

Microscopie des plantes consommées par les animaux

Joselyne Rech



Microscopie des plantes consommées par les animaux

Joselyne Rech

Déjà parus dans la Collection *Guide pratique*

Reconnaître et décoder les traces d'animaux
Manuel d'ichnologie
Muriel Chazel, Luc Chazel
2011, 192 p.

Locust Control Handbook
Manuel de lutte antiacridienne
Tahar Rachadi
2010, 168 p.

Manuel de lutte antiacridienne
Tahar Rachadi
2010, 176 p.

Estimation de l'aléa pluvial en France métropolitaine
Patrick Arnaud, Jacques Lavabre
2010, 158 p.

Les requins. Identification des nageoires
Pascal Deynat
2010, 380 p.

Cactus et plantes succulentes du monde
Francis Bugaret
2010, 240 p.

Les Lamproies en Europe de l'Ouest
Catherine Taverny, Pierre Élie
2010, 112p.

Dessins

Joselyne Rech

Édition, infographie, maquette

Éditions Quæ

Mise en page

Alter ego communication

Éditions Quæ

RD 10

78026 Versailles Cedex, France

© Éditions Quæ, 2011
ISBN 978-2-7592- 0926-2
ISSN 1952-2770

Le code de la propriété intellectuelle interdit la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Le non-respect de cette disposition met en danger l'édition, notamment scientifique, et est sanctionné pénalement. Toute reproduction, même partielle du présent ouvrage est interdite sans autorisation du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC), 20, rue des Grands-Augustins, Paris 6°.

Sommaire

Remerciements	6
Avant-propos	7
Introduction	9
Pourquoi et comment la microscopie est-elle employée ?	11
Domaines d'application	11
Préparation des échantillons	13
Méthode et limites d'utilisation	15
Angiospermes dicotylédones	25
Épiderme de la feuille	27
Éléments anatomiques fondamentaux	27
Éléments anatomiques complémentaires	27
Codification des éléments anatomiques	28
Description des principales familles	53
Éléments anatomiques	53
Éléments anatomiques de quelques familles de moindre importance	147
Clé de détermination	153
Clé de détermination à partir d'un fragment de feuille	153
Plan général de la clé	153
Présence de cristaux d'oxalate de calcium	154
Absence de cristaux d'oxalate de calcium	160
Microscopie de quelques espèces exotiques	167
Combinaisons pour ramener un genre à sa famille d'origine	167
Combinaisons pour identifier des familles et des genres	169
Quelques espèces illustrées	169
Angiospermes monocotylédones	173
Graminées	175
Éléments anatomiques	175
Principales espèces étudiées	183
Identification et classification	184

Amaryllidacées, aracées, dioscoracées, iridacées, liliacées	189
Espèces étudiées	189
Caractères communs aux dicotylédones et aux graminées	189
Caractères spécifiques	190
Ptéridophytes et gymnospermes	193
Ptéridophytes - Fougères et prêles	195
Éléments anatomiques des frondes de fougères	195
Éléments anatomiques des écailles de prêles	195
Gymnospermes	197
Section transversale de la feuille des aiguilles et des écailles	197
Canaux résinifères	197
Épiderme et sous-épiderme (hypoderme)	198
Mésophylle	198
Épiderme à plat ou de face	198
Stomates haplochéiles ou syndétochéiles	198
Graines et fruits (akènes, caryopses)	203
Principaux tissus et éléments anatomiques	205
Tissus observés	205
Particularités des éléments anatomiques	208
Éléments anatomiques des téguments des graines et des enveloppes des fruits	211
Caractères physico-chimiques	211
Caractères anatomiques	212
Matières premières des aliments pour animaux	219
Céréales	219
Tourteaux et graines protéagineuses	225
Écorces d'arbres et d'arbustes	243
Tissus de l'écorce	245
Caractères anatomiques de l'écorce	245
Caractères anatomiques de l'écorce des arbres répandus en Midi-Pyrénées	247
Annexe – Principaux signes cliniques observés chez les animaux	255
Références bibliographiques	265
Liste des illustrations	269
Index des plantes citées	271

À la mémoire de mes parents qui, dès mon plus jeune
âge, m'ont appris à aimer la nature et les animaux.

Mon père, professeur de philosophie, m'a
enseigné la sagesse et la réflexion.

Ma mère, géologue, m'a transmis l'art de
l'observation et du raisonnement scientifique.

À ma sœur Nadine, toute mon affection.

Et tous mes amis, dans mes pensées,
de près et de loin,
sont ici rassemblés.

Remerciements

Je remercie chaleureusement celles et ceux qui m'ont aidée. Grâce à leurs précieux conseils et leurs judicieuses critiques, j'ai pu écrire cet ouvrage dans d'excellentes conditions et avec un grand enthousiasme.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Claude Leredde, aujourd'hui disparu, qui a été mon professeur de botanique à l'Université Paul Sabatier de Toulouse. Je lui dois l'amour de la botanique. Je lui en serais toujours reconnaissante.

Les personnalités qui suivent, par l'intérêt qu'ils portaient à mon travail, ont très largement contribué à l'aboutissement de ce livre dans un climat d'amitié et de confiance. Tout simplement : Merci à toutes et à tous !

École vétérinaire de Toulouse

Messieurs Louis Faliu et Daniel Griess, tous deux professeurs à l'unité pédagogique d'Alimentation, botanique appliquée.

Monsieur Yves Lignereux, professeur à la chaire d'Anatomie des animaux domestiques.

Madame Nathalie Priymenko, maître de conférences à l'unité pédagogique d'Alimentation, botanique appliquée.

Madame Viviane Burgat-Sacaze, professeure, chaire de Pharmacie et toxicologie.

Madame Geneviève Bénard, professeure, chaire d'Hygiène et industrie des aliments d'origine animale.

En mémoire de Monsieur Patrick Bénard, professeur, chaire de Physique, chimie biologiques et médicales.

École vétérinaire de Maisons Alfort

Monsieur Bernard-Marie Paragon, professeur, chaire Alimentation et nutrition.

Madame Géraldine Blanchard, docteur vétérinaire, agrégée en alimentation animale.

Au cours de la réalisation de cet ouvrage, je n'ai pas cessé de penser à la belle et noble profession des praticiens vétérinaires qui m'apporté une aide précieuse pour la compréhension des termes techniques décrivant les pathologies conséquentes des intoxications végétales. Je les remercie tous.

Ma reconnaissance et mes remerciements s'adressent aussi à l'équipe des Éditions Quæ, en particulier Françoise Réolon. Avec compétence et gentillesse, ces personnes ont accompagné la création du livre dont je rêvais et l'ont mis entre vos mains, vous, lecteur.

Avant-propos

Quelque part dans une prairie des Pyrénées, un troupeau de vaches et, au loin, des chevaux, pâturent tranquillement une herbe abondante et parfumée. À mes côtés, mon lapin de compagnie choisit goulûment les meilleurs brins d'herbe. En sautillant, il se dirige vers un petit arbrisseau et grignote quelques feuilles fraîches.

Dans le silence du lieu, seulement interrompu par les clarines des animaux en estive, j'examine les couleurs des fleurs et la forme des feuilles à l'aide d'une flore de poche afin de mettre un nom sur les plantes qui m'entourent et dont les animaux se délectent.

Une question s'impose à moi : comment faire pour d'identifier les plantes ayant traversé le tube digestif des animaux alors que leur aspect dans les fèces n'a plus rien à voir avec celui de la plante sur pied ? Cette question me taraude d'autant plus que, parmi mes activités professionnelles à l'École vétérinaire de Toulouse, dans l'unité pédagogique d'Alimentation et de botanique appliquée, j'ai développé une technique en microscopie optique visant l'identification des matières premières réduites en poudre dans les aliments composés. Comment développer un protocole général de reconnaissance des fragments de plantes avec un simple microscope optique ? Passionnant ! Cette réflexion est le point de départ d'un travail d'observation au microscope optique des végétaux vasculaires pour rechercher les caractères permettant de ramener la plante à son unité systématique.

La relation plante-animal est étroite. Elle est étudiée et parfois connue depuis longtemps. Elle est déjà décrite dans la Genèse (1-30) : « ...Et à tout animal de la Terre, à tout oiseau du ciel, et à tout ce qui se meut sur la Terre, ayant en soi un souffle de vie, je donne toute herbe verte pour nourriture. Et cela fut ainsi. »

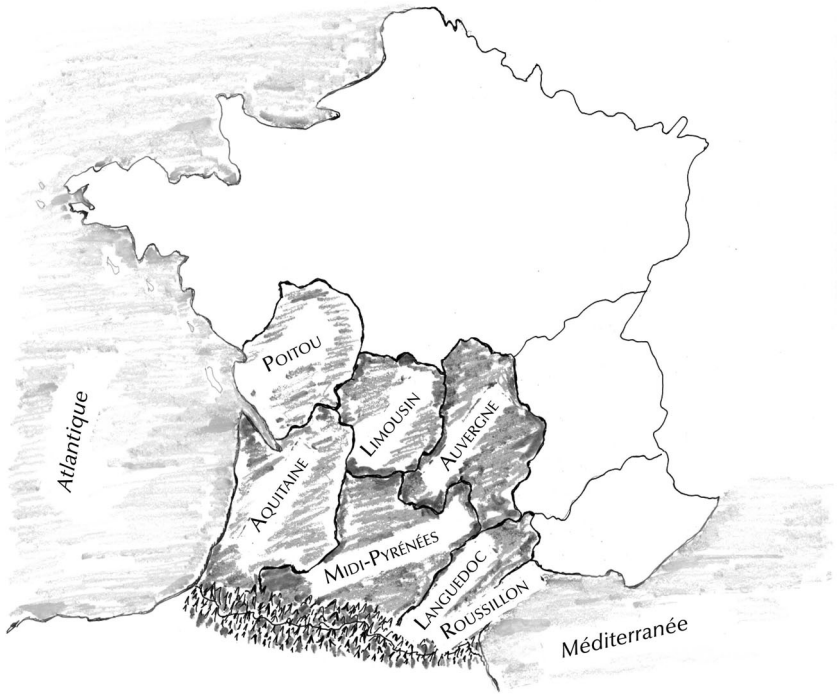
Il y a des millions d'années, les premières plantes sortaient de l'eau. Elles colonisent les différents milieux terrestres grâce à l'organisation d'un système vasculaire. Puis, c'est au tour des animaux de se libérer du milieu aquatique. Ainsi, les fougères apparaissent avec les amphibiens ; les gymnospermes occupent les terres émergées en même temps que les reptiles. À l'ère tertiaire, les angiospermes apparaissent et peuplent rapidement tous les milieux grâce à leur grande adaptabilité. De nombreuses espèces de mammifères se développent avec ces plantes qui sont à la base de leur alimentation. Enfin, à notre époque, outre les végétaux consommés comme le fourrage par les herbivores, d'autres plantes constituent les matières premières utilisées pour l'alimentation humaine ou celle des animaux domestiques.

Mais si les plantes sont vitales pour les animaux, elles peuvent aussi les intoxiquer, dans certaines circonstances qui seront décrites dans cet ouvrage. L'observation au microscope pour identifier la présence de plantes toxiques dans les contenus digestifs ou dans les fèces d'un animal pourrait ainsi devenir un outil d'aide au diagnostic des intoxications végétales à la disposition des vétérinaires.

La rédaction de cet ouvrage a germé à l'École vétérinaire de Toulouse. La récolte d'un maximum d'espèces végétales a permis l'établissement d'une collection de référence : les feuilles, les graines, les fruits, les écorces, etc., consommées par les animaux, ont été étudiées. Ce long travail d'observation a débouché sur la description des caractères anatomiques définissant les familles, les genres et

les espèces exposés dans cet ouvrage. Sous « l'œil » du microscope sont apparues les images de structures anatomiques, originales et variées, au niveau des feuilles (épiderme inférieur), des graines et des fruits (enveloppes) ou de l'écorce (partie externe). Je les ai « croqué » à l'encre de Chine, à partir de l'observation directe au microscope optique et avec l'aide de clichés photographiques ; elles constituent les quelques 150 planches qui illustrent de cet ouvrage.

Le lecteur a ainsi à sa disposition une clé de diagnose originale basée sur la structure et l'organisation de chaque plante. Cette nouvelle facette de la botanique n'exclut en aucune manière l'approche traditionnelle d'identification, réalisée à partir de l'observation de la morphologie « macroscopique » de la plante comme elle est décrite dans les flores.



Zone géographique couverte par l'étude

Introduction

L'identification d'une plante se fait habituellement à l'aide d'une flore. Elle repose sur l'observation et la description de caractères morphologiques faciles à observer. Un matériel rudimentaire tel qu'une simple loupe est souvent suffisant. À l'heure actuelle de nombreuses techniques sont à la disposition des systématiciens leur permettant d'utiliser des critères liés à la méthode choisie pour un but poursuivi. La palynologie, par exemple, détermine les espèces végétales à partir des grains de pollen dans le but d'évaluer la qualité des miels. Citons pour mémoire d'autres techniques : la cytologie, la phytochimie, la biologie moléculaire...

Les critères retenus dans cette étude sont l'anatomie de l'épiderme inférieur de la feuille et l'anatomie des enveloppes des fruits et des graines ; pour l'écorce, c'est le suber (écorce externe morte), l'assise phellogène et le liber (écorce vivante) qui sont retenus. L'usage de réactifs et de matériel est simple et accessible à tout praticien ou tout laboratoire. La méthode repose sur l'observation de fragments, de taille comprise entre 0,1 et 0,5 millimètres dans la majorité des cas, presque invisibles à l'œil nu et difficilement reconnaissables à la loupe.

Les fragments d'une plante (feuille, graine, fruit, écorce), consommés par les animaux sauvages et domestiques, se retrouvent dans leurs matières fécales, dans leurs contenus digestifs ou dans les matières premières réduites en farine lors de la fabrication d'un aliment. Leur observation fait appel à l'anatomie végétale, utilisée depuis près de 150 ans pour des identifications pratiques et pour celles des relations phylogénétiques entre les familles. À la différence des cellules animales, les cellules végétales ont une membrane pecto-cellulosique ou squelettique. Celle-ci est constituée de microfibrilles de cellulose, d'hémicellulose, et de composés pectiques (dérivés de l'acide hexuronique). Au cours de leur différenciation et de leur organisation en tissus, les cellules modifient la nature chimique de leurs parois :

- par imprégnation de lignine ;
- par un dépôt de carbonate de calcium et de silice ;
- par un dépôt de cutine et de subérine, substances de nature lipidique qui assurent l'imperméabilité et la protection des feuilles, des tiges jeunes (cutine) et des tiges âgées (subérine).

La membrane squelettique constitue un cadre qui confère à toute cellule végétale une forme caractéristique. Celle-ci n'est pas modifiée par le processus chimique de la digestion des animaux. Cette forme donne une image au microscope optique à des grossissements courants de $\times 100$ ou de $\times 200$. L'image est à la base de l'identification de la plante à partir de fragments de ses différentes parties : feuille, graine, fruit, écorce.

L'identification microscopique d'une plante à l'état de fragments revêt un intérêt certain car les plantes représentent 90 % de la nourriture des animaux. Leurs parties sont diversement utilisées.

La feuille, partie aérienne de la plante, est consommée directement par l'herbivore et l'omnivore sauvage et domestique aux pâturages, dans divers milieux naturels ou dans les fourrages récoltés et conservés sous la forme de foin, d'ensilage destinés le plus souvent aux animaux domestiques. Le foin peut également être distribué aux animaux sauvages en période hivernale.

La graine, les fruits (fruits secs indéhiscent) et leurs dérivés entrent dans la composition d'aliments industriels en tant que matières premières (céréales, tourteaux d'oléagineux). Ils peuvent aussi être directement ingérés par les animaux comme les glands, les châtaignes, diverses baies... Les fruits et les graines de plantes adventices des cultures, présents accidentellement dans l'aliment composé peuvent modifier sa valeur nutritive voire entraîner une toxicité pour l'animal. Ils sont identifiés de la même façon.

L'écorce d'arbre ou d'arbuste constitue un bouclier protecteur contre les intempéries et les prédateurs (bactéries, insectes, certains oiseaux). Des animaux sauvages (cerf, lapin, lièvre, chevreuil) et domestiques (cheval, chèvre) écorcent les arbres et les arbustes pour se nourrir et pour des raisons sanitaires (parasitisme, par exemple). Certaines écorces sont toxiques pour les animaux domestiques, en particulier l'écorce de cytise et d'if.

Le bulbe, la racine, le rhizome, le tubercule, organes souterrains accessibles par le sanglier par exemple, ne sont pas traités dans l'ouvrage. Ils comportent des éléments anatomiques qui leur sont propres et sont semblables pour des familles différentes. Indirectement, suite à la reconnaissance de la plante par ses autres parties, l'analyste peut cependant consulter une flore descriptive pour identifier une racine tubérisée ou un rhizome. Parfois, il est nécessaire d'identifier un fragment de partie souterraine de la plante lorsqu'il y a une suspicion d'intoxication.

Pourquoi et comment la microscopie est-elle employée ?

Domaines d'application

Le contrôle de la qualité des aliments composés

La production globale d'aliments composés en France est de 21 526 700 tonnes (Snia/CFNA *Revue de l'alimentation animale*, n° 624, mars 2009). Cette valeur justifie la nécessité du contrôle de leur qualité par l'examen microscopique. Celui-ci complète le contrôle quantitatif fondé sur les résultats de l'analyse chimique.

Le contrôle-qualité est un contrôle aux sources puisqu'en aucun cas des falsifications ou des erreurs accidentelles de fabrication de l'aliment ne peuvent modifier les structures anatomiques caractéristiques des différentes matières premières. Les ingrédients indésirables provenant de végétaux mélangés accidentellement ou frauduleusement sont déterminés de la même manière. Ces végétaux indésirables peuvent provenir de graines ou de fruits de plantes adventices des cultures.

L'identification des plantes toxiques pour les animaux

Depuis quelques années, les animaux de compagnie occupent une place importante dans nos foyers. Ils peuvent être, tout comme leur propriétaire, victimes des plantes toxiques. Leur identification au microscope, à caractère spécifique, conduit l'analyste aux sources de l'accident de toxicologie. Le dosage des principes actifs de la plante ne peut pas toujours révéler l'origine de cet accident. En effet, les mêmes alcaloïdes, hétérosides, composés aromatiques, terpènes, etc. peuvent être présents chez des plantes d'origine botanique tout à fait différente. Le recours à la méthode présentée dans ce guide peut alors s'avérer très utile.

Les intoxications végétales des animaux domestiques d'élevage sont souvent graves médicalement, le diagnostic est parfois tardif et difficile. Les manifestations cliniques peuvent être atypiques lorsque, par exemple, la quantité de toxique ingéré est faible se traduisant par des troubles digestifs non spécifiques. Économiquement, les intoxications ont une incidence importante à cause d'une éventuelle mortalité des animaux, d'une chute de production zootechnique de l'animal malade, sans oublier qu'une convalescence d'un animal atteint, peut être longue. Il est donc nécessaire de réunir le plus grand nombre d'informations sur le terrain consignées dans une fiche de renseignements. En présence d'une suspicion d'intoxication végétale, le praticien adoptera deux attitudes différentes :

- le végétal suspect est encore présent accessible aux animaux ; le praticien examine alors directement la plante ;

– il ne reste plus de traces visibles de la plante sur le terrain, mais il y a suspicion de consommation par les animaux ; le praticien recherche des fragments de la plante suspecte, soit dans les matières fécales, soit dans les vomissures de l'animal malade, soit dans le (les) contenu(s) digestif(s) de l'animal lors de son autopsie.

Intoxication des animaux par les plantes – Des facteurs de risque

La répartition géographique des espèces végétales

Dans le Quercy par exemple, où les forêts de chênes sont importantes, le praticien sera confronté à une fréquence élevée des intoxications des animaux par les glands. Suite à certaines conditions atmosphériques qui perturbent leur complète maturité : un coup de vent, des orages de la fin de l'été précipitent les glands au sol avant leur maturité, ils sont alors accessibles aux animaux. Avant leur complète maturité, les glands sont riches en tanins hydrolysables, toxiques pour les animaux domestiques. Autre exemple : le laurier rose, arbuste parfois présent à l'état spontané dans les prairies de la région méditerranéenne, provoque une intoxication brutale sur les animaux en pâturage, plus précisément sur les chevaux sensibles à cette plante.

L'influence du sol et de ses traitements

Les plantes, sous l'action d'herbicides, perdent parfois leur goût et leur odeur désagréables pour l'animal. Elles seront alors consommées sans méfiance. Les terres cultivées mises en jachère peuvent être envahies par des espèces végétales dangereuses, normalement peu nombreuses (mercuriale, amarante, datura, morelle noire, etc.). Certaines plantes fourragères (légumineuses, graminées) sont parfois la cause d'accidents à la suite d'une fertilisation trop importante (excès d'azote ou de nitrates).

L'état de la plante, les conditions climatiques, le comportement des animaux

Certaines plantes, naturellement refusées par l'animal, passent inaperçues lorsqu'elles sont mélangées au foin, à l'ensilage, car elles ont perdues leurs propriétés organoleptiques naturelles, masquées par l'odeur aromatique du foin ou l'odeur acide de l'ensilage. Par ailleurs, la concentration des principes toxiques est étroitement liée au stade végétatif de la plante. Ainsi le stade feuillu et la floraison sont les périodes pendant lesquelles une espèce est la plus dangereuse à cause du métabolisme intense de la plante à ce moment là. Chez d'autres espèces, ce sont les graines et les fruits seuls qui sont toxiques, par concentration des principes actifs. Enfin, dans certains cas, seules les parties souterraines peuvent être dangereuses (bulbes de la majorité des liliacées).

Le froid, l'humidité excessive, la sécheresse, les changements brusques de température, perturbent le métabolisme de la plante en favorisant l'accumulation de certains principes toxiques. Par exemple, la concentration de la durrhine, hétéroside cyanogénétique du sorgho, augmente en période de sécheresse.

Enfin, certains facteurs peuvent modifier le comportement normal des animaux domestiques et conduire à un accident toxicologique :

- la faim, conséquence de la sécheresse, les animaux n'ont plus alors la possibilité du choix de nourriture ;
- la précipitation lorsque les animaux sortent trop tôt de l'étable au tout début du printemps, ils se jettent sur la « verdure » après en avoir été sevrés pendant tout l'hiver ;
- la curiosité et le jeu du chiot ou du chaton qui mordille les feuilles ou la tige d'une plante ornementale d'appartement ou de jardin, peut tourner au drame ;
- un appétit dépravé suite à une carence ;
- l'ennui des animaux de compagnie, chien, chat, enfermés seuls dans un appartement, ou un cheval isolé dans un enclos, les poussent à consommer des plantes dangereuses, plantes en général ornementales.

L'étude du régime alimentaire des animaux sauvages et domestiques

Cette étude est menée à partir de l'examen des contenus digestifs ou des matières fécales.

L'identification botanique

Parfois, l'identification traditionnelle des plantes à l'aide d'une flore est difficile. Les caractères morphologiques ne sont plus visibles pour l'observateur. La plante est séchée, fragmentée, les fleurs sont absentes, ou les graines, les fruits sont absents. Seuls les fragments de feuille ou les graines, ou enfin les fruits entiers ou fragmentés, sont à la disposition du praticien.

L'identification archéologique

À partir de l'observation de résidus culinaires (pains et galettes), de litière, la botanique microscopique permet l'identification des espèces végétales utilisées.

Préparation des échantillons

Produits réactifs et matériels

– Du Teepol (ou autre détergent), de l'eau de javel du commerce (solution aqueuse d'hypochlorite de sodium à 2,6 % de chlore actif), une solution de potasse à 3 %, de l'alcool éthylique à 95 %, de la glycérine pure, de l'eau courante du robinet ;

– un bécher de 400 millilitres sans bec, des verres de montre, une lame de rasoir simple, un broyeur à marteaux (Turmix), un tamis standard NF de 4 mm, 2,5 mm, 0,6 mm, 0,2 mm superposés sur fond de tamis, des lames ordinaires et des lamelles (24 x 32 mm) ;

– un microscope optique équipé d'objectifs courants (x 10) ou (x 20), oculaires de (x 10) de Nichols, croisés pour observer en lumière polarisée. Il est conseillé d'adapter sur le microscope une caméra vidéo couleur avec un moniteur ou un appareil de photographie numérique. L'ensemble sera relié à un microordinateur PC disposant d'un logiciel d'acquisition d'images afin de constituer d'une part un fichier d'images de référence et d'enregistrer, d'autre part, les images observées au cours d'une diagnose.

Modes opératoires

Feuilles

La feuille est maintenue entre le pouce et l'index. On décolle l'épiderme inférieur (après avoir repéré la face inférieure de la feuille grâce aux nervures en saillie), en le grattant à l'aide d'une lame de rasoir. L'épiderme inférieur de la feuille est choisi car il possède de nombreux éléments anatomiques dont l'association est caractéristique de la famille, du genre et parfois de l'espèce. L'épiderme supérieur de la feuille est homogène d'une famille à l'autre. Les poils tecteurs, sécréteurs, les stomates y sont peu nombreux, voire absents dans de nombreux cas.

•Plantes ou échantillons frais

Destruction cellulaire (excepté pour des cristaux d'oxalate de calcium et des parois cellulaires) : le fragment obtenu après grattage est plongé pendant

15 minutes pour une plante herbacée, 20 à 25 minutes pour un arbre, un arbuste, une plante sub-ligneuse, dans un verre de montre contenant le mélange suivant : $\frac{3}{4}$ d'eau de javel, $\frac{1}{4}$ d'alcool éthylique à 95 °C.

Rinçage : devenu transparent, le fragment végétal est rincé à l'eau ordinaire additionnée de quelques gouttes de détergent pour faciliter le mouillage et l'élimination des bulles d'air éventuellement formées.

• Plantes prélevées sur le terrain

La feuille ou le fragment de feuille peut être séché : le tremper alors dans de l'eau additionnée de détergent afin de réhydrater les tissus. Ensuite, décoller l'épiderme inférieur comme précédemment. Procéder à la destruction cellulaire et au rinçage.

• Fragments végétaux provenant des matières fécales ou des contenus digestifs

Isoler tout d'abord les fragments de feuille à déterminer par lavage des contenus digestifs ou des matières fécales à l'eau courante sur des tamis superposés (2,5 à 4 mm).

Si les fragments sont trop petits pour décoller l'épiderme inférieur, les plonger directement dans le mélange d'eau de javel et d'alcool jusqu'à ce que les fragments deviennent transparents. Rincer à l'eau courante additionnée de quelques gouttes de détergent.

S'il n'est pas possible d'isoler les fragments de feuille, prélever un gramme environ d'échantillon directement sur le tamis de 2,5 mm, traiter à l'eau de javel et rincer. Recommencer cette opération 5 ou 6 fois de façon à disposer d'un échantillon global et représentatif.

Dans tous les cas, procéder au montage de la préparation dans une goutte de glycérine pure. Observer les structures caractéristiques conduisant à la diagnose des plantes.

Graines ou fruits (akènes, caryopses)

Un contrôle de la qualité des aliments composés (identification des matières premières et des substances étrangères) est réalisé.

À partir de 25 g d'aliments finement broyés (20 secondes au Turmix), 2 g constituent une prise d'essai qui est plongée dans un bécher de 400 ml contenant 50 ml d'une solution de potasse caustique à 3 %. La potasse est utilisée ici de préférence à l'eau de javel car elle respecte la pigmentation naturelle de certaines cellules des enveloppes des fruits et graines, ce qui facilite la diagnose.

L'ensemble est porté à douce ébullition pendant 10 minutes. On procède ensuite à 5 ou 6 lavages à l'eau claire. Chaque lavage est suivi d'une décantation (ou centrifugation à 3 000 tours par minute). Le liquide surnageant est éliminé. Procéder au montage entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine pure. Rechercher les structures anatomiques caractéristiques de chaque matière première et des substances étrangères à l'aliment.

Écorces

REMARQUE : Les fragments d'écorce existent dans les estomacs ou les panses dans lesquels ils peuvent être identifiés suivant le même protocole que les autres fragments végétaux. Cela ne peut se réaliser qu'après la mort de l'animal. Des morceaux d'écorce se retrouvent aussi dans les matières fécales de l'animal vivant.

Les fragments d'écorce prélevés directement sur l'arbre ou l'arbuste, ou dans un gramme de matières fécales (préalablement séchées à 60 °C pendant 4 à 5 heures), sont plongés dans une solution à 50 % de javel.

Dans les deux cas, l'ensemble est porté à douce ébullition pendant 20 minutes. Rincer 4 à 5 fois à l'eau courante. Laisser reposer les fragments pendant une heure dans l'eau du dernier rinçage additionnée de quelques gouttes de détergent, afin d'éliminer les bulles d'air formées au cours de la préparation ou, bien souvent, emprisonnées dans l'écorce avant la préparation. Déposer les fragments d'écorce (prélevés directement sur l'arbre) ou déposer 0,4 mg de matières fécales contenant des fragments d'écorce entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine pure. Rechercher les structures caractéristiques permettant la diagnose de l'arbre ou de l'arbuste.

Méthode et limites d'utilisation

Des codes pour caractériser les éléments anatomiques

REMARQUE : Un logiciel d'aide à la diagnose a été créé. Il s'appuie sur la codification des éléments anatomiques. Celle-ci est intégralement reprise dans cet ouvrage.

Généralement, le système de classification traditionnel des plantes repose sur les caractères morphologiques de l'appareil végétatif et de l'appareil reproducteur, c'est-à-dire, la fleur, organe de protection des étamines et du carpelle. Ce mode de classification est prévisionnel. Si une plante à identifier possède les mêmes caractères que ceux observés chez la plante de référence, cette plante inconnue sera alors rattachée à sa famille d'origine.

Dans le cadre de la microscopie des plantes, un chiffre ou code numérique correspond à la description de l'élément anatomique observé au niveau de l'épiderme inférieur (feuille), au niveau des enveloppes (graine, fruit), au niveau de l'écorce des arbres ou arbustes. C'est la combinaison d'un certain nombre de caractères anatomiques observés, au nombre de trois en général, (traduits par les codes de **1** à **265**) qui ramène une plante à son unité systématique. Autrement dit, si trois caractères de l'épiderme inférieur de la feuille ou trois caractères anatomiques des enveloppes des fruits et des graines d'une plante à déterminer sont identiques à ceux de la plante de référence, la plante inconnue sera identifiée.

Cependant, il est souvent difficile d'individualiser l'espèce à l'intérieur d'une famille identifiée ou appartenant à une famille différente également identifiée. Chaque code numérique résume les nuances de l'élément anatomique. Par exemple, la longueur, la forme, le nombre de poils tecteurs, le nombre de stomates sur une surface épidermique peuvent être variables pour un même épiderme ; ces nuances traduisent les ressemblances parfois très proches d'une espèce à l'autre ; les éléments anatomiques appartiennent à un seul tissu, lui-même appartenant à un seul organe de la plante (l'épiderme inférieur de la feuille ou les enveloppes des fruits et des graines). Bien sûr, un nombre de codes plus élevé, correspondant à l'ensemble des éléments anatomiques pourrait être envisagé, mais cela compliquerait exagérément la méthode proposée. Par ailleurs, ce sont les différentes parties de la plante, et non la plante entière, qui se retrouve dans les contenus digestifs ou dans les matières fécales de l'animal, ou constituent les matières premières d'un aliment composé.

L'utilisateur de cette méthode peut donc être amené à observer des éléments anatomiques (ou une suite de codes) identiques pour des espèces différentes à l'intérieur d'une famille, ce qui entraîne une incertitude dans la diagnose.

Par exemple, *Eryngium campestre*, localisé dans les prés secs et rocailleux et *Eryngium maritimum* localisé dans le sable et galets du littoral : ces deux ombellifères ont la même suite de codes.

Parfois, certains caractères anatomiques de l'épiderme inférieur des angiospermes dicotylédones dépassent le cadre d'une famille pour se retrouver chez des familles différentes. Par exemple, la succulence se traduit par l'épaississement de la feuille pour mettre de l'eau en réserve (cas de certaines euphorbiacées de régions arides, les crassulacées de nos régions tempérées au climat sec ou enfin de nombreuses chénopodiacées halophytes). Autrement dit, le milieu (rocailles, éboulis de haute montagne, sable du littoral) et le climat sont la cause d'une convergence (ou uniformité) d'éléments anatomiques, ce qui rend difficile la diagnose. Dans ces cas, l'utilisateur devra faire une enquête sur le terrain pour confirmer sa diagnose.

Chez les angiospermes monocotylédones, les caractères anatomiques de l'épiderme inférieur restent à l'intérieur des familles à cause de la morphologie homogène de leur appareil végétatif. Ainsi, la simple observation de la structure des cellules de garde du stomate, des cellules courtes (codes **123** à **133**) suffisent à la reconnaissance d'une graminée. La nature des fragments végétaux à identifier constituent des séquences de codes, établies en fonction de l'utilisation des plantes par les animaux et des différentes parties de la plante.

Dans cette étude, la description des familles à partir des feuilles, des graines et des fruits est privilégiée. L'écorce ne constitue pas la base de l'alimentation des animaux. Elle est utilisée occasionnellement par certains animaux sauvages (cerfs, chevreuils, lièvres...). Il existe parfois des cas d'accidents toxicologiques chez le cheval et l'âne attachés au pied du cytise ou de l'if à baies. Par ennui, ils vont grignoter des fragments de l'écorce de l'arbre. Pour cette raison, nous donnons uniquement la liste des éléments anatomiques (codes **224** à **265**) permettant la reconnaissance des arbres et arbustes.

Séquences de codes d'après les différentes parties de la plante et leur classification

Nature de l'échantillon	Codes affectés aux éléments observés
Angiosperme dicotylédone, feuille, épiderme inférieur.	1 à 100
Angiosperme monocotylédone, feuille, épiderme inférieur (graminées).	101 à 133
Angiosperme monocotylédone, feuille, épiderme inférieur (amaryllidacées, aracées, dioscoracées, iridacées, liliacées).	134 à 142
Ptéridophyte, fronde de fougère, épiderme inférieur.	143 à 147
Ptéridophyte, écailles de prêle, épiderme (inférieur ou supérieur).	148 à 150
Gymnosperme feuille (aiguille, écaille), coupe transversale, épiderme inférieur (face).	151 à 180
Angiosperme dicotylédone, monocotylédone, graine (tégument séminal), fruit (caryopse, akène), épicarpe, mésocarpe, endocarpe, glumelles.	189 à 223
Écorce (arbre, arbuste), angiosperme dicotylédone et gymnosperme.	224 à 265

Combien d'éléments anatomiques ?

Cas des angiospermes dicotylédones

Les 170 000 espèces, répertoriées en moyenne, constituent un groupe homogène grâce aux deux cotylédons de la graine et aux formations secondaires des faisceaux conducteurs libéroligneux disposés en couronne (ou cycle). Mais la morphologie de l'appareil végétatif de cette classe est très variée : arbres, arbustes, buissons, plantes herbacées annuelles et pérennes, sont les principales formes végétatives observées sous notre climat tempéré.

Ces formes végétatives ont une incidence importante sur la morphologie des feuilles. Les feuilles sont simples ou composées, les deux sortes de nervures (principales et secondaires) sont pennées ou palmées, le bord du limbe est entier, denté, incisé, lobé... Dans la classe des dicotylédones des feuilles simples ou composées peuvent être étroites linéaires, la nervation devient alors parallèle dans certains cas.

Ces variations morphologiques de la feuille expliquent le nombre élevé d'éléments anatomiques de l'épiderme inférieur soit au nombre de 100, pour un seul tissu. Ce nombre est directement lié au génome de la plante et à son adaptation au milieu.

Cas des angiospermes monocotylédones

L'étude porte essentiellement sur les graminées à cause de leur importance économique (céréales, plantes fourragères). Quelques espèces issues d'autres familles (aracées, dioscoracées, iridacées, liliacées) sont également étudiées. La plupart de ces familles sont ornementales pour nos jardins et appartements. Elles peuvent être dangereuses pour nos animaux de compagnie (chiens, chats, chevaux). Un seul cotylédon dans la graine, l'absence de formations secondaires dans les faisceaux libéroligneux disposés en plusieurs couronnes, caractérisent les monocotylédones. Les 55 000 espèces en moyenne répertoriées sont herbacées (sauf les bambous et les palmiers).

La simplification morphologique de ces plantes se retrouve au niveau de la morphologie à caractère homogène des feuilles. Ainsi, les feuilles sont étroites, rubanées (graminées), la nervation est parallèle. Les nervures ont la même importance. On observe une absence de nervation principale et secondaire. Quelques exceptions existent en dehors des graminées. La parisette, par exemple, possède des feuilles verticillées par quatre, le limbe est étalé, la nervation convergente.

L'homogénéité morphologique des feuilles entraîne une réduction du nombre d'éléments anatomiques de l'épiderme inférieur : 33 chez les graminées et 8 chez les autres monocotylédones, lesquelles, par ailleurs, ont des éléments anatomiques communs avec les graminées et les dicotylédones.

En conséquence, le nombre restreint d'éléments anatomiques rend l'identification des monocotylédones par cette méthode plus délicate que pour les dicotylédones.

Comment et quel élément anatomique doit-on observer ?

Avant d'effectuer toute diagnose d'une plante au microscope à partir de fragments, il est indispensable de définir la nature du fragment, afin de se situer dans le groupe des codes précités correspondant à sa nature :

- dans le cas du contrôle de la qualité des aliments composés : la nature des fragments végétaux de chaque matière première est connue puisque son origine se situe dans le fruit ou la graine ;
- dans le cas de régime alimentaire des animaux sauvages et domestiques, la diagnose des plantes toxiques et l'identification botanique : les fragments inconnus sont triés, selon leur taille, à l'œil nu ou à la loupe (un grossissement x 10 est suffisant). Ensuite, les différentes fractions sont portées à douce ébullition dans une solution de potasse à 3 % pendant 15 minutes. Rincer à l'eau claire, montage dans une goutte de glycérine pure.

Que peut-on observer ?

PRÉSENCE DE STOMATES (organe aérien à fonction chlorophyllienne)

La tige, les rameaux, le pétiole de plante herbacée ou sub-ligneuse, annuelle ou vivace. Il n'est pas possible de déterminer la plante correspondante par cette méthode car la discrimination des éléments anatomiques permettant l'identification est insuffisante en raison de l'homogénéité des éléments anatomiques.

Une feuille élargie, rubanée

Pour une angiosperme dicotylédone : les éléments anatomiques observés correspondent aux codes 1 à 100.

Pour une angiosperme monocotylédone : les éléments anatomiques observés correspondent aux codes 101 à 141.

Pour les ptéridophytes, les frondes des fougères : les éléments anatomiques observés correspondent aux codes 142 à 147.

Une feuille en écaille

Pour les ptéridophytes, prèle écaille : les éléments anatomiques observés correspondent aux codes 148 à 150. Toutes les espèces de prêles ont une morphologie de l'appareil végétatif homogène : un seul caractère anatomique d'un fragment d'écaille permet d'isoler ces plantes de l'ensemble des fragments.

Une feuille aciculaire (en aiguille), parfois en écaille

Pour la feuille des gymnospermes : les éléments anatomiques observés correspondent aux codes 151 à 180.

ABSENCE DE STOMATES

Des fragments de péricarpe ou fruit (akène, caryopse), téguments séminaux de graine

Pour le fruit ou la graine d'angiospermes monocotylédones ou dicotylédones : les éléments anatomiques observés correspondent aux codes à 181 à 223. Les classes mono et dicotylédones sont réunies car la liste des éléments anatomiques des graines et fruits identifiés par cette méthode, appartiennent à ces deux classes.

Les cellules aux parois très épaisses, lignifiées souvent traversées par de fins canalicules, de forme variée, courtes, allongées, ou très allongées (fibres, ou en tubes) : il s'agit d'un fragment de péricarpe (akène, caryopse), ou de téguments séminaux. Les cellules sont pentagonales, hexagonales, aux parois épaisses, toujours rectilignes ; la surface cellulaire est souvent granuleuse : il s'agit d'un fragment d'albume de graine, de caryopse, d'akène.

Des fragments d'écorce

Pour les angiospermes dicotylédones et les gymnospermes : les éléments anatomiques observés correspondent aux codes à 224 à 265. Les cellules isodiamétriques ou allongées, apparaissent le plus souvent alignées et de couleur marron sombre. Les parois épaisses sont rectilignes. Ces cellules observées en priorité dans un fragment d'écorce correspondent aux cellules de suber (ou liège).