

Mesures des spores

et interprétation statistique des résultats obtenus.

Par Jean-Louis Jalla

E_mail : jljalla@aol.com

Avertissement:

Le présent travail ne s'adresse qu'aux mycologues amateurs qui ne disposent pas de système de mesure sophistiqué. Seule une méthode ne nécessitant que l'emploi d'un microscope optique, équipé d'un oculaire micrométrique et d'un objectif à immersion autorisant un grossissement de 1000 diamètres environ sera développée.

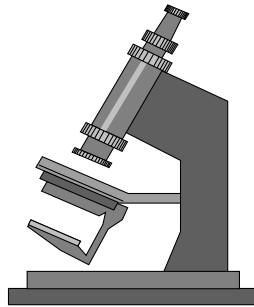
Les traitements statistiques nécessitent l'usage d'un PC et du logiciel EXCEL.

Le fichier EXCEL peut être fourni sur demande auprès de l'auteur (via Internet).

Sommaire:

Présentation d'une méthodologie de mesure des spores adaptée aux impératifs des mycologues amateurs, précautions à prendre. Calcul du volume sporique et intérêt de ce paramètre. Calcul du rapport L/l. Interprétation statistique des résultats et présentation graphique de la distribution.

La méthode proposée permet de comparer deux séries de mesures par comparaison des moyennes.



Mesures:

Quels que soient les traitements statistiques effectués sur les valeurs mesurées, si celles-ci sont entachées d'erreurs, les résultats obtenus seront fantaisistes. La mesure des spores est la partie la plus délicate du processus. En préalable à toute mesure, un minimum d'équipements est nécessaire, et quelques précautions sont indispensables pour son usage.

Le microscope:

Un microscope binoculaire n'est pas indispensable pour les mesures, en effet, seul un oculaire est équipé d'une échelle micrométrique. Par contre les optiques utilisées doivent être de très bonne qualité, les diverses aberrations et autres déformations induites par des optiques bas de gamme peuvent engendrer des erreurs importantes.

Par contre l'usage d'un objectif à immersion est indispensable, l'image obtenue doit être la plus grande possible. En dernier lieu, il faut être certain de la justesse de l'étalonnage de couple **objectif - oculaire**, et au moindre doute ne pas hésiter à refaire cet étalonnage, voir même à le faire confirmer par une tierce personne habituée aux mesures à l'aide d'un microscope.

a) Récolte de la sporée :

Pour être sûr de mesurer des spores arrivées à maturité, il faut impérativement opérer sur des spores de sporée. Donc les carpophores doivent être suffisamment frais pour pouvoir sporuler dans des conditions normales. Lors de la récolte, une bonne façon de faire consiste à mettre les exemplaires destinés à

l'étude dans des sortes de papillotes de papier d'aluminium, fermée aux deux bouts, sans les serrer. Ainsi conservés, ils seront plus aptes à produire des spores, arrivés à la maison.

Dès le retour de la sortie, le champignon est mis sur un verre contenant au fond assez d'eau pour que le stipe soit en contact avec le liquide (mais pas trop), le chapeau reposant sur deux lames de préparation microscopique. Si le temps est très sec, il peut s'avérer nécessaire de fermer l'ensemble par une cloche. Celle-ci peut être opaque, la lumière n'est pas nécessaire.

Si toutes les conditions sont favorables, le lendemain, un dépôt de spores doit s'être fait sur les lames de verre. Cette manière de faire permet en outre de constater la couleur de la sporée, les spores étant regroupées avec une aiguille lancéolée en un petit amas et recouvertes d'une lamelle. Il est ainsi aisé de comparer la couleur avec un témoin, un nuancier ou un code de couleur. C'est la méthode recommandée par H. Romagnési pour estimer au mieux la couleur des sporées des Russules.

b) Préparation pour les mesures.

Le milieu d'observation doit être adapté aux spores à mesurer. Pour les russules, le Melzer s'impose, dans les autres cas, l'eau distillée est souvent suffisante. Cependant les spores dans l'eau ont tendance à se déplacer, rendant les mesures délicates. Un milieu moins fluide peut être nécessaire. Dans ce cas, le bleu lactique est quelquefois préférable. Éviter les milieux d'observation pouvant induire un regonflement trop important (soude...).

Dans tous les cas, le milieu d'observation utilisé doit être précisé dans le compte rendu.

c) Mesures.

Les spores à mesurer devraient être choisies « au hasard » dans la préparation. C'est du moins la règle que professent tous les manuels de statistique. Cependant il ne faut pas perdre de vue quelques notions :

- ◆ Chaque sporée, si on était en mesure de la récolter en intégralité, se compose de plusieurs centaines de milliers, voir de millions de spores.
- ◆ Il existe des tables, des formules, des abaques, pour calculer, en fonction du risque (statistique) retenu, la taille de l'échantillon, et donc le nombre de spores à mesurer. Mais cela reviendrait à mesurer un nombre beaucoup trop grand de spores (plusieurs milliers), ce qui est bien entendu exclu...
- ◆ Notez bien que les grands instituts de sondages rencontrent le même problème, lors des élections, et chacun d'entre eux a mis au point sa « formule miracle » pour définir un « *échantillon représentatif* ». Il faut trouver quel « *échantillon* » de la population est *représentatif de l'ensemble de la population*. Prendre les gens au hasard dans la rue, suivant le quartier de la ville retenue, la ville retenue, l'heure du sondage conduirait à des résultats loin du résultat qui sortira des urnes.
- ◆ Donc il faut « *choisir* » les spores à mesurer, et je sens bien en disant cela que les puristes vont « hurler »... Quand même quelques règles de bon sens: ne pas prendre en compte les spores manifestement mal formées, et aussi celles qui ont une taille vraiment « hors norme ». *Pour le reste, seule l'expérience et le bon sens peuvent vous aider...*

Un autre problème rencontré lors de la mesure des spores est que celles-ci ne se présentent pas toujours à la vue dans un plan horizontal. Lorsque la spore se trouve disposée vue par dessus, inclinée, sa dimension apparente est très sous-estimée lors de sa mesure. Pour détecter cette position, un grossissement maximum est nécessaire. En effet, le plan de netteté n'est pas le même pour la partie « haute » de la spore que pour la partie « basse ». Cette inclinaison est bien entendu possible sur les deux axes.

Nous utilisons pour les mesures un objectif à immersion de 100 associé à un oculaire micrométrique de 10. Ce grossissement d'environ 1000 diamètres nous permet de nous assurer que les spores mesurées sont correctement disposées, et d'éliminer les autres. La très faible *profondeur de champ* du microscope liée à ce grossissement maximum est ici bien utile. Un contour parfaitement net, sans qu'il soit nécessaire de jouer sur la mise au point micrométrique, est un préalable indispensable aux mesures.

Nous pensons que cette vérification n'est pas toujours faite par les mycologues, et que les grandes variations signalées sur les dimensions sont quelquefois le résultat de cette situation.

Pour le rapport L/l cela est encore plus vrai. Pour une espèce donnée, et avec des spores de sporée (matures) la forme générale de la spore varie très peu, et l'écart type sur les rapports L/l doit être petit.

La courbe de distribution des volumes sporiques, donnée par le tableur doit se rapprocher le plus possible d'une distribution normale. Une courbe « à deux bosses » peut signaler que pour certaines spores, et plus

particulièrement sur le petit diamètre, des spores « en biais » on été mesurées.

Pour avoir une représentation statistique convenable de la sporée, il faut mesurer au moins 20 spores différentes. La feuille de calcul présentée en annexe; et les coefficients qui servent au calcul des limites de population sont programmés pour ces 20 mesures. La rigueur statistique nous oblige de préciser que ces 20 mesures sont faibles au regard des milliers (millions ?) de spores produites par un même carpophore (voir supra); Mais la mesure de 20 spores (soit 40 mesures) c'est déjà bien long à réaliser; Cela permet quand même d'avoir une bonne idée de la taille (et de la variabilité) des spores de l'espèce étudiée, et surtout, les valeurs moyennes sont plus représentatives qu'une simple mesure.

Par facilité, sur la feuille de calculs, il suffit de reporter directement les valeurs trouvées en divisions oculaire. Le tableur se charge de convertir en μm suivant l'oculaire employé. Ces paramètres doivent bien évidemment être corrigés pour chaque appareil, en fonction des valeurs relevées lors de l'opération d'étalonnage.

Interprétation statistique des résultats:

Le logiciel EXCEL est utilisé pour les calculs statistiques. (voir un exemple en annexe 1, à la fin de ce texte).

Le classeur se compose de trois feuilles :

Série 1	Feuille de saisie des valeurs l et L pour les calculs
Série 2	Feuille identique à la première utilisée pour faire des comparaisons entre deux séries de mesures.
Test	Feuille sans champs de saisie, les valeurs sont reprises automatiquement sur les deux précédentes feuilles.

Les 20 mesures (L et l) sont reportées sur la feuille.

Le tableur calcul :

- La moyenne
- Le Mini
- Le Maxi
- L'écart type

Pour le grand diamètre, le petit diamètre, le volume sporique, et le rapport L/l.

Sont également calculées les limites de population pour ces paramètres à \pm un écart type multiplié par 2.093.(pour 20 mesures).

Un graphe donne une représentation graphique de la distribution pour 4 classes. (Fréquence).

Intérêt de ces divers paramètres :

Généralement les dimensions des spores sont indiquées de la manière suivante :

Sp. 7-9 x 4-5 μ

Ce qui signifie pour l'auteur que le grand diamètre peut être compris entre **7 et 9 μm** et le petit entre **4 et 5 μm** .

Quelquefois sont précisées entre parenthèses les dimensions extrêmes :

Sp. 7-9 (10) x 4-5(6) μ

Bien sûr un dessin donne en plus la forme générale de celles ci. Enfin quelques auteurs indiquent le rapport entre le grand diamètre et le petit (rapport L/l).

Mais les publications récentes font aussi appel à d'autres paramètres, dont le volume sporique. Le tome 3 des **Champignons de Suisse** (voir Bibliographie) l'indique pour toutes les espèces étudiées. Il est certain que cette donnée est très significative, et varie beaucoup entre des espèces proches.

Attention cependant, une erreur d'estimation du diamètre a des répercussions importante sur le volume. Par exemple, pour une spore de dimension **8.5 x 10 μm** le volume est de **378 μm^3** , il devient **445 μm^3** pour simplement **0.5 μ** d'erreur par excès sur les deux dimensions. L'intérêt d'une étude statistique portant sur un nombre important de mesures est ici évident, la composante aléatoire de l'erreur de mesure (**sg** : voir plus

loin) est pondérée par la moyenne.
La formule retenue pour le calcul de ce volume et :

$$\text{Soit : } \quad 4\pi/3 \cdot l/2^2 \cdot L/2$$

$l/2$ = rayon du petit diamètre
 $L/2$ = rayon du grand diamètre.

Il est évident que l'erreur systématique (par exemple erreur d'étalonnage du micromètre) existe toujours, d'où l'intérêt d'un étalonnage le plus rigoureux possible.

D'autre part, la formule de calcul du volume sporique tend à assimiler les spores à des ellipsoïdes de révolution, ce qui n'est bien entendu pas toujours le cas. Ce volume sera d'autant plus juste que la forme des spores se rapprochera le plus possible de cette structure parfaite. Pour des formes moins « conventionnelles » le volume calculé sera entaché d'une erreur importante. Néanmoins il pourra quand même servir de « référence », à condition bien sûr d'avoir toujours à l'esprit les limites de la méthode.

Les puristes pourront toujours mesurer la largeur de profil (l') et modifier la formule de calcul qui deviendra alors :

$$\text{Soit : } \quad 4\pi/3 \cdot l/2 \cdot L/2 \cdot l' / 2$$

Pour les spores rondes (quelques Russules), où $L = l$, il suffit de recopier la colonne L dans la colonne l .

$$\text{Soit : } \quad 4\pi/3 \cdot (L/2)^3$$

Le volume moyen est toujours plus intéressant que chaque valeur individuelle. Seul celui ci devrait être indiqué.

L'écart type (δ) estimé pour un échantillon de 20 mesures est multiplié par un coefficient de 2.093 pour effectuer le calcul des limites supérieures et inférieures de population (au risque de 95%).

Ces limites de population peuvent servir à éliminer une mesure aberrante (macrospore, mélange de population, erreur de mesure).

Le traditionnel coefficient L/l est issu de la moyenne des mesures des deux diamètres. Pour lui aussi sont calculés les valeurs extrêmes hautes et basses.

En dernier lieu, la représentation graphique de la fréquence de distribution des volumes donne une idée de la « normalité » de la population étudiée. Cependant précisons que cette courbe de Gauss tracée avec seulement 20 valeurs et 4 classes trouve vite ses limites et serait (à juste titre) à même de faire « hurler » un statisticien rigoureux !

Comparaison de deux échantillons:

Il est quelquefois nécessaire de comparer deux échantillons, les statistiques peuvent aider, dans ce cas, à répondre à la question que bien souvent se posent les mycologues :

Les deux champignons étudiés sont-ils de la même espèce ?

Ou, si la question est posée de manière plus scientifique :

Les différences constatées entre les deux séries de mesures sont-elles significatives ou sont-elles seulement dues à la fluctuation d'échantillonnage ?

Pour cela, la simple comparaison des deux moyennes (que ce soit du volume des spores, ou des dimensions L et l) peut nous donner une indication, à condition que la réponse à la question *les moyennes sont-elles significativement différentes, soit fiable*.

Si on effectue plusieurs séries de mesures de spores prélevées sur un même carpophore, on obtiendra des valeurs différentes, et ceci pour de nombreuses raisons dont les principales sont :

- Tous les champignons font preuve (plus ou moins) d'une certaine hétérosporée. Et suivant où sera prélevé l'échantillon des 20 spores mesurées sur la préparation, les valeurs trouvées seront différentes. Cette situation sera amplifiée beaucoup si la taille de l'échantillon est petite (ici 20 mesures). Cette fluctuation d'échantillonnage est de loin la cause des plus grandes variations constatées. Pour pallier à ce problème il faudrait multiplier par 10 ou 20 le nombre de mesures effectuées, mais le protocole deviendrait alors bien lourd...

- Notre processus de mesure (microscope, oculaire micrométrique, opérateur...) est lui aussi soumis à certaines variations, et même s'il était possible de toujours mesurer les mêmes spores du même champignon, les valeurs trouvées seraient-elles aussi (un peu) différentes.

- Et enfin, pour des spores particulièrement petites, la performance de notre processus de mesure (capabilité) est très insuffisante. La division la plus petite de nos oculaires micrométriques est, suivant les appareils, et avec un objectif à immersion de X100, d'environ 1µm (1.19 µm sur mon appareil avec un oculaire de X10). Même s'il est possible d'estimer la demi-division, voir mieux pour les plus méticuleux, une erreur de 0.5 µm représente 10% d'erreur pour des spores de 10 µm. On a vu plus haut quelle répercussion 0.5 µm d'erreur avaient sur le calcul du volume sporique.

Pour toutes ces raisons, deux séries de mesures donnent obligatoirement des moyennes (et une dispersion) différente. Il est donc utile, si on veut une réponse objective, de se servir de tests statistiques qui, à défaut de nous donner une réponse sûre, nous indiqueront au moins quelle confiance il est possible d'accorder à une différence entre deux séries, et quelle est la probabilité de se tromper en formulant un jugement.

Le test proposé porte sur les moyennes des deux séries de mesures. Il est, dans la feuille de calculs proposée, automatique, et reprend les mesures des deux feuilles de saisie. Il consiste à calculer l'écart standard S_d de la distribution des différences.

$$sd = \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}$$

Avec :	m1	Moyenne de la première série de mesures
	m2	moyenne de la deuxième série de mesures
	δ1	Ecart type des valeurs du premier échantillon
	δ2	Ecart type des valeurs du deuxième échantillon
	n1	Nombre de mesures du premier échantillon (20)
	n2	Nombre de mesures du deuxième échantillon (20)
	sd	Ecart standard de la différence des moyennes.

Si deux fois cet écart standard ($2 S_d$) est inférieur à la différence des deux moyennes, alors on pourra dire que *cette différence est significative au seuil de probabilité de 5%*

Si	$2 sd > m1 - m2$	Test négatif
Si	$2 sd < m1 - m2$	Test positif
	Au risque de 5%	

Il est possible de rendre le test plus sévère en prenant $2.6 S_d$. **Le seuil de probabilité passe alors à 1%.**

Si	$2,6 sd > m1 - m2$	Test négatif
Si	$2,6 sd < m1 - m2$	Test positif
	Au risque de 1%	

Mais en corollaire, le risque de répondre NON à la question « **les moyennes sont-elles statistiquement différentes ?** » (alors qu'elles le sont) augmente. Nous avons choisi de garder le seuil de probabilité de 5%

Le test porte sur les trois paramètres :

- L
- l
- Volume des spores.

Mais il est bien évident que le test sur le volume des spores **est le plus intéressant.**

Limites de la méthode :

a) Limite sur les mesures des spores.

Il est bien évident que les amateurs ne pourront jamais rivaliser avec les professionnels, et ceci, indépendamment de la compétence des uns et des autres, mais à cause des équipements de laboratoires dont peuvent bénéficier les seconds. Les mesureurs électroniques associés à une caméra CCD montée sur un microscope seront toujours plus performants que le meilleur oculaire micrométrique manié même par un génial amateur. Mais cela ne doit pas dispenser les mycologues amateurs de faire preuve dans tous les domaines d'une rigueur sans faille. Ils ont pour eux le temps et la passion. Un protocole connu, respecté et appliqué avec confiance doit donner des résultats parfaitement valables et pouvant servir de référence.

Nous avons tenté de calculer (ou plutôt d'estimer) l'incertitude de mesure du processus Microscope + objectif immersion X100 + oculaire micrométrique (+ opérateur).

$$hg = dg + 3 sg$$

Avec : **hg** Incertitude de mesure du processus de mesure.
 dg erreur systématique (pour notre cas, généralement erreur d'étalonnage)
 sg estimateur de l'écart type du processus de mesure (erreur aléatoire).

dg devrait être idéalement à une valeur très proche de zéro. Un étalonnage avec un micromètre objet de très grande qualité, beaucoup de soins mis dans l'opération tendent à nous conduire à ce résultat. Par facilité, je considère ce résultat atteint ! (ne pas oublier quand même que si les mesures sont effectuées avec l'objectif à immersion, l'étalonnage doit lui aussi être fait avec de l'huile entre l'objectif et la lamelle qui recouvre l'échelle micrométrique du micromètre objet).

sg est beaucoup plus difficile à cerner. Une série de mesures portant sur des objets dits (à tort) de référence, telle qu'une préparation de diatomées, en prenant soin de repérer toujours la même, et en notant objectivement les résultats peut nous aider à déterminer la **répétabilité** de nos mesures. Il va sans dire que la diatomée choisie devra être de dimension aussi proche possible des spores habituellement mesurées.

Mais donner une valeur est hasardeux. Il me semble, plus par intuition et par expérience que par certitude scientifique, et sans que je ne sois capable d'apporter un fondement mathématique irréfutable à ce chiffre, **que l'incertitude globale** des mesures faites au microscope soit :

$$hg = \pm 0.5\mu\text{m}.$$

Ce qui (est si c'est vrai) est déjà remarquable.

b) Limite sur les méthodes statistiques employées.

Un carphophore produit plusieurs milliers (plusieurs millions ?) de spores, et tenter d'appréhender les caractéristiques d'une population avec seulement la mesure de 20 de celles-ci est très osé ! Mais c'est déjà bien contraignant, et de toute façon les mycologues qui le souhaitent, peuvent toujours faire des séries de 30 (ou plus) mesures. La feuille de calcul devra être modifiée en conséquence.

Pour ce qui est du test entre deux moyennes, le nombre de valeurs ne devrait jamais être inférieur à 30. Même remarques...

Nous pensons aussi que les mycologues ne sont pas forcément tous des mathématiciens de haut vol (?), et donc que la méthode proposée devait être simple, et automatisée pour les parties qui le seraient moins.

Enfin, le tracé de la courbe de fréquence est fait avec seulement 4 classes. Là aussi plus de valeurs serait mieux...

Conclusions:

Il est bien évident que la méthode proposée est contraignante. Mesurer 20 spores, (soit 40 mesures) avec un microscope simplement équipé d'un oculaire de mesure n'est pas une opération simple. Cependant avec un peu de méthode, nous pouvons affirmer qu'un quart d'heure suffit, et les résultats obtenus sont infiniment

plus significatifs qu'une seule mesure traditionnelle. La méthode peut être perfectionnée, et les mycologues ayant à leur disposition une chambre claire à dessiner peuvent encore diminuer les erreurs de mesures. Mais dans ce cas le temps passé aux 40 mesures devient très supérieur aux 15 minutes indiquées plus haut.

D'autres moyens existent, les laboratoires professionnels sont équipés de dispositifs d'acquisition de mesures assistés par ordinateur. Il existe aussi des méthodes de mesure du volume des spores automatisées (Voir bibliographie). Mais nous sortons là du domaine de l'amateur...

Annexe :

La feuille en annexe (voir à la fin de ce texte) prend à titre d'exemple l'étude d'une récolte d'un Cortinarius.

C'est un « *cas d'école* » simplement utilisé ici pour illustrer les résultats obtenus, et la représentation graphique de la distribution.

Les feuilles 2 (deuxième série de mesures), et 3 (comparaison des deux séries) ne sont pas illustrées.

Bibliographie :

Seuls les articles et ouvrages en langue Française sont signalés.

Champignons de Suisse. Tome 3 J. Breitenbach & F. Kränzlin

Explication sommaire des méthodes statistiques appliquées aux mesures des spores.

Ce volume est indiqué pour toutes les espèces représentées.

Document Mycologique 96 :51-72 P. Baumgart ; A. Laurent ; J.P. Maurice

Mesure statistique automatisée du volume des spores.

La méthode déployée nécessite un matériel de laboratoire sophistiqué.

AGARICA Vol. 6 N°12, Pages 366-380. P. Heinemann & J. Rammeloo

De la mesure des spores et de leur expression.

Document Mycologique 81 :1-10 G. Gross

Clé des espèces européennes du genre Tuber.

Bull. Soc. Roy. Bot. Belge. 118 : 93-95 (1985) A. Empain

Mesures semi-automatisées au microscope.

La description des champignons supérieurs, M. Jossierand

Encyclopédie Mycologique XXI (1952) 338 p.

Les Russules d'Europe et d'Afrique du Nord. H. Romagnesi.

Jean Louis JALLA
E_mail : jljalla@aol.com

ANNEXE 1 :

Espèce: Cortinarius sp.

Récolte:

Oculaire de: 10,00

1 div = 1,19 μ

Objectif immersion de: 100

Grossissement = 1000

Série de mesures	I (en divisions)	L(en divisions)	I (en μ m)	L (en μ m)	Vol. sporique
1	9	6	10,71	7,14	429
2	8,5	5,8	10,12	6,90	370
3	8	5,4	9,52	6,43	305
4	8	5,4	9,52	6,43	305
5	8,5	5,6	10,12	6,66	357
6	7,8	5,4	9,28	6,43	290
7	6,8	5,2	8,09	6,19	212
8	9	6,2	10,71	7,38	443
9	9,5	6,4	11,31	7,62	510
10	8,5	5,5	10,12	6,55	351
11	8,5	5,8	10,12	6,90	370
12	8,8	5,9	10,47	7,02	403
13	7,8	5	9,28	5,95	268
14	7,6	5,2	9,04	6,19	265
15	9	6,5	10,71	7,74	465
16	8,5	6,5	10,12	7,74	414
17	8,9	6,6	10,59	7,85	461
18	9	7	10,71	8,33	500
19	9	6,8	10,71	8,09	486
20	8,5	6	10,12	7,14	382
Moyennes			10,07	7,03	379,30
Max			11,31	8,33	509,6
Min			8,09	5,95	212,2
Ecart Type			0,755	0,691	85,587
Limite de population					
Max			11,65	8,48	558,43
Min			8,49	5,59	200,16
Q Moyen (L/I)			0,70		
Q Extrêmes			0,64	0,78	

En cas de spores sphériques, recopier (les valeurs) de I dans L

Le choix de calcul avec une série de 20 mesures est fait pour avoir une parfaite cohérence avec les volumes sporiques indiqués dans le tome 3 des Champignons de Suisse.

Les 20 mesures I (petite largeur) et L (grande largeur) peuvent être exprimées avec 2 décimales.

Les limites de population ont été calculées avec T (pour 20 mesures) = 2.093

La courbe de distribution est calculée avec 4 classes.

Observations: Feuille d'essai, Mesures non significatives, Fichier associé à SPORES1.DOC

DISTRIBUTION

