

La profondeur de champ vaincue en photomicrographie

Une contribution à l'étude des Myxomycètes avec une technique directement applicable en lichénologie

(cet article précédemment publié dans le bulletin de la Société de Botanique du Nord de la France
a été réclaté par de nombreux membres de l'AFL adeptes de macrophotographie et de photomicrographie)

Michel BLONDEL
2, rue Henriette
78320 LA VERRIERE

Résumé

L'auteur décrit un procédé de traitement de photographies digitales qui permet de rendre la profondeur de champ indéfiniment grande pour des objets de dimension inférieure à 3 mm comme les Myxomycètes, tout en gardant le pouvoir de résolution de l'objectif.

Mots-clés : photomicrographie, Myxomycètes, profondeur de champ.



La profondeur de champ est une grandeur bien connue des photographes. Elle traduit l'impossibilité pour un objectif photographique de projeter sans déformation la scène à 3 dimensions qui constitue son objet, sur la pellicule à 2 dimensions qui constitue son image. Si nous définissons les dimensions de la scène photographique par sa largeur et sa hauteur selon un plan perpendiculaire à la ligne de visée, et par la profondeur, la dimension qui lui est parallèle, un objectif photographique, quelles que soient ses qualités, ne sera « corrigé » que pour un certain plan situé à une profondeur définie. Il est bien connu que cette adaptation est obtenue en modifiant mécaniquement la distance entre l'objectif et la pellicule ; c'est l'opération de « mise au point ».

Heureusement, dans la photographie ordinaire que nous appellerons scénique, c'est-à-dire celle qui reproduit des scènes en réduisant le rapport de dimension, on tolère une certaine **profondeur de champ**, un écart de distance par rapport au plan de mise au point où le « flou » devient imperceptible devant le pouvoir séparateur de l'émulsion photographique et de l'objectif. Cette propriété est mise à profit dans la photographie de portrait, où le sujet est « mis au point » alors que le décor avec un certain flou suggère un relief.

Cette tolérance croît d'autant plus vite (cf. Annexe I) que le rapport de grandissement G entre l'image et l'objet est petit. Ainsi, avec un objectif de 50 mm de focale, une ouverture à $f/8$, et une mise au point à 10 mètres ($G=50/10000 = 1/200$), la profondeur de champ s'étend de l'infini à 5 mètres ; elle se réduit de 1,1 à 0,95 mètre pour une mise au point à 1 mètre ($G=50/1000 = 1/20$).

On conçoit que cette réduction de la profondeur de champ devient dramatique en photomicrographie lorsque le grandissement tend vers l'unité, et qu'elle devient incontournable en photomicrographie lorsque l'image devient 10 à 100 fois plus grande que l'objet. Les microscopistes savent avec quel soin il faut « aplatir » l'objet entre lame et lamelle pour observer avec confort la préparation en éclairage par transmission.

Une simple évocation géométrique de triangles semblables montre que le rapport de grandissement image/objet est en rapport direct avec les distances respectives de l'image et de l'objet à l'objectif. En microscopie, ce rapport devenant très élevé (10 à 100), les anciens objectifs comportaient une distance à 15 cm entre l'image et l'objectif. Cette distance normalisée imposait de réduire la distance à l'objet à des valeurs proches du millimètre, et même inférieures ; cette contrainte interdisait tout autre éclairage que par transmission, à moins d'utiliser des solutions sophistiquées et peu souples comme l'éclairage confocal.

L'apparition de nouveaux objectifs destinés à l'inspection des circuits intégrés électroniques et comportant une distance respectable entre la monture et l'objet – quelques centimètres – a permis de donner un nouveau souffle à la photographie d'objets millimétriques comme par exemple les Myxomycètes, en les éclairant par réflexion. Ces objectifs s'affranchissent de la norme précédente en ce qu'ils sont corrigés pour reporter systématiquement l'image à l'infini ; l'objet est donc toujours dans le plan focal. C'est au microscope lui-même qu'est attribuée la fonction, en général par un dispositif zoom, de reporter cette image virtuelle en image réelle sur la surface sensible.

C'est ainsi que nous avons pu photographier des Myxomycètes (fig. 1) sur pellicule argentique avec un stéréomicroscope « Olympus SZX12 », le sujet étant éclairé par des diodes



Fig. 1 - Photographie d'un myxomycète *Lamproderma pulveratum* sur pellicule argentique, montrant l'incompatibilité entre une profondeur de champ suffisante et la résolution offerte par l'objectif à pleine ouverture

électroluminescentes (LED) blanches dont la température de couleur est élevée. Malheureusement la qualité et les possibilités de l'appareillage ne résolvent en rien la

contrainte géométrique qui fait qu'à ces grandissements élevés, la profondeur de champ reste trop petite, bien inférieure aux dimensions de l'objet photographié.

On pourrait être tenté de réduire l'ouverture, de diaphragmer le faisceau lumineux puisqu'on sait que cette opération a pour effet d'accroître la profondeur de champ, quitte à augmenter le temps de pose, ce qui est sans inconvénient avec des objets immobiles comme les myxomycètes. Malheureusement un phénomène insoupçonné en photographie scénique, vient détruire un tel bénéfice ; lorsque la résolution de l'objet, c'est-à-dire la dimension du plus petit détail, quelques micromètres, approche la longueur d'onde de la lumière (environ $0,5 \mu\text{m}$), cette résolution exige une ouverture numérique d'autant plus grande.

Cette contrariété est visible sur les deux photographies de la figure 2. En (2a) l'ouverture numérique est plus grande qu'en (2b) ; la profondeur de champ est plus petite en (2a) qu'en (2b). On aperçoit la granulation du *péridium* des sporanges en (2a), alors qu'elle apparaît floue en (2b) ; mais réciproquement les plans où se situent les sporanges sont plus nets en (2b) qu'en (2a).



Fig. 2 - La photographie de gauche (a) a été faite avec une plus grande ouverture numérique que celle de droite (b). C'est pourquoi la profondeur de champ y est plus petite. Mais on aperçoit la granulation du *péridium* sur quelques sporanges, alors que celle-ci est floue dans la photographie (b).

La profondeur de champ est liée à des conditions géométriques, tandis que la résolution est liée à la nature ondulatoire de la lumière. Ces deux grandeurs sont antagonistes, il faut donc choisir, soit par un compromis, soit par une nouvelle technique. Le compromis est la seule technique en photographie argentique, alors que la technique digitale, par sa possibilité de traitement automatique des images, offre de nouvelles perspectives. Comme nous travaillons en lumière visible, nous ne pouvons modifier sa longueur d'onde, mais il reste la possibilité de contourner la faible profondeur de champ par une série de photographies

à différents plans de profondeur, suffisamment corrélés de proche en proche pour que l'on puisse choisir de l'un à l'autre, les zones où la précision est la meilleure.

C'est la solution que nous avons adoptée avec un boîtier photographique « Fuji S1 Pro », le microscope « Olympus SZX12 », lequel muni d'une vis micrométrique de mise au point, et un objectif « Mitutoyo M Plan Apo » de 40 mm de focale, offrant une distance de travail de 34 mm, assez confortable pour éclairer soigneusement l'objet, et dont la résolution est 2 μm avec une profondeur de champ réduite à 14 μm ... !

Bien entendu, le microscope travaille à l'ouverture maximum. L'opération consiste donc à enregistrer une série ordonnée de photographies digitales du même objet dans des conditions identiques si ce n'est le décalage de 15 μm de mise au point entre chaque prise de vue ; puis, de faire subir à ces enregistrements un traitement informatique consistant à comparer deux enregistrements consécutifs pour en composer un troisième, tel que le choix de ses pixels sera déterminé par l'environnement présentant le plus de détails. Ensuite, on réitère la comparaison de ce troisième avec le suivant jusqu'à épuisement de la série.

L'algorithme étant assez technique, nous le présentons en Annexe II, afin de ne pas alourdir l'exposé.

Un objectif de même nature que le précédent, mais de longueur focale quatre fois plus petite, nous a permis de photographier ce *Licea minima* avec une résolution de 0,6 μm . Nous pouvons supposer qu'il n'existe pas beaucoup de photographies de cette espèce avec une telle précision, comme le présente la Figure 5.

Légendes des photographies des pages 65 et 67

Figure 3 : elle présente un exemple de photographies primaires d'un *Lamproderma pulveratum*, espacées de 60 ou 120 μm et tirées d'une série de 12 clichés espacés de 60 μm qui ont servi à édifier le cliché composite de la figure 4. L'objet étant convexe, il est préférable de commencer le traitement par le plan le plus éloigné, celui du stipe, pour remonter jusqu'à la calotte sphérique du sporange.

L'algorithme consiste à choisir entre deux clichés consécutifs, le pixel dont l'environnement présente le plus de détails.

Figure 4 : ce composite de 12 clichés présente un pouvoir de résolution de 2 μm , tel que les spores d'une dizaine de microns sont identifiables dans la masse du *capillitium* à travers le *péridium*. La profondeur de champ est parfaite sur l'ensemble du myxomycète.

Figure 5 : Composite de 14 clichés distants de 7,5 μm , obtenu avec un objectif MITUTOYO de 10 mm de focale, offrant une profondeur de champ de 1,6 μm et un pouvoir de résolution de 0,7 μm qui permet de distinguer des détails sur les spores.

Figure 6 : Composite de *Macbrideola synsporos* (famille des Stemonitidaceae).

Figure 7 : Composite de *Licea kleistobolus* (famille des Liceaceae).

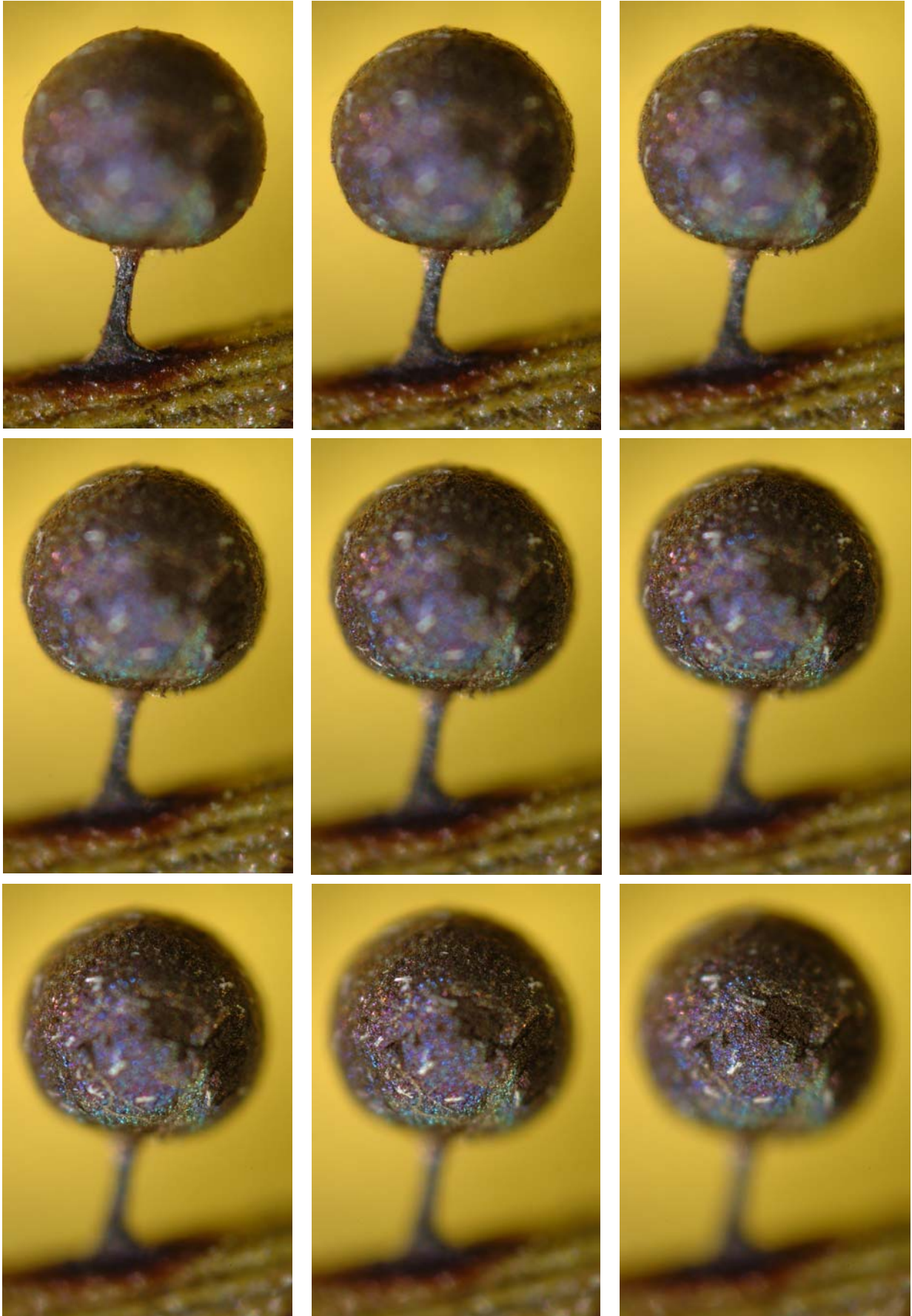


Fig. 3 – Exemple de sélection de 9 clichés (parmi les 12) de *Lamproderma pulveratum*

Annexe I

La formule qui relie la distance P de l'objet à l'objectif et P' , celle de l'image à l'objectif, en fonction de la distance focale F est :

$$(1/P) + (1/P') = (1/F)$$

P et P' sont symétriques, ce qui signifie que l'objet et l'image sont interchangeables : on peut donc utiliser un objectif photographique sur un agrandisseur. En revanche, il est fortement déconseillé de l'utiliser comme objectif de projection à cause de la chaleur qui dessèterait les lentilles.

Considérons une variation de profondeur dP , il en résulte un défaut de mise au point dP' que l'on peut calculer en différentiant l'équation précédente ; ce qui donne :

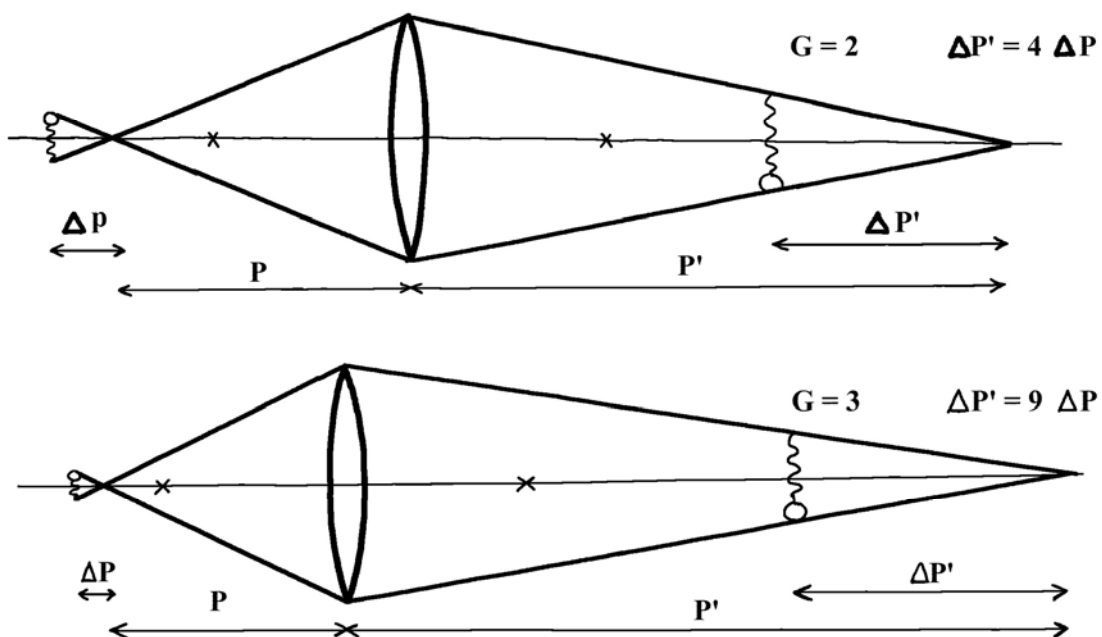
$$(-dP/P^2) + (-dP'/P'^2) = 0$$

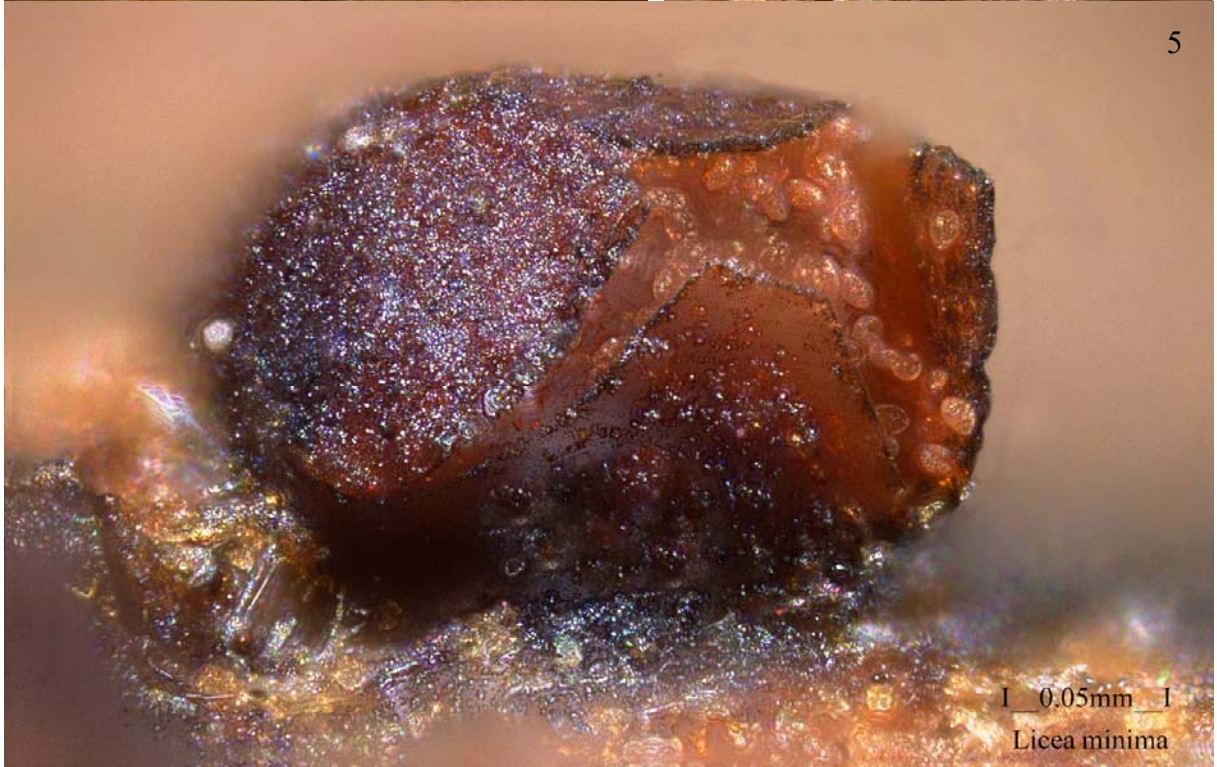
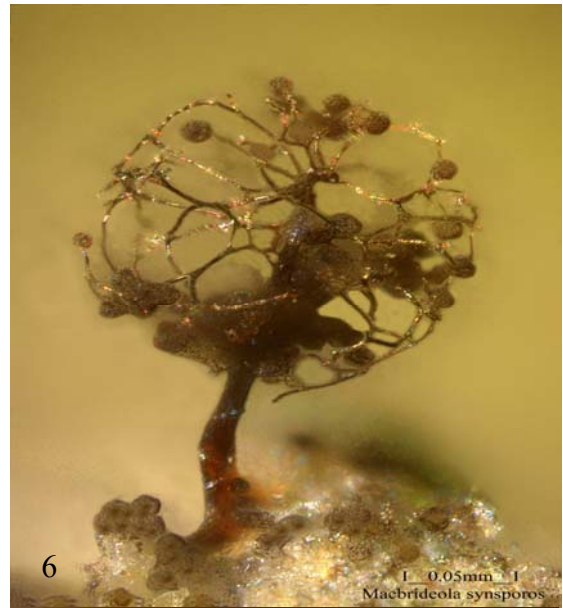
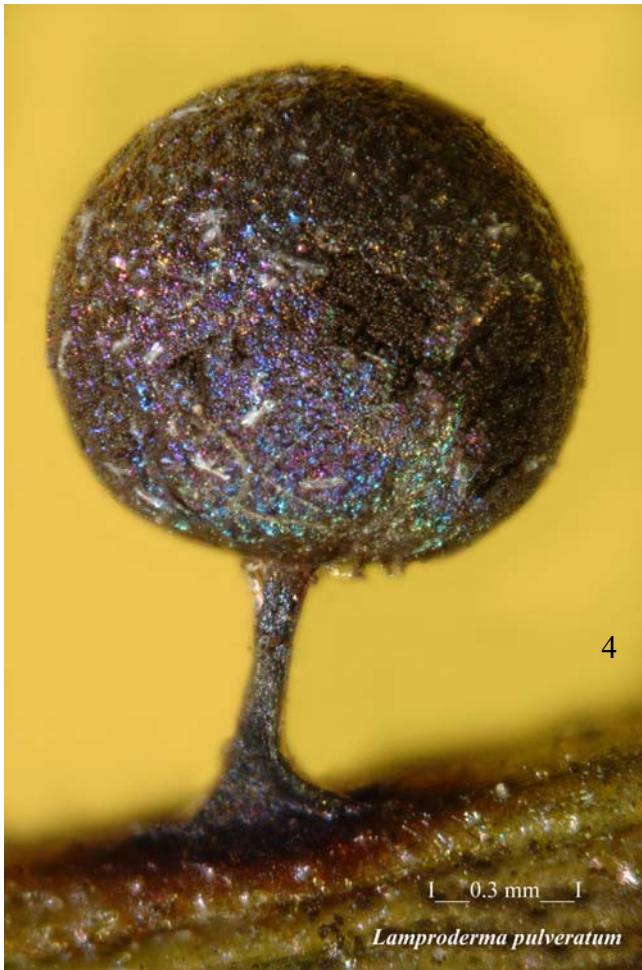
puisque la focale F est invariante

$$D'où (dP'/dP) = -(P'/P)^2 = -G^2$$

G est le grandissement, rapport linéaire de l'image à l'objet, qui, par suite de la propriété des triangles semblables, est égal à P'/P .

On comprend alors que dans la photographie scénique pour laquelle $G < 1/10$, la profondeur de champ dP soit très grande devant la résolution de l'émulsion dP' . On a $dP = (dP'/G^2)$ dans un rapport supérieur à 100. Par contre en photomicrographie où $G > 10$, la proportion s'inverse, ce qui conduit à un flou.





4. *Lamproderma pulveratum* 5. *Licea minima* 6. *Macbrideola synsporos* 7. *Licea kleistobolus*

Mise en page Jean-Pierre GAVERIAUX

Photographies composites réalisées par Michel Blondel

Annexe II

Tout défaut dans la mise au point se manifeste par un « flou », c'est-à-dire par la disparition des détails fins de l'image. Comme chaque image comporte à la fois des zones mises au point et des zones qui ne le sont pas, le choix est déterminé par une analyse locale de l'environnement.

Nous exposerons succinctement ci-dessous les principes rudimentaires de la **méthode des résidus**.

On considère la luminosité de chaque pixel situé dans un cercle C de rayon suffisant (environ 50 pixels) pour y déceler des fins détails que le défaut de mise au point modifierait. Ces fins détails se signalent mathématiquement par des variations importantes de la luminosité du pixel par rapport à ses voisins, c'est-à-dire une pente dE/dx plus importante que s'il était noyé dans un flou. **E** représente le nombre caractérisant la luminosité et **x** la position du pixel par rapport au centre du cercle d'analyse.

Appelons **E_i** la luminosité du pixel *i* de coordonnées {*x_i*} dans le cercle d'analyse **C** comportant **N** pixels. Calculons la moyenne :

$$M1 = (1 / N) \sum_c E_i$$

Comme le flux lumineux est conservatif quelle que soit la mise au point, **M1** sera pratiquement identique pour deux clichés consécutifs dans la même fenêtre d'analyse. Il n'en est plus de même pour le moment d'ordre 2 :

$$M2 = (1 / N) \sum_c (E_i - M1)^2$$

En effet, supposons que le « flou » soit parfait, alors tous les pixels ont des **E_i** identiques et **M1 = E_i** quelque soit *i*, donc **(E_i - M1) = 0** et **M2 = 0**.

Au contraire, s'il y a des détails dans le cercle C, les **E_i** s'écartent d'autant plus de la moyenne **M1**, et **M2** qui est une somme de termes positifs, croît d'autant plus.

En analysant par cette méthode deux enregistrements consécutifs pour un même cercle d'analyse, on choisira la valeur du pixel central de l'enregistrement présentant le plus grand **M2**. On déplace le cercle pour analyser tous les pixels et on réitère pour composer l'enregistrement composite. On réitère ensuite entre ce premier composite et l'enregistrement suivant... etc.