

Les mesures en mycologie

Partie 1 : Introduction ; mesures à l'échelle macroscopique ; étalonnage des oculaires micrométriques ; photographie et dessin.

Didier BAAR ⁽¹⁾

1. Introduction

La place importante qu'occupent les mesures au sein de l'ensemble des caractères intervenant dans l'identification des champignons va sans dire. Aussi bien à l'échelle macroscopique que microscopique, l'influence, souvent plus ou moins inconsciente, des mesures sur notre jugement est considérable. En effet, le mycologue qui découvre une espèce inconnue pour lui, parvient très souvent à la situer dans un genre au premier coup d'œil. Cette action de classification devient, avec l'expérience, une sorte de réflexe, conditionné par une série de caractères perçus de manière subliminale. Parmi ceux-ci, deux nous semblent prépondérants : la forme ⁽²⁾ surtout, mais aussi la dimension. Ces deux caractères fondamentaux peuvent être estimés aisément et très rapidement : une fraction de seconde suffit à situer une mycène parmi les petites espèces à lames, et non au sein des taxons charnus ornés de tubes !

Au niveau microscopique, l'intérêt des mesures est encore plus considérable. Il est peu concevable, à l'heure actuelle, de faire l'étude micrographique d'un champignon sans en mesurer au moins les spores. Si l'importance des dimensions sporales est relativement limitée au sein d'un genre comme les lactaires, elle est déjà plus grande chez les inocybes, et elle devient primordiale chez les ascomycètes. La mesure des spores ne se limite d'ailleurs pas à leur longueur et à leur largeur, et la portée des mesures microscopiques en général s'étend bien au-delà des spores, car elle concerne également une multitude d'hyphes et d'articles particuliers, comme les asques, les cystides, les basides, etc.

Au cours de ces quelques pages, nous allons donc tenter de donner un aperçu des instruments et des techniques de mesure utilisés couramment en mycologie. Cet article est scindé en deux parties qui, pourtant, sont indissociables l'une de l'autre, car les éléments développés dans la première partie seront largement utilisés au cours de la seconde.

Ce premier volet est consacré à une introduction générale sur les mesures, aux mesures macroscopiques, à une introduction aux mesures micrométriques, à l'étalonnage des oculaires micrométriques, et à la réalisation de mesures à partir de dessins ou de photographies. Dans la seconde partie, nous nous intéresserons à la réalisation pratique des mesures micrométriques, aux différentes sources d'erreurs, ainsi qu'à l'interprétation et à l'expression des résultats. Nous terminerons ce second volet avec une conclusion générale et la bibliographie.

2. Mesures, unités et étalons

Toutes les mesures physiques reposent sur un même principe : la comparaison de l'intensité d'une propriété des objets (appelée grandeur) avec une grandeur comparable, choisie comme étalon. Cet étalon définit l'unité utilisée pour exprimer le résultat d'une mesure. Les mesures de longueur n'échappent pas à cette règle, et résultent de la comparaison de la longueur des objets avec celle d'un étalon. Elles s'expriment en mètres ⁽³⁾, en multiples (surtout kilomètre) ou en sous-multiples (millimètre, micromètre, nanomètre, etc.) de celui-ci.

Le mètre a d'abord été défini comme une longueur égale au quarante millionième du méridien terrestre. Puis, pour une meilleure précision, le mètre a été concrétisé par une règle de platine iridiée dont la longueur coïncidait avec celle définie par l'étalon précédent. Ensuite, le mètre a été défini sur base de la longueur d'onde d'une radiation émise par l'atome de krypton 86. Enfin, depuis 1983, il est défini par le trajet que parcourt la lumière dans le vide en une fraction (1/299.792.458) de la seconde qui correspond à l'inverse de la vitesse de la lumière, de telle manière que la longueur ainsi définie coïncide également avec celle des étalons précédents. L'étalon a donc été, à maintes reprises, remplacé au cours des siècles, afin d'obtenir une meilleure précision et une plus grande reproductibilité, mais l'unité de mesure n'a pas changé.

⁽¹⁾ décédé accidentellement le 14 octobre 2001, à l'âge de 23 ans.

⁽²⁾ Il est à noter que la forme et les dimensions ne sont pas sans relation : le rapport des dimensions d'un objet donne souvent une idée de sa forme. Ainsi, pour prendre un exemple simple, on appellera sphéroïde un objet dont tous les diamètres sont de longueur égale ou presque ; par contre, un objet filiforme est au moins trois fois plus long que large...

⁽³⁾ Le mètre (m) est l'unité du Système International, mais d'autres unités sont utilisées dans des domaines particuliers : l'angström (Å), notamment utilisé en spectrométrie, équivaut au dixième de nanomètre (soit 10⁻¹⁰ m), tandis que l'année-lumière (a l), courante en astronomie, équivaut à une distance de quelque dix petamètres (exactement 9,461.10¹⁵ m).

3. Mesures à l'échelle macroscopique

La mesure des champignons à l'échelle macroscopique ne pose pas de grandes difficultés. Une simple règle suffit dans la plupart des cas, bien que l'utilisation du pied à coulisse soit toujours préférable. Cet instrument facilite les mesures en s'adaptant à la forme des objets grâce à divers artifices. D'autre part, sa précision est beaucoup meilleure que celle d'une simple règle : elle varie, selon les modèles, du dixième au cinquantième de millimètre. Le dixième de millimètre est suffisant en mycologie. De plus, sa large gamme de mesure, qui s'étend de la fraction de millimètre à la quinzaine de centimètres, rend le pied à coulisse adapté à la plupart des champignons, qu'il s'agisse de minuscules ascomycètes ou d'imposants basidiomycètes.

3.1. Le pied à coulisse

Le pied à coulisse (voir figure 1) est composé de deux éléments principaux : un ensemble de deux règles qui peuvent glisser l'une sur l'autre, et un système d'estimation des fractions du millimètre, à l'origine un vernier ou, sur certains modèles, une montre. Différents dispositifs font partie intégrante des deux règles : une pince et une sorte d'écarteur permettent notamment de mesurer respectivement le diamètre extérieur et le diamètre intérieur de cylindres ; une latte est destinée à la mesure de la hauteur de dénivellations ; enfin, une tige permet de mesurer la profondeur de cavités étroites. L'adaptation du pied à coulisse à la mycologie permet de mesurer avec précision, sans peine et sans devoir dépecer les champignons, le diamètre ou la longueur du stipe, le diamètre du chapeau, la longueur et la largeur des lames, la profondeur des apothécies, etc.

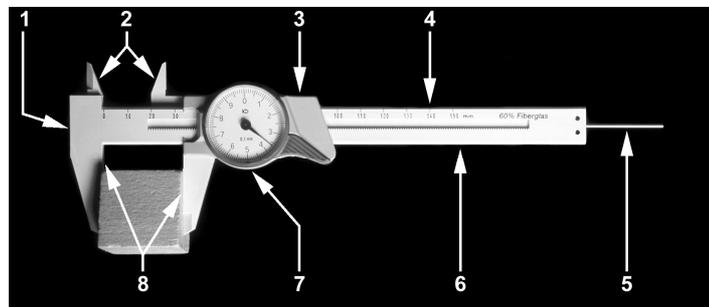
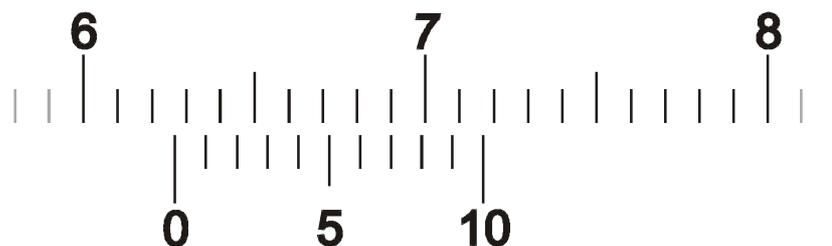


Figure 1 : Les différentes parties du pied à coulisse. 1- latte pour la mesure de la hauteur de dénivellations ; 2- sorte d'écarteur permettant notamment la mesure du diamètre intérieur de cylindres ; 3- règle mobile ; 4- Echelle millimétrique ; 5- tige permettant la mesure de la profondeur de cavités étroites ; 6- règle fixe ; 7- montre permettant la lecture des dixièmes de millimètre ; 8- sorte de pince permettant, par exemple, la mesure du diamètre extérieur de cylindres.

Ainsi, pour mesurer le diamètre du stipe d'un champignon, il suffit de le pincer délicatement entre les mors du pied à coulisse. La condition pour obtenir une mesure exacte est d'assurer un bon contact sans pour autant comprimer l'objet, car cela conduirait à une sous-estimation de la mesure. La lecture du nombre de centimètres se fait sur la règle fixe de l'instrument, en fonction de la position de la règle mobile. Le nombre de millimètres est lu soit sur la règle fixe également (modèles à vernier), soit sur la montre (modèles à montre). Enfin, les fractions de millimètres sont lues respectivement sur le vernier ou sur la montre. De légères variations de ces principes peuvent se présenter, notamment en rapport avec la précision du modèle considéré.

Le vernier est une petite règle, le plus souvent divisée en dix parties égales sur une longueur de neuf millimètres, qui est intégrée à la barre mobile du pied à coulisse. Chaque division du vernier a donc une longueur de neuf dixièmes de millimètre. Cette petite règle est juxtaposée à une règle millimétrique ordinaire gravée dans la partie fixe de l'instrument. La différence de longueur entre une division du vernier et une division de l'échelle millimétrique est donc de un dixième de millimètre. C'est cette différence qui est à la base de l'évaluation : il suffit de rechercher, parmi les onze traits (définissant dix divisions) du vernier, celui ⁽⁴⁾ qui est le plus exactement en face d'un trait quelconque de l'échelle fixe pour lire le nombre de dixièmes de millimètres (voir figure 2). L'évaluation des vingtièmes ou des cinquantièmes de millimètre que permettent les modèles les plus précis est basée sur le même principe.



⁽⁴⁾ Il ne peut jamais y avoir qu'un seul trait du vernier exactement en face d'un des traits de l'échelle millimétrique, sauf dans le cas où l'objet mesure un nombre entier de millimètres : le premier et le onzième trait du vernier sont alors chacun en face d'un des traits de l'autre échelle.

Figure 2 : Exemple de mesure d'un objet à l'aide d'un pied à coulisse muni d'un vernier. L'échelle millimétrique ordinaire est située en haut ; le vernier se trouve en bas. La lecture des centimètres et des millimètres se fait sur l'échelle fixe ; les dixièmes de millimètre sont lus sur le vernier. Etant donné que le zéro du vernier se trouve entre 6,2 et 6,3 cm, on peut dire que l'objet mesure plus de 62 mm, mais moins de 63 mm. La septième graduation du vernier est la seule qui soit exactement en face d'un des traits de l'échelle millimétrique. On doit donc ajouter sept dixièmes de millimètre à la mesure obtenue : l'objet de cet exemple mesure 62,7 mm.

La lecture des fractions du millimètre est plus rapide sur les modèles à montre : une aiguille tourne autour de son axe et indique un point, sur un cadran circulaire représentant un centimètre divisé en dixièmes de millimètres.

Il faut, pour obtenir des mesures exactes, s'assurer que le pied à coulisse indique bien zéro lorsqu'aucun objet n'y est inséré. Un système de « réglage du zéro » est parfois prévu. Il peut par exemple s'agir, pour les modèles à montre, d'une possibilité de rotation du cadran : on amène le zéro du cadran en face de l'aiguille lorsqu'aucun objet n'est inséré dans l'instrument. Sans ce réglage, les résultats risquent d'être entachés d'une erreur systématique correspondant à la différence entre le zéro réel et le zéro de l'instrument.

3.2. Expression des résultats

Enfin, l'expression des résultats dépend de la nature et de l'ordre de grandeur de l'objet mesuré. Il est bien évident que donner le diamètre du chapeau d'un tricholome au dixième de millimètre près n'a aucun sens, notamment à cause de la très grande variabilité naturelle des champignons. D'autre part, la moindre compression du chapeau, un imperceptible dessèchement, un choix non optimal du diamètre mesuré, et bien d'autres causes, font allègrement varier les mesures de plusieurs millimètres ; le centimètre (ou, à la rigueur, le demi-centimètre) constitue donc une approximation suffisante. Ainsi, on arrondira à dix centimètres le diamètre d'un chapeau pour lequel on a obtenu la mesure de nonante-six millimètres et quatre dixièmes.

Ordre de grandeur	Précision à respecter	Unité d'arrondissement	Exemple de mesure réelle	Expression du résultat
10 cm	± 0,5 cm	cm	86,1 mm	9 cm
5 cm	± 0,25 cm	$\frac{1}{2}$ cm	53,7 mm	5,5 cm
1 cm	± 0,5 mm	mm	11,5 mm	12 mm ⁽⁵⁾
5 mm	± 0,25 mm	$\frac{1}{2}$ mm	4,3 mm	4,5 mm
1 mm	± 0,05 mm	$\frac{1}{10}$ mm	0,8 mm	0,8 mm

Tableau 1 : Précision à prendre en compte lors de l'expression du résultat des mesures, sur base d'une erreur relative maximale de cinq pour cent. Les trois colonnes de gauche donnent les valeurs théoriques pour quelques ordres de grandeur fréquents en mycologie ; les deux colonnes de droite en donnent des exemples concrets.

En gros, il semble qu'une précision relative de cinq pour cent sur les mesures macroscopiques soit largement suffisante en mycologie. Le tableau 1 donne quelques ordres de grandeur pour des mesures courantes chez les champignons, avec la précision théorique à respecter et l'unité ou la fraction d'unité à laquelle les valeurs devraient être arrondies.

Dans ce tableau, le choix des unités pour l'expression des résultats n'est pas innocent. Des mesures telles que 9 cm ou 5,5 cm doivent bien être exprimées en centimètres et non pas en millimètres, car indiquer 90 mm ou 55 mm, dans le but principal d'éviter les décimales, supposerait que la mesure est précise au millimètre près, ce qui n'a pas de sens ⁽⁶⁾. De même, et de manière encore plus flagrante, les mesures comme 4,5 mm ou 0,8 mm doivent évidemment être exprimées en millimètres, et non pas en micromètres.

4. Mesures à l'échelle microscopique : généralités

A l'échelle microscopique, des mesures de différents types sont rendues possibles grâce à des dispositifs plus ou moins sophistiqués. Les mesures de longueurs, qui donnent accès, principalement par le truchement des méthodes mathématiques, aux mesures de surfaces et de volumes, voire de masses, sont évidemment les plus courantes. Mais le microscope permet également la réalisation de mesures d'épaisseur, d'angles, de viscosité, de dureté, d'indices de réfraction, etc., sur lesquelles nous ne nous étendrons pas.

Trois techniques d'usage courant permettent la réalisation des mesures de longueur au microscope : les oculaires micrométriques, le dessin et la photographie. Exactement comme à l'échelle macroscopique, les mesures micrométriques sont réalisées par comparaison avec un étalon, en l'occurrence le micromètre-objet ⁽⁷⁾. Celui-ci est composé d'une lame porte-objet sur laquelle des traits ont été gravés, espacés par un intervalle dont la longueur est connue avec exactitude. Il s'agit en général d'un millimètre divisé en centièmes, soit cent divisions de dix micromètres

⁽⁵⁾ On arrondit toujours à l'unité supérieure les décimales égales ou supérieures à cinq. Les décimales inférieures à cinq sont arrondies à l'unité inférieure.

⁽⁶⁾ En vérité, pour la même raison, au lieu d'indiquer « 5,5 cm », il serait préférable d'écrire « 5½ cm ».

⁽⁷⁾ Le micromètre-objet est en fait un étalon secondaire, construit à partir du mètre, l'étalon primaire.

chacune. Cet étalon servira aussi bien aux mesures réalisées à l'aide des oculaires micrométriques, qu'aux mesures qui découlent du dessin ou de la photographie.

Les oculaires micrométriques ont ceci de particulier que le constructeur y a inséré un graticule (LOCQUIN et LANGERON, 1978), composé d'un disque de verre portant une échelle graduée semblable à celle que représente la figure 3. La lentille d'œil⁽⁸⁾ est montée sur une bague filetée permettant de réaliser la mise au point du graticule.

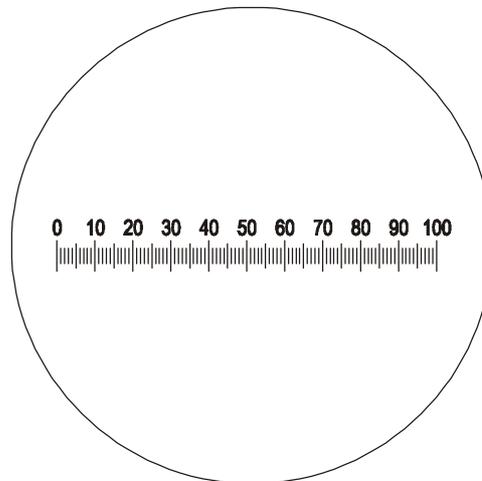


Figure 3 : Graticule des oculaires micrométriques.

On trouve également, sur le marché, des disques de verre gradués, destinés à être insérés au niveau du plan focal des oculaires ordinaires, afin de les convertir en oculaires micrométriques. En pratique, il suffit de dévisser la lentille d'œil, de déposer le graticule sur le diaphragme de l'oculaire, puis de revisser la lentille. Mais cette solution économique n'est pas sans présenter de sérieux inconvénients. D'une part, il est impossible, sans bricolage, de réaliser la mise au point de l'échelle micrométrique ; pour peu que l'œil de l'observateur ne soit pas parfaitement normal, cette échelle risquera d'apparaître constamment floue. D'autre part, le disque n'étant pas fixé, il peut se déplacer dans le tube de l'oculaire lors des mesures. Il est toutefois assez simple de remédier à cet inconvénient en scellant le graticule sur le diaphragme de l'oculaire au moyen d'une goutte de baume du Canada.

5. Etalonnage des oculaires micrométriques

5.1. Nécessité de l'étalonnage

L'objectif agrandit l'image de l'objet observé, mais pas celle du graticule de l'oculaire micrométrique. Par conséquent, alors que la distance réelle, absolue, qui sépare les traits du graticule est évidemment invariable, la valeur relative des divisions varie en fonction du grossissement. C'est ce qu'illustre la figure 4.

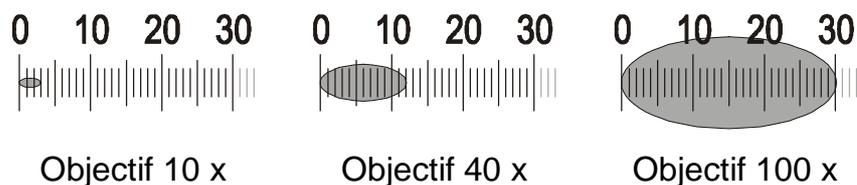


Figure 4 : Apparence d'un même objet, mesurant *environ* 30 µm, observé à l'aide d'un même oculaire micrométrique, mais avec trois objectifs différents. La longueur physique de l'objet est évidemment identique, qu'il soit observé à travers un objectif 10 x, un objectif 40 x ou un objectif 100 x. Mais la taille de son image varie selon le grossissement, alors que l'image des graduations, elle, ne varie pas. Cet exemple montre bien que la valeur d'une division du graticule varie en fonction du grossissement : avec l'objectif 10 x, une division vaut *environ* 10 µm ($\pm 30 \mu\text{m} / 3 \text{ graduations} \cong 10 \mu\text{m}$) ; avec l'objectif 40 x, une division vaut *environ* 2,5 µm ($\pm 30 \mu\text{m} / 12 \cong 2,5 \mu\text{m}$) ; avec l'objectif 100 x, une division vaut *environ* 1 µm ($\pm 30 \mu\text{m} / 30 \cong 1 \mu\text{m}$).

Trois facteurs principaux influencent le grossissement du microscope : la puissance de l'*objectif*, celle de l'*oculaire*, et la distance qui sépare l'objectif de l'oculaire, c'est-à-dire la *longueur du tube*⁽⁹⁾. Ces trois facteurs sont

⁽⁸⁾ On appelle « lentille d'œil » d'un oculaire la lentille contre laquelle se trouve l'œil lors de l'observation (voir figure 5/9). La lentille qui est située à l'autre extrémité de l'oculaire porte le nom de « lentille de champ ».

⁽⁹⁾ A l'origine, le tube du microscope était un simple cylindre métallique aux extrémités duquel étaient fixés l'objectif et l'oculaire. Actuellement, le nom de tube a été conservé, bien que son sens se soit élargi : il désigne, sur les microscopes modernes, l'ensemble des éléments mécaniques et optiques qui définissent le trajet de la lumière entre l'objectif et l'oculaire.

donc susceptibles de modifier la valeur relative des divisions de l'échelle micrométrique par rapport à l'image de l'objet. Dès lors, l'étalonnage devra être effectué pour *chacune des combinaisons* possibles de ces trois éléments.

D'une manière générale, les constructeurs calculent leurs oculaires micrométriques de telle manière qu'une division du graticule corresponde à *peu près* à un micromètre lors de l'observation avec les objectifs 100 x à immersion. C'est la raison pour laquelle de nombreuses personnes ont tendance à négliger l'étalonnage de leurs optiques...

L'étalonnage doit donc être effectué avec *chaque oculaire micrométrique*, y compris s'ils ont été fabriqués par le même constructeur et s'ils sont du même modèle. En effet, de très légères différences peuvent apparaître d'un lot à l'autre.

Il en va de même pour les objectifs : chaque oculaire micrométrique doit être étalonné *pour chaque objectif*, même si ceux-ci sont de la même marque et du même modèle. On pourrait être tenté de n'étalonner que l'objectif 100 x à immersion et de se dire que, puisqu'un objectif 10 x est dix fois moins puissant que l'objectif 100 x, il suffit de multiplier par dix le coefficient trouvé pour l'objectif 100 x afin d'obtenir celui de l'objectif 10 x. Mais ce serait une erreur, car le grossissement indiqué sur les objectifs et sur les oculaires n'est jamais qu'*approximatif*.

Enfin, l'étalonnage doit être fait en tenant compte des caractéristiques du tube du microscope, à savoir sa constitution et sa longueur. L'importance de ces deux paramètres, bien qu'elle soit largement méconnue, est absolument primordiale. Concrètement, l'étalonnage de chaque combinaison objectif-oculaire doit être réalisé pour une longueur et une constitution bien précises du tube.

La constitution du tube varie évidemment d'un microscope à l'autre ⁽¹⁰⁾, mais elle peut également varier sur un même instrument, par exemple lors du montage d'accessoires photographiques ou lors du remplacement d'une tête monoculaire par une tête binoculaire.

De même, la longueur du tube, bien qu'elle soit partiellement standardisée depuis longtemps, varie encore d'un constructeur à l'autre, essentiellement entre les valeurs de 160 ou de 170 mm. Mais la longueur du tube peut également varier sur un même microscope, non seulement suite au montage d'accessoires divers, mais également, très simplement, par la modification de l'*écart interpupillaire* ⁽¹¹⁾ ou du *réglage dioptrique* ⁽¹²⁾ ! Cette variation de la longueur du tube intéresse essentiellement les microscopes binoculaires, et peut conduire à des erreurs de mesure considérables ; nous verrons des exemples plus bas.

5.2. Réglages préalables à l'étalonnage

Tout microscope doit impérativement être réglé correctement avant d'être étalonné. Le protocole de réglage dépend de différents paramètres : nature monoculaire ou binoculaire du microscope ; type de mouvement permettant le réglage de l'écart interpupillaire ; présence d'une compensation automatique de la modification de la longueur du tube lors du réglage de l'écart interpupillaire ; possibilité d'une compensation manuelle ; possibilité de réglage dioptrique sur un des tubes porte-oculaires, voire sur les deux ; etc.

Nous avons mis au point treize protocoles, consignés plus bas, qui décrivent le réglage de seize modèles différents de microscopes. Il est bien évident que cet exposé n'est pas exhaustif, et que tous les types de microscopes n'ont pas pu être évoqués. Le choix s'est tout naturellement orienté vers les modèles les plus courants.

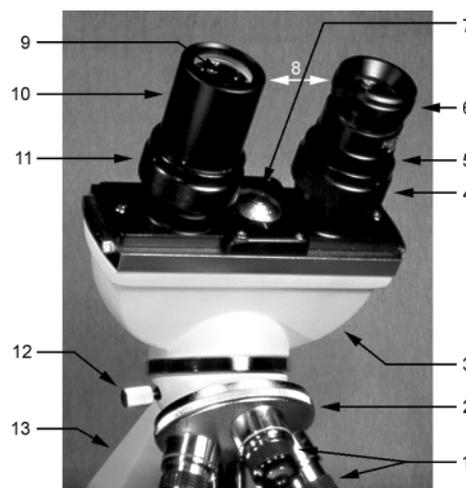


Figure 5 : Les différents organes de la partie supérieure d'un microscope binoculaire. 1- objectifs ; 2- revolver ; 3- tête binoculaire pouvant tourner sur 360 ° ; 4- bague de compensation de l'écart interpupillaire ; 5- bague permettant la rotation de l'oculaire micrométrique ; 6- bague de mise au point du graticule ; 7- échelle indiquant la valeur de l'écart interpupillaire ; 8- mouvement de

⁽¹⁰⁾ Pas question donc de prendre son oculaire micrométrique et de l'utiliser, sans recommencer l'étalonnage, pour mesurer des spores avec le microscope du voisin, comme nous l'avons vu faire souvent, notamment à l'occasion de congrès.

⁽¹¹⁾ L'écart interpupillaire n'est pas entendu ici au point de vue de l'observateur, mais il désignera la distance physique séparant le centre des deux oculaires des microscopes binoculaires.

⁽¹²⁾ On appelle « réglage dioptrique » la manoeuvre qui permet d'équilibrer les oculaires de manière à ce que les yeux perçoivent tous deux une image parfaitement nette. Le réglage dioptrique est rendu possible grâce à la présence, sur au moins un des deux tubes du microscope, d'une bague fileté permettant d'allonger ou de raccourcir légèrement le tube, afin de compenser une éventuelle différence de vision entre les deux yeux.

réglage de l'écart interpupillaire ; 9- lentille d'œil ; 10- oculaire ordinaire ; 11- bague de réglage dioptrique ; 12- vis de blocage de la tête binoculaire ; 13- potence, faisant partie du statif. L'échelle du tube portant l'oculaire micrométrique n'apparaît pas sur cette figure ; elle se trouve à l'arrière. La terminologie est fort semblable en ce qui concerne les microscopes monoculaires, à quelques détails près.

Le souci de clarté nous a poussé à limiter au maximum le nombre de renvois, c'est pourquoi le parti a été pris de rédiger des protocoles complets, chacun se suffisant à lui-même. Mais ce choix nous a obligé à faire de très nombreuses redites d'un protocole à l'autre. Afin de simplifier la recherche fastidieuse du protocole adapté à l'instrument que l'on s'est mis en devoir d'étalonner, nous avons rédigé une clé de choix du bon protocole, basée sur le même principe que les clés dichotomiques d'identification des champignons. La figure 5 nomme les principales parties du microscope dont il sera question dans les lignes qui suivent.

5.2.1. Clé de choix du bon protocole de réglage

Cette clé permet de choisir le bon protocole de réglage, parmi les treize qui sont décrits à la section suivante.

- [1.a] Le microscope est monoculaire.....PROTOCOLE A
- [1.b] Le microscope est binoculaire (si le microscope possède plus de deux tubes porte-oculaires, les seuls dont il sera question dans la suite de cette clé sont les deux qui servent à l'observation ordinaire) 2

- [2.a] Le réglage de l'écart interpupillaire se fait par *rotation* des tubes porte-oculaires autour d'un axe excentrique, comme dans le cas des jumelles. En principe, avec ce type de tête binoculaire, le réglage de l'écart interpupillaire n'influe pas sur la longueur du tube 4
- [2.b] Le réglage de l'écart interpupillaire se fait par *glissement* des deux tubes porte-oculaires le long d'un même axe (voir figure 5/8). Avec ce type de tête binoculaire, le réglage de l'écart interpupillaire peut influencer sur la longueur du tube 3

- [3.a] Le microscope possède un système de compensation automatique de la modification de la longueur du tube lorsque l'écart interpupillaire est changé (modèles haut de gamme). Ce système de compensation automatique est généralement visible par le fait que, lorsque l'utilisateur augmente l'écart interpupillaire, la longueur des deux tubes porte-oculaires diminue grâce à un mouvement mécanique, et vice versa 4
- [3.b] Aucune compensation automatique n'est prévue (modèles plus modestes) ; celle-ci doit se faire manuellement. La longueur des tubes porte-oculaires n'est donc pas modifiée automatiquement lorsque l'utilisateur règle l'écart interpupillaire de son instrument. En principe, la présence d'une échelle graduée doit permettre la lecture de la valeur de l'écart interpupillaire, exprimée en millimètres, et une échelle semblable doit être gravée sur au moins un des deux tubes porte-oculaires 5

- [4.a]Aucun des deux tubes porte-oculaires ne présente de bague de réglage dioptrique (modèles mal conçus)PROTOCOLE B
- [4.b] Un seul des deux tubes porte-oculaires présente une bague de réglage dioptrique (cas le plus fréquent)PROTOCOLE C
- [4.c] Une bague de réglage dioptrique est présente sur chacun des deux tubes.....PROTOCOLE D

- [5.a] Aucune échelle permettant la lecture de la valeur de l'écart interpupillaire n'est présente (modèles mal conçus) 6
- [5.b] Une échelle permet la lecture de la valeur de l'écart interpupillaire 7

- [6.a] Aucun des deux tubes porte-oculaires ne présente de bague de réglage dioptrique PROTOCOLE E
- [6.b] Un seul des deux tubes porte-oculaires présente une bague de réglage dioptrique PROTOCOLE F
- [6.c] Une bague de réglage dioptrique est présente sur chacun des deux tubes.....PROTOCOLE G

- [7.a] Aucun des deux tubes porte-oculaires ne présente d'échelle reprenant les valeurs possibles de l'écart interpupillaire (modèles mal conçus) 8
- [7.b] Un des deux tubes porte-oculaires présente à la fois une échelle correspondant à celle qui permet la lecture de la valeur de l'écart interpupillaire et une bague de réglage. L'autre tube porte-oculaire ne présente pas d'échelle, mais est souvent doté d'une bague de réglage dioptrique 9
- [7.c] Chacun des deux tubes porte-oculaires présente à la fois une échelle semblable à celle permettant la lecture de la valeur de l'écart interpupillaire et une bague de réglage. Cette dernière peut servir indifféremment à la compensation ou au réglage dioptrique.....PROTOCOLE H

- [8.a] Aucun des deux tubes porte-oculaires ne présente de bague de réglage dioptrique PROTOCOLE I
- [8.b] Un seul des deux tubes porte-oculaires présente une bague de réglage dioptrique PROTOCOLE J

- [8.c] Une bague de réglage dioptrique est présente sur chacun des deux tubes.....PROTOCOLE K
- [9.a] Le tube qui porte l'échelle présente une bague de réglage, mais l'autre tube en est dépourvu (modèles mal conçus)..... PROTOCOLE L
- [9.b] Les deux tubes, aussi bien celui qui présente une échelle que celui qui en est dépourvu, sont dotés d'une bague de réglage (cas le plus fréquent)..... PROTOCOLE M

5.2.2. Protocoles de réglage

Ces protocoles aiguillent le choix, parmi les deux tubes porte-oculaires, de celui qui devra recevoir l'oculaire micrométrique. Une fois ce choix effectué, il faudra absolument veiller à toujours insérer l'oculaire micrométrique dans le même tube, que ce soit lors de l'étalonnage ou pour la réalisation des mesures. Les protocoles indiquent également, pour chaque type de microscope, de quelle manière l'écart interpupillaire et le réglage dioptrique doivent être établis afin de pouvoir procéder à l'étalonnage et, ultérieurement, aux mesures. Enfin, ils renseignent sur la possibilité éventuelle de pouvoir modifier l'écart interpupillaire et/ou le réglage dioptrique après avoir réalisé l'étalonnage, sans risquer d'introduire des erreurs de mesure, et sans devoir recommencer l'étalonnage.

Toutefois, afin d'éviter de les répéter dans chacun des protocoles, les techniques générales à utiliser pour réaliser, de manière optimale, les réglages dioptrique et d'écart interpupillaire, ne seront décrits qu'à la section 5.2.4.

5.2.2.1. Microscopes monoculaires

PROTOCOLE A : L'étalonnage des microscopes monoculaires ne présente pas de difficulté particulière, car la longueur de leur tube, en dehors de l'adaptation d'accessoires, est rarement amenée à varier. Il suffit donc d'insérer l'oculaire micrométrique dans le tube porte-oculaire et de procéder à l'étalonnage avec chaque objectif.

5.2.2.2. Microscopes binoculaires à réglage interpupillaire n'influant pas sur la longueur du tube

PROTOCOLE B : L'étalonnage de ce type de microscopes se ramène à celui des microscopes monoculaires, car, en dehors de l'adaptation d'accessoires, la longueur de leurs tubes n'est en principe pas amenée à varier. Il suffit d'insérer l'oculaire micrométrique dans un des deux tubes porte-oculaires et de procéder à l'étalonnage avec chaque objectif. Le réglage de l'écart interpupillaire peut être modifié à n'importe quel moment, même après l'étalonnage, sans aucun risque d'introduire des erreurs de mesure. Le réglage dioptrique est, quant à lui, impossible sans bricolage. Voyez la section 5.2.3.

PROTOCOLE C : La longueur du tube portant la bague est amenée à varier chaque fois que l'observateur effectue le réglage dioptrique. Il est donc impératif d'insérer l'oculaire micrométrique dans le tube fixe, c'est-à-dire celui qui ne possède pas de bague. Procéder ensuite à l'étalonnage de chaque objectif. Dans ces conditions, les réglages dioptrique et d'écart interpupillaire peuvent être effectués à n'importe quel moment, même après l'étalonnage, sans aucun risque d'introduire des erreurs de mesure. Voyez la section 5.2.3.

PROTOCOLE D : La longueur de chacun des deux tubes est amenée à varier toutes les fois que l'utilisateur modifie le réglage dioptrique du tube concerné. Il est donc impératif d'immobiliser le tube destiné à recevoir l'oculaire micrométrique : choisir ce tube et le fixer, par exemple à l'aide d'une bande adhésive, dans une position quelconque ⁽¹³⁾. Une autre solution consiste à graver un repère permettant de retrouver la même position chaque fois que des mesures devront être effectuées. Procéder ensuite à l'étalonnage de chaque objectif. Le réglage de l'écart interpupillaire peut être effectué à n'importe quel moment, même après l'étalonnage, sans aucun risque d'introduire des erreurs de mesure. Il en va de même pour le réglage dioptrique, à condition qu'il soit effectué uniquement sur le tube qui ne porte pas l'oculaire micrométrique. Voyez la section 5.2.3.

5.2.2.3. Microscopes binoculaires à réglage interpupillaire influant sur la longueur du tube

PROTOCOLE E : La longueur des tubes de ce type de microscopes est amenée à varier chaque fois que l'observateur modifie l'écart interpupillaire, sans repère ni compensation possible. Il est donc impératif de régler précisément l'écart interpupillaire et de l'immobiliser fermement dans une position convenable (par exemple à l'aide de bandes adhésives), ou au moins de graver un repère permettant de retrouver cette position chaque fois que des mesures devront être

⁽¹³⁾ Le début ou la fin de course de la bague représentent les deux meilleures positions, car la butée constitue un point de repère précieux. Le choix du début ou de la fin de course dépend de la vision de l'observateur, si elle n'est pas parfaitement normale ou s'il ne porte pas ses lunettes lorsqu'il observe au microscope. En effet, un mauvais choix risque d'entraver le réglage dioptrique sur le tube qui ne porte pas l'oculaire micrométrique ; le plus sûr est de réaliser des essais. Il est à noter que les personnes atteintes d'astigmatisme doivent toujours porter leurs lunettes lorsqu'elles observent au microscope. Les myopes, les hypermétropes et les presbytes, par contre, peuvent indifféremment observer avec ou sans leurs bécicles, sans que cela ait une influence sur la qualité de l'image perçue, ni d'ailleurs sur l'étalonnage de l'oculaire micrométrique.

effectuées. Insérer ensuite l'oculaire micrométrique dans un des deux tubes porte-oculaires et procéder à l'étalonnage de chaque objectif. Le réglage dioptrique est impossible sans bricolage. Rappelons que l'écart interpupillaire ne peut pas être modifié sans recommencer l'étalonnage.

PROTOCOLE F : La longueur des tubes de ce type de microscopes est amenée à varier chaque fois que l'observateur modifie l'écart interpupillaire, sans repère ni compensation possible. Il est donc impératif de régler précisément l'écart interpupillaire et de l'immobiliser fermement dans une position convenable (par exemple à l'aide de bandes adhésives), ou au moins de graver un repère permettant de retrouver cette position chaque fois que des mesures devront être effectuées. D'autre part, la longueur du tube portant la bague varie chaque fois que l'observateur effectue le réglage dioptrique. L'oculaire micrométrique doit donc obligatoirement être inséré dans le tube fixe, c'est-à-dire celui qui ne possède pas de bague. Procéder ensuite à l'étalonnage de chaque objectif. Dans ces conditions, le réglage dioptrique peut être effectué à n'importe quel moment, même après l'étalonnage, sans aucun risque d'introduire des erreurs de mesure. Rappelons que l'écart interpupillaire ne peut pas être modifié sans recommencer l'étalonnage.

PROTOCOLE G : La longueur des tubes de ce type de microscopes est amenée à varier chaque fois que l'observateur modifie l'écart interpupillaire ou le réglage dioptrique, sans repère ni compensation possible. Il est donc impératif de régler précisément l'écart interpupillaire et de l'immobiliser fermement dans une position convenable (par exemple à l'aide de bandes adhésives), ou au moins de graver un repère permettant de retrouver cette position chaque fois que des mesures devront être effectuées. De même, il est indispensable d'immobiliser le tube destiné à recevoir l'oculaire micrométrique : choisir ce tube et le fixer dans une position quelconque ⁽¹⁴⁾. Là aussi, la gravure d'un repère peut être suffisante. Procéder ensuite à l'étalonnage de chaque objectif. Le réglage dioptrique peut être effectué à n'importe quel moment, même après l'étalonnage, sans aucun risque d'introduire des erreurs de mesure, à condition qu'il soit effectué uniquement sur le tube qui ne porte pas l'oculaire micrométrique. Rappelons que l'écart interpupillaire ne peut pas être modifié sans recommencer l'étalonnage.

PROTOCOLE H : La longueur des tubes de ce type de microscopes est amenée à varier chaque fois que l'observateur modifie le réglage dioptrique ou l'écart interpupillaire, mais une compensation est possible. Dès lors, la seule règle qu'il est indispensable de respecter pour éviter les erreurs de mesure est de toujours reporter la valeur de l'écart interpupillaire (lue sur l'échelle indicatrice) sur l'échelle portée par le tube dans lequel se trouve l'oculaire micrométrique. En pratique, commencer par régler l'écart interpupillaire, puis insérer l'oculaire micrométrique dans un des deux tubes porte-oculaires. Reporter la valeur de l'écart interpupillaire sur l'échelle de ce tube, en tournant la bague de compensation. Procéder ensuite à l'étalonnage de chaque objectif. Le réglage dioptrique peut donc être effectué à n'importe quel moment, même après l'étalonnage, à condition qu'il le soit uniquement sur le tube qui ne porte pas l'oculaire micrométrique. Il en va de même pour l'écart interpupillaire, à condition de toujours reporter la valeur de cet écart sur l'échelle du tube qui porte l'oculaire micrométrique.

PROTOCOLE I : La longueur des tubes de ce type de microscopes est amenée à varier chaque fois que l'observateur modifie l'écart interpupillaire, sans compensation possible. Il est donc impératif de commencer par régler précisément l'écart interpupillaire et d'en noter soigneusement la valeur, qui constituera la « position de mesure ». Insérer ensuite l'oculaire micrométrique dans un des deux tubes porte-oculaires et procéder à l'étalonnage de chaque objectif. Le réglage dioptrique est impossible sans bricolage, et le réglage interpupillaire doit être ramené à la « position de mesure » avant de procéder aux mesures.

PROTOCOLE J : La longueur des tubes de ce type de microscopes est amenée à varier chaque fois que l'observateur modifie l'écart interpupillaire, sans compensation possible. Il est donc impératif de commencer par régler précisément l'écart interpupillaire et d'en noter soigneusement la valeur, qui constituera la « position de mesure ». D'autre part, la longueur du tube portant la bague varie chaque fois que l'observateur effectue le réglage dioptrique. L'oculaire micrométrique doit donc obligatoirement être inséré dans le tube fixe, c'est-à-dire celui qui ne possède pas de bague. Procéder ensuite à l'étalonnage de chaque objectif. Dans ces conditions, le réglage dioptrique peut être effectué à n'importe quel moment, même après l'étalonnage, sans aucun risque d'introduire des erreurs de mesure. Le réglage interpupillaire doit être ramené à la « position de mesure » avant de procéder aux mesures

PROTOCOLE K : La longueur des tubes de ce type de microscopes est amenée à varier chaque fois que l'observateur modifie l'écart interpupillaire ou le réglage dioptrique, sans compensation possible. Il est donc impératif de commencer par régler précisément l'écart interpupillaire et d'en noter soigneusement la valeur, qui constituera la « position de mesure ». De même, il est indispensable d'immobiliser le tube destiné à recevoir l'oculaire micrométrique : choisir ce tube et le fixer, par exemple à l'aide d'une bande adhésive, dans une position quelconque ⁽¹⁵⁾. Une autre solution consiste à graver un repère permettant de retrouver la même position chaque fois que des mesures devront être effectuées. Procéder ensuite à l'étalonnage de chaque objectif. Le réglage dioptrique peut être effectué à n'importe quel moment, même après l'étalonnage, sans aucun risque d'introduire des erreurs de mesure, à condition qu'il soit effectué

⁽¹⁴⁾ Voir ⁽¹³⁾.

⁽¹⁵⁾ Voir ⁽¹³⁾.

uniquement sur le tube qui ne porte pas l'oculaire micrométrique. De même, le réglage interpupillaire peut être modifié à condition de le ramener à la « position de mesure » avant de procéder aux mesures.

PROTOCOLE L : La longueur des tubes de ce type de microscopes est amenée à varier chaque fois que l'observateur modifie l'écart interpupillaire, mais une compensation est possible, grâce à l'échelle qui se trouve sur un des deux tubes porte-oculaires. C'est donc dans ce tube que doit impérativement être inséré l'oculaire micrométrique. Dans ces conditions, la seule règle qu'il est indispensable de respecter pour éviter les erreurs de mesure est de toujours reporter la valeur de l'écart interpupillaire (lue sur l'échelle indicatrice) sur l'échelle portée par le tube dans lequel se trouve l'oculaire micrométrique. En pratique, commencer par régler l'écart interpupillaire, puis insérer l'oculaire micrométrique dans le tube portant l'échelle. Reporter la valeur de l'écart interpupillaire sur l'échelle de ce tube en tournant la bague de compensation. Procéder ensuite à l'étalonnage de chaque objectif. Le réglage de l'écart interpupillaire peut donc être effectué à n'importe quel moment, même après l'étalonnage, à condition de toujours reporter la valeur de cet écart sur l'échelle du tube qui porte l'oculaire micrométrique. Etant donné que l'autre tube porte-oculaire ne présente pas de bague de réglage dioptrique, ce dernier est impossible sans bricolage.

PROTOCOLE M : La longueur des tubes de ce type de microscopes est amenée à varier chaque fois que l'observateur modifie l'écart interpupillaire, mais une compensation est possible, grâce à l'échelle qui se trouve sur un des deux tubes porte-oculaires. C'est donc dans ce tube que doit impérativement être inséré l'oculaire micrométrique. Dans ces conditions, la seule règle qu'il est indispensable de respecter pour éviter les erreurs de mesure est de toujours reporter la valeur de l'écart interpupillaire (lue sur l'échelle indicatrice) sur l'échelle portée par le tube dans lequel se trouve l'oculaire micrométrique. En pratique, commencer par régler l'écart interpupillaire, puis insérer l'oculaire micrométrique dans le tube portant l'échelle. Reporter la valeur de l'écart interpupillaire sur l'échelle de ce tube en tournant la bague de compensation. Procéder ensuite à l'étalonnage de chaque objectif. Le réglage dioptrique peut donc être effectué à n'importe quel moment, même après l'étalonnage, à condition qu'il le soit uniquement sur le tube qui ne porte pas l'oculaire micrométrique. De même, l'écart interpupillaire peut être modifié, à condition de toujours reporter la valeur de cet écart sur l'échelle du tube qui porte l'oculaire micrométrique.

5.2.3. Remarque importante concernant les protocoles B, C et D.

Les protocoles B, C et D s'appliquent aux microscopes pour lesquels le réglage de l'écart interpupillaire n'influence pas la longueur du tube, soit parce que ce réglage se fait par rotation des tubes porte-oculaires autour d'un axe excentrique, soit parce qu'un système de compensation automatique est prévu.

Il est simple et très utile de vérifier que la longueur du tube est effectivement invariable : il suffit de mesurer deux fois un même objet (assez long de préférence), aux deux positions extrêmes de l'écart interpupillaire : la longueur obtenue doit être rigoureusement identique dans les deux cas. Bien entendu, ce test n'est valable que si l'écart interpupillaire est le seul paramètre qui varie. Eviter donc de modifier le réglage dioptrique entre les deux mesures... D'autre part, une mesure absolue, exprimée en micromètres, n'est pas nécessaire : il suffit de compter les graduations, et éventuellement d'évaluer les fractions de graduations si leur nombre n'est pas entier. Pour la même raison, n'importe quel objectif peut convenir à cette opération. Dans le cas, peu probable, où les longueurs obtenues aux deux extrémités de l'échelle ne seraient pas exactement identiques, il faudrait reprendre la clé de choix du bon protocole à partir de la question 5.

Une bonne indication de l'invariabilité probable de la longueur du tube est également donnée par l'absence d'échelle indiquant la valeur de l'écart interpupillaire, combinée à l'absence d'échelle correspondante sur les tubes porte-oculaires. Mais attention aux constructeurs peu consciencieux qui ne se préoccupent pas nécessairement des erreurs que pourraient commettre les utilisateurs de leurs microscopes en modifiant l'écart interpupillaire de leur appareil.

5.2.4. Réglage de l'écart interpupillaire et réglage dioptrique

5.2.4.1. Réglage de l'écart interpupillaire

L'idéal, afin de parvenir aisément à régler l'écart interpupillaire d'un microscope, est de le faire dans des conditions normales d'observation, avec une préparation sous les yeux. Le plus simple est d'écartier au maximum les deux tubes porte-oculaires, puis de les rapprocher lentement, jusqu'à ce que les deux images se confondent exactement en une seule. Ne pas oublier de reporter, si nécessaire, la valeur de l'écart interpupillaire (lue grâce à l'échelle indicatrice) sur le tube qui porte l'oculaire micrométrique. L'exactitude de cette correction peut aisément être vérifiée, en s'assurant que les mesures obtenues à la valeur minimale de l'écart interpupillaire sont rigoureusement identiques à celles que l'on obtient lorsque celui-ci est maximal. Si ce n'était pas le cas, il faudrait réaliser l'étalonnage et les mesures en conservant toujours exactement le même écart interpupillaire.

Lorsqu'on n'a aucune habitude de l'observation binoculaire, le réglage de l'écart interpupillaire peut s'avérer délicat, car l'image n'est entièrement visible que lorsque les yeux sont parfaitement dans l'axe des oculaires. Le moindre mouvement des yeux ou de la tête suffit à faire disparaître une des deux images, sans qu'on s'en aperçoive toujours immédiatement, à cause de l'autre image qui continue à être observée normalement. Pour cette raison, il est important de choisir un siège de hauteur convenable, afin d'être dans une position d'observation confortable, et que les yeux soient bien dans l'axe des oculaires, sans devoir faire d'effort pour y parvenir.

5.2.4.2. Réglage dioptrique

Il ne peut être effectué que si le tube qui ne porte pas l'oculaire micrométrique est pourvu d'une bague de réglage. On choisira, pour réaliser le réglage dioptrique, une préparation qui présente des détails particulièrement fins, quoique suffisamment contrastés. Les diatomées, vendues par bon nombre de fournisseurs de microscopes afin de démontrer la qualité de leurs optiques, conviennent parfaitement à cet effet. La préparation sera observée avec le plus fort objectif à sec dont on dispose (en général 40 x). Commencer par occulter l'œil qui ne regarde pas dans l'oculaire micrométrique. A l'aide du mouvement fin - vis micrométrique (¹⁶) - du microscope, réaliser la mise au point très précise d'un détail subtil de la préparation. Changer d'œil et, sans plus toucher à la vis micrométrique, ajuster la mise au point sur le même détail, à l'aide de la bague de réglage dioptrique qui se trouve sur le tube par lequel l'œil ouvert observe, c'est-à-dire, maintenant, le tube qui porte l'oculaire ordinaire, et non pas l'oculaire micrométrique.

5.3. Pratique de l'étalonnage proprement dit

Le but de l'abondante littérature (!) qui précède est de permettre, quels que soient le type du microscope et les particularités des yeux de l'observateur, la réalisation, dans des conditions parfaitement constantes, de l'étalonnage et des mesures : c'est la seule manière d'arriver à des résultats exacts et reproductibles, et d'éviter de devoir recommencer l'étalonnage avant chaque mesure. C'est ainsi qu'il ne doit, en principe, être réalisé qu'une seule fois avec chaque oculaire micrométrique.

Le micromètre-objet, qui est la clé de l'étalonnage, a déjà été décrit à la section 4 : il s'agit d'une lame porte-objet sur laquelle des traits, généralement espacés d'un centième de millimètre, ont été gravés.

La première étape de l'étalonnage consiste à mettre au point le graticule de l'oculaire micrométrique en vissant ou en dévissant la bague de la lentille d'œil, jusqu'à ce que traits et chiffres apparaissent nettement. Prendre garde, ce faisant, que le tube porte-oculaire, entraîné par le mouvement, ne tourne pas lui-même (ce qui provoquerait une modification de sa longueur). Positionner ensuite le micromètre-objet sur la platine du microscope, et le mettre au point avec le premier objectif pour lequel l'étalonnage doit être réalisé. Tourner l'oculaire micrométrique dans le tube (attention : pas la bague du tube ni la bague de la lentille d'œil !), de manière à obtenir les deux échelles en position parallèle.

Juxtaposer (ou mieux : superposer) les deux échelles en déplaçant le micromètre-objet sur la platine (la présence d'une surplatine ou « chariot » est presque indispensable pour mener à bien cette opération), et ajuster très exactement un trait de l'échelle-étalon en face du premier trait de l'échelle oculaire. Rechercher ensuite une éventuelle correspondance entre deux traits, vers la fin de l'échelle oculaire. Compter, sur chacune des deux échelles, le nombre de divisions qui séparent les deux points de correspondance. Si, comme c'est le cas la plupart du temps, cette correspondance n'existe pas, alors il faut évaluer les fractions de divisions sur une des deux échelles. La figure 6 donne un exemple d'étalonnage pour un objectif 100 x.

Le calcul du coefficient de conversion, C_i , pour l'objectif i considéré, se fait alors grâce à la relation suivante :

$$C_i = \frac{m \times l}{n} \qquad \text{Relation 1}$$

Dans cette relation, m est le nombre de divisions comptées sur le micromètre-objet, entre les deux points de correspondance ; l est la longueur, exprimée en micromètres, d'une division de l'étalon ; enfin, n est le nombre de divisions comptées sur l'échelle oculaire. La valeur obtenue pour C_i étant rarement entière, le mieux est de ne conserver que trois chiffres significatifs lors de son expression.

Afin de diminuer l'erreur due à l'expérimentateur, il est préférable de réaliser, pour chaque objectif, plusieurs étalonnages, et de prendre pour C_i la moyenne de toutes les valeurs obtenues. D'autre part, l'erreur relative sur m et sur n , et donc sur C_i , sera d'autant plus faible que les valeurs de m et de n seront grandes. Il est donc primordial de réaliser l'étalonnage sur une longueur aussi importante que possible des deux échelles. Enfin, plus le grossissement de l'objectif

⁽¹⁶⁾ Il est bien entendu que la vis micrométrique n'a aucun rapport avec l'oculaire micrométrique. Elle porte ce nom parce que l'ampleur du mouvement vertical qu'elle imprime à la platine du microscope (ou au tube des modèles anciens) est de l'ordre du micromètre.

à étalonner sera important, plus les traits de l'étalon apparaîtront grossiers. L'étalonnage des objectifs puissants devra être réalisé en tenant compte de l'épaisseur des traits, c'est-à-dire que la recherche des deux points de correspondance entre l'échelle oculaire et l'échelle d'étalonnage devra être effectuée par rapport au bord gauche, au centre, ou au bord droit, des traits de l'étalon.

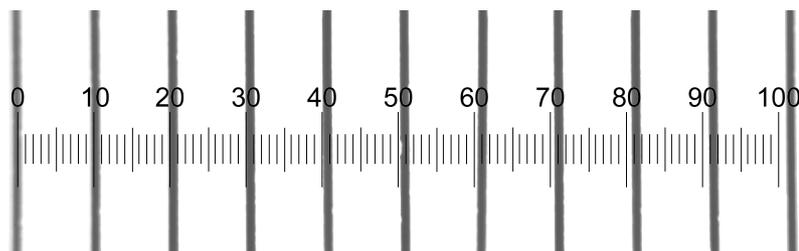


Figure 6 : Etalonnage d'un objectif 100 x à immersion. L'étalon est la plus grosse des deux échelles ; une division correspond à 10 μm . Remarquer l'épaisseur importante des traits à ce grossissement. L'autre échelle est celle de l'oculaire micrométrique. Dans le cas de cet objectif, 91,5 divisions de l'échelle oculaire correspondent à 9 divisions de l'étalon. Le coefficient C_{100} est donc, en vertu de la relation 1, de 0,984 pour cet objectif.

Au terme de l'étalonnage d'un oculaire micrométrique sur un microscope particulier, on se retrouve avec plusieurs valeurs de C_i , une pour chaque objectif. Par exemple, les valeurs C_4 , C_{10} , C_{40} , et C_{100} , se rapportant respectivement aux objectifs 4 x, 10 x, 40 x et 100 x, sont voisines de 25, 10, 2,5 et 1, en vertu de ce qui a été dit au paragraphe 5.1. Concrètement, C_i représente le nombre de micromètres (C) de l'objet correspondant à une division de l'échelle oculaire, lorsque l'objet est observé à l'aide de l'objectif i . Il suffira donc, pour obtenir, en micromètres, la longueur (L) d'un objet mesuré, de multiplier par le coefficient C_i le nombre (n) de divisions de l'échelle oculaire couvertes par cet objet :

$$L = n \times C_i \quad \text{Relation 2}$$

6. Cas particuliers du dessin et de la photographie

La réalisation de mesures à partir de dessins ou de photographies demande l'observation des mêmes règles générales que pour les mesures effectuées à l'aide des oculaires micrométriques : un étalonnage doit être réalisé pour chaque boîtier photographique ou pour chaque tube à dessiner, sur chaque microscope, et avec chaque objectif. Les mesures doivent être réalisées dans des conditions parfaitement constantes, et identiques à celles de l'étalonnage.

6.1. Réalisation de mesures à partir de la pellicule ou du dessin

La conduite de l'étalonnage est très simple, quelle que soit la technique de reproduction mise en oeuvre : il suffit, après avoir photographié ou dessiné un objet, de remplacer la préparation par le micromètre-objet et de photographier ou de dessiner celui-ci dans les mêmes conditions : même matériel, même tirage, même position en hauteur de la feuille pour le dessin, etc. On mesure ensuite, à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse, sur le négatif, la diapositive ou l'épure, autant de divisions que possible de la reproduction du micromètre-objet, et on obtient le coefficient de conversion, C_r , grâce à la relation suivante :

$$C_r = \frac{m \times l}{d} \quad \text{Relation 3}$$

Dans cette relation, m est le nombre de divisions du micromètre-objet prises en compte ; l représente la longueur réelle, exprimée en *micromètres*, d'une de ces divisions ; et d correspond à la longueur de l'ensemble des divisions, exprimée en *millimètres* et mesurée sur la reproduction.

Pour obtenir la longueur, exprimée en *micromètres*, d'un objet dessiné ou photographié, il suffit de mesurer celui-ci sur la pellicule ou sur le dessin, et de multiplier la longueur obtenue, exprimée en *millimètres*, par le coefficient de conversion C_r ⁽¹⁷⁾. Il est à noter que cette technique de mesure est relativement peu précise, particulièrement à partir de dessins, qui ne permettent jamais une reproduction parfaitement fidèle des objets. La figure 7 donne un exemple de mesure d'une même cystide, à partir d'un dessin et d'une photographie.

⁽¹⁷⁾ De la même manière que C_i représente le nombre de micromètres (C) de l'objet correspondant à une graduation de l'oculaire micrométrique en fonction du grossissement (i), le coefficient C_r représente le nombre de micromètres (C) de l'objet correspondant à un millimètre sur la reproduction r . C est donc un nombre sans unité, puisqu'il se rapporte à des micromètres par millimètres (équivalent à des micromètres par mille micromètres), c'est-à-dire à des pour mille.

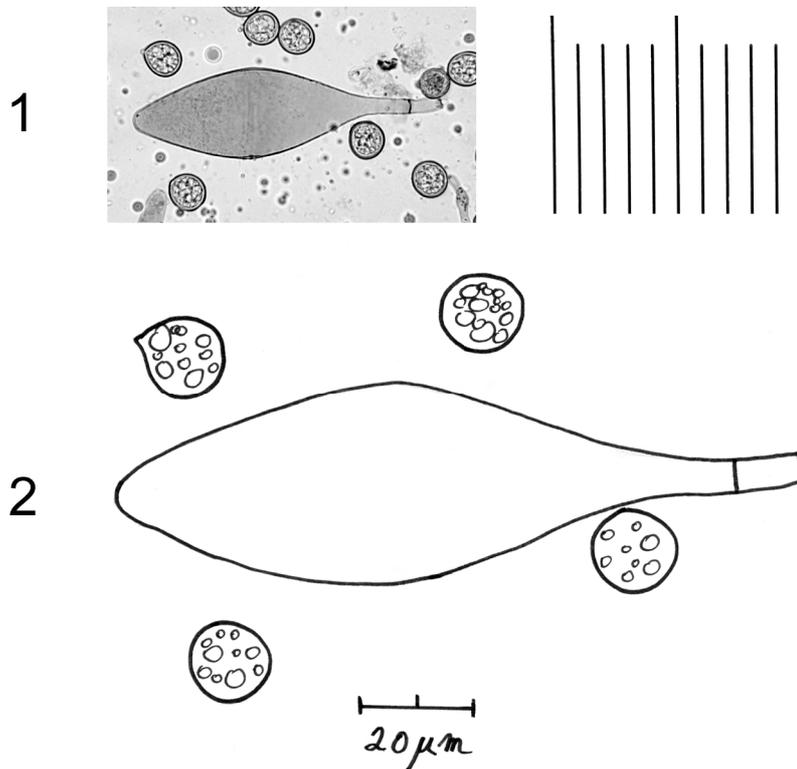


Figure 7 : Mesure d'une même cystide d'*Oudemansiella mucida*, à partir d'un dessin ou d'une photographie. 1- à partir d'une photographie : dix divisions du micromètre-objet mesurent 32,5 mm. Le coefficient C_r vaut donc, ici, 3,08. Sur la photographie, la cystide mesure 36,5 mm. Sa longueur réelle est dès lors de 112,5 μm . 2- à partir d'un dessin : deux divisions de l'étalon mesurent 15 mm, ce qui correspond à un coefficient C_r de 1,33. La longueur de la cystide est de 82 mm sur le dessin ; sa longueur réelle est donc de 109 μm . La différence constatée entre les deux valeurs obtenues pour la longueur réelle de la cystide est due à de légères imprécisions au niveau du dessin, qui ne reproduit évidemment pas aussi fidèlement l'objet que la photographie. Notons encore que, si cette figure n'avait pas été une illustration mais bien un cas réel de mesure, elle se serait plutôt rapportée à la réalisation de mesures à partir d'images secondaires (section suivante) qu'à partir de dessins ou de photographies proprement dits, car les images présentées ci-dessus ont été numérisées et imprimées avant d'être mesurées. Au lieu d'un coefficient C_r , nous aurions donc dû calculer un coefficient $C_{r'}$, comme nous le verrons plus bas.

6.2. Réalisation de mesures sur des images secondaires

Le tirage sur papier argentique, la projection de diapositives, la numérisation de photographies, et bien d'autres, sont autant d'opérations qui infligent une modification (le plus souvent une augmentation) de taille à l'image. Afin de pouvoir réaliser des mesures à partir d'épreuves, d'images projetées sur écran ou bien numérisées, il faut tenir compte de ce facteur d'agrandissement supplémentaire, en calculant un nouveau coefficient de conversion, $C_{r'}$. La meilleure méthode, pour y parvenir, est de faire subir exactement les mêmes opérations à la photographie de l'étalon qu'à celle de l'objet : projection à l'aide du même matériel, tirage à un agrandissement équivalent, ou numérisation à des résolutions identiques.

On mesure alors, sur l'image finale de l'étalon, le plus grand nombre possible de divisions, puis on calcule le coefficient $C_{r'}$ ⁽¹⁸⁾ à l'aide de la relation suivante, similaire à la relation 3, mais dans laquelle d' représente, en millimètres, la longueur de l'ensemble des divisions mesurées sur l'image finale de l'étalon, et non plus sur la pellicule :

$$C_{r'} = \frac{m \times l}{d'} \quad \text{Relation 4}$$

Une autre méthode, permettant de calculer $C_{r'}$, est de multiplier C_r par le rapport entre la dimension (p) du négatif ou de la diapositive et la dimension (f) de l'image finale (relation 5). Mais cette méthode est moins précise, car elle augmente le nombre d'étapes nécessaires au calcul du coefficient de conversion, et donc l'erreur relative sur la valeur finale obtenue pour $C_{r'}$ augmente également.

$$C_{r'} = C_r \times \frac{p}{f} \quad \text{Relation 5}$$

⁽¹⁸⁾ Egalement sans unité. Voir ⁽¹⁷⁾.

Concernant le dessin, la technique est absolument comparable : il suffit d'astreindre le dessin de l'étalon aux mêmes opérations (photocopie, agrandissement, réduction, numérisation, etc.) que le dessin de l'objet lui-même, puis d'utiliser le rapport entre la dimension réelle de l'étalon et sa longueur mesurée sur l'image finale pour trouver le nouveau coefficient de conversion C_r' .

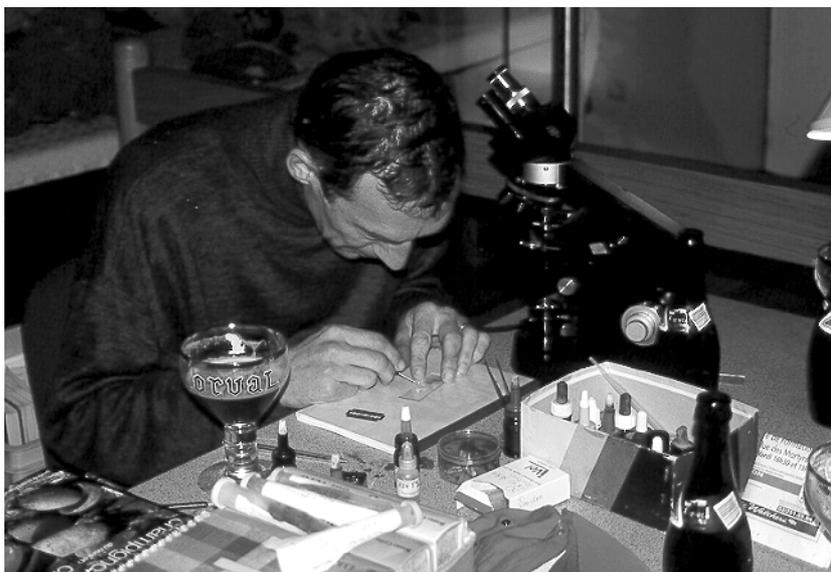
Afin d'obtenir, en micromètres, la longueur exacte d'un objet à partir de son image finale, de quelque nature qu'elle soit, il convient de multiplier, par le coefficient C_r' , la longueur de l'image, exprimée en millimètres. Enfin, il est à noter que ce coefficient permet, grâce à la relation suivante, de calculer aisément l'échelle, E , de l'image finale :

$$E = \frac{1000}{C_r'} \quad \text{Relation 6}$$

6.3. Fréquence utile d'étalonnage

En principe, pour autant qu'on prenne soin de toujours photographier dans des conditions constantes (même boîtier, même oculaire, même tirage, etc.), une photographie du micromètre-objet, réalisée avec chacun des objectifs, est parfaitement suffisante pour permettre la mesure d'objets à partir de toutes les photographies ultérieures, qu'elles soient sous forme de négatifs, de diapositives, d'épreuves sur papier argentique, qu'elles soient projetées à l'écran ou numérisées puis imprimées, etc. En effet, toutes ces opérations peuvent être appliquées aux photographies du micromètre-objet autant de fois que cela est nécessaire.

De même, un dessin de l'étalon, effectué avec chaque objectif, est en principe suffisant, à condition que le croquis des objets soit toujours réalisé en conservant la même position du tube à dessiner et de son miroir (s'il s'agit d'un modèle à miroir), et à condition que le papier soit toujours positionné exactement à la même hauteur par rapport au microscope. Etant donné qu'une petite variation d'un de ces paramètres est vite survenue, il est préférable d'ajouter un petit dessin du micromètre-objet à chaque épure. Ce dernier dessin aura par ailleurs l'avantage de donner l'échelle.



Micrographe en plein travail, s'apprêtant certainement à mesurer une cystide...

Partie 2 : Pratique des mesures micrométriques ; principales sources d'erreurs ; exploitation et expression des résultats ; conclusion.

Nous allons maintenant aborder la réalisation pratique des mesures micrométriques, et tenter de donner une définition précise des différents angles de vue (vue de face, de profil et par bout) sous lesquels les spores peuvent être observées, ainsi que des grandeurs caractéristiques (longueur, largeur, épaisseur, diamètre et hauteur). Nous envisagerons également les différentes sources des erreurs qui peuvent entacher les mesures de manière dramatique, et donnerons un aperçu des techniques d'exploitation et des modes d'expression des résultats. Enfin, une conclusion générale et une bibliographie clôtureront ce texte.

7. Réalisation pratique des mesures micrométriques

Le microscope photonique à fond clair ne permet de voir des objets qu'un seul plan à la fois, c'est-à-dire qu'il réduit à deux dimensions des objets qui en possèdent trois. La perception des volumes n'est possible que grâce à un effort d'imagination, qui consiste à superposer mentalement les différents plans optiques donnés par le microscope. Une spore de helvelle, par exemple, dont deux des sections sont elliptiques et la troisième circulaire, est un ellipsoïde, structure volumineuse, bien qu'elle apparaisse elliptique ou circulaire, donc plane, sous le microscope.

C'est ainsi que, tout naturellement, une grande partie des termes utilisés dans les études micrographiques est issue de la géométrie plane : les volumes, au lieu d'être décrits comme tels, le sont à partir d'une ou de plusieurs surfaces. Des éléments sphériques, ellipsoïdaux, cubiques, ovoïdaux, cylindriques, prismatiques, et bien d'autres, seront souvent qualifiés de ronds, elliptiques, carrés, ovales, rectangulaires, polygonaux, etc.

Cette simplification de la description des formes se retrouve dans l'expression des dimensions, qui sont quasiment toujours, quelle que soit la géométrie de l'objet mesuré, ramenées à des longueurs (L sur les figures), à des diamètres (D), à des largeurs (l), à des épaisseurs (e) et, exceptionnellement, à des hauteurs. De fait, la description micrographique des mycètes s'encombre peu fréquemment de rayons, de bases, d'axes, de diagonales, etc.

En principe, la longueur est la plus grande des trois dimensions, et l'épaisseur est la plus petite. Si cette définition est souvent respectée, elle ne l'est pas toujours, notamment dans le cas des spores chez certains basidiomycètes, comme nous allons le voir plus loin. Le plus souvent toutefois, l'épaisseur des structures fongiques étant égale à leur largeur, on n'en donne que deux dimensions : leur longueur et leur diamètre (ce dernier étant, selon les auteurs, également appelé largeur ou épaisseur). C'est le cas pour l'immense majorité des spores, des basides, asques, cystides, paraphyses, hyphes, etc., et, d'une manière générale, pour tous les objets ellipsoïdaux, cylindriques, ovoïdaux, etc.

7.1. Méthode générale de mesure

La mesure en elle-même ne pose que peu de difficultés : il suffit d'amener, en déplaçant la préparation et en tournant l'oculaire dans le tube, une des extrémités de l'objet en concordance avec un des traits de l'échelle oculaire, puis de compter le nombre de divisions qui recouvrent l'objet. Si, comme c'est presque toujours le cas, ce nombre n'est pas entier, alors on peut évaluer les fractions de division, mais en se limitant à la demi-division ou, à la rigueur, au quart de division ; nous verrons les raisons de cette limite. Ne pas oublier de multiplier le nombre de divisions comptées par le coefficient de conversion, C_i , correspondant à l'objectif utilisé, pour obtenir, en micromètres, la longueur réelle de l'objet. La figure 8 donne un exemple de mesure.

L'un ou l'autre conseil pratique permettra de réaliser les mesures dans les meilleures conditions : plus le milieu d'observation utilisé sera visqueux, plus lents seront les mouvements des objets à l'intérieur de ce milieu, et donc plus aisées seront les mesures. Mais le choix du milieu d'observation est intimement lié à la nature de l'objet dont il doit permettre l'étude. De plus, il est primordial, pour la réalisation de mesures exactes, que le milieu utilisé ait une influence aussi faible que possible sur la forme des éléments étudiés : les spores doivent être bien gonflées, mais pas excessivement. D'autre part, il est bien évident que meilleur sera le contraste, moins laborieuses seront les mesures... Mais le contraste dépend largement du milieu d'observation choisi !



Figure 8 : Mesure de la longueur d'une spore de *Chaetosphaerella phaeostroma*, à l'aide d'un objectif 40 x. La spore occupe $10\frac{3}{4}$ divisions de l'échelle oculaire. Etant donné que, pour le microscope utilisé, le coefficient C_{40} , correspondant à cet objectif, est de 2,51, cette spore mesure $10,75 \times 2,51 = 27 \mu\text{m}$.

Dans tous les cas, il est souhaitable de toujours mentionner, en plus des dimensions obtenues, les conditions dans lesquelles les mesures ont été réalisées : origine du matériel étudié (spore ou dissociation d'un fragment d'hyménium), âge des spores (fraîchement chues ou déshydratées depuis longtemps), nature du milieu de montage utilisé, composition du liquide ayant servi au regonflage, s'il est différent du milieu de montage, chauffage éventuel pour accélérer une réaction, etc.

Par ailleurs, notons qu'il est préférable, afin de limiter au maximum les erreurs de mesure dues à l'imperfection des optiques, de réaliser, autant que faire se peut, les mesures vers le centre du champ, car c'est dans cette zone que la correction des aberrations optiques est la meilleure. De plus, les mesures sont toujours plus exactes lorsque l'œil qui ne les effectue pas est occulté. En effet, lors de l'utilisation d'un microscope binoculaire, l'intégration, par le cerveau, de l'image dépourvue d'échelle micrométrique avec l'image qui sert à la mesure perturbe souvent, au moins, l'évaluation des fractions de divisions de l'échelle.

Enfin, des mesures sur les objets non sphériques ne peuvent être prises que lorsque ces objets sont dans des positions franches par rapport à l'axe optique du microscope : position horizontale ou verticale, mais pas oblique. En effet, la mesure d'objets disposés obliquement conduit inévitablement à la sous-estimation ou à la surestimation d'au moins une de leurs dimensions. Une bonne indication que des objets sont en position oblique est que leur contour n'apparaît pas entièrement net sans devoir retoucher la mise au point. Néanmoins, il faut garder présent à l'esprit que le contour de certains objets de morphologie particulière, même positionnés franchement, peut apparaître partiellement flou.

7.2. Mesure des spores

JOSSERAND (1952) discute de la mesure des spores avec une élégance peu commune, assortie d'une étonnante richesse en détails. Nous nous conformerons en grande partie, dans les lignes qui suivent, aux recommandations de cet auteur.

Il convient tout d'abord, comme l'a fait JOSSERAND, de préciser les angles de vue sous lesquels les spores doivent être mesurées. Toutefois, cet auteur de grand talent s'est essentiellement préoccupé de la description des spores chez les basidiomycètes, négligeant quelque peu les ascomycètes, que nous affectionnons particulièrement. Il est pourtant une différence fondamentale entre basidiospores et ascospores : c'est que les premières possèdent un *apicule*, tandis que les dernières, par définition, en sont dépourvues.

L'apicule, qui rend la plupart des basidiospores « moins symétriques » que la majorité des ascospores, représente un excellent point de repère, permettant une définition relativement précise de l'angle sous lequel une spore de basidiomycète est observée : vue *de profil* (*P* sur les figures), *de face* (*F*), ou *par bout* (*B*), selon JOSSERAND. La distinction entre la vue de profil et la vue de face nous paraît nettement moins claire en ce qui concerne les ascospores, aussi bien, d'ailleurs, que pour les basidiospores sphériques, ou encore celles dont l'apicule est terminal et point du tout latéral. Voir figure 9.

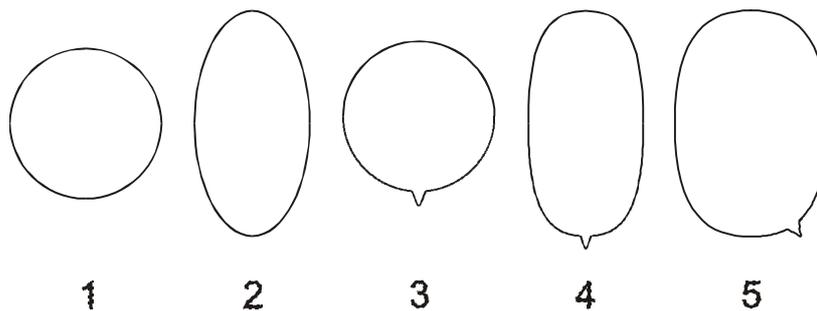


Figure 9 : Représentation schématique des différents types de spores étudiés ici. Toutes sont disposées de profil, à condition que l'on admette cela possible, car, pour les quatre premières spores, la vue de profil est impossible à distinguer de la vue de face. Pour la première spore, la vue par bout ne peut d'ailleurs pas être distinguée non plus. 1- ascospore sphérique ; 2- ascospore ellipsoïdale ; 3- basidiospore sphérique ; 4- basidiospore ellipsoïdale à apicule terminal ; 5- basidiospore ellipsoïdale à apicule latéral.

Précisons encore, avant de poursuivre, que la mesure d'une spore, observée dans une orientation franche, soit de face, soit de profil, soit par bout, se ramène le plus souvent à la mesure des côtés du rectangle circonscrit qu'il est possible de tracer autour de la coupe optique de la spore, telle que fournie par le microscope. Selon la morphologie de la spore et selon son orientation, le petit et le grand côté de ce rectangle correspondront à la longueur, à la largeur ou à l'épaisseur des spores. La figure 10 illustre ces notions.

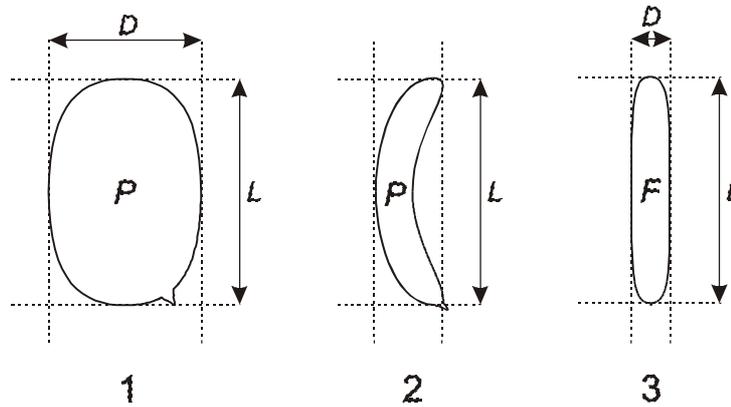


Figure 10 : La mesure d'une spore se ramène le plus souvent à la mesure des côtés des rectangles circonscrits à la spore, vue soit de profil, soit de face, soit par bout. 1- le rectangle circonscrit à la vue de profil d'une basidiospore ellipsoïdale permet la mesure de sa longueur et de son diamètre ; 2- dans le cas d'une basidiospore allantoïde, seule la longueur peut être mesurée de cette manière ; 3- le rectangle circonscrit à la vue de face permet, quant à lui, la mesure de la longueur et du diamètre des basidiospores allantoïdes.

7.2.1. Définition des angles de vue et des grandeurs caractéristiques en fonction de la morphologie des spores

On sent bien, d'après ce qui précède, que la définition des angles de vue selon lesquels les spores peuvent être observées dépend essentiellement de leur symétrie. Cette définition devra donc être adaptée au type de spore dont il est question, et sera d'autant plus précise que les spores seront moins symétriques.

L'exemple extrême d'élément parfaitement symétrique est celui de l'ascospore sphérique qui, par nature, est dépourvue d'apicule. C'est le cas chez des espèces à spores lisses, comme *Pulvinula constellatio*, *Sphaerosporella brunnea*, *Caloscypha fulgens*, et bien d'autres, mais aussi chez de nombreuses espèces à spores ornementées, comme *Lamprospora laetirubra* ou *Scutellinia armatospora*. Les spores de toutes ces espèces peuvent être, à condition que leur ornementation, si elle existe, soit homogène, observées sous n'importe quel angle, et donner toujours exactement la même image (voir figure 11/1). Il est dès lors impossible de dire si deux spores de ce type sont orientées de la même manière ou pas, et si de telles spores sont vues de face, de profil ou par bout. De même, il n'est pas possible de distinguer une longueur, une largeur et une épaisseur : en dehors des ornements et du contenu, la seule dimension que l'on puisse donner, pour les ascospores sphériques, est leur diamètre.

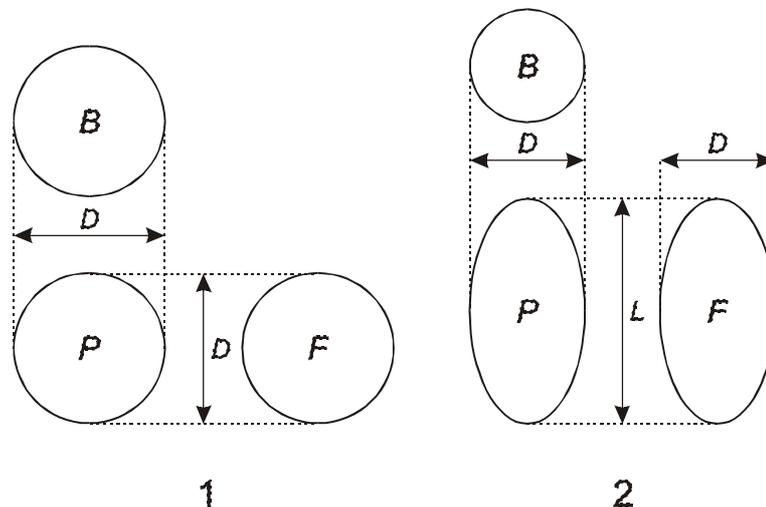


Figure 11 : Mesure des ascospores sphériques ou ellipsoïdales. 1- En ce qui concerne les ascospores sphériques, la seule dimension qu'on puisse mesurer est le diamètre. La spore apparaît de la même manière, qu'elle soit vue de face, de profil ou par bout. 2- Dans le cas des ascospores ellipsoïdales, la vue de face est semblable à la vue de profil, mais, par contre, la vue par bout est différente.

Un peu moins symétriques sont les ascospores ellipsoïdales, comme celles de *Peziza badia*, de *Helvella crispa* ou de *Morchella conica*. L'apparence de ces spores n'est plus indépendante de l'angle selon lequel on les observe : la vue de face et la vue de profil, indiscernables à moins que la spore soit comprimée, feront apparaître celle-ci sous la forme d'une même ellipse, tandis que la vue par bout montrera un cercle (voir figure 11/2). Lors de l'expression des dimensions de telles spores, on mentionnera donc leur longueur (la plus grande des dimensions) et leur diamètre, cette dernière grandeur correspondant à la fois à la largeur et à l'épaisseur. Dans le cas où les ascospores seraient comprimées, au lieu du diamètre, on donnera, cette fois, la largeur et l'épaisseur, cette dernière étant la plus petite des trois dimensions. Notons que, par convention anthropomorphique, la vue de face sera logiquement celle qui permet de voir à la fois la longueur et la largeur, tandis que dans le profil, l'épaisseur deviendra visible, au détriment de la largeur. Cette convention correspond d'ailleurs assez bien à la réalité, car les spores comprimées le sont quasi toujours, d'après

JOSSERAND, selon un axe antéro-postérieur, en tout cas chez les basidiomycètes, pour lesquels cet axe est identifiable grâce à la présence d'un apicule.

Le cas des basidiospores sphériques (par exemple, chez *Laccaria tortilis* ou chez *Amanita ceciliae*) est fortement semblable au cas des ascospores sphériques, car la présence d'un apicule, s'il permet de définir une vue de profil (ou de face) et une vue par bout, n'intervient pas dans l'expression des mesures, qui se résument toutes à une unique dimension : le diamètre. Précisons toutefois que la longueur de l'apicule ne doit pas être comptée dans la mesure du diamètre.

Un niveau encore un peu moindre de symétrie est constitué par les basidiospores ellipsoïdales (par exemple chez certaines *Tricholomatales*) dont l'apicule est exactement terminal, mais il s'agit d'un cas relativement rare car, chez l'immense majorité des basidiomycètes à spores non sphériques, l'apicule est disposé plus ou moins latéralement sur la spore. Les dimensions des spores à apicule terminal seront exprimées en suivant les mêmes règles que pour les ascospores ellipsoïdales, à la différence près que la longueur sera toujours la dimension, même si ce n'est pas la plus grande, reliant la base de la spore (c'est-à-dire l'extrémité portant l'apicule) à son sommet (voir figure 12). La longueur de l'apicule lui-même, toutefois, doit être exclue de la mesure.

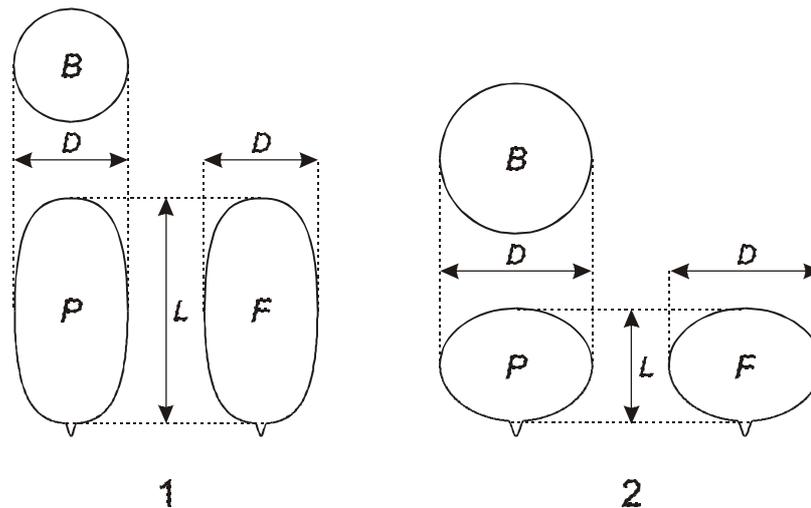


Figure 12 : Mesure des basidiospores ellipsoïdales à apicule terminal. 1- basidiospore normale, plus longue que large ; 2- basidiospore « aplatie », plus large que longue. Remarquer que, selon nos conceptions, la longueur doit, dans les deux cas, se mesurer suivant le même axe, malgré que, pour les spores aplaties, la longueur ne soit pas la dimension la plus grande.

Enfin, nous arrivons au cas très fréquent des basidiospores à apicule plus ou moins déjeté latéralement. Nous reprendrons, pour le traitement de ce cas, les excellentes définitions de JOSSERAND.

Le profil est [...] le contour de la spore telle qu'elle apparaît si on la tranche par son plan de symétrie, le seul qui la partage en deux moitiés égales. Sur une telle vue de profil, l'apicule est toujours visible sur le côté et saillant au maximum [...].

La vue de face est définie, par ce même auteur, de la manière suivante : Parmi l'infinité de plans perpendiculaires au plan de symétrie et passant par le sommet de la spore, [la vue de face correspond à] celui qui découpe dans le volume sporique la figure la plus allongée. Nous nommerons vue de face la vue de la spore supposée tranchée par un tel plan. Ajoutons que l'apicule doit être tourné vers l'observateur, sinon la vue est de dos.

La vue par bout est [...] la vue de la spore présentant vers l'observateur son extrémité distale, le grand axe sporique fuyant dans le rayon visuel. Une mise au point à mi-hauteur permettra de tracer la coupe optique de la spore vue par bout [...]. Un des avantages de préférer étudier les spores avec leur extrémité distale ⁽¹⁹⁾ tournée vers l'observateur est que le pore germinatif, s'il existe, apparaîtra plus nettement (moyennant l'ajustement de la mise au point), que s'il était vu à travers la spore.

La longueur des basidiospores à apicule latéral correspondra donc, sur la vue de face ou de profil, à la longueur du segment de droite qui relie l'extrémité distale de la spore à son extrémité proximale, apicule non compris. La largeur de la spore représentera la distance (souvent perpendiculaire ⁽²⁰⁾, ou presque, à la longueur) qui sépare les deux flancs de la spore lorsque celle-ci est vue de face. Enfin, l'épaisseur de la spore est la troisième dimension, également perpendiculaire, en général, aux deux autres, qui relie la face ventrale de la spore (portant l'apicule lorsque celui-ci n'est pas terminal) à sa face dorsale. Notons encore que, dans la plupart des cas, les spores ne sont pas comprimées, et donc leur largeur est égale à leur épaisseur. Avec LOCQUIN (1984), nous préférons alors utiliser le terme *diamètre*, à la place de *largeur* ou d'*épaisseur*. Voir figure 13.

⁽¹⁹⁾ Les extrémités des basidiospores sont définies par rapport à la baside qui leur a donné naissance : on qualifie de *proximale* l'extrémité de la spore qui est la plus proche de la baside ; c'est donc celle qui porte l'apicule. *A contrario*, l'extrémité distale est opposée à la baside, et donc à l'apicule.

⁽²⁰⁾ La largeur et l'épaisseur des spores peuvent ne pas être perpendiculaires à leur longueur, notamment dans le cas où l'apicule est à la fois latéral et disposé sur une protubérance, qui constitue l'extrémité proximale de la spore.

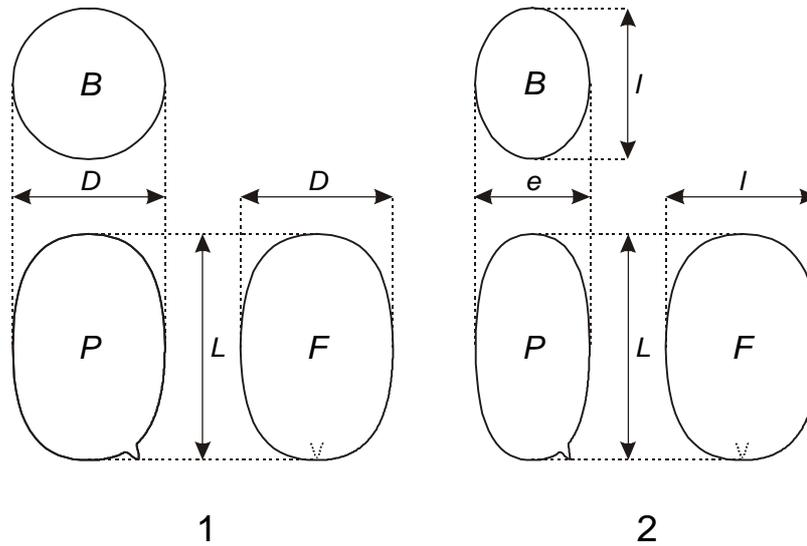


Figure 13 : Mesure des basidiospores ellipsoïdales à apicule latéral. 1- basidiospore non comprimée ; 2- basidiospore comprimée selon un axe dorso-ventral ($e < l$).

JOSSERAND définit les trois dimensions des basidiospores en fonction du grand et du petit côté des deux rectangles circonscrits à la spore, vue de profil ou de face. Mais ces notions de *grands* ou de *petits* côtés présentent l'inconvénient de ne pas pouvoir s'appliquer aux spores « aplaties », c'est-à-dire plus larges que longues (comme c'est par exemple le cas chez *Tremella globospora*).

Voici les définitions de JOSSERAND : *La longueur et l'épaisseur d'une spore sont respectivement égales au grand et au petit côté du rectangle circonscrit à la spore vue de profil, étant entendu que le rectangle doit être construit de telle manière que ses grands côtés soient disposés parallèlement à l'axe longitudinal de la spore inscrite [...]. Le grand et le petit côté du rectangle circonscrit à la spore vue de face donnent : 1° une nouvelle fois la longueur [...] et 2° sa largeur [...].* De la même manière, nous pourrions ajouter, à ces définitions, que la largeur et l'épaisseur de la spore sont encore égales, respectivement, au grand et au petit côté du rectangle circonscrit à la spore vue par bout, à condition que ce rectangle soit tracé dans la zone de la spore correspondant à sa section maximale (à mi-hauteur pour les spores ellipsoïdales, vers la base dans le cas des spores ovoïdes, etc.).

Toutefois, ces définitions, bien qu'elles excellent par leur clarté et leur précision, présentent l'inconvénient de n'être exactes que pour une variété assez limitée de spores. En effet, elles ne sont parfaites que pour les basidiospores ellipsoïdales comprimées à apicule latéral. Par contre, elles s'appliquent moins intimement aux spores arquées ou aplaties, aux ascospores, etc.

Quoi qu'il en soit, il est bien évident que toutes les définitions données ci-dessus restent relativement générales, et que la variété des cas envisagés n'est pas suffisante pour cerner l'étude de toutes les spores que les Champignons ont bien pu imaginer. Le plus souvent, néanmoins, une légère adaptation de ces règles permet de les appliquer aux cas même les plus farfelus. En conclusion, admettons humblement que l'énonciation de règles universelles paraît bien délicate...

7.2.2. Conditions de mesure

Il est une condition essentielle à la réalisation de mesures valables, c'est que les spores soient parfaitement matures. Le seul moyen d'en être absolument sûr est de travailler à partir de sporées. En effet, la présence d'une coloration, ainsi que l'aspect des ornements et du contenu des spores, bien qu'ils donnent de précieuses indications sur l'état de maturité de celles-ci, ne sont pas suffisants pour jurer que ce dernier est complet. Il n'est pas indispensable, toutefois, d'avoir à sa disposition une sporée sur papier ou sur plaque de verre, car des sporées naturelles se forment presque toujours en haut du pied, mais également, aussi étonnant que cela puisse paraître, à la surface du chapeau. L'observation d'un scalp dans la cuticule ou dans la partie sommitale du stipe permet donc souvent de se tirer d'affaire.

Les spores, lorsqu'elles ont été émises depuis un certain temps, ont une fâcheuse tendance à se dégonfler. Il convient donc, avant de procéder à des mesures, de les regonfler complètement. Divers milieux de montage peuvent être conseillés, mais les liquides à base d'ammoniaque ou d'hydrate de chloral sont sans doute parmi les plus efficaces à ce point de vue. Un chauffage est parfois nécessaire, pour parvenir à résoudre les cas les plus difficiles, et notamment les spores d'entolomes, qui ont une propension particulière à résister au regonflage. Il n'est toutefois pas indiqué de chauffer systématiquement, car les spores dont la paroi est délicate pourraient se regonfler trop fortement, voire éclater.

D'autre part, on doit faire intervenir, dans la longueur, la largeur et l'épaisseur des spores, tout accident de leur paroi qui n'est pas clairement délimité : gibbosités et nodules des inocybes goniosporés ; faces et angles des entolomes ; protubérance supportant l'apicule ; etc. Par contre, toutes les structures nettement individualisées, comme l'apicule, et ce qui, d'une manière générale, constitue l'ornementation proprement dite des spores (épines, verrues, crêtes, appendices divers, etc.) ne doivent pas intervenir dans la mesure : tous ces éléments seront étudiés séparément. Voir figure 14.

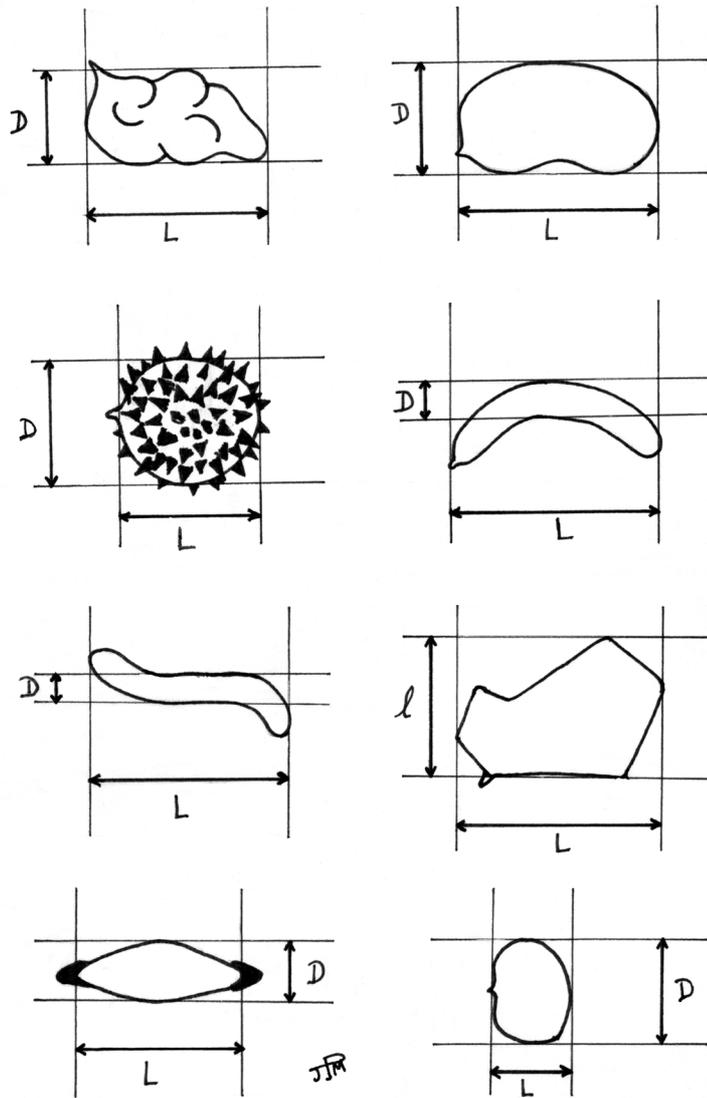


Figure 14 : Cas particuliers de la mesure des spores. De gauche à droite et de haut en bas : spores de *Inocybe*, *Hygrocybe*, *Laccaria*, *Auricularia*, *Lasiosphaeria*, *Entoloma*, *Rhizina* et *Tremella*.

En effet, la mesure des spores est loin de se limiter à leur longueur, à leur largeur et à leur épaisseur : il est intéressant également, selon les cas, de mesurer la longueur et le diamètre de l'apicule ; la hauteur et le diamètre des épines ; l'épaisseur de la paroi ; le diamètre des granules, guttules, globules et vacuoles ; la longueur, l'épaisseur et la hauteur des crêtes ; etc. Toujours dans l'optique d'une nomenclature cohérente et uniforme, nous pensons qu'il est préférable, pour la plupart des ornements, d'appeler hauteur la dimension perpendiculaire à la surface de la spore, au lieu d'épaisseur pour les verrues, de longueur pour les épines, etc.

7.3. Mesure d'éléments divers

La portée des mesures s'étend bien au-delà des dimensions sporales : très courantes également sont les mesures se rapportant aux asques, aux basides, aux paraphyses, aux cystides, aux hyphes de la cuticule et de la trame des lames, aux sphérocytes de la chair, aux conidies, aux hyphes du cortex du stipe, aux stérigmates, aux articles de l'excipulum ou du sous-hyménium, et à bien d'autres éléments encore (voir figure 15). De manière générale, toute mesure sera intéressante lorsqu'elle représentera un critère à la fois constant et discriminatoire, pouvant contribuer à la distinction de taxons en vue de l'identification spécifique d'une récolte, ou de la définition d'une espèce par rapport à ses synonymes et aux autres taxons appartenant à un même clade. Il faudra donc choisir des mesures significatives et reproductibles, car caractéristiques des éléments observés (longueur totale ; diamètre maximum et, éventuellement, minimum ; importance d'un renflement ou d'une constriction, etc.).

Comme pour les spores, la manière de nommer les différentes grandeurs varie en fonction de la morphologie des éléments mesurés. Les deux dimensions les plus généralement acceptées sont la longueur et le diamètre, bien que ce dernier, selon les auteurs, soit également nommé largeur ou épaisseur. La logique veut que, pour tous les éléments cylindriques, et, plus généralement, pour ceux dont les coupes transversales sont toutes des disques ou des cercles, on nomme diamètre la grandeur qui est perpendiculaire à la longueur, et non pas largeur ou épaisseur (comme nous l'avons

souvent écrit nous-même). Toutefois, cette terminologie varie largement d'un auteur à l'autre, et il est toujours souhaitable de préférer les termes clairs à ceux qui, tout en respectant la logique de manière idéale, sont quelque peu ambigus.

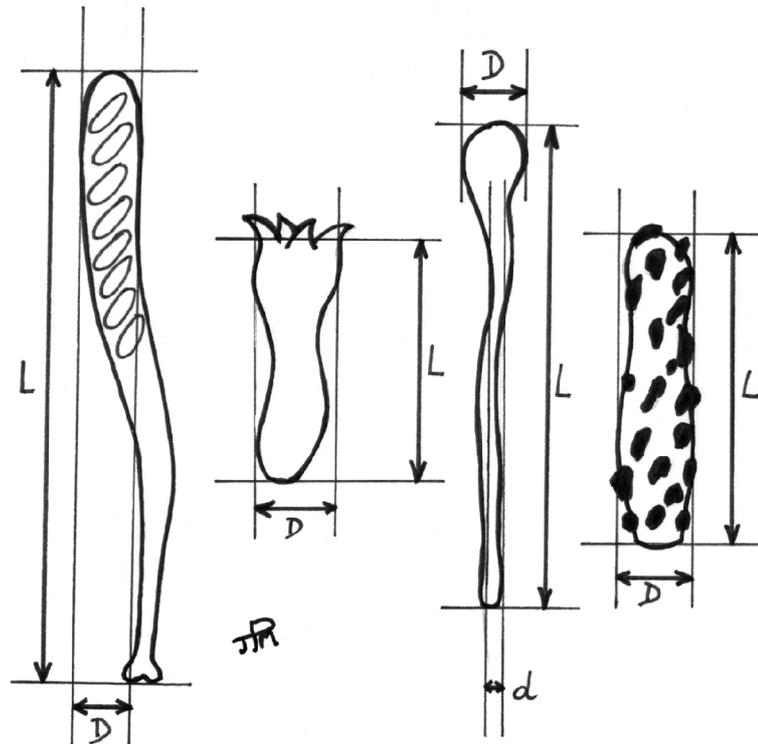


Figure 15 : Mesure d'éléments divers. De gauche à droite : asque de *Rutstroemia* ; baside de *Sistotrema* ; paraphyse d'*Orbilina* ; cystide de *Lyomyces*.

8. Petit catalogue des grandes erreurs

Nous allons voir, dans ce qui suit, que les sources d'erreurs de mesure foisonnent. L'importance de toutes ces erreurs n'est pas aisément quantifiable ; c'est pourquoi seules quelques-unes seront illustrées par des exemples numériques. Les erreurs seront réparties en trois classes : d'abord, celles qui sont dues à un mauvais étalonnage ou à la réalisation des mesures dans des conditions différentes de celles de l'étalonnage ; ensuite, celles qui sont liées à l'expérimentateur et à la nature de l'élément mesuré ; enfin, les erreurs, souvent négligeables, introduites par le matériel utilisé. Précisons que les exemples numériques présentés n'ont pas été inventés : ils sont parfaitement authentiques.

8.1. Erreurs dues à un mauvais étalonnage

Les erreurs dues à un mauvais étalonnage ou à la réalisation des mesures dans des conditions inconstantes, bien qu'elles n'affectent généralement pas de plus de dix pour cent le résultat d'une mesure, ne peuvent cependant pas être négligées. Elles seront envisagées dans les lignes qui suivent, et illustrées par des exemples chiffrés.

8.1.1. Négliger l'étalonnage

Au début de cet article, nous avons mis en exergue l'importance de l'étalonnage. Le tableau 2 donne les coefficients C_i , calculés lors de l'étalonnage de notre propre microscope, et l'erreur relative qui entacherait systématiquement les mesures si cet étalonnage n'avait pas été réalisé. Cet exemple, parfaitement banal, montre déjà une erreur relative atteignant trois pour cent, ce qui signifie une erreur d'un micromètre et demi sur la longueur d'un élément qui en mesure cinquante. D'autre part, la banalité de l'exemple choisi suggère que des erreurs beaucoup plus importantes sont possibles.

Objectif concerné	Coefficient C_i théorique	Coefficient C_i réel	Erreur relative
4 x	25,00	25,2	0,8 %

10 x	10,00	10,3	3,0 %
40 x	2,50	2,51	0,4 %
100 x	1,00	0,998	0,2 %

Tableau 2 : Exemple réel d'étalonnage d'un oculaire micrométrique avec les quatre objectifs d'un microscope. Trois chiffres significatifs ont été conservés dans l'expression du coefficient de conversion réel. La quatrième colonne donne l'erreur relative qui entacherait les mesures si l'étalonnage n'avait pas été effectué. La correspondance entre le coefficient théorique et le coefficient réel est presque parfaite pour l'objectif 100 x, tandis qu'elle est moins bonne pour l'objectif 10 x. Cet exemple démontre clairement l'importance d'étalonner séparément *chaque* objectif.

8.1.2. Ne pas tenir compte de l'écart interpupillaire et du réglage dioptrique

L'erreur relative que peut introduire une mauvaise gestion des réglages dioptrique et d'écart interpupillaire lors des mesures est assez importante, comme en témoigne l'exemple du tableau 3. Ce tableau présente la mesure d'un étalon de 50 μm à l'aide d'un objectif 100 x, et avec différentes combinaisons entre la valeur de l'écart interpupillaire, lue sur l'échelle indicatrice, et la valeur choisie sur l'échelle du tube qui porte l'oculaire micrométrique.

COMPENSATION	ECHELLE INDICATRICE		
	55 mm	65 mm	75 mm
55 mm	50 μm	51,5 μm	53 μm
65 mm	48,5 μm	50 μm	51,5 μm
75 mm	47 μm	48,5 μm	50 μm

Tableau 3 : Exemple réel de mesure d'un étalon de 50 μm avec différentes combinaisons entre la valeur de l'écart interpupillaire et la valeur choisie sur l'échelle du tube portant l'oculaire micrométrique. Ces mesures ont été effectuées à l'aide de l'objectif 100 x du microscope dont les coefficients de conversion sont repris dans le tableau 2. Le coefficient C_{100} est suffisamment proche de l'unité pour que cinquante divisions de l'échelle oculaire équivalent, en pratique, à cinquante micromètres (exactement, 50 divisions correspondent à $50 \times 0,998 = 49,9 \mu\text{m}$). Remarquer qu'on arrive toujours à cinquante micromètres lorsque les deux échelles sont mises en concordance, et ce, quelle que soit la valeur de l'écart interpupillaire. Ceci prouve l'efficacité et l'exactitude de la correction que permet l'échelle se trouvant sur le tube qui porte l'oculaire micrométrique.

La différence entre la longueur mesurée et la longueur réelle de l'étalon atteint 3 μm , ce qui correspond à une erreur relative de 6 %. Noter que la différence entre les deux valeurs extrêmes est de 6 μm , ce qui correspond à 12 % d'erreur relative sur une longueur réelle de 50 μm . Une erreur aussi importante pourrait être atteinte dans le cas où les mesures seraient réalisées dans des positions extrêmes et inverses des deux échelles, tandis que l'étalonnage aurait été réalisé avec les échelles dans des positions exactement opposées.

Cet exemple illustre également les erreurs entraînées lorsque le réglage dioptrique est effectué sur le tube portant l'oculaire micrométrique, étant donné que la compensation de l'écart interpupillaire dont il est question ci-dessus se fait par le même mouvement que le réglage dioptrique lui-même.

A nouveau, cet exemple, de par sa banalité, suggère que des erreurs plus importantes encore que 12 % peuvent exister. Toutefois, les positions extrêmes de l'écart interpupillaire et du réglage dioptrique sont rarement utilisées, ce qui atténue quelque peu l'importance de l'erreur dont il est question ici.

8.1.3. Cas des congrès

L'étalonnage doit être réalisé avec chaque microscope, car il dépend de la longueur et de la constitution du tube du microscope : c'est également un point sur lequel nous avons beaucoup insisté. L'influence de la constitution du tube ne sera pas illustrée ici, car la quantification de ce paramètre est relativement malaisée à réaliser. L'influence de la longueur du tube, par contre, a déjà été illustrée au paragraphe précédent, à travers la non-prise en compte des réglages dioptrique et d'écart interpupillaire.

Un deuxième exemple de l'influence de la longueur du tube sur les mesures va nous permettre d'illustrer le cas où un même oculaire micrométrique est utilisé sur deux microscopes différents, sans se soucier des questions d'étalonnage. On pourrait nommer cet exemple le « cas des congrès », car c'est souvent à leur occasion que les oculaires passent inopinément d'un microscope à l'autre. Pour cet exemple, nous allongerons artificiellement le tube du microscope en surélevant l'oculaire micrométrique à l'aide d'une bague en bristol, longue d'un centimètre d'abord, puis de deux. Le tableau 4 reprend les résultats de la mesure d'un étalon de 50 μm à l'aide d'un même microscope, avec ou sans l'ajout de bagues en bristol, afin de simuler l'utilisation de trois microscopes différents.

Bague	Longueur de l'étalon	Erreur relative
Aucune bague	50 μm	0 %
Bague de 1 cm	53 μm	6 %
Bague de 2 cm	56 μm	12 %

Tableau 4 : Exemple d'erreur qui pourrait être introduite en utilisant le même oculaire micrométrique sur différents microscopes, et sans se préoccuper de l'étalonnage. Les microscopes diffèrent par la longueur de leur tube, dont la variation est simulée par l'ajout de bagues en bristol afin de surélever l'oculaire micrométrique.

Ce tableau montre qu'une différence de deux centimètres dans la longueur du tube de deux microscopes introduit une erreur relative de 12 %. Toutefois, cet exemple est moins réaliste que les précédents, car il simplifie la réalité en considérant le tube du microscope comme un simple cylindre. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'ajout de bagues en bristol (noir de préférence) peut être mis à profit de plusieurs manières. En effet, cet artifice, moyennant quelque tâtonnement, permet d'ajuster, à un micromètre exactement, la valeur d'une division de l'oculaire micrométrique. Il permet également le réglage dioptrique sur les tubes porte-oculaires qui sont dépourvus de bague, et la mise au point du graticule des oculaires non réglables. C'est essentiellement la confection de ces bagues qui a été appelée « bricolage » dans les protocoles de réglage du microscope avant l'étalonnage, au paragraphe 5.2.2.

8.2. Erreurs dues à l'expérimentateur et à la nature des éléments mesurés

L'observateur est lui-même directement responsable d'une partie des erreurs de mesure : il peut ne pas ajuster exactement l'élément mesuré sur les traits de l'échelle ; il peut se tromper en comptant le nombre de divisions couvertes par l'élément mesuré, ou encore en convertissant ce nombre en micromètres à l'aide du coefficient C_i ; il peut aussi mal évaluer les fractions de divisions, surtout lorsque la mesure est effectuée alors que les deux yeux sont ouverts ; etc. Néanmoins, l'importance de toutes ces erreurs peut être sensiblement limitée par la réalisation de plusieurs mesures et par l'analyse statistique des résultats obtenus, telle que nous la verrons au chapitre 9.

Une autre erreur importante due à la subjectivité de l'observateur, spécialement lors de la mesure de spores, est une attirance particulière pour les plus grandes, pour celles qui présentent telle forme plutôt que telle autre, pour les nombres pairs, impairs ou ronds, etc. Ces préférences, plus ou moins inconscientes, sont très fréquentes et peuvent entraîner des erreurs importantes sur le résultat des mesures. Il faut donc absolument s'astreindre à mesurer des spores sélectionnées *au hasard*, c'est-à-dire à mesurer *toutes* les spores *normales*, qui se présentent dans une *position convenable* lors du parcours de la préparation suivant un chemin bien établi. Celui-ci sera évidemment choisi de manière à éviter de passer deux fois à la même place. Le zigzag d'un bout à l'autre de la préparation est incontestablement la meilleure méthode.

Néanmoins, la mesure au hasard n'est possible que lorsque toutes les spores présentes dans la préparation sont mures, ce dont on ne peut être sûr que si les spores proviennent d'une sporée. Lorsque cette condition n'est pas respectée, il est préférable de ne mesurer que les grandes spores, car, bien évidemment, la taille des spores augmente au cours de la maturation. Éviter toutefois la mesure *des plus grandes spores*, surtout si elles sont en petit nombre.

En discutant de la maturité, on arrive à ce qui nous semble être *la plus grande source d'erreurs* : la mesure de spores ne provenant pas d'une sporée. Théoriquement, la taille des spores étant minimale lorsqu'elles viennent de naître, et leur dimension plafonnant à la complète maturité, l'erreur relative maximale sur les mesures effectuées à partir de spores ne provenant pas d'une sporée avoisine les 100 %. Heureusement, cette erreur est nettement plus faible en pratique, car les spores absolument immatures sont aisément reconnaissables. Néanmoins, la distinction entre les spores quasiment mures et celles qui le sont effectivement est nettement plus délicate, tandis que leur dimension peut encore augmenter sensiblement entre ces deux états. En vertu de ce fait et de notre expérience personnelle, nous n'hésitons pas à proclamer que l'erreur sur ce type de mesure atteint *fréquemment les 20 %*, et les dépasse même souvent. En conclusion, disons que les mesures obtenues à partir de spores dont on n'est pas certain de la complète maturité, bien qu'elles donnent souvent des indications précieuses, doivent être interprétées avec la plus grande prudence.

D'autres facteurs, liés à la nature des objets mesurés, peuvent également augmenter les risques d'erreurs : les éléments dont la paroi est épaisse et/ou ornementée seront plus difficiles à mesurer que les objets lisses à paroi fine. En effet, l'ajustement des extrémités de l'objet sur les traits de l'échelle micrométrique sera plus délicat, et donc le risque d'erreur sera plus important. D'autre part, l'indice de réfraction de l'objet mesuré, ainsi que sa coloration, influenceront le contraste ; meilleur sera celui-ci, et plus aisé sera l'ajustement sur l'échelle micrométrique. Enfin, la mesure fractionnée d'objets dont la longueur dépasse celle de l'échelle oculaire est entachée d'une erreur supplémentaire, engendrée par le déplacement inévitable de l'objet.

8.3. Erreurs dues au matériel utilisé

De nombreuses erreurs sont également introduites par le matériel utilisé, à savoir l'étalon, le microscope, le matériel de préparation et le dispositif de reproduction, qu'il s'agisse d'un boîtier photographique ou d'un tube à dessiner. Ces erreurs, bien que variées, n'influencent généralement que très peu le résultat des mesures. Nous allons tout de même, pour mémoire, en évoquer quelques-unes.

La perfection n'existe pas, c'est bien connu, et donc le micromètre-objet qui sert à l'étalonnage n'est pas parfait lui-même : la longueur des divisions est inévitablement entachée d'une erreur, toujours faible mais néanmoins présente. D'autre part, de subtiles déformations, constamment infligées à l'ensemble du matériel par la manipulation et les écarts de température, introduisent également une erreur. Les couvre-objets, l'huile à immersion et le milieu de montage utilisés, qui, tous, se trouvent dans le trajet de la lumière entre l'objet et son image, représentent eux aussi, *via* leur indice de réfraction, des sources supplémentaires d'erreurs. Tous ces éléments agissent un peu comme de minuscules lentilles, et, pour bien faire, l'étalonnage devrait être recommencé chaque fois que l'un ou l'autre d'entre eux est

modifié : achat d'un nouveau flacon d'huile à immersion, utilisation de couvre-objets plus ou moins épais, et choix d'un milieu de montage plus ou moins réfringent. En pratique, toutefois, l'influence de ces variations est suffisamment faible que pour pouvoir être négligée devant les sources d'erreurs plus importantes.

Enfin, certaines erreurs sont dues à d'autres causes, plus subtiles encore que les précédentes. Ainsi, des erreurs trouvent leur source dans la distorsion de l'image de l'objet par l'optique du microscope. Ces erreurs sont de plus en plus réduites, grâce aux progrès réalisés dans la conception des optiques. D'autre part, elles peuvent être en grande partie évitées en réalisant les mesures préférentiellement dans la partie centrale du champ. La diffraction est une autre cause d'erreur, car elle rend imprécise la limite des objets. Des erreurs sont également engendrées, lors de la réalisation de mesures sur des photographies, par la déformation que subit le support photographique au cours du développement. D'autres sources d'erreurs encore sont décrites en détail par POLICARD, BESSIS et LOCQUIN (1957).

8.4. Fausses erreurs

La mécanique des microscopes modernes permet la rotation de la tête sur le statif. Cette rotation ne modifie pas, en principe, la longueur du tube. Elle n'a donc aucune influence sur l'étalonnage. De même, la mise au point du graticule de l'oculaire micrométrique, après l'étalonnage, n'introduit aucune erreur de mesure, car la modification de la longueur du tube entraînée par ce réglage affecte la dimension de l'image de l'objet et la dimension de l'image du graticule dans des proportions identiques.

9. Exploitation et expression des résultats

Nous avons vu, au cours de la section précédente, que les sources d'erreurs sur les mesures fourmillent ; des erreurs relatives de dix pour cent sont monnaie courante. Toutefois, il est possible de réduire, dans une large mesure, l'importance de la plupart de ces erreurs, en prenant une série de précautions qui ont été détaillées dans ce qui précède : étalonnage du matériel, conditions de mesure constantes, etc.

La méthode d'échantillonnage représente une des plus importantes sources d'erreurs ; nous avons déjà précisé qu'il était préférable, toutes les fois où cela est possible, de réaliser les mesures sur des spores provenant d'une *sporée*, et sélectionnées *au hasard*. Cependant, même lorsque cette condition est respectée, la variabilité naturelle des dimensions cellulaires, particulièrement chez les champignons, constitue un risque d'erreur supplémentaire. Celui-ci peut toutefois être limité également, grâce à l'utilisation d'outils statistiques plus ou moins élaborés.

Bien qu'il ne soit pas invraisemblable d'envisager leur généralisation à tous les types de mesures, les méthodes statistiques sont essentiellement appliquées à l'exploitation des résultats issus de la mesure des spores. Il n'est pas dans notre intention de développer dans le détail l'exploitation statistique de ces mesures, mais bien d'en rappeler les grandes lignes, en nous limitant aux opérations les plus utiles et les plus fréquemment rencontrées dans la littérature.

9.1. Effectif et précision

Tout d'abord, il est bien évident que mesurer l'entière des spores émises par un champignon, même minuscule, est pratiquement impossible par les méthodes habituelles. On est donc contraint de s'intéresser à un échantillon réduit de spores, et de supposer celui-ci représentatif de la population entière. On s'attend, en toute logique, à ce que l'approximation soit d'autant meilleure que l'effectif de l'échantillon étudié sera important.

Le nombre de spores que l'on conseille de mesurer pour obtenir des résultats fiables varie largement selon les auteurs : de cinq (JOSSEAND, 1952) à cent (LOCQUIN, 1984). Personnellement, nous estimons que, à des fins systématiques courantes, la mesure d'une dizaine de spores lorsque la population est relativement homogène, ou d'une vingtaine de spores lorsque leur taille est très variable, est largement suffisante.

D'autre part, il est absolument vain de vouloir mesurer des spores avec une précision supérieure au demi-micromètre ou, à la rigueur, au quart de micromètre. Un peu d'habitude suffit à s'en convaincre, mais deux raisons flagrantes permettent d'expliquer cette limite. Tout d'abord, il est parfaitement illusoire, avec les oculaires micrométriques courants, de tenter l'estimation des dixièmes et, *a fortiori*, des centièmes de micromètres, car cette opération est encore plus délicate, mais tout aussi insensée, que l'estimation des dixièmes de millimètres à l'aide d'une simple règle.

Ensuite et surtout, le pouvoir de résolution optique des microscopes photoniques à fond clair utilisant la lumière blanche est de l'ordre du quart de micromètre. Il s'agit d'une limite physique, incontournable, liée à la nature même de la lumière. C'est cette limite qui a fixé le grossissement maximal de la majorité des microscopes à environ mille fois. Il est pourtant très simple, par exemple en projetant des photomicrographies, d'atteindre, et même de dépasser largement, des grossissements dix fois plus importants. Certes, l'image obtenue est beaucoup plus grande, mais elle est aussi infiniment plus grossière, et ne montre aucun détail supplémentaire qui n'était pas visible à un grossissement plus faible.

L'erreur *absolue* minimale sur les mesures se situe donc aux alentours du quart de micron, et ce, quelle que soit la taille de l'élément mesuré. Au contraire, l'erreur *relative* minimale sur les mesures augmente rapidement lorsque la dimension de l'objet devient très petite. Ainsi, par exemple, cette erreur est de 2,5 % pour une spore de 10 μm , tandis

qu'elle est de 25 % pour une spore de 1 µm. Disons, avec HENTIC (2000), que les mesures ne sont plus que des ordres de grandeur pour des dimensions de l'ordre de 3 µm et en dessous.

Notons encore qu'il est préférable de réaliser les *calculs* avec un excès de précision, par exemple en conservant deux décimales pour toutes les valeurs intermédiaires, et de ne procéder à l'arrondissement que lors de l'expression du *résultat final*. La précision choisie lors de cette expression devra être adaptée à la nature du résultat : longueur, quotient sporique, volume, etc.

Il faut se limiter, lors de l'expression des grandeurs linéaires (longueur, largeur, épaisseur, diamètre, hauteur), au quart de micromètre pour les raisons évoquées précédemment. Toutefois, pour une meilleure lisibilité, nous indiquerons toujours « ,25 », « ,5 » et « ,75 », au lieu de « ¼ », « ½ » ou « ¾ ». Ce choix typographique n'est pourtant pas idéal, car il suppose, lorsqu'on ne donne aucune indication, que les mesures aient été réalisées au dixième ou au centième de micromètre près. D'autre part, il nous paraît raisonnable de limiter au micromètre cube la précision des volumes sporiques, car la variation des volumes est beaucoup plus grande que la variation des longueurs. A l'inverse, il est indispensable de conserver au moins une décimale, voire deux, lors de l'expression des quotients sporiques.

9.2. Analyse statistique et expression des résultats

Les résultats des mesures, en mycologie, peuvent être exprimés de différentes manières. Ils ont longtemps été, et sont encore couramment à l'heure actuelle, exprimés de manière empirique, en repérant « à l'œil » les tailles les plus *courantes* au sein de l'ensemble des valeurs, et en transformant celles-ci en un intervalle reflétant la variation naturelle des spores concernées. On donne un, deux ou trois intervalles, selon la forme des spores, comme le montrent les exemples repris dans le tableau 5.

Forme des spores	Dimensions	Exemple
Spores sphériques	Diamètre	12-13,5 µm
Spores ellipsoïdales	Longueur x diamètre	12-13,5 x 6-7 µm
Spores comprimées	Long. x largeur x épais.	12-13,5 x 6-7 x 4-4,75 µm

Tableau 5 : Exemples d'expression de la dimension des spores en fonction de leur forme.

Lorsque *quelques-unes* des spores mesurées ne peuvent pas être incluses dans cet intervalle parce que, sans être *anormales*, elles sont soit nettement plus petites, soit nettement plus grandes que l'ensemble des spores, il est d'usage d'indiquer leurs dimensions entre parenthèses, de part et d'autre de l'intervalle. Par exemple, indiquer les dimensions suivantes : (10)12-13,5 x (5)6-7(7,5) µm, signifie que la longueur de la plupart des spores oscille entre 12 et 13 ½ µm, mais qu'il n'est pas rare (ni vraiment fréquent !) de trouver des spores de 10 µm de longueur. De même, le diamètre de la plupart des spores de cet exemple se situe entre 6 et 7 µm, mais il en existe de plus minces (5 µm), et de plus épaisses (7,5) µm. Les dimensions indiquées entre parenthèses sont, en quelque sorte, des dimensions « *modérément extrêmes* », et il faudra toujours ignorer les *monstres de nanisme ou de gigantisme*, pour reprendre les expressions de JOSSERAND.

On sent bien à quel point cette méthode d'expression des résultats est empirique, et liée à la subjectivité de l'observateur, à sa conception plus ou moins large de la spore *normale*. Une meilleure méthode, pour exprimer les résultats, est de se baser sur des paramètres statistiques, dont les deux plus importants sont la *moyenne* et l'*écart-type*.

La moyenne, que tout le monde connaît, est une mesure de tendance centrale, c'est-à-dire qu'elle donne une idée de la valeur autour de laquelle oscille la dimension des spores. On distingue différents types de moyennes : arithmétique, géométrique, harmonique, quadratique. La plus courante est la moyenne arithmétique (\bar{x}). Elle se calcule en additionnant l'ensemble des valeurs (x_i) de l'échantillon, puis en rapportant la somme obtenue au nombre de valeurs prises en compte, c'est-à-dire à l'effectif (n) de l'échantillon :

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \text{Relation 7}$$

L'écart-type (s), quant à lui, est une mesure de la dispersion, c'est-à-dire qu'il donne une idée de la manière dont les valeurs sont distribuées autour de la moyenne. Un écart-type grand reflète un échantillon hétérogène, c'est-à-dire une grande variation dans la dimension des spores : les valeurs sont dispersées ; elles ne sont pas bien rassemblées autour de la moyenne. Au contraire, un écart-type faible traduit une population homogène. L'écart-type est généralement défini comme la moyenne quadratique des écarts des valeurs (x_i) par rapport à la moyenne arithmétique, \bar{x} , de l'échantillon. La relation 8 illustre cette définition. Dans cette relation, lorsque l'effectif (n) de l'échantillon n'est pas supérieur à 30, on remplace souvent par $n - 1$ le dénominateur de la fraction.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \text{Relation 8}$$

Comme avec la méthode empirique, le résultat de la mesure des spores sera exprimé sous la forme d'un intervalle ($\bar{x} \pm s$). La limite inférieure de celui-ci est calculée en retranchant l'écart-type à la moyenne ; au contraire, la limite supérieure est calculée en additionnant ces deux paramètres. Certains auteurs, comme HENTIC (2000), conseillent de calculer les bornes en retranchant ou en additionnant, à la moyenne, le double de l'écart-type ($\bar{x} \pm 2s$). Personnellement, nous préférons nous limiter à un seul écart-type, car alors l'intervalle défini devient trop large, et les mesures perdent une grande partie de leur signification.

Bien entendu, il n'est pas interdit de combiner la méthode empirique avec la méthode statistique, notamment en assortissant l'intervalle défini par la méthode statistique des valeurs *modérément extrêmes*, indiquées entre parenthèses, et relevées par la méthode empirique. On peut aussi rechercher l'intervalle par la méthode empirique, et mentionner, en plus, la moyenne et l'écart-type, que le lecteur interprétera selon ses propres conceptions.

Enfin, les mesures de spores sont fréquemment accompagnées, dans la littérature, de deux paramètres supplémentaires : le quotient et le volume sporiques, qui sont aisément calculables. Le quotient sporique (Q) se calcule en divisant la longueur des spores, L , par leur diamètre, D . Une spore aura donc un quotient d'autant plus proche de un que sa forme tendra vers la sphère. A l'inverse, plus une spore sera allongée, et plus son quotient sporique sera élevé. On subodore clairement que le quotient sporique donne une idée de la forme des spores, à travers l'importance de leur « allongement ».

$$Q = \frac{L}{D}$$

Relation 9

Pour les spores comprimées, deux quotients peuvent être calculés, l'un correspondant au rapport longueur sur épaisseur, et l'autre au rapport longueur sur largeur. Un troisième quotient, donnant une idée de l'importance de la compression, pourrait être calculé en recherchant le rapport entre la largeur et l'épaisseur.

Dans la plupart des cas, tous les quotients sporiques sont égaux ou supérieurs à un, car les rapports sont toujours recherchés en divisant la longueur par l'épaisseur ou par la largeur, ou encore en divisant la largeur par l'épaisseur, mais pas l'inverse ; or, pour l'immense majorité des spores, la longueur est plus grande que la largeur, qui est elle-même plus grande que l'épaisseur.

Comme pour les dimensions, les quotients seront exprimés sous la forme d'un intervalle cernant les valeurs les plus courantes. Les valeurs exceptionnelles pourraient, ici aussi, être indiquées entre parenthèses.

Le volume sporique, quant à lui, est un paramètre supplémentaire, moins significatif que les quotients, mais pouvant néanmoins valoir la peine d'être recherché. Il s'exprime en micromètres cube (μm^3) et se calcule en assimilant les spores à des ellipsoïdes de révolution, grâce à la relation suivante ⁽²¹⁾, dans laquelle L représente la longueur de la spore, et D correspond à son diamètre, ces deux grandeurs étant exprimées en micromètres :

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{L}{2} \times \left(\frac{D}{2}\right)^2$$

Relation 10

On peut également donner un intervalle pour ce paramètre, ou se contenter de mentionner le volume moyen. La signification du volume sporique, calculé de cette manière, est relativement limitée, d'abord parce qu'il ramène la forme des spores à des ellipsoïdes de révolution, ce qui est loin d'être toujours le cas, et ensuite parce qu'une très faible augmentation de la longueur des spores, ou de leur diamètre, conduit à une augmentation bien plus forte de leur volume. Pour une sphère, le volume double lorsque le diamètre est multiplié par 1,26 ⁽²²⁾ !

Enfin, il est bon de préciser que les quotients et le volume sporiques doivent être calculés pour chaque spore étudiée, et non pas à partir de l'intervalle représentant la dimension générale des spores. Disons encore que la première chose à faire, après avoir calculé le ou les quotients et le volume sporiques pour chaque spore, est de trier séparément, par ordre croissant, les valeurs correspondant à chaque paramètre (L , D , Q , V). Cette manière de procéder permet de repérer rapidement les maxima et les minima, et de se faire plus facilement une idée globale de la distribution des valeurs, sans pour autant être obligé de répartir ces dernières en classes et de dresser un graphique.

Tous les calculs dont il est question ci-dessus peuvent paraître fastidieux, mais avec un minimum d'habitude, ils sont aisément réalisés, rapidement et sans risque d'erreur, à l'aide d'un ordinateur ou d'une calculatrice de poche tant soit peu perfectionnée. Deux exemples réels vont nous permettre d'explicitier ce qui précède. Ceux-ci nous donneront

⁽²¹⁾ Cette relation, donc, est celle qui permet le calcul du volume d'un ellipsoïde de révolution. Elle n'est théoriquement correcte que pour les spores non comprimées, c'est-à-dire pour celles dont l'épaisseur est égale à la largeur. Lorsque ce n'est pas le cas, la relation générale suivante devrait être utilisée :

$$V = \frac{\pi \times L \times l \times e}{6}$$

Relation 10'

⁽²²⁾ En fait, le volume de la sphère étant proportionnel au cube de son rayon, il double lorsque ce dernier est multiplié par un facteur correspondant à la racine cubique de deux (c'est-à-dire 1,26).

notamment l'occasion de comparer entre elles les différentes méthodes d'exploitation des résultats, et de montrer l'intérêt de mesurer un nombre suffisamment élevé de spores.

9.3. Exemples d'exploitation des résultats de la mesure des spores

9.3.1. Comparaison des trois méthodes d'interprétation des résultats

Le premier exemple qui va être traité est celui de la mesure d'une vingtaine de spores de *Peziza cerea*, prélevées sur une sporée ancienne de plus d'un an. Les spores ont été énergiquement regonflées, à chaud, dans l'ammoniaque concentrée, et mesurées dans le rouge Congo ammoniacal. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 6. Notons que les ascospores de *Peziza cerea* sont de forme ellipsoïdale.

Longueur (µm)	Diamètre (µm)	Quotient	Volume (µm ³)
16,5	9	1,833	699,8
17,25	9,75	1,769	858,6
16	9,5	1,684	756,1
18,25	10,5	1,738	1053,5
16	9,5	1,684	756,1
15,25	9,25	1,649	683,2
18,75	10,5	1,786	1082,4
15	9	1,667	636,2
16,75	9	1,861	710,4
17,5	10	1,750	916,3
16,25	9	1,806	689,2
17,25	9	1,917	731,6
15,75	9	1,750	668,0
16,75	9,75	1,718	833,7
16	9	1,778	678,6
18	10,25	1,756	990,2
18,25	9,75	1,872	908,4
15,75	9	1,750	668,0
16,75	9,25	1,811	750,4
17	10	1,700	890,1

Tableau 6 : Résultats de la mesure de vingt spores provenant d'une ancienne sporée de *Peziza cerea*. Les quatre valeurs se trouvant sur une même ligne se rapportent toutes à la même spore : la longueur et le diamètre ont été mesurés, tandis que le quotient et le volume ont été calculés respectivement d'après les relations 9 et 10.

Le passage par un tableau de ce genre est nécessaire aux calculs du quotient et du volume de chaque spore. Toutefois, ce type de tableau n'est que très peu éloquent, et, afin de pouvoir interpréter les données, il est préférable de construire un second tableau, dans lequel les valeurs seront rangées par ordre croissant. C'est ce qui a été fait dans le tableau 7.

Longueurs (µm)	Diamètres (µm)	Quotients	Volumes (µm ³)
15,00	9,00	1,649	636,2
15,25	9,00	1,667	668,0
15,75	9,00	1,684	668,0
15,75	9,00	1,684	678,6
16,00	9,00	1,700	683,2
16,00	9,00	1,718	689,2
16,00	9,00	1,738	699,8
16,25	9,00	1,750	710,4
16,50	9,25	1,750	731,6
16,75	9,25	1,750	750,4
16,75	9,50	1,756	756,1
16,75	9,50	1,769	756,1
17,00	9,75	1,778	833,7
17,25	9,75	1,786	858,6

17,25	9,75	1,806	890,1
17,50	10,00	1,811	908,4
18,00	10,00	1,833	916,3
18,25	10,25	1,861	990,2
18,25	10,50	1,872	1053,5
18,75	10,50	1,917	1082,4
$\bar{x} = 16,75 \mu\text{m}$	$\bar{x} = 9,50 \mu\text{m}$	$\bar{x} = 1,764$	$\bar{x} = 798,0 \mu\text{m}^3$
$s = 1,01 \mu\text{m}$	$s = 0,52 \mu\text{m}$	$s = 0,070$	$s = 132,2 \mu\text{m}^3$

Tableau 7 : Les données du tableau précédent sont présentées ici par ordre croissant. Les quatre valeurs d'une même ligne ne se rapportent donc plus nécessairement à une même spore, car chaque colonne a été triée indépendamment. Un tableau de ce genre permet de repérer facilement les minima et les maxima (italique), les valeurs courantes (fond gris) et les valeurs « modérément extrêmes ». Bien entendu, la distinction entre les valeurs *normales* ou *modérément extrêmes* est personnelle et très subjective. La moyenne (\bar{x}) et l'écart-type (s) ont été calculés à partir des valeurs de chaque colonne, selon les relations 7 et 8. Ces deux paramètres auraient déjà pu être calculés dans le tableau précédent.

La présentation utilisée dans le tableau 7 facilite grandement l'interprétation et l'expression des mesures. Il a été dit, dans ce qui précède, que cette interprétation pouvait être réalisée de manière empirique ou statistique, mais encore, dans ce dernier cas, qu'il était possible de baser le calcul des intervalles sur l'écart-type ($\bar{x} \pm s$) ou sur le double de celui-ci ($\bar{x} \pm 2s$). Les limites inférieure (inf.) et supérieure (sup.) de chaque intervalle de valeurs ont été calculées par chacune de ces trois méthodes, et elles sont comparées dans le tableau 8.

METHODE	LONGUEUR		DIAMETRE		QUOTIENT		VOLUME	
	inf.	sup.	inf.	sup.	inf.	sup.	inf.	sup.
A l'œil	15,75	17,50	9,00	10,00	1,649	1,833	668,0	916,3
$\bar{x} \pm s$	15,74	17,76	8,98	10,02	1,694	1,834	665,8	930,2
$\bar{x} \pm 2s$	14,73	18,77	8,46	10,54	1,624	1,904	533,6	1062,4

Tableau 8 : Limites inférieure (inf.) et supérieure (sup.) des intervalles de valeurs courantes pour la longueur, le diamètre, le quotient et le volume des spores de *Peziza cerea*. Les bornes de ces intervalles ont été déterminées selon trois méthodes différentes : d'une part empiriquement, grâce aux valeurs disposées par ordre croissant dans le tableau 7, et, d'autre part, statistiquement, sur base de la valeur du simple ($\bar{x} \pm s$) ou du double ($\bar{x} \pm 2s$) écart-type. Remarquer la bonne correspondance générale entre les valeurs de la première ligne et celle de la seconde ligne, mais la discordance par rapport à la dernière ligne.

Ce tableau montre clairement que les valeurs obtenues par la méthode statistique basée sur le simple écart-type sont, globalement, très proches des valeurs que nous avons obtenues empiriquement, à l'œil. Par contre, les limites obtenues sur la base du double écart-type divergent assez nettement. Cette dernière méthode n'est donc pas en accord avec notre propre conception, c'est pourquoi nous refusons de l'utiliser.

Il reste encore, une fois tous ces calculs effectués, à procéder à l'expression finale de la dimension des spores. Celle-ci se fera à partir des limites d'intervalle consignées dans le tableau 8, mais il faudra tenir compte, en plus, des valeurs *modérément extrêmes* du tableau 7, tout en rejetant les valeurs *véritablement extrêmes* de ce même tableau. C'est au moment de l'expression des résultats (en suivant les règles énoncées aux paragraphes 9.1 et 9.2) que les nombres devront être arrondis. La transcription, selon la syntaxe habituelle, des dimensions des spores prises en compte dans cet exemple, est réalisée dans le tableau 9.

METHODE	RESULTATS
Longueur et diamètre	
A l'œil	(15)15,75-17,5(18,25) x 9-10(10,5) μm
$\bar{x} \pm s$	(15)15,75-17,75(18,25) x 9-10(10,5) μm
$\bar{x} \pm 2s$	14,75-18,75 x 8,5-10,5 μm
Quotient	
A l'œil	1,65-1,83(1,92)
$\bar{x} \pm s$	1,69-1,83(1,92)
$\bar{x} \pm 2s$	1,62-1,90
Volume	
A l'œil	(636)668-916(1082) μm^3
$\bar{x} \pm s$	(636)666-930(1082) μm^3
$\bar{x} \pm 2s$	534-1062 μm^3

Tableau 9 : Expression, selon les conventions habituelles, des valeurs consignées dans les tableaux 7 et 8. Ce tableau permet une comparaison des résultats obtenus par les trois méthodes d'interprétation, et montre bien que les intervalles obtenus par la méthode

basée sur le double écart-type sont trop larges, car même les valeurs extrêmes sont comprises dans ces intervalles. Remarquer que les bornes des intervalles ont été arrondies selon les règles énoncées au paragraphe 9.1. Les valeurs *modérément extrêmes* du tableau 7 ont été définies par la méthode empirique, et conservées dans les trois méthodes d'expression, sauf lorsqu'elles se rapprochaient trop des bornes de l'intervalle des valeurs *normales*.

Cet exemple nous a permis de comparer les trois méthodes d'expression des résultats, et de montrer pourquoi nous préférons celle basée sur l'analyse statistique des données, avec définition des intervalles par rapport au simple écart-type. L'exemple suivant va permettre la comparaison des valeurs obtenues en fonction du nombre de spores mesurées.

9.3.2. Comparaison des résultats en fonction du nombre de spores mesurées

Les spores étudiées, dans ce second exemple, sont celles de *Chaetosphaerella phaeostroma*. Elles ont été mesurées à partir de périthèces frais, préparés par dissociation dans le rouge Congo ammoniacal. Rappelons que *Chaetosphaerella phaeostroma* est un pyrénomycète qui possède des spores arquées, cylindriques à fusiformes. Le tableau 10 reprend les dimensions obtenues.

Longueur (µm)	Diamètre (µm)	Quotient	Volume (µm ³)
30,75	7	4,393	788,9
28	5,75	4,870	484,7
32,25	6,75	4,778	769,4
29,5	6,5	4,538	652,6
28,25	6,25	4,520	577,8
32,25	7	4,607	827,4
33,5	6,75	4,963	799,2
36,5	6	6,083	688,0
29,25	6,75	4,333	697,8
32,25	6,25	5,160	659,6
34	7	4,857	872,3
39,25	6,25	6,280	802,8
32,25	6,75	4,778	769,4
31,5	7,25	4,345	866,9
34,75	7	4,964	891,6
27,5	7	3,929	705,5
32	6,25	5,120	654,5
31,5	6	5,250	593,8
34	7	4,857	872,3
33,5	6,25	5,360	685,2

Tableau 10 : Résultats de la mesure de vingt spores de *Chaetosphaerella phaeostroma* avec, pour chacune d'elles, la valeur du quotient et du volume. Les vingt spores ont été réparties en quatre groupes de cinq. Cette répartition est aléatoire, puisque les spores mesurées ont elles-mêmes été sélectionnées de manière aléatoire.

Les vingt spores dont les dimensions sont reprises dans ce tableau ont été arbitrairement réparties en quatre groupes de cinq. La moyenne et l'écart-type ont été calculés, d'une part, pour chacun de ces groupes et, d'autre part, pour l'ensemble des vingt spores. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 11.

GROUPE	LONGUEUR		DIAMETRE		QUOTIENT		VOLUME	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
1 ^{er} groupe	29,75	1,59	6,45	0,43	4,620	0,176	654,7	114,9
2 ^e groupe	32,75	2,34	6,55	0,37	5,029	0,599	734,4	66,2
3 ^e groupe	34,35	2,71	6,85	0,34	5,045	0,652	840,6	46,5
4 ^e groupe	31,70	2,29	6,50	0,42	4,903	0,515	702,3	93,0
ensemble	32,14	2,82	6,59	0,42	4,899	0,547	733,0	108,5

Tableau 11 : Résultats du calcul de la moyenne arithmétique et de l'écart-type pour chacun des quatre groupes de cinq spores, ainsi que pour l'ensemble des vingt spores.

Statistiquement, l'approximation de la moyenne et de l'écart-type à partir d'un échantillon aléatoire sera d'autant meilleure (car plus proche de la réalité) que l'effectif de l'échantillon sera important. Nous simplifierons le problème en supposant que la population totale est de vingt spores, et que donc la moyenne et l'écart-type, calculés à

partir de l'ensemble des vingt spores, correspondront aux paramètres de la population. Pour avoir une idée de l'erreur que l'on risque de commettre en calculant les paramètres statistiques sur cinq spores au lieu de vingt, nous comparerons la moyenne et l'écart-type des groupes de cinq (que nous appellerons dès lors des échantillons) aux paramètres de la population (constituée par les vingt spores du tableau 10). Les résultats de la comparaison sont repris dans le tableau 12, sous la forme d'écart relatif (% \bar{x} et % s) entre les paramètres des échantillons de cinq spores et ceux de la population.

GROUPE	LONGUEUR		DIAMETRE		QUOTIENT		VOLUME	
	% \bar{x}	% s						
1 ^{er} groupe	7,4	43,6	2,1	2,4	5,7	67,8	10,7	5,9
2 ^e groupe	1,9	17,0	0,6	11,9	2,7	9,5	0,2	39,0
3 ^e groupe	6,9	3,9	3,9	19,0	3,0	19,2	14,7	57,1
4 ^e groupe	1,4	18,8	1,4	0,0	0,1	5,9	4,2	14,3

Tableau 12 : Ecarts relatifs entre les paramètres (moyenne et écart-type) des quatre échantillons de cinq spores et les paramètres de la population. Les plus grands écarts sont mis en exergue (caractères gras italiques).

Ce tableau montre qu'en ne mesurant que cinq spores au lieu de vingt, on risque de commettre des erreurs atteignant 15 % sur la moyenne, et presque 70 % sur l'écart-type (²³) ! Bien entendu, ces valeurs sont biaisées par le fait que nous avons limité la population à vingt spores, ce qui n'est pas le cas dans la réalité. Il est évident qu'une erreur entache également la moyenne et l'écart-type calculés à partir de vingt spores, puisque la population en compte presque une infinité dans la réalité.

En conclusion, cet exemple montre bien l'importance de mesurer un nombre suffisamment grand de spores, particulièrement lorsque la taille de ces dernières varie dans une large mesure. Une vingtaine de spores représente un bon compromis entre l'effort fourni et le gain en précision et en exactitude. Néanmoins, il serait intéressant de comparer les résultats obtenus en mesurant vingt spores et en mesurant une centaine...

10. Conclusion générale

Personne ne conteste l'importance du rôle joué par les mesures, aussi bien macroscopiques que microscopiques, dans l'identification des champignons, tout particulièrement au niveau spécifique. A travers cet article, nous avons tenté de montrer que l'obtention de mesures *comparables* n'est pas nécessairement tâche aussi aisée qu'il peut y paraître de prime abord.

Les grandes sources d'erreurs ont été explicitées, et quelques conseils permettant l'évitement des écueils les plus importants ont été prodigués. Nous avons vu que des erreurs relatives pouvant dépasser dix pour cent sont monnaie courante. Toutefois, on peut raisonnablement espérer que, de manière générale, les différentes sources d'erreurs n'exercent pas toutes leur action dans le même sens. Ainsi, l'une compensant l'autre, l'erreur globale sur le résultat final peut être relativement limitée.

C'est, entre autres, pour cette raison que la réalisation de mesures à l'aide du microscope photonique reste, pour le mycologue, une technique d'usage courant, car, pour peu qu'elles soient toujours effectuées dans de bonnes conditions, les mesures sont *comparables*. Il faut cependant admettre, en toute modestie, que l'exactitude physique de nos mesures micrométriques quotidiennes est bien loin d'être toujours démontrée, et que les dimensions obtenues à l'aide d'autres méthodes, telles que la microscopie électronique, pourraient fournir des résultats bien différents...

Par ailleurs, une certaine confusion existe encore en ce qui concerne la définition des angles de vue et des grandeurs caractéristiques des spores, chaque auteur ayant ses propres conventions. La largeur des uns correspond à l'épaisseur des autres ; d'aucuns conseillent de réaliser les mesures sur les spores vues de face, les autres les préfèrent de profil ; etc. Chacun argumente sa vision des choses avec plus ou moins d'à propos et de bon sens. Ainsi, les notions développées au chapitre 7, bien que largement basées sur les vues de JOSSERAND, n'en restent pas moins très personnelles.

Nous avons également vu comment il est possible de réaliser des mesures à partir de dessins ou de photographies. Toutefois, une autre technique, dont l'usage se répand de plus en plus, a été complètement passée sous silence, faute d'expérience personnelle : il s'agit de la réalisation automatique des mesures, par informatique, à l'aide de logiciels spécialisés. Les mesures sont effectuées à partir d'images numérisées, obtenues, en temps réel, à l'aide d'une caméra vidéo ou d'un appareil photo numérique. Comme lors de la réalisation de mesures par les techniques habituelles, un étalonnage préalable est indispensable.

Terminons en disant que la plupart des idées de cet article sont issues d'une réflexion personnelle, basée sur notre propre expérience et sur la lecture de différents ouvrages et articles. Ces réflexions pourront paraître étonnantes, curieuses, voire farfelues, inutiles ou même incompréhensibles à certains. Espérons toutefois que ceux-là, qui n'auront

(²³) Une erreur relative aussi importante que 70 % tend à montrer que le calcul de l'écart-type n'a pas de sens pour des échantillons dont l'effectif est aussi réduit. Par ailleurs, il est à noter que rien, dans la relation permettant le calcul de ce paramètre, n'empêche de le faire sur deux données, voire même sur une seule !

peut-être pas tout à fait tort, parviendront malgré tout à extraire, des lignes qui précèdent, quelques informations pratiques leur permettant de réaliser des mesures de manière adéquate.

11. Bibliographie

Les ouvrages de JOSSERAND (1952), de POLICARD *et al.* (1957) et de LOCQUIN (1984), ainsi que l'introduction du tome 3 de BREITENBACH et KRÄNZLIN (1991), et l'article de HENTIC (2000), sont des compléments dont la lecture ne saurait trop être conseillée.

- AYEL, A. ; MOINARD, A. : *Le microscope. Constitution ; fonctionnement ; emploi en mycologie.* Bulletin Spécial n° 3a. Société Mycologique du Poitou, 1992 (seconde édition).
- BON, M. : *Champignons de France et d'Europe occidentale.* Arthaud, 1988.
- BOUILLOT, R. : *La photographie moderne. Traité technique et pratique.* Montel, 1975.
- BREITENBACH, J. ; KRÄNZLIN, F. : *Champignons de Suisse.* Mykologia, 1986-2000 (5 tomes).
- COURTECUISSIE, R. ; DUHEM, B. : *Guide des champignons de France et d'Europe.* Delachaux et Niestlé, 1994.
- DE IZARRA, Z. : *Introduction à l'étude microscopique des champignons.* Bulletin Spécial n° 5. Société Mycologique du Poitou.
- ELLIS, M. B. ; ELLIS, J. P. : *Microfungi on Land Plants.* Richmond, 1997 (seconde édition).
- FAROUX, J.-P. ; RENAULT, J. : *Optique. Optique géométrique et optique physique.* Dunod, 1998.
- HENTIC, R. : *A propos de l'exploitation statistique des mesures en mycologie.* Bull. Soc. mycol. Fr., 116 (2), 2000 : 173-180.
- JOSSERAND, M. : *La description des champignons supérieurs. Technique descriptive ; vocabulaire raisonné du descripteur.* Lechevalier, 1952.
- JUNGERS, V. J. : *Principes de microscopie et de microphotographie.* Desoer.
- KANE, J. ; STERNHEIM, M. : *Physique.* InterEditions, 1986.
- KUHNER, R. ; ROMAGNESI, H. : *Flore analytique des champignons supérieurs. Agarics, bolets, chanterelles.* Masson, 1984.
- LOCQUIN, M. : *Mycologie générale et structurale.* Masson, 1984.
- LOCQUIN, M. ; LANGERON, M. : *Manuel de microscopie.* Masson, 1978.
- POLICARD, A. ; BESSIS, M. ; LOCQUIN, M. : *Traité de microscopie. Instruments et techniques.* Masson, 1957.
- SPIEGEL, M. R. : *Statistique. Cours et problèmes.* Seconde édition, McGraw-Hill, 1993.
- VENEK, J. ; PROS, L. : *Minéraux.* Gründ, 1987.

Nous n'avons malheureusement pas encore eu l'occasion de consulter l'article de HEINEMANN, P. et RAMELOO, J. (*De la mesure des spores et de son expression.* Agarica, 6 (12), 1985 : 366-380), qui représente pourtant certainement une référence intéressante.

12. Remerciements

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements aux trois personnes qui m'ont aidé dans la rédaction de cet article : tout d'abord Jean-Marie PIRLOT, pour la réalisation des nombreux dessins qui sont à la base des figures 7, 14 et 15, ainsi que pour la relecture avisée de mon texte, à travers l'oculaire de son fidèle microscope. Ensuite, Daniel DRUART, qui a, lui aussi, accepté de relire mon texte, dépoussiérant pour l'occasion son tableau noir de mathématicien. Enfin, et peut-être surtout, Jean-François BAAR, qui, affublé de son épée d'Académicien, a toujours révisé mes articles avec beaucoup de persévérance, en concentrant tout particulièrement ses efforts sur la question linguistique.

13. Table des matières

PARTIE 1 : Introduction ; mesures à l'échelle macroscopique ; étalonnage des oculaires micrométriques ; photographie et dessin

1. INTRODUCTION

2. MESURES, UNITES ET ETALONS

3. MESURES A L'ECHELLE MACROSCOPIQUE

3.1. Le pied à coulisse

3.2. Expression des résultats

4. MESURES A L'ECHELLE MICROSCOPIQUE : GENERALITES

5. ETALONNAGE DES OCULAIRES MICROMETRIQUES

5.1. Nécessité de l'étalonnage

5.2. Réglages préalables à l'étalonnage

5.2.1. *Clé de choix du bon protocole de réglage*

5.2.2. *Protocoles de réglage*

5.2.2.1. *Microscopes monoculaires*

5.2.2.2. *Microscopes binoculaires à réglage interpupillaire n'influant pas sur la longueur du tube*

5.2.2.3. *Microscopes binoculaires à réglage interpupillaire influant sur la longueur du tube*

5.2.3. *Remarque importante concernant les protocoles B, C et D*

5.2.4. *Réglage de l'écart interpupillaire et réglage dioptrique*

5.2.4.1. *Réglage de l'écart interpupillaire*

5.2.4.2. *Réglage dioptrique*

5.3. Pratique de l'étalonnage proprement dit

6. CAS PARTICULIERS DU DESSIN ET DE LA PHOTOGRAPHIE

6.1. Réalisation de mesures à partir de la pellicule ou du dessin

6.2. Réalisation de mesures sur des images secondaires

6.3. Fréquence utile d'étalonnage

PARTIE 2 : Pratique des mesures micrométriques ; principales sources d'erreurs ; exploitation et expression des résultats ; conclusion.

7. REALISATION PRATIQUE DES MESURES MICROMETRIQUES

7.1. Méthode générale de mesure

7.2. Mesure des spores

7.2.1. *Définition des angles de vue et des grandeurs caractéristiques en fonction de la morphologie des spores.*

7.2.2. *Conditions de mesure*

7.3. Mesure d'éléments divers

8. PETIT CATALOGUE DES GRANDES ERREURS

8.1. Erreurs dues à un mauvais étalonnage

8.1.1. *Négliger l'étalonnage*

8.1.2. *Ne pas tenir compte de l'écart interpupillaire et du réglage dioptrique*

8.1.3. *Cas des congrès*

8.2. Erreurs dues à l'expérimentateur et à la nature des éléments mesurés

8.3. Erreurs dues au matériel utilisé

8.4. Fausses erreurs

9. EXPLOITATION ET EXPRESSION DES RESULTATS

9.1. Effectif et précision

9.2. Analyse statistique et expression des résultats

9.3. Exemples d'exploitation des résultats de la mesure des spores

9.3.1. *Comparaison des trois méthodes d'interprétation des résultats*

9.3.2. *Comparaison des résultats en fonction du nombre de spores mesurées*

10. CONCLUSION GENERALE

11. REMERCIEMENTS

12. TABLE DES MATIERES