurs de AB et de son image A'B',  
 $u$  et  $u'$  inclinaisons sur l'axe d'un rayon lumineux passant par les points A et A'.

En microscopie, où l'angle d'ouverture image est toujours faible et où le milieu intermédiaire est toujours l'air, cette condition, nécessaire pour conserver le stigmatisme dans un plan, peut s'écrire :

$$n \gamma \sin u = \gamma' u'$$

ce qui permet d'exprimer le grandissement de l'objectif tant en fonction des dimensions objet et image qu'en fonction de ses angles d'ouverture objet et image par la relation :

$$g_{ob} = \gamma' / \gamma = (n \sin u) / u'$$

#### 2.1.2 Ouverture numérique

Nous venons implicitement d'introduire la notion d'ouverture numérique. Considérons un point A d'un objet d'indice  $n_o$ , recouvert d'une lamelle d'indice  $n_v$ , séparée de la frontale de l'objectif par un liquide d'immersion d'indice  $n$  et supposons que le rayon ABCD (figure 7) soit le plus incliné sur l'axe entrant dans l'objectif suscep-



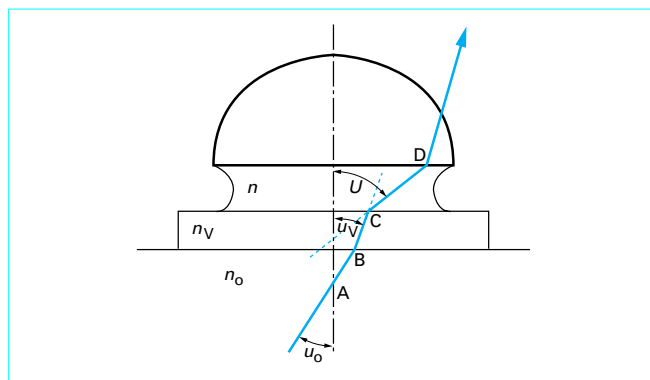


Figure 7 – Définition de l'ouverture numérique

tible d'en ressortir. Son inclinaison à la traversée des dioptries plans séparant les milieux prend les valeurs successives  $u_o$ ,  $u_v$ ,  $U$  et

$$n_o \sin u_o = n_v \sin u_v = n \sin U$$

Cette quantité invariante  $n \sin U$  est l'**ouverture numérique** de l'objectif. Plus encore que son grandissement, cette grandeur est sa caractéristique principale. Outre qu'elle régit la quantité de lumière entrant dans l'instrument, c'est elle qui définit sa propriété la plus essentielle : sa **limite de résolution**. Arrondie à deux décimales, la grandeur de l'ouverture est, comme nous l'avons indiqué précédemment, gravée sur la monture de l'objectif.

### 2.1.3 Limite de résolution de l'objectif

Doter un objectif d'un grandissement suffisamment fort pour agrandir notablement l'image n'est pas une démarche suffisante. Il est encore nécessaire, à l'intérieur des limites de l'objet, d'en agrandir les détails, de les mettre en évidence, de les **résoudre**.

Définir la qualité d'un objectif de microscope par la classique limite de séparation entre deux points n'est pas vraiment significatif car ne correspondant pas exactement à l'usage qui en est fait. Si cette notion s'applique bien au télescope qui doit résoudre le problème de la séparation de deux points lumineux images de sources ponctuelles différentes, donc parfaitement incohérentes, ce cas n'est pas exclusivement celui de la microscopie où deux points voisins peuvent présenter entre eux à la fois un certain degré de cohérence et un déphasage. Par ailleurs, en microscopie, de même qu'en photographie et en astronomie en dehors de l'observation des étoiles, on peut considérer que le champ étendu de l'objet, à l'image d'une photographie tramée, est constitué d'une structure pouvant être décomposée en un ensemble d'objets périodiques de périodes, de spectres de fréquences « spatiales », de contraste, d'orientations tous différents. La **limite de résolution** de l'objectif est alors définie comme étant la plus petite période résolue par l'objectif. Cette limite de résolution varie suivant l'état de cohérence de la lumière d'éclairage, c'est-à-dire pratiquement selon les dimensions de la source. Nous allons examiner simplement, en nous inspirant des expériences d'Abbe, comment l'ouverture numérique détermine cette limite.

Considérons (figure 8) un objet, dit de phase, dont l'amplitude complexe ne présente dans une direction que des variations de transmission purement sinusoïdales de période spatiale  $p$ . Immergé dans un milieu d'indice  $n$ , éclairé par une onde plane  $\Sigma_i$  émise par une source ponctuelle  $S$  placée au foyer d'un condenseur  $Cd$ , cet objet se comporte comme un réseau diffractant la lumière de lon-

gueur d'onde  $\lambda$  dans deux directions symétriques inclinées sur l'axe d'angle  $\pm \alpha$  tel que :

$$n \sin \alpha = \lambda/p$$

Tant que  $\alpha$  reste inférieur à  $U$ , angle du rayon lumineux le plus incliné pénétrant dans l'objectif pouvant en ressortir (angle d'ouverture objet), il en est de même des deux ondes  $\Sigma_1$  et  $\Sigma_2$  diffractées par le réseau. L'ensemble condenseur-objectif fournit ainsi dans le plan de la pupille de sortie  $P'_o$  de l'objectif deux images  $S_1$  et  $S_2$  qui, cohérentes entre elles, reconstruisent par interférence une image conforme de l'objet. La limite de résolution est dans ce cas d'**éclairage cohérent** la période  $p_c$  (cf. figure 11) telle que :

$$1/p_c = (n \sin U)/\lambda$$

et, pour toute fréquence spatiale  $1/p$  inférieure, l'image obtenue est de contraste unité alors que les fréquences spatiales supérieures ne sont pas transmises. Notons que si l'objet n'est pas de profil sinusoïdal, quoique périodique, il est décomposable en un spectre de composantes sinusoïdales fournissant chacune une paire d'ondes diffractées reconstruisant une image conforme tant qu'elles sont transmises par la pupille. À la limite, si seules les ondes correspondant à la fréquence spatiale  $1/p$  la plus basse, c'est-à-dire la fréquence fondamentale correspondant à la période du réseau, sont transmises par la pupille, l'image reconstruite par interférences est purement sinusoïdale.

Inversement, si la source est infiniment étendue (**éclairage incohérent**), elle est néanmoins limitée par l'image dans son plan de la pupille de sortie  $P'_o$ , l'ouverture numérique du condenseur se trouvant naturellement limitée à  $n \sin U$ . Si l'on considère alors un objet dont le facteur de transmission soit sinusoïdal en intensité, outre une onde directe remplissant toute la pupille, il fournit deux ondes diffractées auxquelles correspondent deux images  $S_1$  et  $S_2$  de la source (figure 9). Dans les zones communes à deux de ces ondes existent des points homologues pouvant indépendamment fournir des systèmes d'interférences identiques reconstruisant une image de l'objet. Par perte d'énergie, quand la fréquence spatiale augmente, le contraste, proportionnel aux aires communes à  $S_1-P'_o$  et  $S_2-P'_o$ , diminue et s'annule pour une fréquence spatiale double de la limite précédente lorsque les images  $S_1$  et  $S_2$  sont tangentes extérieurement à  $P'_o$  :

$$1/p_i = (2 n \sin U)/\lambda$$

cette période  $p_i$ , appelée **limite de résolution absolue de l'objectif** est égale à (cf. figure 11) :

$$p_i = \lambda/(2 n \sin U)$$

L'amélioration du contraste pour les faibles fréquences spatiales s'obtient en limitant l'ouverture numérique du condenseur à une valeur  $n \sin u_c$  inférieure à l'ouverture numérique de l'objectif par un diaphragme d'ouverture  $D_o$  dont l'image dans le plan de la pupille de sortie de l'objectif est plus petite que cette pupille (figure 10).

Par un raisonnement analogue à celui qui a été présenté dans le cas de l'éclairage incohérent, on montre, ce qui avait été constaté depuis fort longtemps par les microscopistes utilisant couramment cette procédure, qu'avec cet **éclairage partiellement cohérent**, le contraste de l'image (figure 11) reste égal à l'unité tant que :

$$1/p < (n \sin U - n \sin u_c)/\lambda$$

et s'annule pour une limite de résolution  $p_s$  telle que :

$$1/p_s = (n \sin U + n \sin u_c)/\lambda$$

Quoi qu'il en soit, la limite de résolution est d'autant meilleure que l'ouverture numérique est plus grande. Il existe quelques rares *objectifs à sec* ( $n = 1$ ) d'ouverture 0,95, soit un angle  $U$  exceptionnellement grand de  $72^\circ$ , de limite de résolution absolue égale à  $0,3 \mu\text{m}$ . L'immersion homogène ( $n = 1,518$  correspondant à l'indice des lamelles et de la lentille frontale) permet des résolutions inférieures à  $0,2 \mu\text{m}$  avec des ouvertures de 1,25 correspondant à un angle  $U$  de seulement  $55^\circ$ .

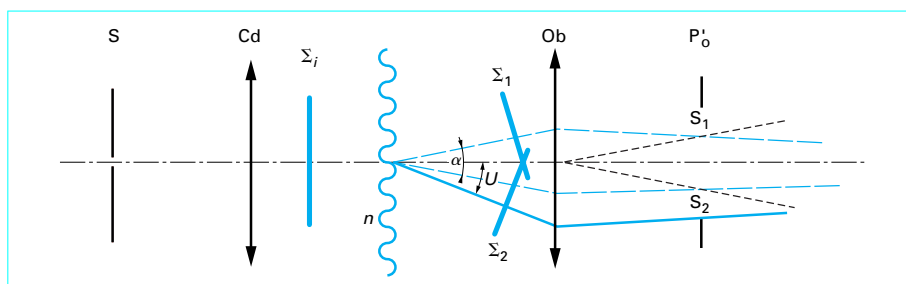


Figure 8 – Justification de la limite de résolution

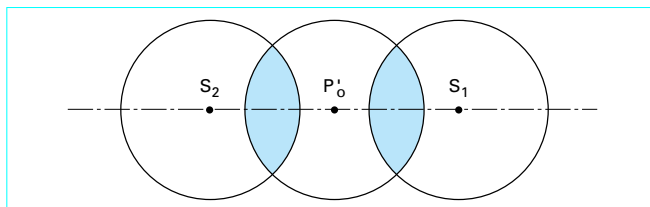


Figure 9 – Interception des images de la source dans le plan de la pupille

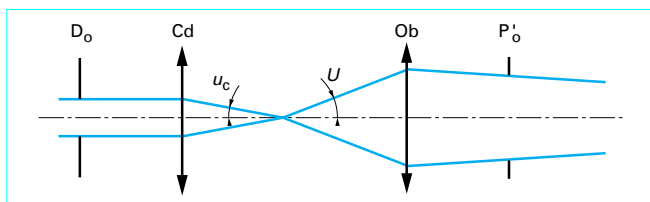


Figure 10 – Cas de l'éclairage partiellement cohérent

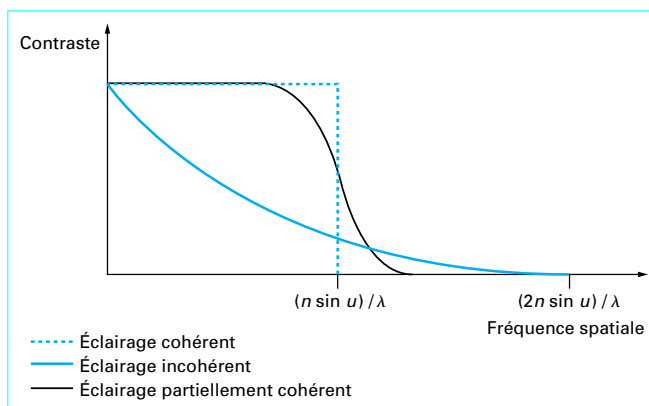


Figure 11 – Variation du contraste en fonction de la fréquence spatiale

Cette limite de résolution n'est jamais effectivement mesurée mais est déduite par calcul à partir de l'ouverture numérique fournie par le constructeur ou mesurée avec un *apertomètre*. En pratique la valeur réelle de la résolution reste toujours plus faible que sa valeur théorique. D'une part sa limite ne peut jamais être atteinte car le récepteur utilisé, et plus particulièrement l'œil, présente un seuil de perception de contraste, d'autre part la qualité de l'objectif, qui reste

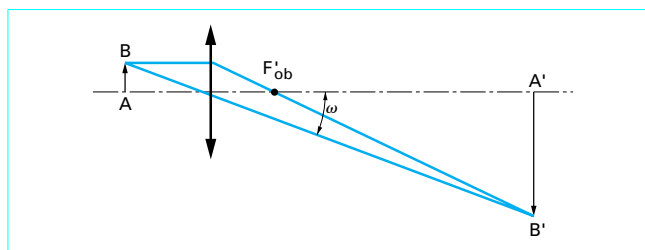


Figure 12 – Détermination du champ angulaire de l'objectif

imparfaitement corrigé des aberrations et n'est donc pas *limité par la diffraction* comme il vient d'être supposé, est à prendre en compte. Dans les conditions d'expérience réelles, c'est-à-dire essentiellement la nature de l'éclairage et éventuellement les propres capacités du récepteur, la limite de résolution peut être appréciée par l'observation d'objets tests de structure périodique connue, telles les frustules de diatomées.

### 2.1.4 Champ de l'objectif

Le champ de l'objectif est, en fait, limité linéairement par le diamètre mécanique intérieur du tube porte-oculaire. Celui-ci est pratiquement normalisé à une valeur de 23,2 mm, mais, pour limiter angulairement le champ observé par l'oculaire atteignant rapidement des valeurs supérieures au champ visuel, le champ linéaire dans l'espace intermédiaire reste en moyenne de l'ordre de 15 mm (pratiquement entre 12 et 18 mm selon que l'objectif est fort ou faible), ce qui n'interdit pas que certains objectifs soient corrigés pour des champs beaucoup plus grands : 20, 25, voire 32 mm.

Ainsi le diamètre linéaire du champ objet exprimé en millimètres est sensiblement égal à :

$$2\gamma = 15/g_{ob}$$

Angulairement, ce champ est très faible (figure 12) :

$$\omega = 7,5/\pi'_{ob} \approx 7,5/150 = 1/20$$

où  $\pi'_{ob}$  est la distance du foyer image de l'objectif  $F'_{ob}$  au plan de l'image intermédiaire A'B' (plan focal objet de l'oculaire).

$$2\omega \approx 5^\circ$$

On retiendra surtout que **l'objectif est un système à forte ouverture et faible champ** et que les rayons lumineux sont faiblement inclinés dans l'espace intermédiaire, les angles de demi-champ  $\omega$  et d'ouverture  $u'$  étant faibles.



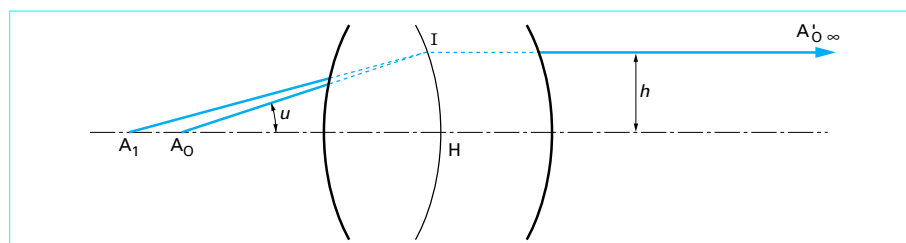


Figure 13 – Profondeur de champ de l'objectif

### 2.1.5 Profondeur de champ de l'objectif

L'objectif est un système stigmatique pour un couple de points situés sur l'axe optique. Considérons plus particulièrement le cas d'un objectif corrigé à l'infini, le cas de l'objectif corrigé à distance finie pouvant lui être assimilé eu égard à la grandeur du tirage image devant la distance focale. Le point objet stigmatique  $A_0$  est alors est alors confondu avec le foyer objet de l'objectif et la condition d'aplanétisme s'écrit alors (figure 13) :

$$n f'_{ob} = h / \sin u$$

avec  $h$ , **hauteur pupillaire**, distance à l'axe du rayon émergent correspondant à un rayon incident passant par  $A_0$  d'inclinaison  $u$ .

La quantité  $h / \sin u$  étant constante, le lieu du point d'intersection  $I$  des rayons incident et émergent correspondants, ou **surface principale**, est une sphère de rayon  $n f'_{ob}$  centrée en  $A_0$  ; ainsi la différence des chemins optiques parcourus le long de deux rayons quelconques entre  $A_0$  et tout point de cette sphère est nulle, ce qui n'est autre que la **condition de stigmatisme**, exprimant la conservation du chemin optique entre  $A_0$  et son image à l'infini. Cette sphère principale peut être considérée comme une surface d'onde issue du point  $A_0$ . Considérons un autre point objet  $A_1$  situé sur l'axe optique à la distance  $\Delta z$  de  $A_0$ . On admet que la condition de stigmatisme se conserve pour le point  $A_1$  si la différence entre les chemins optiques parcourus le long des rayons  $A_1 I$  et  $A_1 H$  confondu avec l'axe (différence de chemin optique aberrant) est inférieure à  $\lambda / 4$  (tolérance de Lord Rayleigh), critère suffisant pour que la qualité de l'image reste acceptable. Cette condition fixe la valeur maximale du défaut de mise au point tolérable pour un objectif d'ouverture numérique  $n \sin U$  :

$$\Delta z = \pm \lambda / [4 n (1 - \cos U)]$$

Cette quantité très faible, pouvant être considérée comme une limite de résolution longitudinale, et la limite de résolution latérale définissent, pour certains utilisateurs, le volume de résolution.

### 2.1.6 Récapitulatif des caractéristiques de l'objectif

Nous récapitulons dans le tableau 3 les caractéristiques essentielles d'une série d'objectifs pouvant constituer l'équipement normal d'un microscope biologique de laboratoire.

## 2.2 Classes d'objectifs

### 2.2.1 Importance des aberrations

L'ouverture numérique étant forte, certains rayons lumineux incidents sont fortement inclinés sur l'axe optique, ce qui ne correspond plus aux hypothèses de l'approximation de Gauss qui ne peuvent être retenues pour la conception de l'objectif. Ainsi à chaque point du plan objet ne peut correspondre un point unique du plan image, c'est-à-dire qu'à une onde sphérique supposée émise en un point du plan objet ne peut correspondre une onde émergente sphérique centrée sur l'image de Gauss, mais une onde déformée dont les écarts par rapport à l'onde sphérique idéale traduisent l'existence d'une aberration géométrique. Celle-ci se décompose généralement en une série de termes, fonctions à des degrés divers de l'ouverture et du champ, qu'il est nécessaire de corriger.

La première de ces composantes, l'**aberration sphérique**, ne dépend que de l'ouverture et intéresse l'obtention du stigmatisme sur l'axe. Compte-tenu de l'ouverture importante, de la présence d'autres aberrations, on ne peut se contenter d'un résidu d'aberration défini par la tolérance de Lord Rayleigh, et la correction doit être étendue au moins deux ordres au-delà, soit au moins jusqu'au septième ordre, sinon jusqu'au neuvième ou au onzième. Pour satisfaire à la condition d'aplanétisme, c'est-à-dire corriger l'aberration primaire de **coma** ou d'**aigrette**, dépendant du champ au premier ordre, n'est pas non plus suffisant et la correction d'au moins un ordre de coma supérieur s'impose. Le champ est heureusement faible, ce qui permet souvent de ne pas corriger l'astigmatisme, mais par contre eu égard à la puissance des objectifs, la **courbure de champ** est d'une telle importance qu'elle est restée très longtemps sans correction, les utilisateurs se contentant de n'observer que le centre du champ. Le développement de la photographie a fini par imposer cette correction. La distorsion, sauf exception, mais plutôt pour des applications particulières concernant des systèmes voisins des objectifs de microscope, est également souvent négligée, le microscope n'étant pas spécialement destiné à produire des mesures géométriques.

Tableau 3 – Récapitulatif des caractéristiques de l'objectif

Grandissement $g_{ob}$	Ouverture numérique $n \sin U$	$U$ (°)	Distance focale $f'_{ob}$ (mm)	Diamètre du champ $2 y$ (mm)	Limite de résolution absolue $p_i$ ( $\mu m$ )	Profondeur de champ $2 \Delta z$ ( $\mu m$ )
10	0,25	14,5	15	1,5	1	8
25	0,45	27	6	0,6	0,6	2,5
40	0,65	40	4	0,4	0,4	1,2
63	0,85	58	2,5	0,25	0,3	0,6
100	1,25	55	1,8	0,15	0,2	0,4

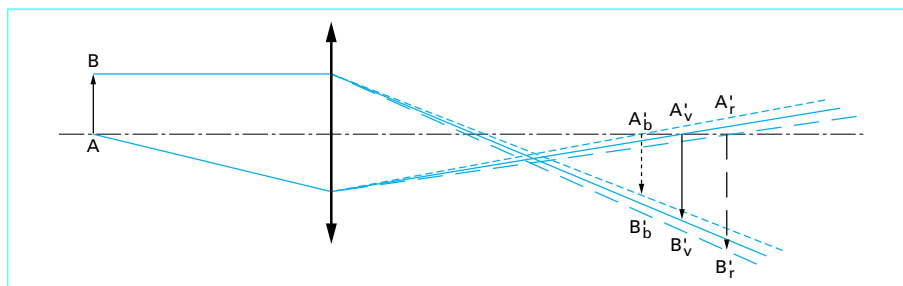


Figure 14 – Chromatisme de grandeur et de position

Outre ces aberrations fondamentales, le concepteur doit prévoir l'influence des aberrations dites d'**excentrement** qui peuvent toujours apparaître, et hélas apparaissent suite à des erreurs de manipulation, lorsque de nombreux éléments optiques sont empilés. Cela fixe des tolérances d'exécution et de montage très strictes, ces défauts étant essentiellement cause d'apparition de coma et d'astigmatisme intolérables. Le montage doit encore être tel qu'il ne puisse développer de tensions mécaniques dans les lentilles.

Ces aberrations géométriques ne sont pas seules à prendre en compte. Les ondes électromagnétiques, selon leur fréquence, ne cheminent pas toutes à la même vitesse dans les milieux matériels transparents tel le verre qui est un constituant essentiel des systèmes optiques. L'indice de réfraction varie avec la « couleur », la matière disperse la lumière, les images bleue (b), verte (v) et rouge (r) (figure 14) ne sont pas situées dans un même plan (**chromatisme axial** ou **longitudinal**) et ne sont pas de même dimension (**chromatisme latéral** ou **de grandeur**).

Ces aberrations chromatiques sont autant que possible très sévèrement corrigées, l'indice de réfraction mais aussi la dispersion des verres, variant avec la longueur d'onde et l'influence de ces variations étant d'autant plus grande que l'ouverture augmente.

Le type de correction des aberrations, qui a obéi à une certaine continuité dans le temps, permet de ranger les objectifs en classes de qualités différentes, destinées souvent à des usages différents, dont les coûts sont également fort différents.

### 2.2.2 Achromats

Les objectifs les plus simples sont les **objectifs achromatiques** ou **achromats** corrigés du chromatisme pour deux longueurs d'onde, les images bleue et rouge sont confondues, de l'aberration sphérique pour une longueur d'onde intermédiaire, un rayon voisin du plus incliné sur l'axe, ou **rayon marginal**, passant par l'image de Gauss ou **paraxiale** (figure 15).

Il existe une famille de doublets achromatiques, découverte empiriquement par Lister, naturaliste anglais, vers 1830, possédant (figure 16) deux couples de points stigmatiques.

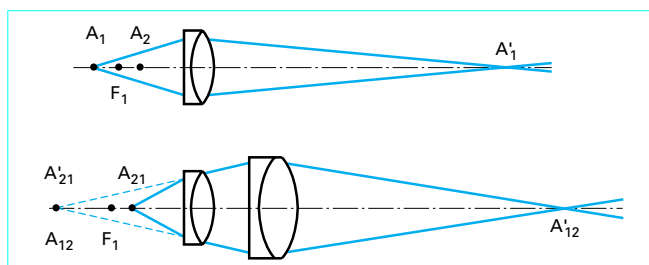


Figure 16 – Objectifs achromatiques de Lister

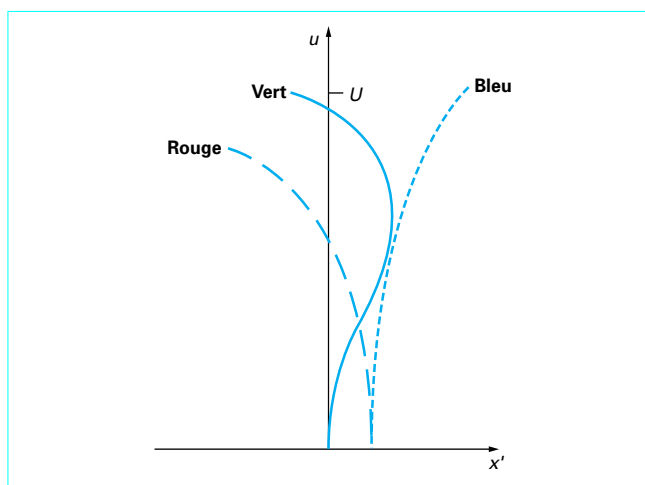


Figure 15 – Courbes de correction de l'aberration sphérique  $x'$  d'un objectif achromatique

Pour ces couples, l'aberration sphérique primaire est corrigée. Les deux points objets  $A_1$  et  $A_2$  (figure 16) sont réels et sensiblement symétriques par rapport au foyer objet. En choisissant celui d'entre eux qui fournit une image réelle  $A'_1$ , il est possible d'atteindre une ouverture numérique de 0,10. La propriété se conserve si l'on aligne plusieurs doublets. En utilisant un second doublet, dont le point objet  $A_{12}$  donnant une image réelle est confondu avec l'image virtuelle  $A'_{21}$  du premier, il est possible d'atteindre une ouverture numérique de 0,25.

Pour dépasser cette ouverture, on adopte une solution due à Amici. On prend une première lentille constituée d'un **ménisque aplanétique**. La première face est centrée au point de Weierstrass objet de la seconde (figure 17). On y place l'objet et ainsi l'image est au point de Weierstrass image du second dioptré. On a une transformation de convergence :

$$\sin u_2 / \sin u_1 = 1/n$$

et, pour la longueur d'onde correspondant à l'indice  $n$ , il n'y a ni aberration sphérique ni coma.

Une succession de  $p$  ménisques aplanétiques donne une transformation de convergence  $(1/n)^p$ . Lorsque  $\sin u_p \leq 0,25$ , on utilise alors deux doublets de Lister (figure 18). Cette solution introduit une forte aberration chromatique de position que l'on diminue en surcorrigant les deux doublets et en limitant à deux le nombre de ménisques. On obtient au mieux, avec cette solution, une ouverture de 0,60.

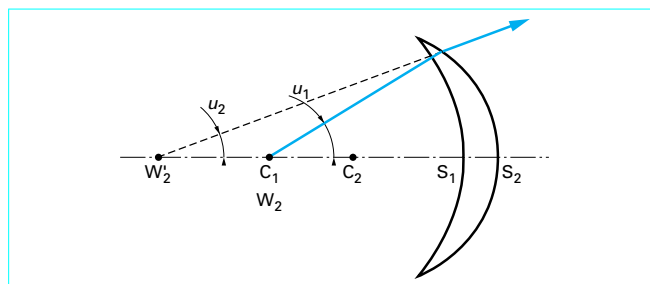


Figure 17 – Ménisque aplanétique d'Amici

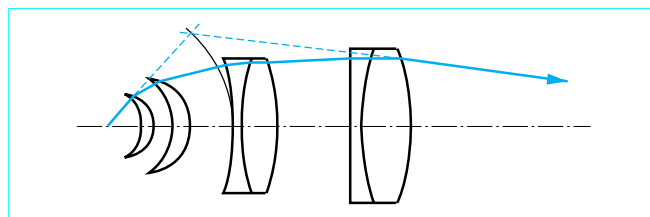


Figure 18 – Combinaison achromatique de Lister-Amici

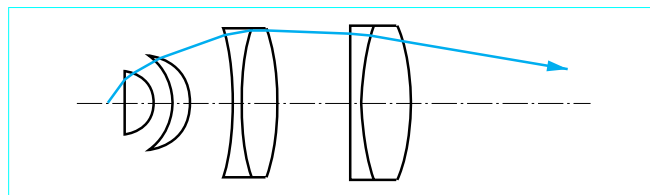


Figure 19 – Solution adoptée pour les objectifs achromatiques

Si l'aberration zonale de sphéricité (aberration d'ordres supérieurs) ne provient que des doublets, il y a un grave inconvénient provenant de la face avant concave de la lentille frontale : difficile à usiner et à centrer, fragile aux chocs, délicate au nettoyage, inapte à l'emploi en immersion homogène par enfermement d'une bulle d'air entre frontale et liquide. Pour un objectif 40/0,60, de distance focale 3,8 mm et de hauteur pupillaire 2,4 mm, la sphère d'aplanétisme ou surface principale (figure 18), se trouve très nettement à l'intérieur de l'objectif et la distance frontale égale au rayon de courbure du premier dioptré est de l'ordre du millimètre. Outre la difficulté de sa réalisation, pour que le plan objet ne se situe pas à l'intérieur de la mécanique, le montage de la première lentille est délicat.

On choisit donc (figure 19) de remplacer le premier ménisque par une lentille plan convexe. On pourrait songer à placer l'objet en un point tel que son image par rapport à la surface plane soit au point de Weierstrass objet du dioptré sphérique. Dans ce cas, la transformation de convergence serait très avantageuse car en  $1/n^2$  et, en plaçant une telle lentille devant deux ménisques, on pourrait atteindre des ouvertures considérables. Cette solution a parfois abusé certains auteurs de problèmes. En fait, quoique la lentille travaillant dans ces conditions vérifie la loi des sinus, elle n'est pas aplanétique car le dioptré plan, non stigmatique pour tout point à distance finie, introduit une forte aberration sphérique.

Cette aberration peut être diminuée en augmentant l'épaisseur de la lentille qui peut être demi-boule et même dépasser cette épaisseur. Néanmoins, quoi qu'on fasse, l'ensemble reste toujours en sous-correction que l'on ne peut diminuer qu'en rapprochant

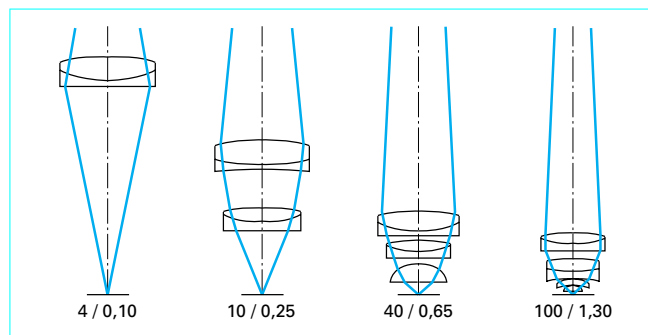


Figure 20 – Exemples d'objectifs achromatiques (d'après Bausch &amp; Lomb)

l'objet, le dioptré plan ne formant plus son image dans le plan de Weierstrass du dioptré sphérique. En fait, cette solution est surtout utilisée en immersion homogène (le liquide d'immersion étant de même indice que la lentille frontale), l'objet étant placé au point de Weierstrass. La transformation de convergence est alors en  $1/n$ . L'ouverture numérique peut ainsi atteindre 0,85 avec un seul ménisque et deux doublets. Pour les objectifs à sec, les sous-corrections résiduelles d'aberration sphérique et de chromatisme sont rattrapées par des surcorrections des doublets.

Ces objectifs achromatiques restent entachés d'un défaut chromatique provenant de l'importance du spectre secondaire (dû à la variation chromatique de dispersion). On peut le diminuer en remplaçant certains verres par des cristaux de faible dispersion : fluorure de calcium ou fluorure de lithium associés à un verre ou à du quartz dans les doublets, ou employés pour construire frontale et ménisques pour réduire les variations chromatiques de l'aberration sphérique. Ce sont les **objectifs à fluorine**.

Pour ces achromats (figure 20), on tend à respecter des normes afin de corriger :

- pour une longueur d'onde comprise entre 500 et 600 nm :
  - l'aberration sphérique pour 90 % de l'ouverture,
  - la coma et l'astigmatisme pour un champ image de 15 mm ;
- pour deux longueurs d'onde extérieures à cet intervalle :
  - les chromatismes de grandeur et de position à  $\pm 1\%$ .

### 2.2.3 Apochromats

Pour diminuer encore le chromatisme, on remplace les doublets par des triplets. Ces **objectifs apochromatiques**, ou **apochromats**, peuvent être corrigés (figure 21) du chromatisme pour trois longueurs d'onde, de l'aberration sphérique et de la coma pour deux longueurs d'onde. Il est alors possible d'atteindre une ouverture de 0,90 à sec. En fait la tendance actuelle, fournissant des séries d'objectifs de moindre coût, consiste à *replier* l'aberration sphérique pour trois longueurs d'onde comprises dans l'intervalle 450 à 650 nm, de telle sorte que les rayons lumineux passant par le bord et le centre de la pupille se coupent sur l'axe optique, tout en conservant un résidu de chromatisme longitudinal (figure 22). Ces systèmes sont appelés **semi-apochromats**.

Ces systèmes apochromats (figure 23) ne sont pas encore satisfaisants. Bien corrigés du chromatisme de position, ils présentent, comme les achromats, du chromatisme de grandeur, l'image bleue étant plus grande que l'image rouge.

On remédie visuellement à ce défaut en leur associant des **oculaires compensateurs** permettant la vision des images sous le même angle (figure 24), corrigeant ainsi le **chromatisme apparent** ou **perspectif**. Récemment, l'adjonction dans les objectifs de composants en verres nouveaux de dispersion anormale permet la fourniture

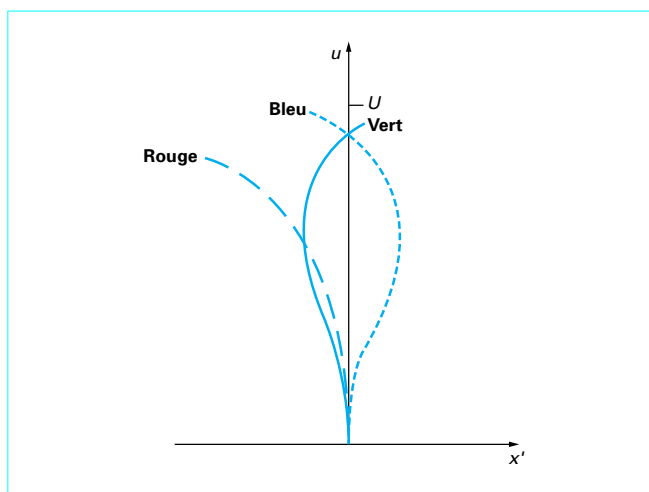


Figure 21 – Courbes de correction d'un objectif apochromatique

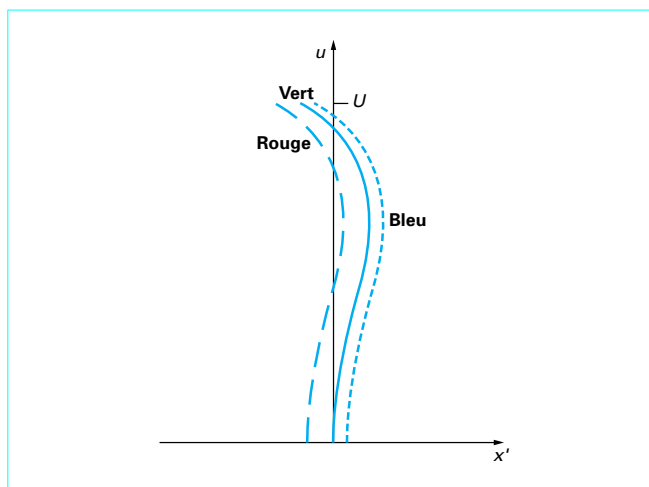


Figure 22 – Courbes de correction d'un objectif semi-apochromatique

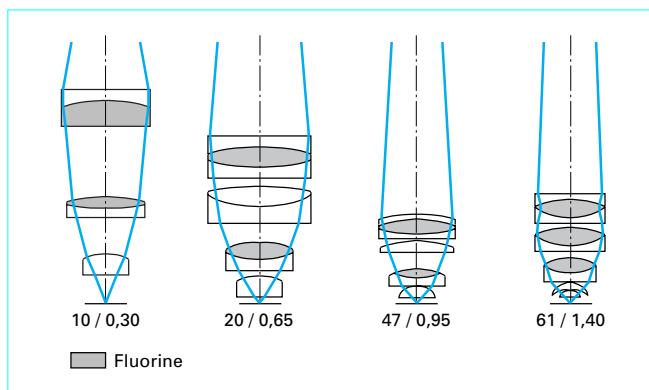


Figure 23 – Exemples d'objectifs apochromatiques (d'après Bausch &amp; Lomb)

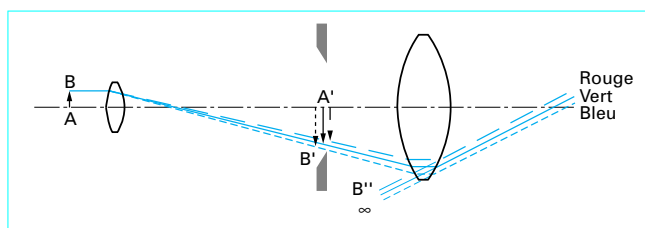


Figure 24 – Principe de l'oculaire compensateur associé à un objectif apochromatique

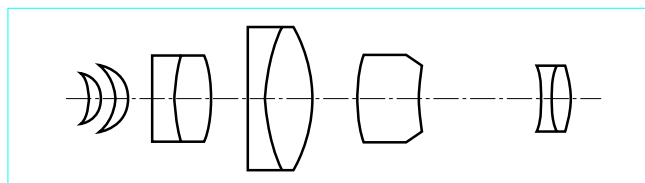


Figure 25 – Objectif planachromatique

d'objectifs assez bien dénués de chromatisme de grandeur (séries CF : « *chromatic aberration free* ») devant être naturellement associés à des oculaires de même type.

Pour les objectifs de ces classes, achromats ou apochromats, la correction de l'astigmatisme est négligée, ce qui est justifié par les dimensions réduites du champ. Malheureusement leur **courbure de champ** très forte (de l'ordre de la puissance de l'objectif, donc pouvant atteindre plusieurs centaines de dioptries), peu gênante en observation visuelle car l'œil ne saisit pas en général l'ensemble du champ, les rend inutilisables en photographie. Cette courbure peut être partiellement corrigée à l'aide d'un oculaire divergent ou **oculaire projectif**, à pupille de sortie virtuelle, ce qui interdit son utilisation en observation visuelle, fournissant une image réelle dans le plan de laquelle peut être placée une émulsion photographique. Pour remédier vraiment à la courbure, des objectifs plans doivent être utilisés.

## 2.2.4 Objectifs plans

La correction de la courbure de champ se traduit par une augmentation du nombre de lentilles constituant l'objectif. Les objectifs achromats donnent naissance à la série des **planachromats** (figure 25), non réellement développés aujourd'hui, pour lesquels on ne tente pas de corriger l'aberration sphérique introduite par une demi-boule, ce qui nécessite l'emploi de deux ménisques. La combinaison Lister-Amici est complétée de deux éléments : une lentille épaisse de puissance nulle servant de transformateur de convergence sans apporter de courbure supplémentaire, un doublet de puissance négative compensant la courbure des éléments antérieurs.

La correction des apochromats est plus difficile et de réalisation plus récente grâce à la maîtrise de la technique et à l'introduction de verres nouveaux sur le marché. On a alors des séries d'objectifs **planapochromats** dont la courbure est diminuée par l'introduction d'une surface à forte courbure concave ou négative voisine du plan de l'objet. La figure 26 illustre le cas d'un objectif 100/1,30 où cette solution est obtenue par une demi-boule incluse dans un ménisque d'indice plus élevé.

Les planachromats et planapochromats (et les plans semi-apochromats), recevant les mêmes corrections que les objectifs de leurs classes d'origine, sont en outre corrigés de la courbure pour la longueur d'onde principale.

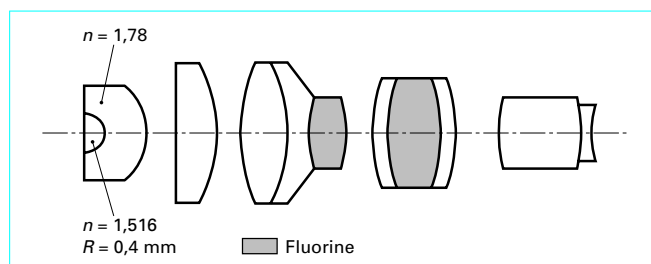


Figure 26 – Exemple d'objectif planapochromatique (d'après Zeiss-Oberkochen)

L'apparition simultanée du contraste de phase ne nécessitant pas la coloration des préparations et de sources quasi monochromatiques de grande luminance a entraîné la conception d'objectifs monochromatiques corrigés de la courbure. Cela concerne encore les **objectifs photoréducteurs**. Utilisés pour la fabrication des microcircuits (les « puces »), ils s'apparentent aux meilleurs objectifs de microscope, sauf qu'ils travaillent en sens inverse, destinés à insoler une résine photosensible par réduction de l'image d'un masque au grandissement  $\sim 1/5$  ou  $\sim 1/10$ . De qualité strictement limitée par la diffraction, à haute résolution, ils doivent satisfaire de meilleures conditions telles que :

- conserver le grandissement dans le champ, c'est-à-dire n'être entachés que de faibles résidus de coma et de distorsion au bord d'un champ de grande dimension (de l'ordre de 1,5 pouce) ;
- corriger l'astigmatisme, le champ étant, toutes choses égales par ailleurs, notablement plus grand (environ 10 fois) qu'en microscopie.

Pour satisfaire à l'ensemble des corrections, il est plus aisé de concevoir des objectifs monochromats, ce que ne permet pas la microscopie où l'objet peut contenir une information « couleur ». Les radiations monochromatiques utilisées sont les raies intenses du mercure émises par une source haute pression de type HBO. La tendance a donc été, à partir d'une solution proche d'un objectif de microscope pour un champ de 8 mm, une ouverture 0,45, une résolution de 0,9  $\mu\text{m}$  travaillant à 546 nm, d'augmenter progressivement le champ jusqu'à 20 mm, tout en réduisant l'ouverture à 0,28, ce qui a exigé, pour conserver la résolution, de diminuer la longueur d'onde à 365 nm dans le domaine du proche ultraviolet. À ce stade, les fabricants de microcircuits, satisfaits de la résolution compatible avec les résines existantes et la technologie des microcircuits (les électrons peuvent « sauter » d'un conducteur à l'autre s'ils sont trop proches) souhaitent encore :

- augmenter le champ pour y implanter davantage d'éléments, ce qui implique au niveau de la correction de réduire l'ouverture, donc de diminuer la longueur d'onde pour conserver la résolution ;
- augmenter la cadence de fabrication, ce qui tend à utiliser des sources lumineuses plus intenses, donc en général des longueurs d'onde plus courtes car plus énergétiques ;
- augmenter la profondeur de champ pour inscrire des motifs plus épais sur plusieurs couches implantées successivement par des machines différentes, ce qui impose de réduire ouverture et longueur d'onde.

Tout concourt ainsi au besoin d'un objectif photoréducteur fonctionnant en ultraviolet utilisant, par exemple, comme source de lumière la raie 248 nm émise par le laser excimère KrF.

## 2.2.5 Objectifs à miroirs

Outre les systèmes réfringents, des **objectifs à miroirs** existent aussi. D'existence très ancienne, puisque introduits par Newton, ils ont été très utilisés jusqu'au début du 19<sup>e</sup> siècle quand apparaissent les premiers achromats. La préférence de leur emploi était due à

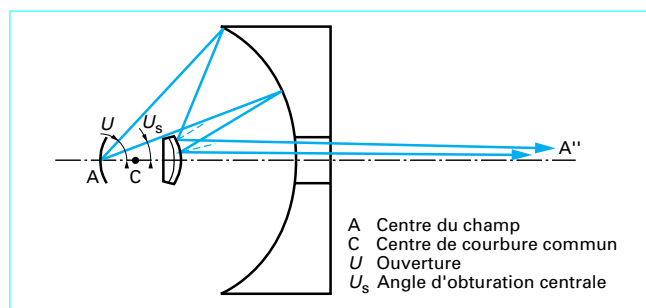


Figure 27 – Objectif à deux miroirs concentriques

leur meilleure qualité, notamment au plan évident du chromatisme. Après presque un siècle d'abandon, ils retrouvent une grande vogue vers 1930, la microscopie s'étant étendue vers les courtes longueurs d'onde, d'une part pour améliorer la limite de résolution, d'autre part à l'instigation des cytologistes mettant en œuvre l'absorption sélective de l'ultraviolet par le noyau des cellules. Ils perdent de nouveau leur intérêt lors de l'apparition vers 1960 d'objectifs dioptriques corrigés dans ce domaine spectral (200 à 500 nm). Ils sont néanmoins toujours utilisés, essentiellement en métallographie, dans des applications nécessitant une grande distance frontale telle l'observation d'objets dans des enceintes chauffantes ou réfrigérantes.

D'abord monomiroirs difficilement adaptables à un statif, ils ont été remplacés par des systèmes à deux miroirs parfois asphériques de type Cassegrain-Schwarzschild, ce dernier étant l'auteur en 1905 de la théorie générale des paires de miroirs aplanétiques. Le système le plus simple et le plus courant est constitué de deux miroirs sphériques concentriques (figure 27).

Les points principaux du système sont situés au centre de courbure et la distance frontale est de l'ordre du double de la distance focale. Ces systèmes de révolution, dénués d'aberrations de champ, ne sont aplanétiques que pour une sphère objet. D'obturation centrale d'ouverture  $\sin U_s$ , on corrige leur aberration sphérique en la repliant de telle sorte que, pour une ouverture égale à 90 % de leur ouverture numérique, l'aberration sphérique soit égale à celle de l'ouverture d'obturation. Cette obturation entraîne une baisse de contraste dans l'image affectant essentiellement les basses fréquences spatiales. Les systèmes existants se compliquent souvent de surfaces asphériques permettant de conserver l'aplanétisme en réduisant l'obturation centrale et de l'adjonction de lentilles pour corriger le chromatisme apporté par la fenêtre de l'enceinte renfermant l'objet.

## 2.2.6 Propriétés particulières

La finesse des préparations biologiques, imposée par la faible profondeur de champ de l'objectif, nécessite l'emploi d'une lamelle couvre-objet pour les rendre planes et les protéger. Celle-ci apporte aberration géométrique et chromatisme qui doivent être pris en compte dans la correction de l'objectif.

Sauf exception, la lamelle est d'indice 1,515 et d'épaisseur 0,17 mm avec une tolérance d'autant plus sévère que l'objectif est plus ouvert (0,07 mm pour l'ouverture 0,30, mais seulement 5  $\mu\text{m}$  pour l'ouverture 0,85). Il existe des exceptions à cette règle, justifiées par l'usage de l'objectif. Ainsi, pour l'emploi en ultraviolet, une lamelle en quartz est indispensable alors qu'un objectif destiné à l'observation dans une enceinte doit être corrigé en tenant compte de l'épaisseur de sa fenêtre qui peut être de plusieurs millimètres. Ces données d'exception sont gravées sur la monture.

Il en est de même de la nature et de l'indice du liquide d'immersion utilisé pour augmenter l'ouverture numérique. Les principaux



milieux rencontrés sont l'eau d'indice 1,33, souvent milieu naturel d'objets sous observation, la glycérine en ultraviolet (1,47), l'huile de cèdre ou, plus couramment, des milieux synthétiques de même indice, en immersion homogène (1,52), des liquides d'indice encore plus élevé mais heureusement peu usités car volatils et nocifs tels le monobromonaphtalène (1,66) ou l'iodure de méthylène (1,74).

## 2.3 Contrôle de qualité des objectifs

Le contrôle de qualité des objectifs est normalement de la compétence des constructeurs ou d'experts spécialisés et de gros défauts inacceptables ne sont pas perceptibles du profane par les méthodes usuelles que nous allons mentionner.

L'estimation de la qualité est généralement réalisée industriellement par l'observation de l'image d'un point lumineux, trou éclairé de diamètre  $\Phi$  tel que son image géométrique soit inférieure d'environ un ordre de grandeur à la dimension du maximum central de la tache de diffraction :

$$\Phi \leq 0,12 \lambda / n \sin U$$

On utilise pratiquement un trou submicronique existant fortuitement dans un dépôt d'aluminium. Un objectif parfait devrait en fournir une répartition d'éclairements constituée d'un maximum central entouré d'anneaux concentriques de moins en moins lumineux (tache d'Airy ou « réponse percussionnelle » de l'objectif). La présence d'**aberration sphérique** se traduit au centre du champ par l'existence d'anneaux plus brillants et distribués différemment si l'on procède à des défauts de mise au point symétriques de part et d'autre de la meilleure mise au point. En dehors du centre du champ, une tache de diffraction dissymétrique en forme d'aigrette est manifeste de **coma**, alors que la concentration de la lumière suivant deux segments perpendiculaires, situés dans deux plans respectivement de part et d'autre du plan de meilleure mise au point, traduit l'existence d'**astigmatisme**. Il va de soi que des résidus de ces aberrations existant conjointement à des degrés divers, l'image du point lumineux ne prend jamais ces formes idéales. La variation de mise au point et la mesure de la longueur de l'image d'un segment lumineux éclairé en longueur d'onde variable permettent d'estimer plus aisément **chromatismes de position et de grandeur**.

La caractérisation des aberrations géométriques peut aussi se faire par l'interprétation des déformations de la surface d'onde transmise par l'objectif par interférométrie normale (mais il est difficile de construire une surface d'onde de référence parfaite, sauf à utiliser un hologramme synthétique) ou différentielle, mais, là encore, l'interprétation de l'interférogramme reste du domaine du spécialiste.

Les instruments commerciaux fournissant directement la fonction de transfert d'un système optique peuvent être partiellement appliqués aux objectifs de microscope sans être aptes à atteindre ses fréquences de coupure les plus élevées.

## 3. Oculaire de microscope

### 3.1 Caractéristiques de l'oculaire

Nous avons vu au paragraphe 1 que l'oculaire est essentiellement caractérisé par son grossissement commercial  $G_{oc}$ , ce qui fixe sa distance  $f'_{oc}$  (exprimée en millimètres) par :

$$G_{oc} = 250/f'_{oc}$$

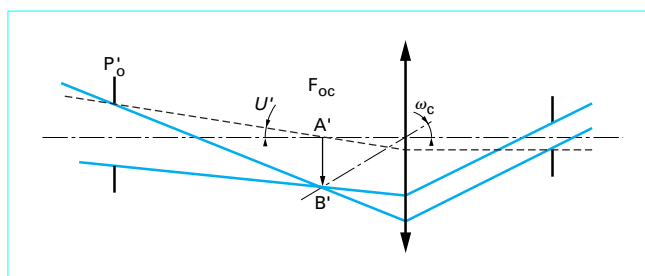


Figure 28 – Détermination des caractéristiques de l'oculaire

Son angle de demi-champ  $\omega_c$  (figure 28) est tel que :

$$\tan \omega_c = A'B'/f'_{oc}$$

où le demi-champ linéaire  $A'B'$  est supposé égal à 7,5 mm. Les caractéristiques des oculaires classiques rapportées dans le tableau 4 montrent que l'angle de champ de l'oculaire est rapidement important et que, pour les oculaires les plus forts, il est supérieur à celui de l'œil.

Par contre, l'ouverture numérique de l'oculaire étant l'ouverture numérique image  $U'$  de l'objectif :

$$U' = (n \sin U)/g_{ob}$$

reste comprise, pour les objectifs usuels, entre 0,025 et 0,013, correspondant donc à des angles  $U'$  très faibles compris entre 1,5 et 0,7°. Contrairement à l'objectif, **l'oculaire est un système optique à grand champ de faible ouverture**.

Comme nous l'avons déjà signalé au paragraphe 2, l'espace intermédiaire est un espace où champ et ouverture sont faibles, les rayons les plus inclinés sur l'axe optique ne le sont qu'à moins de quelques degrés. L'introduction d'éléments optiques accessoires dans cet espace n'aura en général qu'une faible influence sur les aberrations du système.

Les oculaires utilisés en microscopie, convergents pour l'observation visuelle et dérivant des modèles classiquement connus, sont composés de deux verres (ou groupes de verres), un **verre de champ**  $V_c$  au plus près de ce dernier servant à rabattre les rayons lumineux issus de la pupille de l'objectif formant l'image intermédiaire vers le **verre d'œil**  $V_o$  observant cette image.

### 3.2 Types d'oculaire

#### 3.2.1 Oculaires négatifs

Les oculaires les plus couramment utilisés pour l'observation visuelle en microscopie sont des **oculaires convergents** (de puissance positive) **négatifs**, c'est-à-dire dont le plan focal objet est inférieur aux deux verres. Par rapport aux oculaires positifs (à plan focal objet en avant du système), ils présentent l'avantage, à ouverture de verre de champ égal, d'offrir un champ apparent plus grand entaché de moindres aberrations.

Tableau 4 – Caractéristiques des oculaires classiques									
Grossissement $G_{oc}$	5	6,3	8	10	12,5	16	20	25	32
Distance focale $f'_{oc}$	50	40	30	25	20	15	12,5	10	8
Angle de demi-champ $\omega_c$	9°	11°	14°	17°	21°	26°	31°	37°	44°

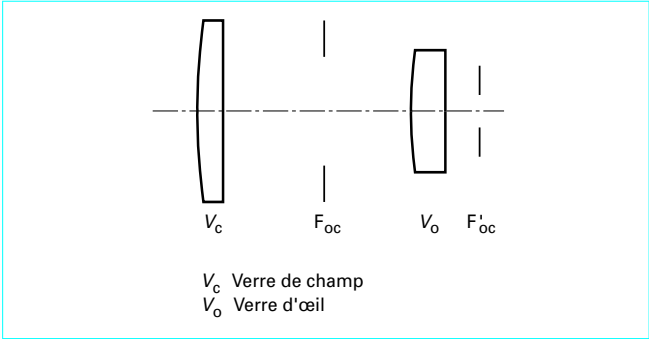


Figure 29 – Oculaire convergent négatif

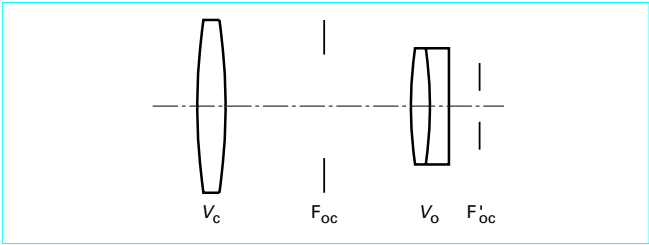


Figure 30 – Oculaire compensateur

L’oculaire le plus fréquent est l’**oculaire de Huygens** de type 4-3-2, c’est-à-dire dont la distance focale  $f'_1$  du verre de champ, l’espace  $e$  entre verres et la distance focale  $f'_2$  du verre d’œil sont respectivement proportionnels à ces nombres. On sait que vérifiant la relation :

$$f'_1 + f'_2 = 2e$$

cet oculaire est corrigé du chromatisme apparent, si toutefois les deux lentilles sont de même verre. Il est composé (figure 29) de deux lentilles simples plan-convexes de convexité tournée vers le faisceau incident. Surtout utilisé avec les objectifs achromatiques, il possède de l’aberration sphérique, de l’aberration chromatique longitudinale et de la distorsion. Une variante également utilisée de cet oculaire est l’**oculaire de Dollond**, de symbole 3-2-1, vérifiant également la condition d’achromatisme perspectif.

De ce type d’oculaire dérive l’**oculaire compensateur** dont le verre d’œil (figure 30) est constitué d’un doublet. Destiné à corriger le résidu d’aberration chromatique de grandeur de l’objectif, il est surtout associé aux objectifs apochromatiques.

Les oculaires négatifs ne sont pas bien adaptés pour recevoir une échelle micrométrique ou un diaphragme de champ situé entre les deux verres. L’image qu’en observe l’œil, seulement fournie par le verre d’œil, est imparfaite et particulièrement chromatique.

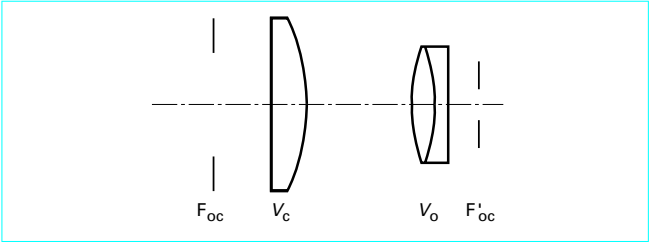


Figure 31 – Oculaire convergent positif de Kellner

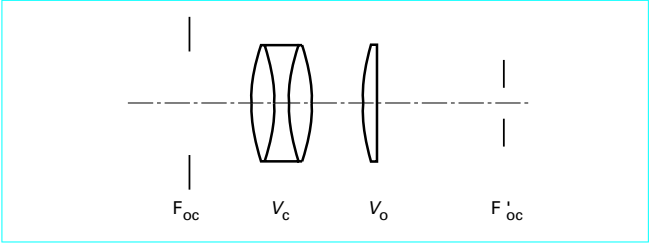


Figure 32 – Oculaire spécial pour porteurs de lunettes

3.2.2 Oculaires positifs

Les **oculaires convergents positifs** sont utilisés notamment pour y placer un micromètre ou toute autre gravure. Ils découlent du type classique de **Ramsden** (1-1-1 :  $f'_1 = e = f'_2$ ) vérifiant l’achromatisme apparent quels que soient les verres le constituant. Dans cette solution de base, il n’est guère utilisé car pratiquement inutilisable. En effet, il présente un double inconvénient. Il est de puissance égale à celle de chaque verre, et son **plan focal objet**, c’est-à-dire le plan de l’image intermédiaire, est **confondu avec le verre de champ** ; les poussières qui s’y déposent ou les empreintes digitales qu’y laisse aisément le manipulateur sont au point en même temps que l’image. De même son **plan focal image**, presque confondu avec l’anneau oculaire est **confondu avec le verre d’œil** et on ne peut y placer sa propre pupille. Pour y remédier, on a tendance à prendre un oculaire dérivé de symbole 3-2-3 où le chromatisme apparent n’existe plus. Ces oculaires possèdent moins de chromatisme longitudinal (la moitié), d’aberration sphérique (le cinquième), de distorsion (la moitié) que l’oculaire de Huygens. Corrigés de la coma, ils ont un champ apparent plus grand que l’oculaire de Ramsden et constituent les **oculaires à grand champ** (portant la gravure GC sur leur monture) et les oculaires dotés d’un réticule (micromètre ou autre). L’oculaire de **Kellner**, où le verre d’œil est constitué d’un doublet (figure 31) dérive également de l’oculaire de Ramsden.

Des oculaires spéciaux de type positif existent également pour **porteurs de lunettes** dont la pupille de sortie est très éloignée de l’intention notamment des observateurs devant conserver leurs verres correcteurs, notamment s’ils sont astigmatiques ou très myopes (la myopie moyenne et l’hypermétropie pouvant dans une très large mesure être compensées par un changement de mise au point du microscope). Le plus courant est un oculaire positif dont le verre de champ est constitué d’un triplet (figure 32).



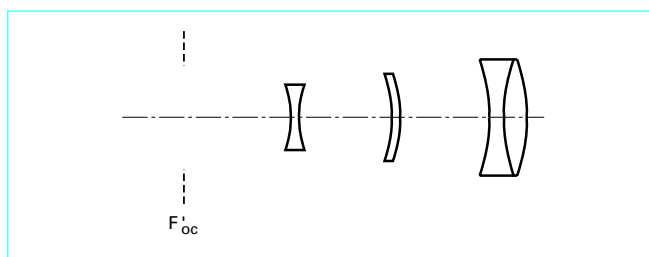


Figure 33 – Oculaire divergent projectif

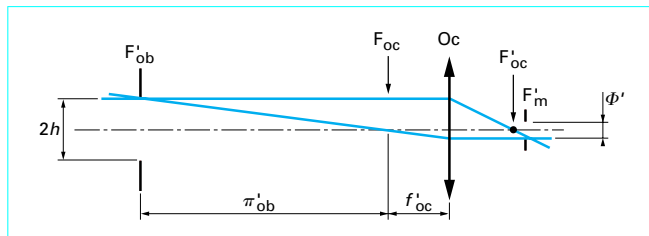


Figure 34 – Détermination du diamètre de l'anneau oculaire

### 3.2.3 Oculaires photographiques

On utilise des oculaires divergents (figure 33), de distance focale négative, à pupille de sortie  $F'_{oc}$  virtuelle donnant, à distance finie, une image réelle pouvant être dans le plan d'une émulsion photographique. De courbure de champ opposée à celle des objectifs non plans, ils en assurent la compensation.

## 4. Association objectif-oculaire

### 4.1 Grossissement optimal du microscope

Le microscope est un instrument d'optique associé à l'œil d'un observateur, et c'est ce dernier élément de la chaîne instrumentale qui forme l'image définitive. C'est donc la limite de perception de l'œil qui, finalement, limite les qualités de l'instrument. Les travaux de A. Arnulf ont montré que cette limite de perception de l'œil varie, à luminance du champ donnée, en fonction du diamètre de sa pupille ; il a défini une fonction : l'**efficacité résolvante de l'œil**  $\sigma$ , égale au produit de la limite de perception angulaire de l'œil  $\varepsilon$  et du diamètre  $\Phi_o$  de sa pupille, indiquant entre quelles limites devait être diaphragmée cette pupille pour que la limite de perception soit la meilleure. Pour les luminances moyennes rencontrées en microscopie, pour lesquelles le diamètre naturel de la pupille serait de l'ordre de 2 mm, la limite de perception est optimale si elle est diaphragmée à un diamètre  $\Phi_o$  compris entre 0,5 et 0,8 mm. En réalité, eu égard à l'allure des variations de  $\sigma$  en fonction de  $\Phi_o$ , c'est surtout la limite inférieure qui est fondamentale. Dans ces conditions, la pupille de sortie du microscope (figure 34) doit avoir au minimum un diamètre de :

$$\Phi' \geq \Phi_o \geq 0,5 \text{ mm}$$

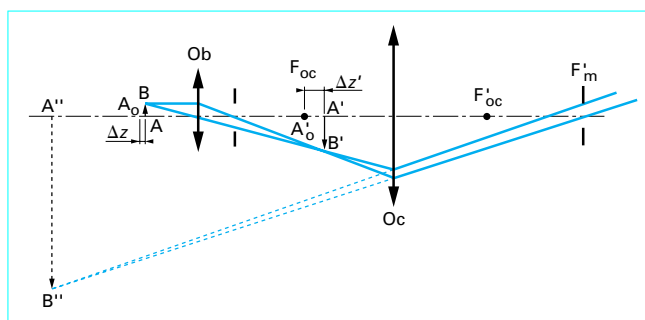


Figure 35 – Détermination de la latitude de mise au point du microscope

On a :

$$\Phi' = 2 h f'_{oc} / \pi'_{ob} = 2 f'_{ob} n \sin U (f'_{oc} / \pi'_{ob}) = 2 n \sin U / g_{ob} P_{oc} = 500 n \sin U / G_m$$

puisque  $h/f'_{oc} = n \sin U$  et avec  $\Phi'$  exprimé en millimètres.

Le grossissement optimal du microscope  $G_m$ , de pupille de sortie correspondant à la limite de perception optimale de l'œil doit donc être tel que :

$$G_m \leq 1\,000 n \sin U$$

Le choix d'un grossissement de microscope ne se fera donc pas par simples choix d'un grandissement d'objectif et d'un grossissement d'oculaire. En fonction de l'objet étudié, c'est-à-dire en fonction de la **résolution** souhaitée, on choisit l'objectif d'ouverture numérique  $n \sin U$  requise, ce qui impose un grandissement  $g_{ob}$ . On lui associera l'oculaire de grossissement  $G_{oc}$  tel que l'ensemble des deux vérifie au mieux la relation ci-dessus, ce qui conduit aux compositions limites idéales :

Objectif	10/0,25	25/0,45	40/0,65	60/0,85	100/1,25
Oculaire	25x	16x	16x	12,5x	12,5x

### 4.2 Latitude de mise au point du microscope

On a vu précédemment qu'objectif et oculaire, pour des raisons de correction, devaient rester rigidement liés et qu'il n'était possible, pour conserver sa qualité à l'image  $A'B'$  d'un objet  $AB$ , que de dépointer l'ensemble par rapport au plan du point stigmatique  $A_o$  (figure 35) d'une quantité au maximum égale à :

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

Un raisonnement, analogue à celui retenu pour déterminer cette limite dans l'espace objet, appliqué dans l'espace image, nous aurait conduit à un décalage maximal tolérable de l'image intermédiaire  $A'B'$  par rapport au plan du point image stigmatisme  $A'_o$ , c'est-à-dire par rapport au plan focal objet de l'oculaire égal à :

$$\Delta z' = \pm \lambda / 4 n' (1 - \cos U') = \pm \lambda / 2 U'^2 = \pm (\lambda / 2) (g_{ob} / n \sin U)^2$$

Dans ces conditions l'image définitive  $A''B''$  n'est plus à l'infini et sa distance à l'anneau oculaire, c'est-à-dire au plan focal  $F'_m$  du microscope est la plus courte distance d'accommodation, égale à l'inverse de la **puissance d'accommodation**  $P_{ac}$ , que l'on pourra

admettre. En négligeant la distance de l'anneau oculaire au plan focal image de l'oculaire devant la distance d'accommodation et, par application de la formule de conjugaison de Newton (seule parfaitement adaptée au microscope), on vérifiera que :

$$P_{ac} = \pm \Delta z' / f'_{oc}{}^2 = \pm (\lambda/2) (g_{ob}/f'_{oc})^2 (1/n \sin U)^2 = \pm (\lambda/2) (P_m/n \sin U)^2$$

Si les puissances sont exprimées en dioptries ( $\lambda$  étant alors exprimée en mètres) :

$$P_m = 4 G_m$$

et

$$P_{ac} = \pm 8 \lambda (G_m/n \sin U)^2$$

et, numériquement, en supposant que le grossissement du microscope soit optimal et égal à  $1000 n \sin U$  :

$$P_{ac}(\delta) = \pm 8 \times 10^6 \lambda \text{ (m)} = \pm 8 \lambda \text{ (}\mu\text{m)} = \pm 4,5 \delta$$

Cela est acceptable, mais nécessite quand même que les forts amétropes conservent leurs verres correcteurs pour l'observation, ce qui a entraîné la conception des oculaires pour porteurs de lunettes.

### 4.3 La photographie en microscopie

L'information contenue dans l'image microscopique peut être enregistrée sur une émulsion photographique. Quelques précautions sont nécessaires. Obtenir une photographie de tout ou partie du champ implique la formation d'une image réelle à distance finie. La plupart des statifs actuels sont dotés d'une sortie permettant cette procédure également applicable à la prise de vue vidéo. S'il n'en est pas ainsi, *dépointer l'oculaire* comme cela était possible sur les anciens statifs dotés d'un tube porte-oculaire coulissant est à proscrire pour les raisons que nous venons d'invoquer dans le précédent paragraphe. L'emploi d'un oculaire photographique est préférable, mais cet équipement est devenu rare sinon inexistant. Placer l'émulsion ou la surface réceptrice photosensible directement dans le plan de l'image intermédiaire n'est possible qu'avec les objectifs plans et la structure des statifs se prête rarement à cette possibilité. Néanmoins, cette solution est favorable au plan de la stabilité et les dimensions de l'image sont compatibles avec celles des petits formats photographiques ou cinématographiques, de même qu'avec celui des caméras vidéo CCD. Il faudra néanmoins vérifier, surtout avec les objectifs faibles, que ce n'est pas la granularité de l'émulsion ou la définition de la mosaïque CCD qui vient limiter la résolution.

La méthode la plus sûre est d'associer un objectif photographique  $O_p$ , suivi de sa chambre, réglé sur l'infini (figure 36). De distance focale  $f'_p$ , il fournit une image photographique de l'image intermédiaire

diaire au grandissement  $g_p = f'_p/f'_{oc}$ , soit de l'objet au **grandissement photographique** :

$$\gamma = g_{ob} g_p$$

Dans le cas général, il y a intérêt à limiter le champ pour en éliminer les parties les plus affectées par la courbure et il y aura toujours lieu de vérifier que le choix des composants est tel que la résolution de l'objectif soit conservée. Pratiquement, cela conduit à des grossissements  $g_p$  de l'ordre de 2 à 4 en petit format et de 10 en format 9 cm x 12 cm.

Il faut naturellement veiller à ce que la pupille d'entrée de l'objectif photographique (son diaphragme d'ouverture) soit confondue avec la pupille de sortie du microscope, afin d'éviter diaphragmation ou perte de contraste sur les bords du champ (phénomène dit de *vignettage*), ce qui est réalisé par construction quand l'équipement existe au catalogue, mais ne peut l'être par adaptation d'une chambre d'amateur. Dans ce cas, il suffira d'ouvrir son diaphragme au maximum, le nombre d'ouverture effectif :

$$N = f'_p/\Phi' = f'_p/2U' \quad f'_{oc} = g_p/2U'$$

compris entre 20 et 40  $g_p$  étant beaucoup plus fort, compte tenu des ouvertures  $U'$  existantes. Ce très grand nombre d'ouverture entraîne en général des temps de pose très longs.

## 5. Éclairage du microscope

### 5.1 Besoin et moyens

Les objets examinés en microscopie sont rarement lumineux par eux-mêmes et il est nécessaire de les éclairer. Compte tenu d'une part du faible rapport du diamètre  $\Phi'$  de la pupille de l'instrument à celui,  $\Phi_o$ , qu'aurait la pupille de l'œil s'il observait directement l'objet, d'autre part du facteur de transmission  $T$  de l'instrument réduit par le nombre important de verres et de surfaces, la **clarté** du microscope :

$$C = (T/n^2) (\Phi'/\Phi_o)^2$$

rapport des éclairages rétinien en observation à travers l'instrument et à l'œil nu est très faible (de l'ordre de un pour cent). L'emploi d'une source lumineuse auxiliaire associée à un dispositif d'éclairage devient nécessaire pour assurer un éclairage uniformément intense de l'objet.

L'**ensemble source** est constitué d'une **lampe** et d'un **collecteur**, système optique destiné à concentrer le flux émis par la lampe.

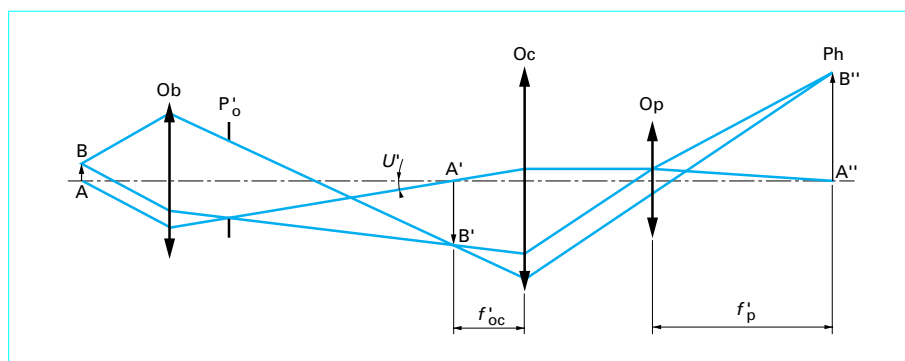


Figure 36 – Schéma du microscope photographique

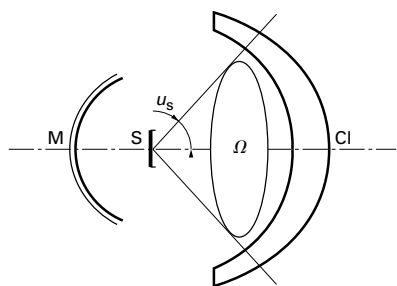


Figure 37 – Ensemble source-collecteur

■ Deux types de lampes sont essentiellement utilisés :

— des lampes à filament de tungstène, ou lampes « auto », généralement en atmosphère halogénée afin d'en accroître la durée de vie avec une luminance constante, de température de l'ordre de 2 800 K, à filament plat augmentant leur luminance et la rendant plus uniforme, alimentées en courant basse tension ou directement par le secteur ;

— des lampes à décharge à arc court et haute pression en atmosphère de mercure ou de xénon de quelques centaines d'heures de durée de vie, à température de couleur proche de celle du soleil (longtemps utilisé en microscopie concurremment avec le ciel uniformément diffus), fournissant une lumière pratiquement blanche par émission d'un spectre de larges raies intenses sur fond continu, alimentées en courant alternatif ou continu, de puissance comprise entre 50 et 200 W avec des luminances de quelques  $10^8$  cd/m<sup>2</sup> pour une surface d'arc de l'ordre de un millimètre carré.

■ Le collecteur CI sert à prélever la plus grande partie du flux fourni par ces sources qui émettent pratiquement dans un angle solide de  $4\pi$ . Le flux  $\Phi$  transmis par le collecteur est égal au produit de la luminance  $L$  de la source et de l'étendue géométrique  $G$  du faisceau, elle-même égale au produit de l'aire  $S$  de la source et de l'angle solide  $\Omega$  dans lequel elle émet (figure 37) :

$$\Phi = LG = LS\Omega = \pi L S \sin^2 u_s$$

où  $\sin u_s$  est l'ouverture numérique du collecteur. Pour augmenter ce flux, on ne peut, la luminance étant intrinsèquement donnée, qu'augmenter l'étendue géométrique sans toutefois qu'elle n'excède celle des différents espaces du microscope. Augmenter l'aire de la source risquant d'introduire une variation spatiale de luminance, on utilise un collecteur ayant la plus grande ouverture possible.

Il est d'autre part possible de récupérer le flux émis vers l'arrière à l'aide d'un miroir sphérique M centré dans le plan de la source formant une image du filament dans ses vides, ce qui pratiquement double le flux utile.

## 5.2 Éclairage fond clair

Ce type d'éclairage où l'objet est directement illuminé est le plus classique en microscopie. La solution la plus simple, longtemps utilisée, consiste à projeter directement la source dans le plan de l'objet à l'aide du collecteur. Cet **éclairage critique** présente, sous cette forme, l'inconvénient de ne pas être uniforme, l'image du filament étant confondue avec celle de l'objet. On y remédie donc en dépointant légèrement la source ou, mieux, en formant son image dans le plan d'une surface légèrement absorbante faiblement dépolie placée au voisinage du plan objet. Du fait des aberrations du collecteur, l'image de chaque point de la source n'est pas ponctuelle et, dans ces conditions, chaque point de l'objet est éclairé partiellement

par plusieurs points de la source ou, plus clairement, des points voisins de l'objet reçoivent de la lumière provenant d'un même point de la source, ce qui définit un éclairage partiellement cohérent avec les avantages en résolution exposés précédemment. Cet état est encore plus manifeste avec l'emploi du verre dépoli. Néanmoins, dans cette solution, l'ensemble du flux transmis par le collecteur peut ne pas pénétrer intégralement dans la pupille et, ainsi, ne pas contribuer entièrement à la formation de l'image. Cette remarque justifie pleinement l'intérêt de l'éclairage introduit en 1893 par Köhler.

### 5.2.1 Éclairage de Köhler

Cet éclairage (figure 38) consiste à projeter la source S dans le plan de la pupille d'entrée du microscope, matérialisée par un diaphragme iris  $D_o$  placé dans le plan focal objet d'un condenseur Cd situé en avant de l'objet. Chaque point de celui-ci recevant alors de la lumière de tous les points de la source est éclairé uniformément de même que l'est le collecteur CI. On place donc en son voisinage un second diaphragme iris  $D_c$  dont le condenseur forme une image dans le plan de l'objet afin, d'une part, d'en limiter l'étendue et, d'autre part, surtout de réduire la lumière parasite provenant de la diffusion de lumière par les parties du champ hors de ses limites de saisie et des réflexions par la paroi du tube du microscope. En modifiant la dimension du diaphragme  $D_o$ , il est possible de faire varier le degré de cohérence de l'éclairage (cohérent à diaphragme minimal, incohérent à diaphragme pleinement ouvert, partiellement cohérent aux ouvertures intermédiaires).

Régler l'éclairage de Köhler consiste donc à réaliser simultanément :

- la conjugaison optique de la source et du diaphragme d'ouverture en réglant la position du filament relativement au collecteur ;
- la conjugaison du diaphragme de champ et de l'objet par translation de l'ensemble diaphragme d'ouverture-condenseur parallèlement à l'axe optique ;
- le centrage du diaphragme de champ confondant les axes optiques du collecteur et du microscope ;
- le centrage du filament pour que son image couvre le diaphragme d'ouverture ;
- le centrage du diaphragme d'ouverture pour que l'éclairage soit uniforme, son image donnée par l'ensemble condenseur-objectif étant centrée dans le plan de la pupille de sortie de l'objectif ;

tout en assurant la mise au point du microscope sur l'objet.

Cette excellente manipulation de « travaux pratiques » n'est heureusement plus à réaliser aujourd'hui au laboratoire, l'éclairage de Köhler étant installé, réglé à la construction, dans les microscopes pour la position du condenseur en butée haute (les centrages des diaphragmes et le réglage de la position de la source sont encore parfois accessibles). En cas de mauvais réglage constaté soit par un éclairage non uniforme résultant d'un excentrement du diaphragme d'ouverture ou d'une mauvaise conjugaison de la source, soit par un excentrement ou un défaut de mise au point du diaphragme de champ, il est préférable de faire appel aux services du constructeur possédant l'outillage nécessaire à la correction de ces défauts.

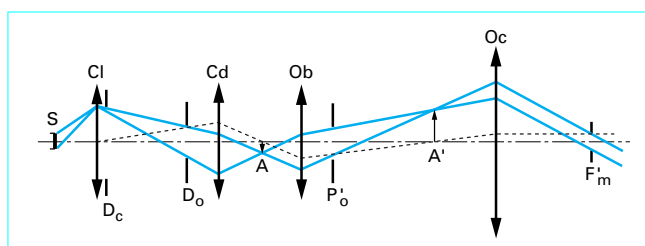


Figure 38 – Éclairage fond clair par transmission selon Köhler

Notons que, dans un instrument d'optique, l'étendue géométrique se conserve dans tous les espaces, ce qui traduit la conservation du flux lumineux, et ainsi :

$$\Phi = \pi L S \sin^2 u_s = \pi L (\pi y^2) \sin^2 u_c$$

et, pour éclairer uniformément le champ  $2y$  de l'objectif, il faut employer une source de rayon  $r_s$  au moins égal à  $y$  ( $\sin u_c / \sin u_s$ ). Les caractéristiques de la source étant généralement fixes, on peut être amené à remplacer le condenseur ou à lui ajouter une lentille lorsque l'on augmente la puissance des objectifs afin de continuer à couvrir le champ.

**Nota :** il est remarquable de constater qu'un éclairage bien réglé, allié à l'intérêt apporté par la propriété de parfocalité des objectifs (distance objet-plan d'appui équilibrée pour tous), facilite la délicate mise au point du microscope sur l'objet et limite les occasions de bris de préparation et/ou d'endommagement des objectifs. En éloignant préalablement le corps du microscope de l'objet, en utilisant l'objectif le plus faible et en ôtant l'oculaire, le diaphragme d'ouverture étant moyennement ouvert tandis que le diaphragme de champ l'est au maximum, on accommode sur le dernier verre de l'objectif voisin de sa pupille de sortie. À l'aide du mouvement rapide, on rapproche doucement le corps du microscope du plan de l'objet. Brusquement la pupille s'emplit de lumière. Dans cette position, l'oculaire étant mis en place, la mise au point doit être obtenue par simple retouche à l'aide du seul mouvement lent. On peut alors ouvrir davantage le diaphragme d'ouverture, fermer le diaphragme de champ, procéder éventuellement au centrage de l'objet, puis passer progressivement aux grossissements d'objectif supérieurs en ne retouchant qu'au mouvement lent, en améliorant le centrage de la préparation, en fermant le diaphragme de champ à chaque étape jusqu'à obtention de la résolution (ou du champ) souhaitée.

## 5.2.2 Types de condenseur

Le condenseur est un système analogue à l'objectif. Il est corrigé pour travailler avec une lame porte-objet de 1,1 mm d'épaisseur et il peut être immergé afin que son ouverture numérique atteigne celle des objectifs les plus forts. Le condenseur le plus courant est le condenseur d'Abbe (figure 39 a) constitué d'une lentille demi-boule et d'une lentille dite de *meilleure forme* permettant de réduire son aberration sphérique. L'addition de lentilles, parfois asphériques (figure 39 b), permet d'augmenter son champ. L'addition de lentilles asphériques permet également (figure 39 c) de le rendre aplanétique car, si la qualité du condenseur n'affecte pas l'imagerie, il n'est pas agréable qu'il fournisse une image trop déformée du diaphragme de champ. Les méthodes de contraste de phase et de contraste interférentiel, que nous évoquerons au paragraphe 6, imposant une meilleure qualité du condenseur notamment en ce qui concerne la correction des aberrations pupillaires, on a été amené à produire des condenseurs aplanétiques et achromatiques (figure 39 d) diminuant notamment l'irisation du diaphragme de champ.

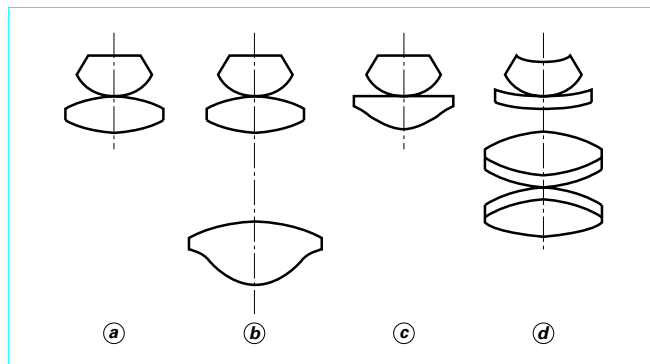


Figure 39 - Différents types de condenseur

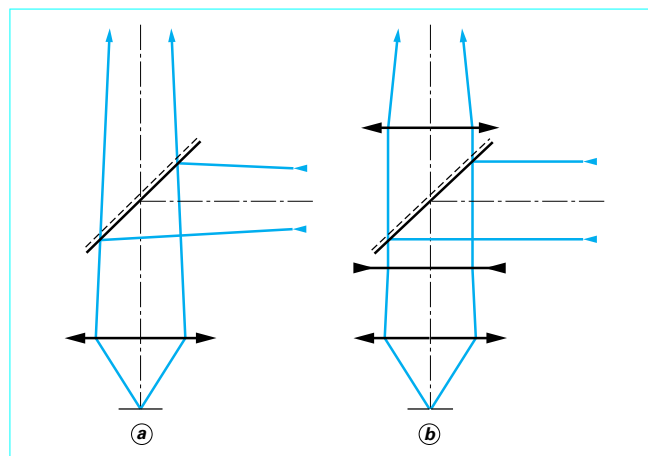


Figure 40 - Rôle de la lame semi-transparente dans l'illuminateur vertical

## 5.2.3 Éclairage en lumière réfléchie

Dans le cas de l'observation des objets réfléchissants, c'est l'objectif métallographique lui-même qui est utilisé pour éclairer l'objet, jouant ainsi le rôle de condenseur. L'éclairage produit par un **illuminateur vertical**, assurant les conjugaisons objet et pupille nécessaires, se fait le plus souvent à l'aide d'une lame semi-réfléchissante (figure 40 a) réfléchissant le faisceau d'éclairage et transmettant celui d'observation.

Une lame à face parallèle traversée par un faisceau convergent introduisant astigmatisme et coma, ces effets peuvent être réduits en lui donnant une légère forme prismatique, ou supprimés (figure 40 b) en la plaçant à l'intérieur d'un système afocal constitué de deux lentilles respectivement divergente et convergente. Cette lame, supportant une couche diélectrique assurant la séparation des faisceaux, présente des facteurs de réflexion et de transmission variant avec l'orientation du plan de polarisation, ce qui est gênant pour les types d'éclairage utilisant la lumière polarisée (microscope polarisant, contraste interférentiel). L'effet est diminué par l'emploi d'un illuminateur muni d'une lame semi-transparente moins inclinée (figure 41 a) ou d'un système à trois réflexions totales (figure 41 b) n'utilisant alors qu'une pupille partielle excentrée tant pour l'éclairage que pour l'observation, comme le faisaient les **illuminateurs opaques** (figure 41 c), premiers systèmes introduits par Nachet pour l'observation des objets réfléchissants, mettant en œuvre un miroir.

Dans sa réalisation, ce mode d'éclairage des objets réfléchissant obéit aux règles de Köhler et impose les mêmes réglages.

## 5.3 Éclairage fond noir et ultramicroscopie

En fond clair, les rayons directs, non diffractés par l'objet car traversant ses parties vides ou sans structure, pénètrent dans l'objectif. Ils produisent dans le champ image un fond clair uniforme auquel se superposent, souvent avec un faible contraste, les images des fins détails formées par les ondes diffractées dans la pupille. Dans l'**éclairage fond noir**, connu aussi sous le nom de **strioscopie**, la lumière directe est supprimée et l'on ne recueille que la lumière diffractée par l'objet dont les détails apparaissent sur un fond uniformément sombre. Cette méthode est illustrée par l'**ultramicroscopie** (figure 42) où l'objet est éclairé par un faisceau perpendiculaire à

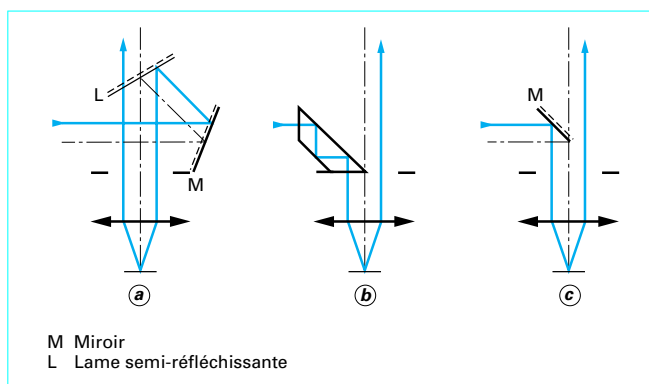


Figure 41 – Autres types d'illuminateur vertical

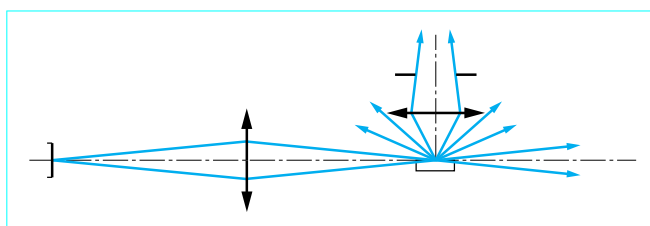


Figure 42 – Ultramicroscopie

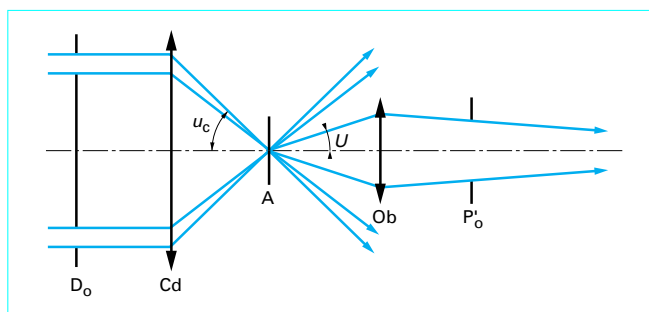


Figure 43 – Principe de l'éclairage fond noir

l'axe optique du microscope. La lumière directe ne peut pénétrer dans l'objectif qui ne reçoit que la lumière diffractée par l'objet sous des angles bien supérieurs à ceux qu'il pourrait admettre en usage normal. Les images ne sont pas vraiment conformes, mais des détails plus fins que la limite de résolution sont détectés, d'où le nom de la méthode.

L'ultramicroscopie n'a pratiquement plus qu'une valeur historique à cause de ses difficultés de mise en œuvre. L'éclairage fond noir est généralement obtenu en lumière transmise par un éclairage annulaire produit par un anneau  $D_o$  placé dans le plan focal objet du condenseur Cd (figure 43) dont l'ouverture minimale est supérieure à celle de l'objectif, ou en employant un condenseur spécial à deux miroirs (figure 44) sphériques ou non (condenseur cardioïde) corrigé de l'aberration sphérique.

De même, en lumière réfléchie, on utilise un condenseur annulaire entourant solidement l'objectif (figure 45) qui peut être également utilisé en fond clair (systèmes *Epilum*, *Ultropak*, *Epityp*...).

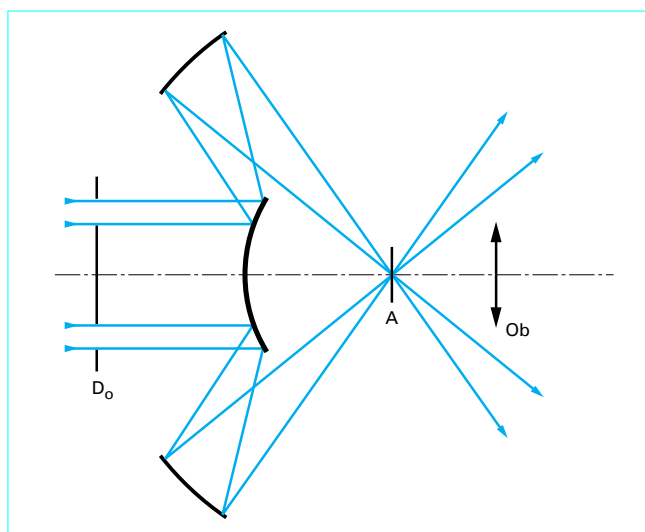


Figure 44 – Condenseur fond noir à miroirs

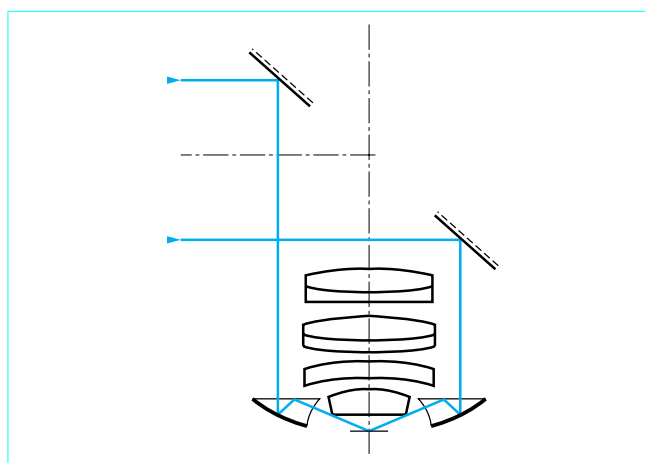


Figure 45 – Éclairage fond noir par réflexion ou épiscopique

## 6. Microscopie des objets de phase

### 6.1 Objet de phase

Certains objets ne sont pas visibles en microscopie parce qu'étant parfaitement transparents, il n'existe aucune variation d'absorption (ou de réflexion pour les objets réfléchissants) dans leur structure et, ainsi, leurs différentes zones ne se différencient par aucune variation de contraste. Par contre, ils présentent entre leurs points des différences d'épaisseur et/ou d'indice de réfraction. Lorsqu'une onde lumineuse traverse de tels objets, ou s'y réfléchit, elle parcourt des chemins optiques (produits de l'indice de réfraction et de l'épaisseur) variables, avec un trajet plus ou moins long suivant que le milieu est plus ou moins épais, à une vitesse plus ou moins

grande suivant que l'indice est plus ou moins faible. Ces variations de chemin optique  $\Delta$  se traduisant par des déformations de la surface d'onde transmise ou réfléchiée respectivement égales à  $|(n' - n)e|$  pour un objet transparent d'épaisseur locale  $e$ , d'indice  $n'$ , immergé dans un milieu d'indice  $n$  (figure 46 a) et à  $2e$  pour un objet réfléchissant (figure 46 b). Les surfaces d'onde étant de surfaces équiphases, et la phase variant de  $2\pi$  lorsque la lumière parcourt un chemin optique égal à la longueur d'onde  $\lambda$ , ces déformations sont équivalentes à des déphasages introduits par l'objet tels que :

$$\varphi = 2\pi \Delta / \lambda$$

L'examen de tels objets impose la mise en évidence de ses variations de phase. Des techniques d'observation comme le **contraste de phase** et l'**interférométrie** permettent d'atteindre ce but.

## 6.2 Contraste de phase

Cette méthode a été imaginée en 1934 par le Hollandais Zernicke et lui valut le prix Nobel de physique en 1953. Elle permet de rendre visibles les variations de phase en les transformant en variations d'intensité. Supposons (figure 47) une source ponctuelle S au foyer d'un condenseur achromatique et aplanétique. Le faisceau issu de la source fournit une onde plane qui traverse l'objet. Si l'on admet l'objet vide, après traversée de l'objectif, cette onde, devenue sphérique, converge en S' dans le plan de la pupille de sortie et éclaire uniformément le plan de l'image intermédiaire. C'est le **faisceau de lumière directe**. S'il existe dans l'objet un détail déphasant B non dénué de dimension, il diffracte la lumière dans un angle d'autant plus grand qu'il est de plus faible dimension. Le **faisceau de lumière diffractée** s'étale dans le plan de la pupille et vient converger en B' image de B.

Les deux ondes directe et diffractée, issues d'un même point source sont cohérentes entre elles et peuvent donc interférer. L'image observée en B' résulte donc des interférences entre ces deux ondes et, dans un diagramme de Fresnel, peut être représentée (figure 48 a) par un vecteur **OB'** de même norme (puisque'il n'y a pas variation d'absorption et si l'on suppose que l'objectif recueille toute la lumière diffractée) que celle du vecteur **OA'** représentant l'onde directe, déphasé de l'angle  $\varphi$ . **OB'** résultant donc des interférences entre onde directe **OA'** et onde diffractée **D**, on vérifie que :

$$\mathbf{OB}' = \mathbf{OA}' + \mathbf{D} = \mathbf{OA}' + \mathbf{A'B}'$$

Le vecteur **A'B' = D** représente donc l'onde diffractée et si nous considérons que le déphasage est très faible, on peut admettre que les vecteurs **OA'** et **A'B'** représentant respectivement les ondes directe et diffractée sont en **quadrature de phase**.

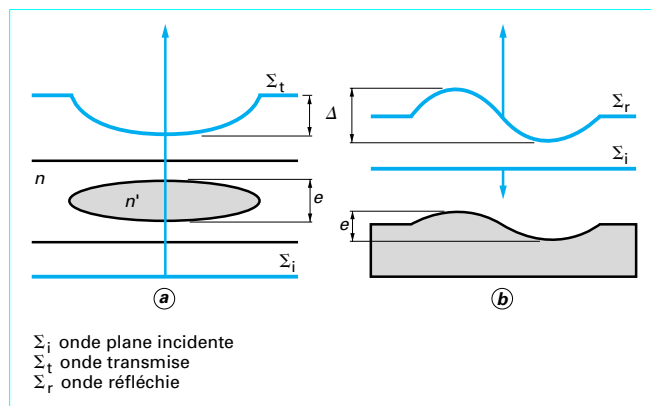


Figure 46 – Action d'un objet de phase sur une onde plane incidente

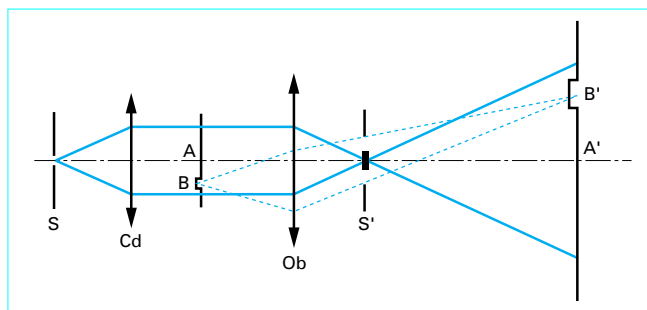


Figure 47 – Schéma explicatif du contraste de phase

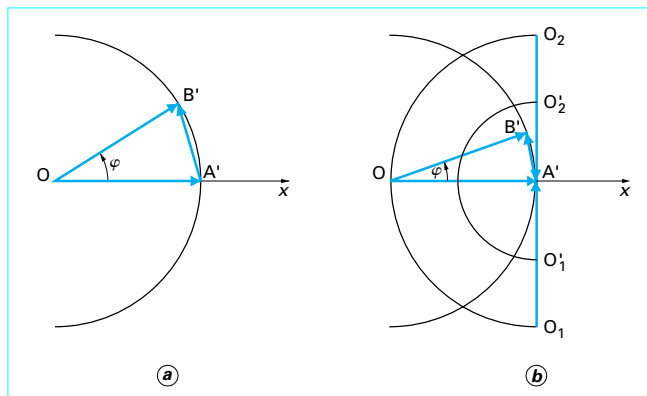


Figure 48 – Principe du contraste de phase

Supposons alors que l'on place en S' image de S (figure 47) une lame recouvrant l'image de la source d'indice et d'épaisseur tels qu'elle avance ou retarde de  $\pi/2$  (lame quart d'onde) d'onde directe. Elle n'affecte pratiquement que cette onde et le vecteur **OA'** devient (figure 48 b), suivant qu'elle avance ou retarde, **O<sub>1</sub>A'** ou **O<sub>2</sub>A'**, pratiquement en **phase** ou en **opposition de phase** avec le vecteur **A'B'**. Le vecteur résultant des interférences entre les deux ondes, en supposant que la norme de **OA'** (et de **OB'**) soit égale à l'unité, est alors de norme égale à :

$$(1 \pm \varphi)$$

et l'intensité en B' est égale à :

$$(1 \pm \varphi)^2 \approx 1 \pm 2\varphi$$

alors que celle du fond est égale à l'unité. Son **contraste** par rapport au fond n'est plus nul mais égal à  $\pm \varphi$ .

Si la lame de phase *avance* (+) l'onde directe d'un quart d'onde (épaisseur optique  $3\lambda/4$ ), à une avance de phase ( $\varphi > 0$ ) correspond une augmentation d'éclairement, à un retard de phase ( $\varphi < 0$ ) une baisse d'éclairement, c'est le **contraste de phase positif**. Inversement, si la lame de phase *retarde* (-) l'onde directe d'un quart d'onde (épaisseur optique  $\lambda/4$ ), à une avance de phase correspond une baisse d'éclairement et vice versa, c'est le **contraste de phase négatif**. Pour améliorer la sensibilité de la méthode, le contraste restant faible, la lame de phase est également absorbante. De facteur de transmission en amplitude  $t < 1$  (donc de facteur de transmission  $t^2$  en intensité), son but n'est pas seulement de faire tourner le vecteur **OA'**, mais encore de réduire sa norme à la valeur  $t$  (ce qui



amène O en  $O'_1$  ou  $O'_2$ ) sans affecter celle de **A'B'**. Dans ces conditions l'intensité en B' devient :

$$I_{B'} = (t \pm \varphi)^2 \approx t^2 \pm 2 t \varphi$$

et, quoique le niveau moyen d'éclairement soit diminué, le contraste égal à  $\pm \varphi/t$  est amélioré.

Avancer ou retarder l'onde directe d'un quart d'onde n'est qu'une solution approchée favorable aux faibles déphasages. Pour des valeurs notables, **OA'** et **A'B'** ne peuvent être considérés en quadrature et, pour que l'éclairement de l'image de l'objet de phase soit maximal ou minimal par rapport à celui du fond, l'onde directe **OA'** doit être amenée en phase ou en opposition de phase avec l'onde diffractée **A'B'** et venir, dans le diagramme de Fresnel (figure 49 a), occuper la position **OA'\_1** ou **OA'\_2**, c'est-à-dire subir les déphasages  $\psi_1$  ou  $\psi_2$  égaux à  $\pm \pi/2 + \varphi/2$ . Le contraste est alors optimal. Il est égal à l'unité si l'éclairement est nul en B', ce qui nécessite (figure 49 b) d'absorber l'onde directe avec une lame de facteur de transmission  $t = 2 \sin |\varphi/2|$  en amplitude.

Il existe des contrastes de phase variables répondant à la question. Cette terminologie est à double sens : ils s'adaptent à la phase variable de l'objet et, pour une phase donnée, il est possible de faire varier le contraste de l'image. Ces dispositifs, au catalogue de rares constructeurs, sont fondés sur l'emploi de composants travaillant en lumière polarisée, dont les orientations relatives permettent d'adapter déphasage et absorption, et ainsi de mesurer la phase puisque ces paramètres en sont fonction.

Dans la pratique, on n'utilise pas une source lumineuse et une lame de phase ponctuelles, ou centrales de faibles dimensions, pour réaliser les dispositifs à contraste de phase, la diffraction de l'onde directe par la lame de phase diminuant la qualité de l'image en produisant des franges sur ses bords. À surface égale, ce phénomène de halo est moins important avec une lame de phase et une source annulaires, et c'est sous cette forme que les dispositifs à contraste de phase sont réalisés.

## 6.3 Interférométrie en microscopie

Les déformations apportées à la surface d'onde par l'objet de phase peuvent être mises en évidence, et éventuellement mesurées, par interférométrie. Suivant son mode de fonctionnement, cette dernière peut être classée en trois catégories qui sont toutes utilisées pour des applications en microscopie.

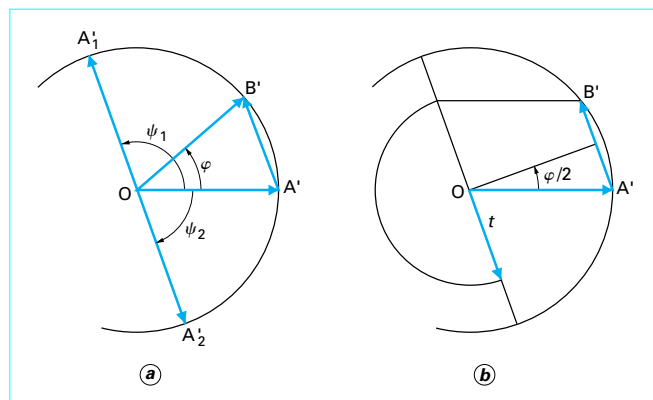


Figure 49 – Principe du contraste de phase variable

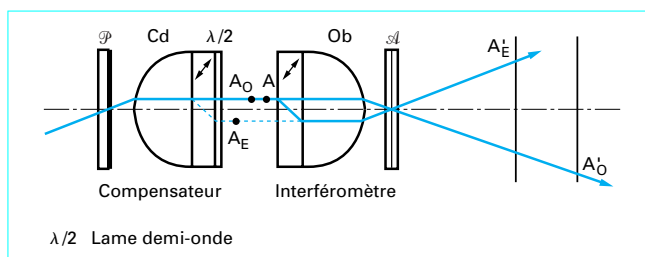


Figure 50 – Schéma de l'interféromètre Jamin-Lebedev

■ En **interférométrie normale**, l'onde incidente est **totale** **dédoublee** et les deux ondes obtenues cheminent suivant deux trajets entièrement distincts, l'objet étant placé sur l'un d'entre eux. Après recombinaison, l'onde empreinte des déformations introduites par l'objet et l'onde de référence interfèrent, et la différence de marche variable due à l'objet est mise en évidence et mesurable. La séparation totale des deux ondes impose des statifs spéciaux que l'on ne rencontre pratiquement plus qu'en métallographie.

■ En **interférométrie à double foyer**, l'onde incidente est **dédoublee longitudinalement**. Il en est de même de l'image de l'objet donnée par le microscope, mais seule une de ces images est au point. La phase de l'onde correspondante est modifiée par les variations locales d'épaisseur optique, alors que l'effet sur l'autre onde, servant d'onde de référence, est celui de l'épaisseur optique moyenne de l'objet et de l'espace environnant. L'interférogramme obtenu est comparable à un interférogramme normal. Rarement produits suivant une conception fragile, les interféromètres de ce type ont disparu des catalogues mais ils conservent l'intérêt d'être à l'origine du modèle d'interféromètre différentiel le plus répandu.

■ En **interférométrie différentielle**, après **dédoublement latéral** de l'onde incidente en deux ondes subissant l'influence de l'objet, leur recombinaison fournit un interférogramme mettant en évidence la différence de chemin optique entre deux points de l'objet séparés par une distance égale au dédoublement. Ce type d'interféromètre, presque essentiellement construit sous une forme unique, est le plus utilisé pour la visualisation des objets de phase. Il dérive de l'interféromètre à **double réfraction** (ou à polarisation) le plus anciennement connu, décrit par Jamin en 1868 et appliqué à la microscopie par Lebedev en 1930.

### 6.3.1 Interféromètre de Jamin-Lebedev

Constitué d'une lame à faces parallèles d'un cristal biréfringent (spat d'Islande) d'axe optique incliné à  $45^\circ$  sur les faces (figure 50) placée devant l'objectif Ob, il donne de l'objet A une **image ordinaire**  $A_O$  au point pour l'objectif et une image extraordinaire  $A_E$  dépointée et décalée latéralement, fortement (et fondamentalement) astigmatique. L'onde ordinaire correspondante porte l'empreinte des déphasages introduits par l'objet. Il en est de même de l'onde extraordinaire qui est d'autre part très déformée par l'astigmatisme et suffisamment dépointée pour que chaque point de l'objet « voie » l'ensemble de cette onde. Grâce à cette référence commune à tous les points de l'objet, l'interférogramme obtenu est normal.

Les deux ondes, ordinaire et extraordinaire, sont polarisées perpendiculairement par l'action d'un polariseur  $\mathcal{P}$  orienté à  $45^\circ$  du plan de section principale du cristal. Les interférences sont possibles en repolarisant les deux ondes dans le même plan à l'aide d'un analyseur  $\mathcal{A}$  croisé avec le polariseur. Au déphasage introduit par l'objet s'ajoute celui que produit l'interféromètre entre les deux ondes. Très grand par l'épaisseur du cristal, choisie pour augmenter le dédoublement, et variable avec l'inclinaison des ondes provenant d'une source étendue, l'interférogramme ne serait pas visible si les déphasages propres à l'interféromètre n'étaient compensés par un



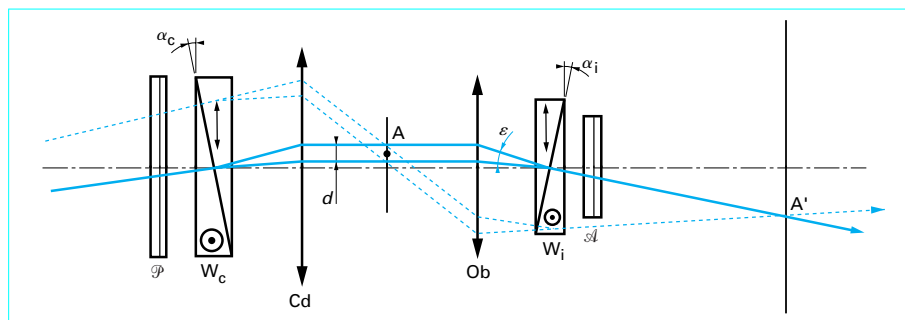


Figure 51 – Interférométrie différentielle à deux ondes polarisées

ensemble placé en avant de l'objet constitué d'une lame cristalline strictement identique à l'interféromètre, produisant donc le même déphasage entre les deux ondes, accompagnée d'une lame demi-onde d'axe lent orienté à  $45^\circ$  du plan de section principale commun aux deux cristaux dont l'effet est d'échanger les directions de polarisation des deux ondes.

### 6.3.2 Interférométrie différentielle

Le système d'interféromètre à double foyer décrit précédemment produit un dédoublement latéral des deux ondes et peut donc donner naissance à un interféromètre différentiel. En réduisant suffisamment l'épaisseur des cristaux de l'interféromètre, ce dédoublement latéral peut être exploitable sans que le défaut de mise au point de l'image extraordinaire soit intolérable. Néanmoins, cette solution présente certains inconvénients. Les cristaux placés dans l'espace objet limitent, par leur épaisseur, l'ouverture numérique des objectifs et imposent le calcul d'objectifs spéciaux dont la correction tient compte de cette épaisseur. Pour la réduire l'emploi d'un cristal de forte biréfringence (différence entre les indices de réfraction extraordinaire et ordinaire) tel le spath est un avantage, mais ce cristal est particulièrement fragile car se clivant aisément sous un choc et son emploi dans un espace libre n'est pas recommandé à cause de son caractère hydrophile. Enfin l'astigmatisme de l'image reste un défaut gênant. Pour remédier en partie à ces défauts, Françon a proposé un oculaire interférentiel où l'interféromètre est un polariscopes de Savart, constitué de deux lames de Jamin croisées séparées par une lame demi-onde, qui a pour avantages de travailler dans un espace mieux protégé et de rendre les deux images au moins également astigmatiques.

La solution la plus répandue (figure 51) dérive de l'emploi d'un biprisme de Wollaston  $W_i$  placé entre polariseurs croisés orientés à  $\pm 45^\circ$  de ses axes (afin que les amplitudes des deux ondes soient égales et que le contraste de leur figure d'interférences soit égal à l'unité). Situé dans le plan de la pupille de sortie de l'objectif (son plan focal image), il produit deux ondes polarisées perpendiculairement décalées angulairement dans la direction perpendiculaire à l'arête du prisme de :

$$\varepsilon = 2 \Delta n \tan \alpha_i$$

avec  $\Delta n = n_e - n_o$  biréfringence du cristal (le plus souvent du quartz),

$\alpha_i$  angle du prisme.

Ce décalage angulaire correspond, dans l'espace objet, à un décalage latéral des ondes :

$$d = f'_{ob} \varepsilon$$

La compensation du déphasage variable introduit par l'obliquité des faisceaux (emploi d'une source large), l'interféromètre étant traversé à des hauteurs différentes, est obtenu en plaçant un biprisme

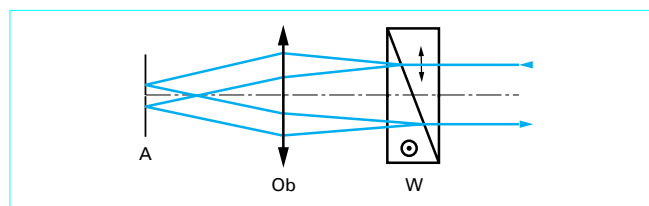


Figure 52 – Interféromètre à polarisation, autocompensé par réflexion

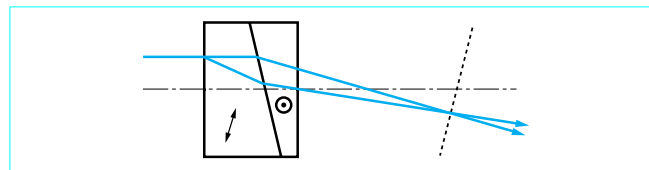


Figure 53 – Schéma du prisme interférentiel de Nomarski

compensateur  $W_c$  dans le plan de la pupille d'entrée du condenseur, d'angle  $\alpha_c$  tel que :

$$f'_{cd} \tan \alpha_c = f'_{ob} \tan \alpha_i$$

**Nota :** cette conjugaison demande un condenseur de haute qualité et est difficile à réaliser pour de larges dédoublements pour lesquels un éclairage en fente est préférable. Par contre, en microscopie par réflexion, son image par autocollimation sur l'objet (figure 52) étant au grandissement  $-1$ , l'interféromètre est autocompensé.

Ce système simple, proposé par Smith, ne peut pas être utilisé avec les objectifs forts dont le plan pupillaire est interne à la combinaison. Afin que le plan de dédoublement angulaire des ondes (ou plan de localisation des franges propres à l'interféromètre) soit confondu avec le plan de la pupille, Nomarski a proposé un biprisme dérivé du Wollaston (figure 53), à prismes d'inégales épaisseurs dont l'un est à axe incliné, permettant de sortir de ce plan de localisation. Cette solution est aujourd'hui adoptée par la grande majorité des constructeurs.

Dans cette position (plan de dédoublement dans le plan de la pupille), l'interférométrie est en *teinte plate* (les ondes ne sont pas basculées dans l'espace objet) qu'il est possible de modifier, en agissant donc sur la compensation, par translation de l'interféromètre dans la direction du dédoublement.

Pour les objets étendus, dont la structure est complexe, cette interférométrie à dédoublement latéral est une méthode de visualisation très appréciée, sous réserve que le dédoublement soit infiniment petit et, en toute rigueur, inférieur à la limite de résolution de l'objectif, afin que le dédoublement de l'image ne soit pas visible.

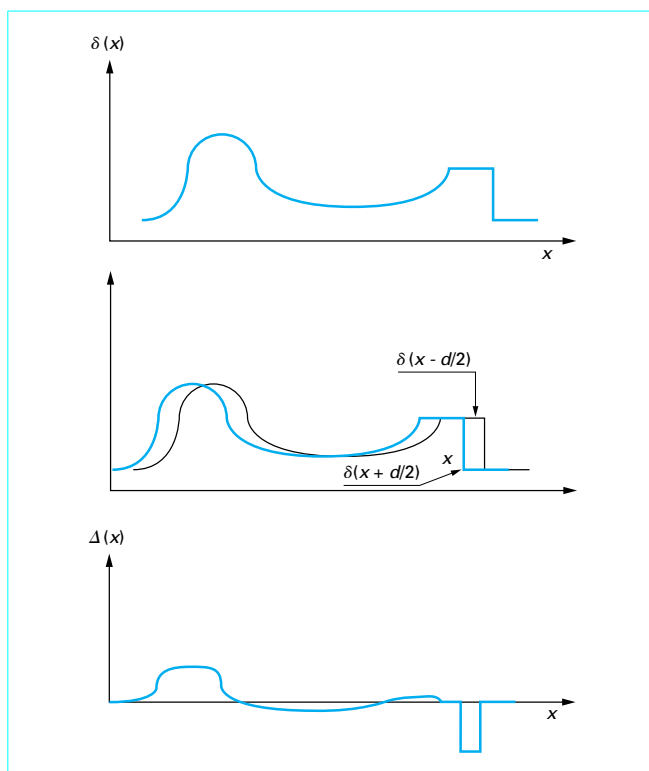


Figure 54 – Élaboration de l'onde résultante en contraste interférentiel

Dans ce cas (connu sous le nom de **contraste interférentiel**), si le dédoublement  $d$  est effectué dans la direction  $x$  (figure 54), en tout point introduisant une variation de chemin optique  $\delta(x)$ , la différence de marche  $\Delta(x)$  entre les deux ondes est :

$$\Delta(x) = \delta(x + d/2) - \delta(x - d/2) \approx \delta'(x) d$$

avec  $\delta'(x)$  gradient (la dérivée) de  $\delta(x)$ .

La différence de marche mise en évidence par interférences est donc une fonction linéaire de la pente de la différence de marche introduite par l'objet. Cette méthode très sensible de visualisation du **gradient** de la phase est concurrente et parfois complémentaire du contraste de phase. Il y a lieu de noter que l'effet directif propre au dédoublement peut nécessiter des examens de l'objet suivant plusieurs orientations par rapport à ce dédoublement pour éviter toute perte d'information.

En pratique, le schéma instrumental est celui de la figure 51. Le biprisme interféromètre forme un dédoublement  $d$  de l'ordre de la moitié de la limite de résolution absolue de l'objectif, soit :

$$d = f_{\text{ob}}' \varepsilon = \lambda / 4 n \sin U$$

Il est donc de dédoublement angulaire  $\varepsilon = \lambda / 4h$ , où  $h$  est le rayon de la pupille de sortie, ce qui entraîne un angle  $\alpha_i$  de quelques minutes d'arc seulement que de rares ateliers sont capables de réaliser.

Deux solutions sont adoptées par les constructeurs, soit qu'ils n'associent qu'un seul interféromètre, ou **prisme principal**, de dédoublement moyen adapté à tous les objectifs, à une série de **prismes auxiliaires** (à raison d'un par objectif) montés dans une tourelle tournant dans le plan de la pupille du condenseur, soit qu'au contraire chaque objectif dispose de son propre interféromètre complété d'un prisme compensateur unique.

## 7. Méthodes particulières de microscopie

### 7.1 Microscope polarisant

Ce microscope est utilisé pour l'étude des objets transparents (ou rendus tels par coupe mince) **biréfringents** ou réfléchissants **biabsorbants**. Il offre un intérêt particulier en minéralogie, cristallographie, pétrographie, paléontologie et constitue également une source d'information en métallographie, en chimie et dans tout le secteur biomédical. Il permet l'identification des cristaux constituant l'objet ou qui y sont inclus, leur orientation par rapport au plan d'observation, la détection et la localisation des contraintes, l'évaluation du comportement des matériaux. Conçu comme un instrument de mesure, il délivre une information quantitative. Son très vaste domaine, fondé sur l'interaction de la matière avec la lumière polarisée, concerne la détermination du signe et la mesure de la biréfringence (différence entre les indices de réfraction extraordinaire et ordinaire), celle de la biabsorbance (différence entre les indices d'extinction, partie imaginaire de l'indice de réfraction), le repérage du plan de section principale, des lignes neutres, des directions d'axe, la mesure de l'angle des axes des cristaux biaxes, de la dispersion des axes conduisant à la caractérisation du **système cristallin**. Nous donnons ici un bref aperçu des possibilités de cette technique particulière faisant l'objet d'ouvrages spécialisés.

Ce microscope, doté de tous les éléments d'un microscope ordinaire, est également équipé d'un polariseur  $\mathcal{P}$  éventuellement tournant et d'un analyseur tournant  $\mathcal{A}$ , tous deux escamotables, placés respectivement avant le condenseur et derrière l'objectif dans des espaces où les rayons lumineux sont faiblement inclinés. Les deux polariseurs étant croisés, la lumière blanche est éteinte, sauf dans les zones biréfringentes apparaissant teintées car chacune d'elles peut être considérée comme une lame onde pour une longueur d'onde particulière qui est éteinte alors que les autres composantes spectrales partiellement transmises fournissent la teinte résiduelle. Dans ce type d'observation, en **éclairage orthoscopique** ou en lumière parallèle (figure 55 a) utilisant un condenseur de faible ouverture, le microscope est analogue à un polariscope classique. L'objet biréfringent dédouble l'onde incidente et se comporte comme un interféromètre. On visualise un système de franges à deux ondes localisées dans le plan de l'objet. Si l'on fait tourner la platine, l'objet biréfringent s'éteint quatre fois suivant deux directions perpendiculaires, ce qui permet de déterminer le plan de section principale. Cela nécessite que le détail observé reste centré pendant la rotation et le microscope doit être équipé d'une platine tournante graduée, ses objectifs, dénués de toute tension, étant centrables dans leur monture afin que leur axe optique, à défaut d'être confondu avec lui, coupe l'axe de rotation de la platine dans le plan de l'objet. Les mesures de biréfringence sont effectuées par différents types de compensateurs montés en glissière s'adaptant au statif : lame quart d'onde fixe associée à un analyseur tournant (de Sénarmont), coin fixe et contre-coin mobile biréfringents (Babinet, Soleil, Bravais), lame de spath perpendiculaire à l'axe inclinable (Berek), lame cristalline parallèle à l'axe inclinable autour de l'axe (Eringhaus).

Ce type d'observation n'est pas toujours suffisant, notamment si l'axe optique du cristal est parallèle au sens de propagation de la lumière. L'extinction subsiste alors quelle que soit l'orientation de l'objet, mais la différence de marche entre les deux ondes varie avec l'incidence de la lumière. En utilisant un condenseur de forte ouverture numérique (figure 55 b), en lumière convergente ou **éclairage conoscopique**, on détecte un système de franges à l'infini localisé dans le plan de la pupille de sortie de l'objectif que l'on observe à l'aide d'une lunette constituée de l'oculaire et d'une lentille additionnelle ou **lentille de Bertrand**  $L_B$  interposée entre objectif et oculaire. Un trou  $T_c$  isolant, dans le plan de l'image véhiculé par la lentille de

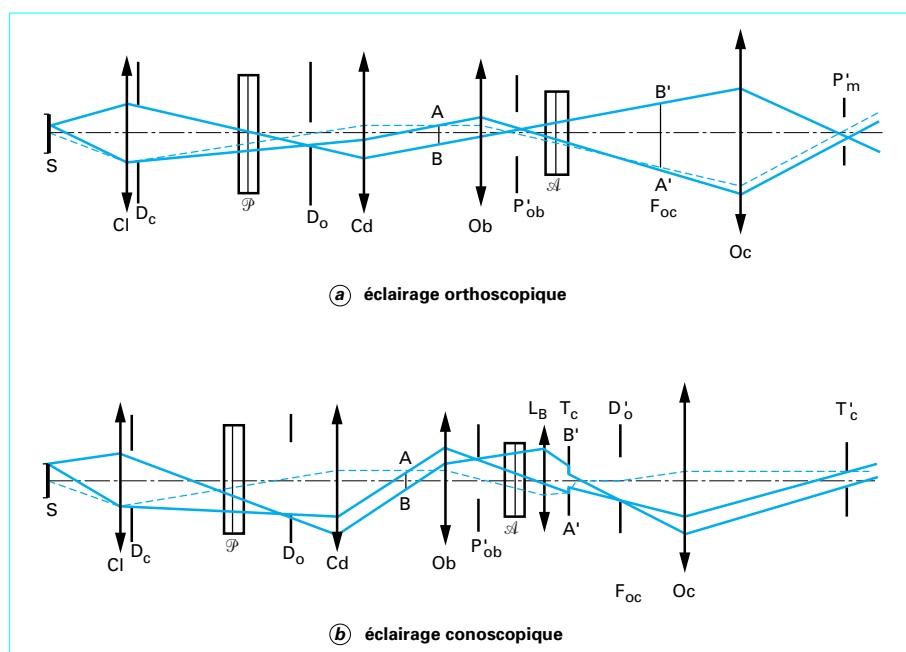


Figure 55 – Microscope polarisant

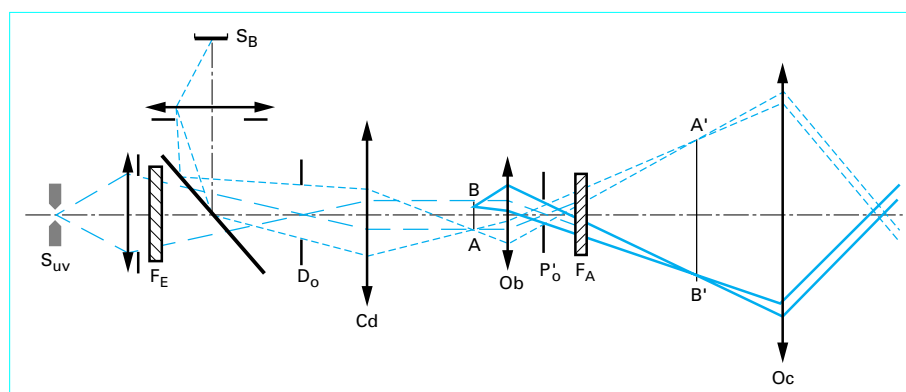


Figure 56 – Schéma de principe du microscope à fluorescence

Bertrand, le détail intéressant du champ permet d'observer la figure d'axe relative à ce détail, la pupille de l'œil étant alors placée dans l'image de ce trou fournie par l'oculaire.

## 7.2 Microscopie en fluorescence

La fluorescence est une propriété caractéristique de nombreuses substances d'émettre, excitées par un rayonnement de courte longueur d'onde (de l'ultraviolet au bleu), un rayonnement de plus grande longueur d'onde dans le domaine visible (du vert à l'orange). Le rendement de cette transformation est très faible et, si les résultats des premières expériences dues à Reichert, effectuées en fond noir à l'aide d'une lampe à arc et d'un filtre liquide, ont été remarquables en botanique et en minéralogie, ils restèrent insuffisants en biologie, l'intensité de cette **fluorescence directe** étant trop faible pour les tissus animaux et la coloration peu sélective. Un meilleur rendement est possible en traitant les préparations par des solutions fortement diluées de colorants organiques particuliers,

des fluorochromes, ne lésant pas les tissus et s'appliquant aux cellules vivantes. L'intérêt de cette **fluorescence secondaire**, introduite par *Haitinger*, n'est pas seulement que les constituants de la préparation émettent des rayonnements fluorescents dans des bandes spectrales qui les caractérisent, mais encore que, suivant la longueur d'onde excitatrice et le choix du fluorochrome, ces bandes soient spécifiques et permettent de formuler une conclusion sur la nature de la substance examinée et, notamment, sur son état pathologique.

L'excitation de la fluorescence (figure 56) s'obtient à l'aide d'une lampe à arc de forte puissance  $S_{uv}$  émettant de courtes longueurs d'onde, la bande spectrale excitatrice étant sélectionnée par le filtre d'excitation  $F_E$ . L'image des zones fluorescentes de l'objet AB est formée par l'objectif en lumière du spectre de fluorescence, la lumière excitatrice beaucoup plus intense étant bloquée par le filtre d'arrêt  $F_A$ . Si le rendement est suffisant, un éclairage en fond clair fourni par la source  $S_B$  peut être superposé pour former une image du reste de la préparation et localiser les zones fluorescentes. En cas de trop faible contraste de l'image du fond, on associe plutôt un éclairage en contraste de phase ou en fond noir si la fluorescence

est trop faible. Ce choix implique l'emploi d'un condenseur de forte ouverture numérique, transparent en ultraviolet de même que le liquide d'immersion qui, de plus, ne doit pas fluorescer (glycérine). Pour des raisons de meilleur rendement, la fluorescence étant émise dans toutes les directions, son excitation tend à se faire à l'aide d'un rayonnement venant de l'objectif (épifluorescence).

### 7.3 Microscopie des métaux

Outre les techniques diverses précédemment décrites appliquées en microscopie par réflexion, les besoins de la métallographie, de la métallurgie et de la mécanique ont amené au développement de certains appareils ou accessoires particuliers.

■ Si la dureté propre d'un métal ou d'un minéral est sa résistance à l'effet de pénétration, on a été amené à définir, à l'échelle microscopique, la **microdureté** comme le rapport de la charge appliquée au pénétrateur à la surface de l'empreinte qu'il laisse dans l'objet. Deux types de pénétrateur en diamant sont utilisés de formes respectivement rhomboédrique (Knoop) et pyramidale à base carrée (Vickers) définissant les microduretés du même nom. L'accessoire permettant de mettre en œuvre leur application est un ensemble comportant un objectif et un diamant pénétrateur portés par un chariot permettant de centrer alternativement ces deux éléments dans le champ. Après repérage à l'objectif du point à traiter, le pénétrateur est mis en place et, par l'emploi du mouvement lent, amené à pénétrer dans l'objet exerçant sur lui une force de réaction égale, mesurable par une balance de torsion solidaire du diamant. Après avoir atteint la charge désirée, la mesure de la surface de l'empreinte (de section losange ou carrée suivant le cas) est effectuée à travers l'objectif remis en place.

■ La **rugosité** des surfaces, pour sa part, peut être mesurée par un instrument proposé par Schmaltz, le microscope à coupe optique, dans lequel on forme, à l'aide d'un microscope d'éclairage (figure 57 a), l'image d'une fente lumineuse sur la surface. Cette ligne fine épousant le profil de la surface est observée par un second microscope. Éclairage et observation, utilisant des objectifs identiques, se font dans des directions perpendiculaires inclinées à 45° sur la surface et la mesure de la rugosité (dans une gamme de quelques micromètres) ou le contrôle de conformité à une norme se font directement à l'aide d'un réticule dans le plan objet de l'oculaire. Des instruments, de plus faible grossissement, avec éclairage normal et observation rasante (figure 57 b) atteignent des valeurs dimensionnelles et angulaires plus importantes.

■ L'observation des **transformations** que subissent des micro-échantillons portés à haute température pendant les cycles de chauffage et de refroidissement permet de déduire les qualités physiques macroscopiques d'un produit métallurgique à partir du déroulement de ses phénomènes de fusion, de solidification et de diffusion. On peut apprécier la pureté d'un composé, identifier ses composants, appréhender les phénomènes de croissance des cristaux, de recristallisation, de formation de grains, d'apparition de joints de grain. La température de fusion d'équilibre, définie comme la moyenne entre les températures à laquelle apparaissent de petits globules sur le pourtour des cristaux et à laquelle disparaît le dernier cristal du champ, peut ainsi être mesurée. La **platine chauffante** de Kofler, accessoire placé sur la platine du microscope métallographique, est constituée d'une enceinte fermée par un hublot en verre ou en quartz épais de quelques millimètres. L'échantillon, massif ou non, posé sur un support ou dans un creuset, est placé à l'intérieur d'un four à chauffage indirect ou sur une plaque à chauffage direct. L'enceinte peut être sous vide ou, au contraire, contenir une atmosphère gazeuse à pression donnée. Une circulation d'eau de refroidissement maintient la paroi externe à la température ambiante. La température dans l'enceinte est mesurée par un couple thermoélectrique jusqu'à 1 800 °C environ, à l'aide d'un micropyromètre au-delà (des expériences ont été décrites jusqu'à 2 700 °C). L'observation est effectuée avec un objectif à grande distance frontale corrigé

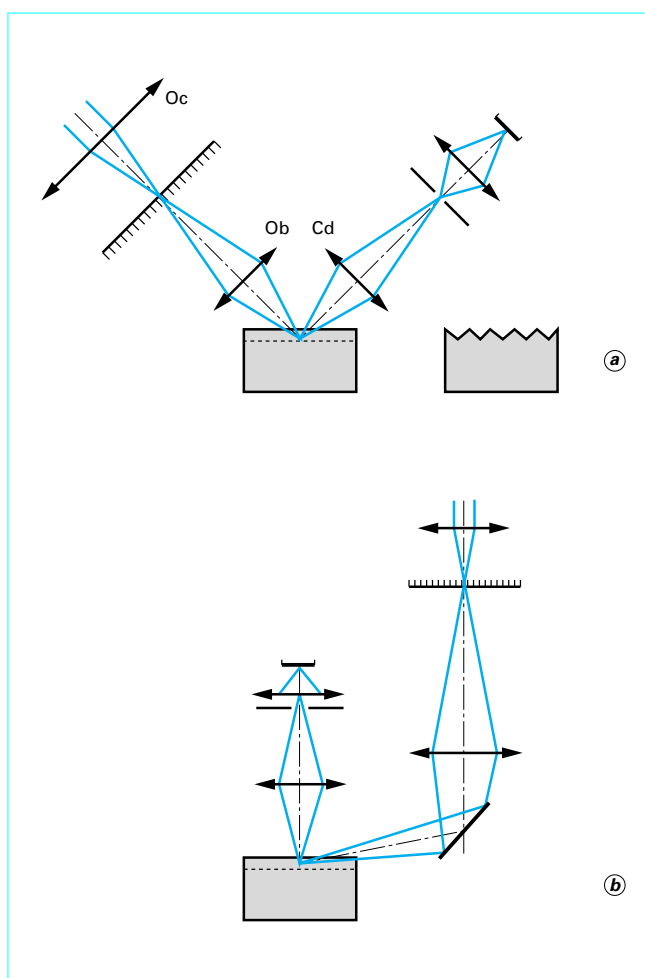


Figure 57 – Microscope à coupe optique

pour l'épaisseur et la matière du hublot. C'est pratiquement le dernier champ d'application des objectifs à miroirs.

### 7.4 Photométrie et spectrométrie en microscopie

La connaissance des facteurs de réflexion, de transmission, d'absorption, est un élément d'information non négligeable pour caractériser les constituants d'une préparation ou leur état momentané. L'absorption, en mesurant le degré de fixation d'un réactif par une cellule, renseigne sur sa pathologie ; la qualité des charbons est corrélée avec leur facteur de réflexion. La mesure du flux lumineux transmis ou réfléchi par le détail intéressant de l'objet isolé dans le champ par un trou T est faite par un récepteur photoélectrique R conjugué du plan de la pupille (figure 58). Cette mesure ne peut être que relative, par rapport au fond de la préparation ou à un détail étalon pris comme référence. Si l'on est dans le domaine de linéarité du récepteur, le rapport de ses réponses fournit directement la mesure. Dans le cas contraire, les réponses peuvent être ramenées au même niveau à l'aide d'une densité variable (coin photométrique) donnant la mesure. Cette photométrie peut être **globale**, si elle prend en

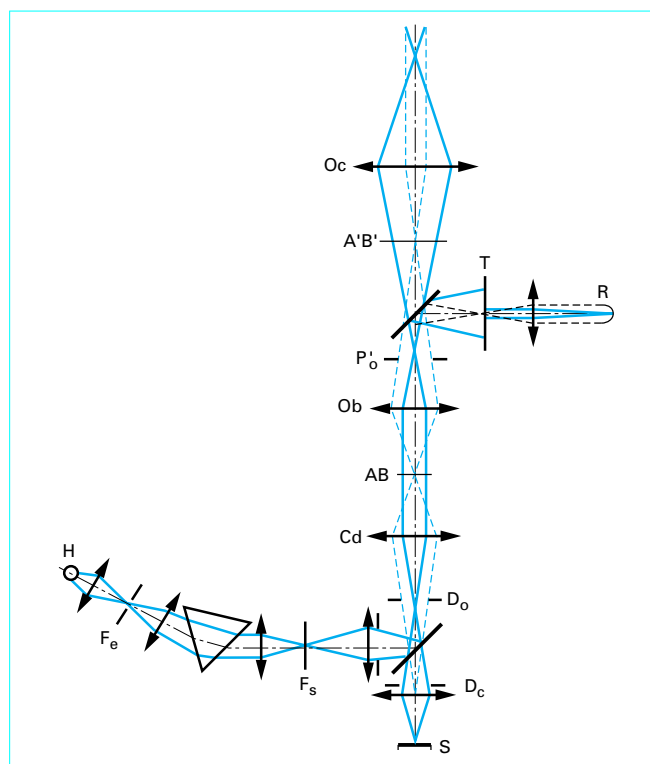


Figure 58 – Photométrie et spectrométrie en microscopie

compte toute la lumière émise par la source S, ou ne concerner qu'une ou quelques longueurs d'onde discrètes sélectionnées par des filtres colorés ou interférentiels placés entre source et objet. Elle peut être **spectrale** si la longueur d'onde de la source varie, ce qui est obtenu à l'aide d'un monochromateur dont la fente d'entrée  $F_e$  est éclairée par un brûleur intense H, sa fente de sortie  $F_s$  étant conjuguée du plan de la pupille  $D_o$ . Cette variation chromatique est aussi obtenue à l'aide d'un filtre interférentiel variable placé dans ce plan.

Outre ces mesures spectrales des grandeurs photométriques, la spectrométrie concerne également l'**analyse spectrale** de la lumière émise par l'objet excité soit par une bande spectrale obtenue par filtrage de la source, soit par une longueur d'onde discrète filtrée par un filtre interférentiel ou émise par une lampe spectrale, un laser ou un monochromateur. L'analyse spectrale, fort utile en histochimie et, en particulier, en cytochimie, en fort développement en chimie moléculaire et en physique des matériaux, s'applique essentiellement à la fluorescence et à l'émission Raman. La lumière diffusée par l'objet est analysée spectralement à la sortie du microscope à l'aide d'un monochromateur dont la fente d'entrée  $F_e$  est conjuguée de la zone du champ en examen. L'analyse peut être **séquentielle**, la longueur d'onde variant et un seul récepteur R conjugué de la pupille étant utilisé (figure 59 a), ou multicanal, l'ensemble du spectre étant obtenu pour un point de l'objet à l'aide d'une barrette de photodiodes  $B_r$  placée dans le plan image de la fente d'entrée (figure 59 b). Une image monochromatique de l'ensemble de l'objet peut être observée en réglant le monochromateur sur une longueur d'onde discrète du spectre d'émission, la pupille du microscope étant alors conjuguée de la fente d'entrée (figure 59 c). Le rendement des phénomènes concernés étant faible, la visualisation est obtenue grâce à une caméra de télévision TV associée à un amplificateur de luminance AL.

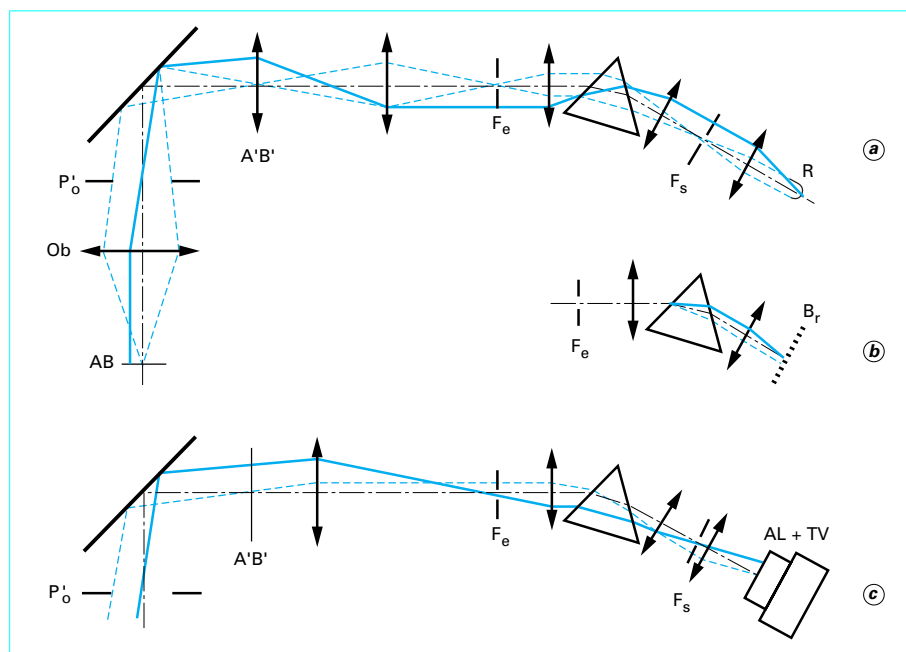


Figure 59 – Analyse spectrale en microscopie

# Microscopie optique

## Bibliographie

### Ouvrages et articles généraux

- BRUHAT (G.). – *Optique*. 5<sup>e</sup> éd. revue par A. Kastler. Masson 908 p. 723 fig. (1959).
- BOUTRY (G.A.). – *Optique instrumentale*. Masson 539 p. 412 fig. (1946).
- MARÉCHAL (A.). – *Imagerie géométrique. Aberrations*. Éd. Revue d'Optique 244 p. 223 fig. (1952).
- CHRÉTIEN (H.). – *Le calcul des combinaisons optiques*. Masson 862 p. 293 fig. (réédition 1980).
- BURCHER (J.). – *Les combinaisons optiques*. Éd. Revue d'Optique 713 p. 89 fig. 73 pl. (1967).
- MARÉCHAL (A.) et FRANÇON (M.). – *Diffraction, structure des images*. Masson 204 p. 149 fig. 10 tabl. (1970).
- BRUHAT (G.). – *Traité de polarimétrie*. Éd. Revue d'Optique 447 p. 250 fig. 882 réf. (1930).

### Ouvrages et articles traitant de microscopie

- PLUTA (M.). – *Advanced Light Microscopy*: vol. 1 *Principles and basic properties*, 464 p., 286 fig., 8 pl., 270 réf.; vol. 2 *Specialized Methods*, 494 p., 224 fig., 46 pl., 746 réf.; vol. 3 *Measuring techniques*, 702 p., 325 fig., 22 pl., 1 286 réf. PWN-Polish Scientific Publishers & Elsevier (1989).
- ABBE (E.). – *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. Schultzes Ark. für mikr. Anat 9 p. 413 (1873).
- KÖHLER (A.). – *Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke*. Z. Wiss. Mikr. 67 H4, p. 244 (1893).
- POLICARD (A.), BESSIS (M.) et LOCQUIN (M.). – *Traité de microscopie*. Masson 610 p. 178 fig. (1957).
- TERRIEN (J.). – *La microscopie*. PUF 128 p. 43 fig. 8 réf. (1968).
- LOCQUIN (M.) et LANGERON (M.). – *Manuel de microscopie*. Masson 352 p. 152 fig. 18 tab. 278 réf. (1978).

- EHRINGAUS (A.). – *Das Mikroskop*. B.G. Teubner 6<sup>e</sup> éd. revue par L. Trapp 132 p. 90 fig. (1967).
- WREDDEN (J.H.). – *The microscope*. Churchill Ltd 296 p. 298 fig. 44 réf. (1947).
- MICHEL (K.). – *Die Grundlagen der Theorie des Mikroskops*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH 314 p. 160 fig. 104 réf. (1950).
- BOEGEHOLD (H.). – *Das optische System des Mikroskops*. VEB Verlag Technik Berlin 2<sup>e</sup> éd. 192 p. 74 fig. 135 réf. (1959).
- MARTIN (L.C.). – *The theory of the microscope*. Blackie 488 p. 281 fig. 134 réf. (1966).
- BEYER (H.). – *Handbuch der Mikroskopie*. VEB Verlag Technik Berlin 720 p. 508 fig. 742 réf. (1973).
- OETTEL (W.). – *Grundlagen der Metallmikroskopie*. Akademische Verlagsgesellschaft 216 p. 139 fig. 124 réf. (1959).
- SCHENDELL (G.). – *Prüfungen und Messungen am Mikroskop*. VEB Verlag Technik Berlin 172 p. 73 fig. 96 réf. (1952).
- ZERNICKE (F.). – *Das Phasenkontrastverfahren bei den mikroskopischen Beobachtung*. Z. Physik 36 p. 848 (1935).
- BENNETT (A.H.), OSTERBERG (H.), JUPNIK (H.) et RICHARDS (W.). – *Phase microscopy*. J. Wiley and sons 320 p. 79 fig. 366 réf. (1951).
- LEBEDEV (A.A.). – *L'interféromètre à polarisation et ses applications*. Rev. Opt. 9 p. 385 (1930).
- HALE (A.J.). – *The interference microscope*. Livingstone Ltd 114 p. 95 fig. 81 réf. (1958).
- FRANÇON (M.). – *Contraste de phase et contraste par interférences*. Mémoires d'un colloque CIO 30 conférences. Revue d'Optique 264 p. (1952).
- FRANÇON (M.). – *Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel*. Éditions du CNRS 149 p. 144 fig. 256 réf. (1954).
- VICKERS (A.E.J.). – *Modern methods of microscopy*. Recueil de 13 articles issus de la revue Research. Butterworths Scientific Publications 114 p. (1956).

- FRANÇON (M.). – *Progress in microscopy*. Pergamon Press Ltd 295 p. 324 fig. 92 réf. (1961).
- FRANÇON (M.) et MALLICK (S.). – *Polarization interferometers*. J. Wiley and sons 159 p. 113 fig. 136 réf. (1971).
- GERMAIN (G.) et ROBLIN (G.). – *Étude de la compensation d'un interféromètre à dédoublement latéral de type Jamin-Lebedev*. Nouv. Rev. Optique 6 n° 4 p. 215-222 (1975).
- WEILL (A.R.) et NOMARSKI (G.). – *Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées*. Rev. Métallurgie 52 p. 121 (1955).
- NOMARSKI (G.) et ROBLIN (G.). – *Localisation longitudinale des surfaces par interférométrie à modulation de phase*. Nouv. Revue Opt. Appl. 2 n° 2, p. 105-113 (1971).
- ROBLIN (G.). – *La mesure des déphasages en microscopie par interférométrie à modulation de phase*. J. Optics 8 n° 5 p. 309-318 (1977).
- RINNE (F.) et BEREK (M.). – *Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung 2<sup>e</sup> éd. 366 p. 285 fig. 21 tab. (1953).
- HALLIMOND (A.F.). – *The polarizing microscope*. Cooke Throughton and Simms Ltd 2<sup>e</sup> éd. 219 p. 97 fig. 157 réf. (1956).
- KÄSTNER (F.). – *Einführung in den Gebrauch des Polarisationsmikroskopes*. Fachbuchverlag GmbH 77 p. 71 fig. 137 réf. (1953).
- BORDET (P.). – *Précis d'optique cristalline*. Masson 219 p. 144 fig. 5 tab. 3 pl. 69 réf. (1968).
- BEUGNIES (A.). – *Microscopie des milieux cristallins*. Dunod 190 p. 107 fig. 102 réf. (1969).
- CONN (G.K.T.) et BRADSHAW (F.J.). – *Polarized light in metallography*. Recueil de 7 articles. Butterworths Scientific Publications 130 p. 31 fig. 22 pl. 4 tab. 123 réf. (1952).
- PILLER (H.). – *Microscope photometry*. Springer, Berlin (1977).

## Constructeurs

Liste non exhaustive

Bausch and Lomb Inc. (USA)  
<http://www.bausch.com>  
 Carl Zeiss  
<http://www.zeiss.fr>  
 Leica Microsystems  
<http://www.leica.com>  
 Micro-contrôle  
 Nachet  
<http://www.nachet.com>

Nikon France  
<http://www.nikon.fr>  
 Olympus France  
<http://www.olympus.fr>  
 Optique Commerciale  
<http://www.optique-commerciale.com>  
 Union Optical (Japon)  
<http://www.union.co>



## Gagnez du temps et sécurisez vos projets en utilisant une source actualisée et fiable !

### 15 DOMAINES D'EXPERTISE

- ✓ Automatique - Robotique
- ✓ Biomédical - Pharma
- ✓ Construction et travaux publics
- ✓ Électronique - Photonique
- ✓ Énergies
- ✓ Environnement - Sécurité
- ✓ Génie industriel
- ✓ Ingénierie des transports
- ✓ Innovation
- ✓ Matériaux
- ✓ Mécanique
- ✓ Mesures - Analyses
- ✓ Procédés chimie - bio - agro
- ✓ Sciences fondamentales
- ✓ Technologies de l'information



Articles de référence  
disponibles en français  
et en anglais

Détails des offres et sommaires  
à retrouver sur le site

[www.techniques-ingenieur.fr](http://www.techniques-ingenieur.fr)

Les offres Techniques de l'Ingénieur permettent d'accéder à une **base complète et actualisée d'articles** rédigés par les meilleurs experts et validés par des comités scientifiques, avec :

+ de 10 000 articles de référence et 1 000 fiches pratiques opérationnelles.

3 000 quiz dans + de 1 000 articles interactifs.

+ de 550 bases documentaires, 8 Parcours Pratiques répartis dans plus de 90 offres.

1 280 auteurs contribuent chaque année à enrichir cette ressource.

Service de Questions aux experts.

Les Archives, technologies anciennes et versions antérieures des articles.

+ de 300 000 utilisateurs de [techniques-ingenieur.fr](http://techniques-ingenieur.fr) chaque mois !

NOS ÉQUIPES SONT  
À VOTRE DISPOSITION

Par téléphone  
 33 (0)1 53 35 20 20

Par email  
 [infos.clients@teching.com](mailto:infos.clients@teching.com)