



Dany JOUBERT

SPORES DE RUSSULES

Traitement informatique visant à obtenir une image plus globale de l'ornementation sporale et comparaison avec le dessin en chambre claire.

Un peu de préhistoire...

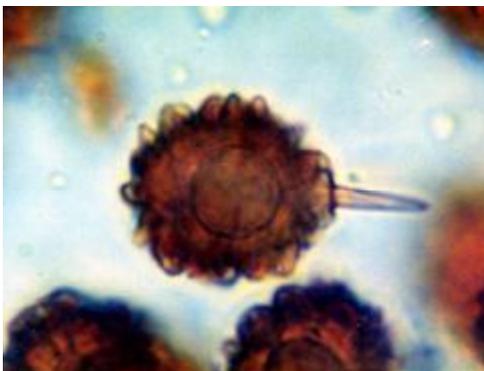
Mes premiers essais datent d'une vingtaine d'années, la photo numérique n'existait pas, les ordinateurs n'étaient pas si répandus.

J'utilisais un Nacet sans tube photo et le boîtier d'un Canon fixé sur un trépied juste à côté du microscope donc totalement séparé du microscope, seulement joint par un tube en papier à dessin noir pour éviter les lumières parasites.

Les temps d'exposition, vu la « puissance » de l'éclairage du microscope, allaient de quelques secondes à quelques minutes.

Voici quelques vieilles photos papier, scannées et plus ou moins rajeunies.

J'étais plutôt content de cette première photo (ci-contre) vu le matériel utilisé, la seule façon d'obtenir une image globalement nette à la fois des spores et de la baside de cet *Agrocybe dura* avait été de faire la mise au point sur les deux spores diamétralement opposées. La baside (tétrasporique) et deux de ses stérigmates, se trouvant ainsi dans le même axe, pouvaient apparaître relativement nets.



La seule façon que j'avais de grossir au-delà de 1000 fois cette spore d'*Octaviana asterosperma* était de reculer l'appareil photo, (sans son objectif), de l'objectif du microscope. Les deux appareils étaient donc situés à 30 ou 40 cm l'un

de l'autre toujours reliés seulement par un long tube de carton noir pour éviter les reflets.

Temps d'exposition : plus ou moins 5 minutes pour cette spore grossie environ 4000 fois sur une photo de 10x15.



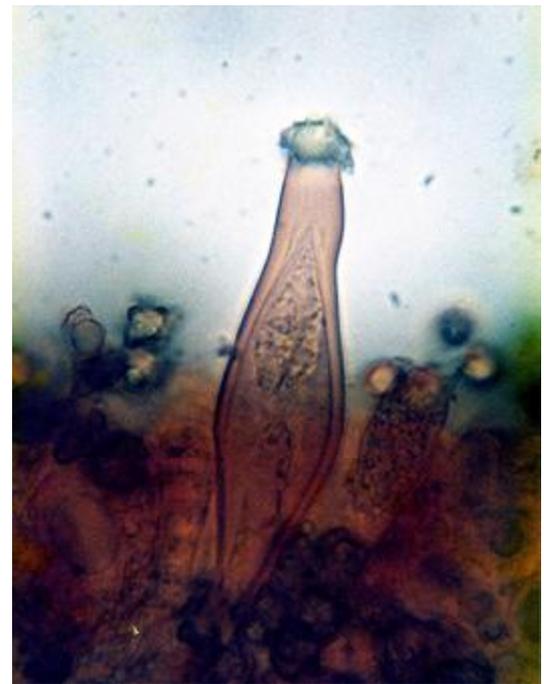
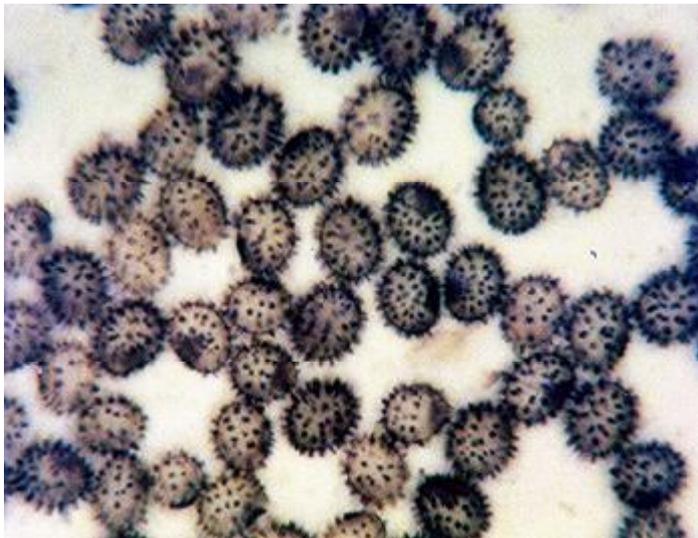


Cette coupe transversale d'une lamelle de *Russula lepida* met en évidence les inclusions lipidiques d'une cystide faciale.



Pas de mérite pour cette photo de *Massaria anomia* puisque les spores mesurent déjà au moins 50 microns et tout ce que l'on peut voir apparaît facilement en coupe optique.

Cystide faciale
coiffée de cristaux d'oxalate de calcium
sur une lame d'*Inocybe astérospora*.



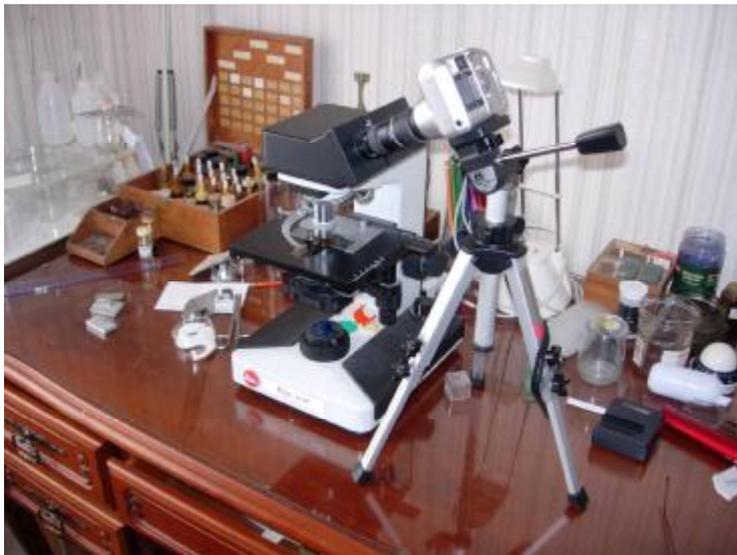
Voici la première tentative pour obtenir une image de spores de *Russula queletii* plus ou moins globale montrant à la fois les aiguillons périphériques et ceux disposés sur la surface supérieure de la spore.

Après avoir pris deux clichés des spores, un en coupe optique et un en vue « aérienne », et les avoir fait développer en diapositive, j'avais enlevé les porte-diapos en plastique, joint les deux prises dans le même porte diapo, et les avais redonné à développer...

Photographie numérique

Après une très longue période d'inactivité mycologique (une bonne douzaine d'années), c'est en contemplant les superbes photos microscopiques que proposent les différents sites, que m'est revenue l'envie de faire à nouveau quelques essais photographiques sur des spores de russules avec des moyens un peu plus modernes, et avec l'espoir d'améliorer quelque peu mes vieux clichés.

Matériel utilisé

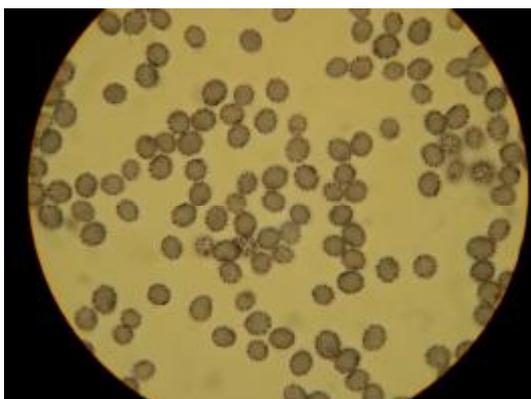


Un microscope Leica med binoculaire d'une quinzaine d'années en tout point équivalent au Laborlux, sauf pour l'objectif à immersion achromatique EF nettement moins performant, (mais je l'ai su malheureusement trop tard), et pour le condenseur n°56, pas exceptionnel, ne possédant qu'une ouverture numérique de 0.90. Par la suite, l'achat d'une petite lentille additionnelle augmentant l'ouverture à 1.25, et se fixant sur le condensateur, a un peu amélioré les performances

(pouvoir séparateur) dans les forts grossissements 100 x 10 (x 1,25 lors de l'usage de la chambre claire).

Cette lentille frontale est à immersion comme l'objectif x100, il faut donc déposer une goutte d'huile sous la lame porte objet pour le condenseur et une sur la lame couvre-objet pour l'objectif. La manipulation est un peu plus longue mais quand on passe un heure ou deux sur la même préparation avec la chambre claire, c'est tout à fait négligeable.

Et... toujours pas de tête trinoculaire ! Ce serait bien pratique, car mon appareil photo n'est toujours pas fixé au microscope, mais seulement posé à côté, impliquant une stabilité et un positionnement rigoureux. En fait lors de l'achat, c'était un choix budgétaire, et, à fond dans les russules, j'avais préféré acheté une chambre à dessiner, persuadé en voyant des ouvrages comme celui de Mr. Romagnesi, que c'était le meilleur choix pour l'étude des spores et cuticules de russules...



L'appareil photo n'est pas très récent ; il s'agit d'un Nikon Coolpix 4300 pas destiné à la macrophotographie, car le grossissement x12 est obtenu en deux temps, d'abord par un zoom optique de x3 puis par un zoom numérique (avec perte de pixels) de x4. L'utilisation

du seul grossissement obtenu par le microscope n'est pas suffisant pour une mise au point aisée à l'aide de l'écran du Nikon, j'utilise donc le zoom optique et seulement lui pour agrandir les images photo micro. Cela dit, ce petit Nikon fournit d'excellentes photos. Son seul grand défaut, relativement gênant, par rapport à la nouvelle génération d'appareils numériques (trois fois moins chers !) et munis d'écrans gigantesques, c'est justement la petitesse de ce dernier.

En effet, avec un moniteur mesurant uniquement 3cmx3cm, c'est très difficile de faire une mise au point précise de la préparation microscopique. J'ai essayé à peu près toutes les options disponibles : automatique macro, reproduction, avec ou sans retardateur de prise de vue, image en HI (haute définition)... J'en suis resté, soit au mode automatique, soit au mode manuel avec option « élevée » sur la netteté des contours, cette solution semblant un peu plus performante.

La haute définition apporte peu de chose si ce n'est des images pesant 11Mo et devenues ainsi difficilement manipulables informatiquement.

Le logiciel pour travailler les photos est Microsoft Picture it! photo 7.0 livré sans doute avec l'ordinateur. Je dispose de deux autres petits logiciels de traitement photos mais n'ai pas pris le temps de les essayer.

Préparation des spores à observer

La qualité principale d'une préparation microscopique, mis à part sa netteté, c'est sa stabilité, aussi bien pour la photo que pour le dessin en chambre claire.

Des spores qui roulent sous l'objectif peuvent bien sûr aider à les voir dans leur globalité, mais rien n'est plus agaçant que de commencer à dessiner et de constater que les spores se sont légèrement déplacées.

La solution a été apportée par Christian Dagrón, russulologue de génie, spécialisé dans l'étude et le dessin microscopique des russules (voir bulletins de la SMF 1989 tome 105, fascicule 3 et 1997 tome 113 fascicule 4) inventeur entre autres de méthodes originales et efficaces de conservation, regonflage et coloration des cuticules. C. Dagrón avait résolu le problème des spores « baladeuses » tout simplement en les collant (encore fallait-il y penser !) sur un petit rectangle de Scotch où elles étaient déposées en monocouche à l'aide d'un fin pinceau.

Ce petit carré de scotch était à son tour collé contre la face inférieure de la lamelle couvre objet en appuyant seulement sur les bords. Le Melzer utilisé pour colorer pénétrait par capillarité entre le papier collant et la petite lamelle couvre objet.

Cette astuce facilement reproductible, avait l'avantage de présenter des spores dociles, (ne bougeant pas) bien disposées, toutes situées dans le même plan, donnant une vue d'ensemble excellente, et évitant les mises au point incessantes.

Une étude précise peut ainsi être entreprise et les quelques secondes supplémentaires passées à la préparation de cette lame ne sont rien, pour la photo ou le dessin, par rapport aux multiples essais avec des spores ayant la « tremblote ».

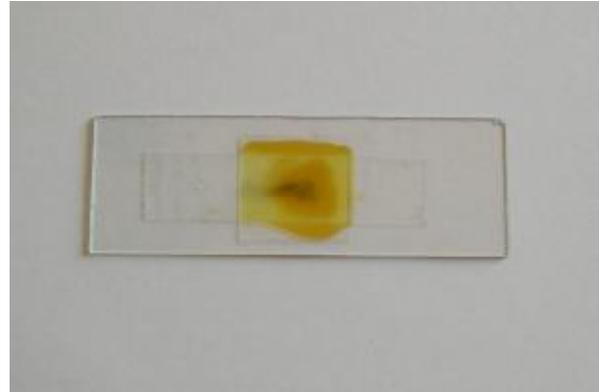
La colle engluant l'ornementation inférieure des spores et le scotch, situés bien en dessous du plan de mise au point qui évolue seulement dans la moitié supé-



rière des spores ne gênent absolument pas, car ils sont invisibles.

Pour ma part, j'utilise une petite variante qui me semble plus aisée : j'utilise du Scotch double face dont je colle un bande de 3 ou 4 cm (sans la tendre outre mesure, car en se rétractant, l'ensemble des spores pourraient bouger...) sur la partie supérieure de la lame porte objet.

J'assure son adhérence parfaite par pression avec un doigt en interposant une feuille non adhésive (un papier-support d'étiquette autocollante quelconque fait très bien l'affaire), puis les spores sont réparties à l'aide d'un pinceau fin.



Prise de vue

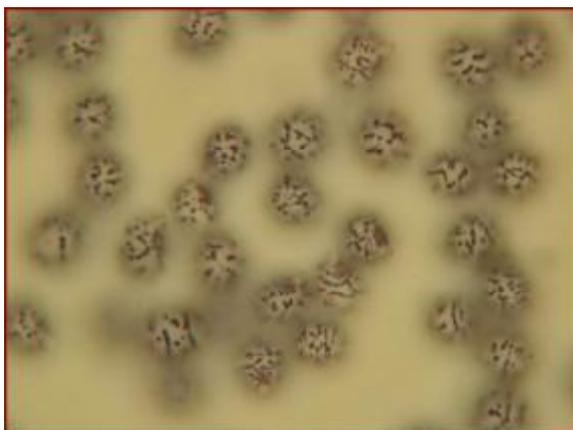
Pour avoir une vue d'ensemble de la surface sporale avec un microscope photonique et un appareil photo, la seule possibilité est, me semble t'il, la prise de plusieurs clichés successifs (une quinzaine) avec une mise au point à peine différente puis d'en sélectionner entre 3 et 5 bien étagés et de les superposer en les ayant préalablement rendus plus ou moins transparents.

En admettant qu'une spore de russule mesure en épaisseur rarement plus de $8\mu\text{m}$ et que seule la surface de l'hémisphère supérieur doit être prise en considération, je pense que quatre est un bon chiffre.

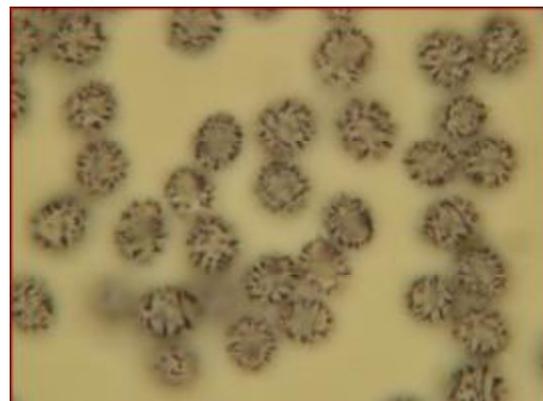
Cinq photos compliquent un peu l'opération et plus on superpose les couches, plus l'ornementation perd de la netteté et du contraste.

Quant à utiliser seulement 3 couches, il est très rare que cela suffise, (petites spores à faible ornementation) pour couvrir la surface entière de l'hémisphère supérieur.

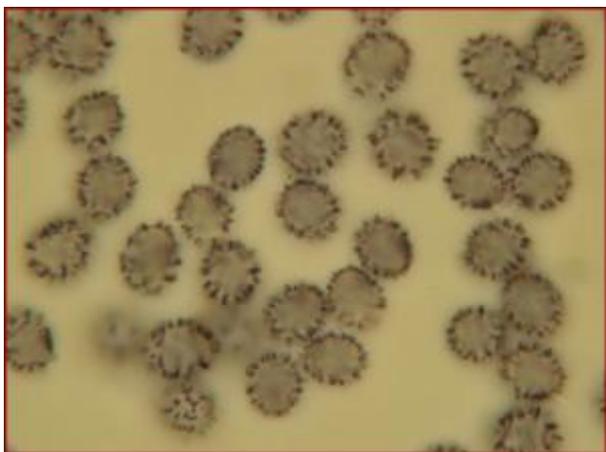
Les 4 images sélectionnées ne sont malheureusement pas d'égale qualité :



La 1^{ère} photo (**B**), montrant la partie la plus supérieure de la spore, perpendiculaire à l'objectif est la plus belle. C'est la plus grande surface représentée et la plus précise, bordée d'une zone floue peu accentuée.



La 2^{ème} photo représente une surface un peu plus oblique apparaissant sur la forme d'un anneau cerné des deux côtés par une zone floue peu gênante après association. La combinaison de ces 2 photos donne déjà une très bonne représentation de l'ornementation sporale, et pourrait presque suffire, mais si l'on veut une représentation plus complète, il faut malheureusement tenir compte des deux images suivantes.

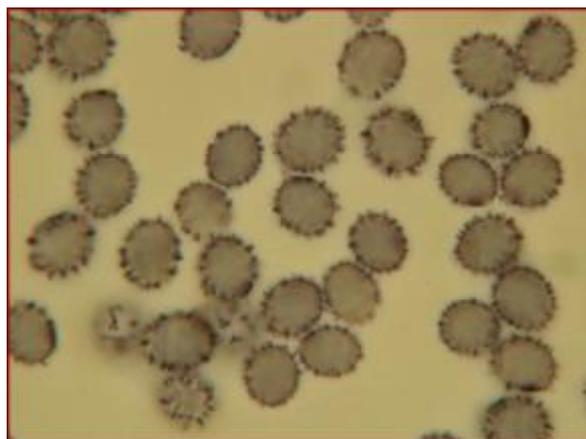


La 3^{ème} photo (**B**) est médiocre : un fin anneau avec seulement les verrues, aiguillons ou crêtes les plus saillantes plus ou moins nettes, bordées de part et d'autre d'une zone floue assez contrastée, due, comme la photo suivante, à la position presque parallèle à l'axe de l'objectif, de la surface sporale. Bien qu'assez pauvre en information, ce cliché est néanmoins indispensable puisque son absence sur une photo reconstituée faire apparaître une zone lisse choquante et un manque de continuité entre les 2 précédentes et la dernière.

En fait, la quatrième photographie qu'on aimerait parfaite, n'est souvent guère mieux.

L'ornementation de cette zone devrait bien se détacher sur le fond de la préparation et apparaître nette et bien contrastée. Mais cette zone est malheureusement polluée par les deux anneaux flous, l'un inférieur et l'autre supérieur, qui la chevauchent allègrement.

Dans de rares cas (spores fortement guttulées ou à ornementation très épaisse et fortement amyloïde), il peut être intéressant d'atténuer le contenu de chaque spore (!) à l'aide du spirographe (généralement plutôt sur le cliché n°3, parfois n°4).



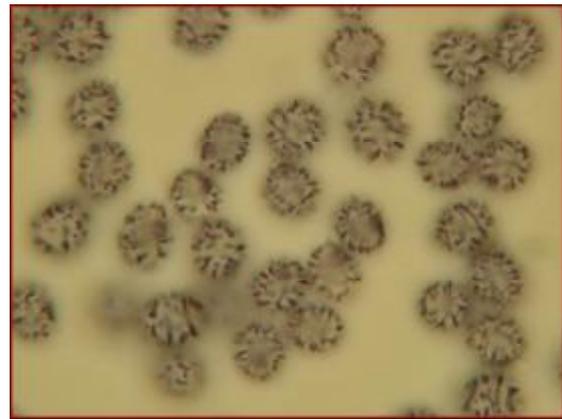
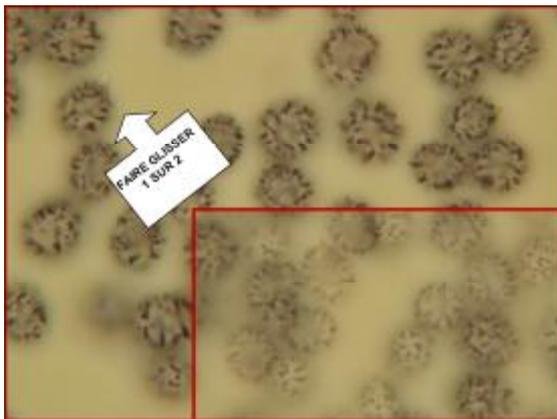
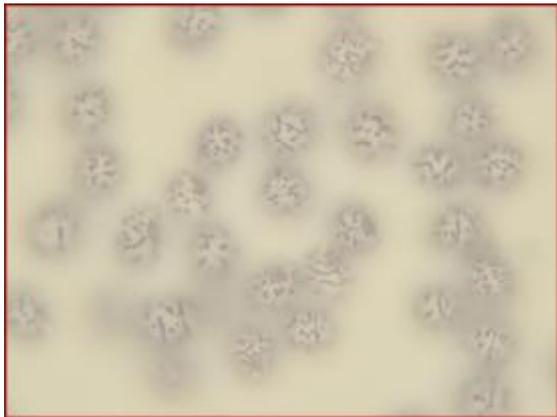
Traitement informatique

Malgré tout cela, il va donc maintenant falloir « marier » ces quatre photographies de façon « équitable ». Chaque opération de superposition par transparence fait perdre un peu de netteté et de détail, aussi, il est préférable de les associer deux par deux puis de réunir les 2 groupes : 1 + 2 puis 3 + 4 et enfin (1.2) + (3.4).

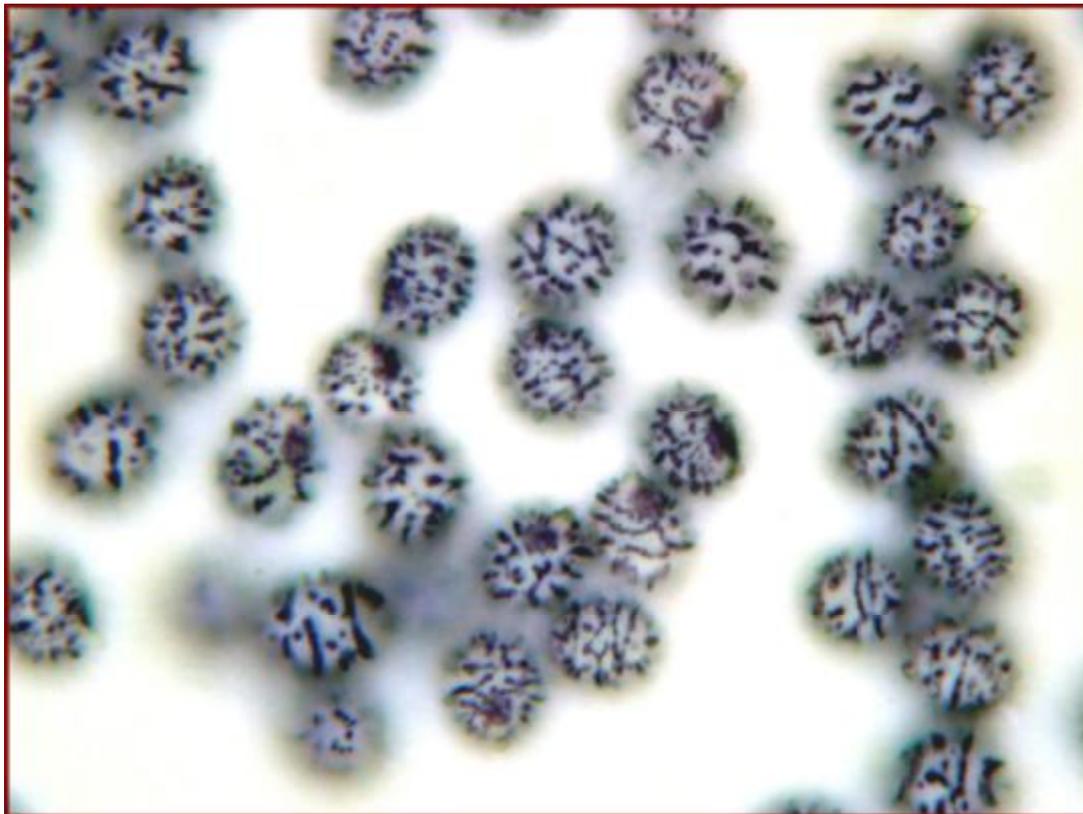
Toute la difficulté de l'opération réside dans l'obtention d'un mariage équilibré, net, suffisamment contrasté mais pas trop, car l'augmentation du contraste va de pair avec l'assombrissement de l'ensemble et l'accentuation du halo marginal duquel l'ornementation périphérique peine à se détacher.

Le premier groupe (1+2) ne pose pas de problème particulier, puisque dès le départ, il est constitué des deux meilleurs clichés.

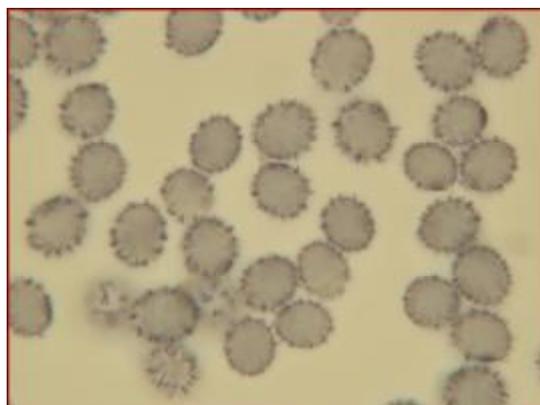
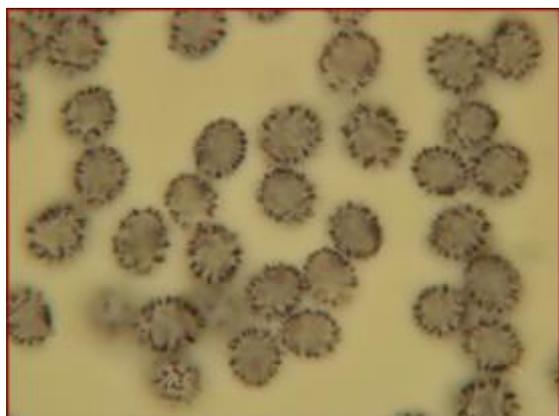
Il suffit de rendre transparent à +/- 50% la photo la plus superficielle et de la superposer très exactement (merci au scotch !) sur la n°2 en la faisant glisser.



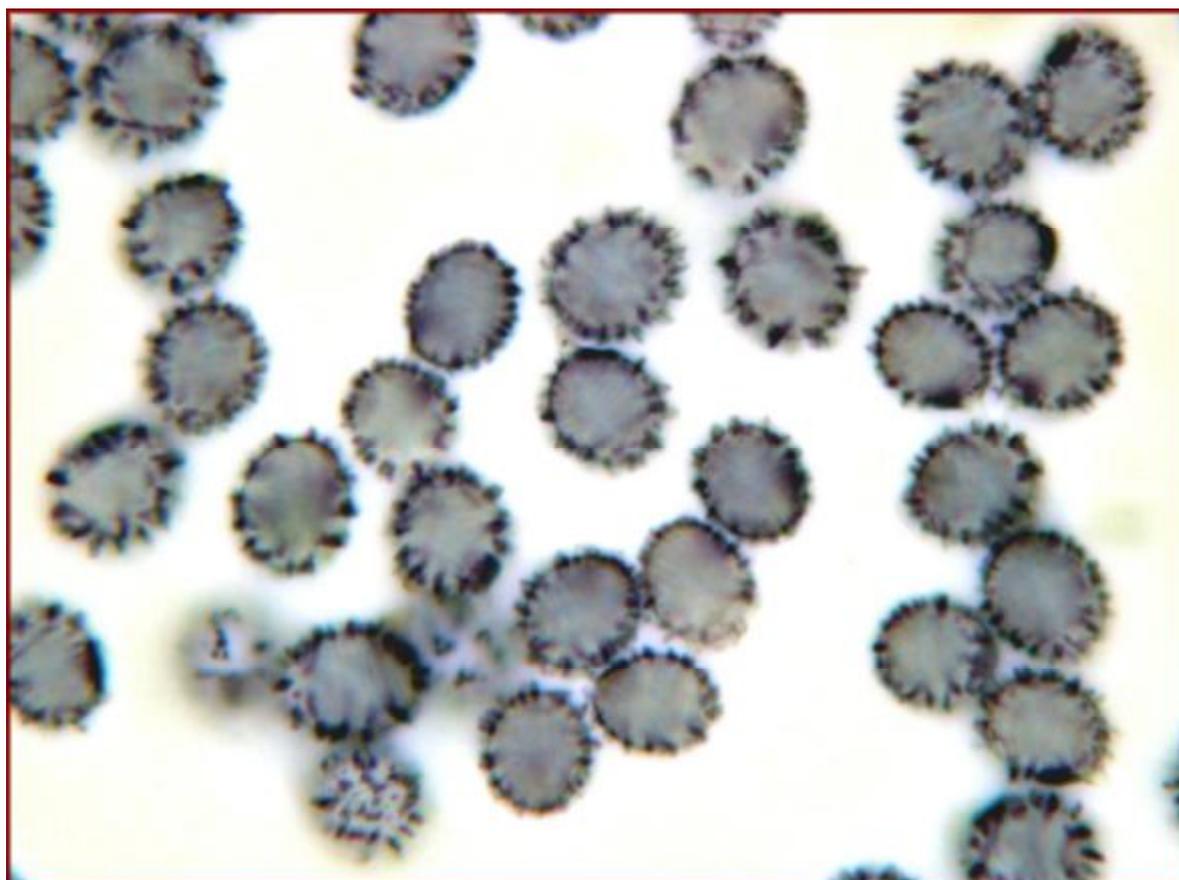
Après avoir aplati le binôme pour qu'il ne fasse plus qu'un, un réglage automatique des niveaux et un léger éclaircissement permettent de rendre instantanément du contraste à l'ensemble.



Pour le couple 3-4 un peu plus trouble, la procédure est identique, mais mieux vaut privilégier la photo 4 car elle n'apparaît jamais assez contrastée au final. Aussi je préfère généralement poser 4 sur 3 et la décolorer (4) entre 20 et 50% en fonction de l'ornementation. Suivant le résultat obtenu, des retours successifs sont toujours possibles.

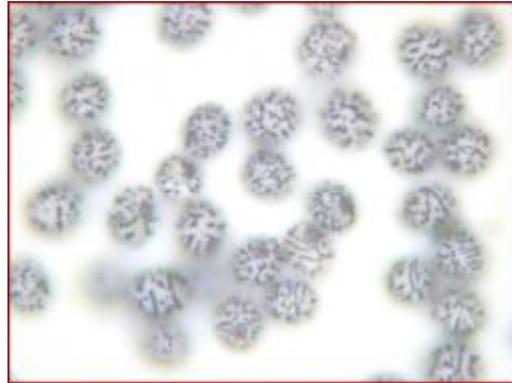
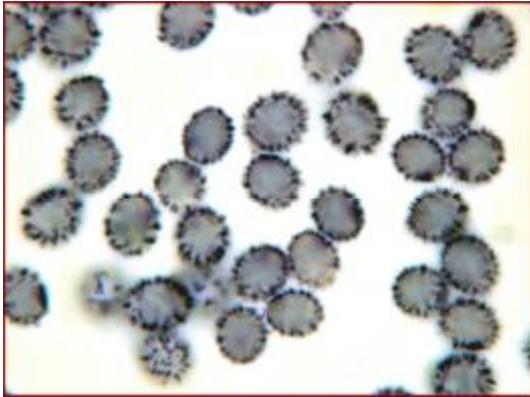


Puis aplatissement, réglage automatique des niveaux et léger éclaircissement.

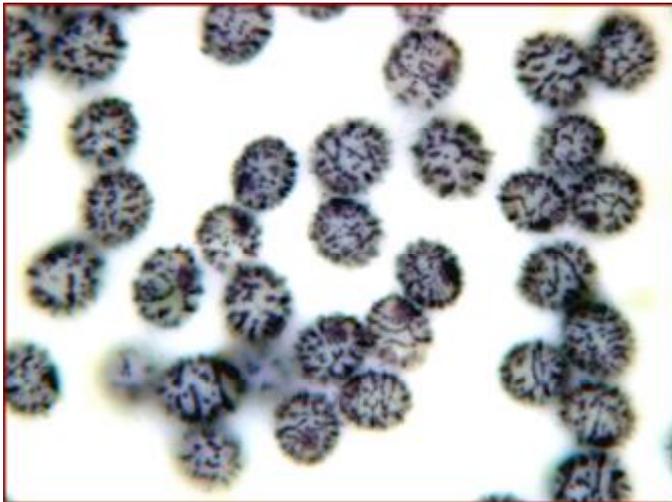


Le 3ème mariage (1.2) + (3.4) suivra le même traitement.

Il faudra utiliser le taux de décoloration maximum possible pour favoriser la coupe transversale sans perdre de contraste sur (1.2) ; Le taux appliqué oscille généralement entre 50 et 75%.



Et on termine comme précédemment par un rognage éventuel qui aplatit l'image, un réglage automatique des niveaux, un éclaircissement et généralement par une légère augmentation du curseur « net ou flou ».



En lisant ces quelques lignes, le procédé semble peut-être long mais en fait de nombreuses opérations informatiques sont instantanées.

En moyenne et avec l'habitude, (les taux de transparence à appliquer se sentent), à part cas spéciaux, la durée totale, (préparation de la lame, prise des photos, transfert, sélection des meilleures et traitement informatique) ne dépasse guère 30 voire 45 minutes maximum (dont 15 minutes pour le traitement informatique des images).

