

## En savoir un peu plus sur le(s) microscope(s)

par Guy Auderset (\*)

### 1. Types d'appareils

Depuis une vingtaine d'années coexistent deux types fondamentaux d'appareils :

- Les appareils anciens (Wild, American Optical, Olympus, Leitz, Euromex, Paralux,...), avec une longueur de tube de 160 ou 170 mm, où une image intermédiaire est produite par l'objectif et grossie par un oculaire.
- Les appareils modernes (Leica, Nikon, Zeiss ... et d'autres) à optique dite ICCS (Infinity Color Corrected System) dont les objectifs corrigés « à l'infini » offrent une section à faisceaux parallèles. Ils sont d'ailleurs marqués du symbole « ∞ ».



*Modèle American Optical binoculaire : un classique !*  
(photo Marcel Lecomte)

Avantages du nouveau système : on peut intégrer toutes sortes d'accessoires directement dans le microscope. La qualité d'image est superbe.

Inconvénients : les optiques ne sont pas compatibles avec les anciens modèles (propriétés optiques, pas de vis) ; prix élevé des objectifs ; impossibilité actuellement (ou grande difficulté) d'acheter du matériel d'occasion.

### 2. Composants du microscope

Tout microscope comporte quatre parties principales :

+++ La tête : partie optique supérieure portant les oculaires. Elle peut être monoculaire, binoculaire, trinoculaire pour adapter caméra ou appareil de photo.

+++ La tourelle porte-objectifs (ou revolver) : accueille des objectifs en nombre variable.

+++ La platine porte-objet et la source d'éclairage : Cette dernière est constituée de deux parties :

- La **source** elle-même : lampe à bas voltage (ancien système à incandescence), lampe halogène (le plus fréquent), LEDs (d'origine maintenant sur de nombreux microscopes : c'est la solution d'avenir), lampe à vapeur de mercure (Hg) ou de xénon, LEDs avec une longueur d'onde précise, pour la fluorescence. Il existe aussi, le plus souvent, un diaphragme de source, ainsi que divers filtres.
- Le **condenseur** avec diaphragme d'ouverture, monté sur une crémaillère sous la platine porte-objet.

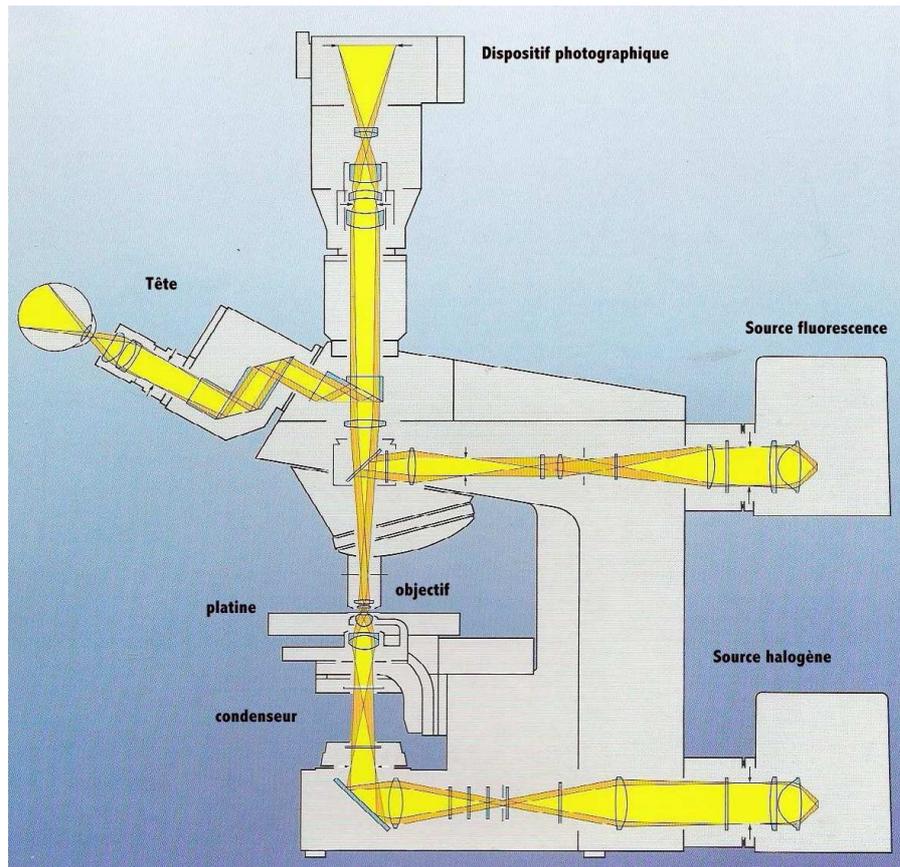


*Un « monstre » de technologie : le Zeiss AxioScope A1, équipé en fluorescence, contraste de phase, contraste interférentiel de Nomarski, fond noir, polarisation, 6 objectifs à l'infini, avec éclairage par leds (épiscopie et diascopie).* (Photo Marcel Lecomte)

(\*) Guy Auderset, Chargé de cours (Botanique) à l'Université de Genève, [gauderset@bluewin.ch](mailto:gauderset@bluewin.ch)

A ce dispositif de base peuvent s'ajouter des accessoires, par exemple :

- Source lumineuse pour la **fluorescence** : disposée obligatoirement au niveau de la tête (épiscopie) puisque la lumière qui sert à produire la fluorescence au niveau de l'objet (lumière dite d'excitation) doit passer à travers l'objectif par un jeu de miroirs, et la fluorescence qu'elle produit en éclairant l'objet est reprise par le même objectif pour l'observation (lumière d'émission). Cette source fluorescente comprend la source elle-même, souvent une lampe à vapeur de mercure de 50 ou 100 W (*précautions d'utilisation*), alimentée par un transformateur particulier. De plus, juste au-dessus des objectifs, se trouve un dispositif porte-filtres (tourelle, glissière) et le ou les filtres appropriés à la fluorescence que l'on veut mettre en évidence et observer.
- Dispositifs d'enregistrement photographique ou TV : disposés sur le troisième tube de la tête.



### +++ Les objectifs

Composants essentiels du microscope puisqu'ils déterminent le grossissement. Il est important d'en contrôler périodiquement la propreté, surtout pour les objectifs les plus longs (les plus puissants). Dévisser l'objectif de la tourelle et contrôler la propreté de la lentille frontale en s'aidant d'une loupe à main. La nettoyer si nécessaire avec un chiffon humecté d'acétone pure ou d'éther (avis divers sur le sujet) et essuyer rapidement.

*( !!! Les objectifs à immersion devraient être nettoyés immédiatement après leur utilisation : ils risquent de souiller la lame et les autres objectifs lors des observations ultérieures !!! ).*

Les caractéristiques de chaque objectif sont gravées sur la monture :

Chiffres en grand : pouvoir grossissant propre, ex : 2,5x, 5x, 10x, 40x, 100x. Ce grossissement est à multiplier par celui qui est gravé sur les oculaires, généralement 10x, ce qui donne comme grossissement total pour notre exemple : 25x, 50x, 100x, 400x, 1000x.

Une autre caractéristique gravée peut se révéler importante, surtout si on travaille à fort grossissement, c'est l'ouverture numérique (gravure : ON ou NA selon les fabricants) ou simplement sa valeur qui est de 0,... jusqu'à 1,40 (maximum optique possible).

Cette valeur NA détermine le pouvoir de résolution du système, c'est-à-dire la capacité de résoudre (différencier) deux points séparés par une distance infime. Plus la valeur NA est élevée, meilleur.

leure est la résolution. Dans le cas d'observations précises et fines, ce paramètre peut jouer un rôle important.

De 2,5 à 40x, les objectifs sont dits « à sec » par opposition aux objectifs puissants de 50 à 100X : ces derniers sont dits à immersion (caractéristique HI gravée sur la monture), c'est à dire qu'ils nécessitent l'apposition d'une goutte d'huile spéciale ( $n = 1,51$ ), dite huile à immersion, entre la lentille frontale et la lamelle qui recouvre l'objet à observer.

Le Pr. Abbe, de Zeiss Jena (~1885 !), a calculé et démontré que la résolution d'un objectif dépend de la longueur d'onde de la lumière utilisée, d'une NA élevée (le prix de l'objectif aussi !) et de l'indice de réfraction « n » du milieu d'observation qui doit être plus grand que 1,0, celui de l'air (à sec). D'où l'utilisation de cette huile d'immersion de  $n = 1,51$ .

*Notice épistémologique : il existe au musée Zeiss Jena une lettre que Robert Koch adressa à Carl Zeiss et Abbe pour les remercier de la mise au point de ces systèmes HI qui lui permirent de découvrir le bacille qui porte son nom : Mycobacterium tuberculosis (bacille de Koch) ! D'autres témoignages aussi importants pour l'avancement de la médecine existent également.*



**Trypanosoma gambiense** (protozoaire responsable de la maladie du sommeil) vu en fond clair classique et en DIC (photo de droite) – photos Guy Auderset

D'autres caractéristiques sont parfois gravées : « 0,17 » : épaisseur (standard) de la lamelle couvre-objet, « Plan » (objectif planachromatique), Plan Apo (objectif planapochromatique), FI (fluorite), qui indiquent d'éventuelles qualités de planéité et de couleurs.

Les objectifs marqués « PH » indiquent une utilisation en fond clair ou en contraste de phase.

### 3. Réglages, contrôles

Après avoir contrôlé la propreté des objectifs, le second contrôle important est celui du centrage et de la bonne hauteur du condenseur.

Centrage : après avoir mis au point sur une préparation, fermer complètement le diaphragme du condenseur : il en résulte un spot lumineux plus ou moins grand qui doit être au centre du champ de vision. Si ce n'est pas le cas, le centrer au moyen des deux vis moletées situées de part et d'autre du condenseur. Rouvrir le diaphragme.

Hauteur : pour éclairage dit « de Köhler » : pour un objectif donné, la position du condenseur doit, en principe, être adaptée. Après mise au point sur une préparation, fermer complètement le diaphragme de champ (pas celui du condenseur !). Un spot lumineux plus ou moins net apparaît. Le rendre le plus net possible en montant ou descendant lentement le condenseur. Rouvrir le diaphragme...dont c'est le seul usage. Ce réglage est surtout nécessaire pour les objectifs à fort grossissement (40 et 100) afin d'en exploiter au mieux les qualités optiques.

« Chauffer » assez la lampe pour avoir une bonne image (voltage à ne pas dépasser) et ne pas oublier de l'augmenter pour les forts grossissements.

En observation de coupes, commencer toujours par un objectif faible. La mise au point pour les suivants est très facile avec la vis micrométrique.

Si vous avez travaillé en fluorescence, contrôler qu'il ne reste pas un bloc-filtre dans le trajet de la lumière. Même chose après une observation en contraste de phase : s'assurer que le coulisseau est en position vide.

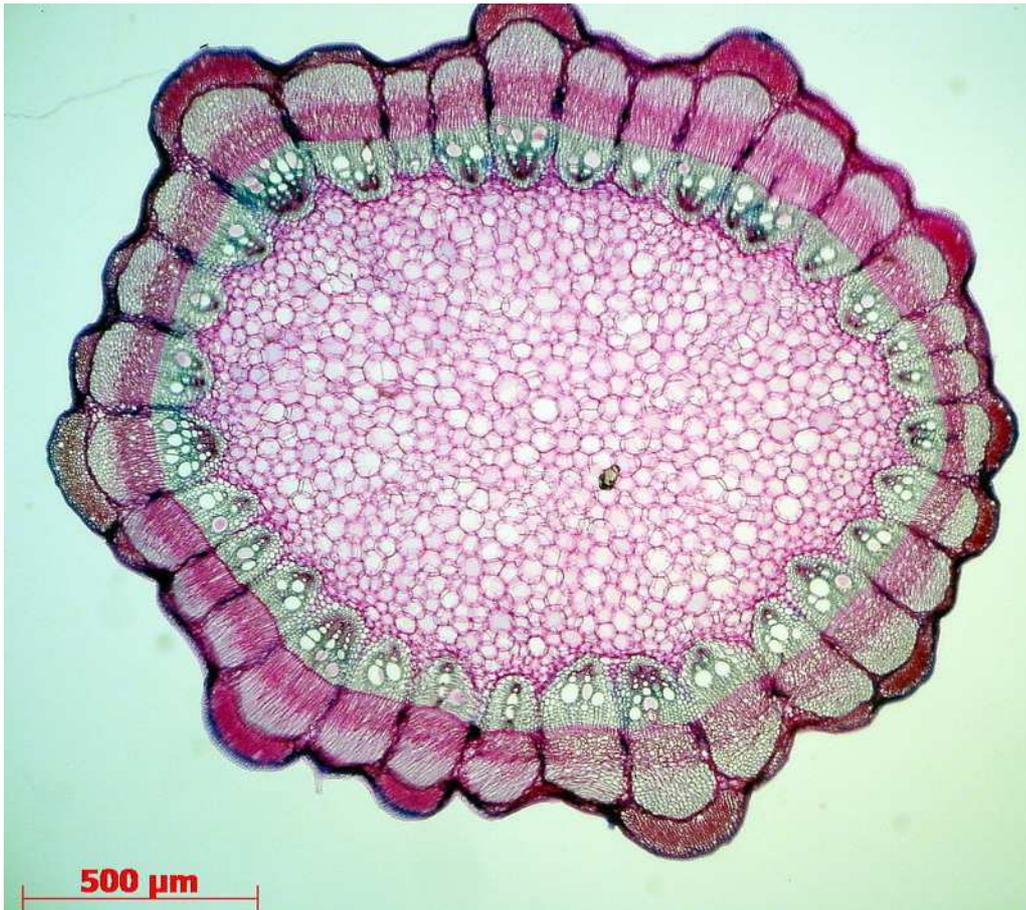
#### 4. Les différents modes d'observation

##### 1. Fond clair

C'est le mode le plus fréquent : on observe le matériel par transparence (diascopie).

Après avoir réglé la hauteur du condenseur, il convient de fermer le diaphragme qui lui est associé d'environ un tiers. Cela a pour effet d'augmenter légèrement le contraste des structures observées. Remarquons qu'il y a les règles d'utilisation théoriques, mais mettez-vous tout de même dans les conditions les plus confortables en tâtonnant un peu !

Les observations de coupes colorées ne posent pas de problème particulier. En cas d'observation de matériel vivant, il convient de rechercher le meilleur contraste en « jouant » un peu avec le diaphragme de condenseur et la hauteur de celui-ci.



*Une coupe transversale dans une tige de vigne (Vitis vinifera), avec double coloration au vert de méthyle et carmin aluné - photo Guy Auderset*

##### 2. Contraste de phase

Cette méthode permet l'observation de matériel vivant, ou non coloré, en ayant une bonne vision des détails structuraux qui en fond clair normal seraient peu ou pas visibles.

Ce type d'observation s'effectue en fond clair, avec dispositif particulier : les objectifs doivent porter la mention «PH», c'est-à-dire qu'ils portent un anneau (dit : plaque de phase) gravé sur la lentille supérieure de l'objectif. Au niveau du condenseur, on dispose d'un système d'anneaux de phase spécifiques à l'objectif utilisé, soit sous forme d'un revolver qui en permet le choix, soit sous forme d'un coulisseau portant le ou les anneaux.

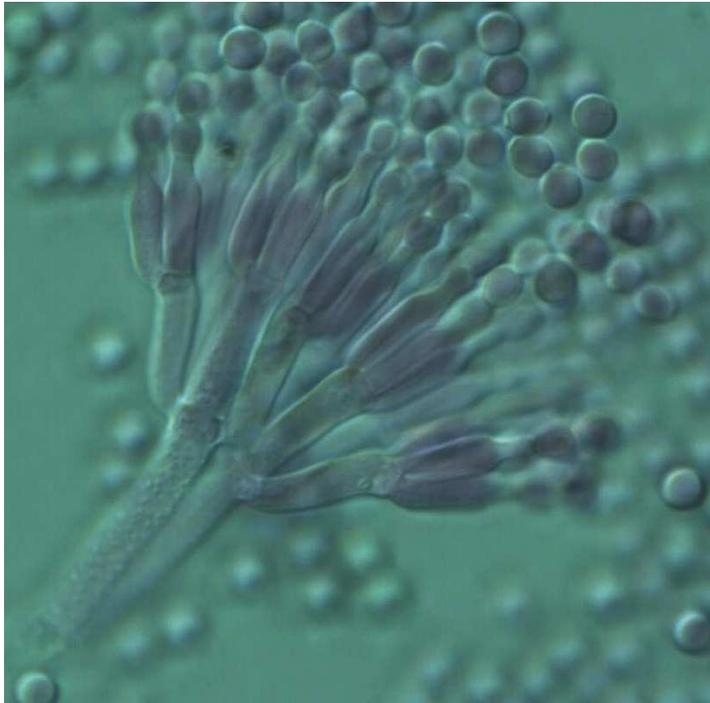
Le matériel observé doit être mince. Le dispositif Phase permet de transformer en niveau de gris les différences d'indice de réfraction qui existent entre les structures observées.

Quand une structure cellulaire produit une diffraction suffisante, la lumière qui la traverse subit un déphasage par rapport aux autres rayons lumineux. Les anneaux, au niveau de l'objectif et du condenseur, filtrent ces rayons déphasés : il en résulte sur l'image un contraste accentué.

Règle : Choisir un objectif et son anneau condenseur correspondant  
 Centrer les anneaux de l'objectif et du condenseur  
 Ne pas trop diaphragmer le condenseur

Intérêt de la méthode : voir « l'invisible » (désolé, St-Exupéry !) ; on passe très rapidement du fond clair au contraste de phase et réciproquement.

Il existe un autre dispositif (complexe et cher) de contraste de phase, dit « contraste interférentiel de Nomarski », ou encore DIC. Les résultats sont surprenants et exceptionnels.



Un « pinceau » de *Penicillium sp.* photographié en DIC (63x) (préparation & photo Marcel Lecomte)

## Technique de préparation du matériel biologique en vue d'une observation

### 1. Observation de matériel à l'état frais

Cette technique est adoptée surtout pour les examens de matériel de faibles dimensions : plancton, algues, cultures cellulaires, bactéries, certains champignons, spores, etc. Bien évidemment, le matériel doit être translucide et laisser passer une bonne partie de la lumière de la source d'éclairage.

Elle fait appel à une lame porte-objet standard, un milieu liquide (milieu de culture ou eau) et une lamelle qui recouvre le matériel. Cette dernière est

quasi obligatoire : pour protéger l'objectif tout d'abord, puis pour exploiter au mieux les capacités de résolution de l'objectif qui, sauf exception (pas de 0,17 gravé sur la monture), sont calculées avec la présence de l'épaisseur de la lamelle.

En cas d'observation d'organes plus volumineux : feuilles, fragments de tige ou racine par exemple, on peut procéder à une dilacération modérée des tissus ou des coupes à main levée au moyen d'une lame de rasoir, avant l'observation qui se fera entre lame et lamelle.

Dans ce type d'observation, le fond clair est pratiqué en diaphragmant assez fortement le condenseur pour augmenter le contraste du matériel vivant non coloré, ou bien l'observation peut se faire en contraste de phase ce qui améliore fortement l'observation des structures.

*!!! Le microscope et sa source dégagent de la chaleur. En cas d'observation prolongée d'une préparation « à l'état frais », contrôler qu'elle ne se dessèche pas. Rajouter un peu de liquide sur un bord de la lamelle si nécessaire.*

### 2. Observation de matériel fixé

La **fixation** consiste à tuer le matériel destiné à l'observation tout en préservant le mieux possible les structures cellulaires et tissulaires. Elle consiste à plonger les fragments de tissus dans un mélange de produits, le fixateur, dont les composants vont agir sur les structures cellulaires en les stabilisant : le formol (ou autres aldéhydes) stabilise les protéines en créant des ponts artificiels entre les secteurs des chaînes de protéines. L'acide acétique stabilise (coagule) l'ADN et permet une bonne visualisation des chromosomes. Aucun fixateur n'est parfait et on doit le choisir en fonction des besoins de l'observation. La liste est nombreuse...

En histologie végétale, le fixateur le plus courant, donnant un résultat acceptable est le **AFA** (Alcool, Formol, Acide acétique). On l'utilise en routine pour les coupes à la paraffine (histologie).

## Observation de petit matériel

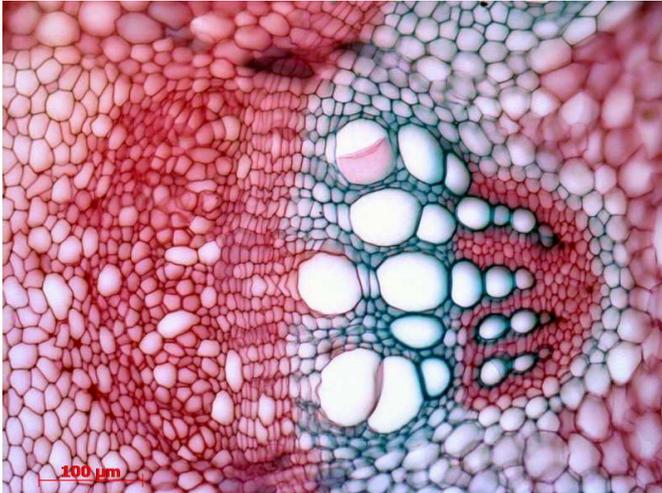
Le matériel de faible dimension évoqué ci-dessus peut aussi bien être observé de la même manière après avoir été fixé (= préservé), par exemple sur le terrain, avant d'être ramené au labo. Le fixateur usuel standard est le formol à 4-5 %.

**!!! Attention aux vapeurs toxiques du formol : laver le matériel dans de l'eau avant l'observation.**

## Observations de type anatomique & histologique

Le but est de faire des coupes dans le matériel afin d'en étudier la structure.

Les modalités sont diverses et vont nécessiter un choix en fonction du matériel à étudier :



*Coupe dans Vitis vinifera, avec double coloration* – photo Guy Auderset

- **Matériel « dur »**, généralement fortement lignifié ; par ex. : tiges, racines de 2ème-3ème année ou plus ; la présence de fortes quantités de lignine/subérine empêche la confection de coupes histologiques et met le rasoir (fort cher) du microtome en mauvais état.

Il existe, en cas de besoin absolu, des techniques lourdes de dissolution de la lignine, avec utilisation de produits dangereux (acide fluorhydrique).

Dans la nécessité de couper ce type

de matériel, la bonne vieille méthode des TP s'impose : **coupe à main levée**, traitement à l'eau de javel et coloration carmin aluné/vert d'iode ; elle donne des résultats très satisfaisants. Un peu de patience et de persévérance sont indispensables !

- **Matériel « mou »**, c'est à dire peu lignifié : organes jeunes, vitro-plants, pièces florales, feuilles, embryons, calcs, etc. : la technique usuelle est celle de la **paraffine**.

**Description** : le matériel fixé est déshydraté puis imprégné à chaud avec de la paraffine maintenue à l'étuve (60°C). Après refroidissement, les blocs de paraffine, dans lesquels sont inclus les échantillons biologiques, sont débités en coupes au moyen d'un microtome. Ces coupes sont ensuite collées sur des lames porte-objet et, après séchage, colorées avec des solutions de colorant(s) déterminées pour la mise en évidence de structures cellulaires ou tissulaires.

Cette méthode nécessite beaucoup de soins et de temps mais présente de nombreux avantages : les coupes obtenues sont minces, généralement 10 microns d'épaisseur. Elles permettent une bonne observation des structures cellulaires. Un choix de colorant approprié permet de mettre en évidence des structures particulières. Enfin, le matériel débité en coupes successives autorise une reconstitution spatiale du matériel observé.

Inconvénient : certaines colorations faciles à utiliser sur les coupes à main levée sont plus difficiles à pratiquer sur des coupes à la paraffine.

*Pour information* : il existe une technique comparable à la méthode paraffine : elle utilise une résine époxy qui nécessite un microtome particulier et un couteau de diamant : les coupes obtenues (dites semi-fines) ont une épaisseur de 1-2 microns et, en utilisant un fixateur « parfait » utilisé en microscopie électronique, cela donne les plus belles images que l'on puisse observer en microscopie optique.