

INITIATION À LA MICROSCOPIE

OBJECTIFS :

1. Connaître les différentes composantes du microscope photonique ainsi que leurs fonctions
2. Utiliser correctement un microscope photonique
3. Déterminer le grossissement total obtenu et le diamètre du champ visible lors d'une observation
4. Rendre compte d'observations faites au microscope selon les normes de présentation standard
5. Appliquer ces connaissances et habiletés pour effectuer des observations sur des cellules humaines

INTRODUCTION :

Le microscope est un instrument que l'on utilise pour l'examen d'objets trop petits pour être visibles à l'œil nu. L'œil humain ne peut distinguer des objets d'une taille inférieure à 0,1mm (ou 100 microns). En nous permettant d'observer des objets ayant une taille aussi petite qu'une fraction de 1 micron (ou même beaucoup plus petite encore, avec le microscope électronique), le microscope devient le prolongement de l'œil humain et nous donne accès à tout un univers insoupçonné!

MATÉRIEL :

Microscope photonique
Lame préparée : papier millimétrique
Lames et lamelles

Cure-dent
Compte-gouttes
Bleu de méthylène

MÉTHODE :

Elle sera présentée en 4 parties :

PARTIE A : DESCRIPTION DES COMPOSANTES DU MICROSCOPE

PARTIE B : MISE EN PLACE DE LA LAME ET MISE AU POINT

PARTIE C : DÉTERMINATION DU GROSSISSEMENT TOTAL ET DÉTERMINATION DU
DIAMÈTRE DU CHAMP MICROSCOPIQUE

PARTIE D : OBSERVATION DE CELLULES HUMAINES

PARTIE A : DESCRIPTION DES COMPOSANTES DU MICROSCOPE

Pour toute la session, vous utiliserez le même microscope.

Mon microscope porte le numéro : _____.

Pour cette première partie, vous devez identifier sur votre microscope les parties décrites ci-dessous. Référez-vous à la figure 1 (les numéros correspondent aux numéros de la légende du schéma). Faites une lecture attentive des fonctions remplies par chacune de ces parties.

Parties mécaniques :

1. Base supporte tout l'appareil.
2. Potence bras recourbé par lequel on saisit l'appareil pour le transporter ; supporte le tube optique et la platine.
3. Platine plateau sur lequel on dépose la préparation à observer ; elle est percée en son centre pour laisser passer la lumière.
4. Valets dispositif servant à retenir la lame en place.
5. Chariot pièce métallique située sur la platine ; sert à déplacer la préparation (contrôlé par les vis de déplacement du chariot).
6. Vis de déplacement du chariot permettent de déplacer le chariot (et donc la lame) ; l'une permet les déplacements avant-arrière (haut-bas pour l'image) et l'autre les déplacements LATÉRAUX (gauche-droite).
7. Tube optique porte à ses deux extrémités les deux composantes du système optique : l'oculaire et les objectifs.
8. Revolver pièce circulaire rotative reliée au tube optique et qui porte les objectifs ; permet de placer dans l'axe optique du microscope l'objectif approprié.
9. Vis macrométrique commande le déplacement en hauteur rapide et visible de la platine ; permet une première mise au point de l'objet à observer ; ne doit être utilisée qu'avec l'objectif à faible grossissement.
10. Vis micrométrique commande un déplacement en hauteur de la platine de très faible amplitude (mouvement produit peu visible) ; sert à faire la mise au point fine.
11. Vis du condensateur permet d'ajuster la hauteur du condensateur, et donc d'ajuster pour obtenir l'éclairage optimal ; attention, il s'agit d'une grosse vis, pas d'une petite (ne touchez pas aux petites vis : le condensateur pourrait tomber)!

Parties optiques :

12. Source lumineuse (lampe) fixée sur la base, sous le condensateur ; vous pouvez régler son intensité (attention de ne pas envoyer TROP de lumière : c'est plus fatiguant pour les yeux et on perd des détails!).
13. Condensateur système de lentilles situé sous la platine ; concentre les rayons lumineux pour augmenter la clarté de l'image. Sa hauteur est réglable par une vis.
14. Diaphragme intégré dans le condensateur ; contrôle la quantité de lumière qui traverse l'objet ; contrôlé par un petit levier qui se déplace latéralement (pas une petite vis : un levier!).
15. Objectif fixés sur le revolver, ils sont au nombre de quatre ; chacun est un système de lentilles pointé vers l'objet à observer ; produisent des images agrandies de l'objet (4X, 10X, 40X, 100X).
16. Oculaire système de lentilles pointé vers l'œil de l'observateur ; il agrandit une nouvelle fois l'image déjà agrandie par l'objectif et la transmet à l'œil.

Note : #4, 5 et 14 peu visibles sur cette photo

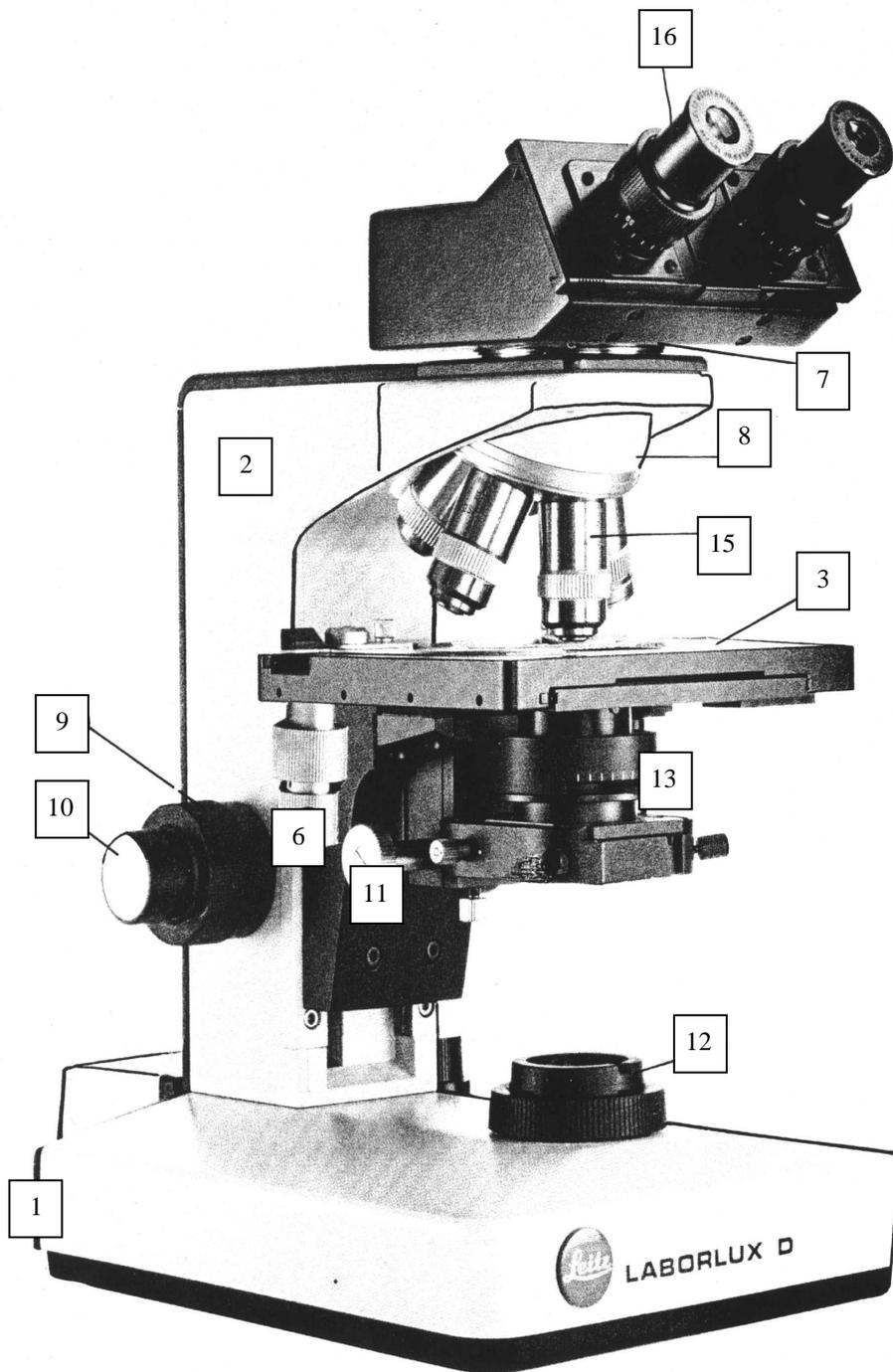


Fig. 1 Le microscope optique

PARTIE B : MISE EN PLACE DE LA LAME ET MISE AU POINT

Pour effectuer des observations au microscope, il est ESSENTIEL de procéder SYSTÉMATIQUEMENT et de ne négliger aucune étape, et ce À CHAQUE FOIS que vous observez une nouvelle lame. La procédure pourra vous sembler longue et complexe au début, mais la pratique répétée de ces étapes vous permettra d'obtenir de bons résultats plus rapidement. Les « raccourcis » que vous pensez prendre feront en sorte que vous serez incapables d'obtenir une image nette, ou même une image visible!

Les étapes à suivre sont les suivantes :

1) Vérifications préliminaires :

- 1.1-Assurez-vous que l'objectif, l'oculaire et la lame sont bien PROPRES.
- 1.2-Assurez-vous que L'OBJECTIF LE PLUS FAIBLE (4X) est bien dans le prolongement du tube optique.
- 1.3-Assurez-vous que la source lumineuse est ALLUMÉE (et à une intensité modérée)

2) Installation de la préparation :

- 2.1-À l'aide de la vis macrométrique, ABAISSEZ la platine au niveau le plus bas possible, afin de faciliter la mise en place de la préparation.
- 2.2-POSEZ la préparation sur la platine, la face portant la lamelle sur le dessus et fixez-la en place à l'aide des valets.
- 2.3-À l'aide des vis de déplacement du chariot, CENTREZ la préparation sur l'orifice de la platine.

3) Mise au point et ajustements :

- 3.1-Mettez l'œil à l'oculaire et effectuez une première mise au point à l'aide de la VIS MACROMÉTRIQUE ; tournez la vis à une vitesse modérée pour ne pas « passer tout droit »
- 3.2-Effectuez ensuite une mise au point plus fine avec la VIS MICROMÉTRIQUE ; encore une fois, n'allez pas trop vite!
- 3.3-La qualité des CONTRASTES de l'image peut être améliorée en modifiant l'intensité lumineuse à la source, la hauteur du condensateur (sur certains microscopes) ainsi que l'ouverture de son diaphragme.

4) Passage à un plus fort grossissement :

***Notes importantes : *l'utilisation de l'objectif 100X (produisant un grossissement total de 1000X) requiert des précautions particulières pour éviter de briser l'objectif (et la lame). Dans le cadre de ce cours, nous n'utiliserons PAS L'OBJECTIF 100X. PRENEZ BIEN SOIN DE REGARDER CE QUE VOUS FAITES lorsque vous changez d'objectif, afin de ne pas changer par erreur pour l'objectif 100X.

*le passage à un objectif plus puissant doit se faire UNIQUEMENT une fois que l'image est NETTE à plus faible grossissement. DONC, AVANT de changer d'objectif pour un plus puissant, l'image obtenue doit être d'excellente qualité.

Voici maintenant les étapes à suivre lors d'un changement d'objectif (pour passer à un plus fort grossissement) :

- 4.1-À l'aide des vis de déplacement du chariot, **CENTREZ** la partie de l'image que vous voulez agrandir. En effet, tout le contour de l'image disparaîtra du champ lors du passage à un plus fort grossissement.
- 4.2-Tournez le revolver pour bien **ALIGNER L'OBJECTIF** suivant dans l'axe du tube optique (**ATTENTION : PAS VERS L'OBJECTIF 100X!**).
- 4.3-Effectuez la mise au point avec la **VIS MICROMÉTRIQUE SEULEMENT** ; allez-y d'autant plus **LENTEMENT** que le grossissement est fort (il est très facile de « passer tout droit » sur l'image nette, à fort grossissement).
- 4.4-Ajustez la hauteur du condensateur et l'intensité de la source lumineuse si nécessaire. Il faut souvent augmenter légèrement l'intensité lorsqu'on augmente le grossissement.

PARTIE C : DÉTERMINATION DU GROSSISSEMENT TOTAL

ET DÉTERMINATION DU DIAMÈTRE DU CHAMP MICROSCOPIQUE

1) Détermination du grossissement total :

Dans un microscope photonique, les rayons lumineux passent à travers un objet (dont la minceur le rend transparent. L'image de cet objet passe ensuite à travers **deux systèmes de lentilles grossissantes**, soit **l'objectif et l'oculaire**. L'image est donc agrandie deux fois.

Pour connaître le **grossissement total**, il s'agit de multiplier la puissance de l'oculaire (qui est toujours de 10) par la puissance de l'objectif (4, 10 ou 40). Donc, lorsque vous utilisez l'objectif 4X, le grossissement total est de 40X. Cela signifie que vous voyez l'objet 40 fois plus gros qu'il est en réalité.

QUESTION #1 : Complétez les trois (3) premières colonnes du tableau 1 (p. 19) à l'aide des informations fournies précédemment.

2) Détermination de la taille du champ :

Maintenant, vous allez mettre en pratique les consignes concernant la mise au point du microscope afin de déterminer le diamètre du champ microscopique obtenu à chacun des grossissements.

On appelle le **champ microscopique** la surface (de forme circulaire) qu'on aperçoit en regardant dans le microscope. **RAPPEL : le diamètre** d'un cercle est une ligne qui va d'un côté à l'autre du cercle en passant par le centre. Pour **mesurer le diamètre du champ du microscope** à chacun des grossissements, nous utiliserons un petit morceau de papier millimétrique monté sur une lame.

Étapes à suivre (en commençant avec l'objectif 40X, donc au plus faible grossissement) :

a) Faites les ajustements et la mise au point décrits dans la partie B (p. 12) afin d'apercevoir une image parfaitement claire du papier millimétrique à un grossissement total de 40X.

b) Ajustez la position du papier de façon à ce qu'une ligne verticale soit placée à l'extrême gauche du champ (comme si vous placiez le «zéro» de votre règle à l'extrême gauche d'une ligne pour la mesurer!). (Voir Fig. 2)

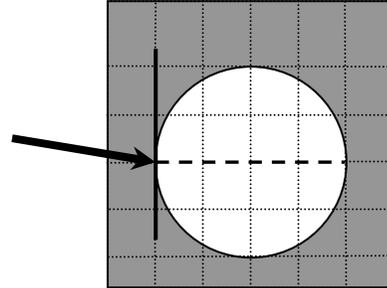


Figure 2 – Façon de positionner le papier quadrillé pour permettre de mesurer le diamètre du champ microscopique.

(Le champ = le cercle éclairé ; le quadrillé = l'objet observé ; la zone grise est invisible au microscope car à l'extérieur du champ).

Question-clé...

Combien mesure le côté d'un carré que vous observez au microscope?!!!
(Indice : vous regardez du papier millimétrique!)



DESSIN 1 : En suivant les règles de présentation des dessins en biologie (réf. p. 5), illustrez les carrés du papier millimétrique visibles dans le champ microscopique **à l'échelle** (c'est-à-dire en illustrant correctement **les proportions** des carrés par rapport au champ). Ne dessinez pas les détails du papier, mais localisez correctement le tracé des carrés : le nombre de carrés est très important! Faites votre dessin en haut de la p. 15.

QUESTION #2 :

À un G_{total} de 40X, quel est le diamètre du champ, en mm? _____

Et puisqu'il y a 1000 μm dans 1 mm, on peut donc dire que cette mesure équivaut à _____ μm .

c) **Passez maintenant à l'objectif 10X ; (voir pages 12-13 pour les étapes à suivre).**

DESSIN 2 : Suivez les mêmes consignes que pour le 1^{er} dessin ; utilisez le bas de la p. 15.

QUESTION #3 :

Puis, évaluez le diamètre du champ à ce grossissement (G_{total} 100X) :

RÉP. : diamètre = _____ mm = _____ μm

Faites ensuite de même pour l'objectif 40X (donc à G_{total} 400X). Cette fois-ci, ne faites **pas de dessin, mais estimez tout de même** le diamètre du champ :

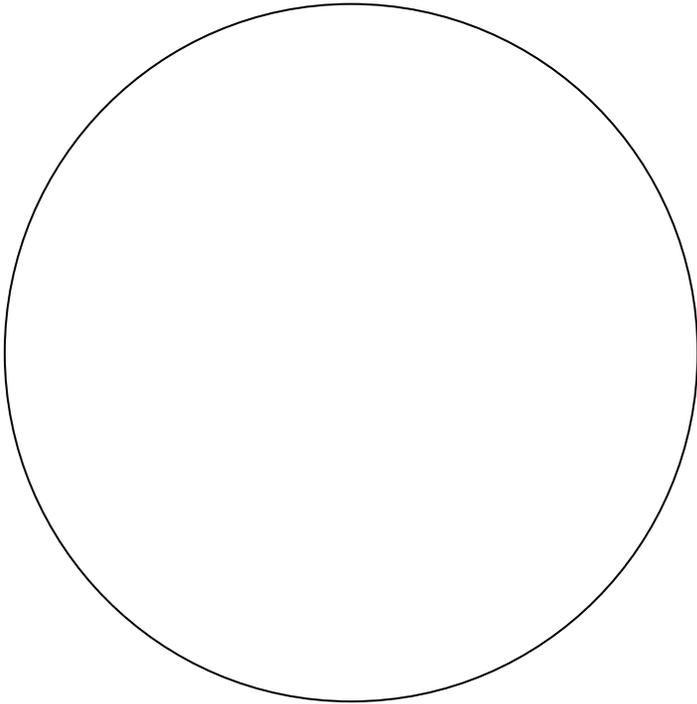
RÉP. : diamètre = _____ mm = _____ μm

À la page 19, complétez maintenant le tableau 1. Référez-vous aux questions #1 à 3 (pages 13-14)..

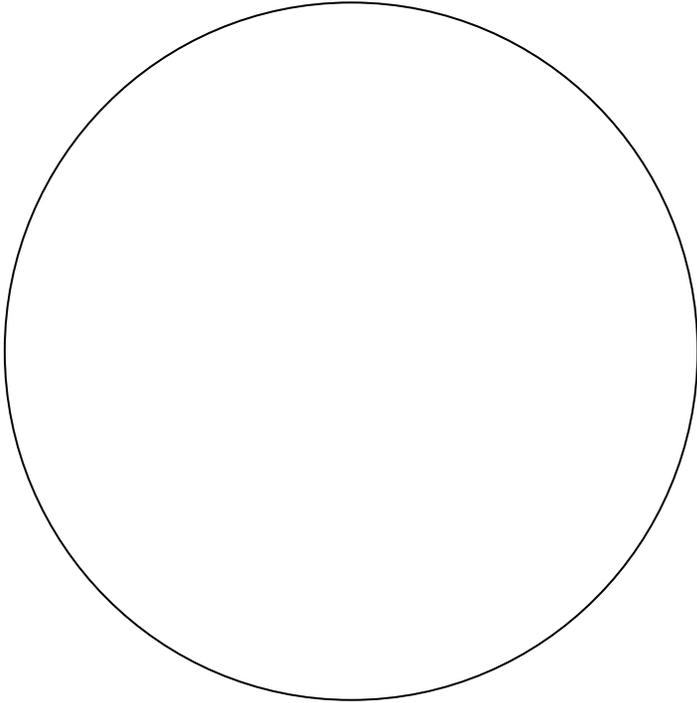
*** RAPPEL IMPORTANT :** nous n'utilisons **PAS** l'objectif 100X!!!*

Fig. 1

a) (Dessin 1)



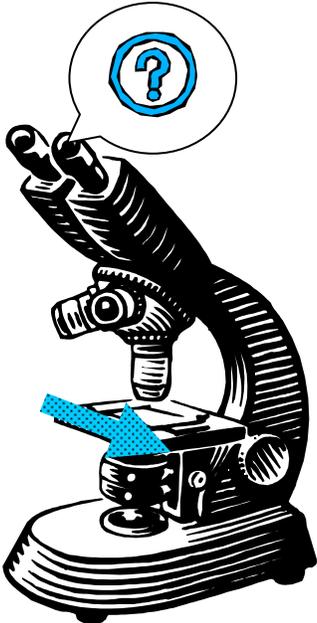
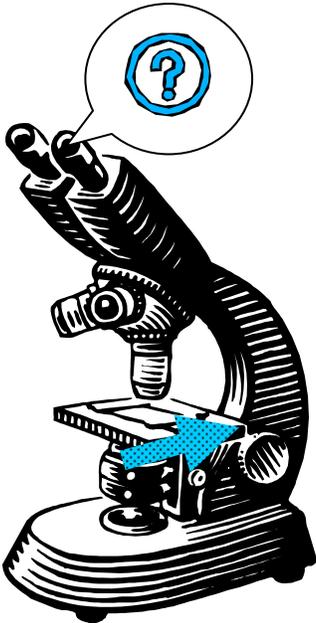
b) (Dessin 2)



3) Dernières petites observations avec le papier millimétrique :

Revenez à l'objectif 4X. Refaites la mise au point. Faites les deux observations décrites ci-dessous.

Sur certains microscopes, le mouvement de l'IMAGE observée dans l'oculaire est inversé par rapport au mouvement de la LAME.

<p>Par exemple, vous voyez l'image se déplacer de gauche à droite dans l'oculaire alors que la lame (sur la platine) se déplace en fait de droite à gauche.</p>	<p>Sur certains microscopes, ce phénomène se produit (aussi ou seulement) avec le mouvement avant-arrière de l'image.</p>
	
<p><u>QUESTION #4a :</u> Qu'en est-il avec votre microscope? Y a-t-il inversion gauche-droite du mouvement de l'image par rapport à celui de la lame? (oui ou non) _____</p>	<p><u>QUESTION #4b :</u> Qu'en est-il avec votre microscope? Y a-t-il inversion avant-arrière du mouvement de l'image par rapport à celui de la lame? (oui ou non) _____</p>

PARTIE D : OBSERVATION DE CELLULES HUMAINES

Pour cette partie, vous devrez monter vous-même une **préparation** microscopique, que vous observerez ensuite.

Pour la **mise au point**, retournez consulter la section B (pages 12-13), décrivant la PROCÉDURE DE MISE AU POINT du microscope.

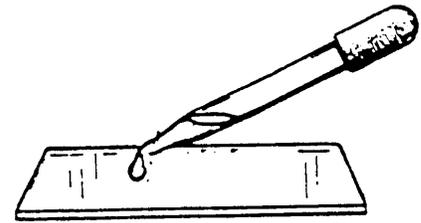
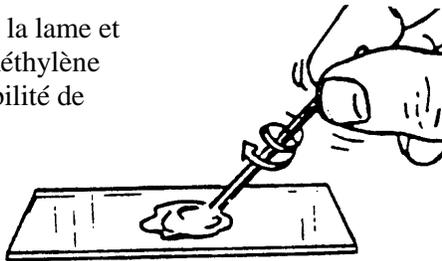
Ce sera à vous de **choisir** le grossissement le plus approprié : il s'agit ici de voir une cellule en entier, avec le plus de détails possible (donc choisir le plus fort grossissement possible, MAIS PAS PLUS de 400X!).

Montage d'une préparation microscopique – cellules d'épiderme buccal humain:

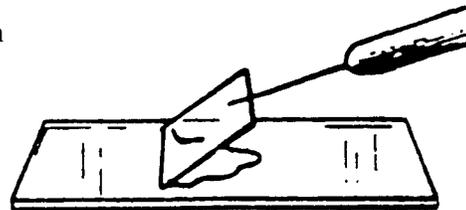
1. Faites un prélèvement de cellules à l'aide d'un cure-dent (allez-y un peu énergiquement!).



2. Déposez votre prélèvement sur la lame et ajoutez une goutte de bleu de méthylène (ce colorant augmentera la visibilité de certaines structures cellulaires).



3. Recouvrez le tout d'une lamelle ; pour limiter la formation de bulles d'air, tenir la lamelle appuyée sur la lame avec un angle de 45 degrés, puis la laisser tomber sur la lame.



DESSIN 3 : Relisez les règles de présentation des dessins en biologie (p. 5), puis **illustrez** l'une des cellules que vous observez. **Choisissez-en** une qui est un peu isolée des autres (et donc plus visible) et dont l'aspect est représentatif (et non une cellule qui a l'air particulièrement bizarre comparativement aux autres).

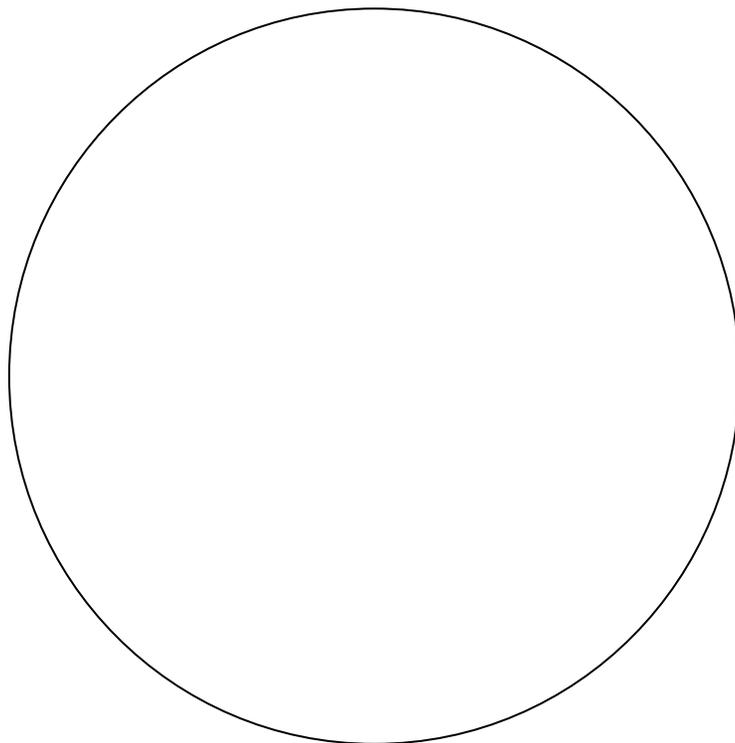
N'oubliez pas que vous devez respecter les proportions :

- de la cellule par rapport au champ du microscope (diamètre de la cellule par rapport à celui du champ en entier)
- des différentes parties de la cellule (ex. : diamètre du noyau par rapport au diamètre de la cellule entière)

Faites votre dessin à la p. 18.

Fig. 2

(Dessin 3)



Rappel : Avez-vous bien respecté les consignes de présentation énoncées à la page 5?

INITIATION À LA MICROSCOPIE

Mon groupe : _____

Mon nom : _____ Microscope # _____

Complétez le tableau suivant, en vous référant aux questions #1 à 3 (pages 13-14).

Tableau 1 : Grossissements et diamètre du champ microscopique avec différents objectifs

Grossissements			Diamètre du champ microscopique	
de l'oculaire	de l'objectif	TOTAL	(en mm)	(en μm)

QUESTION #4 : Qu'en est-il avec votre microscope :

a) Y a-t-il inversion gauche-droite du mouvement de l'image par rapport à celui de la lame (oui ou non)? _____

b) Y a-t-il inversion avant-arrière du mouvement de l'image par rapport à celui de la lame (oui ou non)? _____

QUESTION #5 : Vous observez un même objet à deux grossissements (40X et 100X). Lequel de ces grossissements vous permettra d'apercevoir une plus grande portion de l'objet? _____

QUESTION #6 : Sachant que le diamètre moyen d'un globule rouge humain est de 7,5 μm , combien de tels globules rouges pourrait-on placer sur une ligne imaginaire qui traverserait le champ microscopique avec l'objectif 4X? _____

QUESTION #7 : À partir du Tableau 1 ci-haut et de votre dessin de cellule buccale, évaluez le diamètre de la cellule buccale que vous avez dessinée. _____

(N'oubliez pas préciser les unités!)

Assurez-vous d'avoir répondu correctement à toutes les questions ci-haut et d'avoir vérifié que vos trois (3) dessins respectent les règles de présentation (réf. pages 5 et 6) ; exceptionnellement, pour les deux premiers dessins (page 15), il n'y a pas de parties à identifier.

Si vous avez des difficultés avec les questions #6 et 7, revoyez l'exercice préparatoire (pages 7 et 8), dont un corrigé partiel est disponible sur le web. Au besoin, faites ensuite appel à votre professeur... avant le moment de la remise du laboratoire!