

Biologie et pathologie végétales / Plant biology and pathology

Contribution de la microscopie électronique à balayage et photonique à la connaissance de l'anatomie et de la morphologie de *Styrax officinalis* L.

Ghaleb Tayoub, Isabelle Schwob*, Véronique Masotti, Jacques Rabier, Martine Ruzzier, Josy Viano

ER « Biodiversité et Environnement », laboratoire « Dynamique et ressources du végétal », université de Provence, case 17, 3, place Victor-Hugo, 13331 Marseille cedex 3, France

Reçu le 30 août 2005 ; accepté après révision le 23 mai 2006

Disponible sur Internet le 14 juillet 2006

Présenté par Pierre Buser

Résumé

Notre objectif était de préciser des caractères anatomiques et morphologiques chez *Styrax officinalis* à l'aide de techniques récentes de microscopie, ces caractères pouvant être des marqueurs taxonomiques importants. Nous avons mis en évidence un appareil pilifère très développé sur tous les organes aériens et établi précisément la répartition, la densité et les dimensions des poils étoilés sur ces organes. Par ailleurs, nous avons observé la présence de poches sécrétrices dans le limbe des feuilles. Ce dernier caractère a été décrit pour la première fois chez l'espèce *S. officinalis*. **Pour citer cet article : G. Tayoub et al., C. R. Biologies 329 (2006).**

© 2006 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Contribution of microscopic techniques to anatomical and morphological knowledge on *Styrax officinalis* L. The aim of this study was to precise anatomical and morphological features of the species *Styrax officinalis* with the help of current microscopic techniques, those features being of interest as valuable taxonomic characters. Typical hairy structures were observed on all surfaces of the aerial organs and their location, density and size were specified. Moreover, we demonstrated the occurrence of secretory glands in the leaf blades. These structures were revealed for the first time for this species. **To cite this article: G. Tayoub et al., C. R. Biologies 329 (2006).**

© 2006 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : Anatomie ; Microscopies électronique à balayage et photonique ; Morphologie ; Poches sécrétrices ; Poils étoilés ; *Styrax officinalis*

Keywords: Anatomy; Morphology; Scanning and optic microscopies; Secretory glands; Stellate hair; *Styrax officinalis*

Abridged English version

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : schwob@up.univ-mrs.fr (I. Schwob).

Styrax officinalis L. is a deciduous shrub encountered from East to Southeastern Asia and in Rhodes Island: in

Europe, this species is restricted to the Mediterranean region. In France, few stations are only encountered in Provence, in the South of the Var department. The native occurrence of this species in southeastern France is still under discussion. In spite of its large geographical distribution and of the presence of several chemical compounds with biological activities in it, few studies dealt with the anatomy and the morphology of this species. Moreover the concerned studies are old and out-of-date.

The aim of this study was to precise anatomical and morphological features of the species *Styrax officinalis* with the help of current techniques such as electronic microscopy, those features being of interest as valuable taxonomic characters. Scanning microscopy lead to microphotographs showing typical hairy structures, star-shaped, on all surfaces of the aerial organs. Although trichomes are known to frequently occur on Mediterranean plant species, this kind of protection from the drying effects of wind and sun is largely developed on *S. officinalis*' aerial parts. Moreover, we demonstrated the occurrence of large structures that are secretory glands in the leaf blades. These secretory structures were not encountered in the other aerial parts of the plant. These structures were revealed for the first time in this species.

To the best of our knowledge, no other paper presenting microphotographs of the anatomy of *S. officinalis* has been published. Therefore, our study on the *S. officinalis* species completes the knowledge on other species, more studied, of the genus *Styrax* such as *S. camporum*.

1. Introduction

L'aliboufier, *Styrax officinalis*, se rencontre de l'Orient au Sud-Ouest de l'Asie et à Rhodes ; en Europe, sa répartition est restreinte au pourtour méditerranéen [1,2]. En France, il est limité à la Provence, au Sud du département du Var. La question de son indigénat en France reste cependant discutée [2].

Malgré une large répartition mondiale et la présence de nombreux composés chimiques à activités biologiques [3–10] chez cette espèce, peu de travaux ont porté sur l'anatomie et la morphologie de l'aliboufier. Les rares ouvrages relatant des travaux sur l'anatomie sont d'anciennes thèses de pharmacie [11,12]. De plus, les travaux de Poirier ont porté uniquement sur l'anatomie de la tige et, dans la thèse soutenue par Barthélémy, seuls quelques dessins illustrent cette étude. Ces travaux anciens sont insuffisants pour bien décrire cette plante. Les travaux de Copeland [13], datant de 1938, détaillent les tissus conducteurs d'une espèce voisine, *Styrax redivivus* (Torr.) L.C. Wheeler, anciennement dé-

nommée *S. officinalis* var *californica* Rehder, qui n'est plus considérée comme une variété disjointe de l'espèce *S. officinalis* depuis les travaux de Fritsch [14,15]. De récents travaux [16,17] ont apporté des informations détaillées sur l'anatomie des tiges et des racines de l'espèce *S. camporum* en insistant sur la structure du xylème et de l'écorce. L'ensemble de ces résultats vient enrichir la description de l'anatomie de la famille des Styracaceae fournie par Metcalfe et Chalk [18].

Ainsi, à l'aide de techniques plus récentes, telle la microscopie électronique à balayage, notre objectif a été de mettre précisément en évidence des caractères anatomiques et morphologiques chez l'espèce *S. officinalis* afin de compléter les précédentes études. Ces caractères sont des marqueurs importants dans la distinction de l'espèce au sein du genre *Styrax* et permettront de compléter les critères de détermination utilisés par Fritsch [14] dans sa révision du genre *Styrax*.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Tous les échantillons étudiés (tige, feuille, fleur, fruit) ont été récoltés par nos soins dans la région provençale à Solliès-Ville, en France, durant l'année 2004. Afin de réaliser une étude au microscope électronique à balayage (MEB), les divers échantillons ont été nettoyés à l'alcool, séchés, conservés à l'abri de la pollution atmosphérique jusqu'à leur observation. Pour l'étude au microscope photonique, les échantillons frais ont directement été utilisés.

2.2. Observations en microscopie électronique

Les échantillons ont été préalablement collés sur une bande de ruban adhésif double face, puis métallisés avec une couche de carbone. En ce qui concerne les feuilles et les fruits, des coupes transversales ont été également préparées à l'aide d'un cryostat (Cryocut). L'épaisseur des coupes était de 30 µm.

Des microphotographies de tous ces échantillons ont alors été réalisées au MEB (SEM PHILIPS XL 30), au service commun de microscopie de l'université de Provence, centre scientifique de Saint-Charles (Marseille).

2.3. Observations en microscopie photonique

Des coupes transversales et longitudinales ont été réalisées au microtome à main après enrobage dans la moelle de sureau. Les cellules ont été vidées de leur

contenu dans de l'hypochlorite de sodium selon la technique préconisée par Langeron [19]. La durée du bain était d'une dizaine de minutes ; celui-ci était suivi d'un rinçage dans de l'acide acétique à 10%.

Ensuite, nous avons procédé à la coloration des coupes, en appliquant la méthode de doubles colorations de Mirande par le carmin aluné et le vert d'iode. Les éléments lignifiés sont colorés en bleu vert et les autres tissus cellulosiques en rouge carmin. Les coupes ont ainsi un bon contraste de couleur facilitant l'observation [19].

Les lames sont conservées au laboratoire «Dynamique et ressources du végétal, ER «Biodiversité et Environnement», université de Provence, centre scientifique de Saint-Charles (Marseille).

3. Résultats et discussion

L'examen des microphotographies réalisées au MEB a permis de mettre en évidence un appareil pilifère très développé dans tous les organes aériens. Ces observations (Fig. 1.1 et 1.2) montrent une ornementation sous forme de poils pluricellulaires étoilés à nombreuses branches sur la tige. Ces poils sont répartis sur l'intégralité des tiges. L'observation de poils étoilés sur les tiges n'avait pas été précédemment décrite chez cette espèce [18].

On retrouve ce type de poils sur les feuilles. La densité est cependant plus forte sur la face abaxiale (Fig. 1.3), où ces poils forment un revêtement uniforme. Les poils sont de forme étoilée, le plus souvent à 8 branches, avec une longueur moyenne de chaque branche comprise entre 130 et 140 μm et avec une épaisseur moyenne de 7 μm . La présence de poils étoilés sur les feuilles avait été précédemment signalée comme un critère commun aux trois genres *Halesia*, *Pamphilia* et *Styrax* [18]. Des différences dans la taille de ces poils chez les espèces *Styrax heterotricha* et *S. foveolaria* ont également été mentionnées, sans toutefois que les dimensions aient été précisées.

L'appareil reproducteur est composé d'un calice entièrement recouvert de poils (Fig. 1.4), mais où la forme de ces derniers (Fig. 1.5) diffère de celle des tiges et des feuilles. La corolle est recouverte de poils identiques à ceux de la feuille, avec une densité également plus importante sur la face abaxiale. Les poils des sépales sont

plus grands que ceux des feuilles, avec une longueur moyenne des branches comprise entre 350 et 400 μm et une épaisseur de 16 μm . À notre connaissance, cette description fine du trichome n'a pas été précédemment signalée dans la littérature pour le genre *Styrax*.

La paroi du fruit est, de même, intégralement tapissée de poils étoilés (Fig. 1.6), qui forment un enchevêtrement identique à celui observé sur les sépales (Fig. 1.7).

La présence d'un appareil tecteur bien développé chez les ligneux méditerranéens est fréquemment observée. La forte pilosité de *S. officinalis* traduit probablement une adaptation à la sécheresse [20], puisqu'il s'agit d'une espèce méditerranéenne sclérophylle. Cette pilosité tend à disparaître sur les tiges âgées. Toutefois, chez l'aliboufier, ce type de protection est très développé et concerne l'intégralité des organes aériens. Il est également à noter que la morphologie particulière des poils étoilés est un critère végétatif caractéristique de la famille des Styracaceae et de celle des Malvaceae [21], qui ne peut à lui seul suffire à une éventuelle distinction de l'espèce. La présence de poils étoilés dans le genre *Styrax* a surtout été signalée sur les feuilles à partir d'observations en microscopie photonique. L'originalité de notre étude repose sur un examen approfondi en microscopie électronique à balayage de plusieurs organes : tiges, feuilles, fleurs et fruits. En particulier, nous avons mis en évidence la répartition, la densité et les dimensions des poils sur l'ensemble de ces organes.

Subséquent à ces observations sur la morphologie externe de l'aliboufier, un examen de la structure interne de cette plante, plus particulièrement axé sur la recherche de structures sécrétrices, a été réalisé. Les coupes transversales pratiquées dans la tige présentent un parenchyme médullaire important, sans lacune centrale, et un xylème hétéroxylé (Fig. 2.1). Dans ces jeunes tiges, les phloèmes primaire et secondaire sont bien visibles ; un anneau de sclérenchyme, quelquefois interrompu, entoure le cylindre central. Ce dernier élément est en cohérence avec les précédentes descriptions anatomiques des genres *Halesia*, *Pamphilia* et *Styrax* [18]. L'épiderme apparaît subérisé et nous observons la présence de poils étoilés (Fig. 2.2). Sous l'anneau de sclérenchyme, nous remarquons l'écorce secondaire. Des informations sur les plans ligneux secondaires dans le genre *Styrax* permettant de distinguer les Styracaceae

Fig. 1. Microphotographies de sections de tiges, de sépales et de fruits de *Styrax officinalis* au microscope électronique à balayage (MEB). (1) Vue d'ensemble de la tige recouverte de poils ($\times 65$) et (2) détail des poils ($\times 420$). (3) Vue de la face inférieure des feuilles avec les poils étoilés et les stomates ($\times 590$). (4) Vue d'un sépale (face abaxiale) entièrement recouvert de poils ($\times 78$) et (5) détail des poils de la face abaxiale du sépale ($\times 313$). (6) Vue d'ensemble d'une coupe transversale du fruit contenant une graine ($\times 33$) et (7) détail de la paroi du fruit, recouverte de nombreux poils ($\times 280$). (8) Détail des cellules du tégument de la graine avec les parois ponctuées ($\times 5693$).

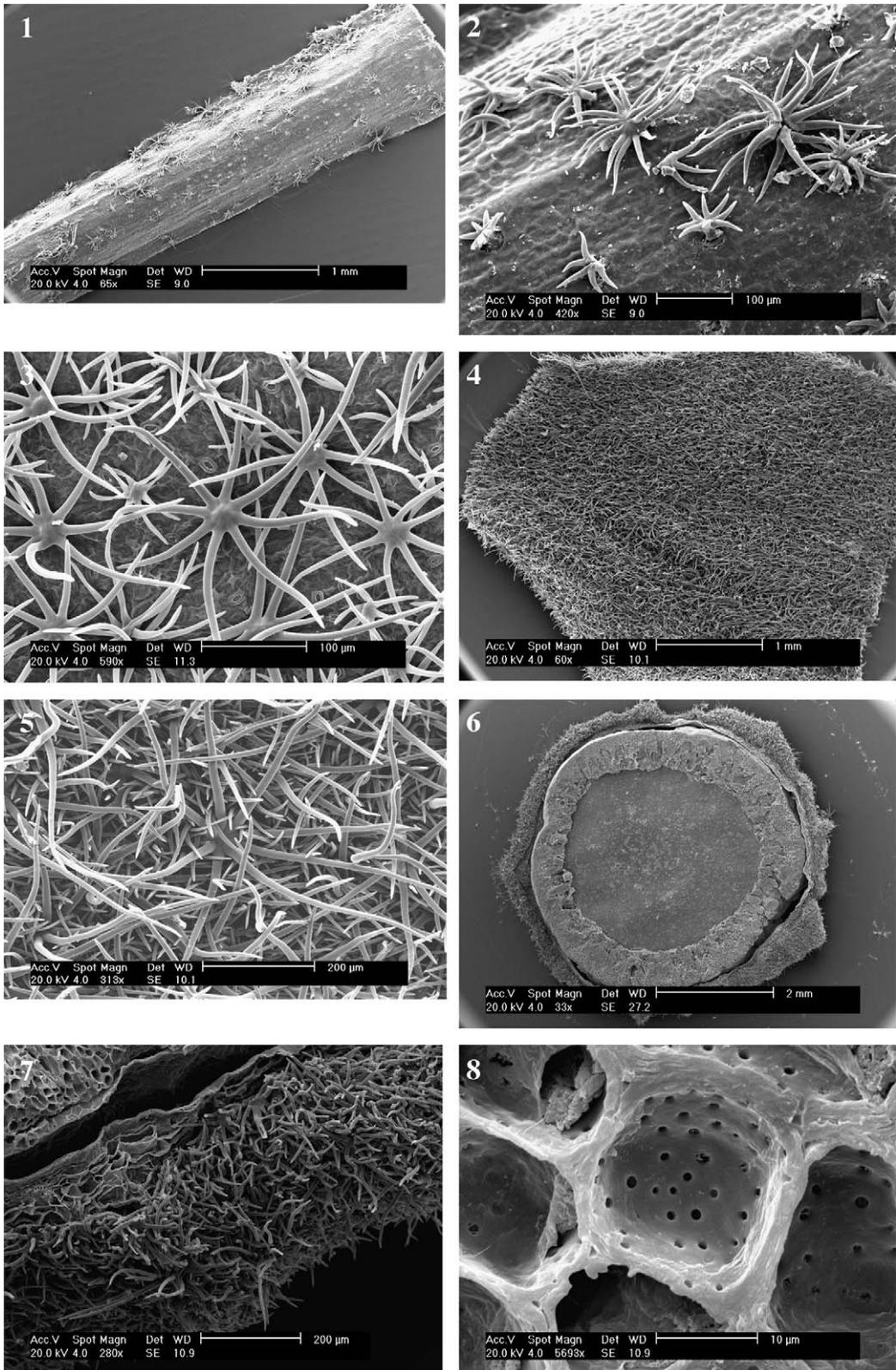


Fig. 1.

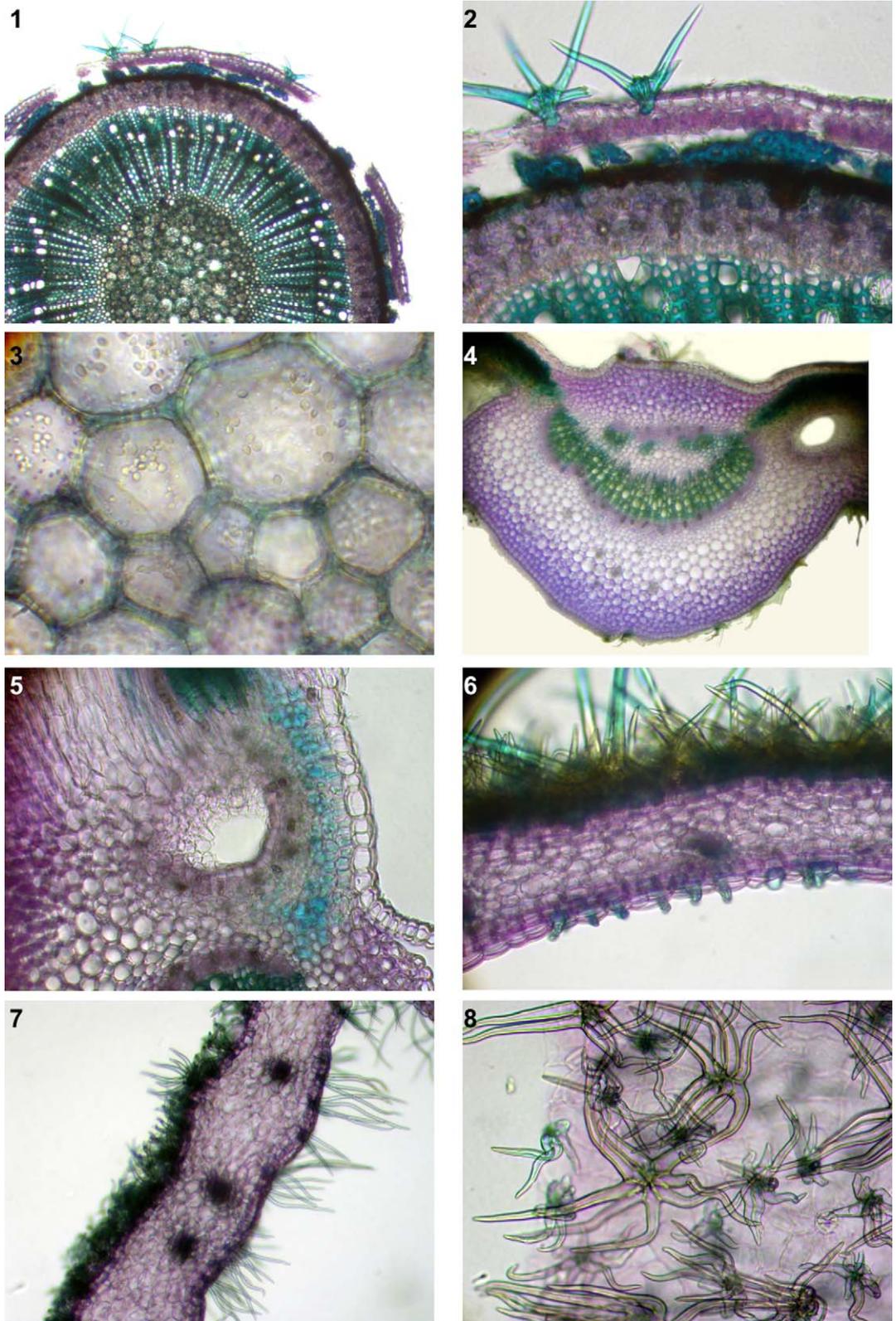


Fig. 2.

Fig. 2. Microphotographies de sections de tiges, de feuilles, de sépales et de pétales de *Styrax officinalis* au microscope photonique. (1) Coupe transversale dans une tige mettant en évidence deux cernes de xylème et un parenchyme médullaire bien développé ($\times 50$). (2) Détail d'une coupe transversale dans une tige mettant en évidence une couche de sclérenchyme en anneau à la périphérie de la coupe ainsi qu'un épiderme subérisé sur lequel des poils étoilés sont présents ($\times 100$). (3) Détail du parenchyme médullaire composé de cellules ponctuées présentant des inclusions réfringentes ($\times 100$). (4) Coupe transversale dans une feuille présentant une poche sécrétrice. Il est à noter la présence de nombreux poils sur la face abaxiale et la répartition restreinte des poils étoilés sur la face adaxiale ($\times 50$). (5) Détail d'une poche sécrétrice tapissée de deux assises cellulaires ($\times 75$). (6) Coupe transversale dans un sépale montrant la présence de longs poils denses sur la face abaxiale et de quelques poils courts sur la face adaxiale ($\times 50$). (7) Coupe transversale dans un pétale montrant une disparité au niveau de l'épiderme entre la face abaxiale recouverte de nombreux poils courts et la face adaxiale avec quelques poils longs ($\times 50$). (8) Morphologie des poils de pétale, face abaxiale ($\times 50$).

des familles botaniquement voisines ont été précisées par Boureau [22]. Pour l'espèce *S. redivivus* Torr., des perforations scalariformes sur les vaisseaux ont été décrites par Copeland [13] ainsi que d'autres particularités du xylème. Ayant focalisé nos recherches sur des jeunes organes, ces précisions n'ont pas pu être apportées pour l'espèce *S. officinalis* lors de notre étude.

Par ailleurs, la présence de cellules ponctuées à paroi très épaissie a été observée dans le parenchyme médullaire des tiges (Fig. 2.3), au microscope photonique, et dans le tégument (testa) des graines (Fig. 1.6 et 1.8), au microscope électronique. Les cellules du parenchyme médullaire présentaient également des inclusions réfringentes, dont la nature n'est pas lipidique, selon la coloration au rouge soudan III (résultat non présenté) ni amylicée (après observation sous lumière polarisée). Il est à noter que, dans les graines, les cellules ponctuées sont réparties sur plusieurs couches (15 à 20 assises de cellules), formant ainsi un tissu très dense à cellules sans méat. Ces ponctuations signalent la sclérification de ces tissus.

Lors de l'examen des coupes transversales pratiquées dans les limbes de feuilles matures, nous avons observé dans le mésophylle des structures de dimension importante, vraisemblablement, des poches sécrétrices (Fig. 2.4). La paroi de ces structures est composée de deux couches de cellules à paroi fine, uniquement cellulosique (Fig. 2.5). Dans l'ensemble des coupes pratiquées, ces poches ont systématiquement été observées dans le mésophylle à proximité de la nervure principale et directement sous une nervure secondaire coiffée de sclérenchyme. Les nervures secondaires étant dans un plan oblique dans les coupes transversales de feuilles, la réalisation de coupes aisément interprétables a été rendue difficile. Cependant, il apparaît que les poches seraient orientées obliquement suivant l'axe des nervures secondaires. Les travaux antérieurs ne faisaient pas état de la présence d'un appareil sécréteur dans les feuilles chez cette espèce [11,12,18]. Néanmoins, des canaux sécréteurs intercellulaires dans les tissus caulinaires ont été précédemment décrits chez *S. benzoin* et *S. officinalis* [18], ces structures étant toutefois d'origine traumatique, ce qui n'apparaît pas être le cas dans

les feuilles observées. Des inclusions cellulaires sont visibles dans certaines cellules du mésophylle (Fig. 2.4) et pourraient être apparentées aux cristaux d'oxalate de calcium précédemment décrits dans les tissus non lignifiés de feuilles d'espèces appartenant au genre *Styrax* [18].

Dans les coupes pratiquées dans les sépales (Fig. 2.6) et dans les pétales (Fig. 2.7), nous n'avons observé aucune structure sécrétrice similaire à celles présentes dans les feuilles. Cependant, nous avons précédemment pu mettre en évidence la présence d'huile essentielle dans les parties aériennes de la plante [10]. Il apparaît donc cohérent que des cellules sécrétrices se forment au cours de l'ontogenèse.

À notre connaissance, aucune publication présentant des microphotographies de l'anatomie de *S. officinalis* n'est disponible et notre travail apporte donc un complément de connaissance sur cette espèce, particulièrement intéressante sur le plan médicinal, qui vient s'ajouter à l'approche sur d'autres espèces du genre *Styrax*, plus étudiées, comme *S. camporum* [16,17]. Nous tenons également à souligner que les travaux présentés dans cet article s'inscrivent dans un cadre de recherches plus vaste portant sur la connaissance biologique, chimique, la culture in vitro et les activités biologiques de l'espèce *S. officinalis* [23].

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier chaleureusement pour leur aide le service commun de microscopie électronique de l'université de Provence, centre scientifique de Saint-Charles, Roger Notonier, qui a apporté sa contribution technique à la préparation de nos échantillons, et Roxane Barthélémy, qui nous a donné de précieux conseils pour les coupes au microtome à congélation.

Références

- [1] P. Fournier, Les quatre flores de France, P. Lechevalier, Paris, 1961.
- [2] P. Lieutaghi, Haute Provence, Le livre des arbres, arbustes et arbrisseaux, vol. I, Robert Morel, Mane, 1969.

- [3] R. Segal, M. Mansour, D.V. Zaitschek, Effect of ester groups on the haemolytic action of some saponins and saponinins, *Biochem. Pharmacol.* 15 (1966) 1411–1416.
- [4] R. Segal, I. Milo-goldweig, S. Sokoloff, D.V. Zaitscek, A new benzofuran from the seeds of *Styrax officinalis*, *J. Chem. Soc. C* 22 (1967) 2402–2424.
- [5] A. Ulubelen, M. Tanker, F. Baykut, F. Kar, A study with seed oil of *Styrax officinalis*, Part III, *Chim. Acta Turcica* 4 (1976) 53–62.
- [6] S. Icli, H. Anil, B. Dindar, O. Alankus-Caliskan, Y. Yayla, A.O. Doroshenko, S. Alp, High-fluorescence emissions of some natural benzofuran derivatives isolated from *S. officinalis*, *Turk. J. Chem.* 24 (2000) 199–207.
- [7] Y.A. Yurdanur, O. Alankus-Caliskawo, A. Hüseyin, R.B. Bates, C. Stessmanc, V.V. Kane, Saponins from *Styrax officinalis*, *Fito-terapia* 73 (2002) 320–326.
- [8] Y.A. Yurdanur, A. Hüseyin, Benzofuran from seeds of *Styrax officinalis*, *Fitoterapia* 74 (2003) 743–745.
- [9] Y.A. Yurdanur, A. Hüseyin, Benzofurans and another constituent from seeds of *Styrax officinalis*, *Phytochemistry* 63 (2003) 939–943.
- [10] G. Tayoub, I. Schwob, J.-M. Bessière, J. Rabier, V. Masotti, J.-P. Mévy, M. Ruzzier, G. Girard, J. Viano, Essential oil composition of leaf, flower and stem of *Styrax* (*Styrax officinalis* L.) in South-East of France, *Flavour Fragrance J.*, in press.
- [11] E. Poirier, Des produits du *Styrax* et des *Liquidambers*, thèse de doctorat en pharmacie, École supérieure de pharmacie, Paris, 1879.
- [12] E. Barthélémy, Contribution à l'étude de *Styrax officinalis*, thèse de doctorat en pharmacie, Montpellier, 1895.
- [13] H.F. Copeland, The *Styrax* of Northern California and the relationships of the *Styracaceae*, *Am. J. Bot.* 25 (1938) 771–780.
- [14] P.W. Fritsch, Phylogeny of *Styrax* based on morphological characters with implications for biogeography and infrageneric classification, *Syst. Bot.* 24 (1999) 356–378.
- [15] P.W. Fritsch, Phylogeny and biogeography of the flowering plant genus *Styrax* (*Styracaceae*) based on chloroplast DNA restriction sites and DNA sequences of the internal transcribed spacer region, *Mol. Phylogenet. Evol.* 19 (2001) 387–408.
- [16] S.R. Machado, V. Angyalossy-Alfonso, B.L. Morretes, Comparative wood anatomy of root and stem in *Styrax camporum* (*Styracaceae*), *IAWA J.* 18 (1997) 13–25.
- [17] S.R. Machado, C.R. Marcati, B. Lange de Morretes, V. Angyalossy, Comparative bark anatomy of root and stem in *Styrax camporum* Pohl. (*Styracaceae*), *IAWA J.* 26 (2005) 477–487.
- [18] C.R. Metcalfe, L. Chalk, Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood, in relation to taxonomy, 185. *Styracaceae*, Oxford University Press, 1957, pp. 887–890.
- [19] M. Langeron, Précis de microscopie, Masson, Paris, 1949.
- [20] K.M. Wiegand, The relation of hairy and cutinized coverings to transpiration, *Bot. Gaz.* 49 (1910) 430–444.
- [21] R.E. Spichiger, V. Savolainen, M. Figeat, Botanique systématique des plantes à fleurs : une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, Suisse, 2000.
- [22] E. Boureau, Anatomie végétale, l'appareil végétatif des Phanérogames, PUF, Paris, 1957.
- [23] G. Tayoub, Contribution à la connaissance biologique et chimique, à la culture in vitro et aux activités biologiques de *Styrax officinalis* L. (*Styracaceae*), thèse, université de Provence, Marseille, 2005.