

Microscopie et photographie Histoire d'une évolution personnelle

par Marcel Lecomte

Préambule :

Il faut savoir que ce texte est rédigé avec l'esprit d'un amateur (au sens noble du terme), et destiné à d'autres passionnés, qui ne disposent pas nécessairement d'un budget élevé à consacrer à l'exercice d'une passion gratuite au niveau des résultats ; un professionnel qui dispose de crédits divers, et ne débourse rien de ses deniers personnels, ne tiendra évidemment pas le même raisonnement que le nôtre, et aura accès à d'autres moyens ou technologies.

Il reste que des spécialistes, comme des amis représentants des firmes Nacet et Zeiss par exemple, sont réellement émerveillés en considérant les résultats obtenus par des « amateurs » grâce à un esprit inventif et ingénieux, qui a pu contourner et résoudre nombre de problèmes, souvent sans bourse délier.

Historique :

Il y a près de quinze années, nos timides essais de photographie en microscopie nous ont laissé un grand sentiment de frustration, car il fallait faire face à des difficultés ou inconvénients majeurs :

- Nécessité de posséder un microscope avec une tête trinoculaire
- Grands problèmes d'exposition et d'éclairage avec un boîtier reflex argentique (utilisation d'une pellicule photos ou diapositives)
- Délai d'attente important entre la prise de vue et le contrôle du résultat
- Prix de revient élevé des photos (souvent un film entier pour obtenir une bonne image ... sans certitude)
- Impossibilité souvent de pouvoir recommencer les photos en cas d'échec
- Manque cruel de documentation sur ce sujet



Un Coolpix 995 avec son oculaire photo fileté et un adaptateur posé sur un tube trino d'un Euromex (photo Marcel Lecomte)

Il y a six ou sept ans, nous avons considérablement progressé dans le monde de l'imagerie microscopique grâce à l'utilisation d'un appareil photo numérique (APN) en l'occurrence un Coolpix Nikon 995.

Cet APN et ses cousins de la série Coolpix (990 et 4500) ont balayé nombre de difficultés et ont permis aux amateurs de réaliser des progrès impressionnants, notamment grâce à la présence d'un filet interne sur l'objectif, qui a permis de fixer un oculaire photo et de stabiliser l'ensemble sur le tube trinoculaire.. L'ingéniosité et le bricolage ont joué un rôle essentiel dans la conception d'adaptateurs divers. La microphotographie venait de réaliser un progrès spectaculaire :

- Possibilité de réaliser des photos gratuites sans limite de nombre
- Résultats instantanés et directement contrôlables
- Obtention d'images, faciles à améliorer ou à corriger grâce à des logiciels de retouche de photos numériques (ils sont nombreux sur le marché)
- Possibilité d'échanger facilement des photos par l'intermédiaire du courrier électronique
- Grande facilité de stockage (même si on ne connaît pas la durée de vie exacte des supports utilisés)

MAIS un problème majeur s'est très vite présenté : apparition rapide de grosses difficultés de mise au point de l'image (netteté) sur un écran de contrôle de petite taille (à peine 3 x 4 cm).

Nous l'avons résolu assez facilement grâce à l'utilisation du canal vidéo du C995 qui a permis de connecter l'appareil en direct sur un écran de télévision, et de voir ainsi une image en grand format, qui permettait d'abord une mise au point facile et impeccable, mais aussi rendait l'observation plus conviviale, car plusieurs observateurs pouvaient se regrouper autour de l'écran de télévision. Puis la question s'est posée de pouvoir visionner en direct l'image sur l'écran d'un ordinateur. La solution est passée pour nous par un relais vidéo externe.

Tout cela n'avait pas résolu le problème de capture d'images : il fallait saisir les images sur l'APN, puis charger le contenu de la carte sur l'ordinateur grâce à un câble ou un lecteur de cartes Compact Flash : beaucoup de manipulations et de pertes de temps. De timides essais avaient lieu en parallèle dans la conception de logiciels permettant de gérer l'APN au départ de l'ordinateur, mais on était loin d'une solution facile et universelle.

Une petite merveille de technologie, qui permet la réalisation de photos excellentes, sans quasi aucune manipulation (photo Marcel Lecomte)

Il y a trois ans, sur les conseils et en suivant l'exemple d'un ami spécialiste des Russules, nous avons eu l'occasion de détourner de leur finalité des caméras de surveillance (avec capteur CCD) et d'obtenir des résultats spectaculaires, par le biais d'un relais vidéo, muni d'un logiciel de capture, et se connectant directement sur un port USB d'ordinateur.

Puis les choses se sont emballées, et nous avons très vite découvert des caméras spécialement conçues pour la microscopie, mais il faut l'avouer, avec des fortunes diverses. Tous ces essais et erreurs nous ont coûté beaucoup d'argent. Nous vous ferons grâce de tous les déboires et déceptions. Ils ne présentent qu'un seul intérêt à nos yeux : éviter à d'autres personnes les mêmes dépenses inutiles en ciblant directement un ou deux maîtres-achats.

Nous sommes passés par la Deltapix Infinity, (une merveille : 21.000.000 de pixels mais un prix très élevé et quasi inaccessible pour des amateurs), la HDCE30 (modèle chinois à 3.000.000 de pixels et près de 1.000 €), et d'autres marques dont je ne citerai pas le nom, afin de ne pas être accusé de contre publicité. Cela représente une dizaine d'exemplaires divers.

Finalement, une caméra chinoise, largement commercialisée maintenant sous le code MDCE5a, nous a permis d'obtenir des résultats excellents, combinés à une très grande facilité d'utilisation ! Avec en prime, un prix défiant toute concurrence, puisqu'il se situe actuellement aux alentours de 325,00 €.

L'utilisation simultanée d'un microscope, d'une caméra, d'un ordinateur et d'un projecteur vidéo nous permet maintenant de réaliser des manipulations et des observations à l'intention d'une salle entière, sans limite du nombre de participants.

Nous avons même poussé le luxe très loin ! Un second ensemble ordinateur-projecteur vidéo alimenté par une webcam de bonne définition, montée sur un pied flexible, permet au spectateur de voir en direct les mains de l'opérateur lors des travaux préparatoires (coupes, colorations, montage) qui précèdent l'observation microscopique.



Une petite merveille de technologie : la Caméra VIDEO MDCE 5A (1,5 millions de pixels) spécialement conçue pour l'imagerie en microscopie optique

Voici les critères techniques annoncés par le constructeur :

Image Sensor	1/2" CMOS
Digital Output	24-bit (color)
Image Format (YUY2)	640×480 ; 800×600 ; 1024×760 ; 1280×1024

Data Format	YUY2, I420
Image Output	USB2.0 Plug and Unplug Freely.
Connecting Mode	Insert it into Eyepiece Tube of Microscope Directly (23.2mm or 30mm)
Image Velocity	30 PfS VGA(I420) - 15 PfS VGA(YUY2)
Lowest Illumination	2.5 lux
SNR	>48dB
Camera Image Control	Saturation, Contrast, Sharpness and so on
Working Current, Exposure	Auto, Manual
Working Current	<200mA

Caractéristiques :

- Images de 1,3 millions de pixels
- Très grande facilité d'installation et d'emploi
- Réglages et balance automatiques, quelle que soit l'intensité lumineuse
- Connexion sur un port USB2
- Caméra de diamètre standard 23 mm, ce qui permet de la poser sur un tube oculaire si on ne dispose pas d'un tube trinoculaire
- Livrée avec un adaptateur d'oculaire 30 mm, ce qui permet de l'utiliser avec une loupe stéréoscopique de modèle standard
- Encombrement minime

La prise en main est extrêmement rapide si on l'utilise en mode automatique (installé par défaut). Nous avons rédigé un mode d'emploi en français, basé sur notre expérience et notre pratique.

- Installer la caméra sur le tube photo de la tête trinoculaire du microscope ou sur un des oculaires si vous ne possédez pas de tête trinoculaire (elle est adaptable directement sur un tube standard de 23 mm)
- Raccorder la caméra sur le port USB prioritaire {en effet, sur les PC portables comptant nombre de ports USB, il est fréquent d'en trouver un qui accepte certains périphériques (imprimante, boîtier TV, caméras), alors que les autres peuvent provoquer des mauvais fonctionnements} → INDICE : si la fenêtre de capture du programme ne s'ouvre que sur la ½ de l'écran et est pixélisée, changer de port



- ATTENTION ! Si vous utilisez un microscope binoculaire et que vous remplacez un oculaire par la caméra, il est impératif de poser un masque (un capuchon opaque) sur l'autre oculaire, sous peine d'obtenir des variations d'éclairage importantes, si vous vous trouvez sous une source de lumière (C. Mertens).

Caméra Deltapix adaptée sur un tube photo avec zoom optique, de 0,4 à 2x ; ce dispositif permet de conserver la profondeur de champ de l'objectif, en doublant le grossissement de l'objectif initial (photo Marcel Lecomte)

Avantages :

- Possibilité de visionner l'image en continu et en plein écran dès que l'accès est donné à la caméra au départ du microscope (tirette latérale)
- L'image est en direct et en temps réel à l'écran : on peut parcourir toute la préparation à l'aide des molettes de déplacement de la platine du microscope
- Possibilité de saisir une image en un clic de souris, à n'importe quel moment et de l'enregistrer directement
- Possibilité d'effectuer une rotation d'image
- Possibilité de saisir seulement une partie de l'image et

- d'en éliminer tout de suite des parties inutiles
- Possibilité d'insérer du texte dans l'image
- Possibilité d'effectuer des mesures

A notre connaissance actuelle, il n'est pas possible d'utiliser une autre barre de mesures qu'en pixels, sur la caméra MDCE5A. Il s'avère donc nécessaire de calculer les coefficients de conversion de la mesure en pixels à une mesure en microns. Pour ce faire :

Adaptateur trino avec repère de hauteur constante : IMPERATIF pour réaliser des mesures, sous peine de fausser toutes les informations (photo Marcel Lecomte)

- Il faut disposer d'une lame micrométrique graduée en 1/100èmes de mm (une graduation vaut donc 10 μm)
- **Il faut que le tube d'accueil amovible de la caméra soit toujours disposé à la même hauteur** (marquer un repère indélébile et précis à la jonction avec le support fixe) sous peine de fausser les mesures
 - Avec chaque objectif, réaliser une photo de la lame micrométrique
 - Effectuer une mesure en pixels sur chaque photo de 10 graduations (= 100 μm)
 - Calculer le coefficient de conversion (CC) ; voici un exemple de calcul réalisé sur les 5 objectifs d'un BK5000 : **(ce coefficient évidemment sera différent sur chaque microscope, puisqu'il varie selon la longueur du tube)**



objectif	Longueur mesurée	pixels	calcul	coefficient
10x (x 10)	100 μm	189		
	→ 1 μm		189 / 100	/1,89
	→ 1 pixel		100/189	x0,529
20x (x5)	100 μm	377		
	→ 1 μm		377/100	/3,77
	→ 1 pixel		100/377	x0,265
40x (x2,5)	100 μm	759		
	→ 1 μm		759 / 100	/7,59
	→ 1 pixel		100/759	x0,132
63x (1,587)	100 μm	1080		
Coef. Corr. = 1,1	→ 1 μm		1080/100x1,1 (*)	/11,9
	→ 1 pixel		100/1080/1,1	x0,0841
100x (1)	50 μm x 2	857 x 2	1714	
Coef. Corr. = 1,1	→ 1 μm		1714/100x1,1 (*)	/18,85
	→ 1 pixel		100/1714/1,1	x0,053

(*) il faut savoir que j'ai remplacé, sur mon BK5000, les objectifs 40x et 100x originaux par des planapochromatiques 63x et 100x de marque Nachet, qui nécessitent ce coefficient de correction après vérification de correspondance de l'échelle micrométrique avec une lame étalon.

Exemple : longueur de spore mesurée à 269 pixels avec l'objectif x100
 → 269 x 0,053 = 14,257 μm OU → 269 / 18,95 = 14,271 μm

ATTENTION ! Les coefficients indiqués ci-dessus dans la colonne 5 sont exemplatifs ; il est nécessaire de les calculer vous-même pour votre microscope personnel !

Il s'avère assez facile de composer sous Excel un tableau de conversion automatique sur base de 10 ou 20 mesures par exemple, et qui calculerait en même temps le Q de la spore.

Il faut également savoir qu'il existe actuellement de remarquables logiciels de mesure, en accès libre sur le Net, et très faciles d'emploi. Je citerai, par ordre alphabétique, avec le nom de l'auteur :

- Axio Vision (Zeiss)
- Micro Cartouche (Christian Aubert)
- Mycomètre (Georges Fannechère)
- Piximètre (Alain Henriot)

Commentaires anticipés à propos d'images qui ne paraissent pas satisfaisantes

- préparation trop épaisse
- préparation mal colorée et saturée, ou empâtée
- préparation non lavée et donc pas assez contrastée
 - Impossible dans de telles conditions d'obtenir de bonnes photos
- effectuer un réglage correct des diaphragmes de champ et d'ouverture (TRES IMPORTANT et à réaliser quasi à chaque observation et changement d'objectif)
- bien régler la hauteur du condenseur (plus le grossissement augmente, plus la lentille du condenseur doit être proche de la préparation)
- utiliser un autre milieu d'observation que l'eau pour améliorer l'indice de réfraction (acide lactique, hydrate de chloral, lactophénol, chloral lactophénol) surtout à l'immersion

Quels que soient la qualité et le prix de votre matériel, la réussite et la qualité de vos photos passent OBLIGATOIREMENT par une préparation la plus soignée et la plus fine possibles. Cela demande rigueur, application, soin et méthode.

Le meilleur des microscopes accompagné d'une préparation de mauvaise qualité donnera des résultats nuls ou très peu satisfaisants.

- pour quelqu'un qui est exigeant sur la qualité des images (netteté et contraste), il faut savoir que même si vous disposez d'un bon objectif 100x (plan achromatique, $n = 1,25$), il est très loin d'être le meilleur.
- Pour que votre microscope réponde à de grandes exigences, il faut lui apporter un objectif 63x à immersion avec $n = 0,95$ à $1,15$ minimum, et un 100x à immersion avec $n = 1,30$ à $1,40$, les deux en plan apochromatique ; MAIS il faut savoir que pour ces 2 objectifs, en occasion, cela coûte cher (de 500 à 600 € pour un 63x et de 600 à 1.200 € pour un 100x)

Nous savons tous que le problème majeur en imagerie microscopique est l'absence cruelle de profondeur de champ, surtout à des grossissements élevés.

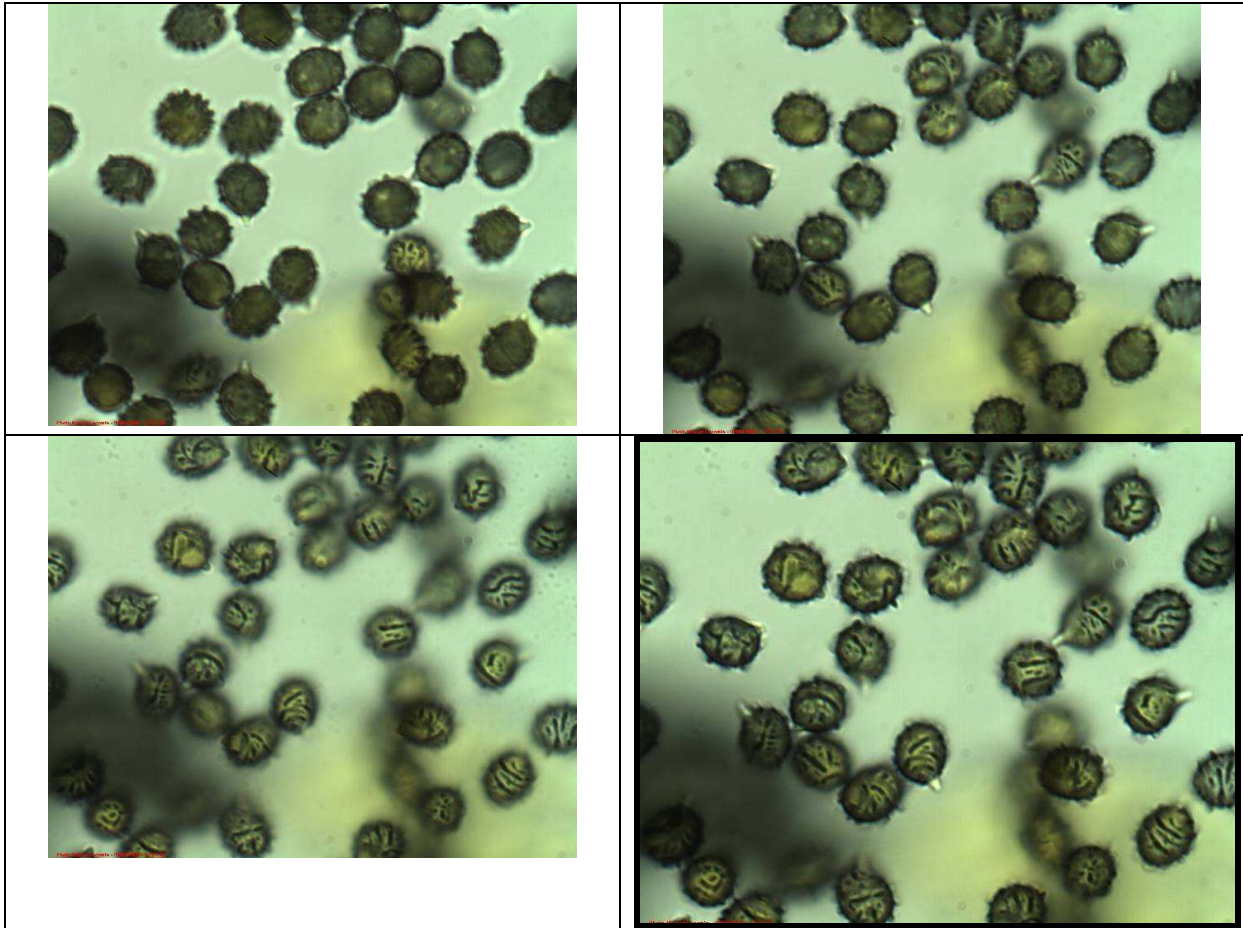
Ce problème est en partie résolu depuis l'apparition de logiciels de superposition d'images ; les 2 plus connus sont Helicon Focus et Combine Z (avec ses déclinaisons).

Leur fonctionnement ne fait pas l'objet de cet article, mais l'utilisation de Combine ZM s'avère beaucoup plus facile avec une caméra qu'avec un APN (sauf s'il est connecté sur un ordi par le canal vidéo ou sur un téléviseur (pour la netteté de l'image, et qu'on utilise une télécommande pour les prises de vue (pour éviter le bouger), car il n'y a aucune vibration transmise et on ne touche pas à l'ensemble « microscope – caméra » (sauf pour faire varier la mise au point avec la vis micrométrique) : toutes les commandes se font au départ de l'ordinateur.

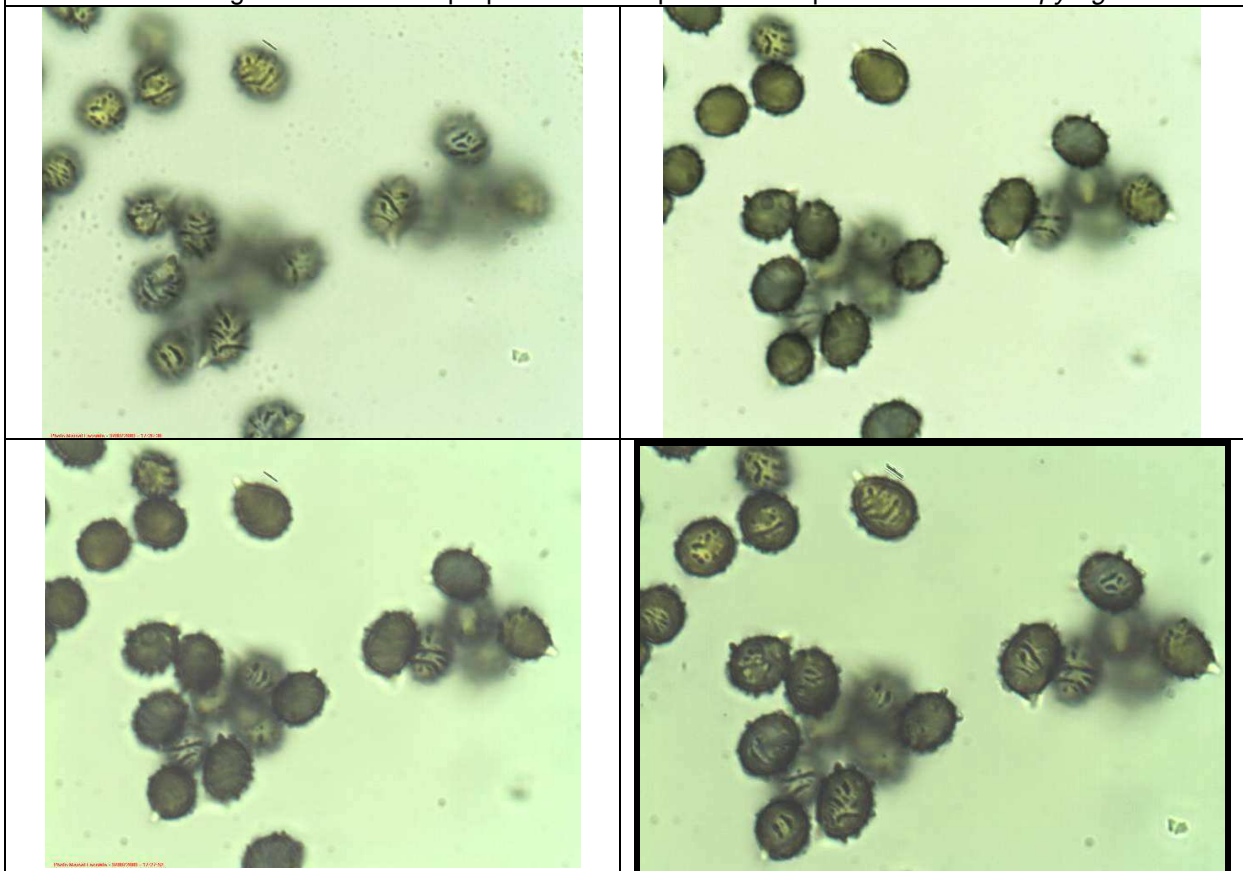
ATTENTION !

Ne pas démonter le filtre qui se trouve sur la caméra, car c'est un filtre RVB (Rouge-Vert-Bleu), aussi appelé en anglais RGB (Red-Green-Blue), car cela modifie considérablement le rendu colorimétrique de la caméra, fournissant ainsi des images qui sont quasi des dégradés de gris légèrement colorés.

A la page suivante, vous trouverez 2 séries de 3 photos représentant des spores de *Lactarius pyrogalus* traitées au réactif de Melzer, ainsi que la photo (encadrée de noir) résultant de la superposition des 3 images à l'aide du logiciel Combine ZM ; Il n'y a eu aucune manipulation avec un logiciel de retouche d'image.



La 4^{ème} image résulte de la superposition des 3 premières : spores de *Lactarius pyrogalus*



La 4^{ème} image résulte de la superposition des 3 premières : spores de *Lactarius pyrogalus*