

Les différents types de microscopes.

Didier Baar ⁽¹⁾

La mycologie générale n'exploite que dans une faible mesure les ressources actuelles de la microscopie. Pour déterminer un champignon, à de rares exceptions près, le mycologue fait exclusivement appel à l'éternel microscope photonique à fond clair. Parfois, il peut s'aider d'un microscope stéréoscopique pour réaliser ses préparations, ou pour définir avec précision certains détails macroscopiques particulièrement ténus.

Mais, tout le monde le sait, la mycologie, ce n'est pas que la détermination d'un champignon. Nous dirons, d'une manière tout à fait générale, que c'est aussi l'étude de leur biologie et de leurs « intérêts économiques et humains ⁽²⁾ » (propriétés antibiotiques, dégradation des hydrocarbures, valeur gastronomique, propriétés fermentatives, nuisances parasitaires, etc.). C'est précisément dans ces domaines-là qu'apparaît clairement l'intérêt de la technique microscopique moderne.

Dans cet article qui, il est vrai, n'est pas exactement à sa place dans une revue mycologique, je vais tenter de décrire très succinctement les différents types de microscopes qui ont trouvé une utilisation en mycologie. Le lecteur désireux d'en apprendre plus sur ce sujet extrêmement vaste consultera avec satisfaction les ouvrages renseignés dans la bibliographie.

1. Les microscopes photoniques.

Les différents types de microscopes photoniques ont tous en commun la mise à profit de radiations lumineuses dont les plus exploitées constituent la lumière visible. Celle-ci peut en effet être observée directement et en toute sécurité par l'œil humain, sans autre intermédiaire (écran fluorescent, par exemple). Des radiations invisibles, tels les ultraviolets, sont également mises à profit, car elles permettent d'améliorer le pouvoir résolvant des instruments. Mais toutes ces radiations peuvent être traitées de différentes manières, non seulement avant de pénétrer dans l'objet, mais également au sortir de celui-ci.

1.1. Composition de la lumière ⁽³⁾.

Il existe actuellement deux théories qui interprètent différemment les propriétés de la lumière : la théorie ondulatoire et la théorie corpusculaire. Ces deux hypothèses, diamétralement opposées, ne sont pourtant pas incompatibles, mais bien complémentaires. Nous devons la théorie ondulatoire, qui est la plus ancienne, à Maxwell et à Hertz, tandis que la théorie corpusculaire, plus récente, est l'œuvre de Planck et d'Einstein.

La théorie ondulatoire, prétendant que la lumière est formée d'ondes électromagnétiques, permet d'interpréter aisément les phénomènes de propagation de la lumière, tels la réfraction ou la réflexion. Pourtant, elle a toujours été incapable de fournir une explication satisfaisante aux phénomènes d'absorption et d'émission de lumière par la matière.

C'est alors qu'est née la théorie corpusculaire, qui admet une quantification de l'énergie lumineuse sous forme de photons. Un photon peut dès lors être considéré comme un corpuscule élémentaire de lumière que la matière peut absorber (photosynthèse, plaques photographiques), mais aussi émettre (lampyres, éclairage à acétylène).

1.2. Microscopes stéréoscopiques.

Les microscopes stéréoscopiques, ou stéréo microscopes, sont parfois appelés aussi loupes binoculaires, microscopes binoculaires, ou encore binoculaires tout court, mais improprement. En effet, la plupart des microscopes binoculaires ne sont pas stéréoscopiques... Par définition, un microscope stéréoscopique est un instrument qui permet de percevoir le relief d'un objet par examen de deux images prises avec un écartement comparable à celui des yeux. Il faut donc qu'il comprenne non seulement deux oculaires, mais également deux objectifs.

Donc, le microscope stéréoscopique est un instrument destiné essentiellement à l'observation de la structure extérieure, du relief des objets. Conventionnellement, c'est un éclairage incident qui est utilisé, car celui-ci favorise grandement la vision stéréoscopique en produisant des jeux d'ombre à la surface de l'objet.

⁽¹⁾ Didier Baar, décédé accidentellement le 14 octobre 2001, à l'âge de 23 ans.

⁽²⁾ Consulter à ce propos « La vie mystérieuse des champignons sauvages », de R. H. Monceaux, où l'auteur aborde les sujets mycologiques les plus divers sur un ton tantôt poétique tantôt scientifique.

⁽³⁾ A. Policard, M. Bessis et M. Locquin, dans leur « Traité de microscopie », décrivent ces concepts plus en détail (page 5). Le lecteur dévoré par une passion effrénée pour les propriétés de la lumière sera assurément satisfait en consultant l'ouvrage d'A. Van De Vorst, « Introduction à la physique » (tome 2, parties 8, 9 et 10 et tome 3, partie 11); celui de G. Bruhat et A. Kastler, « Optique »; et enfin l'ouvrage de J. Kane et M. Sternheim, « Physique » (unités 6 et 7).

Avec un tel dispositif d'éclairage, seuls les rayons réfléchis par le spécimen sont captés par l'œil de l'observateur. Les rayons lumineux n'ayant pas à traverser l'objet, celui-ci ne doit pas nécessairement être transparent, et une certaine opacité est même souhaitable. Les dimensions de l'objet ne sont de ce fait pas limitées, si ce n'est par la mécanique de l'instrument.

Les microscopes stéréoscopiques sont pourvus d'objectifs dont les qualités principales sont une grande distance frontale et un vaste champ d'observation. Ces qualités ne peuvent malheureusement être obtenues qu'au détriment du grossissement, qui n'excède jamais dix fois. C'est la raison pour laquelle le grossissement total des stéréo microscopes dépasse rarement deux cents fois (couplage d'un objectif dix fois avec un oculaire vingt fois).

Pour ce qui est des intérêts mycologiques de l'instrument, ils sont multiples. Le stéréo microscope permet aussi bien l'observation confortable des caractères macroscopiques les plus ténus que l'étude et la détermination des petites espèces. Mais il est aussi un accessoire intéressant lors de la confection de préparations microscopiques. La facilité avec laquelle on réalise les coupes et les dissociations grâce à cet instrument est un argument suffisant pour se le procurer. Dans tous les cas, lors de l'achat d'un tel instrument, il faut veiller à ce qu'il soit muni d'un tube incliné, et non d'un tube droit, extrêmement inconfortable.

1.3. Fond clair.

Les microscopes à fond clair ⁽¹⁾, dont il existe une grande variété, sont des instruments destinés principalement à l'étude de la structure interne des objets. Il est de nombreuses différences entre les microscopes stéréoscopiques et les microscopes à fond clair, mais toutes comportent des exceptions. Le tableau suivant résume ces distinctions en opposant les caractéristiques principales de ces deux types de microscopes.

Microscopes à fond clair :	Microscopes stéréoscopiques :
- Eclairage transmis	- Eclairage incident
- Un seul objectif	- Deux objectifs
- Image renversée	- Image droite
- Grossissements relativement forts	- Grossissements assez faibles
- Faible distance frontale	- Grande distance frontale
- Objets transparents	- Objets préférentiellement opaques
- Objets peu volumineux	- Volume non limité
- Observation de la structure interne des objets	- Observation de l'aspect extérieur des objets

L'image que reçoit l'observateur à travers le microscope à fond clair est formée par les rayons lumineux qui ont traversé l'objet après avoir été émis par la source. Il est bien évident que, pour ce faire, l'objet doit être très transparent, et donc très mince. Or très peu des corps que l'on désire observer sont minces à l'état naturel. C'est pourquoi divers processus (dissociations, coupes, etc.) sont mis en œuvre afin de réduire au mieux leur épaisseur.

Ces microscopes, s'ils sont bien équipés, permettent souvent des grossissements allant jusqu'à deux mille fois. Les constructeurs ont bien essayé de mettre au point des appareils plus puissants, mais toujours ils s'y sont cassés les dents. Les grossissements les plus élevés qu'on ait obtenus atteignent trois mille sept cent cinquante fois, par couplage d'un objectif de cent vingt-cinq fois avec un oculaire de trente fois. Mais ceux-ci n'apportant rien à cause de leur insuffisant pouvoir résolvant, on a tôt fait de les abandonner.

Et enfin, la composition optique de ces microscopes est telle qu'ils donnent de l'objet une image renversée, ce qui n'est pas fort embarrassant. En effet, à cause de la faible distance frontale d'une part, et de la vision non stéréoscopique d'autre part, il n'est généralement pas question de réaliser des dissections sous le microscope. Il existe cependant des oculaires redresseurs, renversant l'image qui est alors perçue à l'endroit par l'observateur, mais très peu d'appareils en sont pourvus en raison de leur prix élevé.

1.4. Lumière réfléchie.

La technique d'examen en fond clair, cela a été dit à plusieurs reprises déjà, ne permet l'observation que d'objets très transparents. C'est sans doute là son plus grand défaut. De tout temps, on a cherché à y obvier, et c'est en modifiant l'éclairage qu'on y est parvenu : il suffisait d'appliquer au microscope à fond clair un éclairage incident, de préférence vertical. Nombreux sont les systèmes qui ont été proposés pour obtenir une illumination satisfaisante ⁽²⁾.

En effet, la distance frontale des objectifs dont sont équipés les microscopes non stéréoscopiques est faible. Disposer une lampe à proximité de l'objectif est dès lors insuffisant. Qui plus est, la chaleur dégagée par toute ampoule de puissance convenable risquerait d'endommager irrémédiablement les lentilles. Suite à l'apparition des fibres

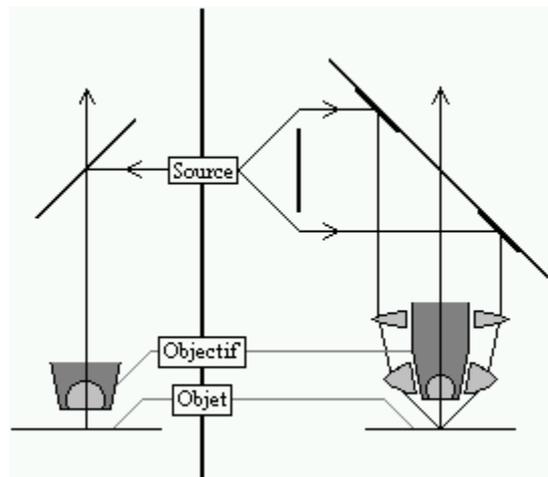
⁽¹⁾ Le fond clair est étudié en détail dans tous les bons ouvrages de microscopie.

⁽²⁾ Consulter à ce sujet le « Manuel de microscopie », de M. Locquin et M. Langeron (pages 36-38).

optiques, on a pu mettre au point des systèmes d'éclairage de petite taille et d'intensité suffisante, ne dégageant aucune chaleur. Ces dispositifs sont très satisfaisants pour les objectifs faibles, qui conservent malgré tout une distance frontale de l'ordre du centimètre.

Pour les objectifs forts, et a fortiori pour les objectifs à immersion, cet illuminateur ne peut convenir. C'est alors qu'est venue l'idée d'incorporer l'éclairage à l'objectif. Ce système, dont il existe de nombreuses variantes, est le plus employé actuellement. La lumière émise par la source est envoyée jusqu'à l'objectif par un système de miroirs et/ou de lames semi-réfléchissantes. Elle parvient à la préparation soit en traversant directement l'objectif, soit en l'encerclant. Dans le premier cas, l'apparition de lumière parasite nuit à la qualité de l'image. Dans le second cas, la lumière forme un manchon et est focalisée sur la préparation, juste sous la lentille frontale de l'objectif.

Cette figure schématise les deux systèmes principaux d'éclairage intégré à l'objectif pour la microscopie en lumière réfléchie. Les flèches indiquent la propagation de la lumière dans l'instrument. A gauche, la lumière traverse directement l'objectif, alors qu'à droite, les rayons lumineux forment un manchon autour de l'objectif.



Le principal intérêt de la microscopie en lumière réfléchie est de permettre l'examen des objets opaques à l'état frais, sans devoir les couper ni les dépigmenter. En entomologie, par exemple, l'instrument rend les plus grands services. Mais le domaine où il est le plus largement utilisé est l'étude des matériaux, et plus spécialement la métallographie (microscopes métallographiques). Pour l'étude des champignons, on comprend tout de suite l'intérêt.

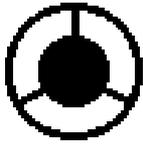
1.5. Fond noir.

Avec le microscope à fond noir, seuls les rayons lumineux diffractés par l'objet concourent à la formation de l'image. C'est sur ce principe que repose le fonctionnement du microscope stéréoscopique. En effet, l'éclairage étant incident, aucun rayon lumineux ne peut pénétrer directement dans l'objectif, et ce sont uniquement les

rayons réfléchis par l'objet qui parviennent à l'œil de l'observateur. On ne s'en aperçoit généralement pas, mais le stéréo microscope est bel et bien un microscope à fond noir, quoique d'un type un peu particulier.

Mais le microscope à fond clair peut aussi devenir un microscope à fond noir. Il suffit pour cela d'occulter, par exemple à l'aide d'un diaphragme circulaire, tous les rayons directs émis par la source. L'objet est alors éclairé par un anneau de lumière, et seuls les rayons diffractés par lui sont collectés par l'objectif. Mais ce dispositif a le désavantage que peu de rayons parviennent jusqu'à l'observateur, ce qui oblige à utiliser un éclairage très intense, nuisible aux préparations.

Voici un diaphragme tel que ceux qui sont utilisés pour occulter les rayons directs lors de l'examen en fond noir. En général, cet accessoire est combiné, pour améliorer la qualité de l'image, avec un condenseur spécial : le condenseur à fond noir.

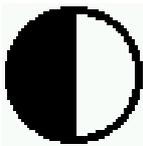


En vérité, le microscope à fond noir est avant tout un dispositif qui facilite la recherche de corpuscules peu visibles en fond clair. Une particule observée au travers de cet instrument apparaît très brillante sur le fond noir de l'image. De même, l'effet de bordure est fortement accentué, c'est-à-dire que les pleins au centre d'une structure paraissent optiquement vides alors que le contour en est très lumineux, ce qui peut conduire à des erreurs d'interprétation.

Concrètement, le microscope à fond noir n'a qu'un intérêt tout relatif en mycologie. L'éclairage oblique, par contre, qui n'est pas un vrai fond noir mais une variante de celui-ci, peut être utilisé avec fruit; il est envisagé ci-dessous.

1.6. Eclairage oblique.

Lorsque le diaphragme annulaire du fond noir est remplacé par un demi-disque comme celui-ci, on obtient un éclairage oblique. Ce dispositif, qui est souvent confondu avec le fond noir conventionnel, est en réalité un éclairage intermédiaire entre fond noir et fond clair.



L'observateur qui utilise un éclairage oblique perçoit de l'objet une image en relief, un peu comme avec le microscope stéréoscopique. Le diaphragme rend l'éclairage asymétrique, ce qui provoque la formation d'ombres dans la préparation. C'est là l'explication de la sensation de relief. Pour ce qui est des champignons, ce dispositif est intéressant au niveau de l'observation des spores. Il permet d'en déceler les plus fines ornements, et d'en étudier la paroi.

1.7. Contraste de phase.

Pour obtenir de bons résultats en fond clair, les objets doivent être contrastés. Pourtant, la plupart d'entre eux, à l'état naturel, le sont peu, et c'est pourquoi on a recours à une multitude de processus de coloration. Mais la plupart des substances colorantes sont toxiques et tuent les cellules, ce qui exclut l'observation de leur évolution au cours du temps. C'est ce qui a motivé la mise au point des microscopes à contraste de phase ⁽¹⁾, qui permettent d'étudier les cellules les plus transparentes tout en les conservant vivantes.

D'une manière générale, on peut distinguer, en microscopie, deux catégories d'objets: les objets d'amplitude et les objets de phase. Les corps plus ou moins colorés ou noirâtres, que ce soit naturellement ou après un traitement spécifique, constituent la catégorie des objets d'amplitude. Ce sont ceux que l'on étudie à l'aide du microscope à fond clair. Au contraire, les objets transparents, difficilement observables en fond clair, font partie des objets de phase. Ce sont ceux qui nous intéressent dans ce paragraphe.

Il existe une différence théorique fondamentale entre ces deux catégories d'objets : les objets de phase déphasent les ondes lumineuses d'un quart de longueur d'onde (λ), ce qui ne se produit pas avec les objets d'amplitude. Le principe du microscope à contraste de phase est de compenser le déphasage que produisent les objets de phase par l'action d'une plaque de phase. Celle-ci ramène l'état de phase à celui qui serait donné par un objet d'amplitude et transpose ainsi les contrastes de phases en contrastes d'amplitudes ; l'objet transparent devient contrasté sans l'action de colorants.

En plus de compenser le déphasage, les plaques de phase, pour accentuer le contraste, ont le pouvoir d'absorber une grande partie des rayons lumineux directs émis par la source, comme c'est le cas du fond noir. Une de ces plaques de phase est insérée à demeure dans chacun des objectifs d'un microscope à contraste de phase. C'est un éclairage annulaire qui est mis en œuvre, et à chaque objectif correspond un diaphragme différent, centré sur la plaque de phase de l'objectif, et que l'on insère au niveau du condenseur.

Pourtant, nombre de facteurs limitent l'utilisation du microscope à contraste de phase. Les objets doivent être peu, ou de préférence pas colorés ; ils ne doivent pas avoir de membranes épaisses et ils ne doivent pas eux-mêmes être épais; ils ne doivent pas non plus couvrir tout le champ. Les surfaces optiques, tant du microscope que de la préparation, doivent être très propres, et l'éclairage doit être plus intense que pour le fond clair.

D'un point de vue mycologique, l'instrument est du plus haut intérêt, mais il est réservé à l'étude de la biologie des champignons. N'en ayant pas l'usage, peu de particuliers le possèdent. D'autre part, son prix relativement élevé, dû essentiellement aux objectifs spéciaux dont il est équipé, a de quoi décourager les amateurs les plus enthousiastes. C'est probablement celui des microscopes photoniques qui a connu le plus grand développement ces dernières années, car le microscope électronique, qui a supplanté dans une large mesure le microscope à fond clair dans les laboratoires spécialisés, ne peut rien contre le contraste de phase.

⁽¹⁾ Les différents types de microscopes interférentiels, dont le microscope à contraste de phase est le modèle le plus répandu, sont décrits plus complètement dans le « Manuel de microscopie » de M. Locquin et M. Langeron (pages 41-44). La constitution, le fonctionnement et l'utilisation de ces divers microscopes sont exposés dans leurs moindres détails dans le « Traité de microscopie » de A. Policard, M. Bessis et M. Locquin (pages 76-91 pour les contrastes de phase et pages 91-95 pour les microscopes interférentiels).

1.8. Microscopie en ultraviolets.

Les radiations ultraviolettes ⁽¹⁾ diffèrent de la lumière visible essentiellement par leur longueur d'onde plus courte. C'est cette propriété qui est mise à profit dans les microscopes à ultraviolets. En effet, plus la longueur d'onde d'une radiation est courte, plus le pouvoir séparateur ⁽²⁾ de l'instrument qui l'utilise est grand. Le pouvoir séparateur d'un microscope à ultraviolets peut être jusqu'à deux fois supérieur à celui d'un microscope à fond clair conventionnel.

En plus d'augmenter le pouvoir résolvant, les ultraviolets ont la propriété d'être absorbés par certains constituants cellulaires, tels les acides ribonucléiques. Ils permettent donc des observations complémentaires à celles qui sont faites en lumière visible. Mais les ultraviolets présentent de graves désavantages. Ainsi, par exemple, les sources lumineuses sont coûteuses et dangereuses pour l'œil, et les objectifs s'altèrent rapidement sous l'action catalysante des radiations ultraviolettes.

1.9. Microscopie en infrarouges.

L'intérêt des infrarouges n'est pas, comme c'est le cas des ultraviolets, d'augmenter le pouvoir résolvant les instruments. En effet, la longueur d'onde des infrarouges est sensiblement plus grande que celle de la lumière visible. Le pouvoir résolvant s'en trouve diminué, et les infrarouges ne sont donc pas destinés à des grossissements très élevés. Pourtant, certains objets tels les téguments des coléoptères, très opaques à la lumière visible, sont plus ou moins transparents aux infrarouges. C'est en cela que réside essentiellement leur intérêt.

Les microscopes à ultraviolets et à infrarouges sont des instruments spécialisés, d'emploi relativement compliqué et de bien piètre utilité dans le domaine des champignons. Inutile donc de s'étendre inconsidérément à leur sujet.

1.10. Fluoromicroscopie.

La microscopie en fluorescence ⁽³⁾ est basée sur la constatation que certains corps violemment éclairés par des radiations de courte longueur d'onde, l'absorbent en réémettant des radiations de longueur d'onde plus grande dites de fluorescence. Cette fluorescence résulte, en vérité, du déplacement des électrons d'une couche électronique à l'autre. En effet, lorsqu'un électron, dans le nuage électronique d'un atome, absorbe une radiation de longueur d'onde déterminée, il passe de l'état fondamental (état non excité) à l'état excité ; et cela se traduit par le déplacement de l'électron vers une couche périphérique. C'est en retournant à l'état fondamental que l'électron émet des radiations de fluorescence, de longueur d'onde plus grande que celle de la radiation absorbée.

Mais la mise à profit de la fluorescence requiert un certain nombre de conditions expérimentales déterminées. Il est bien évident, par exemple, que le matériau dans lequel ont été façonnées les lentilles, ainsi que le baume qui les colle, ne peuvent être fluorescents. Il en est de même des lames porte-objets, des lamelles couvre-objets, du milieu de montage de la préparation, de l'huile à immersion éventuelle, etc. Pas question donc, lors de l'examen en fluoromicroscopie, de monter la préparation dans le baume du Canada ou d'utiliser l'objectif à immersion avec de l'huile de cèdre, car ces deux substances sont fortement fluorescentes. De plus, toutes les surfaces optiques, y compris celles de la préparation, doivent être parfaitement propres.

D'autre part, pour obtenir les meilleurs résultats, il est nécessaire d'utiliser un rayonnement monochromatique, c'est-à-dire dont la longueur d'onde est homogène et bien déterminée (la lumière blanche, poly chromatique, ne peut convenir). Pour ce faire, on fait passer la lumière d'éclairage à travers un filtre d'absorption sélective, qui est généralement construit de manière à ne laisser passer que l'ultraviolet, dont la longueur d'onde est plus courte que celle de la lumière visible. Après que la lumière ait traversé la préparation, on lui fait franchir un second filtre, qui absorbe ce qui reste de la lumière excitatrice, et ne laisse passer que les radiations de fluorescence.

L'examen en fluorescence est parfois associé avec le contraste de phase décrit précédemment, afin de permettre de localiser très précisément les points fluorescents dans la préparation. La polarisation (voir ci-dessous) peut également y être combinée. Il existe deux modalités d'examen en fluorescence, soit que l'objet est fluorescent naturellement, soit qu'il est rendu fluorescent suite au traitement par un fluorochrome (colorant fluorescent, tels la rhodamine, la fluorescéine, l'éosine jaunâtre, l'uranine, l'érythrosine bleuâtre, le rose Bengale, la phosphine, la benzoflavine, etc.).

C'est principalement dans l'étude de la biologie des champignons, mais aussi, dans une moindre mesure, pour la détermination fine de ceux-ci, que la microscopie en fluorescence trouve des applications mycologiques... dans les laboratoires spécialisés, évidemment !

⁽¹⁾ Pour de plus amples renseignements au sujet de la microscopie en dehors du visible, consulter le « Précis de microscopie », de A. Policard, M. Bessis et M. Locquin (pages 96-107).

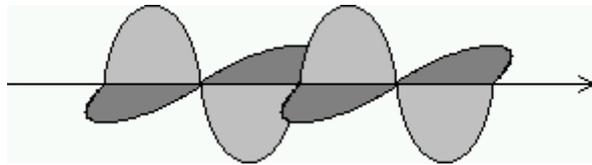
⁽²⁾ Le pouvoir séparateur, ou pouvoir résolvant d'un objectif est sa capacité à séparer deux points l'un de l'autre. Ainsi, en lumière visible, avec les meilleurs objectifs à immersion, le pouvoir séparateur est de l'ordre de 0,2 μm (1 μm = 0,001 mm = 10^{-6} m); c'est-à-dire que deux points d'un objet séparés l'un de l'autre par une distance inférieure à 0,2 μm seront fusionnés par l'objectif et apparaîtront comme un seul point. Plus le pouvoir séparateur d'un objectif est grand, meilleure est la résolution de l'image.

⁽³⁾ Les applications, les modalités et les satellites de la fluoromicroscopie sont décrits de manière détaillée dans le « Précis de microscopie » de A. Policard, M. Bessis et M. Locquin (pages 499-508).

1.11. Polarisation.

La théorie ondulatoire de la lumière prétend que celle-ci, à l'état naturel, vibre de façon aléatoire dans toutes les directions qui sont perpendiculaires à son axe de propagation. Le microscope polarisant ⁽¹⁾ offre la possibilité de sélectionner le plan de vibration des rayons lumineux, et d'orienter l'objet à volonté par rapport à ce plan.

Schéma d'une onde lumineuse, montrant la vibration perpendiculaire à sa direction de propagation.



L'utilisation la plus générale du microscope polarisant est d'ordre minéralogique. Il permet en effet, par étude des propriétés optiques d'une lame mince de roche, d'en déterminer les divers constituants, qui, suivant leur nature et le plan de vibration des rayons lumineux, prennent une couleur déterminée.

Mais l'étude des incrustations minérales dans les cellules biologiques, et tout particulièrement dans les hyphes de champignons, peut être envisagée avec fruit grâce à cet instrument. Il autorise en outre des observations plus classiques, qui permettent quelquefois la mise en évidence de certains éléments de la préparation que l'on observe difficilement avec les techniques traditionnelles de coloration et d'imprégnation.

La compréhension théorique du fonctionnement du microscope polarisant requiert de solides bases en physique, et notamment en optique ondulatoire; c'est pourquoi la description n'en est faite que dans ses grandes lignes au cours des trois paragraphes précédents.

2. Les microscopes électroniques ⁽²⁾.

Dans les microscopes électroniques, ce ne sont plus des photons qui sont mis à contribution, mais bien des électrons. L'intérêt des électrons est leur très courte longueur d'onde, largement inférieure à celle des photons. Or, cela a déjà été signalé à maintes reprises, plus la longueur d'onde d'une radiation est courte, meilleur sera le pouvoir séparateur de l'instrument qui l'utilise. Ainsi, le pouvoir séparateur d'un microscope électronique par transmission peut être mille fois supérieur à celui des microscopes photoniques, et il permet la résolution de deux points séparés l'un de l'autre par deux angströms ⁽³⁾ seulement.

Mais les électrons ont le désavantage majeur d'être peu pénétrants, beaucoup moins que les photons, ce qui définit certaines contraintes, particulièrement sévères dans le cas du microscope électronique par transmission. Par exemple, la colonne de l'instrument doit être portée à un vide poussé. D'autre part, l'épaisseur de l'objet doit être très faible, et ce n'est plus en micromètres qu'on la mesure, mais bien en nanomètres ou en angströms. Dès lors, les techniques de préparation sont tout autres.

Par ailleurs, il n'est plus question de couleur avec les microscopes électroniques: il est impossible, avec ces instruments, de percevoir les teintes naturelles des objets que l'on examine. Du reste, ce ne sont plus des substances colorantes que l'on utilise pour contraster l'objet, mais bien des atomes lourds. D'autre part, notre œil est incapable de reconstituer une image à partir d'électrons; c'est pourquoi on est obligé d'interposer un écran fluorescent ou une plaque photographique.

La disposition des lentilles électroniques qui font office de condenseurs, d'objectifs et d'oculaires, est semblable à celle qui est adoptée dans les microscopes photoniques. Simplement, ce sont des éléments électriques à la place de lentilles en verre. Le flux d'électrons est généralement produit par une cathode constituée par exemple d'un filament incandescent de tungstène, d'où les électrons animés d'une faible vitesse sont arrachés par leur mouvement thermique.

2.1. Microscopes électroniques à balayage.

Le microscope électronique à balayage (MEB ou SEM : Scanning Electron Microscope) est à la microscopie électronique ce que le microscope stéréoscopique est à la microscopie photonique. C'est-à-dire que son utilité relève de l'observation fine de la surface des objets. Ici, les électrons, comme les photons dans le cas du microscope photonique, ne doivent pas traverser l'objet, mais seulement se « réfléchir » à sa surface. La préparation des échantillons est de ce fait fortement simplifiée, puisque leur épaisseur ne doit pas être réduite à quelques centièmes de micromètres, comme c'est le cas avec le microscope électronique par transmission.

⁽¹⁾ Une description détaillée de la microscopie par polarisation est faite dans le « Précis de microscopie » de A. Policard, M. Bessis et M. Locquin (pages 111-120).

⁽²⁾ Pour ce qui est des différents microscopes électroniques et de leurs variantes et satellites, consulter le « Précis de microscopie », de A. Policard, M. Bessis et M. Locquin (pages 180-202). De même, un chapitre du prestigieux « Manuel de microscopie », de M. Locquin et M. Langeron est consacré à la microscopie électronique (pages 97-108). Les informations livrées par ces deux ouvrages restent néanmoins très succinctes; aussi, pour des renseignements plus complets, se référer aux abondants et florissants traités de microscopie électronique.

⁽³⁾ D'une manière générale, un angström (1Å) correspond à un dixième de nanomètre (1nm), lui-même étant la millième partie du micromètre (1µm), lequel est l'équivalent du millième de millimètre (mm). Ainsi, un angström équivaut à un dix-millionième de millimètre.

Les ressources du microscope électronique sont inépuisables, car il permet, outre l'observation des objets les plus divers, l'étude de la composition chimique de ceux-ci par divers procédés, notamment par l'analyse des électrons rétrodiffusés, ou par celles des rayons X produits par l'absorption des électrons incidents par la matière. Le microscope électronique à balayage est doué d'une grande profondeur de champ, plus grande que celle du microscope photonique à des grossissements semblables !

Pour pouvoir observer un objet au microscope électronique à balayage, il faut le préparer par métallisation, c'est-à-dire qu'on dépose à la surface de l'objet, par vaporisation, par exemple, une fine pellicule métallique. Les éléments que l'on choisit à cet effet sont principalement l'or, le platine, le cuivre et le germanium, ou certains alliages tels l'or-palladium ou l'or-cuivre. Le pouvoir résolvant théorique après métallisation est de l'ordre de cent angströms.

2.2. Microscopes électroniques par transmission.

C'est en vue de travailler avec le microscope électronique par transmission qu'il est indispensable de réduire les objets à une grande minceur. En effet, les électrons, si peu pénétrants qu'ils soient, doivent pourtant traverser l'échantillon, au même titre que les photons dans le microscope photonique à fond clair. C'est là qu'interviennent les innombrables techniques de microtomisation qui ont été développées ces dernières années pour la préparation des échantillons à la microscopie électronique. On utilise des ultramicrotomes munis de couteaux en verre ou en diamant. Tout comme pour le microscope électronique à balayage, le microscope électronique par transmission (MET ou TEM : Transmission Electron Microscope) est infiniment riche en ressources, et il a permis les découvertes les plus extraordinaires, spécialement dans les domaines de la biologie et de la médecine. L'intérêt mycologique en est évident, et l'application de l'instrument à l'étude des champignons est florissante.

3. Conclusion.

Dans cet article sont décrits, très succinctement il est vrai, les principaux types de microscopes. La partie concernant la microscopie électronique a été volontairement réduite, car cette dernière est parfaitement inaccessible à la plupart des mycologues non-professionnels. Le prix effroyablement élevé des instruments d'une part, et la prodigieuse complexité des techniques d'autre part, réservent irrémédiablement la microscopie électronique aux laboratoires spécialisés. Ce n'est pas toujours le cas des différents microscopes photoniques envisagés qui, s'ils sont très onéreux, restent néanmoins abordables dans une certaine mesure.

Nous aurions pu en effet discuter bien d'autres techniques instrumentales encore, comme la microscopie électronique par réflexion, la microscopie par émission, la microscopie protonique, la microscopie ionique, la microscopie par rayons X, la microscopie par reconstitution holographique, la microscopie électronique à excitation ultraviolette, la microscopie interférentielle, etc., etc. Et ce ne sont là que quelques exemples... on peut dire que vous l'avez échappé belle !

Il est bien évident que toutes ces informations ne sont pas tirées, pour leur très grande majorité, de mon expérience personnelle, mais bien d'une recherche bibliographique. Les ouvrages de référence, à ce sujet, sont d'une part le « Précis de microscopie » de A. Policard, M. Bessis et M. Locquin, et d'autre part, le « Manuel de microscopie » de M. Locquin et M. Langeron. D'autres références se trouvent citées dans la bibliographie ci-dessous.

4. Bibliographie.

- AYEL, A. ET MOINARD, A.: Le microscope. Société mycologique du Poitou.
BRUHAT, G. ET KASTLER, A.: Cours de physique générale: optique. Masson, 1965.
ENCYCLOPÆDIA UNIVERSALIS, 1996: Microscopie, tome 15.
FRANÇON, M.: La microscopie. Presses universitaires de France, 1988.
KANE, J. ET STERNHEIM, M.: Physique. InterEditions, 1994.
LANGERON, M.: Précis de microscopie. Masson, 1949.
LOCQUIN, M. ET LANGERON, M.: Manuel de microscopie. Masson, 1978.
MC QUARRIE/ROCK: Chimie générale. De Boek, 1992.
MEYBECK, J.: Les colorants. Presses universitaires de France, 1963.
MONCEAUX, R.H.: La vie mystérieuse des champignons sauvages. Stock, 1991.
POLICARD, A.; BESSIS, M. ET LOCQUIN, M.: Traité de microscopie. Masson, 1957.
VANBREUSEGHEM, R. ET LANGERON, M.: Précis de mycologie. Masson, 1952.
VAN DE VORST, A.: Introduction à la Physique, tomes 2 et 3. De Boek, 1991-'92.