

# La Lettre

## DE LA SMF

N° 18 – mars 2012

### La fusion d'images pour les mycologues microphotographes

par Édouard Evangelisti

En mycologie comme dans bien d'autres disciplines naturalistes, le microscope est un auxiliaire précieux qui permet souvent de lever le doute sur la détermination d'une espèce. Parmi les caractères microscopiques les plus couramment observés par les mycologues figurent la forme et la taille des spores, leur ornementation éventuelle, ainsi que différentes structures (cystides, asques, paraphyses, etc.) et revêtements (chapeau, stipe). Ces caractères sont habituellement présentés sous forme de données statistiques accompagnées de dessins au trait. C'est une méthode rigoureuse et éprouvée que la microphotographie vient désormais compléter. Or, la montée en puissance des ordinateurs et l'essor de la photographie numérique permettent aujourd'hui d'effectuer des traitements complexes sur les microphotographies pour obtenir des clichés encore inconcevables il y a quelques années. Dans ce court article, nous souhaitons présenter l'une de ces techniques, déjà très utilisée par les macrophotographes : la fusion d'images ou *focus stacking*.

#### ► Un dilemme : résolution ou profondeur de champ ?

De façon générale, un microscope comporte trois parties : une **partie mécanique** (statif, platine, etc.) qui assure la stabilité du système et les mouvements de mise au point, un **dispositif d'éclairage** qui contrôle l'illumination de l'échantillon et une **partie optique**. Celle-ci regroupe les oculaires, les objectifs et le diaphragme de champ.

Un objectif de microscope est défini par son **ouverture numérique** (ON, en anglais NA pour *numerical aperture*). Celle-ci indique la finesse des détails que peut révéler un objectif. En d'autres termes, plus un objectif possède une ON élevée, plus il est capable de résoudre de fins détails<sup>1</sup>. À grandissement égal, l'ON diffère selon le type d'objectif considéré, achromatique simple ou apochromatique (**Tableau 1**). Ces considérations sortent du cadre du présent article ; les lecteurs intéressés sont invités à se reporter à l'excellent site de la SMNF (voir bibliographie en fin d'article).

Hélas, la course à la résolution entraîne un recours fréquent à l'immersion, indispensable pour dépasser une ON de 1.0, ce qui pose parfois de sérieux problèmes aux microphotographes à cause des remous causés dans le milieu d'observation. Pire encore, les objectifs à grande ouverture numérique ont une **profondeur de champ** généralement très faible, c'est-à-dire que le **plan de netteté** devient si fin que des spores de quelques micromètres d'épaisseur sont déjà trop épaisses pour être entièrement nettes sur un seul cliché. Dans ces conditions, le recours au dessin paraît indispensable pour synthétiser les détails observés aux différents plans de netteté (voir, par exemple, les clichés de la figure 1 : aucun d'entre eux ne permet d'apprécier tous les détails des spores).

<sup>1</sup> On ajoutera tout de même un bémol à cette règle générale, car, à ouverture numérique égale, la qualité des traitements de surface des lentilles affecte sensiblement la qualité de l'image finale. Ainsi, des objectifs récents qui bénéficient des meilleurs traitements de surface des lentilles peuvent se révéler plus performants que des objectifs plus anciens à ouverture numérique supérieure.

Société mycologique de France – 20, rue Rottembourg – 75012 PARIS

Tél. : + 33 (0) 1 44 67 96 90 – [smf@mycofrance.org](mailto:smf@mycofrance.org) – <http://www.mycofrance.org>

Tableau 1. — Ouverture numérique de différents objectifs

	×10	×20	×40	×60	×100
Achromatique	0.25	0.40	0.65	0.85	1.25 (imm.)
Apochromatique	0.40	0.80	1.0–1.3 (imm.)	1.4 (imm.)	1.4 (imm.)

### ► Le *focus stacking* au secours du microphotographe

Le *focus stacking* est une technique de traitement des images que l'on peut traduire en français par « fusion des zones nettes de plusieurs images » ou « augmentation de la profondeur de champ ». Elle consiste à utiliser un algorithme capable de synthétiser les détails observés aux différents plans de netteté d'une structure à partir d'une pile d'images prises à ces différents plans de netteté. En somme, l'ordinateur effectue ici un travail comparable à celui du dessinateur. Les algorithmes utilisés sont en général complexes et ne seront pas décrits dans cet article.

Pour illustrer mon propos, je vous propose de réaliser une expérience simple : préparer un montage de spores de russule. Prenez une lamelle de russule, en choisissant de préférence une espèce à ornementation bien marquée, et déposez-y une goutte de réactif de Melzer<sup>2</sup>. Éliminez l'excès de réactif, découpez la zone en petits dés (environ 1 mm<sup>2</sup>) et montez-les dans du chloral lactophénol. Dissociez les tissus en appliquant de légères percussions sur la lamelle couvre-objet.

Choisissez ensuite une zone photogénique, puis faites la mise au point sur la partie haute des spores, et prenez une photo. Faites ensuite varier légèrement la mise au point (1 à 2 µm) pour « descendre » jusqu'au plan médian, c'est-à-dire jusqu'à la section de surface maximale, et prenez à chaque fois un nouveau cliché. Ce faisant, vous vous constituez une **pile d'images** qui contient des informations sur l'ornementation des spores, la position des apicules et des plages supra-apiculaires, quand l'orientation permet de les voir (**fig 1**).

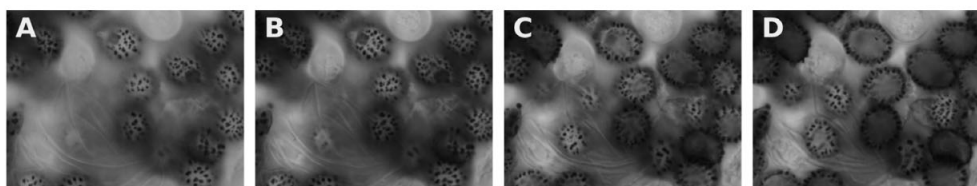


Figure 1. — Une pile d'images pour le *focus stacking*. (A) : plan de netteté sur la partie supérieure. (B) et (C) : plans de netteté intermédiaires. (D) : plan médian pour la plupart des spores.

Nous allons maintenant utiliser un logiciel tel que Combine ZP (voir les liens en fin d'article) pour **superposer ces images et fusionner les zones nettes** présentes sur chacune d'entre elles<sup>3</sup>. On construit alors une image à **profondeur de champ étendue**, avec des spores dont l'ornementation est presque entièrement visible. Sur certaines d'entre elles, on distingue également l'apicule et la plage supra-apiculaire (**fig 2**).

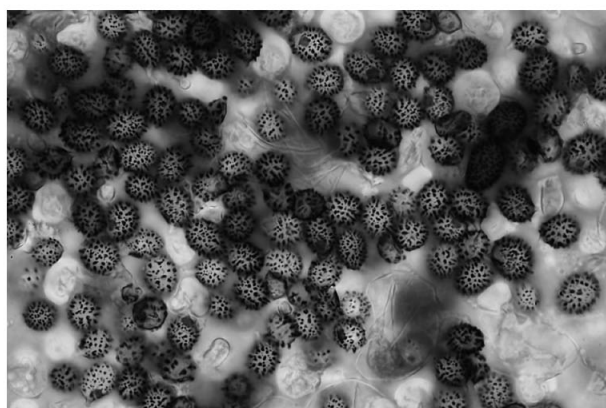


Figure 2. — Image finale obtenue après fusion des images de la figure 1. Les clichés présentés en figure 1 correspondent au centre-haut de cette image.

<sup>2</sup> Pour mémoire, le réactif de Melzer est une solution iodo-iodurée qui colore en bleu foncé ou en noir les structures amyloïdes, et notamment l'ornementation des spores de russules et de lactaires.

<sup>3</sup> Pour une description du fonctionnement de ces logiciels, on se reportera aux manuels disponibles en ligne, ainsi qu'aux nombreux forums consacrés à cette technique.

À noter que cette technique peut être mise à profit pour beaucoup d'autres espèces, notamment des ascomycètes dont l'ornementation sporale est mise en évidence par coloration au bleu coton lactique (**fig 3**).

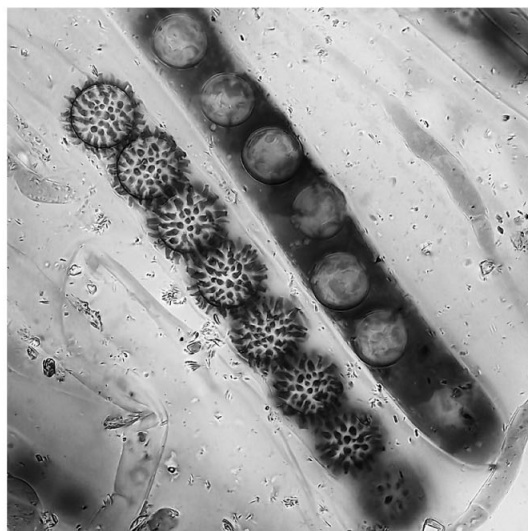


Figure 3. — Focus stacking sur des spores de l'ascomycète *Scutellinia trechispora* (Berk. et Broome) Lambotte, après coloration au bleu lactique. Échantillon aimablement fourni par Benat Jeannerot.

#### ► Le focus stacking et ses chausse-trapes

Le *focus stacking* présente des inconvénients qu'il est important de considérer. Tout d'abord, l'algorithme utilisé, aussi perfectionné soit-il, peut faire apparaître des **artefacts** sur les clichés, notamment des **irisations** ou des **images fantômes** lorsque des structures se déplacent d'une image à l'autre de la pile. On a donc tout intérêt à régler au mieux l'illumination de l'échantillon, en respectant si possible les paramètres de Köhler, et à préférer des milieux de montage visqueux dans lesquels l'agitation des structures est faible<sup>4</sup>. Par ailleurs, l'**impression de relief** est rapidement atténuée lorsque la pile d'images se poursuit au-delà du plan médian. Enfin, si les pas qui séparent deux images successives sont trop grands, des **zones floues** peuvent subsister sur l'image finale. Le nombre de clichés s'estime avec l'expérience, mais on recommande en général un chevauchement de 30 % entre deux clichés successifs. Au-delà, l'information est redondante et ralentit le traitement informatique ; en dessous, on risque de perdre des informations ou de mettre en échec l'algorithme de fusion d'images, qui est alors incapable de relier les images entre elles.

Ainsi défini, le *focus stacking* gagne à être utilisé en mycologie. L'ornementation sporale, en particulier, peut être mise en évidence avec une précision comparable à celle des dessins d'observation. Nous pensons que cette technique ne les remplace pas ; en revanche, nous sommes convaincus que les mycologues peuvent la mettre à profit pour accompagner leurs travaux de clichés de qualité. À vos microscopes !

#### Liens utiles et références bibliographiques

- ♣ Un logiciel libre pour le *focus stacking* (licence GNU GPL) : Combine ZP  
<http://www.hadleyweb.pwp.blueyonder.co.uk/CZP/News.htm>
- ♣ D'autres logiciels (payants)  
Zerene Stacker : <http://www.zerene.com/cms/stacker>  
Helicon Focus : <http://www.heliconsoft.com/heliconfocus.html>
- ♣ Présentation détaillée de la microscopie en fond clair  
<http://www2.ac-lille.fr/myconord/micro/descript00.htm>
- ♣ Un forum de naturalistes où le *focus stacking* est pratiqué en routine  
<http://www.lenaturaliste.net/portail/index.php>

<sup>4</sup> L'eau n'est pas un bon milieu de montage, car elle s'évapore rapidement et provoque de forts courants dans la préparation. On préfère généralement un milieu de montage plus visqueux tel que le chloral lactophénol, mais on prendra soin de le manipuler avec précaution compte tenu de sa toxicité notoire. En cas d'hésitation, le glycérol 50 % est un bon compromis.

## En bref...

### ► Agenda

#### Rappel de quelques manifestations mycologiques en 2012

- Les **Mycologiades internationales de Bellême** (Orne) se dérouleront du jeudi 4 au dimanche 7 octobre.
- La **SESSION de la SMF** organisée par l'*AMYPHAR* (Association de mycologues pharmaciens) se tiendra à **Velaine-en-Haye**, près de Nancy, du lundi 8 au samedi 13 octobre. **Nous rappelons qu'il faut s'inscrire à la session avant le 1<sup>er</sup> juin.**
- La **Semaine nationale du champignon** se déroulera du dimanche 14 au dimanche 21 octobre.
- L'**exposition de la SMF** se tiendra au Parc floral de Paris (bois de Vincennes), du vendredi 19 au lundi 22 octobre.
- Les **jours mycologiques de la FAMM** se tiendront au Vigan (Gard) du lundi 29 octobre au samedi 3 novembre.

#### Tarif 2012\*

Membre actif : avec abonnement au bulletin 42 € — sans abonnement au bulletin 32 €

Conjoint ou enfant(s) de membre actif : le premier 8 € ; les suivants 3 €

Membres bienfaiteurs : 150 € — Membres donateurs : 100 €

Abonnement au bulletin de la SMF seul, sans cotisation (non membre) : France 48 € — étranger 60 €

Règlement par chèque à l'ordre de la Société mycologique de France et par virement bancaire ou mandat postal

Adresse : Société mycologique de France — 20, rue Rottembourg F-75012 Paris

[\* La cotisation et les dons à la Société permettent une déduction fiscale de 66 %]

**Parrainage.** — Les membres de la Société peuvent désormais parrainer des mycologues qui n'ont jamais été membres de la SMF, ou alors qui ne sont plus membres depuis au moins cinq ans. La cotisation pour le parrain et ses filleuls sera de 32 € pour un an, et ils recevront tous, pour ce tarif et gracieusement, les fascicules du bulletin pour l'année correspondante. Les années suivantes seront au tarif habituel de 42 € pour continuer à être membre avec réception du bulletin.