

A propos du calibrage du microscope

par G Fannechère

S'agissant de calibrer la chaîne de grossissement de son microscope, on doit disposer, en principe

- d'un micromètre objet (à disposer sous l'objectif)
- d'un micromètre oculaire

En effet, les objectifs des microscopes n'ont que très rarement un grossissement égal au grossissement indiqué. En d'autres termes, sur l'exemple d'un objectif X100 et d'une oculaire x10 il se peut que le nombre de divisions vues à travers l'oculaire ne corresponde pas au nombre de microns (l'erreur est parfois très significative).

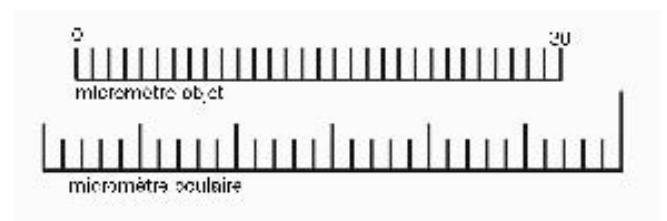
Il est donc impératif de calibrer une fois ses objectifs de microscope.

On verra également comment on peut utiliser Mycomètre sans micromètre oculaire...

1 /Calibrage du microscope avec Mycomètre

Avec Mycomètre V2.xx, le calibrage de cette chaîne est très simple et automatique.

Sur une image des 2 micromètres en place (et non nécessairement superposés)



Faire :

Edition/étalonnage/Etalon.objectif

Pointer une portion quelconque du micromètre objet et noter la dimension

Pointer une portion quelconque de l'image du micromètre oculaire et noter le nombre de divisions

Mycomètre retourne la valeur réelle d'une division du micromètre oculaire
(Nb : les indications nécessaires sont affichées dans la barre de commentaire)

Dans l'exemple figuré, si nous pointons une portion de la mire objet (maximale de préférence, 30 microns ici), puis une portion quelconque du micromètre oculaire (par exemple 25 divisions), Mycomètre retourne

" 1 division représente 1,440 microns"

A noter que la fonction d'étalonnage fonctionne avec n'importe quel objet de longueur connue.
(par exemple réseau optique, brin de fibre optique parfaitement dénudé ..., référence mesurée sur un autre microscope)

2/ Cas du micromètre objet

Il est peut être impossible (ou seulement non souhaité) d'échanger le troisième oculaire avec l'oculaire gradué !

Cela ne présente aucun inconvénient, seulement un léger handicap (une fois seulement).

Si vous disposez d'un micromètre objet, il suffit d'effectuer une prise de vue de cette mire qui servira de référence. Les images des objets à mesurer seront prises dans les mêmes conditions (même distance, même focale).

3/ Etalonnage sans micromètre objet, cas du microscope Trinoculaire

La question m'a été posée de savoir comment étalonner Mycomètre sans micromètre oculaire sur l'oculaire photo si on ne dispose d'aucun objet étalonné pour servir de référence : dans ce cas il suffit d'utiliser un objet quelconque pour servir d'étalon intermédiaire.

Principe :

- 1/Mesurer très soigneusement un objet quelconque avec l'oculaire gradué
- 2/Utiliser cet objet comme une mire objet.

J'ai pratiqué moi même l'opération qui suit et vérifié sa faisabilité.

Choix d'un objet : c'est la partie la plus délicate.

Il faut un objet très plat, de dimension permettant de remplir au mieux le champ de l'oculaire, c'est à dire environ 150 microns pour le X100.

Je dispose de plusieurs types d'objets pouvant faire l'affaire : réseau par transmission, aile de papillon cassée proprement,...

Dans le cas qui se présentait, le mycologue disposait d'un oculaire gradué (et corrigé) sur le binoculaire, mais qui ne s'adaptait pas sur le trinoculaire. Il fallait donc fabriquer une mire objet-étalon.

Comme je souhaitais utiliser un objet le plus banal possible, j'ai procédé ainsi (les explications sont très détaillées, mais l'opération est relativement rapide et ne se fait qu'une seule fois) :

- 1/ sur une lame, j'ai tracé un trait très léger avec un feutre imperméable.
- 2/ avec une aiguille très fine, j'ai rayé ce trait transversalement (90 °).
- 3/ j'ai recouvert d'une goutte d'eau et d'une lamelle (impératif pour des questions d'optique).
- 4/ observation au X100, oculaire gradué et mise au point.
- 5/ j'ai approché mon APN de l'oculaire gradué et effectué la prise de vue (1 seule) => Image A

5 bis / opération que je n'ai pas pu pratiquer (j'ai un monoculaire) : faire une prise de vue (exactement la même) avec le 3ème oculaire. => image B

6/ avec Acdsee (ou autre), sur l'image enregistrée, j'ai repéré et marqué deux points très "propres" les plus éloignés possible. Cette opération n'est pas indispensable, mais très souhaitable.

... à faire sur les images A et B

7/ étalonnage de l'objet de référence

L'objet étalon provisoire est constitué par les deux points marqués sur les images A et B

lancer Mycomètre et charger l'image A

Sur cette image figure à la fois la mire de l'oculaire gradué (supposée exacte ou corrigée) et le segment étalon .

Presser "**étalonner**"

-pointer et marquer l'origine et l'extrémité de la mire graduée (0... 100), valider et entrer "100" dans la fenêtre de dialogue qui s'ouvre.

-pointer l'origine et l'extrémité du segment étalon

> *j'ai mesuré 147.46 microns (voir dans l'image jointe, 1ere cellule de la grille) :*

noter cette valeur ...

PUIS

Charger l'image B

-presser de nouveau sur "**étalonner**"

-pointer et marquer l'origine et l'extrémité du segment étalon, Entrer sa longueur "147.46 " dans la fenêtre qui s'ouvre.

Sauvegarde : **Menu Edition/ Etalonnage-résolution.**

Presser le bouton **Sauvegarde**, entrer votre commentaire, par exemple : "Trino X100 " et valider.

... c'est fini

Futures utilisations :



Menu Edition/ Etalonnage-résolution

Choisir "Trino X100 " dans la liste

Je précise que je n'ai fait qu'un seul essai de trait et une seule photo (myope et sans lunettes ...). On doit faire encore mieux en insistant !

C'est très simple, bien qu'un peu « longuet», et je suppose que chacun de vous y avait déjà pensé.

4/ Cas général : vous ne disposez d'aucun objet de référence optique

Dans le cas précis de cette question qui m'a été posée lors d'un congrès, notre ami ne disposant pas de micromètre (ni oculaire ni objet) devra évidemment utiliser une autre microscope pour mesurer une grandeur de référence.

On peut fabriquer sa propre mire-étalon de référence comme expliqué ci-dessus. On l'étalonne sur un autre microscope dont le calibrage est garanti (c'est à dire que la mesure donnée par le micromètre oculaire a été vérifiée à l'aide d'une référence objet et corrigée si nécessaire).

On n'oubliera pas de coller une étiquette sur la lamelle de référence précisant les points de référence choisis.

Il calibrera ensuite Mycomètre normalement avec cet étalon pour effectuer ses mesures. Mon avis est que l'erreur ne devrait pas dépasser 1%.

A noter, d'ailleurs, qu'il m'a été rapporté que les mires du commerce ne seraient pas toutes correctes.

5/ Calibrage sans aucune référence optique

En complément, il est aussi possible aussi de calibrer sans avoir recours à un micromètre objet ou à autre microscope étalonné. Par contre il faut disposer

- d'un oculaire réticulé (un simple trait suffit)
- d'un comparateur de mécanicien (voir ci dessous) qui apprécie le micron (selon appareil)

Méthode :

-tracer un trait au feutre, comme la méthode décrite par ailleurs, qui occupe



presque tout le champ (selon grossissement)

-placer le comparateur bien horizontalement et bien fermement au bord du chariot (c'est le plus difficile) puis mesurer au comparateur la largeur du trait.

NB : ne JAMAIS faire de marche arrière durant le balayage.

- Effectuer plusieurs mesures de ce type et calculer la moyenne.

Ici, on a effectivement affaire à une VRAIE distribution normale et on peut appliquer les propriétés de la loi de Laplace (je me permets d'insister, car certains savent bien que ne suis pas d'accord pour l'usage systématique de la moyenne pour les mesures de spores, d'autant plus que si ces paramètres sont élémentaires à calculer, leur usage et leur interprétation corrects sont loin d'être évidents ... voir "cours de stats pour mycologues", je ferai peut être un papier simplifié sur ce sujet) La précision du résultat augmentera en fonction de la racine carré du nombre de mesures (4 mesures c'est 2 fois mieux que une).

Le calibrage obtenu tient compte du grossissement de l'objectif ET de l'oculaire.

C'est ainsi que j'ai étalonné mon microscope pour les mouvements verticaux (en particulier pour l'utilisation de Mycomètre en mode multicouches).

On pourrait envisager d'utiliser le vernier du chariot croisé, mais sa précision ne dépasse pas le 1/10 de mm.

Qualité des micromètre-oculaires

J'ai été amené à comparer, dans les mêmes conditions, avec le même objet, les mesures données par deux micromètre-oculaires d'origines différentes : l'écart mesuré était voisin de 10% !

Si votre chaîne optique a été calibrée correctement, ces variations sont évidemment prises en compte. Mais pensez-y si vous êtes amené à changer d'oculaire !

Conclusion :

Le prix d'une mire objet est loin d'être négligeable, d'autant plus que l'on ne s'en sert que très rarement. C'est ce genre d'objet, comme le calibre de couleurs d'écran, que devrait posséder les clubs ou les sociétés MO.

à Limoges, le 18 mars 2008
mise à jour 29 juin 2009