

Le microscope et son utilisation en lichénologie (4)

par **Jean-Pierre GAVÉRIAUX**

14, les Hirsons ; F - 62800 LIEVIN

E-mail : Jean-Pierre.Gaveriaux@wanadoo.fr

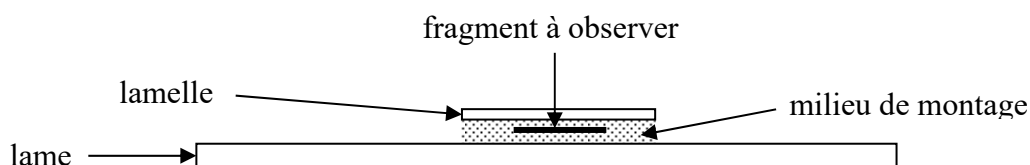
Ces quelques propos sont principalement destinés aux membres de l'association qui désirent progresser en microscopie mais qui, durant leur vie professionnelle, n'ont pas eu la possibilité de connaître et d'utiliser le matériel courant des laboratoires de biologie. Cet article est la suite des trois publications suivantes :

1. Principaux produits chimiques utilisés en histologie lichénologique (pages 49 à 56 du bulletin 2003(1).
2. Description et fonctionnement du microscope optique à fond clair (pages 61 à 80 du bulletin 2003(2).
3. Régler son microscope ; étalonner le micromètre et quelques conseils pour le nettoyage des parties optiques (pages 39 à 48 du bulletin 2004(1).

4^{ème} partie : Initiation à l'utilisation du microscope optique à fond clair

I. Le petit matériel utile pour la confection des préparations microscopiques

Le fragment de lichen à étudier au microscope est toujours placé entre deux lames de verre. Celle du dessous, la plus grande, porte le fragment à étudier dans un liquide de montage ; on l'appelle porte-objet ou plus simplement **lame**. Celle du dessus, en verre très mince, couvre le fragment à étudier, c'est le couvre-objet ou **lamelle**.



La préparation microscopique : le fragment à étudier est monté dans un liquide entre lame et lamelle

Les **lames** couramment utilisées mesurent 26x72mm et ont une épaisseur d'environ 1mm. Plusieurs qualités sont disponibles :

- Les lames standards à bords bruts (ou coupés), sans usinage des bords, sont les moins chères ; il est toutefois conseillé de prendre des lames à bords rodés afin d'éviter toute coupure éventuelle lors de la manipulation ou du nettoyage.
- Pour les préparations destinées aux photographies il est recommandé d'utiliser des lames de qualité supérieure, parfaitement planes, dépourvues de défauts optiques et à transparence améliorée (lame de type superfrost). Ces lames possèdent une plage dépolie et colorée sur laquelle il est possible d'écrire (pas besoin d'étiquettes papiers).

- Il peut également être intéressant de posséder quelques lames à concavités, les 2 ou 3 mini cuvettes qu'elles possèdent facilitant la coloration des échantillons qui doivent subir divers traitements avant le montage définitif.
- Les **lames en plastique** disponibles par lot de 10 sont surtout utilisées comme support pour faire des coupes ce qui évite l'usure prématurée des lames de rasoir.

Les **lamelles**, de forme carrée, sont disponibles en plusieurs dimensions. Les plus courantes sont les 18/18 et les 20/20mm ; elles doivent retenir le liquide de montage et être positionnées parallèlement à la lame. Leur épaisseur est en principe de 0,17mm ; les variations d'épaisseur sont toutefois fréquentes ; ce phénomène n'est pas gênant avec les objectifs à faible grandissement (jusque 20x - 25x) mais entraîne une dégradation de l'image surtout visible avec les objectifs apochromatiques de grandissement supérieur à 25 et qui n'utilisent pas l'immersion. Les plans apochromatiques de 40x sont souvent munis d'une bague qui permet l'ajustement à l'épaisseur de la lamelle (de 0,12 à 0,25mm).

L'utilisation de lamelles de petites tailles 14/14 ou 16/16mm peut parfois être intéressant pour placer plusieurs préparations sur la même lame.

Des lamelles rondes sont souvent utilisées lors dans la confection de préparations permanentes ; lors de leur montage, nous avons constaté une diminution significative des petites bulles résiduelles. Ces lamelles rondes, de 10 à 30 mm de diamètre, sont uniquement conditionnées par 1000.

Les **verres de montre** sont des petites cuvettes en verre de 3 à 5 cm de diamètre. Ils sont très utiles pour les traitements préalables des échantillons à observer, passage à la potasse, rinçage, coloration, traitements chimiques divers... Cinq ou six suffisent pour une utilisation normale.

Les **lames de rasoir** servent à faire les coupes ou les scalps dans les thalles, les apothécies, les périthèces... Les lames du commerce conviennent parfaitement mais elles s'usent très rapidement lorsque le thalle à couper est coincé entre deux lames de verre. Après avoir traversé le thalle, la lame frotte sur le verre et son tranchant devient défectueux. Petite astuce : il suffit de placer sous le thalle une lame en plastique, tendre, qui permet à la lame de rasoir de fonctionner beaucoup plus longtemps en gardant son tranchant.

L'**aiguille lancéolée** est une pointe en forme de fer de lance emmanchée sur une tige de 8 à 10 cm de longueur. Elle possède deux tranchants, permet de prélever, de couper, de transporter ou de dissocier les structures à observer. Elle ne permet toutefois qu'un travail assez grossier et ne peut être utilisée qu'avec les échantillons d'une certaine taille. De nombreux lichénologues préfèrent utiliser la lame de rasoir et l'aiguille emmanchée sous la loupe binoculaire.

Les **aiguilles emmanchées** sont des tiges dans lesquelles il est possible de bloquer des aiguilles de différentes tailles et de différents diamètres. Les aiguilles très fines sont conseillées pour arriver à un travail de précision dans le transport et la dilacération.

Dans le commerce, les aiguilles emmanchées disponibles sont beaucoup trop grosses.

On peut utiliser de fines aiguilles à coudre ou des minuties (destinées aux collectionneurs de papillons) que l'on colle ou que l'on enfonce à force dans un petit bâton de bois (des jeunes rameaux d'érable ou de frêne conviennent parfaitement).

Une **pince de précision** à pointes fines (de type pince d'horloger ou pince Dumont) est indispensable pour la préhension et le transport des menus fragments et des coupes. La précision des pointes doit être protégée par un embout entre les manipulations.

Une **gomme molle** à effacer qui permet de taper sur la lamelle pour dissocier les structures à observer afin d'obtenir une préparation très mince, avec des éléments bien séparés les uns des autres. Il est possible de traverser la gomme avec un crayon et de transformer l'ensemble en "marteau à dissocier".

Un petit **briquet** pour chauffer la lame qui demande une action du colorant à chaud (exemple le bleu lactique).

Un **chiffon** et du **papier absorbant** (mouchoirs en papier) : la propreté est indispensable microscopie ; lors des manipulations, nos lichens laissent souvent tomber la terre retenue dans les rhizines ou sur le thalle et il est souvent nécessaire de nettoyer la surface de travail, les objets qui servent à la confection des coupes, il faut éliminer l'excès de colorant, nettoyer une lame, une aiguille....

Quelques **coton-tiges** et du **nettoyant optique** : La manipulation des lames et lamelles, en particulier l'écrasement de la lamelle sur la lame afin d'aplanir la préparation, nous oblige souvent à nettoyer les surfaces en verre. Il suffit d'utiliser un coton tige préalablement trempé dans un nettoyant optique à base d'alcool. Cette précaution est indispensable lorsque la préparation est destinée à la photomicrographie.

Le **microtome à main** est un outil permettant la réalisation de coupes très minces. Cet outil comprend un cylindre creux dans lequel on place le fragment à couper, comprimé entre deux morceaux de moelle de sureau (ou de polystyrène de récupération). Un piston entraîné par une vis micrométrique fait progresser l'ensemble vers l'extrémité du tube au niveau d'un plan perpendiculaire à l'axe du tube. Avec une lame de rasoir, tenue à la main, on coupe la partie qui dépasse afin d'avoir une zone bien plane (coupe de propreté). On tourne la vis micrométrique pour faire progresser le fragment de quelques μm puis on coupe à nouveau afin d'obtenir une tranche très mince. Avec un peu d'entraînement il est possible d'obtenir des coupes ayant moins de 15 μm d'épaisseur. Des techniques plus précises existent mais elles sont plus complexes et nécessitent, après fixation, d'inclure la fragment à étudier dans de la paraffine, du PVA (Alcool Polyvinylique) ou du PEG (Polyéthylène Glycol). Ces techniques seront décrites dans un prochain article.

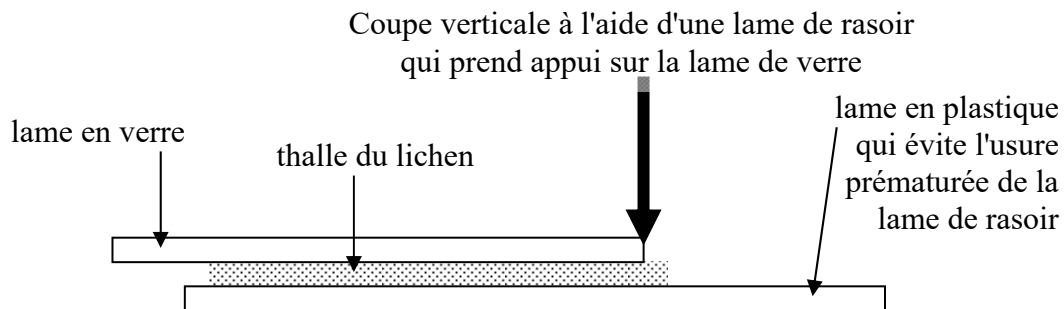
II. Quelques observations simples pour débiter avec un microscope d'initiation

(Cette partie est destinée aux personnes n'ayant jamais utilisé un microscope. On supposera que ce microscope possède un oculaire x10, trois objectifs x10, x40 et x100, un condenseur muni d'un diaphragme d'ouverture).

⇒ 1^{ère} observation : coupe d'un thalle de lichen foliacé (*Parmelia sulcata* par exemple) et recherche des 2 partenaires de la symbiose

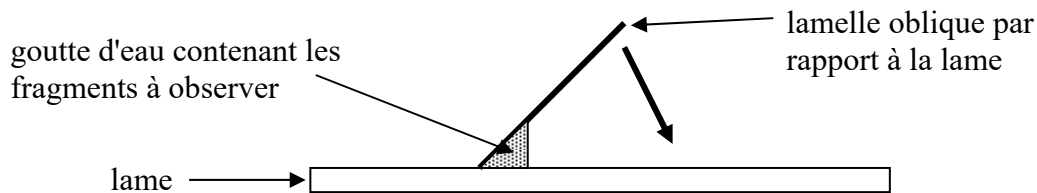
1^{ère} étape : faire la préparation microscopique

- Placer le thalle quelques secondes à 1 minute dans un verre de montre contenant de l'eau afin qu'il devienne bien souple.
- Placer le thalle humide sur une lame en plastique (à défaut prendre une lame en verre).
- Le recouvrir partiellement par une lame de verre.
- Faire une coupe de propreté en prenant appui sur le bord de la lame de verre, couper le thalle sur toute la longueur en ne laissant qu'une très petite partie du thalle émerger entre les deux lames.
- Sous la loupe binoculaire faire une coupe transversale du thalle, la plus fine possible, en prenant à nouveau appui sur la lame de verre.
- Répéter l'opération plusieurs fois et choisir, sous la loupe biboculaire, la coupe qui semble convenir le mieux. Les parties terminales de la coupe sont souvent très fines, elles permettent des observations plus précises. Ne jamais oublier que l'on observe par transparence et que la section de thalle doit laisser passer la lumière.



Dispositif simple pour réaliser une section très mince de thalle

- Placer une goutte d'eau sur une lame et y introduire la coupe du thalle, il est parfois nécessaire de s'aider des aiguilles emmanchées pour faire pénétrer les fragments dans la goutte d'eau.
- Approcher la lamelle en la plaçant obliquement par rapport à la lame (voir schéma) puis ramener progressivement la partie la plus élevée de la lamelle vers la goutte d'eau de façon à éviter d'emprisonner des petites bulles d'air.



Appuyer légèrement avec une pince un peu ouverte sur la lamelle afin que la lame et la lamelle soient pratiquement au contact l'une de l'autre.

2^{ème} étape : l'observation au microscope

- Brancher le microscope et allumer la lampe.
- Ouvrir le diaphragme situé dans le condenseur (il n'y a qu'un seul diaphragme, le diaphragme d'ouverture)
- Choisir le faible grossissement : oculaire x10 et objectif x10 = G x100.
- Centrer la préparation sur la platine.
- Faire la mise au point (MAP) au faible grossissement afin d'observer une image :

Amener la lentille frontale de l'objectif le plus près possible de la lamelle, sans la toucher (en regardant sur le côté du microscope, pas dans les oculaires) ; regarder dans l'oculaire et éloigner tout doucement l'objectif de la lamelle en faisant tourner la molette de déplacement rapide ; au bout de quelques instants l'image nette apparaît ; corriger éventuellement la position de la préparation afin de placer au centre du champ optique une partie significative de l'image. Régler éventuellement le diaphragme pour améliorer la qualité de l'observation. A ce grossissement l'utilisation de la MAP micrométrique est inutile.

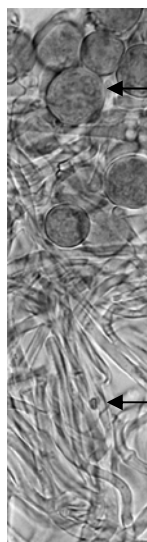
Repérer la couche verte formée par les algues et les hyphes du champignon (les longs filaments transparents) ; localiser le cortex supérieur, la médulle, le cortex inférieur et les rhizines. Jouer sur le diaphragme d'ouverture pour améliorer le contraste de l'image.

- Centrer la préparation sur une zone où les algues sont bien séparées les unes des autres (vers la partie terminale de la coupe) et passer au moyen grossissement puis à l'immersion.

- Faire la MAP au moyen grossissement : oculaire x10 et objectif x40 = G x400.

La MAP étant préalablement réalisée au faible grossissement, remplacer l'objectif x10 par l'objectif x40 ; les objectifs sont réglés pour ne pas avoir à retoucher de façon importante la MAP lors d'un changement d'objectif ; ouvrir le diaphragme. En principe l'image est nette ou ne nécessite que de petites modifications de MAP en faisant tourner la molette de déplacement lent (vis micrométrique). Régler le diaphragme pour améliorer la qualité de l'observation.

* la fermeture du diaphragme augmente la zone de netteté mais diminue la définition de l'image et la luminosité ; pour explorer les différents niveaux de l'objet à observer, il est conseillé de ne pas trop diaphragmer mais de modifier la MAP pour passer par les divers niveaux intéressants de la préparation.



Algues unicellulaires = le partenaire chlorophyllien = le photosymbiote, capable d'utiliser l'énergie solaire pour produire de la matière organique. Les hyphes pourront obtenir les produits de la photosynthèse par le mécanisme d'absorption.

Les hyphes fongiques (mycosymbiote) ne forment pas un mycélium diffus mais un ensemble groupé, le thalle lichénique, dans lequel les algues sont prisonnières. Les algues représentent environ 10 % de la masse totale du thalle.

Coupe partielle du thalle (voir photo 1 de la planche couleur)

- Faire la MAP au fort grossissement : oculaire x10 et objectif x100 à immersion = G x1000. Sans modifier la MAP, dégager l'objectif x40 de la préparation. Ouvrir le diaphragme. Mettre une petite goutte d'huile à immersion sur la lamelle. Amener l'objectif à immersion sur la lamelle (un crantage permet de se rendre compte que la position d'alignement est correcte). Observer les algues et les hyphes.

Il est souvent nécessaire de retoucher la MAP avec la molette de déplacement micrométrique et de fermer légèrement le diaphragme pour améliorer la qualité de l'image. Avec un peu de pratique ces gestes deviennent rapides et précis.

Faire attention à ne pas mettre les objectifs à sec dans l'huile. Quand la préparation est observée à l'immersion, il n'est plus possible de passer aux grossissements plus faibles. L'objectif x100 possède généralement une monture télescopique qui évite d'abîmer la lentille frontale lorsqu'elle entre en contact avec la lamelle lors d'une erreur de manipulation.

Après l'observation, dégager l'objectif à immersion et le nettoyer (il suffit d'enlever l'huile en essuyant avec un mouchoir en papier).

- Recommencer la préparation en utilisant un colorant, le Rouge Congo SDS par exemple, constater que les parois des hyphes sont cette fois colorées en rouge.

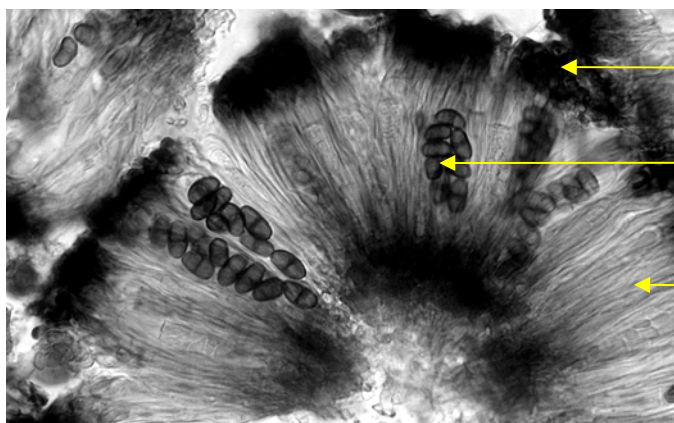
⇒ 2^{ème} observation : l'appareil reproducteur d'un champignon lichénisé : apothécie, hyménium, asques et spores d'*Amandinea punctata* (= *Buellia punctata*)

a) Préparer tout le matériel indispensable sur une surface de travail plane, stable et préalablement nettoyée.

b) Réaliser la préparation microscopique

- Ce lichen crustacé, courant à la base des arbres, présente des apothécies convexes, noires, d'environ 0,5 mm de diamètre. Il est conseillé d'humidifier préalablement le thalle et la lame afin que les fragments restent collés au matériel de prélèvement (Il est difficile de les retrouver lorsqu'ils sont expulsés loin de la loupe binoculaire).

Si possible sous la loupe binoculaire (x10), effectuer une série de coupes à l'aide d'une lame de rasoir dans une apothécie. Avec une pince de précision placer ces coupes sur une lame dans une goutte d'eau, sous la loupe binoculaire éliminer les coupes qui vous semblent mauvaises.



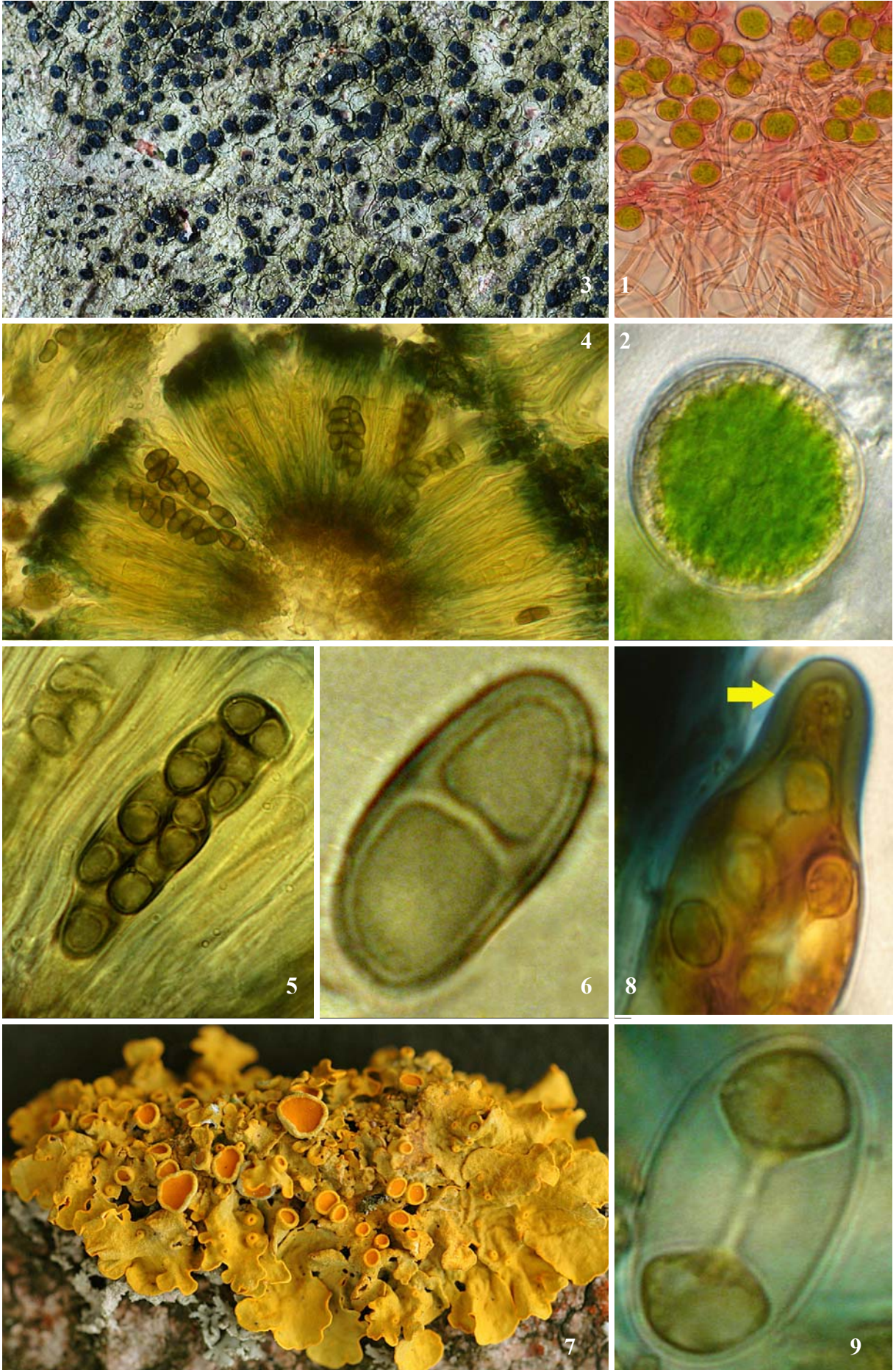
épilhyménium

groupe de 8 spores
(asque octosporé)

disposition radiale des
paraphyses

Coupe transversale dans l'apothécie
hémisphérique d'*Amandinea punctata*
(voir photo 4)

Légendes des photos de la page située à droite : 1. Fragment de thalle montrant les hyphes du champignon et les algues (montage dans le rouge congo x400) ; 2. Algue (15 µm) du genre *Trebouxia*, le plus courant chez les champignons lichénisés (montage dans le lactophénol x1000) ; 3. Vue partielle d'un thalle crustacé (C-) d'*Amandinea punctata* avec ses nombreuses apothécies en forme de petite boules noires d'environ 0,3-0,6 mm de diamètre ; 4. Coupe transversale dans l'apothécie en forme de demi-sphère (melzer x100) ; 5. Asque octosporé (melzer x1000) ; 6. Spore uniseptée (14 µm) – melzer x1000 ; 7. Thalle (K+ rouge) de *Xanthoria parietina* ; 8. Tholus de *Xanthoria parietina* (un capuchon dextrinoïde doublé extérieurement d'une fine couche amyloïde bleuâtre- Lugol x1000) ; 9. Spore polariloculaire de *Xanthoria parietina* (melzer x1000) - Photo Jean-Pierre Gavériaux.

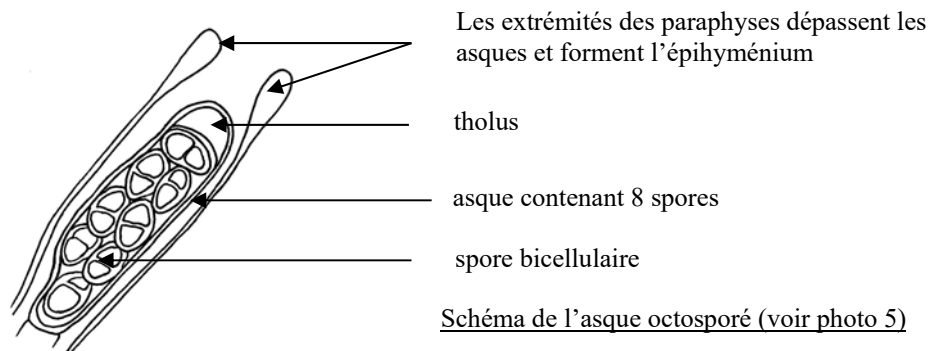


Macrophotographies et photomicrographies de lichens - Coolpix 4500 - Voir légendes sur la page 52

c) Observer au microscope

- Mettre la lamelle (voir explications dans la partie précédente)
- Appuyer légèrement sur la lamelle afin d'avoir une préparation mince, sans excès toutefois afin de ne pas trop dissocier les structures.
- Observer au x10 et repérer dans la demi-sphère les asques (qui contiennent les spores colorées), l'hyménium, l'épilhyménium (parties supérieures renflées des paraphyses qui font saillie au-dessus des asques).
- Placer au centre du champ optique un asque et passer au x40.
- Choisir un asque dans lequel les spores sont bien visibles et passer à l'immersion pour voir le détail de la spore (voir photos 5 et 6).
- A l'aide du micromètre évaluer la longueur et la largeur.

Il est parfois nécessaire de prendre la préparation et de serrer très fort lame et lamelle entre le pouce et l'index (protéger la lame et la lamelle avec un morceau de mouchoir en papier pour éviter de mettre des empreintes sur le verre).

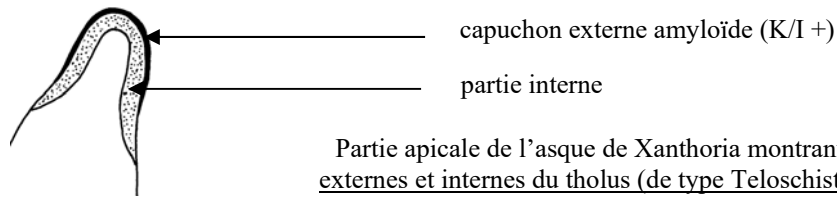


⇒ 3^{ème} observation : observation d'un tholus et d'une spore polariloculaire (chez *Xanthoria parietina* par exemple)

- Dans un verre de montre placer quelques apothécies recouvertes d'une solution de KOH à 5% afin de permettre une dissociation chimique des tissus. Laisser quelques minutes.
- Rincer à l'eau au moins deux fois.
- Sous la loupe binoculaire, faire une série de sections transversales dans l'apothécie de façon à réaliser de nombreuses coupes très fines.
- Récupérer les coupes ; faire le tri sous la loupe bino pour choisir les coupes qui paraissent les plus fines.
- Monter quelques coupes entre lames et lamelles dans une goutte de lugol. Dissocier légèrement par percussion.
- Au microscope rechercher l'hyménium, les asques, les paraphyses.
- Reprendre la préparation et dissocier fortement par compression.
- Rechercher à l'immersion les asques et les spores.
- Observer au sommet de l'asque une sorte de capuchon

L'asque des champignons lichénisés est bitunique et chez de nombreuses espèces le sommet de la paroi interne (endoascus) présente, avant la déhiscence, une structure spécifique, le **tholus**, dont la forme et les réactions aux réactifs iodés (lugol) I+ (amyloïdie ou dextrinoïdie) ou I- donnent des renseignements précieux pour l'identification des genres.

Chez *Xanthoria*, le tholus est un peu allongé, avec une partie interne dextrinoïde (coloration brun rougeâtre) et une fine partie périphérique amyloïde (le fin liseré bleu visible sur la photo).



Partie apicale de l'asque de *Xanthoria* montrant les parties externes et internes du tholus (de type *Teloschistes*) - photo 8

La spore est polariloculaire, elle présente deux cellules séparées par un septum lui même traversé par un fin canal qui relie les deux cellules (voir photo 9).

III. Utiliser la lumière polarisée (en réalité lumière polarisée-analysée)

Quelques espèces lichéniques (exemple : certains *Lecanora*) possèdent des cristaux dans la marge de l'apothécie, le sous-hyménium et parfois aussi au niveau de l'épilhyménium entre les extrémités des paraphyses. Difficile à distinguer en lumière normale, ils deviennent facilement visibles lorsqu'ils sont observés, après montage dans l'eau, à l'aide de filtres polarisants croisés.

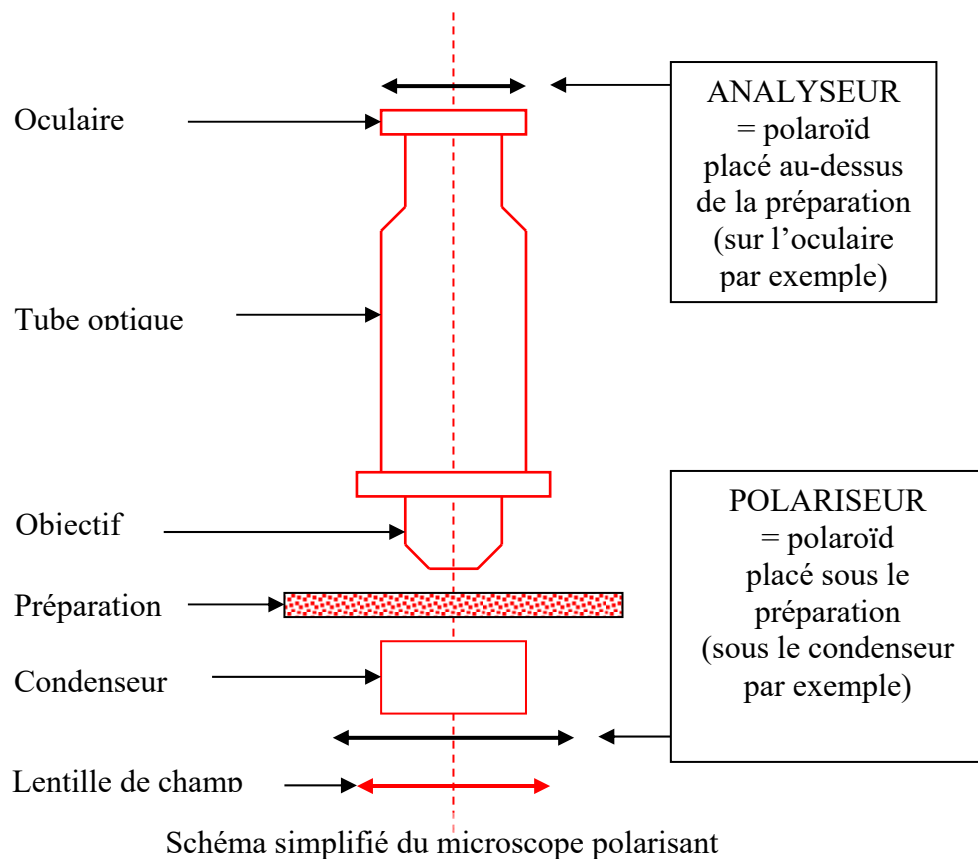
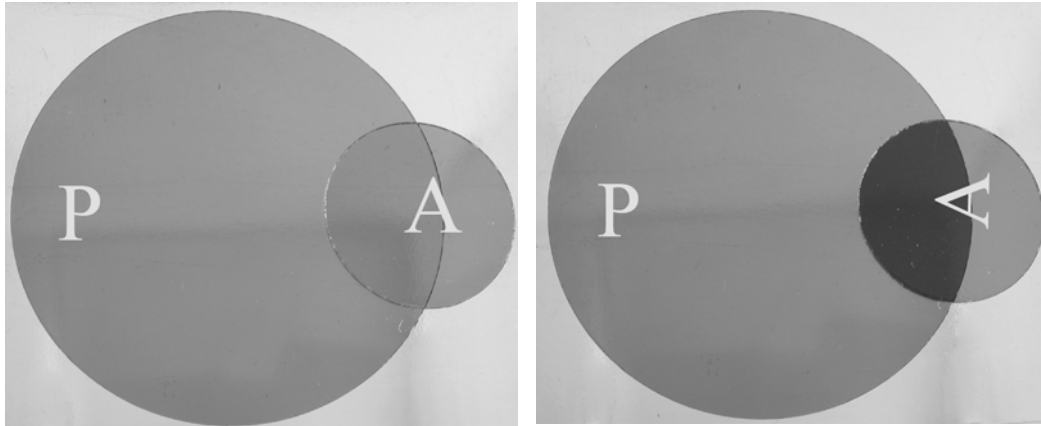


Schéma simplifié du microscope polarisant

La lumière est constituée de photons qui, lors de leur propagation, vibrent de façon aléatoire dans toutes les directions de l'espace. Lorsque cette lumière traverse un filtre polarisant (=

polariseur), la vibration se fait de façon symétrique, par exemple dans un seul plan dans le cas d'une polarisation linéaire.

Si cette lumière polarisée arrive sur un 2^{ème} filtre polariseur, croisé à 90° par rapport au premier, elle est arrêtée, on dit qu'il y a extinction de la lumière. Si on tourne ce 2^{ème} filtre (appelé analyseur) on constate que la lumière réapparaît et s'éteint tous les 90°.



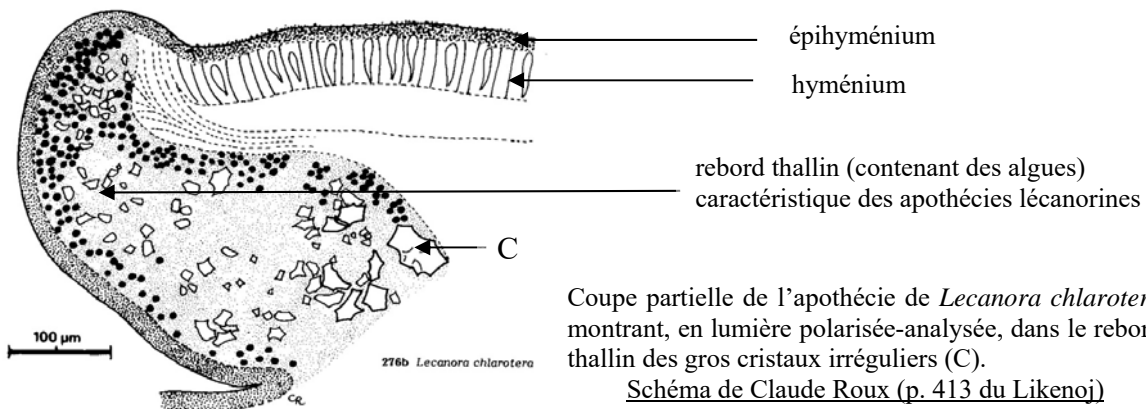
A gauche : P = le polariseur, est le morceau de polaroïd que l'on place sous la lame ;

A = l'analyseur est un morceau de polaroïd plus petit que l'on place sur l'oculaire ;

P et A sont orientés dans le même sens, la lumière polarisée par le 1^{er} filtre traverse le second.

A droite : P et A sont croisés, le 2^{ème} filtre arrête la lumière, il y a extinction.

Les cristaux (sauf ceux qui cristallisent dans le système cubique) sont biréfringents, ils rétablissent partiellement la lumière quand ils sont placés entre polariseur et analyseur croisés. C'est cette propriété qui est exploitée pour observer les cristaux des lichens.



Coupe partielle de l'apothécie de *Lecanora chlorotera* montrant, en lumière polarisée-analysée, dans le rebord thallin des gros cristaux irréguliers (C).

Schéma de Claude Roux (p. 413 du Likenoj)

En pratique il faut de mettre un filtre, le polariseur, entre la source de lumière et la préparation et le second filtre, l'analyseur, entre la préparation et l'œil de l'observateur. Il suffit ensuite de tourner l'un des deux filtres pour obtenir l'extinction de la lumière (lorsque polariseur et analyseur sont croisés à 90°) et voir apparaître les cristaux, brillant sur un fond noir.

Plusieurs possibilités sont offertes pour la réalisation technique :

1. Le dispositif le plus simple et suffisant pour une observation de contrôle en lichénologie consiste à placer un premier morceau de polaroïd sous la lame ou dans le porte-filtre du condenseur et le deuxième est tenu à la main à la sortie de l'oculaire. Les plaques de polaroïd

sont disponibles en carrés de 4x4 centimètres que l'on peut facilement couper avec des ciseaux.



Exemple de dispositif simple : le polariseur rotatif (P) est fixé sous le condenseur ; l'analyseur (A) est placé sur un oculaire.

2. Des ensembles polariseur-analyseur prêts à l'emploi sont vendus par les maisons spécialisées dans la fourniture de matériel scolaire. Ils comprennent une petite platine polarisante à semelle antidérapante qui est placée sur la platine du microscope et un suroculaire contenant l'analyseur.
3. Les dispositifs les plus sophistiqués sont fournis par les fabricants de microscope avec polariseur rotatif et analyseur escamotable. Le prix de ces accessoires les réserve toutefois aux laboratoires spécialisés (en particulier pour l'étude des lames minces de roches).

Dans un prochain bulletin (en fonction de la place disponible) :
quelques techniques pour prendre des photos numériques avec son microscope

à suivre ...

Bibliographie

- ABRAMOWITZ Mortimer - 2003 - Microscope Basics and Beyond, Olympus America Inc. Guide illustré de 42 pages A4.
- NIKON - Notice d'utilisation du microscope trinoculaire Labophot-2A, 32 pages.
- NIKON - 1989 - How to use a microscope and take a photomicrograph, 40 pages A4.
- LOCQUIN Marcel et LANGERON Maurice - 1978 - Manuel de microscopie, 352 pages, éditions Masson.
- OLDFIELD Ron - 1994 - Light microscopy, an illustrated guide, 160 pages, Mosby-Year Book Europe.
- OLYMPUS - Notice d'utilisation du microscope trinoculaire BH2, 20 pages.
- OLYMPUS - How to improve photography through the microscope, guide illustré de 85 pages A4 (une partie importante est consacrée aux réglages du microscope).
- Site WEB : <http://www.afl-lichenologie.fr> plusieurs pages sont consacrées au microscope optique et à son emploi en mycologie et lichénologie.