

Le microscope et son utilisation en lichénologie

1^{ère} partie : Description et fonctionnement du microscope optique à fond clair

par **Jean-Pierre GAVÉRIAUX**
14, les Hirsons ; F - 62800 LIEVIN
E-mail : Jean-Pierre.Gaveriaux@wanadoo.fr

Les pionniers comme Elias Magnus FRIES (1794-1878) n'avaient pas de microscope ; ils ont étudié uniquement les caractères macroscopiques des champignons (champignons lichénisés inclus) pour établir les bases de la mycologie. Les premiers mycologues à utiliser un microscope, par exemple Lucien QUELET (1832-1899), disposaient d'un matériel rudimentaire, peu précis et les observations grossières qui étaient réalisées conduisaient souvent à des conclusions inexactes.

Avec l'avènement d'un matériel optique plus performant, le 20^{ème} siècle a permis à la mycologie de progresser considérablement et si, actuellement les reconstitutions phylogénétiques basées sur l'étude des ADN remettent en question certaines parties de la systématique classique, établie à partir des études en microscopie optique, le microscope à fond clair reste l'outil de base du mycologue et lichénologue.

1590	Zacharias découvre le principe du microscope composé.
1667	Bonnani invente l'éclairage par transparence (suite à l'établissement des lois de la réfraction par Descartes).
1683	Leeuwenhoek construit des loupes (improprement appelées microscopes) permettant de grossir jusqu'à 275 fois.
1740	Hall fabrique les premiers objectifs achromatiques.
1820	Création d'optiques performantes par Marzoli, Tully et Dellond (la supériorité du microscope sur la loupe va pouvoir enfin s'imposer).
1850	Amici invente la technique de l'immersion à eau (ensuite on a utilisé la glycérine puis l'huile de cèdre).
1863	Construction de l'ancêtre du microscope moderne muni d'un condenseur à fond noir par Duboscq et Nachet .
1875	Abbe montre l'influence de l'ouverture numérique sur le pouvoir séparateur d'un objectif. Collaboration avec Zeiss et invention des premiers apochromatiques.
1893	Köhler met au point un système d'éclairage plus performant en plaçant devant la source lumineuse un collecteur muni d'un diaphragme.
1904	Mise au point du microscope à lumière ultraviolette par Köhler et Rohr qui utilisent le quartz et la fluorine.
1904	Siedentopf réalise le premier microscope à fluorescence.
1935	Zernicke met au point le microscope à contraste de phase.
1952	Nomarski invente le microscope interférentiel.

Quelques dates importantes dans l'histoire du microscope optique

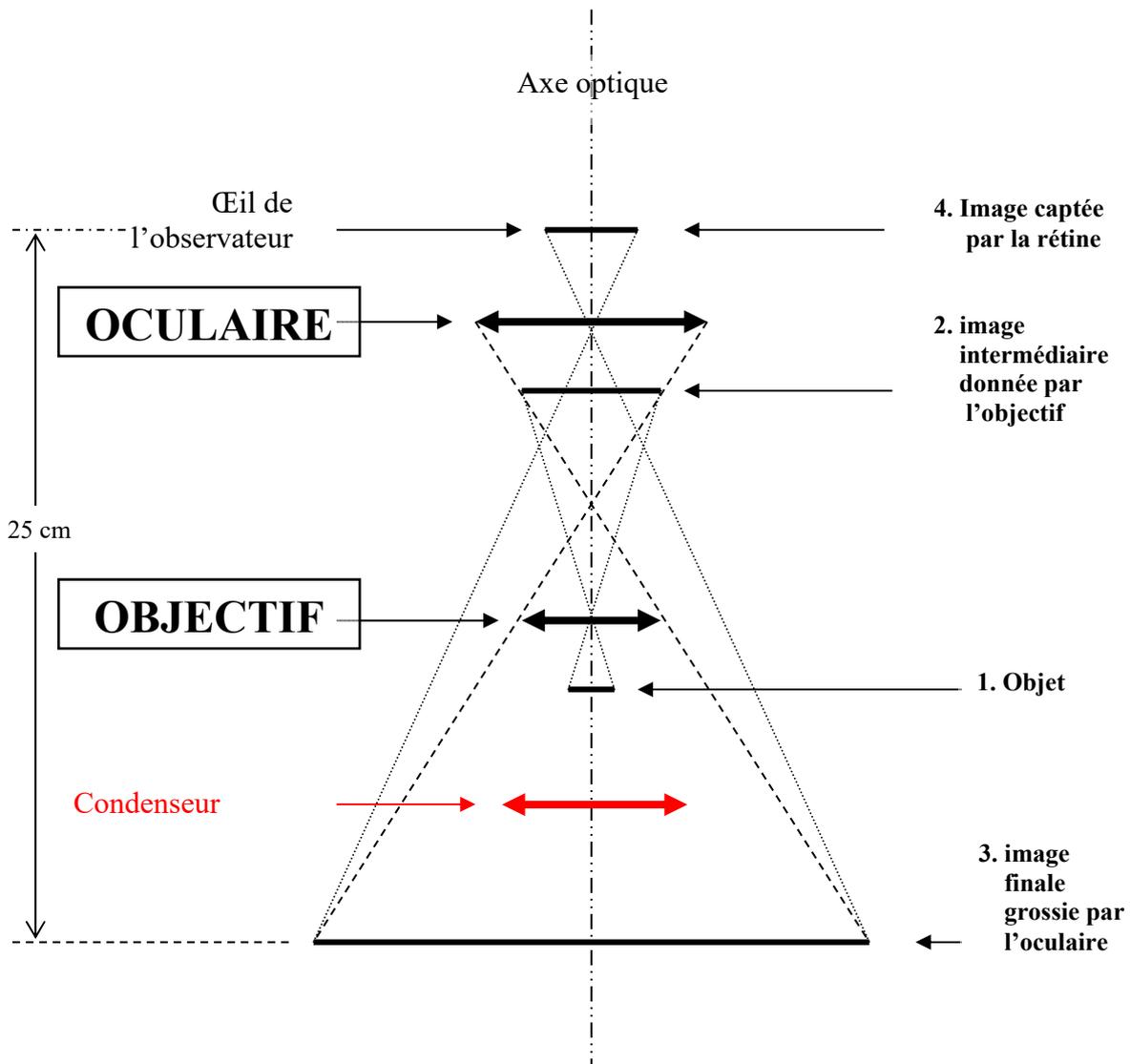
Il nous a donc paru utile de publier quelques articles sur l'utilisation du microscope en mycologie et lichénologie, la plupart des clés de détermination faisant appel à des caractères non décelables à l'œil nu. Cela semble répondre au souhait de nombreux membres de notre

association qui hésitent encore à acheter un matériel dont ils ne maîtriseraient pas parfaitement le fonctionnement.

I Principe du microscope optique

Un tube possède à ses deux extrémités des lentilles.

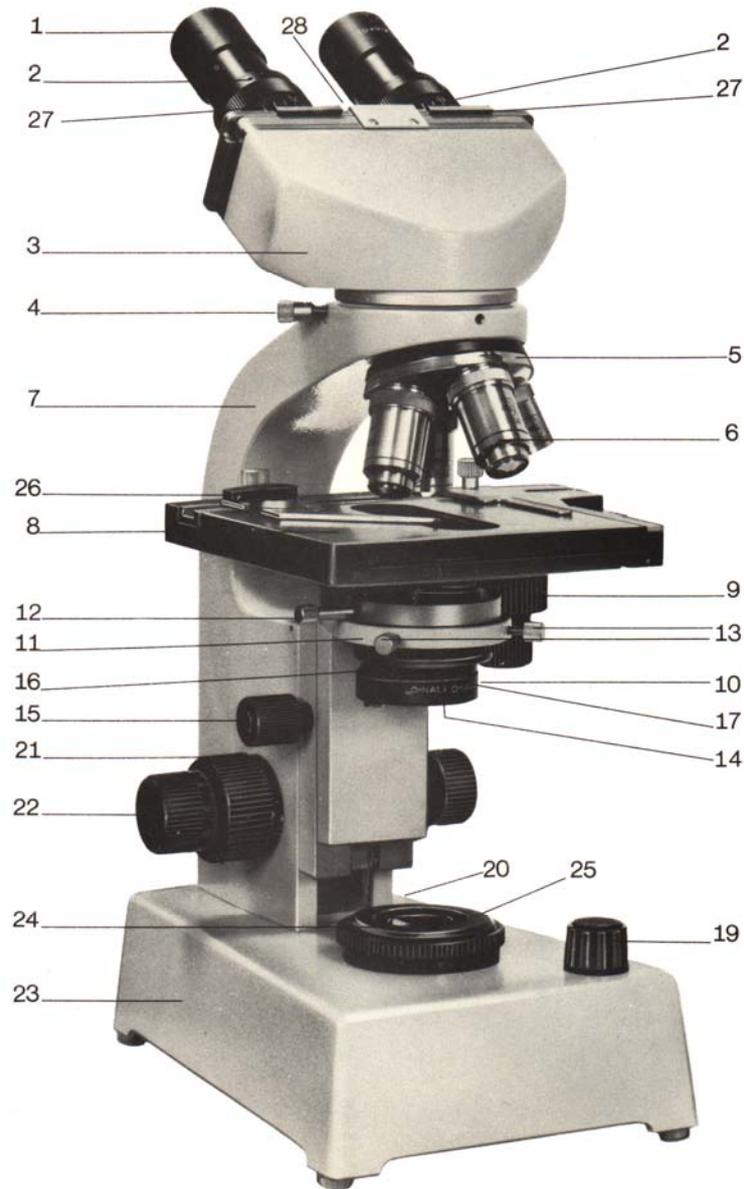
Le premier groupe de lentilles, dirigé vers l'objet à examiner, constitue l'**objectif**. Il donne une image réelle, inversée et agrandie de l'objet. Cette image n'est pas formée sur un verre dépoli, mais se trouve quelque part dans le tube optique, c'est l'image intermédiaire.



Principe du microscope :

L'image intermédiaire formée par l'objectif est grossie par l'oculaire

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.



- | | |
|--|---|
| 01 - Oculaires | 15 - Réglage en hauteur du condenseur |
| 02 - Tubes porte-oculaires réglables | 16 - Diaphragme d'ouverture |
| 03- Tête binoculaire tournante | 17 - Porte-filtre escamotable |
| 04 - Vis de blocage de la tête binoculaire | 19 - Interrupteur et réglage de la puissance de l'éclairage incorporé |
| 05 - Tourelle revolver porte-objectifs | 20 - Prise du cordon d'alimentation |
| 06 - Objectif (parafocalité de 45 mm) | 21 - Mise au point rapide bilatérale |
| 07 - Potence verticale | 22 - Mise au point micrométrique bilatérale |
| 08 - Platine avec chariot incorporé | 23 - Base du statif (contenant l'éclairage) |
| 09 - Boutons de commande du chariot | 24 - Collecteur avec diaphragme de champ |
| 10 - Condenseur d'Abbe à 3 lentilles | 25 - Cavité pour filtres |
| 11 - Sous-platine mobile verticalement | 26 - Chariot mobile |
| 12 - Vis de fixation du condenseur | 27 - Ecartement réglable des oculaires |
| 13 - Vis e centrage du condenseur | 28 - Indicateur d'écartement interpupillaire |
| 14 - Lentille escamotable | |

Les constituants d'un microscope optique binoculaire (Will - Leica Wetzlar)

Le grossissement total du microscope est égal au produit du grandissement de l'objectif (un rapport de longueurs) par le grossissement de l'oculaire (un rapport angulaire).

Grandissement de l'objectif	Grossissement de l'oculaire	Grossissement total du micro.	Nom commun donné à l'observation
4	10	40	faible grossissement
10	10	100	faible grossissement
20	10	200	grossissement moyen
40	10	400	grossissement moyen
100	10	1000	fort grossissement

Dans la pratique, on ne dépasse pas le grossissement 1000. La qualité essentielle d'un système optique n'est pas son grossissement mais son pouvoir séparateur, c'est-à-dire sa capacité à distinguer deux points situés l'un à côté de l'autre. La limite de ce pouvoir séparateur est de 0,2 µm pour les meilleurs objectifs apochromatiques, ayant une ouverture numérique de 1,4 et fonctionnant à l'aide d'un condenseur particulier (un condenseur achromatique-aplanétique).

En mycologie, on utilise principalement trois grossissements : le Gx100 pour rechercher les structures à étudier. La partie significative est ensuite placée au milieu du champ optique puis on passe au Gx400 pour observer les basides, asques, cystides, poils des revêtements piléiques... ou au Gx1000 pour l'observation des spores ou des détails particuliers. On peut donc, dans un premier temps, se limiter à un oculaire x10 et trois objectifs (x10, x40 et x100 à immersion).

II Les constituants du microscope

A) La partie mécanique

- **Le statif** : un support rigide formé d'une base contenant le système d'éclairage et d'une partie verticale sur laquelle sont fixés le tube optique, la platine et la sous-platine. Dans les microscopes d'initiation, le tube optique est mobile et la mise au point se fait en éloignant ou en rapprochant ce tube de la platine. Dans les microscopes perfectionnés, c'est la platine qui se déplace, ce qui autorise le montage d'équipements sophistiqués au sommet du tube (tête trinoculaire et dispositif de photomicrographie).

- **La platine porte-objet** : rigoureusement perpendiculaire à l'axe optique, présente un orifice central permettant le passage des rayons lumineux. Elle reçoit les préparations et est mobile dans toutes les directions. En plus de son déplacement vertical qui permet la mise au point, la platine est capable d'un déplacement sagittal et d'un déplacement transversal, ce qui facilite l'exploitation méthodique des coupes microscopiques. Deux échelles graduées avec verniers permettent un repérage très précis et répétitif des coordonnées X et Y sur une préparation. Les microscopes d'initiation possèdent une platine fixe, la préparation (éventuellement maintenue par 2 valets) est déplacée à la main.

- **La sous-platine** : est une petite platine située sous la platine principale. Elle porte le condenseur et ses accessoires (porte-filtres, dispositif de centrage optique, prisme de Nomarski pour observation en contraste interférentiel...). Son déplacement vertical permet le réglage en hauteur du condenseur.



Quelques exemples de microscopes optiques

- 1. Microscope monoculaire d'initiation Euromex ;
- 2. L1100A de Paralux ;
- 3. DMLS modulable Leica ;
- 4. CH30 d'Olympus ;
- 5. M250 Biologie de Nached ;
- 6. Labphot trinoculaire de Nikon.

- **La tourelle porte-objectifs (ou revolver)** : est un disque tournant à la partie inférieure du tube optique grâce à un roulement à bille de précision. Il est percé de trois à sept trous à filetage normalisé, permettant le vissage des objectifs. Un crantage permet de déceler, lors de la rotation du revolver, l'alignement correct de l'objectif.

- **La tête porte-oculaires** : dans les microscopes simples (pour initiation) le tube optique présente dans sa partie supérieure un tube **monoculaire** droit ou incliné ; l'observateur regarde avec un seul œil, ce qui entraîne rapidement une fatigue importante des yeux si les observations sont nombreuses.

Pour des observations régulières et de longues durées, il est fortement recommandé d'utiliser une tête **binoculaire**. L'image passe dans une série de prismes dont certains sont semi-réfléchissants ; l'image est ainsi séparée en deux images dirigées chacune vers un oculaire (vision binoculaire mais non stéréoscopique, les deux images étant identiques). L'écart entre les deux oculaires est réglable en fonction de la distance interpupillaire de l'observateur (généralement réglable entre 55 et 75 mm).

Certaines têtes sont **trinoculaires**, elles sont conçues pour la photomicrographie. Un sélecteur de trajet optique permet la mise au point photo en observation binoculaire ou dirige les rayons lumineux uniquement vers l'oculaire photo ou vers les oculaires d'observation.

Remarque : la tête binoculaire peut être remplacée par un **phototube** vertical ; cette solution très économique permet la photomicrographie mais nécessite le démontage de la tête avant chaque prise de vues.

- **La commande de mise au point** : permet d'obtenir une image nette, en modifiant la distance objectif - coupe microscopique. Deux techniques sont disponibles :

- modifier la position de l'objectif en déplaçant l'ensemble du tube optique, mécanisme utilisé sur les microscopes d'initiation ;
- déplacer verticalement la platine porte-objet, mécanisme utilisé sur les microscopes plus perfectionnés ; la position des oculaires d'observation reste fixe et il est possible de monter sur le microscope des systèmes de prise de vues et des accessoires variés ;
- pour le déplacement on dispose d'un mouvement rapide et d'un mouvement lent destiné à parfaire la mise au point grâce à une vis micrométrique munie d'un tambour gradué.

B) Le dispositif d'éclairage

C'est généralement un éclairage halogène incorporé dans la partie basale du statif où il prend peu de place tout en étant à l'abri des poussières et salissures. L'ampoule halogène bas voltage, de très petite dimension, est placée devant un miroir parabolique qui refocalise l'image du filament afin d'obtenir un rendement lumineux plus important dont la puissance se règle avec un potentiomètre (une lumière trop puissante fatigue les yeux).

À la sortie du dispositif se trouve un **collecteur** destiné à envoyer la lumière vers le condenseur. Ce collecteur est muni d'un diaphragme (le **diaphragme de champ**) que l'on ferme plus ou moins pour ajuster le diamètre de la zone éclairée au diamètre de la partie visible de la préparation (champ du microscope).

Si le diaphragme de champ est trop fermé, la partie périphérique de l'objet n'est pas éclairée (présence d'une zone périphérique sombre dans le champ). Si le diaphragme de champ est trop ouvert, des parties non observées de la préparation sont éclairées, ce qui engendre des réflexions, diffractions et diffusions parasites qui dégradent l'image finale.

Sur les microscopes que nous utilisons, la température de couleur des halogènes de puissance 10 à 20 watts, ne dépasse pas 3200°K (celle de la lumière solaire est de 5500°K) ; pour

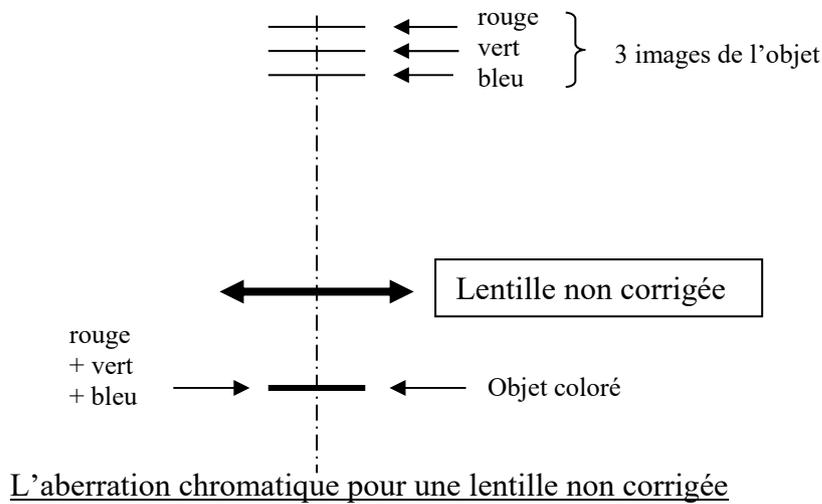
diminuer la dominante rouge qui en résulte, il est fortement conseillé de placer en permanence un **filtre bleu** (en principe fourni avec l'appareil par le fabricant) à la sortie du collecteur.

C) La partie optique

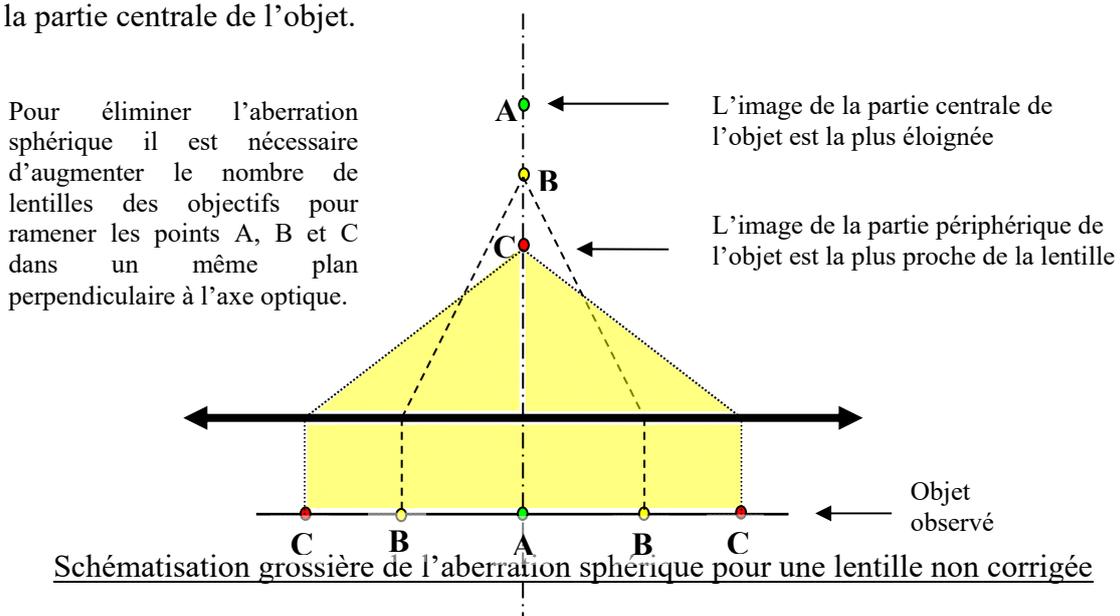
Cette partie comprend trois ensembles optiques (objectifs, oculaires et condenseurs) dont les caractéristiques sont à la base des performances du microscope.

Ces systèmes optiques sont composés d'un nombre plus ou moins important de lentilles qui obéissent aux lois de l'optique (et non aux codes de fonctionnement de l'œil humain), ce qui entraîne des aberrations que l'on peut schématiquement classer en trois groupes.

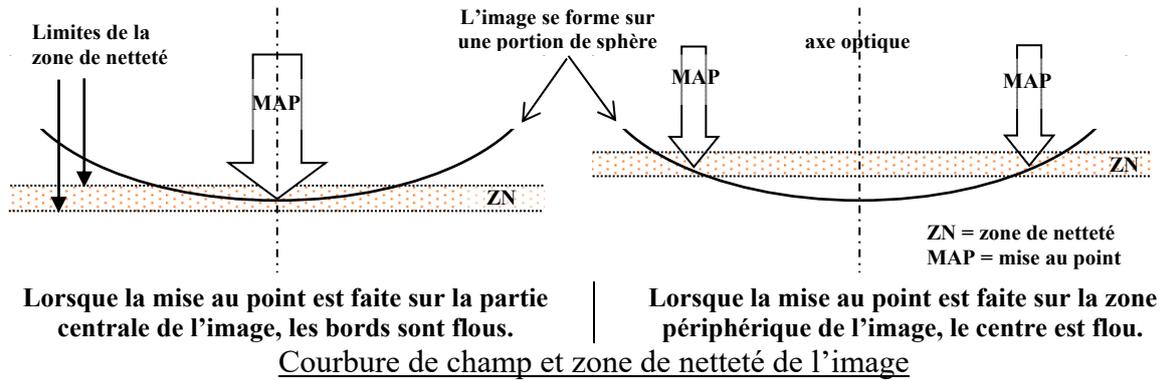
- Les **aberrations chromatiques** : décalage dans l'espace des différentes couleurs issues d'un même objet coloré après traversée d'une ou plusieurs lentilles ; plus la longueur d'onde est grande, plus l'image se positionne vers l'arrière. On trouve successivement le bleu, le vert enfin le rouge.



- Les **aberrations géométriques** : en particulier l'aberration sphérique qui donne une déviation plus importante des rayons marginaux qui se forment ainsi devant les rayons issus de la partie centrale de l'objet.



- La **courbure de champ** : responsable de la formation de l'image sur une portion de sphère et non dans un plan.



Pour corriger ces diverses catégories de défauts, il est nécessaire de faire varier :

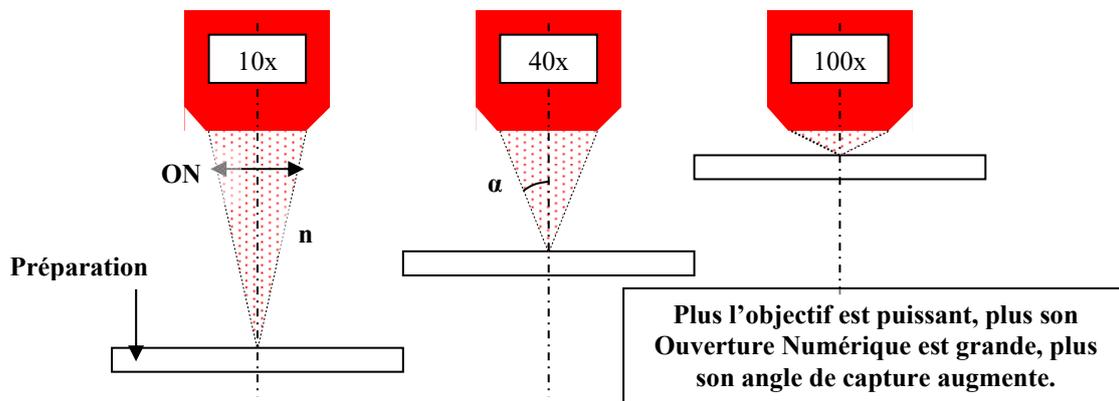
- le nombre de lentilles et leur puissance (convergence/divergence),
- les rayons de courbures et le traitement des faces,
- la position relative des divers groupes (doublets, triplets...),
- la composition des lentilles en utilisant plus de 30 sortes de verres (les flints, à base d'oxyde de plomb ayant un indice de réfraction plus important que les crowns moins réfringents).

1. Les objectifs

Ils donnent une image réelle, inversée et agrandie de l'objet. Éléments essentiels dans la constitution des images, les objectifs sont définis par plusieurs caractéristiques, certaines étant gravées sur le fût de l'objectif.

- L'ouverture numérique (NA)

En photographie, les objectifs sont définis par leur ouverture (2 ; 2,8 ; 4 ; 5,6 ; 8...) ; en microscopie par leur ouverture numérique, capacité à capter les rayons lumineux diffractés (envoyés obliquement pour simplifier à l'extrême) par l'objet éclairé.



Plus leur angle de capture est grand, plus ils sont aptes à montrer les petits détails. Les physiciens ont ainsi défini l'ouverture numérique par la formule :

$$\text{Ouverture numérique} = ON = NA \text{ (Numerical aperture)} = n \sin \alpha$$

n = indice de réfraction du milieu dans lequel travaille l'objectif (1 pour l'air ; 1,515 pour le verre ordinaire ; 1,515 ou 1,518 pour l'huile à immersion).

α = angle formé par l'axe de l'objectif et les rayons extrêmes le traversant et participant à la formation de l'image.

Plus l'objectif grandit l'image, plus son ON augmente. Pour les objectifs 100 à immersion l'ouverture numérique dépasse 1 (1,25 à 1,40 pour les plus performants).

	4 x	10 x	20 x	40 x	100 x
objectifs achromatiques	0,10	0,25	0,40	0,65	1,25
objectifs semi-apochromatiques	0,12	0,30	0,50	0,75	1,30
objectifs apochromatiques	0,16	0,40	0,70	0,95	1,40

Ouverture numériques des différents types d'objectifs

- Le grandissement

Couramment mais improprement appelé grossissement, le grandissement est le rapport entre la taille de l'image formée par l'objectif et la taille réelle de l'objet (le terme grossissement désigne un rapport entre des valeurs angulaires et non entre des valeurs linéaires).

- Le code coloré

Un anneau de couleur permet d'identifier le grandissement de l'objectif.

Grandissement	1 x	2 x	4x	10 x	20 x	40 x	50 x	60 x	100 x
code coloré	Noir	Marron	Rouge	Jaune	Vert	Bleu clair	Bleu clair	Bleu cobalt	Blanc

Code coloré d'identification des grandissements des objectifs pour microscope

- Le type

Caractéristiques de l'objectif ; certaines d'entre elles sont gravés sur le fût.

Ces indications ne sont pas standardisées mais les termes très proches les uns des autres permettent de trouver rapidement les principales références.

Liste simplifiée des principaux sigles et leur signification :

A ; *Achro* ; *Achromat* = objectifs achromatiques

Apo ; *Apochromat* = objectifs apochromatiques

DIC ; *NIC* = obj. pour contraste interférentiel (Contrast de Nomarski)

ELWD = obj. pour extra longue distance de travail

Epi = objectifs pour épi-illumination

Fl ; *Fluo* ; *Neofluar* ; *Fluotar* ; *Semi-apo* = objectifs à la fluorine = obj. semi-apochromatiques

Fluo-plan ; *Pl-Fl* = objectifs plans semi-apochromatiques ou plans à la fluorine

G.F. = objectifs grand champ

Gly = Immersion dans la glycérine

H = pour utilisation avec une platine chauffante.

HI = Immersion homogène

I ; *Iris* ; *W/Iris* = objectif muni d'un diaphragme permettant la modification de l'ouverture numérique (exemple lors de l'utilisation avec condenseur pour fond noir).

Korr ; *Corr*, *W/Corr* ; *CR* = objectif avec bague permettant l'ajustement à l'épaisseur de la lamelle.

LU = Obj. (Nikon) universel pour fond clair, fond noir, contraste de phase et lumière polarisée.

LWD = Obj. pour grande distance de travail (Long-Working-Distance)

M = objectifs pour métallographie (n'utilisant pas de lamelle couvre-objet).

NCG = objectifs pour observation sans lamelle couvre-objet (*No-Cover Glass*)

Oil ; Oel = obj. nécessitant l'immersion dans l'huile.

P ; Pol = objectifs spéciaux pour lumière polarisée

P ; Pol ; SF = objectif sans contrainte (strain free) utilisé pour avoir une lumière polarisée de haute qualité.

Ph ; Phaco = objectifs pour contraste de phase en association avec un condenseur spécial

Plan ; Pl ; NPl = objectifs planachromatiques

Planapo ; Apoplan = objectifs planapochromatiques

SLWD = obj. pour très longue distance de travail (Super-Long-Working-Distance).

UPLAN = Obj. (Olympus) universel pour fond clair, fond noir, contraste de phase et lumière polarisée.

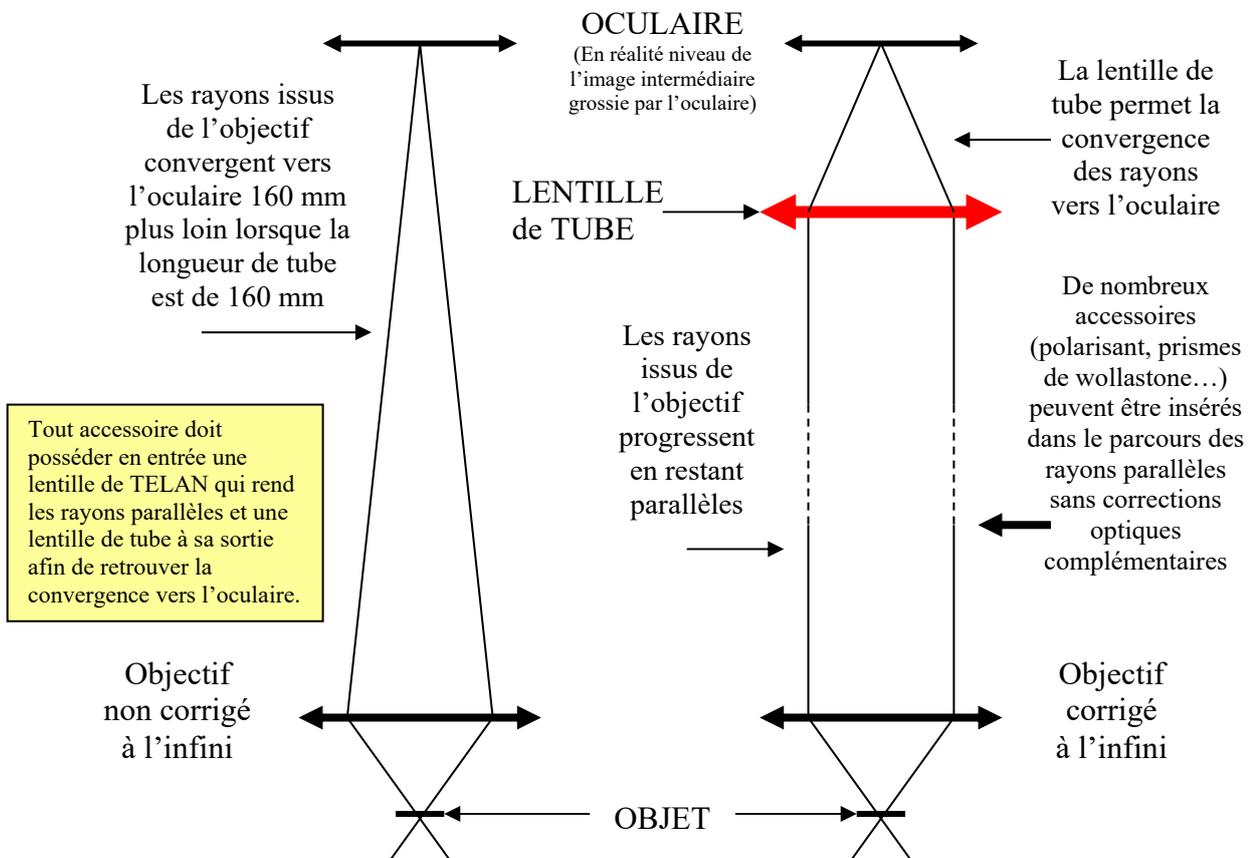
UV = obj. ayant un traitement particulier des surfaces des verres spéciaux afin de permettre le travail dans l'ultraviolet ($\lambda < 400$ nm).

Water ; WI ; Wasser = Immersion dans l'eau.

Les lettres sont noires pour les types standards, rouges pour les objectifs destinés à la lumière polarisée et vertes pour le contraste de phase.

- La longueur mécanique de tube ou longueur d'équilibrage

C'est la distance entre la position d'insertion de l'objectif et le sommet du tube optique qui reçoit l'oculaire. Pendant de nombreuses années cette longueur a été fixée à 160 mm, ce qui signifie, par exemple, qu'un objectif 10x donne à cette distance une image corrigée des aberrations géométriques et agrandie 10 fois. La norme s'est ensuite établie à 170 mm, 180 mm, 210 mm... (Attention lors de l'achat d'objectifs en occasion ! L'objectif acheté doit correspondre à la longueur de tube du microscope sur lequel il sera monté).



Les objectifs corrigés à l'infini ne fonctionnent pas de la même manière que les objectifs calculés pour une longueur de tube donnée ; ces optiques ne sont pas interchangeables.

Les microscopes de nouvelle génération sont actuellement proposés avec des systèmes optiques corrigés pour l'infini ; dans le tube optique du microscope il y a un groupe de lentilles supplémentaires (= lentille de tube). Sur le fût des objectifs corrigés à l'infini on trouve le signe ∞ .

Pour l'utilisateur, ce tube uniforme 'infini' offre des avantages ; les objectifs corrigés à l'infini sont interchangeables sur tous les microscopes adaptés à l'infini et il est possible, sans dommage pour l'image finale, d'ajouter divers équipements sur le trajet optique entre l'objectif et l'oculaire.

- L'épaisseur de la lamelle couvre-objet

La lamelle induit un excès de sphéricité qui est compensé dans l'objectif. Ceci nécessite une épaisseur constante de la lamelle fixée à 0,17 mm. Certains objectifs possèdent une bague correctrice qui permet l'ajustement à l'épaisseur de la lamelle. Pour les objectifs à immersion qui travaillent dans l'huile, l'épaisseur du couvre-objet est peu important, l'huile ayant le même indice de réfraction que le verre.

- La distance focale

Indispensable à connaître en photographie classique (180 mm pour un télé, 28 mm pour un grand-angle), la distance focale des objectifs pour microscope n'est généralement pas indiquée sur l'objectif ; elle est comprise entre 16 et 3 mm pour les objectifs à sec et entre 3 et 1,5 mm pour les objectifs à immersion. L'objectif pour microscope est donc un super grand-angulaire de distance focale extrêmement petite, mais on le définit surtout par son ouverture numérique.

- Le pouvoir pénétrant

Le pouvoir pénétrant ou profondeur de foyer désigne l'épaisseur de la zone dans laquelle tous les points de l'objet sont vus avec netteté ; il est l'équivalent de ce que l'on appelle profondeur de champ en photographie. Les éléments situés avant ou après cette tranche ne sont plus perçus avec autant de précision.

Le pouvoir pénétrant diminue lorsqu'on augmente l'ouverture numérique de l'objectif. Aux forts grossissements la zone de netteté est très faible et il est nécessaire de passer par les différents 'étages' de la préparation pour avoir une bonne idée de la façon dont l'objet est organisé dans l'espace.

Pour augmenter le pouvoir pénétrant il faut fermer légèrement le diaphragme d'ouverture placé dans le condenseur ; la netteté semble augmenter mais l'ouverture numérique du condenseur diminue (elle devient inférieure à l'ouverture numérique de l'objectif) et le pouvoir séparateur est diminué.

Remarque : En général on n'utilise jamais le diaphragme d'ouverture à la valeur de l'ouverture numérique de l'objectif, on le ferme toujours un peu pour avoir une plus grande profondeur de champ et un peu plus de contraste (on le ferme bien souvent aux trois quarts ou aux deux tiers de l'ouverture numérique de l'objectif).

- Le pouvoir séparateur

C'est la capacité pour un objectif de rendre visible deux points situés côte à côte.

Il peut être calculé à partir de l'équation de Abbe

$$PS = \text{Pouvoir Séparateur} = 0,61 \lambda / 2 \times ON = \lambda / 2n \sin \alpha$$

PS = plus petite distance entre deux points rapprochés nettement visibles séparément.

λ = la longueur d'onde de la lumière (de 400 à 760 nm pour la lumière blanche)
 ON = Ouverture numérique (= NA = Numerical Aperture).
 n = indice de réfraction du milieu dans lequel travaille l'objectif.
 α = angle formé par l'axe de l'objectif et les rayons extrêmes le traversant et participant à la formation de l'image.

Pour avoir la plus petite valeur possible de PS il y a donc trois solutions :

- diminuer λ [ex. en utilisant une lumière violette (400 nm) ou ultraviolette(330 nm
- augmenter n [utiliser l'huile à immersion].
- augmenter α [en travaillant avec un objectif qui s'approche davantage de l'objet (objectif à immersion)].

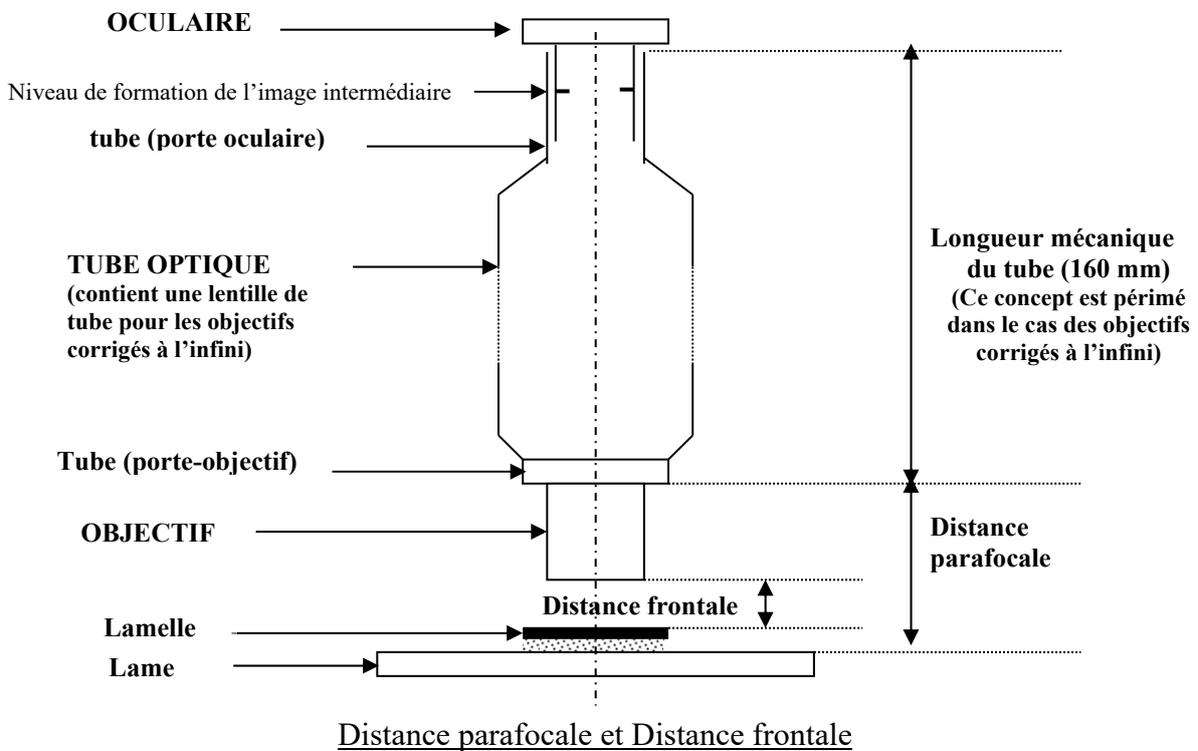
Remarque 1 : Pour un apochromatique 100x l'ON ne dépasse pas 1,40 et la lumière visible a une λ variant de 400 à 760 nm ; le PS est donc obligatoirement limité.

	ultraviolet	bleu	vert	rouge
Longueur d'onde (en nm ¹)	0,365	0,436	0,546	0,650
Pouvoir séparateur (en nm)	0,13	0,16	0,20	0,32

Valeurs du PS en fonction de la longueur d'onde (100x apo)

	4x	10x	40x	100x
objectif achromatique	2,75	1,10	0,35	0,22
objectif apochromatique	1,72	0,86	0,29	0,20

Valeurs du PS en fonction du type d'objectif (lumière verte)



¹ nm = nanomètre = millième partie du micron - unité de mesure des longueurs d'ondes (rappel des principales valeurs : ultraviolet moins de 400 nm ; violet 400-450 nm ; bleu 450-500 nm ; vert 500-580 nm ; jaune 580-610 nm ; rouge 610-700 nm ; infra-rouge plus de 700 nm).

Remarque 2 : Ce PS n'augmente pas lorsque l'on utilise un oculaire plus puissant ; l'image est plus grande mais on ne voit pas plus de détails.

Remarque 3 : Pratiquement on peut admettre que le grossissement total d'un microscope est au maximum de 1000 fois l'ON de son objectif. Ex. : un objectif 100x d'ouverture numérique 1,25 donnera une image 1250 fois plus grande que l'objet. Il est inutile d'utiliser un oculaire supérieur à 12,5x.

- La distance parafocale

C'est la distance qui sépare la zone d'insertion de l'objectif à la tourelle et le plan de la préparation. Autrefois cette distance était de 37 mm mais la construction d'objectifs complexes, à nombreuses lentilles, a entraîné une nouvelle norme et cette distance a été allongée à 45 mm. Pour utiliser les anciens objectifs parafofocalisés à 36 mm sur les nouveaux microscopes parafofocalisés à 45 mm il faut utiliser une bague d'adaptation de 9 mm.

- La distance de travail ou distance frontale

Distance entre la lamelle et la lentille frontale de l'objectif. Plus l'objectif a un grandissement important, plus cette distance diminue (1/10 de mm pour un 100x immersion). Il faut donc prendre des précautions pour ne pas abîmer l'objectif (ni la préparation) lors de la mise au point. Les objectifs modernes ayant un grandissement supérieur à 40x sont équipés d'un dispositif anti-choc, ils disposent d'un système à ressort qui évite la détérioration de la lentille frontale (et de la préparation).

Grandissement	4x	10 x	20 x	40 x	60 x	100 x
Ouverture numérique	0,13	0,25	0,40	0,65	0,80	1,30
Distance focale (mm)	30,03	16,90	8,63	4,58	3,14	1,92
Distance frontale (mm)	18,23	7,18	1,63	0,60	0,23	0,20

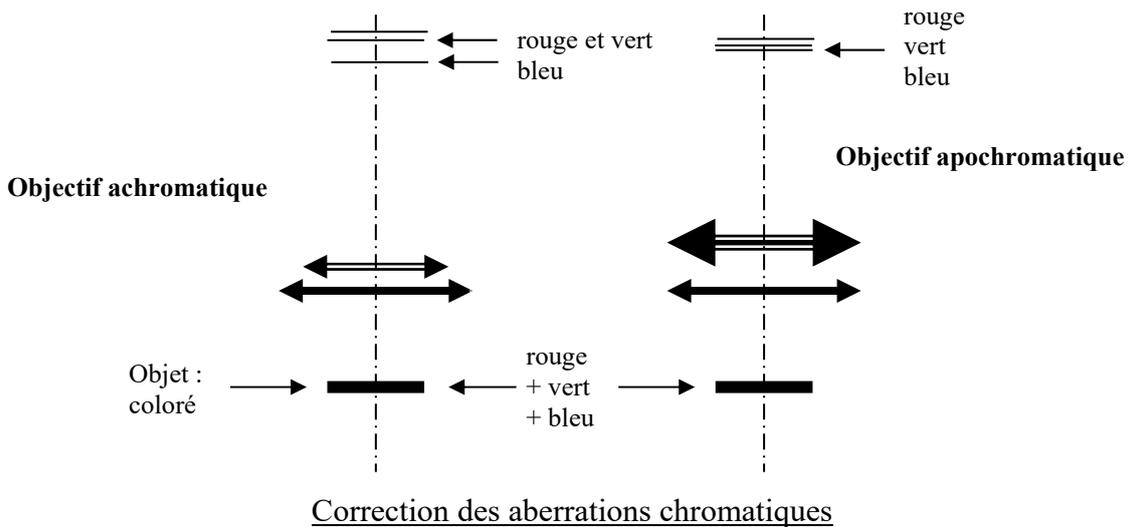
Exemple de valeurs pour les objectifs olympus D achromatiques série LB

Trois grandes catégories d'objectifs sont actuellement disponibles en fonction de leur niveau de correction des aberrations chromatiques et géométriques.

- Les **objectifs achromatiques** sont ceux que l'on utilise le plus communément en mycologie. Ils sont corrigés achromatiquement pour deux longueurs d'onde, le bleu et le rouge et l'aberration de sphéricité est corrigée pour une longueur d'onde, généralement le jaune-vert.

- Les **objectifs semi-apochromatiques** ou objectifs à la fluorine sont corrigés pour deux (ou trois) longueurs d'onde pour les aberrations de chromatisme et pour les aberrations de sphéricité. Cette correction plus poussée est possible grâce à l'emploi de fluorine naturelle ou depuis peu de fluorine de synthèse ; elle permet également d'atteindre des ouvertures numériques plus importantes.

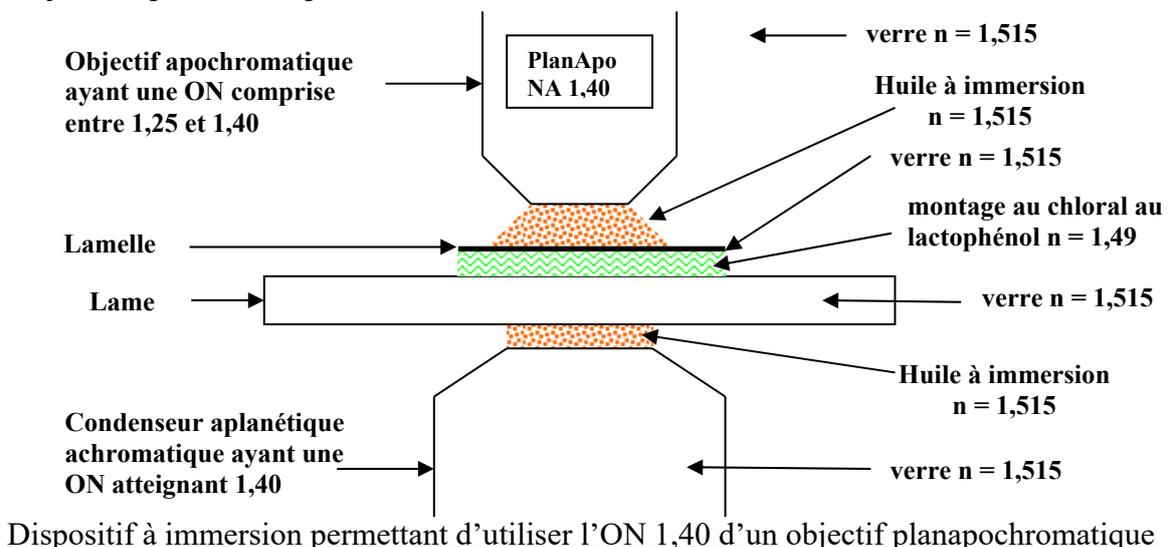
- Les **objectifs apochromatiques** utilisent de la fluorine, des verres spéciaux, un plus grand nombre de lentilles et des traitements multicouches des surfaces ; ils sont corrigés pour 3 ou quatre longueurs d'onde et leur aberration de sphéricité est corrigée pour le bleu et le rouge. Ce sont les objectifs qui ont les meilleures ouvertures numériques et qui permettent de distinguer les plus petits détails lors de l'examen des préparations (seul inconvénient : leur prix qui les met hors de portée des amateurs).



Avec les trois catégories d'objectifs précédemment citées, la courbure de champ n'est pas éliminée. Lorsqu'on fait la mise au point au centre, les bords de l'image sont flous et lorsqu'on fait la mise au point sur une zone périphérique, le centre n'est plus net. Pour éviter ce phénomène, il est possible de rendre ces **objectifs plans**. Ils donnent des images planes et nettes du centre à la périphérie. Ils existent pour chacune des catégories d'objectifs précédents, les plus performants étant les objectifs planapochromatiques. Etant donné leur prix exorbitant on les trouve surtout dans les catalogues et la grande majorité des mycologues utilise des objectifs achromatiques ou planachromatiques s'ils désirent des photomicrographies de meilleure qualité.

- L'immersion

Les objectifs qui travaillent dans l'air (objectifs à sec) ont une ON limitée à 0,95. Pour augmenter cette valeur et avoir un meilleur pouvoir séparateur on met de l'huile entre la lentille frontale de l'objectif et la lamelle. Cette huile a un indice de réfraction proche de celui du verre ($n = 1,515$), ce qui évite plusieurs déviations des rayons lumineux. Les objectifs fonctionnant de cette façon sont appelés les objectifs à immersion et sur leur monture on trouve l'un des termes suivants : 'Oil', 'oel' ou 'HI' (homogeneous immersion). Ces objectifs permettent de déceler les plus fins détails d'une préparation avec une ON atteignant 1,40 pour les objectifs apochromatiques.



Remarque 1 : Pour utiliser pleinement l'ouverture numérique de 1,25 - 1,40 des objectifs apochromatiques, une goutte d'huile doit également être déposée entre la lentille supérieure du condenseur et la lame (sinon on n'atteint même pas l'ouverture 1). Ce dépôt d'huile entre le condenseur et la lame est toutefois inutile dans le cas d'un objectif achromatique qui nécessite toujours une légère fermeture de son diaphragme d'ouverture.

Sur certains objectifs à immersion on trouve le sigle W ou le sigle Gly. Ces objectifs ont été calculés pour une immersion dans l'eau ou dans la glycérine (ne pas les utiliser avec de l'huile à immersion classique).

Remarque 2 :

- Autrefois on utilisait la résine de cèdre ou huile de cèdre ($n = 1,52$) mais lorsque celle-ci n'était pas essuyée correctement en fin de séance, elle durcissait et, lors du nettoyage, il y avait risque de détérioration de l'objectif à immersion qui est très onéreux.

- Actuellement on utilise des **huiles de synthèse** non résinifiables, à indice de réfraction $n = 1,518$. Ces huiles ne durcissent pas et il n'est pas nécessaire de nettoyer avec minutie l'objectif après chaque utilisation du microscope ; il suffit d'essuyer l'objectif avec le doigt. Ces huiles de synthèse sont disponibles en différentes viscosités ; pour les utilisations de platines microscopiques en position verticale elles sont très visqueuses, pour les utilisations en ambiance froide, elles sont très fluides. En mycologie on utilise uniquement l'huile de viscosité normale.

2. Les oculaires

L'oculaire grossit l'image intermédiaire formée par l'objectif, corrige certaines aberrations résiduelles et donne l'image définitive plus plane et plus nette. Il est caractérisé par son grossissement et son indice de champ qui correspond au diamètre de la zone circulaire observable sur la préparation (de 14 à 30 mm pour les oculaires à grand champ).

Suivant l'équipement optique du microscope et les performances recherchées, les fabricants proposent plusieurs types d'oculaires.

- **L'oculaire de Huygens**, le plus simple et le moins onéreux, comprend deux lentilles convergentes entre lesquelles il y a un diaphragme de champ situé au niveau du foyer de la lentille supérieure ou lentille d'œil ; la lentille inférieure ou lentille de champ aplanit l'image et la rend plus claire.

Le diaphragme de champ élimine les parties périphériques (où les aberrations sont trop importantes) et limite la zone circulaire qui permet de définir son indice de champ.

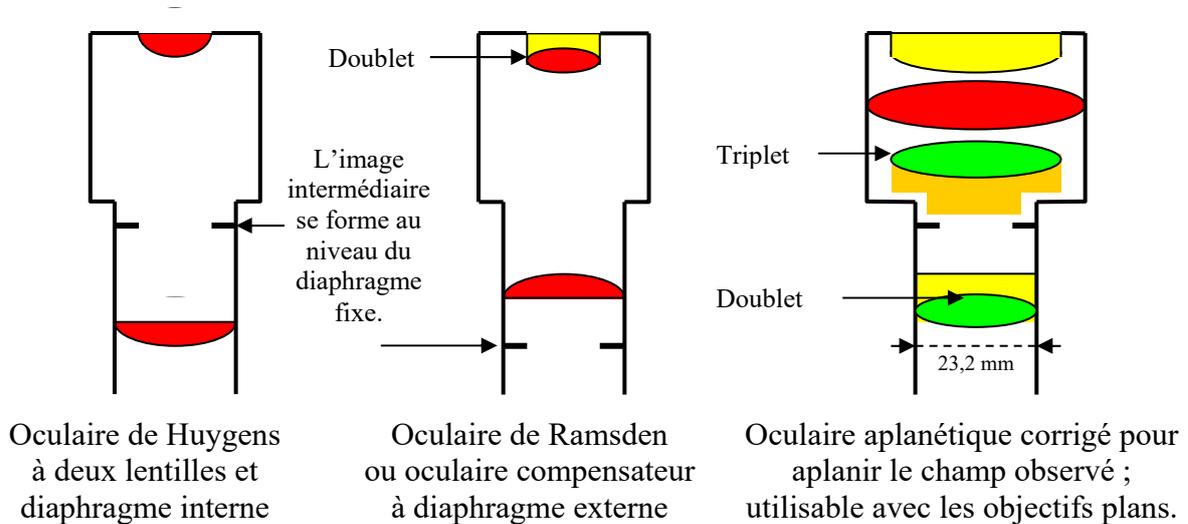
C'est au niveau du diaphragme de champ que l'on place les dispositifs de mesure (**micromètre**), de repérage et de pointage.

Ces oculaires simples équipent les microscope d'initiation avec des objectifs achromatiques dont les aberrations ne sont pas correctement corrigées. Leur indice de champ ne dépasse pas 14 à 16. Ils sont notés 'H' sur la monture.

- **Les oculaires compensateurs** dont le verre d'œil est constitué de plusieurs lentilles corrigent les défauts résiduels des objectifs. Ils corrigent en particulier la courbure de champ et les différences de grossissements pour les diverses longueurs d'onde. Ils donnent de meilleures images et sont indispensables pour exploiter correctement les objectifs achromatiques haut de gamme ainsi que les objectifs apo et semi-apochromatiques. Sur leur monture on trouve le sigle 'C', 'K' ou 'Comp' (voir remarque 4).

- **Les oculaires aplanétiques** notés 'Kpl', 'P', 'Pl' ou 'CP' sont des oculaires qui forment l'image finale dans un plan ; ils sont à utiliser avec des objectifs plans.

- **Les oculaires grand champ** sont des oculaires compensés plans qui possèdent un plus grand nombre de lentilles permettant d'accroître l'indice de champ jusque pratiquement 20. Leur marquage se fait avec les sigles 'GC' ou 'GF' gravés à côté de l'indice de champ.



Remarque 1 : Tous les oculaires précédents sont adaptables sur un tube normalisé de 23,2 mm de diamètre. Actuellement les constructeurs ne respectent plus ces normes trop contraignantes et augmentent le diamètre du tube optique, ce qui a permis la mise au point récente d'oculaires dépourvus d'aberrations chromatiques donnant une image corrigée de 32 mm. Ces **oculaires grand champ exempts d'ACL** (aberration chromatique latérale) équipent les microscopes haut de gamme muni d'une lentille de tube (optiques corrigées pour l'infini).

Remarque 2 : Certains oculaires ont été calculés pour que l'image finale se forme très en arrière du verre d'œil. Ces **oculaires grand champ sont destinés aux porteurs de lunettes** qui ne sont plus obligés d'enlever leurs lunettes pendant l'observation. Ces oculaires portent un symbole schématisant une paire de lunettes.

Remarque 3 : Les oculaires précédents ont le diaphragme de champ en arrière de la lentille de champ, ils sont qualifiés d'oculaires négatifs et sont destinés à l'observation. Pour la photomicrographie, on utilise des oculaires positifs, le diaphragme de champ est situé avant la lentille de champ. Ils fonctionnent comme des objectifs photographiques et donnent des images observables sur un dépoli. Les oculaires photographiques donnent des images parfaitement planes et sont disponibles en grossissements 2,5x, 3,3x, 5x et 6,7x.

Remarque 4 : De nombreux objectifs récents donnent des images intermédiaires entièrement corrigées, ils ne doivent pas être utilisés avec des oculaires compensateurs [exemple les objectifs de la série CF ("Chrome Free") de chez Nikon à utiliser avec des oculaires CF sous peine de dégradation de l'image finale].

3. Les condenseurs

Situé entre la préparation et le dispositif d'éclairage, le condenseur est un système optique qui contrôle le cône lumineux envoyé sur la préparation ; la qualité de l'image dépend de son réglage méticuleux.



Séance de microscopie lors de la session lichénologique de Fontainebleau de février 2002 - (1) A. Belle mère et JP. Montavont (2) B. Marron (3) Initiation avec P. Collin (4) F. Guilloux et A. Pioli (5) B. Martin (6) G. Agnello (7) JC. Boissière et JM. Sussey (8) JC. Boissière organisateur de la session. (Photos JP Gavériaux).

La lumière issue du condenseur converge vers la préparation ; lors de son passage à travers la préparation la lumière devient divergente et forme un cône inversé (par rapport au cône convergent envoyé par le condenseur) qui est capté par la lentille frontale de l'objectif. La valeur angulaire de ce cône est contrôlée par le **diaphragme d'ouverture** situé à la base du condenseur.

Le condenseur possède (comme les objectifs) une ouverture numérique. Plus cette ON est grande, plus le condenseur est capable de fournir une valeur angulaire élevée au cône lumineux. Lorsqu'on choisit un condenseur il faut donc prendre en considération son ON.

L'Ouverture Numérique du condenseur doit être légèrement supérieure ou au moins égale à l'ON de l'objectif ayant la plus grande des ouvertures numériques.

Le diaphragme d'ouverture permet d'adapter l'ON du condenseur à l'ON de l'objectif. Rappel : En général on n'utilise jamais le diaphragme d'ouverture à la valeur de l'ouverture numérique de l'objectif, on le ferme toujours un peu pour avoir une plus grande profondeur de champ et un peu plus de contraste (on le ferme bien souvent aux trois quarts ou aux deux tiers de l'ouverture numérique de l'objectif).

Si on utilise une gamme étendue d'objectifs il est parfois nécessaire de posséder plusieurs condenseurs différents. Le plus souvent, le microscope ne possède qu'un seul condenseur, choisi en fonction de l'objectif le plus puissant, et, sur certains modèles, ce condenseur possède une lentille (ou un bloc de lentilles) escamotable.

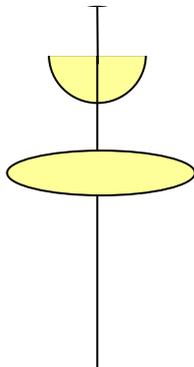
- Si la lentille escamotable est à la partie supérieure du condenseur, elle doit être retirée pour utilisation des objectifs 4x et 2x (la lumière est ainsi moins concentrée sur le préparation, l'ON diminue).
- Si la lentille escamotable est à la partie inférieure du condenseur, elle doit être (en général, sauf spécification du constructeur) retirée pour utilisation des objectifs 10x à 100x (la lumière est ainsi plus concentrée sur le préparation, son ON est plus grande).

Type de condenseur et domaines d'utilisation	Condenseur d'Abbe	Condenseur à lentille escamotable	Condenseur achromatique aplanétique	Condenseur ultra-faible
	ON = 1,25	ON = 0,9 – 0,16	ON = 1,40	ON = 0,16
	2 lentilles en 2 groupes	4 lentilles en 3 groupes	7 lentilles en 4 groupes	3 lentilles en 3 groupes
1x				
2x		Lentille escamotée		
4x	domaine d'utilisation			
10x				
20x				
40x				
50x				
60x				
100x		Compatible		
				Impossible

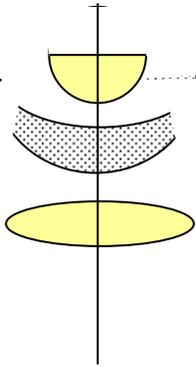
Exemples de condenseurs pour microscope fond clair olympus BH et domaines d'utilisation

Principaux types de condenseurs

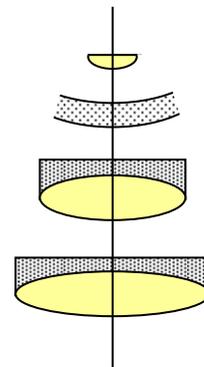
- Le **condenseur d'Abbe** comprend deux à trois lentilles non corrigées des aberrations chromatiques et sphériques. La lentille supérieure qui est pratiquement en contact avec la préparation présente une face supérieure plane. L'ouverture numérique est d'environ 1,2 (deux lentilles) ou 1,4 (trois lentilles). C'est le condenseur généralement livré avec le microscope. Il travaille à sec (ce qui signifie qu'il n'est pas nécessaire de mettre une goutte d'huile à immersion entre la lentille supérieure du condenseur et la lame lors de l'utilisation d'objectifs ayant une ON supérieure à 1 (objectifs à immersion)).
- Le **condenseur achromatique** possède un nombre plus important de lentilles et est corrigé pour les défauts de chromatisme. L'ouverture numérique atteint 1,3.
- Le **condenseur achromatique aplanétique** est le condenseur le plus complexe à construire, il assure une correction maximale de toutes les aberrations. Son ouverture numérique atteint 1,4. Il est recommandé pour les objectifs planachromatiques ; il permet de concentrer la lumière sur une surface très petite et conserve une grande ouverture.



Condenseur d'Abbe non corrigé à deux lentilles



Condenseur d'Abbe aplanétique



Condenseur d'Abbe achromatique aplanétique

Remarque : Pour utiliser pleinement l'ouverture numérique de 1,25 - 1,40 de ces condenseurs performants, il est nécessaire de les faire travailler en immersion et une goutte d'huile doit être déposée sur la lentille supérieure du condenseur avant de poser la préparation (qui reçoit ensuite à son tour une goutte d'huile sur la lamelle).

à suivre ...

Sommaire de la deuxième partie :

- le petit matériel indispensable à la microscopie ;
- quelques manipulations simples pour débiter en microscopie ;
- régler un éclairage de Köhler ;
- Utiliser la lumière polarisée
- étalonner et utiliser un micromètre ;
- quelques sites web consacrés à la microscopie...

La troisième partie, la plus importante, sera consacrée aux caractères microscopiques des lichens. La quatrième partie sera axée sur l'utilisation des techniques nouvelles de la photo numérique en macrophotographie sur loupe binoculaire et en photomicrographie.

Bibliographie

- AYEL Antoine et André MOINARD - 1992 - Le microscope, constitution, fonctionnement, emploi en mycologie, 200 p., bull. spécial n°3a de la Société Mycologique du Poitou.
- BETTON Gérard - 1969 - Photomicrographie, 174 p., publications Photo-Revue.
- BETTON Gérard - 1985 - La photomicrographie, 127 p., collection Que sais-je.
- BRADBURY S. et B. BRACEGIRDLE - 1988 - Introduction to light microscopy, 124 pages, Microscopy handbook series 42, Royal Microscopical Society.
- DELLY John Gustav - 1988 – Photography through the microscope, 104 p., Eastman Kodak Company.
- ERB Bruno et MATHEIS Walter - 1983 - Pilzmikroskopie : Präparation und Untersuchung von Pilzen, 168 pages, Frankh'sche Verlagshandlung, Stuttgart.
- FRAÇON Maurice François - 1988- La microscopie, 120 p., collection Que sais-je.
- IZARRA de Zacharie - 1994 - Introduction à l'étude microscopique des champignons, 80 p., bull. spécial n°5 de la Société Mycologique du Poitou.
- LANGERON Maurice - 1952 - Précis de Microscopie (2^{ème} édition revue et augmentée par R. VANBREUSEGHEM), 703 p., éditions Masson.
- LOCQUIN Marcel et LANGERON Maurice - 1978 - Manuel de microscopie, 352 pages, éditions Masson.
- NIKON – Notice d'utilisation du microscope trinoculaire Labophot-2A, 32 pages.
- NURIDSANY Claude - 1978 - Voir l'invisible, 117 p., éditions Hachette.
- PERE Jean-Pierre - 1994 - La microscopie, technique d'étude en biologie, 128 p., éditions Fernand Nathan.
- OLDFIELD Ron - 1994 - Light microscopy, an illustrated guide, 160 pages, Mosby-Year Book Europe.
- OLYMPUS – Notice d'utilisation du microscope trinoculaire BH2, 20 pages.
- WASTIAUX Gérard - 1994 - La microscopie optique moderne, 270 p., éditions Lavoisier.