

Chapitre II : Méthodes d'analyse et d'observation des matériaux

II.1. Introduction

La microscopie est un ensemble de techniques d'imagerie des objets de petites dimensions. Quelle que soit la technique employée, l'appareil utilisé pour rendre possible cette observation est appelé un microscope.

Des mots grecs anciens *mikros* et *skopein* signifiant respectivement « petit » et « examiner », la microscopie désigne étymologiquement l'observation d'objets invisibles à l'œil nu. On distingue principalement trois types de microscopies : la microscopie optique, la microscopie électronique et la microscopie à sonde locale.

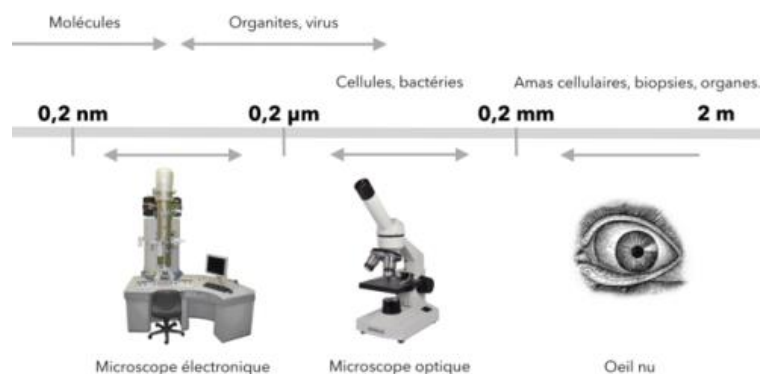


Figure II.1. Différentes échelles d'observation

II.2. La métallographie

C'est la technique qui consiste à déterminer la structure d'un métal en l'observant avec un microscope optique. On peut déterminer ainsi, selon les cas :

- la taille et la forme des cristallites (ou grains) ;
- la répartition des phases ;
- la direction des lignes de glissement (intersection des plans de glissement avec la surface), dans le cas d'un échantillon déformé.

II.2.1. Préparation des éprouvettes

La préparation des éprouvettes destinées à l'étude microscopique est divisée en plusieurs étapes :

- le prélèvement de l'échantillon (préparation des échantillons),
- l'enrobage,
- le polissage,
- l'attaque révélatrice de la micro structure (l'attaque chimique).

a- Prélèvement de l'échantillon (préparation des échantillons)

Il est tout d'abord nécessaire de souligner l'importance du *prélèvement* de l'échantillon. En effet, une étude micro-structurale n'a de valeur que dans la mesure où l'échantillon représente bien

l'ensemble d'où il provient, tant par sa composition chimique que par ses caractéristiques physiques.

Dans le cas de la préparation des échantillons, l'échantillon est coupé à l'aide d'une scie ou d'une meule le plus doucement possible en lubrifiant un maximum de telle sorte que l'échantillon ne présente pas d'échauffement ou de déformation qui peuvent brouiller ou modifier la microstructure et qui rend l'échantillon non-représentatif de la vraie microstructure de celui-ci.

b- L'enrobage

On effectue un *enrobage* au moyen de résine ou d'un polymère renforcé, afin de permettre une manipulation plus aisée de l'échantillon et d'assurer la planéité de la surface.

c- Le polissage

Le *polissage* a pour buts principaux l'obtention d'une surface plane de rugosité minimale, mais également l'élimination de la couche superficielle de l'échantillon dont la microstructure pourrait être non-représentative du matériau (couches d'oxydes ou écrouissage provenant de la découpe...).

Il s'effectue généralement en deux étapes. La première consiste en un polissage grossier de la surface à l'aide de papiers recouverts de poudre abrasive de granulométrie décroissante (typiquement de 150 à 15 μm).

La seconde, appelée polissage fin, est effectuée à l'aide d'un drap contenant une pâte de diamant de l'alumine ou de la silice dont les particules ont un diamètre de 1 à 10 μm . Pour ces deux stades, l'utilisation d'un lubrifiant est indispensable afin d'éviter tout échauffement du matériau. Le rinçage de l'échantillon, voir son passage dans un bain à ultrasons, est requis à chaque changement de papier ou de drap afin d'éviter que des particules de grand diamètre ne polluent le stade de polissage à plus faible granulométrie.

d- L'attaque chimique (mise en évidence de la microstructure)

L'attaque des échantillons met en évidence la morphologie des grains, les défauts ou irrégularités de la surface, la sous-structure, les précipités, les inclusions, etc. Les méthodes d'attaque peuvent être classées en deux principales catégories:

- L'attaque chimique, provoquant une dissolution différentielle des cristaux suivant leur orientation, des phases suivant leur nature ou une attaque spécifique aux joints de grains,
- L'attaque électrolytique où une source extérieure de courant est utilisée. L'échantillon (qui doit être conducteur) est placé à l'anode du circuit électrique provoquant une oxydation des éléments de certaines zones de la surface. Il est également possible d'imposer un potentiel à l'échantillon de façon à attaquer une seule phase du matériau.

Le tableau suivant donne un aperçu de quelques réactifs principaux permettant une attaque chimique révélatrice de la microstructure.

Réactifs	Composition chimique	Matériaux
Nital	HNO ₃ (4%) + alcool éthylique	Aciers
Eau régale	HCl (66%) +HNO ₃ (34%)	Aciers alliés
Villela	HCl(5%) + ac.Picrique C ₆ H ₃ N ₃ O ₇ (5%) + H ₂ O	Aciers
Acide nitrique	HNO ₃ (10-60%) + H ₂ O	Cuivre
Keller	HF (10%) + HCl (15%) +HNO ₃ (25%) + H ₂ O	Aluminium

Tableau II.1. Principaux réactifs utilisés en attaque métallographique

II.3. Principe du microscope optique de base

Le microscope optique est un système optique à lentilles dont le but est d'obtenir une image agrandie de l'échantillon à observer.

Le premier groupe de lentilles, dirigé vers l'objet à examiner, constitue l'**objectif**. Il donne une image réelle, inversée et agrandie de l'objet. Cette image n'est pas formée sur un verre dépoli, mais se trouve quelque part dans le tube optique, c'est l'image intermédiaire.

Le deuxième groupe de lentilles, dirigé vers l'œil de l'observateur, est appelé l'**oculaire** ; il fonctionne comme une simple loupe et grossit l'image précédente. On obtient alors l'image définitive virtuelle, plus ou moins fortement grossie et renversée de l'objet initial.

Le grossissement total du microscope est égal au produit du grandissement de l'objectif et du grossissement de l'oculaire.

II.4. Constituants du microscope

De bas en haut :

- **Miroir** : sert à réfléchir la lumière ambiante pour éclairer l'échantillon par en dessous;
- **Source de lumière** : artificielle de meilleure température de couleur et de stabilité et par l'usage d'un condenseur qui permet à cette lumière de remplir d'une façon homogène et régulière le champ observé,
- **Diaphragme** : ouverture de diamètre variable permettant de restreindre la quantité de lumière qui éclaire l'échantillon.
- **Platine porte-échantillon** : où l'on pose l'échantillon ; les « valets » servent à tenir l'échantillon lorsque celui-ci est mince (par exemple une lame).
- **Objectifs** : lentille ou ensemble de lentilles réalisant le grossissement. Il y a en général plusieurs objectifs, correspondant à plusieurs grossissements, montés sur un barillet.

- **Bouton de réglage macro et micrométrique** : c'est la mise au point rapide et micrométrique ; pour que l'image soit nette, il faut que l'objet soit dans le plan focal de l'objectif ; ces molettes font monter et descendre l'ensemble objectif-oculaire avec un système de crémaillère, afin d'amener le plan focal sur la zone de l'échantillon à observer ;

- **Oculaire** : lentille ou ensemble de lentilles formant l'image d'une manière reposante pour l'œil. L'oculaire peut être remplacé par un appareil photographique, ou par une caméra vidéo pour faire une acquisition numérique.

Remarque : Pour calculer le grossissement d'un microscope optique on multiplie le grossissement de l'oculaire par celui de l'objectif. $GT = G_{ocu} * G_{obj}$

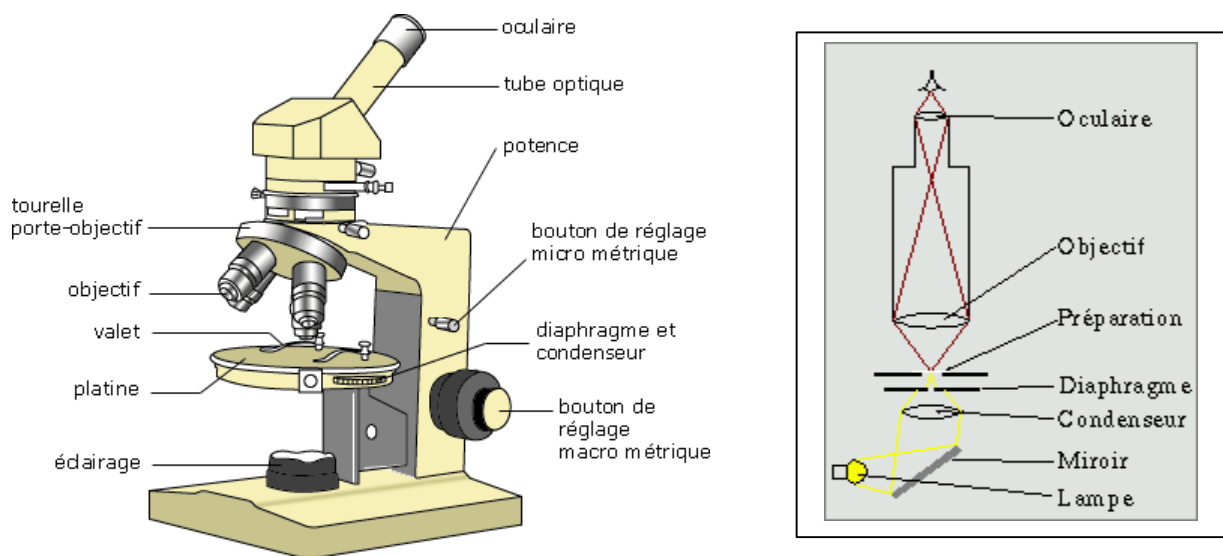


Figure II.2. Schéma d'un microscope optique

II.5. Différents types de microscope optique

II.5.1. Le microscope polarisant

Le microscope polarisant permet de visualiser et caractériser les échantillons biréfringents.

Pour cela, des polariseurs sont placés de part et d'autre de l'échantillon. Si ce dernier est biréfringent, il va modifier le trajet de la lumière polarisée, ce qui le rend visible même si il est transparent. Pour certains objets, cela permet également de déterminer la direction d'alignement des molécules qui les composent.

Il est utilisé en pétrographie pour l'observation et l'identification des minéraux dans les roches.

La **biréfringence** (double réfraction) est une propriété qu'ont certains matériaux transparents vis-à-vis de la lumière. Leur effet principal est de diviser en deux un rayon lumineux qui les pénètre. C'est pourquoi, sur la photographie ci-contre, certaines lettres apparaissent en double derrière un cristal biréfringent.

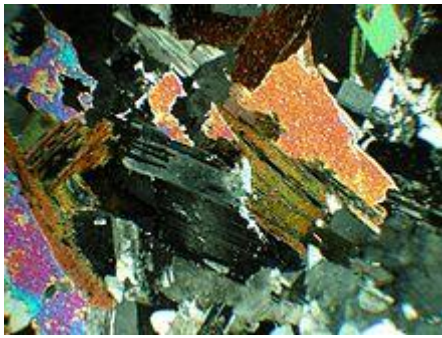


Figure II.3. a) Lame mince de granite observée au microscope confocal. b) La biréfringence

II.5.2. Le microscope à fluorescence

La microscopie à fluorescence repose sur le phénomène de fluorescence. La fluorescence est une propriété de certaines substances qui absorbent la lumière d'une longueur d'onde donnée et la réémettent sous forme de lumière d'une autre longueur d'onde.

Il est composé de lentilles pour grossir l'objet, d'un miroir dichroïque, et des filtres. Le premier filtre sélectionne la couleur qui va exciter les fluorochromes de l'échantillon (ici le bleu).

Cette lumière bleue illumine une large région de l'échantillon. Quand les fluorophores sont illuminés avec la bonne longueur d'onde (ici le bleu), ces fluorophores émettent par fluorescence de la lumière avec une autre longueur d'onde (ici le vert). Le miroir dichroïque et le deuxième filtre permettent de sélectionner seulement la lumière émise par l'échantillon. On détecte alors l'image de la partie fluorescente de l'échantillon. Ces microscopes permettent de détecter la présence et la localisation d'un très petit nombre de molécules dans un échantillon biologique.

Un fluorochrome ou fluorophore est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.

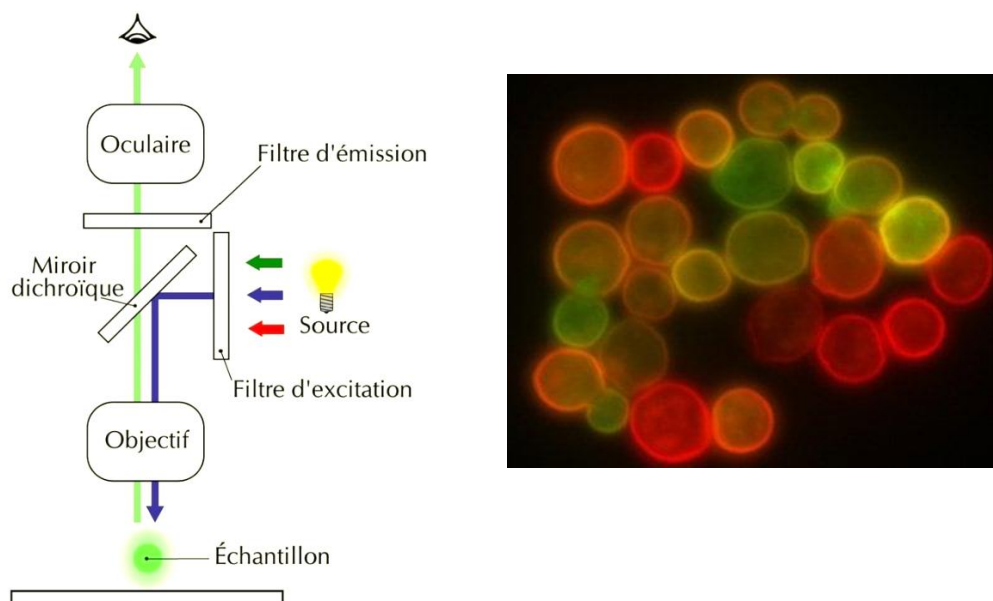


Figure II.4. Schéma de fonctionnement d'un microscope en fluorescence. Une image de

protoplastes capturée à l'aide de la microscopie en fluorescence (à droite)

II.5.3. Le microscope confocal

La microscopie confocale est un type de microscopie à fluorescence qui utilise un laser pour exciter la fluorescence des fluorophores utilisés pour marquer différents sous-ensembles d'un spécimen. Dans le microscope confocal, l'excitation est focalisée en un point précis de l'échantillon puis balayée dans tout le volume, permettant ainsi la reconstruction d'une image à trois dimensions avec une bonne résolution.

Le microscope confocal est une variante du microscope à fluorescence. Deux diaphragmes (les petits trous) sont placés sur le trajet de la lumière. Le faisceau est focalisé seulement sur une petite partie de l'échantillon par le premier diaphragme. Si des fluorophores sont présents en ce point, ils émettent une lumière, ensuite filtrée par le miroir dichroïque et un filtre.

Un deuxième diaphragme est placé au point de focalisation du faisceau. Il ne laisse passer que la lumière venant du point visé dans l'échantillon. L'objectif ne détecte donc que ce point. On déplace ensuite soit l'échantillon soit le montage optique. Cela permet de balayer la surface de l'échantillon avec le faisceau pour en former l'image de fluorescence à une hauteur précise. On peut ensuite déplacer le faisceau verticalement puis recommencer, pour obtenir ainsi différents plans de coupes.

La microscopie confocale est particulièrement utile pour l'imagerie d'échantillons épais ou de structures complexes, tels que les tissus biologiques ou les cultures cellulaires en 3D. En éliminant la lumière hors foyer, il est possible d'obtenir des images à haute résolution de couches ou de régions spécifiques de l'échantillon, ce qui permet une analyse détaillée de la structure et de la fonction des systèmes biologiques.

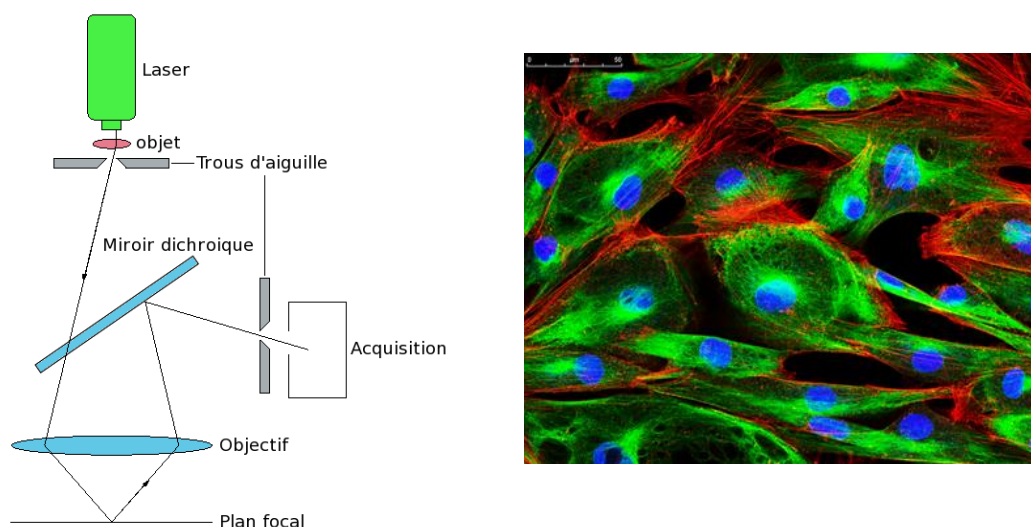


Figure II.5. Schéma de fonctionnement d'un microscope confocal, Une image de protoplastes

capturée à l'aide de la microscopie confocal (à droite)

II.5.4. Le microscope à champ sombre

Un microscope à champ sombre permet d'observer des échantillons transparents. Il contient un détecteur, des lentilles pour le grossissement. Un anneau de phase qui sélectionne une partie de la lumière et une source lumineuse.

Grace à un anneau qui stoppe une partie du faisceau, le cône de lumière ne parvient pas au détecteur. Quand on place un échantillon, celui-ci diffuse une partie de la lumière, même s'il est transparent. Cette lumière diffusée est refocalisée vers le détecteur. On voit alors apparaître l'image de l'échantillon à l'écran. La microscopie à champ sombre permet notamment de renforcer le contraste d'objets non colorés.

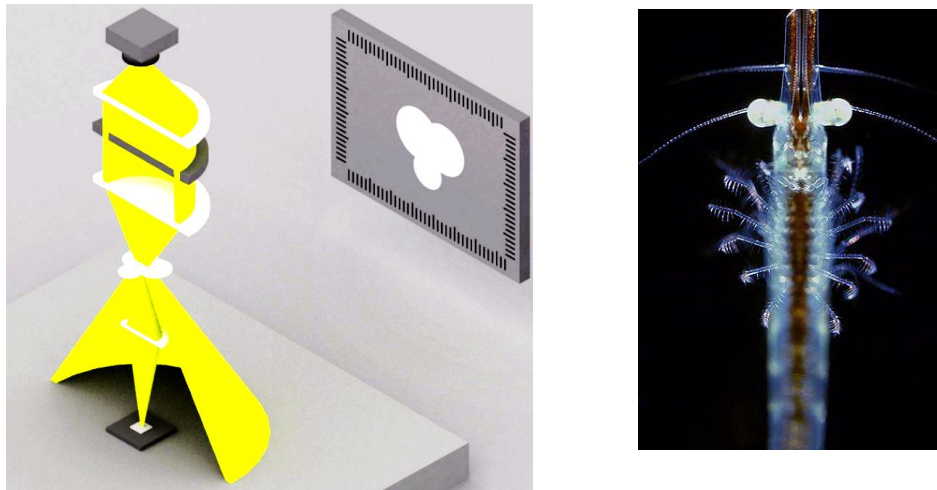


Figure II.6. Schéma de fonctionnement d'un microscope à champ sombre,
Un peracarida (mysidacé) éclairé en champ sombre (à droite)

II.5.5. Le microscope à contraste de phase

Un microscope à contraste de phase permet d'observer des échantillons transparents, comme des cellules sans devoir les colorer. Un anneau de phase modifie le faisceau lumineux.

Quand un échantillon est inséré, il diffuse une partie de la lumière également refocalisée par l'objectif vers le détecteur. Pour distinguer le faisceau direct et celui diffusé par l'échantillon, une plaque de phase est insérée. Le faisceau diffusé traverse une plus grande épaisseur de la plaque ; cela le déphase par rapport au faisceau direct.

Le faisceau diffusé interfère alors avec le faisceau direct ce qui crée le contraste de phase. Cette différence d'intensité permet de visualiser les échantillons même transparents.

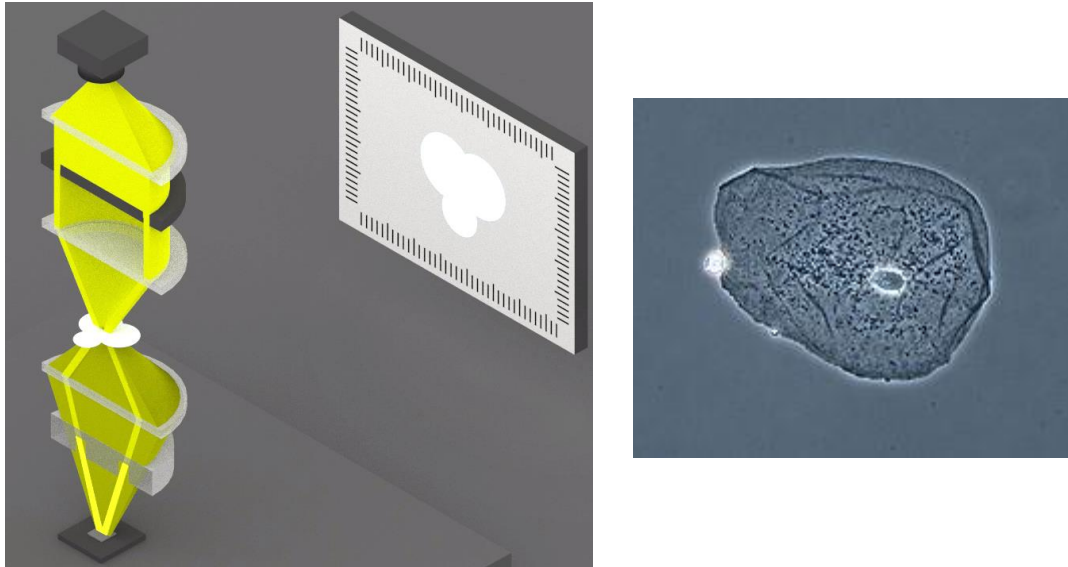


Figure II.7. Principe de La microscopie à contraste de phase Photographie d'une cellule épithéliale de joue vue par un Microscope à contraste de phase (à droite)

Comparaison entre le microscope à champ sombre et à contraste de phase

Les microscopes à champ sombre et contraste de phase permettent d'observer des échantillons transparents. Celui à champ sombre produit un cône de lumière qui ne parvient à l'objectif que lorsqu'il est diffusé par l'échantillon. Cela renforce les contrastes de l'image.

Le microscope à contraste de phase, lui, modifie le trajet de la lumière de sorte qu'une partie du faisceau est modulée par l'échantillon et pas l'autre. En faisant interférer ces deux faisceaux, on crée un contraste qui permet de visualiser les échantillons même transparents.

II.5.6. Le microscope à force atomique

Le microscope à force atomique permet de mesurer la topographie de la surface de la matière jusqu'à la résolution atomique.

Un microscope à force atomique sonde la surface d'un échantillon ; il est constitué d'une pointe placée au bout d'un levier, et d'un système optique utilisant un laser pour détecter les déviations de la pointe.

Quand la pointe est déplacée le long de la surface de l'échantillon, la déviation du rayon laser permet de mesurer la hauteur de la pointe et ainsi le profil de la surface. Il permet donc de visualiser la topologie des surfaces jusqu'à des résolutions atomiques.

Un autre mode de fonctionnement, le «tapping mode», est souvent utilisé. Ici, on fait osciller régulièrement la pointe lors de son déplacement. Elle touche moins souvent la surface ce qui

l'use moins.

Le microscope à force atomique peut aussi mesurer la force exercée par la surface sur la pointe ; pour cela, on mesure la déviation de la pointe pendant qu'on la fait s'approcher verticalement de la surface à une position fixée. Plus la pointe est proche de la surface, plus elle est attirée car les atomes de pointe et de la surface s'attirent. Mais à très courte distance, quand la pointe 'touche' la surface, elle est repoussée, car les atomes de la pointes et ceux de la surface ne peuvent pas s'inter-pénétrer. Cette mesure de force permet de déterminer plusieurs caractéristiques de la surface, par exemple son élasticité.

Des techniques analogues en utilisant des pointes magnétiques ou électrique permettent de mesurer les propriétés magnétique ou électriques de la surface.

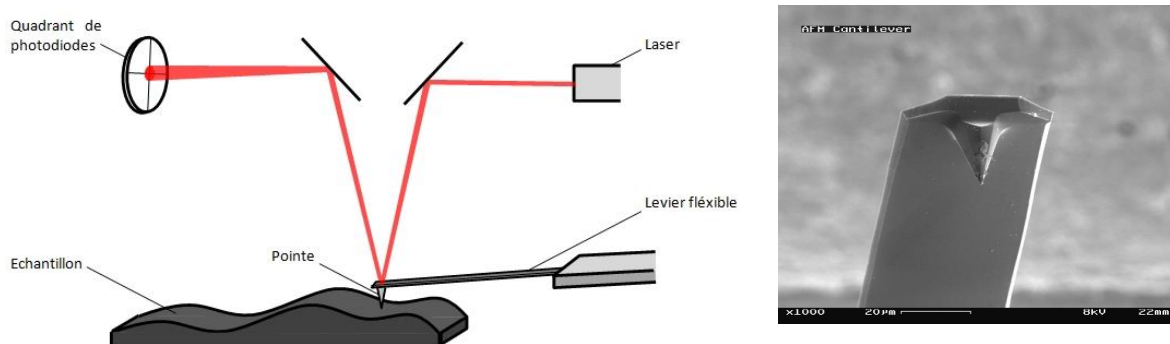


Figure II.8. Principe de La microscopie à force atomique. Pointe en Silicium (à droite)

Grâce à la microscopie à force atomique, il est possible d'observer non seulement l'oligomère, mais aussi des polymères de différentes tailles et d'autres petites molécules

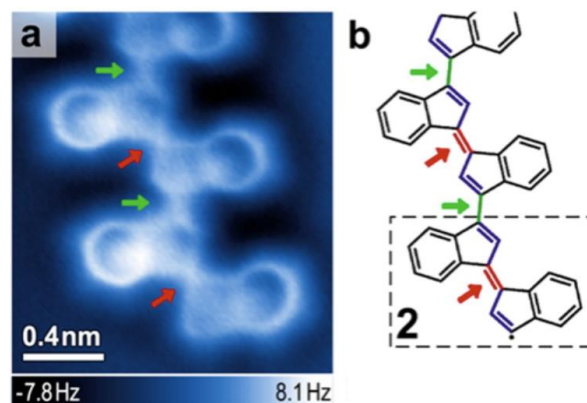


Figure II.9. Observation du polymère par le microscope à force atomique

II.5.7. Le microscope à effet tunnel

Quand un objet quantique est envoyé sur une barrière épaisse, il rebondit. Si la barrière est assez fine, l'objet peut parfois passer à travers. Plus la barrière est fine, plus l'objet a de chances de

passer. Observons un métal, constitué d'atomes et d'électrons quantiques. Si on approche une pointe très fine alimentée électriquement, elle peut arracher par effet tunnel les électrons du métal. En mesurant le courant électrique qui passe dans la pointe, on peut reconstituer ou se trouvent les atomes et tracer leur position. C'est le principe du microscope à effet tunnel.

Un microscope à effet tunnel est constitué de deux électrodes de conductivité raisonnable dont l'une à la forme d'une pointe et l'autre est la surface du film à étudier. La distance pointe-échantillon est de l'ordre de quelques angströms. Si une tension de polarisation est appliquée entre la pointe et la surface, les électrons ont une probabilité non nulle de passer d'une électrode à l'autre et un courant tunnel va donc naître. En faisant varier la position de la pointe ou la tension appliquée, on peut ainsi avoir à la fois des informations sur la topographie de la surface et sur sa nature physique et même les caractéristiques des électrons du métal..

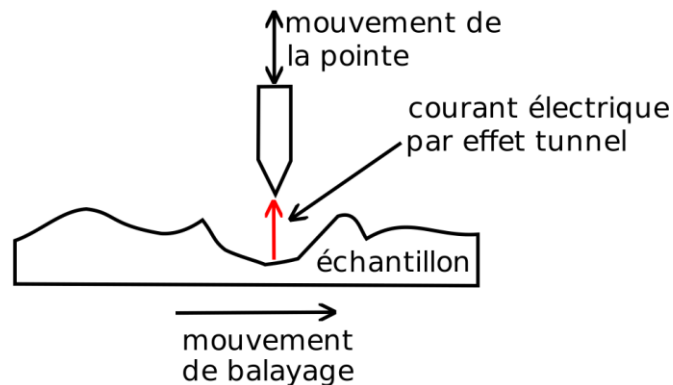


Figure II.10. Principe de fonctionnement du microscope à effet tunnel.

II.6. Microscopes électroniques

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf que :

- Les photons sont remplacés par des électrons.
- Les lentilles de verre sont remplacées par des lentilles électromagnétiques.
- La limite de résolution du ME est plus élevée à celle du MO. Elle est de 2 nm (c'est-à-dire 1000 fois plus élevé que le MO).

L'agrandissement du ME peut atteindre jusqu'à 500.000 contre 2000 pour un MO.

II.6.1. Le microscope électronique à balayage

Le pouvoir de résolution (capacité à distinguer des détails fins) de l'œil humain avec un microscope optique est limité par la longueur d'onde de la lumière visible (photons) ainsi que par la qualité des lentilles grossissantes. Les plus puissants microscopes optiques peuvent distinguer des détails de 0,1 à 0,2 μm . Si l'on veut observer des détails plus fins, il faut diminuer la longueur d'onde qui éclaire les cibles. Dans le cas des microscopes

électroniques, on n'utilise pas des photons, mais des électrons, dont les longueurs d'ondes associées sont beaucoup plus faibles.

Le microscope électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais pour *scanning electron microscopy*) permet d'obtenir une image fortement agrandie de la surface d'échantillons épais, mais aussi d'en analyser la composition.

Le microscope électronique à balayage utilise un fin faisceau d'électrons, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques permettent de focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon.

L'interaction entre les électrons et l'échantillon provoque la formation d'électrons secondaires de plus faible énergie. Ils sont amplifiés puis détectés et convertis en un signal électrique. Ce processus est réalisé en chaque point de l'échantillon par un balayage du microscope. L'ensemble des signaux permet de reconstruire la typographie de l'échantillon et de fournir une image en relief. Le MEB réalise donc une topographie de l'échantillon à analyser, c'est pourquoi le MEB fournit des images en noir et blanc où chaque nuance de gris est le résultat de l'intensité du courant détecté.

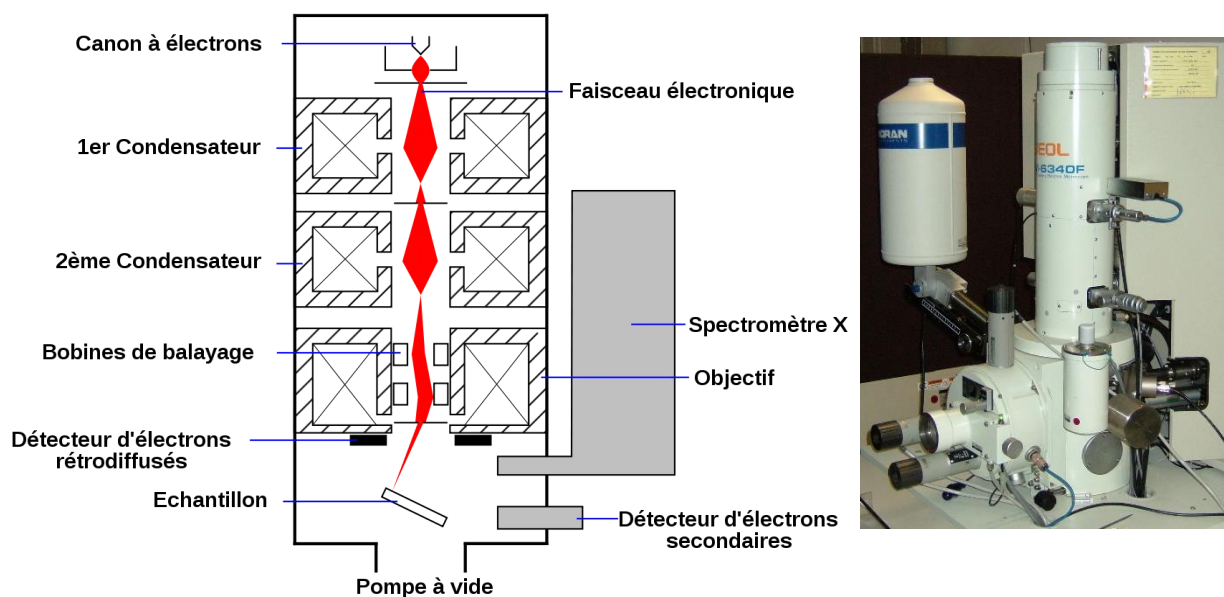


Figure II.11. Schéma d'un MEB équipé d'un détecteur de rayons X « EDS »

Un MEB est constitué des éléments suivants :

- Un **canon à électron** qui envoie un faisceau d'électrons (source d'électrons primaire).
- Une **lentille magnétique** qui focalise les électrons comme peut le faire une lentille optique avec la lumière de manière à obtenir un faisceau très fin et focalisé.

- Des **bobines de balayage** permettant balayer la surface de l'échantillon à observer avec le faisceau d'électrons. Ces bobines sont positionnées perpendiculairement de manière à faire parcourir des lignes au faisceau de la même manière que dans une télévision.
- Une **pompe à vide** permettant de faire le vide dans l'enceinte où se trouve l'échantillon. En effet, pour obtenir une mesure précise, il est important de faire le vide dans l'enceinte.
- Un **détecteur** permettant de détecter les électrons secondaires.

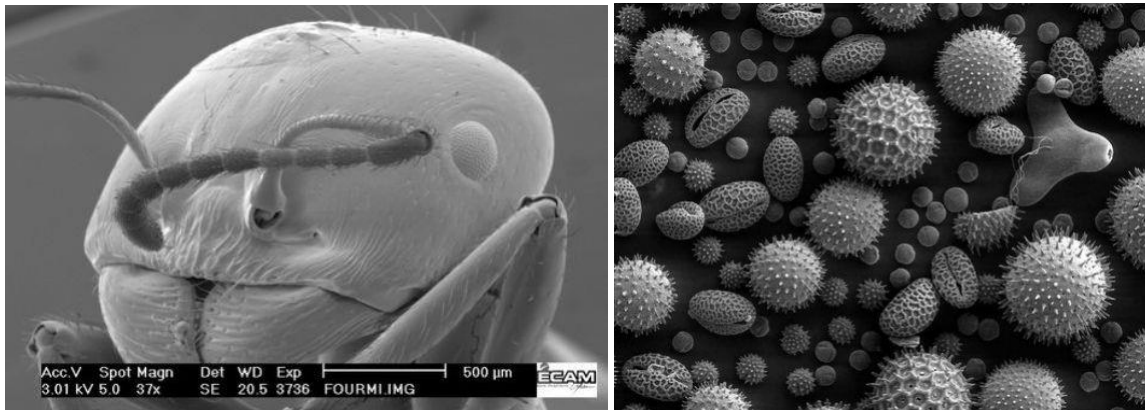


Figure II.12. Tête d'une fourmi obtenue par MEB (à gauche) *Grains de pollen* (à droite)

II.6.2. Le microscope électronique à transmission

Il fonctionne sur le même principe que le MEB sauf que le faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. Cet appareil permet des analyses ponctuelles fines et précises mais surtout d'avoir ponctuellement des informations sur la structure cristalline du minéral. Il nécessite une préparation lourde mais aussi la destruction des échantillons. Soit le minéral doit être réduit en poudre soit il doit subir un amincissement ionique.

Le microscope électronique à transmission utilise un faisceau d'électrons pour observer et imager des échantillons. Les électrons sont extraits d'un filament (tungstène; borure de lanthane) chauffé à très haute température (1.500 à 2.700°C) et sont accélérés par l'application d'une haute tension qui peut aller de 50.000 à 300.000 volts (à 80.000 volts la vitesse des électrons est de 150.000 km/sec soit la moitié de la vitesse de la lumière). Pour ne pas être déviés de leur trajectoire les électrons circulent dans une colonne dans laquelle un vide poussé (10^{-7} - 10^{-10} Torr) est maintenu grâce à un système de pompes.

Des lentilles électromagnétiques se succèdent dans la colonne pour contrôler leur trajet: les lentilles condenseurs focalisent les électrons sur un échantillon extrêmement mince, la lentille objectif donne la première image agrandie de l'échantillon, des lentilles intermédiaires agrandissent encore l'image et la projettent sur un écran fluorescent. Le grossissement peut aller

de 500 à 5.000.000x, selon le microscope. Un hublot d'observation permet de visualiser l'image qui se forme sur l'écran.

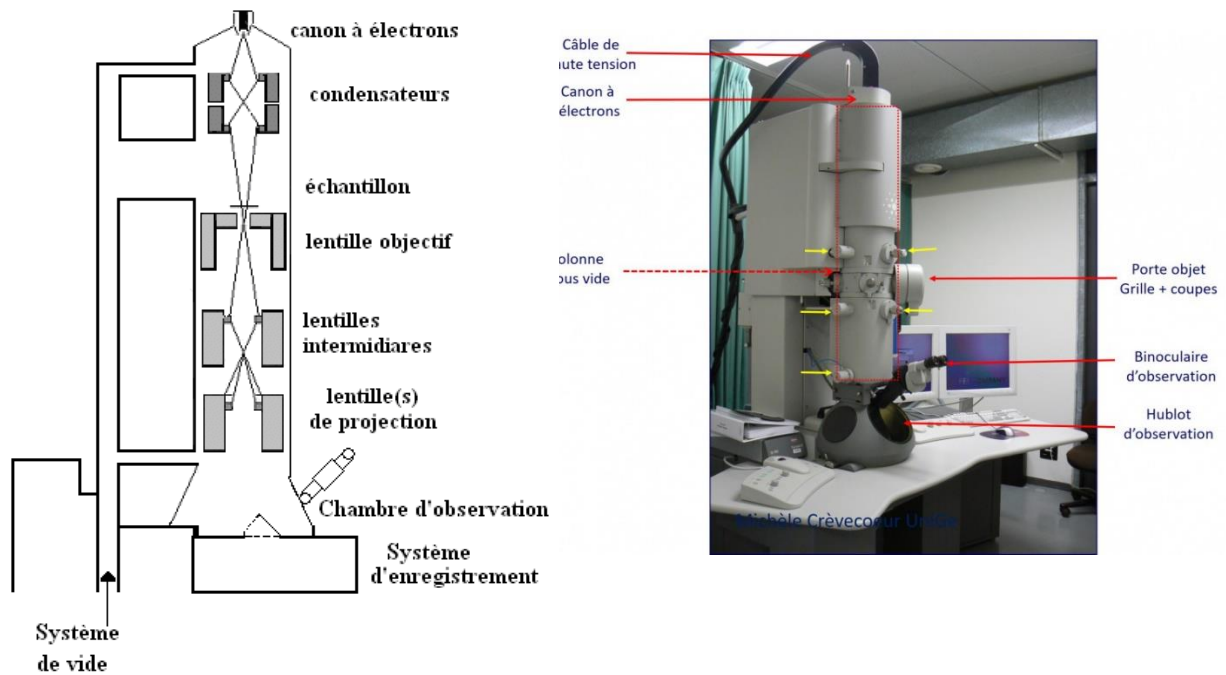


Figure II.13. Schéma d'un microscope électronique à transmission

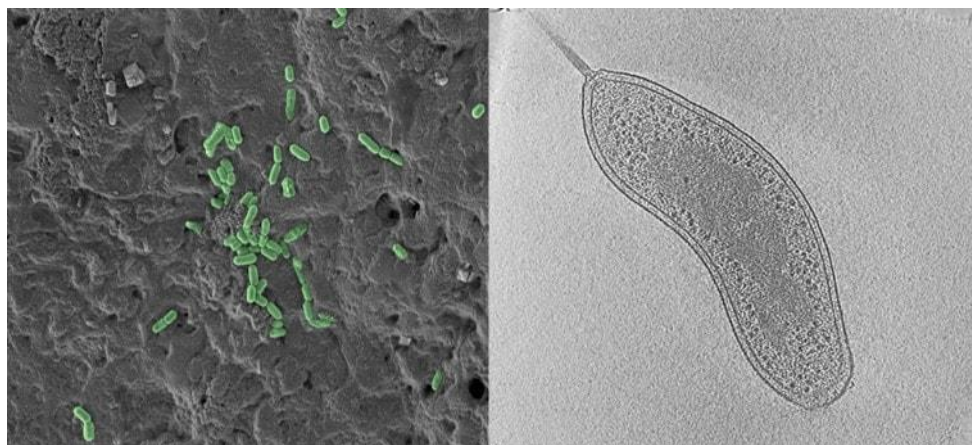


Figure II.14. Images MEB (à gauche) et MET (à droite) de bactéries. Alors que le MEB montre de nombreuses bactéries sur une surface (vert), l'image MET montre la structure intérieure d'une seule bactérie.