

Apport de la microscopie électronique à balayage environnemental à la caractérisation de l'espèce *Urginea pancration* (steinh.) Phil. des monts du Tessala (Algérie)

Zoulikha BENCHIHA^{1*}, Ali LATRECHE¹ et Khéloufi BENABDELI²

¹Laboratoire de Biodiversité Végétale : Conservation et Valorisation, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Djilali Labès de Sidi Bel-Abbès, Algérie

²Laboratoire de géo-Environnement, université de Mascara, Algérie

*Correspondance, courriel : zbenchiha@yahoo.fr

Résumé

Les cristaux d'oxalate de calcium (CaC_2O_4) figurent dans une grande partie d'organes et tissus de végétaux. Dans ce travail, le microscope électronique à balayage environnemental (MEBE) a permis de mettre en évidence une importante présence de raphides dans le bulbe ainsi que dans la racine d'*Urginea pancration* (steinh.) Phil. La nature de ces cristaux a pu être déterminée grâce à la microanalyse X qualitative et quantitative, par sonde électronique des parties cristallisées. Les résultats obtenus apportent des informations supplémentaires sur la présence des raphides d'oxalate de calcium chez *Urginea pancration* (steinh.) Phil.

Mots-clés : *urginea pancration (steinh.) phil., Oxalate de calcium, microscopie électronique à balayage environnemental (MEBE), microanalyse X.*

Abstract

Contribution of the environmental scanning electron microscopy to the characterization of *Urginea pancration* (steinh.) Phil. from Tessala mounts (Algeria)

Calcium oxalate crystals (CaC_2O_4) are present in organs and tissues of a huge number of plant species. In this work, the use of environmental scanning electron microscopy made it possible to put in evidence the presence of a large number of raphides in the bulb and the root of *Urginea pancration* (steinh.) Phil. The nature of these crystals has been accurately identified as calcium oxalate by both qualitative and quantitative X ray microanalysis performed on the crystallized zones. This work provides additional information on the calcium oxalate raphides that are located in *Urginea pancration* (steinh.) Phil.

Keywords : *urginea pancration (steinh.) phil., calcium oxalate, environmental scanning electron microscopy (ESEM), X-ray microanalysis.*

1. Introduction

Urginea pancratium (steinh.) Phil. est une géophyte herbacée de la famille des Hyacinthaceae présente dans le bassin méditerranéen, on la rencontre surtout dans les pâturages et les formations forestières à des altitudes variant de 0 à 1200 m [1]. Chez les hyacinthaceae, la présence de cristaux d'oxalate de calcium (CaC_2O_4) est souvent notée. Dans le règne végétal, plus de 215 familles [2, 3] présentent ces structures cristallines retrouvées dans différentes parties de la plante. Leur présence a été remarquée dans les feuilles [4], dans les tiges [2], dans les racines [5] ainsi que dans les graines [6-8]. Trois principaux types morphologiques d'oxalate de calcium ont été observés chez les monocotylédones: les raphides, les styloïdes ou pseudoraphides et les druzes qui sont des conglomerats de cristaux se formant autour d'un site de nucléation, et qui sont plus fréquents chez les dicotylédones [9, 10]. Plusieurs rôles ont été attribués à ces cristaux puisqu'ils sont d'abord considérés comme des substances toxiques jouant un rôle dans le mécanisme de défense des végétaux contre les herbivores [3]. Ils permettent également une régulation du taux de calcium dans la plante [11] et ont un rôle dans les processus de désintoxication des plantes des métaux lourds [12]. En outre, la distribution et les types de cristaux d'oxalate de calcium sont utilisés comme caractères taxonomiques dans la classification de nombreuses familles de plantes [13].

Le présent travail se veut une contribution à la connaissance de l'espèce par un moyen récent d'investigation qu'est le microscope électronique à balayage environnemental (MEBE) doté d'un détecteur EDS pour l'analyse dispersive en énergie des rayons X, permettant la caractérisation élémentaire chimique locale. Contrairement au MEB classique, le MEBE permet l'observation d'échantillons biologiques dans leur état naturel, sans aucune préparation préalable susceptible de les dégrader. Le MEBE équipé du détecteur EDS permet d'effectuer des analyses chimiques locales qualitatives et quantitatives.

2. Matériel et méthodes

Urginea pancratium (steinh.) Phil. utilisée provient des monts Tessala, chaîne de montagnes de l'Atlas tellien occidental caractérisé par un étage bioclimatique semi-aride frais avec des précipitations moyennes annuelles de l'ordre de 335 mm. Les températures moyennes maximales sont de l'ordre 43,4°C et minimales de 2,3°C. Les sols dominants ont une profondeur de l'horizon superficiel variant entre 0,25 m à 0,30 mètre. C'est généralement des terra rossa sur substratum calcaire caractérisés par une texture sablo-limoneuse et un faible taux de matière organique [14, 15]. Cette espèce est connue sous le nom commun de Scille et El Boussaila en arabe, elle appartient à la famille des Hyacinthaceae et à la sous-famille des Urgineoideae. C'est une espèce à assez large répartition puisqu'elle est présente en plus des clairières et des terrains de parcours, dans les matorrals à *Quercus rotundifolia* Lamk., *Pistacia lentiscus* L. dans les monts de Tessala.

2-1. Description du Microscope Electronique à Balayage Environnemental

L'appareil utilisé est un Microscope électronique environnemental (MEBE) de marque Electroscan 2020 équipé d'un détecteur EDS « Oxford Linkis » pour la microanalyse, avec comme source d'électrons un filament de tungstène. La tension d'accélération a été fixée à 15 kV et la distance de travail, à une valeur de 18,3 mm. On fait varier la pression dans la chambre d'analyse en introduisant de la vapeur d'eau. Les rayons X sont collectés grâce à un détecteur Si(Li) de surface 10 mm². Le temps d'acquisition est de 180 s. La résolution du système est de 68 eV. L'analyse quantitative est effectuée par la méthode de correction ZAF. Une cartographie permet, au besoin, de montrer la répartition spatiale de chaque élément chimique détecté.

2-2. Préparation des échantillons

Des coupes ont été pratiquées au niveau du bulbe, de la racine et de la tige pour prélever des échantillons de 7 cm² de surface avec une épaisseur de 1 à 2 mm. Le nettoyage des échantillons se fait aux ultra-sons, complété par une soufflette (gaz neutre) après séchage de quelques minutes.

2-3. Observations préliminaires

Lors des observations, une dérive de l'image a été notée et elle est due à une charge électrique excessive de la surface. Cette contrainte a été réglée en menant deux opérations simultanées, à savoir : une réduction de la surface des échantillons (en les coupant en deux) et une amélioration du contact arrière par de laque au carbone et fil électrique. La focalisation prolongée du faisceau d'électrons sur une même zone d'échantillon a conduit au dessèchement de ce dernier par échauffement local; ce qui a produit la déformation des cellules. Un déchirement avec écrasement des tissus lors de la coupe à l'état brut a été observé également et il a fallu employer de nouveaux échantillons congelés à l'azote liquide juste avant leur introduction dans la chambre d'analyse.

3. Observation des coupes

Les conditions d'observation optimales étant obtenues, des observations ont été faites sur la racine, le bulbe et la tige. Ces observations ont été effectuées sous atmosphère de vapeur d'eau (pression de 5,9 Torr) et à une tension de 15 kV. Des zones cristallisées dans les trois parties de la plante (racine, bulbe et tige) ont pu être observées, comme le montrent respectivement les *Figures 1, 2 et 3*. Dans les 3 cas, des agrégats de cristaux allongés en forme d'aiguilles et regroupées en des ensembles d'orientations différentes ont été identifiées avec une densité moindre au niveau de la tige. Ces cristaux allongés sont des raphides observés chez d'autres plantes [2].

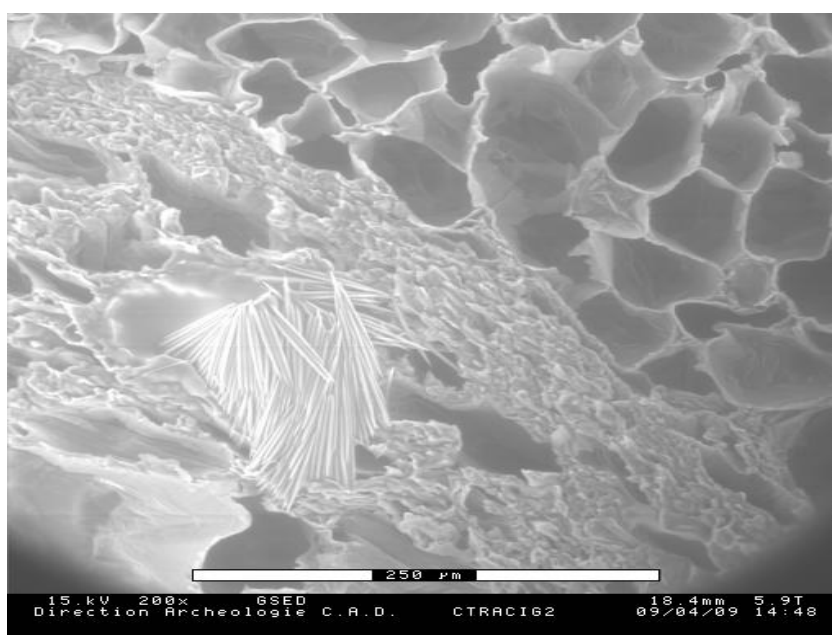


Figure 1 : Observation au MEB Environnemental d'une coupe de la racine d'*Urginea pancrati*(steinh.)
 Phil. Gr : 200 x

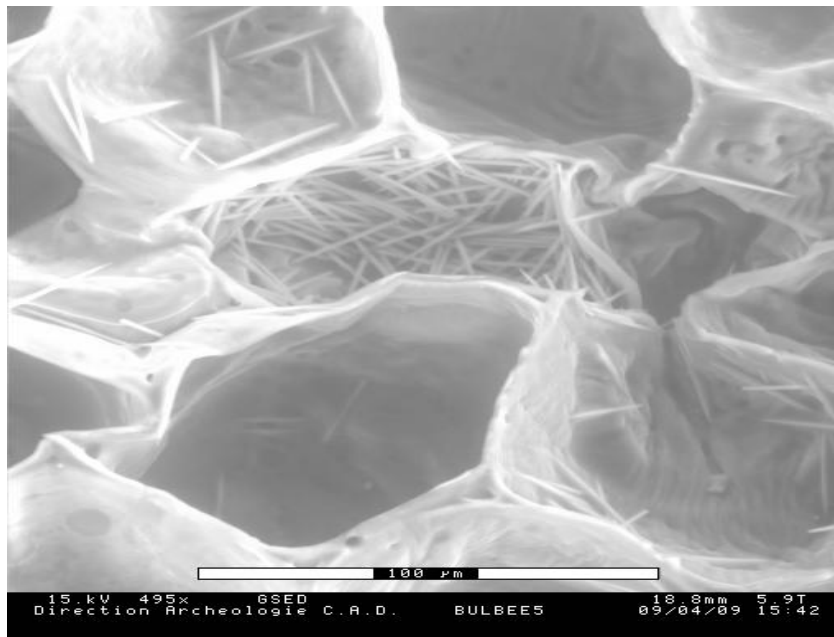


Figure 2 : Observation au MEB Environnemental d'une coupe du bulbe d'*Urginea pancrations*(steinh.)
Phil. Gr : 495 x

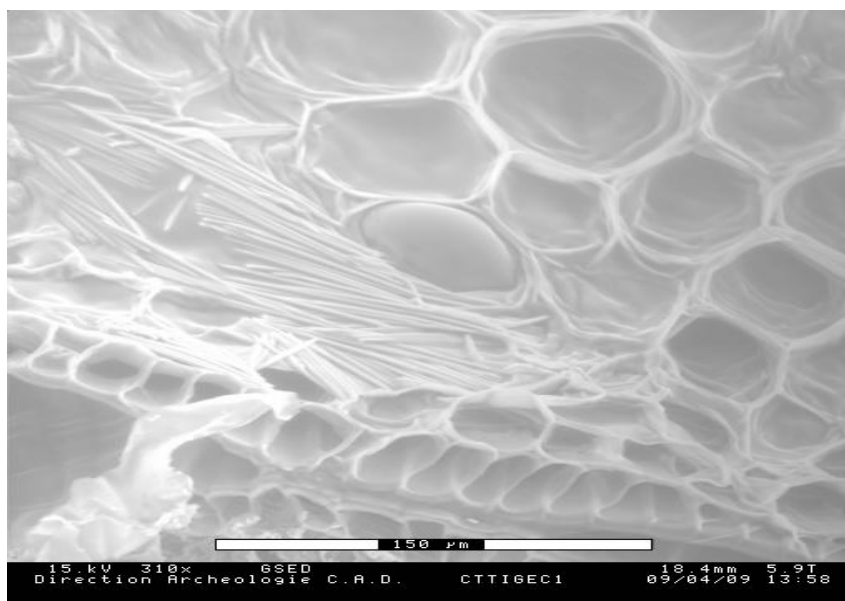


Figure 3 : Observation au MEB Environnemental d'une coupe de la tige d'*Urginea pancrations*(steinh.) Phil.
Gr : 310 x

La **Figure 4** montre un ensemble de raphides de même orientation. Ces raphides peuvent être constitués d'oxalate de calcium ou de carbonate de calcium. Cependant, selon certains travaux sur cette même espèce, ces raphides sont le résultat d'une sécrétion et d'une cristallisation de l'oxalate de calcium [9, 10].

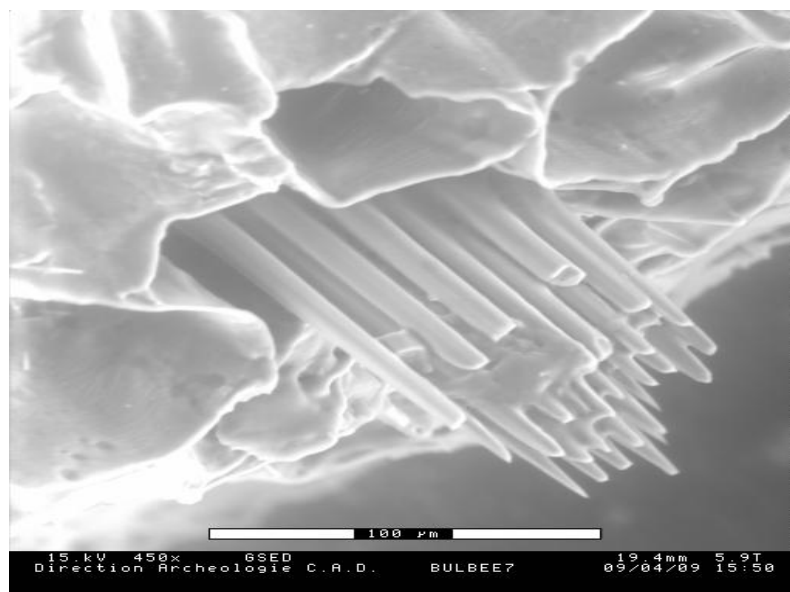


Figure 4 : *Ensemble de raphides : 450 x*

Pour confirmer cette observation, le recours à l'utilisation de la microanalyse X s'est avéré nécessaire pour l'identification des éléments chimiques présents localement dans le volume sondé de l'échantillon.

4. Résultats et discussion

L'imagerie MEBE a montré des zones cristallisées en plus grand nombre dans le bulbe et la racine que dans la tige, d'où le choix de procéder à la microanalyse X seulement sur les coupes provenant des organes souterrains de la plante (bulbe et racine). L'analyse qualitative a mis en évidence l'émission des raies caractéristiques du calcium, du carbone et de l'oxygène, constituants de l'oxalate de calcium. Ceci confirme les hypothèses émises. Les spectres en énergie pour le bulbe et la racine, sont représentés respectivement par les **Figures 5 et 6**. La **Figure 6** montre en outre, des pics correspondant au sodium, au magnésium, au chlore et au cuivre, émergeant du bruit.

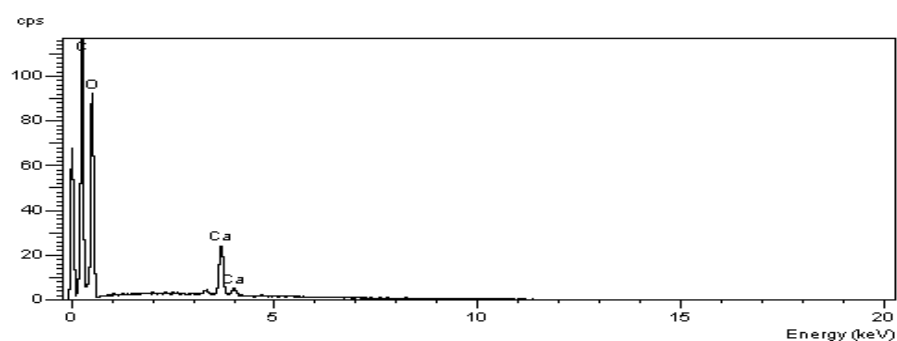


Figure 5 : *Spectre en énergie provenant du bulbe*

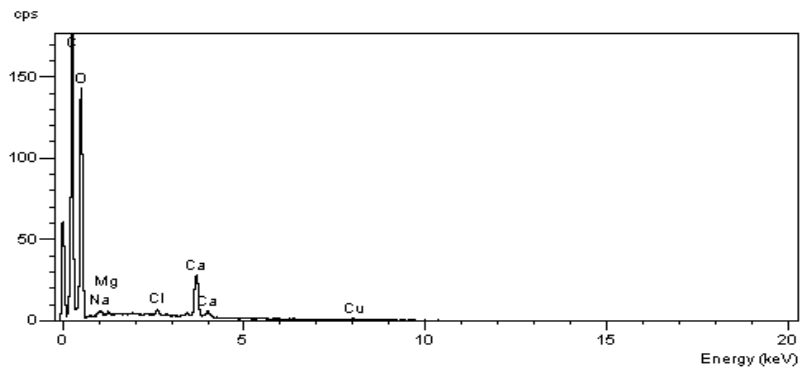


Figure 6 : *Spectre en énergie provenant de la racine*

Dans le but de confirmer la présence l'oxalate de calcium, une deuxième phase d'observations a été menée, axée sur l'orientation du faisceau d'électrons exclusivement sur les zones cristallisées (raphides). Les **figures 7 et 8** correspondants respectivement à ces zones cristallisées du bulbe et de la racine montrent clairement une augmentation de l'intensité du calcium dans les deux cas. Les cristaux sont donc bien constitués d'oxalate de calcium.

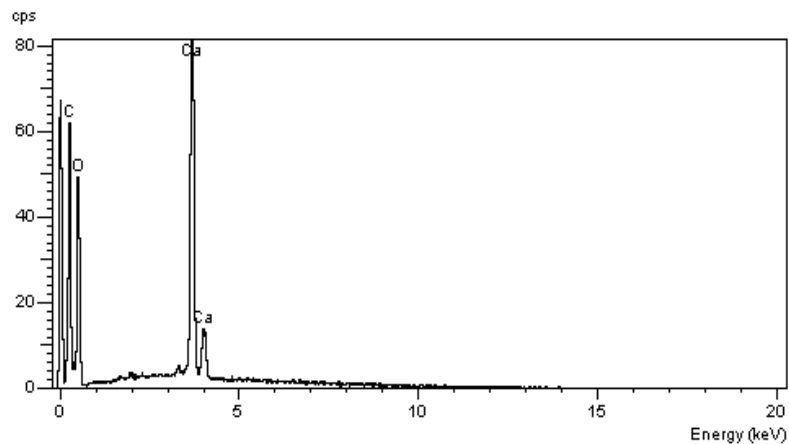


Figure 7 : *Spectre en énergie provenant de la zone cristallisée du bulbe*

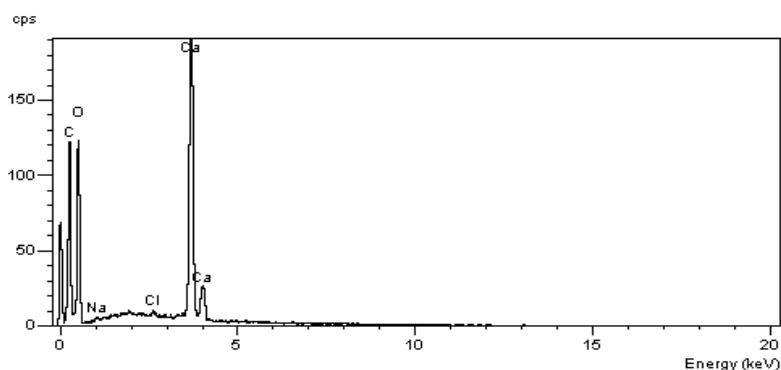


Figure 8 : *Spectre en énergie provenant de la zone cristallisée de la racine*

Le **Tableau** qui suit récapitule l'ensemble des résultats de l'analyse quantitative où les concentrations (titres massiques) des divers éléments chimiques détectés dans le bulbe et la racine ainsi que dans les zones cristallisées de ces deux organes de la plante y sont évalués.

Tableau 1 : *Concentration des divers éléments observés sur le bulbe et la racine et dans leurs zones cristallisées respectives*

Élément	Titre massique (%)			
	<i>Bulbe</i>	<i>Bulbe/cristaux</i>	<i>Racine</i>	<i>Racine/cristaux</i>
C	38,26	29,02	38,38	26,19
O	58,66	55,42	58,38	57,71
Ca	3,09	15,55	2,38	15,67
Na	-	-	0,47	0,23
Mg	-	-	0,15	-
Cl	-	-	0,24	0,20

La **Figure 9** donne un aperçu sur la variation des concentrations en carbone, oxygène, calcium, sodium, magnésium et chlore dans le bulbe et la racine et dans leurs zones cristallisées respectives.

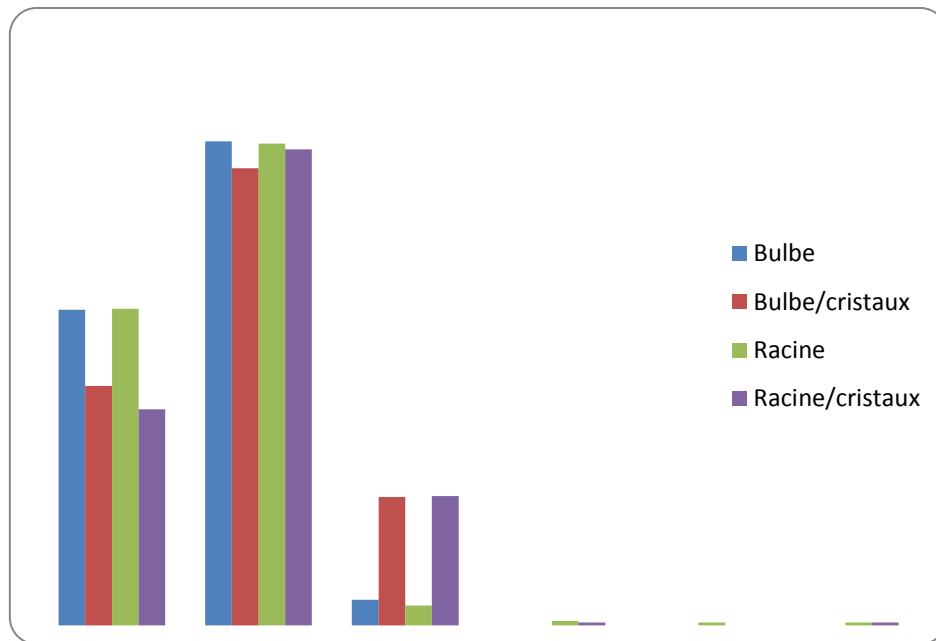


Figure 9 : Variation des concentrations en carbone, oxygène, calcium, sodium, magnésium et chlore dans le bulbe et la racine et dans leurs zones cristallisées respectives

L'analyse des données du **Tableau 1** et des histogrammes de la **Figure 9** permet de tirer les enseignements suivants :

- Les concentrations en carbone, oxygène et calcium sont assez proches et comparables dans le bulbe et la racine.
- Les éléments sodium, magnésium et chlore n'apparaissent que dans la racine. Si ces éléments existent dans le bulbe, ils seraient à des concentrations inférieures à la limite de détection en microanalyse X. La présence de ces éléments et leurs concentrations dans la racine sont certainement liés à la nature du sol, la racine étant l'organe d'absorption par lequel transitent tous les éléments minéraux.
- Les concentrations en calcium sont similaires dans le bulbe et la racine. Cependant le calcium apparaît en plus forte concentration dans les zones cristallisées de ces organes comme l'a mis en relief l'analyse qualitative. Une cartographie X de la surface de tous les échantillons précédemment analysés a, en effet, montré que le calcium est localisé préférentiellement dans les amas de raphides cristallisés.

5. Conclusion

Les résultats obtenus dans la caractérisation d'*Urginea pancracion* ont permis de mettre en évidence des zones cristallisées dans la racine et le bulbe. Ces deux parties de la plante sont constituées d'amas de raphides observées en imagerie MEBE. La nature de ces raphides a ensuite été confirmée par microanalyse X comme étant de l'oxalate de calcium. La présence en forte concentration de ces raphides est à mettre en étroite relation avec le sol à caractère calcique des bas versants du mont Tessala, région d'où a été prélevée la plante-échantillon, objet de cette étude. Des travaux sont en cours afin de déterminer les effets de l'environnement sur cette espèce, en suivant la variation de la concentration des éléments détectés par microanalyse X dans les différents organes d'*Urginea pancracion*.

Références

- [1] - P. QUEZEL et S. SANTA, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I. Ed. CNRS. Paris. 565p. (1962).
- [2] - V.R. FRANCESHI and H.T. HORNER, Calcium oxalate crystals in plants. *Bot Rev* 46 (1980) 361-427.
- [3] - B. MOLANO-FLORES, Herbivory and calcium concentrations affects calcium oxalates. Crystals formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Annales of Botany* 88 (2001) 387-391.
- [4] - H.T. HORNER and E. ZINDLER-FRANCK, Histochemical, spectroscopic, and x-ray diffraction identifications of the two hydration form of calcium oxalate crystals in three legumes and *Begonia*. *Can. Journal of botany* 60 (1982) 1021-1027.
- [5] - H.T. HORNER, A.P. KAUSCH and B.L. WAGNER, Ascorbic acid: a precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca torreyi* in liquid root culture. *International J Plant Sciences* 161 (2000) 861-868.
- [6] - M.A. WEBB and H.J. ARNOTT, A survey of calcium oxalate crystals and other mineral inclusions in seeds. *Scan Electron Micros* 3 (1982) 1109-1131.
- [7] - H. ILARSLAN, R.G. PALMER, J. IMSANDE and H.T. HORNER, Calcium oxalate crystals in developing seeds of soybean. *Annales of Botany*. 88 (2001) 243-257.
- [8] - H. ILARSLAN, R.G. PALMER, J. IMSANDE and H.T. HORNER, Quantitative determination of calcium oxalate and oxalate in developing seeds of soybean (leguminosae). *American Journal of Botany*. 84 (1997) 1042-1046.
- [9] - H.T. HORNER and B.L. WAGNER, Calcium oxalate formation in higher plants. In S.R Khan (ed.), *Calcium oxalate in biological systems: 53-72*. Boca Raton: CRC Press (1995).
- [10] - C.J. PRYCHID and P.J. RUDALL, Calcium oxalate crystals in monocotyledons: A review of their structure and systematic. *Ann. Bot.* 84 (1999) 725-739.
- [11] - V.R. FRANCESHI, Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna Minor*. *Protoplasma* 148 (1989) 130-137.
- [12] - P.A. NAKATA, Advances in our understanding of calcium oxalate crystals formation and function in plants. *Plant Sci* 164 (2003) 901-909.
- [13] - N.R. LERSTEN and H.T. HORNER, Calcium oxalate crystals types and trends in their distribution. Patterns in leaves of *Prunus* (Rosaceae: Prunoideae). *Plant Syst Evol* 224 (2000). 83-96
- [14] - N. FERKA-ZAZOU, Impact de l'occupation spatio-temporelle des espaces sur la conservation de l'écosystème forestier: cas de la commune de Tessala (Sidi Bel Abbes-Algérie). Mémoire de magister en Faculté des sciences, département de foresterie, université de Tlemcen, Algérie (2006).
- [15] - C. ALCARAZ, Contribution à l'étude des groupements à *Quercus ilex* sur terra rossa des Monts du Tessala (Ouest algérien). *Revue Ecologia mediterranea*, tome XVII 1991 : 1-10 (1991).