

## Le microscope et son utilisation en lichénologie (3)

par **Jean-Pierre GAVÉRIAUX**  
14, les Hirsons ; F - 62800 LIEVIN  
E-mail : [Jean-Pierre.Gaveriaux@wanadoo.fr](mailto: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 deux publications de 2003 :

- la première présentant les principaux produits chimiques utilisés en histologie lichénologique (pages 49 à 56 du bulletin 2003(1) ;
- la deuxième consacrée à la description et au fonctionnement du microscope optique à fond clair (pages 61 à 80 du bulletin 2003(2)).

---

---

### **3<sup>ème</sup> partie : Initiation à l'utilisation du microscope optique à fond clair**

---

---

#### **I. Régler correctement son microscope bi- ou trinoculaire**

*Certains microscopes ne possèdent pas tous les perfectionnements techniques et peuvent être dépourvus de certaines fonctions, les réglages se trouvent alors considérablement simplifiés.*

##### **1) Ajuster les oculaires du système d'observation de la tête binoculaire ou trinoculaire**

- L'un des oculaire (oculaire micrométrique) possède, au niveau de son diaphragme, un disque circulaire transparent muni d'une petite échelle portant 100 graduations. Il est nécessaire, avant tout autre réglage, de régler la position de la lentille d'œil afin d'observer une image bien nette de l'échelle graduée (il suffit de tourner dans un sens ou dans l'autre la bague supérieure de l'oculaire pour placer les lentilles à la bonne distance de la lame graduée).

- Régler l'écartement interpupillaire

Choisir un grossissement moyen ; allumer le microscope ; placer une préparation ; ajuster la puissance de l'éclairage et faire la mise au point.

Afin que la vision binoculaire soit parfaite, il est nécessaire d'ajuster la distance entre les oculaires afin qu'elle soit égale à l'écartement entre les yeux de l'observateur ; il suffit de déplacer, en même temps, les barrettes cannelées situées aux extrémités droite et gauche de la plaque qui porte les oculaires. L'ajustement est souvent possible de 55 mm à 72 mm. Les deux images doivent se superposer parfaitement pour donner l'impression d'avoir une seule image.

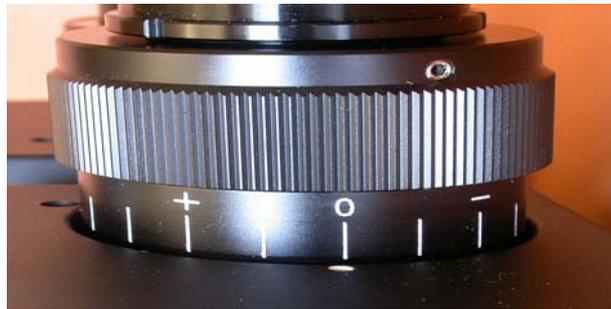
Lire la distance en mm sur la petite échelle située entre les deux porte-oculaires et reporter cette distance à droite et gauche en tournant les porte-oculaires afin que la valeur

correspondante gravée sur ces tubes soit placée devant l'index. Cette opération est indispensable pour rétablir la longueur de tube et maintenir la parfocalité<sup>1</sup> des objectifs.



- Corriger éventuellement la différence d'acuité entre les deux yeux  
L'un des oculaires doit posséder un verre d'œil réglable (de - 2 à + 2 dioptries généralement)..

Faire la mise au point précise avec l'oculaire dépourvu de réglage. Regarder ensuite l'image avec l'autre œil au travers de l'oculaire réglable. Tourner la bague d'ajustement dioptrique pour obtenir une image nette (sans utiliser les molettes de MAP). Il est alors possible de regarder avec les deux yeux, une image parfaitement nette



Remarque : Chez certains fabricants l'ajustement est possible sur l'un des tubes porte-oculaires ; parfois les 2 oculaires possèdent une frontale réglable ; dans ce cas, faire l'ajustement sur l'oculaire qui ne possède pas le micromètre.

Ces réglages seront refaits chaque fois qu'une nouvelle personne utilise le microscope ; toutefois, pour une observation ponctuelle, réalisée par une autre personne, on se contente de modifier uniquement l'écartement interpupillaire.

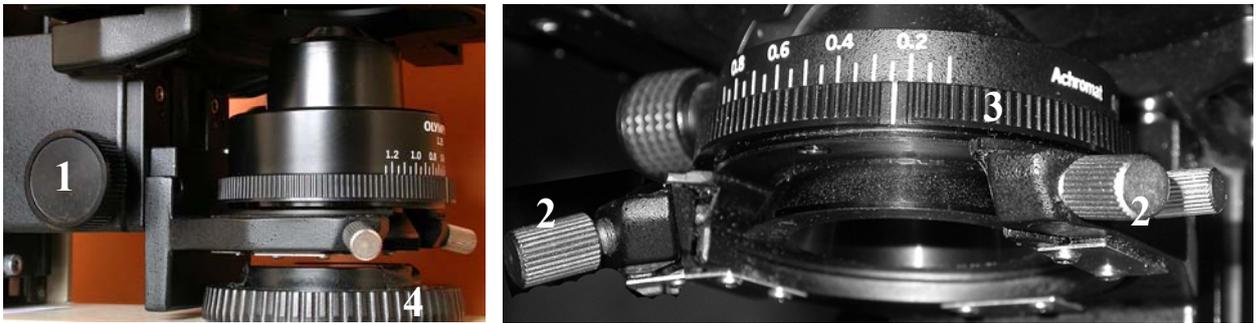
## 2) Centrer le condenseur

Les microscopes perfectionnés possèdent des condenseurs interchangeables. A chaque changement de condenseur, il est nécessaire de placer son centre dans l'axe optique du microscope.

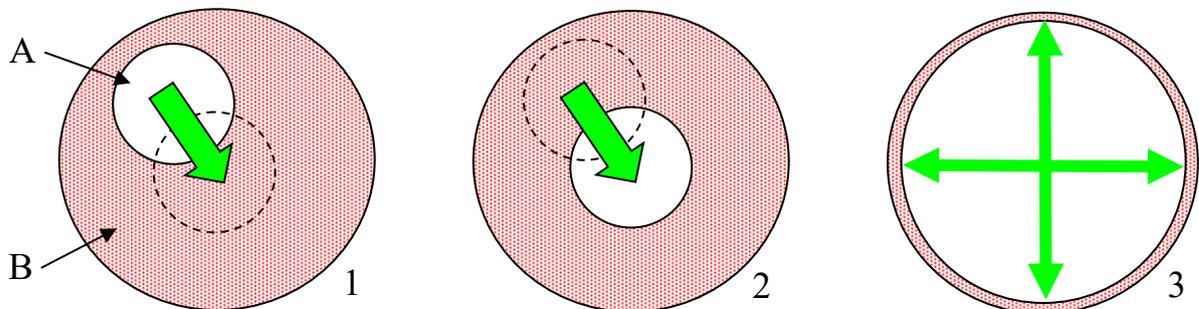
- Faire la MAP sur un sujet avec l'objectif x10 ou x40.
- Fermer le diaphragme de champ presque complètement.
- Descendre le condenseur jusqu'à ce que l'image du diaphragme de champ soit nette.
- En agissant sur les vis de centrage du condenseur ramener l'image du diaphragme au centre du champ visuel.
- Ouvrir le diaphragme de champ pour obtenir une image du diaphragme légèrement plus petite que le champ optique.

<sup>1</sup> Lorsqu'on change d'objectif, il n'est pas nécessaire de refaire la mise au point (en réalité une petite correction avec la MAP micrométrique est souvent nécessaire).

- Si cela est nécessaire, parfaire le centrage en agissant à nouveau sur les vis permettant le déplacement horizontal du condenseur.
- Remonter le condenseur à sa position initiale.



Vues du condenseur situé sous la platine : (1) molette de réglage en hauteur du condenseur (sa rotation permet d'obtenir une image nette du diaphragme de champ) ; (2) vis de déplacement horizontal (pour centrer le condenseur) ; (3) bague du diaphragme d'ouverture ; (4) bague du diaphragme de champ.



(1) L'image du diaphragme de champ (A) est nette dans le champ optique (B) du microscope mais elle est éloignée du centre ; (2) En agissant sur les vis de centrage du condenseur, cette image est centrée ; (3) le diaphragme de champ est ensuite ouvert pour le faire juste disparaître du champ visuel.

### **3) Comment régler le diaphragme de champ et la hauteur du condenseur ?**

Le diaphragme de champ contrôle le diamètre de la zone éclairée de la préparation. Il doit être plus ou moins fermé pour ajuster le diamètre de la zone éclairée au diamètre de la partie de la préparation captée par l'objectif (champ du microscope).

Si le diaphragme de champ est trop fermé, la partie périphérique de l'objet n'est pas éclairée ; si le diaphragme de champ est trop ouvert, des parties non observées de la préparation sont éclairées.

Les étapes du réglage :

- Fermer le diaphragme de champ jusqu'à ce qu'une zone sombre affecte la périphérie du champ optique, les contours du diaphragme apparaissent.
- Mettre au point l'image de ce contour de diaphragme en modifiant la position verticale du condenseur.
- Ouvrir ensuite le diaphragme, tout juste pour le faire disparaître du champ visuel.

Seule la partie captée par l'objectif est éclairée, les réflexions parasites sont éliminées et l'image présente une meilleure définition et un meilleur contraste. Ces réglages doivent être refaits à chaque changement d'objectif.

*Plus l'objectif est puissant, plus la zone à éclairer est petite,  
plus le diaphragme de champ est fermé.*

Remarque 1 : Dans la pratique, pour éviter de modifier la hauteur du condenseur à chaque changement d'objectif, on se contente (si on ne fait pas de photomicrographies) d'ajuster la hauteur du condenseur pour l'utilisation de l'objectif x100 et on garde cette hauteur pour les autres grossissements (grossissements inférieurs à 100).

Remarque 2 : De nombreux microscope ne possèdent pas de diaphragme de champ, ils donnent cependant des résultats extrêmement corrects en observation classique. La présence de ce diaphragme de champ est surtout indispensable en photomicrographie où il permet de réaliser un éclairage à double diaphragme de type Köhler.

#### **4) Quel condenseur choisir ?**

Le condenseur contrôle le cône lumineux envoyé sur la préparation ; selon l'objectif utilisé, ce cône lumineux doit varier considérablement et un seul condenseur est incapable de répondre à toutes les situations.

Le condenseur normal, vendu généralement avec le microscope, possède une ouverture numérique allant généralement jusque 1,25 ; il permet l'utilisation correcte des objectifs x4 à x100 achromatiques dont l'ON ne dépasse pas 1,25. Il est souvent pourvu d'une lentille escamotable qui doit être retirée pour utilisation de l'objectif 4x (la lumière est ainsi moins concentrée sur le préparation, l'ON diminue).

- Pour l'utilisation d'objectifs à faible grossissement x1 ou x2 (et x4) il est indispensable d'utiliser un condenseur ultra-faible, d'ouverture numérique de 0,16 à 0,02, seul capable d'illuminer suffisamment la partie périphérique de la zone observée.

- Quant aux objectifs haute définition planapochromatiques ayant pour le x100 une ON atteignant 1,4, il est indispensable d'utiliser un condenseur achromatique-aplanétique ayant une ON de 1,40.

#### **5) Quelle valeur faut-il donner au diaphragme d'ouverture ?**

le condenseur possède un diaphragme, le diaphragme d'ouverture qui permet d'adapter l'ON du condenseur à l'ON de l'objectif (voir article précédent). Si ce diaphragme est trop ouvert ou trop fermé, il y a une dégradation importante de l'image et il est préférable de respecter certaines règles plutôt que de procéder par tâtonnements. Ce réglage doit être fait à chaque fois que l'on change d'objectif.

Deux cas sont possibles en fonction du niveau technique du microscope :

1<sup>er</sup> cas : le diaphragme est dépourvu d'échelle indiquant les diverses valeurs de l'ON lorsqu'on ferme le diaphragme d'ouverture (seule figure l'ouverture maximale).

- La mise au point étant réalisée sur le sujet à observer, enlever l'un des oculaires.

- Regarder dans le tube porte-oculaire et fermer le diaphragme du condenseur.

- L'image du diaphragme apparaît dans l'objectif.

- Ouvrir le diaphragme jusqu'à ce que le diamètre de son image soit égal à celui de l'ON de l'objectif. On se trouve alors à la pleine ouverture d'éclairage, celle qui donne le meilleur pouvoir séparateur (ON de l'objectif = ON du condenseur).

- Pour éviter d'avoir à refaire cette évaluation, il est souhaitable de repérer la position de l'index du diaphragme sur le condenseur. Des petits repères peuvent être collés (papier adhésif) afin de connaître la position à retenir pour chaque objectif.



### Le condenseur d'Abbe

Son ouverture numérique va de 0,1 à 1,25 ; il permet l'utilisation correcte des objectifs x4 à x100 achromatiques dont l'ON ne dépasse pas 1,25.

Exemple présenté : Lors de l'utilisation d'un objectif achromatique x40 d'ON maximale 0,65, le condenseur doit être ouvert au maximum à 0,65.



### Le condenseur à lentille escamotable

Son ouverture numérique va de 0,1 à 0,9 ; il permet une utilisation satisfaisante des objectifs x4 à x100 achromatiques. L'objectif x100 ne peut pas être utilisé à son ON maximum, à 0,9 il est toutefois correctement diaphragmé, en principe, il ne faut pas fermer le diaphragme davantage.



Condenseur précédent avec lentille supérieure escamotée. Le champ éclairé est plus grand, il est possible de couvrir toute la zone de capture d'un objectif x4. Il n'est toutefois pas possible de diaphragmer cet objectif d'ON 0,1, cette valeur étant la limite inférieure du condenseur.

Ce type de condenseur est très utilisé, il permet un bon compromis lorsque l'on ne désire pas acheter plusieurs condenseurs différents.



### Le condenseur achromatique-aplanétique

Son ON atteint 1,40 ; il permet l'utilisation d'objectifs haute définition planapochromatiques ayant pour le x100 une ON atteignant 1,4.

Intégralement corrigé pour les aberrations chromatiques et géométriques, il est principalement destiné aux observations à très fort grossissements indispensables sur les microscopes de recherche.



### Le condenseur ultra-faible

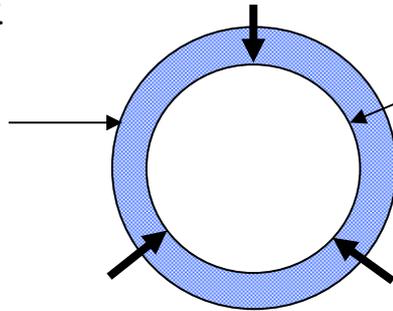
Son ON varie de 0,02 à 0,16. Il permet l'utilisation d'objectifs à faible grossissement x1 ou x2 (et x4). La partie périphérique de la zone observée est correctement éclairée.

Exemple présenté : objectif plan semi-apo x2 dont l'ouverture numérique est de 0,08. Il peut être diaphragmé jusque 0,06 à 0,05 au maximum.

Le condenseur est choisi en fonction de l'objectif utilisé

- Le diaphragme du condenseur ne sera jamais ouvert au-delà de cette valeur (dégradation de l'image suite aux phénomènes de diffraction et de diffusion).
  - Si le contraste n'est pas suffisant (ce qui est généralement le cas), on réduit ensuite l'ouverture en fermant le diaphragme ; il est fortement recommandé de ne pas dépasser 70 à 80% de la pleine ouverture (phénomènes de diffraction).
  - La fermeture du diaphragme d'ouverture du condenseur (à partir de la pleine ouverture de l'objectif)) entraîne une diminution du pouvoir séparateur mais permet d'augmenter le contraste de l'image et la profondeur de champ (zone de netteté de l'image).
- L'augmentation de la profondeur de champ et du contraste, se font donc au détriment du pouvoir séparateur de l'objectif.

Limite extérieure du champ optique du microscope



Le diaphragme d'ouverture peut être fermé jusqu'à 70-80% de la valeur de l'ON de l'objectif

Remarque 1 : En faisant ce travail pour chaque objectif, on constate que plus l'objectif est puissant, plus son ON est grande, plus le diaphragme du condenseur reste ouvert.

Remarque 2 : Diaphragme de champ et diaphragme d'ouverture fonctionnent de façon inverse. Plus on grossit, plus on ferme le diaphragme de champ et plus on ouvre le diaphragme d'ouverture.

Remarque 3 : Pour modifier l'intensité de l'éclairement, il ne faut pas modifier l'ouverture du diaphragme de champ mais jouer avec le potentiomètre de réglage de la lumière.

2<sup>ème</sup> cas : le diaphragme est muni d'une échelle indiquant les diverses valeurs de l'ON

Le travail est beaucoup plus rapide et surtout plus précis. Il suffit de reporter sur le condenseur la valeur de l'ON de l'objectif puis, en faisant un contrôle visuel, de fermer le diaphragme jusqu'à 70 à 80 % de cette valeur, en faisant un compromis entre pouvoir séparateur, contraste et profondeur de champ.

***Plus l'objectif est puissant, plus l'ouverture numérique de l'objectif est grande, plus le diaphragme d'ouverture est ouvert.***

Ces réglages peuvent sembler complexes au débutant mais, avec un peu de pratique, ils deviennent automatiques et permettent d'utiliser son microscope au maximum de ses possibilités.

## 6) Faire la mise au point :

C'est 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 ;
- déplacer verticalement la platine porte-objet ;
- 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.



- Choisir un faible grossissement : oculaire x10 et objectif x10 = G x100.
- Centrer la préparation sur la platine.
- Faire la mise au point (MAP) au faible grossissement :

Amener la lentille frontale de l'objectif le plus près possible de la lamelle, sans la toucher (selon le microscope utilisé, il faut descendre le tube optique ou remonter la platine) ; 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 d'ouverture pour améliorer la qualité de l'observation. A ce grossissement l'utilisation de la MAP micrométrique est inutile.
- 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 à l'ON du nouvel objectif. 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.
- 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. 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.

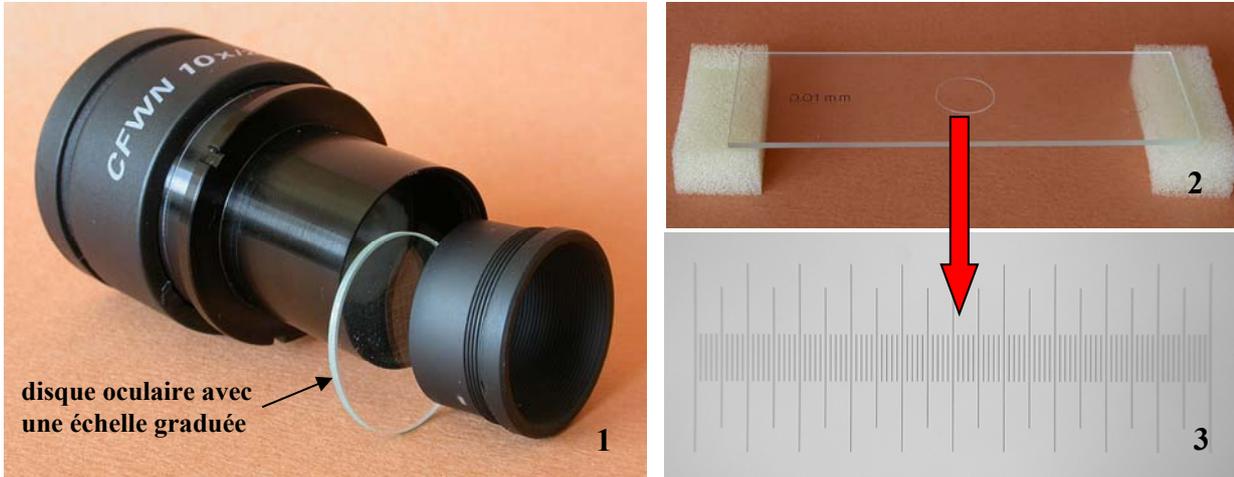
Faire attention à ne pas mettre les objectifs à sec dans l'huile. Quand la préparation est observée à l'immersion, il n'est plus possible de passer aux grossissements plus faibles. L'objectif x100 possède généralement une monture télescopique qui évite d'abîmer la lentille frontale lorsqu'elle touche 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 avec le gras du doigt et d'essuyer avec un mouchoir en papier).

## II. Evaluer les dimensions des éléments observés

Pour mesurer les dimensions des structures observées (spores, asques, épilhyménium...), on place, au niveau du diaphragme fixe de l'un des oculaires, un disque transparent portant une échelle munie de 100 graduations. Ce disque d'oculaire est vendu comme accessoire et doit être commandé en même temps que le microscope. Son diamètre correspond au diamètre intérieur de l'oculaire (environ 21 mm mais cela peut varier selon les constructeurs). L'oculaire qui porte cet accessoire est appelé oculaire micrométrique.

Remarque : Si vous achetez un oculaire micrométrique différent de celui qui équipait votre microscope, il y a de très grandes chances pour que deux images ne puissent pas fusionner parfaitement. On doit dans ce cas utiliser l'oculaire micrométrique uniquement pour réaliser les mesures puis remettre l'oculaire initial pour rétablir la vision binoculaire nettement plus confortable et moins fatigante pour les yeux.

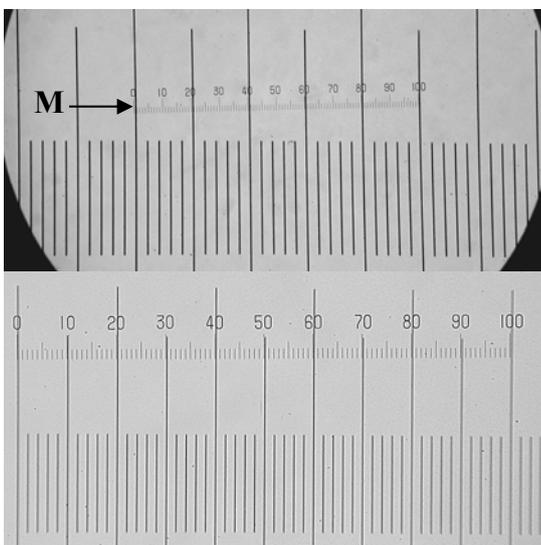


(1) L'échelle du disque oculaire est divisée en 100 parties ; (2) La lame micrométrique porte un segment de 1mm (3) divisé en 100 parties égales ; 2 traits sont séparés par 10  $\mu\text{m}$ .

Pour évaluer les longueurs il faut étalonner cet oculaire pour chacun des objectifs du microscope ; savoir à quelle longueur en  $\mu\text{m}$  correspond la distance entre deux graduations successives. On utilise une préparation microscopique particulière appelée lame micrométrique ou micromètre objet qui porte un segment de 1 mm de longueur divisé en 100 parties égales.

$$\underline{100 \text{ graduations} = 1 \text{ mm} = 1000 \mu\text{m} \Rightarrow \text{entre 2 graduations il y a donc } 10 \mu\text{m}}$$

On place le micromètre objet sur la platine et on l'observe avec l'oculaire micrométrique. On fait la MAP puis en déplaçant la préparation micrométrique on fait coïncider le zéro du micromètre oculaire avec le zéro du micromètre objet. Il suffit de lire le nombre de  $\mu\text{m}$  qui correspond aux 100 graduations du micromètre oculaire (celui qui bouge quand on fait tourner l'oculaire).



Au grossissement 400 (10x40) les 100 graduations du micromètre oculaire (M) correspondent à 25 divisions (soit 250  $\mu\text{m}$ ) du micromètre objet ; entre 2 graduations de l'oculaire micrométrique il y a donc 2,5  $\mu\text{m}$ .

Au grossissement 200 (10x20) les 100 graduations du micromètre oculaire correspondent à 50 divisions (soit 500  $\mu\text{m}$ ) du micromètre objet ; entre 2 graduations de l'oculaire micrométrique il y a donc 5  $\mu\text{m}$ .

Autre exemple : au grossissement 1000 (10x100) les 100 graduations du micromètre oculaire correspondent à 8,3 divisions (soit 83  $\mu\text{m}$ ) du micromètre objet ; entre 2 graduations de l'oculaire micrométrique il y a donc 0,83  $\mu\text{m}$ . Une spore mesurant 17 graduations aura donc pour taille  $17 \times 0,83 = 14 \mu\text{m}$ .

Au grossissement 1000, si les 100 divisions du micromètre oculaire correspondent à 10 divisions (soit 100  $\mu\text{m}$ ) du micromètre objet, ce qui correspond au cas idéal, entre 2 graduations de l'oculaire micrométrique il y a donc 1  $\mu\text{m}$ .

Les valeurs trouvées pour chaque objectif sont reportées sur un petit morceau de papier scotché sur le microscope. Il suffit ensuite de faire les mesures et de multiplier par le coefficient préalablement trouvé.

Remarque : le micromètre objet ne sert qu'une seule fois, lors de l'étalonnage du micromètre oculaire. Pour éviter son achat on peut l'emprunter lors d'un stage au cours duquel de nombreux microscopistes sont présents et pourront utilement vous conseiller.

### III. Nettoyage de l'optique

Il est fondamental que les parties optiques du microscope restent extrêmement propres. Il faut prendre l'habitude de protéger l'appareil par une housse, afin d'éviter que la poussière et des petites saletés viennent se déposer sur les surfaces optiques, ce qui entraînerait une diminution des performances et de la qualité de l'image finale.



Le matériel indispensable : le nettoyant optique, la poire soufflante, les coton-tiges, le papier optique, les chiffonnettes imprégnées de nettoyant optique, la loupe pour vérifier l'état des surfaces optiques.

Il faut donc surveiller et parfois nettoyer les parties optiques qui présentent des surfaces en contact avec le milieu ambiant :

- Lentille de sortie du collecteur.
- Filtres.
- Condenseur.
- Lentilles frontales (et parfois postérieures) des objectifs.
- Lentilles d'entrée et de sortie du tube optique.
- Oculaires pour l'observation et éventuellement oculaire photo de la tête trinoculaire.

Les oculaires sont les parties qui sont le plus fréquemment souillées et il est facile de le savoir si on constate que les petits éléments qui perturbent l'image tournent lorsqu'on fait tourner l'oculaire dans son logement.



Le nettoyage de la surface optique se fait à l'aide d'un coton-tige (enveloppé ou non de papier optique), en partant du centre et en faisant un mouvement circulaire pour atteindre la périphérie.

Pour le nettoyage il faut dans un premier temps chasser les impuretés avec un pinceau soufflant (une vieille poire à lavement convient parfaitement). L'air (sec) emporte les petites particules qui ne seront pas frottées ensuite sur les lentilles.

Pour éliminer les traces diverses, un nettoyant optique est nécessaire. Olympus conseille un mélange éther-alcool (70/30) tandis que Nikon recommande uniquement de l'alcool.

Recouvrir un coton tige d'un morceau de papier optique (à défaut un morceau d'essuie-tout ou de mouchoir en papier non pelucheux) ; déposer quelques gouttes de nettoyant optique ; frotter en tournant, en partant du centre de la lentille vers sa périphérie. Vérifier avec la loupe de terrain que la surface est uniformément propre. Les pochettes nettoyantes pour lunettes, imprégnées d'un produit peu agressif, peuvent également être utilisées.

Si vous utilisez une huile de synthèse non résinifiable, il n'est pas indispensable de nettoyer complètement l'objectif à immersion après chaque usage ; il suffit de l'essuyer avec un papier optique. Il ne sera nettoyé minutieusement qu'en cas d'une longue inutilisation.

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.

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).

LEITZ - The microscope and its application, 110 pages