

De la dangerosité de photographier à travers un oculaire micrométrique ...

par Marcel Lecomte (*)

Etant inscrit sur nombre de forums de mycologie, nous voyons régulièrement défiler des photos de microscopie prises à travers l'oculaire micrométrique, et supposées fournir des renseignements quant à la mesure des éléments photographiés.

Force est de constater que beaucoup de photographies présentent des incohérences susceptibles de troubler complètement l'esprit de débutants, car des renseignements essentiels et indispensables sont manquants (**). En outre, il faut bien admettre que ce réticule n'est pas très esthétique sur une photo.

L'objet de notre intervention est de susciter la réflexion : il ne s'agit en aucun cas de pérorer ou de critiquer le travail d'autrui (nous en avons déjà parlé plus d'une fois avec J.J. Wuilbaut sur différents forums).

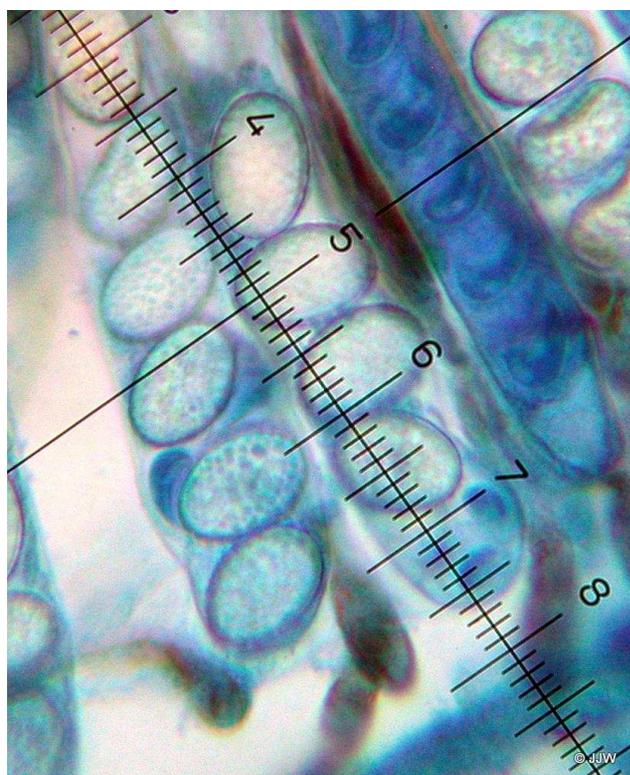


Photo J.J.Wuilbaut, publiée avec l'aimable autorisation de l'auteur.

Les ascospores de ce *Scutellinia* sp. sont annoncées par l'auteur à 20 x 14 μm ... et que voyons-nous sur cette photo ?

Des mesures qui manifestement ne correspondent pas, et qui risquent de perturber tout observateur non averti.

Il faut savoir que l'échelle micrométrique n'est valable que dans une situation très précise : 1 graduation = 1 micron, avec un objectif 100x à immersion, pour une longueur de tube donnée (160 ou 170), avec l'oeil comme élément de lecture. Il faut en outre avoir vérifié avec une lame étalon micrométrique que votre oculaire micromètre est correct, et ne nécessite pas l'application d'un coefficient de correction (CdC).

Si vous utilisez un objectif 10x, il faut appliquer un CdC de 10, pour un 40x, le CdC est de 2,5 ...etc ... le CdC est une proportionnelle de 100 tout simplement, et il doit figurer sur la photo.

Lorsque vous remplacez l'oeil humain par un APN, tout cela peut devenir obsolète !

En effet :

- la distance est modifiée et, de plus, non constante lors de prises à main levée
- l'image traverse une lentille supplémentaire
- vous faites intervenir un zoom
- vous ne connaissez pas la distance entre l'optique de l'APN et le capteur
- le problème sera encore différent si on utilise un reflex avec objectif réglé sur l'infini

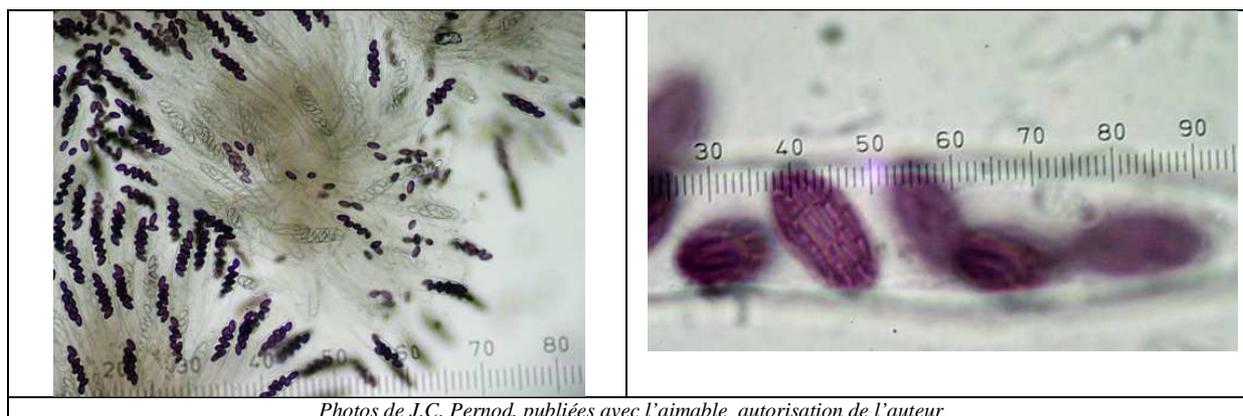
Tous ces paramètres vont rendre (quasi) impossible l'établissement d'un CdC correct permettant une interprétation valable de la photo.

Nous vous laissons tirer vous-même la conclusion !

La photo sera tout aussi belle sans l'échelle, et elle ne générera pas d'erreurs d'interprétation ou de confusions.

(*) Marcel Lecomte, 117, rue Basse Chaussée, 5022 COGNELEE/NAMUR (Belgique) mlecomte@skynet.be

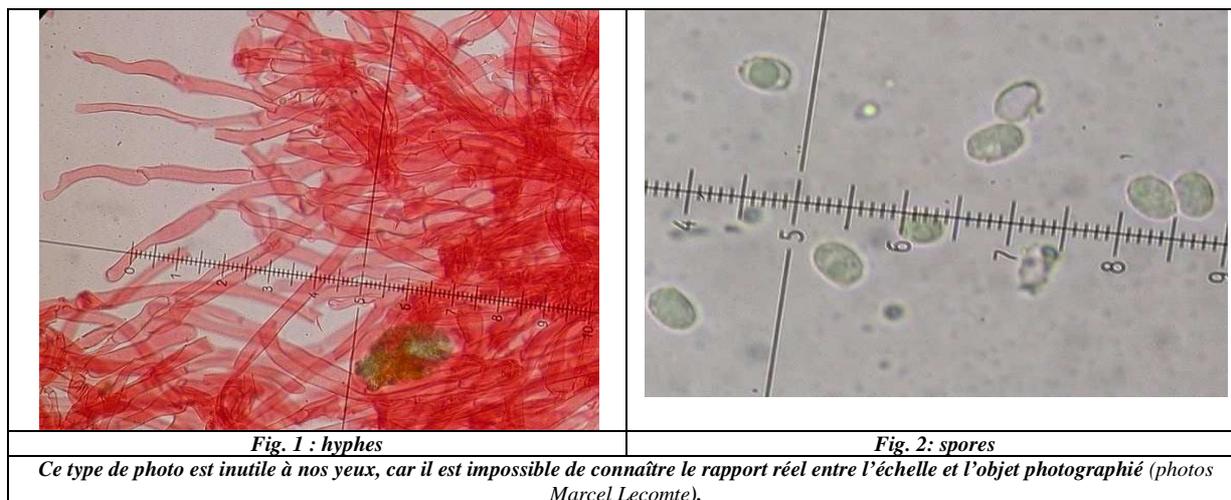
Autre exemple traitant des ascospores d'*Ascobolus furfuraceus*, qui font en moyenne 23-26 x 10-14 μm ...



(*) Pourquoi ?

- Le grossissement utilisé n'est pas indiqué (objectif 10x, 20x, 40x, 63x, 100x) avec un oculaire 10x
- Le coefficient de correction à appliquer n'est pas mentionné (voir son calcul à la page suivante)

Remarque : toutes les photos qui vont suivre ont été réalisées à main levée, avec un Nikon Coolpix 995, au travers d'un oculaire micrométrique (posé sur un tube oculaire ou sur le tube trinoculaire), ce qui explique la mauvaise qualité de certaines d'entre-elles ; nous vous demandons votre indulgence à ce propos.



Deux cas de figure sont à envisager : ce sont ceux qui vont nous intéresser le plus car ce sont, que je sache, les seuls cas où il est possible de photographier le réticule micrométrique en même temps que le sujet.

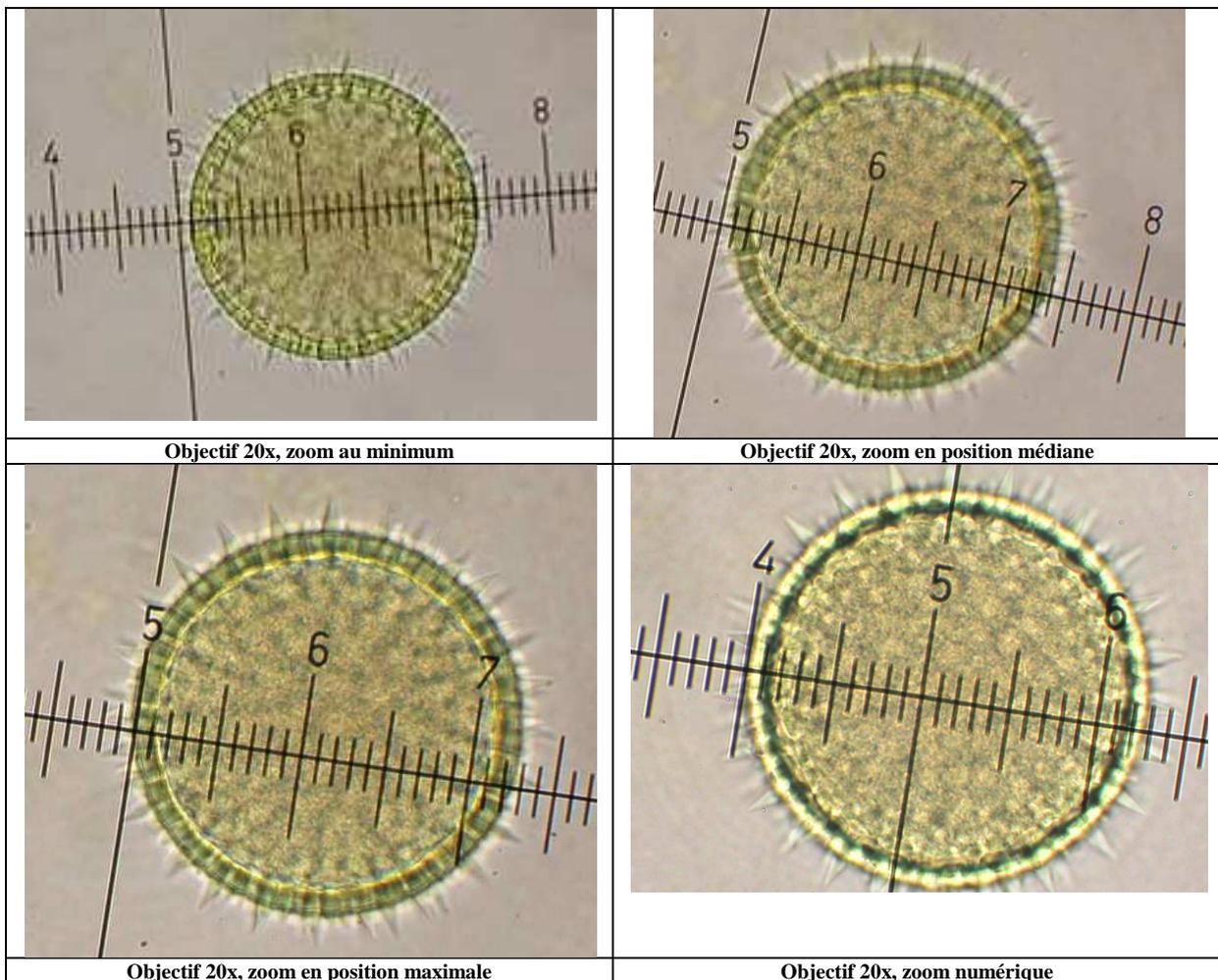
- **Utilisation d'un oculaire micrométrique fileté** (dans le cas d'un Coolpix de la série 990 ou 4500), posé au niveau d'un tube oculaire ou du tube photo (à condition qu'ils possèdent tous deux le même diamètre) : c'est la situation idéale car l'ensemble est fixe et permet aisément toutes les manipulations au niveau de l'appareil photo et du microscope
- Photographie à l'aide d'un **compact numérique (APN) posé contre l'oculaire micrométrique**, soit au niveau d'un tube oculaire ou du tube photo (à condition qu'ils possèdent tous deux le même diamètre)

Autres cas de figure :

- **Photographie à l'aide d'un reflex numérique** fixé sur le tube trinoculaire (l'appareil est utilisé sans objectif, avec un adaptateur spécial qui comprend une lentille à hauteur variable, comme un zoom de téléobjectif)
- **Capture d'image à l'aide d'une caméra numérique**, avec capteur CCD ou CMOS, placée **sur le tube trinoculaire**
- (5) **Capture d'image à l'aide d'une caméra numérique**, avec CMOS placée **sur la tête binoculaire, à la place d'un oculaire**
- ... il existe sans doute encore d'autres possibilités qui ne nous sont pas connues ou que nous ne maîtrisons pas du tout !

Expérimentations personnelles afin de déterminer des constantes.

Matériel utilisé : préparation définitive de grains de pollen de *Althaea rosea* (colorés au vert de méthyle acétique), photographiés avec Coolpix 995, oculaire micrométrique (OM) grand champ de 20 mm. La taille réelle du grain photographié (toujours le même) est de 115 µm.

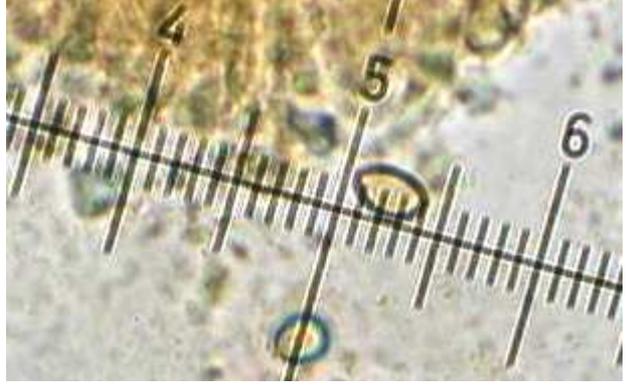
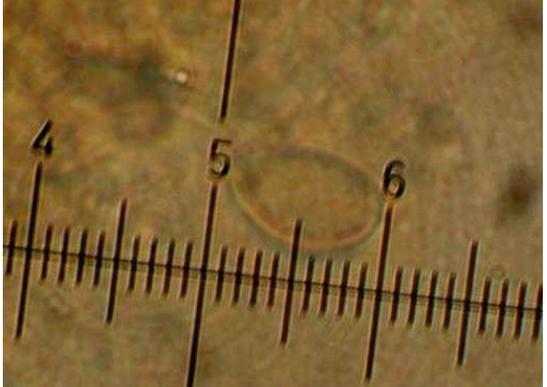


CONCLUSIONS :

- **Quelle que soit la position du zoom optique, et au-delà, du zoom numérique, le rapport entre l'échelle micrométrique et le sujet observé n'a pas changé.** La mesure est de 23 µm... mais ce n'est pas la valeur correspondant à la réalité !
- Il faut maintenant lui appliquer le coefficient de correction correspondant (CdC), soit « x5 » = 23 µm x 5 = 115 µm (taille réelle).
- Le CdC est le rapport qui existe entre l'objectif 100x (le seul objectif où un espace de l'OM correspond à un µm) et celui qui est concerné ; ce sera une constante, qui devra être inscrite sur les photos

$100x = (10x) \times 10 \rightarrow \text{CdC} : \times 10$	$100x = (20x) \times 5 \rightarrow \text{CdC} : \times 5$
$100x = (40x) \times 2,5 \rightarrow \text{CdC} : \times 2,5$	$100x = (63x) \times 1,58 \rightarrow \text{CdC} : \times 1,58$
$100x = (100x) \times 1 \rightarrow \text{CdC} : \times 1$ (pas de correction)	

L'expérience a été répétée ci-dessous avec une préparation définitive de spores d'*Inocybe incarnata*, dont la taille réelle est de 9 à 10 μm de long. Le zoom a été actionné de manière aléatoire et différente entre le 40x et le 100x.

	
Objectif 40x, zoom en position médiane	Objectif 100x, zoom quasi au maximum
Avec l'objectif 40x, la mesure apparente est de +/- 4 μm ; la mesure réelle sera donc de 4 μm x 2,5 = 10 μm Avec l'objectif 100x, la mesure apparente est de +/- 10 μm , ce qui correspond à la mesure réelle (pas de CdC dans ce cas)	

D'autres solutions existent :

- Utiliser des logiciels de mesure qui permettent d'indiquer directement la mesure sur le sujet, ou de placer une échelle de mesure sur l'image
- Créer une échelle de mesure (avec Photoshop par exemple)

Cela implique UNE obligation :

→ le logiciel employé (quelle que soit sa nature) doit être paramétré (étalonné) en fonction des objectifs utilisés, avec une distance constante et immuable entre le plan focal de l'objectif et le capteur numérique

→ le système doit être fixe et définitif

- La technique qui présente le moins de risque d'erreurs de manipulation consiste à remplacer un oculaire par une caméra d'oculaire
- Si la caméra est placée sur un adaptateur au niveau du tube trinoculaire, il est impératif de marquer le tube coulissant, car toute erreur de positionnement va générer une erreur de mesure