

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral
I.S.M.A.L.

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Universitaires Appliquées (D.E.U.A.)
en sciences de la mer
Option : **Ecologie marine**

Thème

**Contribution à l'étude de la variation des teneurs en phénols
totaux chez *Posidonia oceanica* (L.) Delile**

Présenté par :

Mlle HAMOUL N.

Mlle MOKEDDEM Z.

Soutenu le 07 octobre 2002 devant la commission d'examen composée de :

M. SEFIANE O.	Président
M. REFES W.	Examinateur
Mlle OULD AHMED N.	Examinateur
Mlle BOUMAZA S.	Rapporteur
M. SELLALI B.	Co-rapporteur

Sommaire

Sommaire

Introduction	01
1- Généralités	04
1-1- Cellules à tanins : distribution, ultrastructure et rôle	04
1-2- Les composés phénoliques : définition, répartition, synthèse et rôle	05
2- Matériel et méthodes	10
2-1- Choix et localisation des sites d'étude	10
2-1-1- Tamentfoust	10
2-1-2- L'anse de Kouâli	10
2-2- Prélèvement et transport des échantillons	12
2-3- Tri et conditionnement des échantillons	12
2-4- Analyse des composés phénoliques	14
2-4-1- Protocole d'extraction	14
2-4-2- Techniques d'analyse	16
2-4-2-1- Méthodes colorimétrique de dosage des phénols totaux	16
2-4-2-2- Principe de la spectrophotométrie UV/visible	17
2-4-2-3- Etalonnage du spectrophotomètre UV/visible	17
2-5- Comptage des cellules à tanins	19
2-6- Analyses statistiques utilisées	19
2-6-1- Test de MANN-WHITNEY	19
2-6-2- Test de KRUSKAL-WALLIS	20
3- Résultats et discussion	21
3-1- Variation de la teneur en phénols totaux	21
3-1-1 Variation en fonction du tissu foliaire	21
3-1-2- Variation en fonction de la station	22
3-2- Les cellules à tanins	24
Conclusion générale	27
Références bibliographiques	29

Introduction

Introduction

Posidonia oceanica (Linnaeus) Delile est une Angiosperme Monocotylédone endémique de la mer Méditerranée. Elle présente la même structure que «les plantes herbacées» terrestres dont elle est issue, avec un système foliaire dressé porté par un rhizome ou tige et des racines. Par opposition aux autres végétaux immergés (e.g. algues), elle fleurit, donne des fruits et produit des graines (PERGENT-MARTINI, 2000). Elle colonise la majeure partie des fonds littoraux, aussi bien les substrats durs que les substrats meubles, et constitue de vastes prairies sous-marines appelées «herbiers» depuis la surface de l'eau jusqu'à 30 à 40 m de profondeur.

L'herbier à *Posidonia oceanica* est considéré comme l'écosystème le plus important du système benthique littoral méditerranéen. Il exerce de nombreuses fonctions tant au niveau écologique que dans le maintien des équilibres littoraux : (i) il représente un pôle de biodiversité : près de 20 % des espèces méditerranéennes y sont signalées (BOUDOURESQUE, 1996) ; (ii) il intervient sur la qualité des eaux littorales grâce à une importante production d'oxygène (BAY, 1978) ; (iii) il joue un rôle fondamental dans la protection hydrodynamique de la frange côtière en fixant les fonds meubles et en atténuant la puissance des vagues et des houles (JEUDY de GRISSAC et BOUDOURESQUE, 1985) ; (iv) il est le siège d'une importante production primaire, soit 2 à 10 tonnes par hectare et par an (PERGENT-MARTINI *et al.*, 1994) ; (v) enfin, l'herbier est à la base de nombreuses chaînes trophiques et constitue un site de fraie et de nurserie privilégié pour de très nombreuses espèces, en particulier de poissons et de crustacés d'intérêt économique (HARMELIN-VIVIEN, 1983 ; BOUDOURESQUE, 1996).

De plus, l'herbier à *Posidonia oceanica* constitue un puissant intégrateur de la qualité des eaux littorales, en effet très largement répandu sur tout le littoral méditerranéen, il est particulièrement sensible à la pollution et aux agressions liées aux activités humaines (ASTIER, 1984 ; BOURCIER, 1989). Solidaire du fond, l'herbier rend compte par sa présence, sa vitalité ou sa régression, de la qualité des eaux qui dérivent au-dessus de lui, ce rôle d'indicateur global de la qualité des eaux fonctionne à deux niveaux (PERGENT, 1991) :

• **Au niveau de la population :** la position bathymétrie de la limite inférieure de l'herbier est un bon indicateur de la turbidité moyenne des eaux qui dérivent au-dessus de lui. De même, la limite supérieure de l'herbier de *Posidonia oceanica* est également une zone tout particulièrement sensible, car elle est directement exposée aux agressions engendrées par les aménagements littoraux et les rejets d'origine urbaine ou industrielle. Ces agressions entraînent la diminution du recouvrement et de la productivité de l'herbier.

• **Au niveau de l'individu :** la biométrie foliaire de *Posidonia oceanica* apporte des renseignements quant à la qualité globale de l'eau. En effet, en milieu pollué, la longueur moyenne des feuilles peut subir une réduction importante. A l'échelle anatomique, l'abondance des cellules à tanins, spécialisées dans l'élaboration des composés phénoliques (CARIELLO et ZANETTI, 1979), semble augmenter en réponse à un état de stress de la plante. Cette augmentation est observée lorsque l'on se rapproche du rejet en mer d'un émissaire (PERGENT, 1988) et lorsqu'il existe une forte compétition interspécifique (e.g. *Caulerpa taxifolia*) (de VILLELE, 1992 ; CUNY, 1993 ; AGOSTINI, 1996 ; FERRAT, 1998).

Les composés phénoliques sont considérés comme des métabolites secondaires et sont de première importance dans la protection de la plante et dans le maintien de son intégrité contre des compétiteurs, des prédateurs ou des pathogènes (ZAPROMETOV, 1993 in AGOSTINI, 1996). Il a été démontré que plusieurs plantes synthétisaient et accumulaient des composés phénoliques spécialement des tanins en réponse à un stress (SCHULTZ et BALDWIN, 1982 in CUNY, 1993 ; CHALKER-SCOTT *et al.*, 1989). Certains auteurs suggèrent que cette réaction peut-être utilisée comme indicateur physiologique, révélateur de l'existence de facteurs environnementaux stressants pour la plante (CONTOUR-ANSEL et LOUGUET, 1986 in AGOSTINI, 1996).

Le premier objectif de cette étude consiste à reproduire le protocole d'extraction et de dosage des composés phénoliques chez *Posidonia oceanica* par spectrophotométrie UV/Visible.

Le second objectif est de mettre en évidence l'impact éventuel des conditions environnementales sur la variation de la teneur totale en composés phénoliques chez *Posidonia oceanica*. Pour ce faire, deux sites sont choisis : le premier, l'anse de Kouâli,

considéré comme zone de référence et le second, Tamentfoust, soumis à différents types de pollutions.

Le troisième objectif est de déterminer si le type de tissu foliaire est un facteur de variation de la teneur en composés phénoliques chez *Posidonia oceanica*. Les feuilles adultes et intermédiaires seront donc étudiées séparément.

Le quatrième objectif est d'estimer l'abondance des cellules à tanins des feuilles intermédiaires de *Posidonia oceanica* provenant des deux sites étudiés, afin de mettre en évidence un éventuel impact du niveau d'anthropisation sur la production des cellules à tanins et d'établir une relation entre l'abondance de ces dernières et la teneur totale en composés phénoliques.

Généralités

1- Généralités

1-1- Cellules à tanins: distribution, ultra structure et rôle

La présence et la distribution des cellules à tanins dans les différents tissus de *Posidonia oceanica* sont confirmées par plusieurs auteurs. Mis à part les tissus foliaires (CARIELLO et ZANETTI, 1979 ; de VILLELE, 1992 ; PELLEGRINI et PELLEGRINI, 1992, 1993 ; CUNY, 1993 ; FERRAT, 1998), ces cellules peuvent se rencontrer dans les rhizomes et les écailles (MOSSE, 1983, 1984 ; CROUZET, 1984 ; PERGENT, 1988 ; PERGENT et al., 1983), les racines (KUO et CAMBRIDGE, 1978). Toutefois, leur nombre semble varier avec l'âge et la nature du tissu.

Pour illustrer la structure et la différenciation des cellules à tanins, PELLEGRINI et PELLEGRINI (1993) ont suivi l'ultrastructure du développement de la région basale d'une feuille de *Posidonia oceanica* et ont constaté que les tanins sont enfermés dans des vacuoles de cellules spécialisées disséminées çà et là dans la première couche cellulaire du mésophylle ; elles diffèrent des autres cellules voisines par leur grande taille et leur contour arrondi (Figure 1).

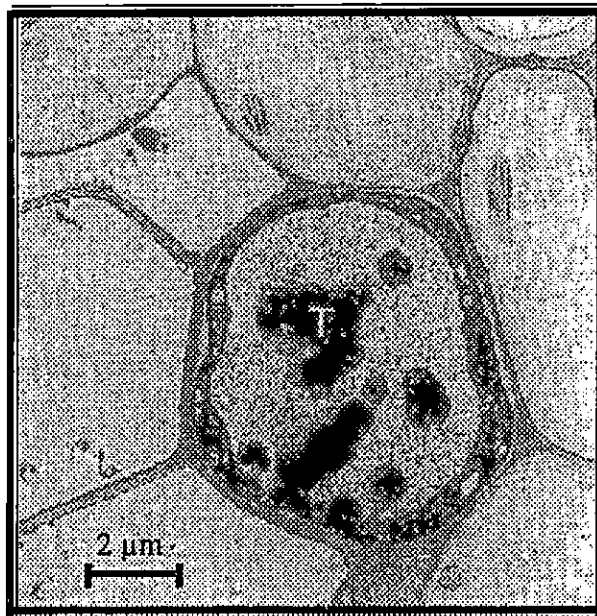


Figure 1 : Cellule à tanins observée au microscope électronique (d'après PELLEGRINI et PELLIGRINI, 1993).

phénoliques, en particulier des tanins (PHOUPAS, 1962 *in* CUNY, 1993 ; KUO et MC COMB, 1989 *in* CUNY, 1993 ; PELLEGRINI *et al.*, 1992, 1993). Elles semblent surtout présentes dans les feuilles où le métabolisme est le plus actif ; à savoir les jeunes feuilles en cours de croissance (CARIELLO et ZANETTI, 1979). Elles sont considérées comme étant des indicateurs de stress de la plante (PERGENT-MARTINI *et al.*, 1993) ; leur multiplication traduirait donc une réaction de défense de la plante (de VILLELE, 1992).

1-2- Les composés phénoliques : définition, répartition, synthèse et rôle

On regroupe sous le terme de composés phénoliques une grande variété de composés chimiques qui ont pour caractéristique commune de posséder un ou plusieurs noyaux aromatiques, substitués par un ou plusieurs groupements hydroxyles ou dérivés (notamment métoxyles) et une chaîne latérale à 1, 2 ou 3 carbones.

Les composés phénoliques sont largement répandus dans le monde végétal (POLONOVSKI *et al.*, 1941; BIOLEY *et al.*, 1987 ; CUNY, 1993). Mais leur nature varie considérablement suivant le phylum considéré. Ce sont les plantes vasculaires (Ptéridophytes, Gymnospermes et Angiospermes) qui renferment la plus grande variété de ces composés phénoliques (HARBORNE, 1989 *in* CUNY, 1993). Ils sont caractérisés par une répartition quantitative et qualitative très inégale selon les espèces considérées, les organes, les tissus, les stades physiologiques et les conditions de croissance (LEVIN, 1971 *in* FERRAT, 1998). On trouve par exemple des Anthocyanes (flavonoïdes), qui sont des pigments hydrosolubles responsables, pour la plus grande part, des colorations rouges, bleues et violettes de beaucoup de fleurs et de fruits (MARKHAM, 1982; RIBEREAU-GAYON, 1968).

Les composés phénoliques sont relativement toxiques, ils sont donc rarement à l'état libre dans le cytoplasme des cellules végétales et sont souvent sous forme combinée ou polymérisée. Les combinaisons se font généralement sous forme d'hétérosides ou d'esters simples, mais aussi avec des terpènes, des lipides, des acides organiques ou des composés aminés (RIBEREAU-GAYON, 1968). Ainsi combinés ils perdraient leur toxicité vis-à-vis de la plante qui les produit (CUNY, 1993).

Les formes polymérisées sont les plus abondantes, ce sont par ordre d'abondance : les lignines (DESCHAMPS, 1989 *in* CUNY, 1993) qui correspondent à la partie non glucidique des

généralement concentrés dans les écorces, les galles ou les feuilles des plantes ligneuses (DESCHAMPS, 1989 *in* CUNY, 1993). On distingue deux groupes de tanins :

- les tanins hydrolysables : gallotanins et ellagotanins qui sont respectivement des polymères d'esters d'acide gallique et d'acide ellagique avec un sucre (majoritairement du glucose).
- et les tanins condensés qui sont des polymères complexes de flavonoïdes (flavanes) (RIBEREAU-GAYON, 1968).

Plus de 220 composés phénoliques ont été décrits chez les organismes marins (bactéries, éponges, coelentérés, annélides, échinodermes, algues et phanérogames marines). Ils ont pour caractéristique principale d'être substitués par des groupements halogénés, et notamment par le brome (BAKUS *et al.*, 1986 *in* CUNY, 1993).

Chez les algues, ce sont les composés phénoliques des Fucophyceae qui sont les mieux connus. On y trouve des iodo et bromophénols, mais surtout des polyphloroglucinols (MC LACHLAN *et al.*, 1996 ; RAGAN et GLOMBITZA, 1986). Les polyphloroglucinols, qui sont des polymères du phloroglucinol (1, 3, 5 - trihydroxybenzène), sont des analogues des tanins des végétaux terrestres (STEINBERG, 1992 *in* CUNY, 1993). Ils peuvent représenter 15 à 20 % du poids sec des algues (RAGAN et GLOMBITZA, 1986).

En ce qui concerne les phanérogames marines, les quelques études menées à ce jour montrent que les acides phénoliques qu'on y trouve sont aussi largement distribués chez les Angiospermes terrestres (ZAPATA et MC MILLAN, 1979 *in* CUNY). Il semble cependant qu'il puisse exister des différences quantitatives pour certains composés. Ainsi, ZAPATA et MC MILLAN (1979, *in* CUNY, 1993) ont trouvé de l'acide gallique en plus grande quantité chez les phanérogames marines que ce qui a été observé chez un grand nombre de plantes provenant de la partie centrale du Texas (E. U.).

Les composés phénoliques sont majoritairement synthétisés par deux voies biosynthétiques : la voie de l'acide shikimique et la voie acétate (RIBEREAU-GAYON, 1968; BIOLEY *et al.*, 1987 ; HELLER et FORKMAN, 1993) (Figure 2).

■ **La voie de l'acide shikimique** : C'est la formation des métabolites secondaires à partir des glucides, cette voie représente le principal mode d'accumulation des phénols dans les plantes, c'est en particulier par ce mécanisme que sont formés les acides aminés aromatiques c'est-à-

des acides benzoïques (acide gallique, protocatéchique, salicylique...) d'une part, et de la phénylalanine et la tyrosine d'autre part. La désamination de ces deux derniers, par l'intervention de la Phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et de la Tyrosine ammonia-lyase (TAL) permet la synthèse de l'acide cinnamique. Les coumarines dérivent des acides cinnamiques par cyclisation. La réduction de ces acides conduit à l'alcool coniférulique, qui est un précurseur important des lignines.

■ **La voie de l'acétate malonate** : C'est la formation des acides phénols et des autres composés phénoliques à partir d'unité acétate, qui par C-acylation Co A, va aboutir à la formation de chaînes polycétoniques qui vont se cycliser pour former les flavonoïdes. Cette voie s'apparente à la biosynthèse des acides gras. L'acétyl-Co enzyme A subit d'abord une carboxylation qui le transforme en malonyl Co enzyme A (acide malonique), qui par la suite se condense en trois unités qui se lie à l'acide para - coumaroyl formant ainsi un composé appelé chalcone à noyau phloroglucinol qui est l'unité de départ de la synthèse des flavonoïdes. Ces derniers vont donner des isoflavonoïdes d'une part, et des tanins condensés d'autres part.

Les composés phénoliques sont classés en trois grandes familles par **RIBEREAU-GAYON (1968)** (Tableau 1) :

- * **Les familles des composés phénoliques largement répandus** (acides-phénols et flavonoïdes)
- * **Les familles des composés phénoliques peu répandus** (phénols simples, benzaldehydes, acetophénones, acides cinnamiques, benzophénones, ...).
- * **Les composés phénoliques présents dans la nature sous-forme de polymères** (tanins et lignines).

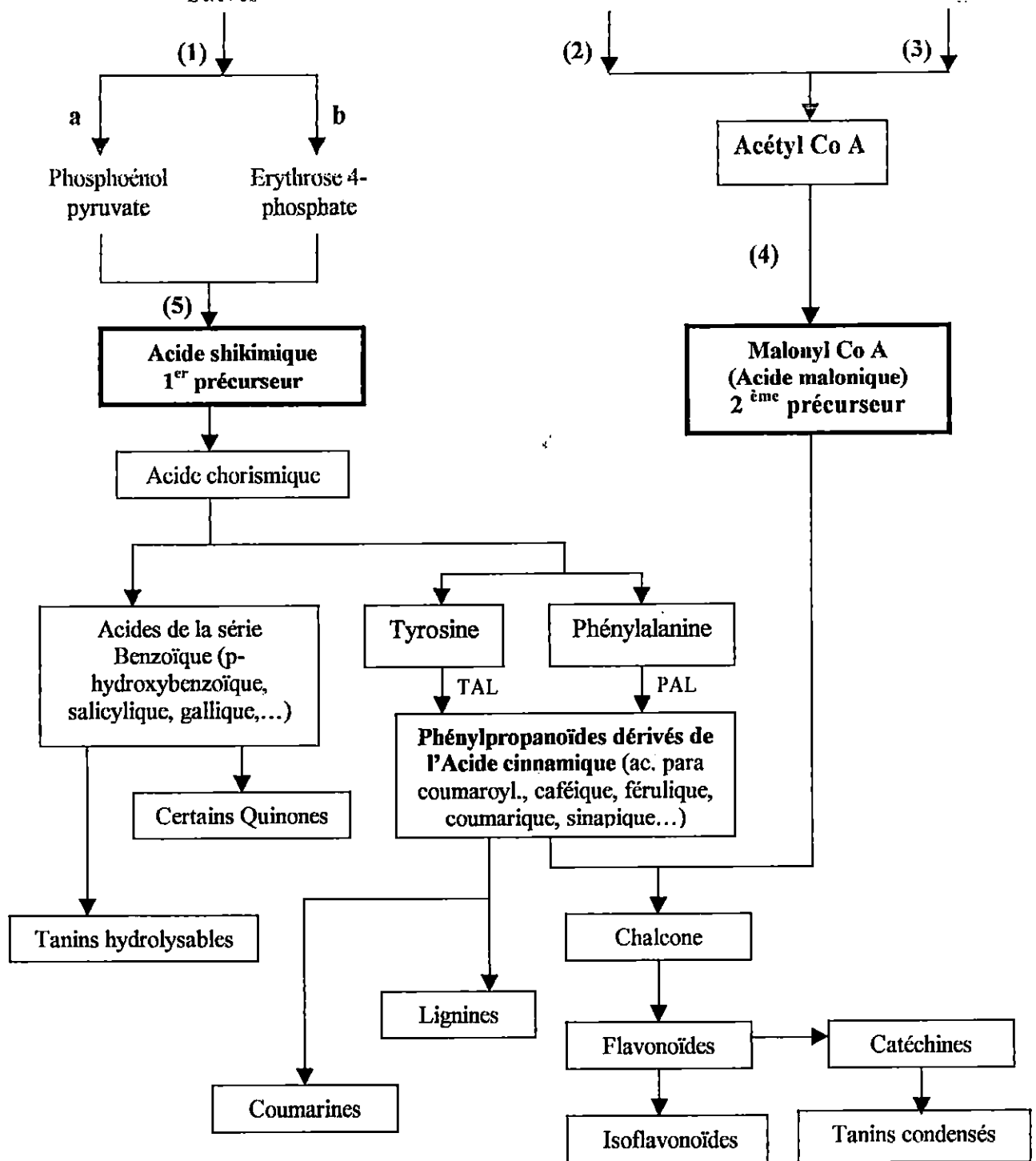


Figure 2: Les différentes voies métaboliques des composés phénoliques (synthèse à partir des travaux de MARKHAM, 1982 et de BIOLEY *et al.*, 1987).

(1) : a- Glycolyse ; b- voie des pentoses phosphates.

(2) : Transamination, désamination et oxydation.

(3) : β - oxydation.

(4) : Voie de l'acétate malonate.

(5) : Voie de l'acide shikimique.

PAL : Phényl Alanine ammonia-lyase.

TAL : Tyrosine ammonia-lyase.

Famille	Classe	Noms usuels des composés phénoliques	Nombre de carbone	Structure de base
COMPOSES PHENOLIQUES PEU REPANDUS	Phénols simples	Phénols Pyrocatechol Phloroglucinol Pyrogallol	6	C6
	Benzaldéhydes	Protochaldéhyde Hydroxy-4 benzaldéhyde Vanilline Siringaldéhyde	7	C6-C1
	Acétophénone	Hydroxy-4 acétophénone Acétovanillone Acétosyringone	8	C6-C2
COMPOSES PHENOLIQUES LARGEMENT REPANDUS	Acides benzoïques	Acide gallique Acide protocatechique Acide benzoïque Acide hydroxy-4 benzoïque Acide vanillique Acide syringique Acide p- anisique	8	C6-C2
	Acides cinnamiques	Acide caféique Acide cinnamique Acide p - coumarique Acide férulique Acide sinapique Acide cinnamique	9	C6-C3

Les composés phénoliques des végétaux n'ont aucun rôle primaire dans le métabolisme de la plante qui les produits (LEVIN, 1971 *in* FERRAT, 1998). Ils sont généralement considérés comme des métabolites secondaires (BIOLEY *et al.*, 1987 ; SCEHOVIC, 1990 *in* CUNY, 1993). Ce sont des composés d'une grande diversité structurale et à cette diversité structurale est associée une grande variété de rôles biologiques et écologiques.

Les acides phénols contribuent aux mécanismes de résistance aux maladies : inhibition de la croissance des microalgues et de bactéries (HARRISSON, 1982 *in* CUNY, 1993).

Les tanins ont souvent été interprétés comme étant des substances défensives des algues brunes contre les herbivores (RAGAN et GLAMBITZA, 1986). L'étude des défenses chimiques, et des tanins en particulier, a d'ailleurs eu un rôle non négligeable dans le développement des théories sur les interactions entre plantes et herbivores, aussi bien en milieu terrestre (HAUKIOJA, 1980 *in* CUNY, 1993) qu'en milieu marin (QUAKENBUSH *et al.*, 1986), où les polyphénols algaux auraient un rôle similaire aux tanins des plantes vasculaires.

(**BIOLEY et al., 1987 ; RAGAN et GLAMBITZA, 1986**) :

- activités antibiotiques et antifongiques ;
- activités antialgales et antilarvaires ;
- rôle dans les mécanismes de détoxification des métaux lourds ;
- rôle dans la cicatrisation et la limitation des infections suite à une blessure.

Les acides phénoliques et les tanins seraient impliqués dans les résistance contre les phytopathogènes (**BIOLEY et al., 1987**). Ils sont également impliqués dans la réponse de la plante à des stress environnementaux tels que le déficit en nutriments (**CHALKER-SCOTT et FUCHIGAMI, 1989**) ou les compétitions intra ou interspécifiques (**MC LACHLAN et CRAIGIE, 1966**).

On peut aussi évoquer le rôle des composés phénoliques dans le recyclage de la matière végétale. Des teneurs élevées en composés phénoliques ralentissent en effet les processus de dégradation des débris végétaux : soit en limitant la biodégradabilité des polysaccharides des parois cellulaires végétales (**DESCHAMPS, 1989 in CUNY, 1993**), soit par leur action inhibitrice ou/et limitante sur l'activité des détritivores (**HARRISSON, 1982 in CUNY, 1993**). Les tanins sont par exemple susceptibles d'inhiber le processus de nitrification par les bactéries nitrifiantes (**RICE et PANCHOLY, 1973 in CUNY, 1993**).

Il convient néanmoins, de nuancer le rôle des composés phénoliques. En effet, leur activité dépend souvent des conditions physico-chimiques du milieu, de leur concentration et de leur nature. Certains d'entre eux peuvent aussi agir favorablement sur la croissance de certaines bactéries (**CARIELLO et ZENATTI, 1979**).

**Matériel
et
méthodes**

2- Matériel et méthodes

2-1- Choix et localisation des sites d'étude

Afin d'établir une relation entre la production en composés phénoliques et l'abondance des cellules à tanins chez *Posidonia oceanica* et le niveau d'anthropisation, deux sites soumis à des conditions environnementales différentes ont été choisis (Figure 3). Le premier, Tamentfoust, situé dans la baie d'Alger, est soumis à de fortes influences anthropiques (SELLALI *et al.*, 1999) et où l'herbier a particulièrement régressé (SEMROUD, 1993). Le second, l'anse de Kouâli, situé dans la partie occidentale de la baie de Bou Ismaïl, est considéré comme zone de référence, en atteste la présence d'un récif-barrière (BOUMAZA, 1995 ; AMAROUCHE, *sous presse*).

2-1-1- Tamentfoust

Dans la baie d'Alger et sur son flanc Est se situe Tamentfoust (36° 48.30' Nord ; 3°14.15' Est). C'est une zone semi-fermée, de mode calme et bien protégée des vents dominants Est et Nord-Est (SEMROUD, 1993). Elle borde un village de quelques milliers d'habitants dont la population augmente en période estivale. La station est soumise à divers types de pollutions : (i) activités plaisancières et portuaires (port de pêche), (ii) apports terrigènes assez importants qui se font par les crues de l'oued El Hamiz (Automne-Hiver), (iii) rejets d'un égout charriants des matières particulières d'origine domestique ne subissant aucun traitement préalable avant leurs déversements (SEMROUD, 1993).

L'herbier à *Posidonia oceanica* de la station de Tamentfoust est très clairsemé, sa densité moyenne est de l'ordre de 275 faisceaux par m² et présente une vitalité moyenne (SEMROUD, 1993). Sa limite inférieure de type régressif est située à environ 10 m de profondeur, attestant de la forte turbidité du milieu.

2-1-2- L'anse de Kouâli

L'anse de Kouâli est située dans la baie de Bou Ismaïl à environ 70 Km à l'Ouest d'Alger (36° 35.50' Nord ; 2° 29.20' Est) ; elle est délimitée à l'Ouest par le village touristique CET de Tipaza. Elle est l'une des plus abritées de toutes les criques et anses situées dans la baie de Bou Ismaïl et ce, en raison de la présence d'un goulet qui isole le fond est protégé ce dernier de la houle venant du Nord. L'anse de Kouâli occupe une surface de 5 Km² (SEGUENI et NACEUR, 1996), sa plage se trouve encastrée et limitée à son ouverture par deux appointements de grès calcaire qui sont protégés par des trottoirs à *Vermetus cristatus*.

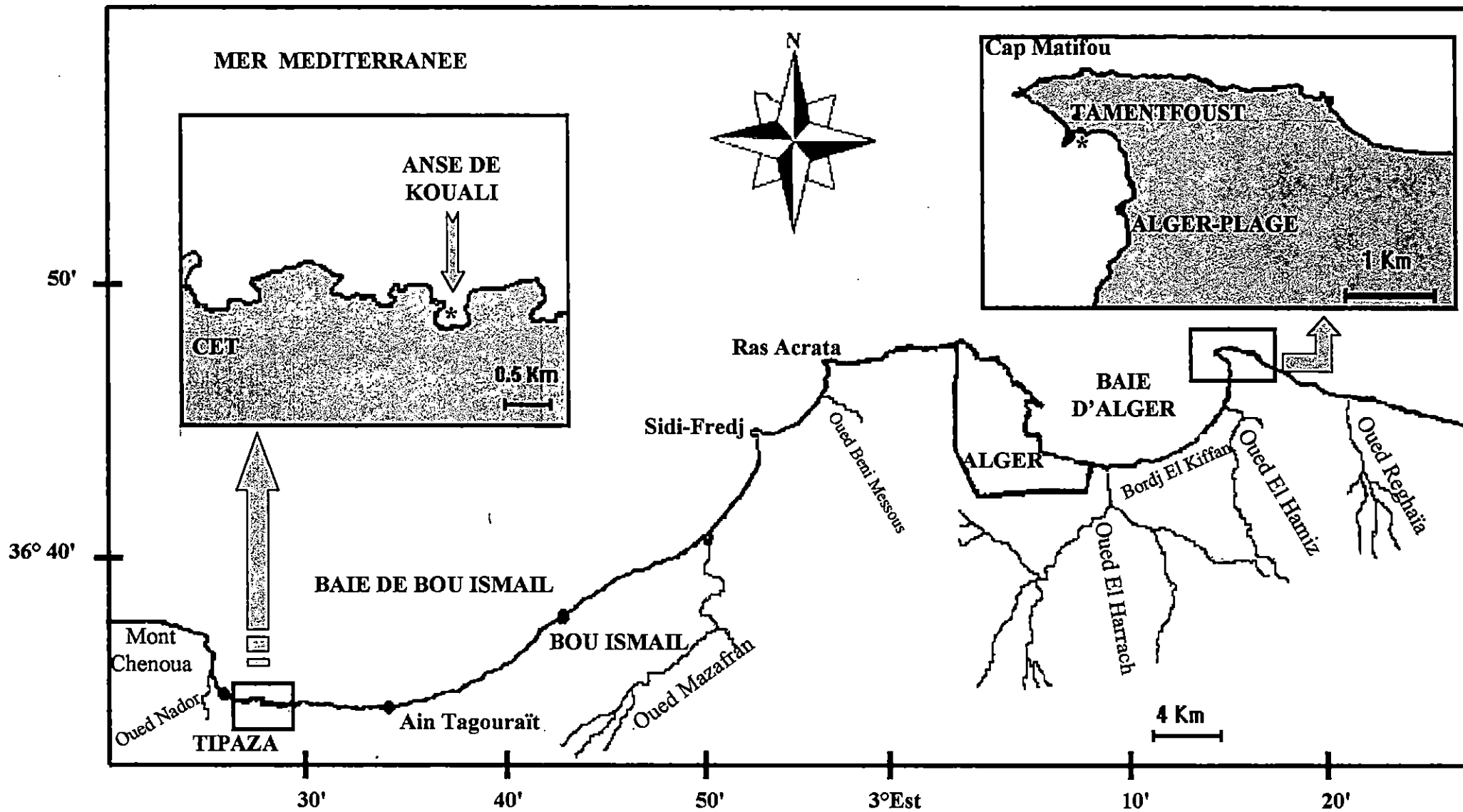


Figure 3 : Localisation des stations de prélèvements (*).

Cette station est caractérisée par la présence d'un récif-barrière qui se continue vers le large par un herbier très prospère, dont la limite inférieure est située à 20 m de profondeur. La surface occupée par l'herbier à *Posidonia oceanica* représente environ 65% de la surface totale de l'anse (BOUMAZA,1995).

2-2- Prélèvement et transport des échantillons

Les prélèvements des faisceaux de *Posidonia oceanica* sont effectués en scaphandre autonome à une profondeur constante de 5 m pour les deux stations, afin de s'affranchir d'une éventuelle variation de la teneur en composés phénoliques imputable à la profondeur.

Trente faisceaux ont été prélevés aléatoirement dans chaque station : le 02 Mai pour l'anse de Kouâli et le 08 Juillet pour la station de Tamentfoust (2001).

Les faisceaux sont ensuite transportés à l'obscurité dans des glacières garnies de blocs réfrigérants (température de 6°C), cette précaution est prise afin de maintenir les faisceaux prélevés en bonne état, jusqu'au laboratoire.

2-3- Tri et conditionnement des échantillons

Une fois au laboratoire, le tri est réalisé sur le matériel frais. Toutefois, une conservation au réfrigérateur (température de 4°C) est possible, mais celle-ci ne doit pas excéder les vingt quatre heures afin d'éviter toute perte de composés phénoliques (RAGAN et CRAIGIE, 1978). Par contre, la conservation par congélation est fortement déconseillée, car de très basses températures peuvent entraîner, d'une part, une perte de composés phénoliques (jusqu'à 80 %), d'autre part, la production d'éthane et le brunissement, signe de l'oxydation des composés phénoliques (CHALKER-SCOTT *et al.*, 1989).

Les faisceaux prélevés sont répartis en dix lots de trois faisceaux chacun. Au sein de chaque lot, les feuilles sont séparées en trois catégories en fonction de leur âge, selon le protocole de GIRAUD (1977) (Figure 4) :

- Les "feuilles adultes" d'une longueur supérieure à 50 mm et présentant un pétiole d'une longueur supérieure ou égale à 2 mm.
- Les "feuilles intermédiaires" d'une longueur supérieure à 50 mm et dépourvues de pétiole d'une longueur supérieure ou égale à 2 mm.
- Les "feuilles juvéniles" d'une longueur inférieure ou égale à 50 mm (ne sont pas prises en considération dans cette étude).

Les pétioles (ou bases) ayant une nature de tissu différente de celle des limbes des feuilles adultes sont séparés de ces dernières, ils seront analysés séparément.

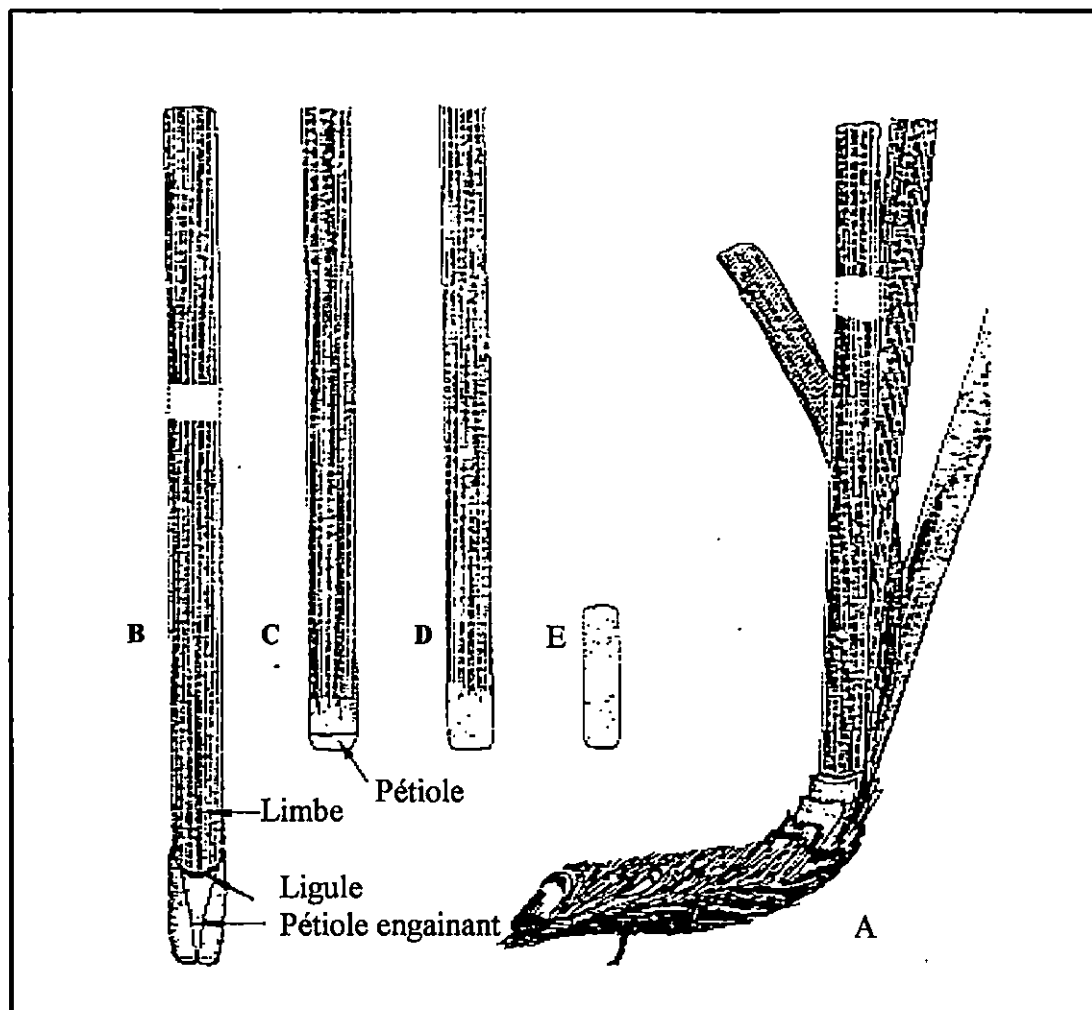


Figure 4 : *Posidonia oceanica* : rhizome et faisceau (A). Les différents types de feuilles : feuilles adultes (B), intermédiaires (C et D) et les feuilles juvéniles (E), (d'après BOUDOURESQUE et MEINESZ, 1982).

Les feuilles ainsi triées sont ensuite raclées soigneusement à l'aide d'une lame de rasoir afin d'éliminer les épiphytes, puis séchées à l'aide de papier absorbant et découpées en petits morceaux avec des ciseaux.

Après une congélation rapide d'une heure, les échantillons sont lyophilisés (-40°C , -1 mbar ; type du lyophilisateur : EDWARDS, MODULYO 4) pendant quarante huit heures, puis pesés. Les poids secs obtenus sont variables : de 2 à 4 g pour les feuilles adultes et intermédiaires, et de 0.5 à 1 g pour les bases. Cette variation du poids sec est également fonction du site ; en effet, les longueurs des feuilles de *Posidonia oceanica* de l'herbier de Tamentfoust sont moins importants que celles enregistrées à l'anse de Kouâli (BOUMAZA, 1995).

Les échantillons ainsi conditionnés, sont alors conservés à l'abri de l'humidité et à l'obscurité jusqu'à l'extraction.

2-4- Analyse des composés phénoliques

2-4-1- Protocole d'extraction

Le protocole utilisé pour l'extraction des composés phénoliques chez *Posidonia oceanica* est celui adopté par CUNY (1993) et AGOSTINI (1996). Le détail du protocole est présenté dans la figure 5.

- L'extraction des composés phénoliques est réalisée par infusion au bain-marie des feuilles dans du méthanol aqueux dans une colonne à reflux. En effet, l'extraction à l'alcool est préconisée car la majorité des composés phénoliques (exceptés les composés phénoliques liés à des protéines ou à des sucres non hydrosolubles) peuvent être extraits avec du méthanol ou de l'éthanol. Cette méthode d'extraction serait « la plus efficace, la plus reproductible, la plus fiable et la moins destructrice » et permet d'éviter une trop grande contamination par les substances lipidiques et une estérification partielle des composés phénoliques (VAN SUMERE, 1989 in CUNY,1993).
- Après filtration sur papier filtre whatman, nous procédons à l'évaporation totale du méthanol au Rotavapor, suivie d'une acidification (quelques gouttes de HCl) pour une meilleure extraction des composés phénoliques à l'acétate d'éthyle, qui constitue un excellent solvant (RAGAN et CRAIGIE, 1978).
- La phase organique (acétate d'éthyle + composés phénoliques) est récupérée, centrifugée puis séchée de toute trace d'eau avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) et mise au frais pendant une nuit (RAGAN et CRAIGIE, 1978). Elle est ensuite récupérée après filtration sur papier whatman pour éliminer le sulfate de sodium anhydre qui se dépose au fond du flacon.
- L'évaporation de l'acétate d'éthyle au Rotavapor n'est pas totale, elle est stoppée dès que le volume atteint 5 ml, afin d'éviter une éventuelle perte des composés phénoliques qui sont thermolabiles. L'évaporation est ensuite achevée par séchage sous jet d'azote jusqu'à l'obtention d'un résidu sec qui est repris dans 1 ml de méthanol dans des ampoules ambrées à sceller. Les échantillons, au nombre de soixante sont conservés au réfrigérateur, jusqu'à leur analyse.

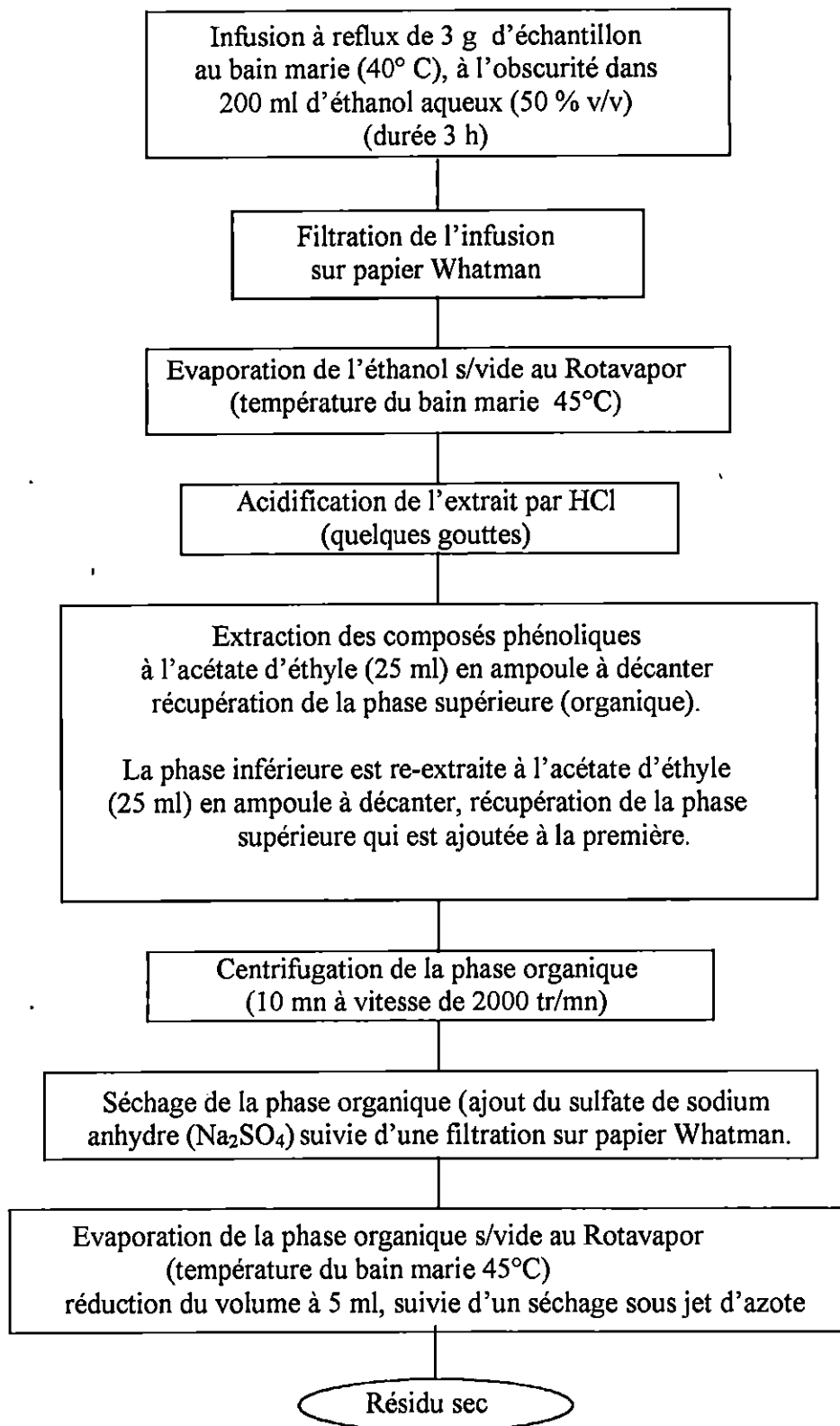


Figure 5 : Protocole d'extraction des composés phénoliques (d'après CUNY, 1993 et AGOSTINI, 1996).

2-4-2- Techniques d'analyse

Les composés phénoliques présents dans les tissus de *Posidonia oceanica* peuvent être analysés par plusieurs méthodes : Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC), Spectrophotométrie UV/visible, Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (CUNY, 1993 ; AGOSTINI, 1996 ; FERRAT, 1998). Seule la spectrophotométrie UV/visible (méthode colorimétrique) sera utilisée dans ce travail.

2-4-2-1- Méthode colorimétrique de dosage des phénols totaux

Le principe du dosage des composés phénoliques par spectrophotométrie UV/visible est basé sur l'emploi du réactif de Folin-Denis, qui en pH basique se combine avec les composés phénoliques pour donner une coloration bleue (FOLIN et DENIS, 1915). Cette méthode a déjà été utilisée pour *Posidonia oceanica* par FRANTZIS (1992) in FERRAT (1998) et FERRAT (1998). Le protocole d'analyse est présenté dans la figure 6.

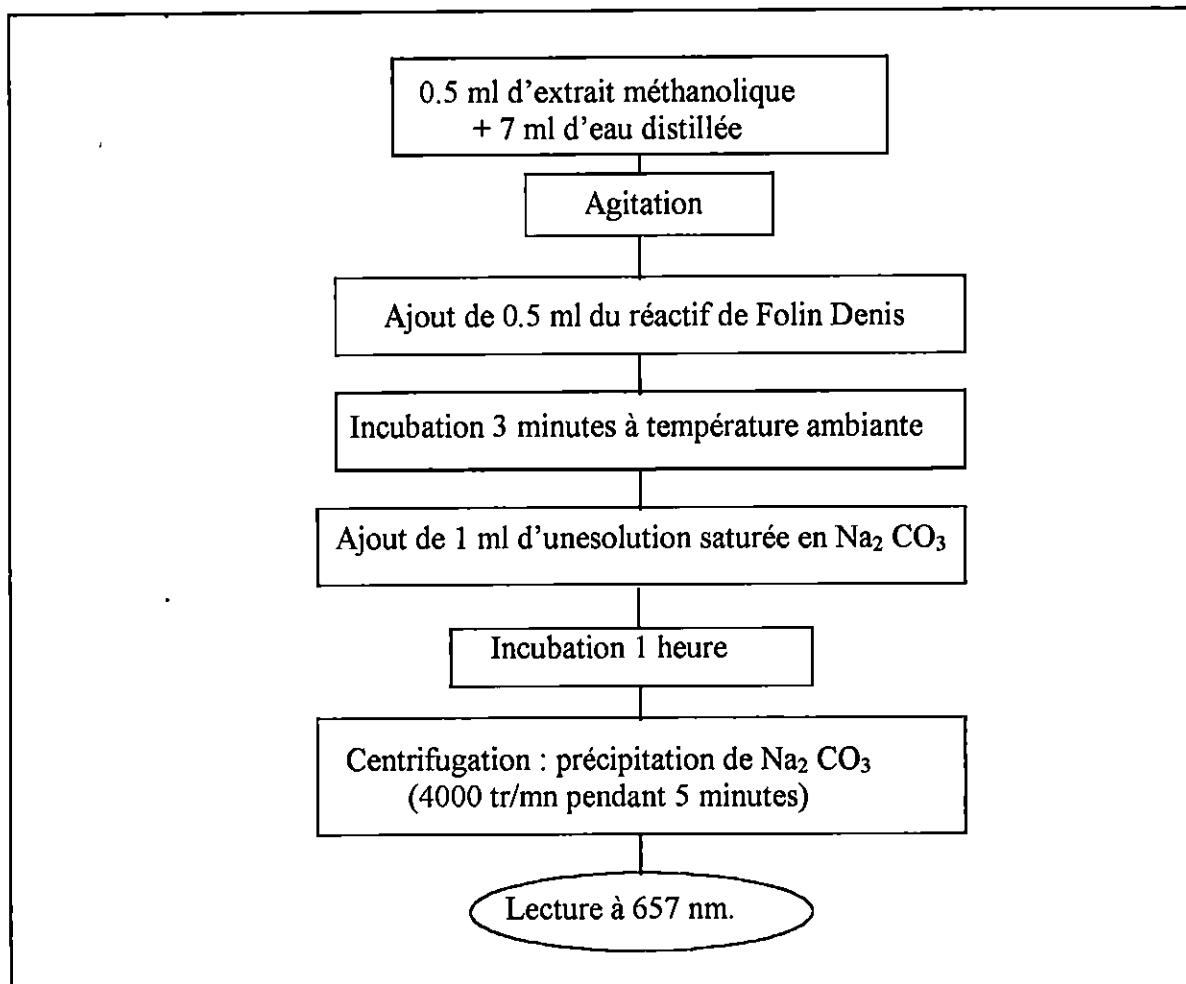


Figure 6 : Protocole de dosage des composés phénoliques (d'après FRANTZIS, 1992 in FERRAT, 1998).

2-4-2-2- Principe de la spectrophotométrie UV/visible

Une source émet un faisceau de lumière qui traverse une épaisseur déterminée de la solution colorée à analyser. On détermine l'absorption de lumière qui est en relation avec la concentration de la substance absorbante (CHARLOT et BEZIER, 1949). La lumière arrivant sur un échantillon peut être transmise, réfléchiée, diffusée ou absorbée. La loi de Beer-Lambert ne concerne que la fraction absorbée .

$$\text{Absorbance} = \text{Densité optique} = \log I/I_0 = -KLC$$

Où :

I_0 : Intensité lumineuse incidente.

I : Intensité lumineuse transmise.

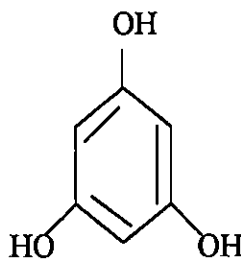
K : coefficient d'extinction molaire ou moléculaire .

L : Longueur du trajet optique (épaisseur du milieu absorbant).

C : Concentration du milieu absorbant.

2-4-2-3- Etalonnage du spectrophotomètre UV/visible

Afin de calibrer le spectrophotomètre (marque HITACHI, modèle U-2001), nous procédons à la préparation d'une gamme de solutions de concentrations connues du composé à doser ; elle est soumise au même traitement que l'échantillon. Le phloroglucinol est utilisé comme standard dans la préparation de la gamme étalon (RAGAN et CRAIGIE, 1978). La gamme utilisée est : 0.3, 0.6, 2, 4, 6, 8 et 12 μg de phloroglucinol anhydre équivalent par millilitre.



Trihydroxy-1,3,5-benzène

Cette gamme nous permet d'obtenir une courbe d'étalonnage de type :

$$y = ax + b$$

où :

y : absorbance (densité optique).

x : concentration en $\mu\text{g} / \text{ml}$.

a : pente de la droite

b : l'ordonnée à l'origine (le blanc standard)

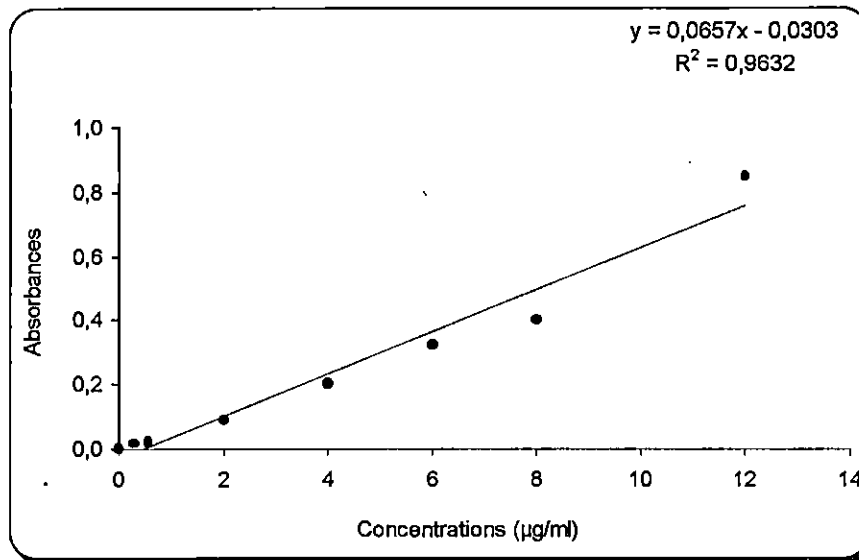


Figure 7 : Courbe d'étalonnage du spectrophotomètre UV/visible.

L'équation de la droite de régression ($y = 0.0657 x - 0.0303$) nous permet de calculer la concentration en mg/ml des phénols totaux présents dans nos extraits. Ces concentrations sont ensuite rapportées au poids sec en utilisant l'expression suivante :

$$C = \frac{(C_e - C_b) \times V_f \times F}{P_s}$$

où

C : concentration de l'échantillon (mg/g).

C_e : concentration de l'échantillon (mg/ml).

C_b : concentration du blanc échantillon (mg/ml).

Vf : volume final de dilution (ml).

Ps : poids sec (lyophilisé) (gramme).

F : facteur de dilution ($F = \text{volume de dilution (ml)} / \text{volume extrait (ml)}$).

2-5- Comptage des cellules à tanins

Le comptage des cellules à tanins a été effectué afin de mettre une éventuelle relation entre la teneur en composés phénoliques et le nombre de ces cellules d'une part, et d'autre part, l'abondance de ces cellules en fonction du niveau d'anthropisation. En effet, les cellules à tanins de *Posidonia oceanica* sont des cellules riches en composés phénoliques et particulièrement en acide chicorique (CARIELLO et ZANETTI, 1979).

Pour le comptage des cellules à tanins, des faisceaux ont été prélevés dans chaque station à 5 m de profondeur, le 02 Mai pour l'anse de kouâli (11 faisceaux) et le 08 Juillet pour Tamentfoust (4 faisceaux) et sont conservés dans de l'alcool absolu. Une fois les faisceaux disséqués, seules les feuilles intermédiaires possédant encore leur apex (feuilles entières) sont retenues ; ce choix est dicté par le fait que leur métabolisme y est le plus actif (CARIELLO et ZANETTI, 1979).

Le protocole utilisé pour le dénombrement des cellules à tanins est celui adopté par FERRAT (1998). Sur chaque feuille intermédiaire, 3 fines coupes transversales sont réalisées à 1 cm de l'apex. Après une décoloration rapide des coupes (quelques secondes) dans l'eau de Javel pure commerciale, le comptage est réalisé sous microscope optique (marque ZEISS) (préalablement étalonné) au grossissement $\times 40$. On relève pour chaque coupe l'épaisseur et la largeur de la feuille afin de rapporter le nombre de cellules au mm^2 .

2-6- Analyses statistiques utilisées

Les variations de la teneur en phénols et l'abondance des cellules à tanins sont testées à l'aide de tests non paramétriques : le test de MANN-WHITNEY (cas d'une comparaison entre deux populations) et le test de KRUSKAL-WALLIS (cas d'une comparaison entre trois populations). Les tests non paramétriques sont utilisés lorsque les conditions d'application de l'analyse de variance ne sont pas remplies : la normalité des distributions et l'homogénéité des variances (DAGNELIE, 1975).

2-6-1- Test de MANN-WHITNEY

Le test de MANN-WHITNEY est un test non paramétrique visant à tester l'égalité de deux populations. La statistique de MANN-WHITNEY, notée U, est définie comme étant le

nombre total de fois qu'un élément du premier groupe précède un élément du second groupe dans la classification par ordre croissant de n observations (DODGE, 1993).

L'hypothèse nulle (H_0) d'identité des deux populations est rejetée si U calculé est supérieur à la valeur donnée par la table de MANN-WHITNEY à 5 %.

2-6-2- Test de KRUSKAL-WALLIS

Le test de KRUSKAL-WALLIS est un test non paramétrique visant à déterminer si K populations sont toutes identiques ou si au moins une des populations tend à fournir des observations différentes des autres populations (DODGE, 1993).

Les observations sont classées par ordre croissant sans tenir compte de l'appartenance aux échantillons ; un rang est attribué à chaque observation.

La distribution du test est celle d'un χ^2 avec comme degré de liberté $DDL = p - 1$ (p étant le nombre d'échantillon).

$$\chi^2_{\text{obs}} = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^n \frac{Y_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

où :

n : Effectif total des i échantillons.

Y_i : somme des rangs dans l'échantillon i .

Ensuite le χ^2_{obs} est comparé à la valeur χ^2 théorique donnée par la table de PEARSON et HARTLEY (1966).

L'hypothèse nulle (H_0) d'identité des deux populations est rejetée si la valeur calculée est supérieure à celle donnée par la table du χ^2 à 5 % correspondant au nombre de degrés de liberté.

Les calculs ont été faits manuellement et à l'aide du logiciel Epi Info (version 5.01).

Résultats et discussion

3- Résultats et discussion

3-1- Variation de la teneur en phénols totaux

3-1-1- Variation en fonction du tissu foliaire

Les teneurs moyennes en phénols totaux enregistrées au niveau des différents tissus de *Posidonia oceanica* pour les stations de l'anse de Kouâli et de Tamentfoust sont présentées dans la figure 8 et le tableau 2. Les variations enregistrées entre les feuilles adultes, les feuilles intermédiaires et les bases ne montrent pas de différence significative au niveau de la station de l'anse de Kouâli (test de KRUSKAL-WALLIS, $p > 0.05$). Inversement, au niveau de la station de Tamentfoust la différence est significative (test de KRUSKAL-WALLIS, $p < 0.05$). Les résultats obtenus sont similaires à ceux relevés dans la littérature où généralement la teneur en composés phénoliques diminue avec l'âge des feuilles (CARIELLO et ZANETTI, 1979). C'est donc dans les feuilles intermédiaires de *Posidonia oceanica* que la teneur en composés phénoliques est la plus élevée, et c'est dans cette catégorie de tissu que le métabolisme est d'ailleurs le plus actif (CARIELLO et ZANETTI, 1979). Il semblerait par conséquent que la synthèse des composés phénoliques suit le même rythme que l'activité métabolique des tissus foliaires, ce qui a également été avancé par CUNY (1993). Par contre, AGOSTINI (1996) et FERRAT (1998) trouvent des résultats variables en fonction des stations étudiées, mais d'une manière générale les feuilles intermédiaires présentent des teneurs plus élevées en phénols totaux.

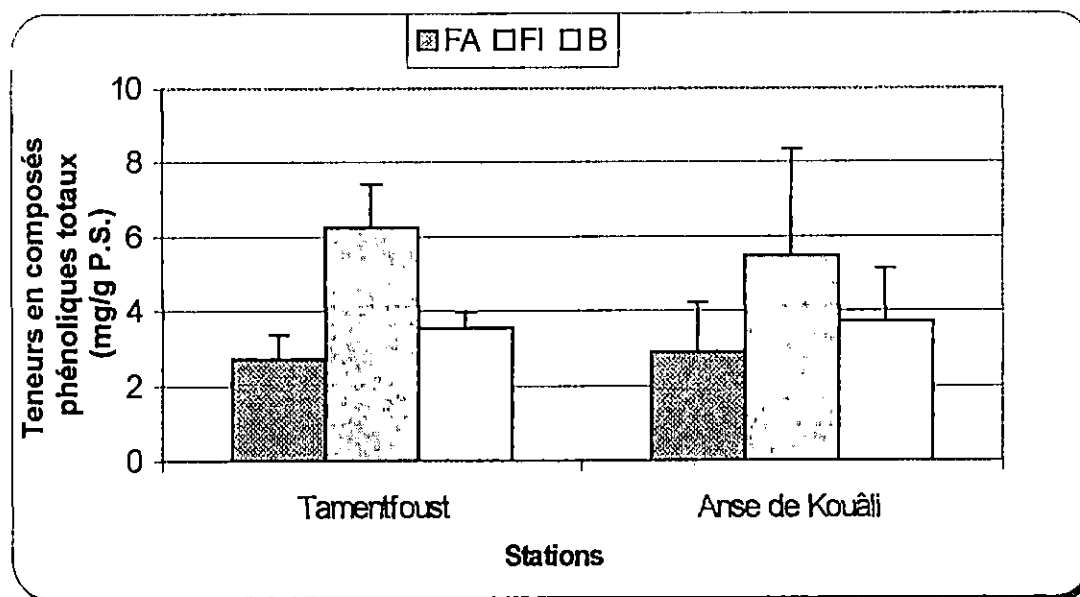


Figure 8 : Les teneurs moyennes en phénols totaux (mg/g P.S.) (\pm intervalle de confiance 95%) pour les différents tissus de *Posidonia oceanica*.

Quant aux teneurs enregistrées au niveau des différents tissus de *Posidonia oceanica* comparées à celles relevées dans la littérature celles-ci sont toujours plus faibles. Cette différence pourrait s'expliquer par une différence du niveau d'anthropisation des sites puisqu'il est démontré qu'un stress environnemental peut-être à l'origine d'une forte production des composés phénoliques (CHALKER-SCOTT *et al.*, 1989). Cette production est d'autant plus intense que l'est le stress ; en effet, PERGENT (1988) atteste que la production des composés phénoliques par *Posidonia oceanica* augmente dans les zones polluées. Par ailleurs, les techniques utilisées pour le dosage des phénols totaux diffèrent d'un auteur à l'autre, ce qui pourrait être à l'origine de cette différence. En effet, FERRAT (1998) a pu montrer que les teneurs en phénols totaux obtenus par chromatographie liquide haute performance (HPLC) étaient moins élevées que celles mesurées par spectrophotométrie UV/visible. En effet, CHALKER-SCOTT *et al.* (1989) observent que l'extraction des phénols entraîne également une extraction de nombreux pigments (e.g. chlorophylle) qui peuvent interférer lors des mesures des composés phénoliques par spectrophotométrie UV/visible.

3-1-2- Variation en fonction de la station

La comparaison des teneurs en phénols totaux entre les tissus de même catégorie provenant des stations étudiées est réalisée par l'application du test de MANN- WHIYNEY. Le test montre que les teneurs enregistrées au niveau des feuilles adultes, des feuilles intermédiaires et des bases ne diffèrent pas de façon significative ($p > 0.05$).

Aussi, afin de tester l'effet de la station sur la teneur en phénols totaux chez *Posidonia oceanica*, nous avons groupé les concentrations obtenues pour les trois catégories de tissus en une seule série, et ce pour chaque site. Les teneurs moyennes obtenues sont de 4.02 ± 3.15 et de 4.28 ± 1.78 mg/g P.S., respectivement à l'anse de Kouâli et à Tamentfoust (Figure 9). Ces valeurs ne diffèrent pas de façon significative (test de MANN-WHITNEY, $p > 0.05$).

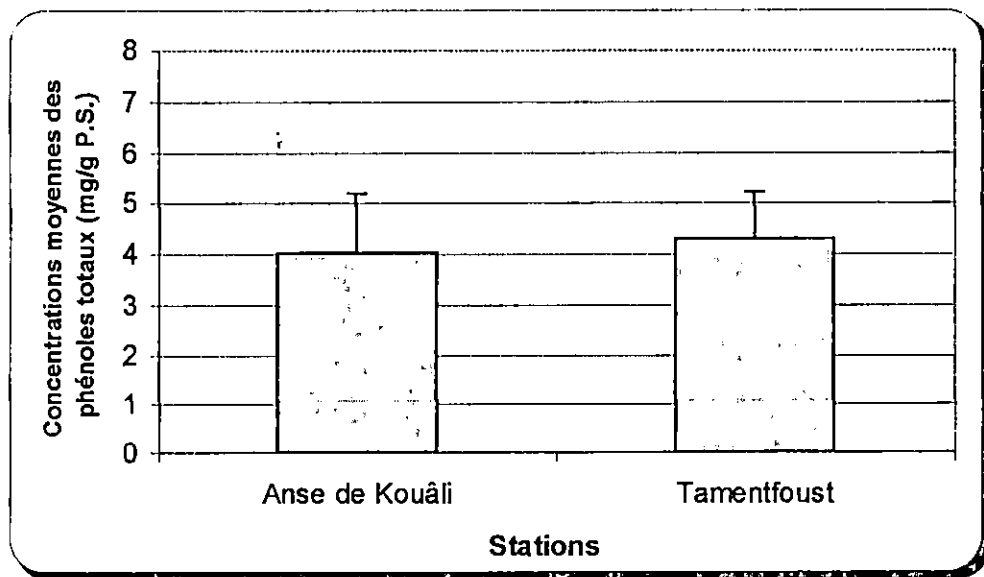


Figure 9 : Teneurs moyennes en phénols totaux (mg/g P.S.) (\pm intervalle de confiance à 95 %) en fonction des deux stations

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de CUNY *et al.* (1994) et FERRAT *et al.* (2001) qui ne montrent pas de différences significatives entre des stations où *Posidonia oceanica* subit différents niveaux de compétition avec *Caulerpa taxifolia*.

Cette similitude est cependant surprenante ; en effet, il est clairement démontré que les végétaux réagissent à un stress environnemental en augmentant la synthèse des composés phénoliques et en particulier les tanins (CHALKER-SCOTT *et al.*, 1989). Par conséquent, la réaction de *Posidonia oceanica* aux différents stress identifiés à la station de Tamentfoust (Pollutions, turbidité,...) sont de nature à provoquer une augmentation des tanins condensés (contenus dans les cellules à tanins dont le nombre a augmenté (voir paragraphe suivant), sans que nous puissions mettre en évidence ce phénomène. En effet, le protocole d'extraction utilisé ne s'applique qu'aux composés phénoliques hydrosolubles (solubles dans l'alcool). Dans les analyses à venir, il sera donc nécessaire d'extraire et de doser en plus ce type de composé.

Tableau 2 : Teneurs moyennes en phénols totaux dans les différents tissus foliaires de *Posidonia*

oceanica relevées dans la littérature pour différentes localités de la Méditerranée.

Localités et profondeur de prélèvement.	Caractéristiques du site	Concentrations mg/g P.S. par type de tissu.			Méthode d'analyse	Auteurs
		F.A.	F.I.	B.		
Tonnara (Corse) (-10 m)	Peu anthropisé	36.3	58.4	18.2	HPLC	AGOSTINI <i>et al.</i> (1998)
Livourne (Italie) (-10 m)	Rejets industriels	45.3	59.2	17.9		
Marseille (France) (-10 m)	Stress biotiques (surpâturage, épiphytisme...etc.)	17.0	28.6	17.6		
Figari (Corse) (-10 m)	Rejets aquacoles	47.6	43.4	15.0		
Nice (France) (-10 m)	compétition avec <i>C. taxifolia</i>	17.1	17.0	14.5		
Ile d'Elbe (France) (-8.5 m)	Faible compétition avec <i>C. taxifolia</i>	6.96 ± 1.17	-	-	HPLC	FERRAT <i>et al.</i> (2001)
		14.19 ± 0.62	-	-	Spectrophotométrie	
	Forte compétition avec <i>C. taxifolia</i>	4.22 ± 0.29	-	-	HPLC	
		10.63 ± 0.624	-	-	Spectrophotométrie	
Anse de Kouâli (Algerie) (-5 m)	Site de référence	2.90 ± 2.02	5.46 ± 2.28	3.73 ± 2.28	Spectrophotométrie	Ce travail (2002).
Tamentfoust (Algerie) (-5 m)	Forte anthropisation	2.72 ± 0.67	6.27 ± 1.32	3.55 ± 0.45		

F.A. : feuilles adultes ; F.I. : feuilles intermédiaires ; B. : bases.

3-2- Les cellules à tanins

Le comptage des cellules à tanins est réalisé à partir de coupes transversales effectuées à 1 cm de l'apex des feuilles intermédiaires de *Posidonia oceanica* (Figure 10).

Le nombre de cellules à tanins par mm² met en évidence des résultats différents de ceux obtenus par spectrophotométrie UV/visible. Alors, que les teneurs moyennes en composés phénoliques n'enregistrent aucune différence entre les deux stations étudiées, le nombre des cellules à tanins diffère de façon significative (test de MANN-WHITNEY $p < 0.05$). Ceci révèle que les tanins condensés (contenus dans les cellules à tanins) ne sont pas extraits par la méthode d'extraction utilisée, et échapperaient donc au dosage, ce qui rejoint le constat réalisé par CUNY (1993).

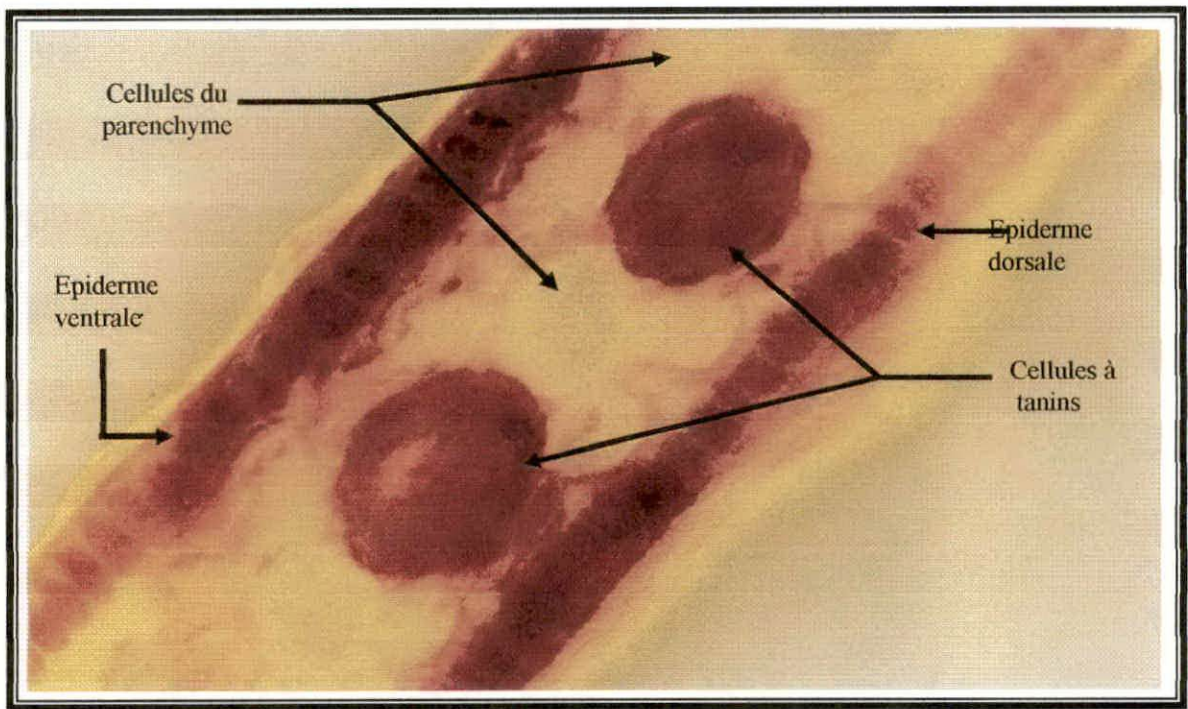


Figure 10 : Coupe transversale d'une feuille intermédiaire de *Posidonia oceanica* (G = 400).

L'herbier de la station de Tamentfoust, soumis à des influences anthropiques fortes, présente des valeurs élevées en nombre de cellules à tanins comparé à celui relevé à l'anse de Kouâli. En effet, contre 62.0 ± 23.8 cellules par mm^2 enregistrées à Tamentfoust, il n'est compté que 30.1 ± 16.1 cellules par mm^2 à l'anse de Kouâli (figure 11).

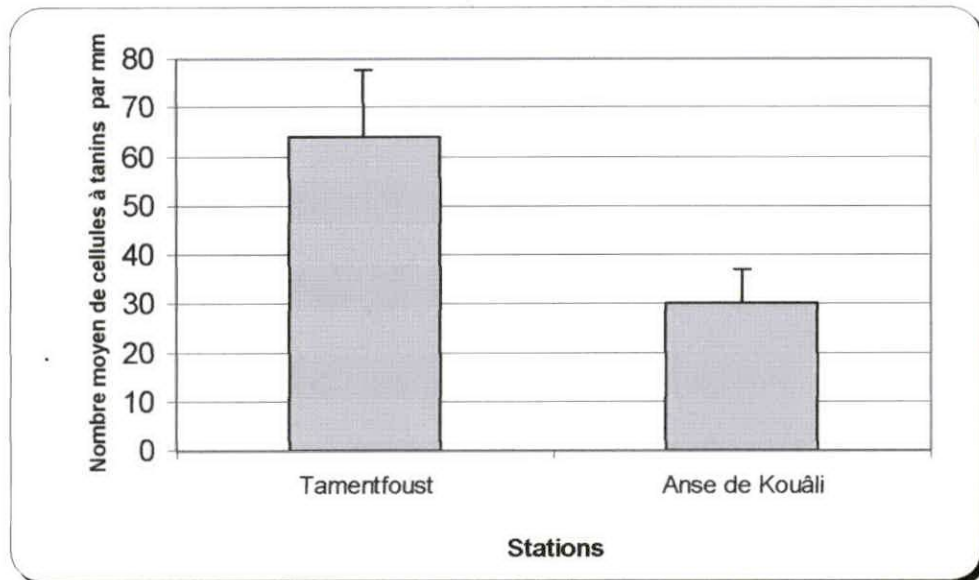


Figure 11 : Nombre moyen de cellules à tanins par mm^2 (\pm intervalle de confiance à 95%).

Les cellules à tanins sont considérées comme étant des indicateurs de stress de la plante (PERGENT-MARTINI *et al.*, 1993). Ceci est illustré par les études qui mettent en évidence l'augmentation de leur nombre en réponse à une compétition de *Posidonia oceanica* avec la Chlorophyte tropicale *Caulerpa taxifolia* (DE VILLELE, 1992 ; CUNY *et al.*, 1994 ; FERRAT *et al.*, 2001). Ces auteurs relèvent des résultats avec des différences significatives entre les stations colonisées par *Caulerpa taxifolia* et les stations de références. En effet, FERRAT *et al.* (2001) ont enregistré une différence significative entre le nombre de cellules à tanins d'un l'herbier fortement colonisé par *Caulerpa taxifolia* à l'Ile d'Elbe (37.93 ± 1.03 cellules par mm^2) et celui enregistré dans la station faiblement colonisée dans la même région (34.33 ± 1.99 cellules par mm^2), de même qu'au Cap Martin où l'herbier colonisé présente une valeur de 54.26 ± 4.70 cellules par mm^2 contre 30.68 ± 3.54 cellules par mm^2 comptées dans un herbier non colonisé dans la même région.

Conclusion générale

Conclusion générale

L'objectif de cette étude était de rechercher des variations quantitatives en composés phénoliques chez *Posidonia oceanica* dans des sites présentant des niveaux d'anthropisation différents. Pour cela, deux sites en été choisis : l'un de référence situé dans la baie de Bou Ismaïl (l'anse de Kouâli) et l'autre fortement anthropisé situé dans la baie d'Alger (Tamentfoust).

Le dosage des composés phénoliques est réalisé par spectrophotométrie UV/visible dans différents tissus foliaires : les limbes et les pétioles des feuilles adultes, et les feuilles intermédiaires. Les résultats obtenus montrent que les feuilles intermédiaires présentent des teneurs moyennes plus élevées en phénols totaux que celles enregistrées au niveau des limbes et des pétioles des feuilles adultes ; cette tendance est également rapportée dans la littérature. Les teneurs en phénols totaux enregistrées à Tamentfoust et à l'anse de Kouâli sont similaires du fait que les tanins condensés (contenus dans les cellules à tanins), qui augmentent en réponse à un stress environnemental, n'ont pas pu être extraits par la méthode utilisée car non solubles dans l'alcool.

L'abondance des cellules à tanins dans les feuilles de *Posidonia oceanica*, observée à Tamentfoust est significativement plus importante que celle de l'anse de Kouâli. Ceci témoigne d'une relation directe entre l'augmentation du nombre des cellules à tanins en réponse à un stress environnemental, observation largement rapportée dans la littérature. Toutefois, il n'a pas été possible d'enregistrer une relation entre la teneur en composés phénoliques et l'abondance des cellules à tanins. En effet, le protocole d'extraction utilisé dans ce travail ne s'applique qu'aux seuls composés phénoliques hydrosolubles.

L'utilisation de la méthode de dosage par spectrophotométrie UV/visible reste intéressante pour un dosage rapide de l'ensemble des composés phénoliques. Mais pour cela des améliorations d'extraction sont à mettre en oeuvre afin d'analyser également les tanins condensés.

Il apparaît clairement, au regard des résultats de cette étude préliminaire, la complexité des mécanismes liés à la production des composés phénoliques. La compréhension de ces mécanismes nous permettra d'appréhender leur importance dans le fonctionnement de l'écosystème à *Posidonia oceanica*.

Les études futures devront permettre d'appréhender :

- * l'influence de la saison et de la profondeur sur l'abondance des cellules à tanins et la teneur en composés phénoliques chez *Posidonia oceanica* ;
- * l'identification des différents composés phénoliques présents dans les différents tissus de *Posidonia oceanica* par une étude qualitative en utilisant des méthodes fiables et rapides tels que : HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance), RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) ;
- * la réalisation d'études *in vitro* et *in situ* permettront de déterminer le rôle et la régulation des différents composés phénoliques en fonction des différents types de stress environnementaux.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- AGOSTINI S., 1996.** Etude de la variation des teneurs en composés phénoliques chez *Posidonia oceanica*. Mémoire de D.E.A., Université de Provence et de la Méditerranée : 1-22.
- AGOSTINI S., DESJOBERT J. M. et PERGENT G., 1998.** Influence de l'algue *Caulerpa taxifolia* sur les teneurs en composés phénoliques de la phanérogame marine *Posidonia oceanica*. *Third International Workshop on Caulerpa taxifolia*, Boudouresque C.F., Gravez V., Meinesz A. & Palluy F. édit., GIS Posidonie publ., Fr. : 227-232.
- AMAROUCHE N., (sous presse).** Mémorisation des métaux traces (métaux lourds) par la phanérogame marine *Posidonia oceanica* dans la baie de Bou Ismail. Thèse de Magister, U.S.T.H.B., Algerie.
- ASTIER J.M., 1984.** Impact des aménagements littoraux de la rade de Toulon, liés aux techniques d'endiguage, sur les herbiers à *Posidonia oceanica*. *International Workshop on Posidonia oceanica Beds*, Boudouresque C.F., Jeudy de Grissac A. & Olivier J. édit., GIS Posidonie Publ., 1 : 255-259.
- BAY D., 1978.** Etude *in situ* de la production primaire d'un herbier de Posidonies (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) dans la baie de Calvi-Corse. *Progr. Rép. Stn. Océanogr.Stareso., Univ. Liège, Belg.*, 18 : 6 p non num. +1-251.
- BIOLEY J.P., JAY M. et FIASSON J.L., 1987.** Mécanismes biochimiques du métabolisme secondaire dans la réaction des végétaux cultivés aux pathogènes fongiques. INST. d'Analyses des Systèmes Biologiques et Socio-Economiques, Univ. Claude Bernard Lyon I. : 7-19.
- BOUDOURESQUE C.F., 1996.** Impact de l'homme et conservation du milieu marin en Méditerranée . 2^{ème} Edit. GIS. Posidonie Publ., Marseille, Fr. : 1-243 .
- BOUDOURESQUE C.F. et MEINESZ A., 1982.** Découverte de l'herbier de Posidonies. Parc Naturel Régional de la Corse. Cahier N°4 :1-80.
- BOUMAZA S., 1995.** Phénologie, biomasse, lépidochronologie et production primaire de l'herbier à *Posidonia oceanica* (L.) Delile. de l'Anse de Kôuali, Tipaza (Algérie). Thèse de Magister Océanol., I.S.M.A.L., Algerie : 1-125 + Annexe : 1-138 .

- BOURCIER M., 1989.** Régression des herbiers à *Posidonia oceanica* (L.) Delile, à l'Est de Marseille, sous l'action conjuguée des activités humaines et des modifications climatiques. *International Workshop on Posidonia oceanica Beds*, Boudouresque C.F., Meinesz A., Fresi E. & Gravez V. dir., GIS Posidonie Publ., Marseille, 2 : 287-293.
- CARIELLO L. et ZANETTI L., 1979.** Distribution of chicoric acid during leaf developpement of *Posidonia oceanica*. *Bot. Mar.*, 22 : 359-360.
- CHALKER-SCOTT L. et FUCHIGAMI L.H., 1989.** The role of phenolic compounds in plant stress reponses. *In Low temperature stress physiology in crops*. Edited by P.H. Li. CRC Press, Boca Raton, Fla. : 67-79.
- CHALKER-SCOTT L., FUCHIGAMI L.H., et HARBER R.M., 1989.** Spectrophotométrie measurement of leached phenolic compounds as an indicator of freeze damage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114 (2) : 315-319.
- CHARLOT G. et BEZIER D., 1949.** Méthodes modernes d'analyses quantitatives minérales. 2^e édit. MASSON et C^{ie}, éditeurs, Paris : 1-681.
- CROUZET A., 1984.** Contribution à l'étude anatomique des feuilles de *Posidonia oceanica* (Potamogetonacea). Variations de la structure le long d'une écaille épaisse. *International Workshop on Posidonia oceanica Beds*, Boudouresque C.F., Jeudy de Grissac A., Olivier J. édit., GIS Posidonie Publ., Fr., 1 : 109-117.
- CUNY P., 1993.** Etude des composés phénoliques de la Phanérogame marine *Posidonia oceanica* dans une zone des Alpes Maritimes colonisée par la chlorophyte tropicale *Caulerpa taxifolia*. Mém. DEA., L.B.M.E.B., Univ. Aix - Marseille II : 1-43.
- CUNY P., SERVE L., JUPIN H. et BOUDOURESQUE C.F., 1994.** Les composés phénoliques hydrosolubles de *Posidonia oceanica* (phanérogame marine) dans la zone colonisée par la chlorophyte introduite *Caulerpa taxifolia* (Alpes maritimes, France, Méditerranée). *First International Workshop on Caulerpa taxifolia*, Boudouresque C.F., Meinesz A. et Gravez V. Edit., G.I.S. Posidonie Publ., Fr. : 355-364.
- DAGNELIE P., 1975.** Théorie et méthodes statistiques. Applications Agronomiques II. Les méthodes de l'interférence statistique. Les presses agronomiques de Gembloux. Belg. : 1-464.
- DODGE Y., 1993.** Statistique. Dictionnaire encyclopédique. DUNOD édit., Paris : 1-104.

- FERRAT L., 1998.** Analyse des composés phénoliques chez la phanérogame marine *Posidonia oceanica* lors d'une compétition avec l'algue tropicale *Caulerpa taxifolia*. Fac. des Sci. et de Tech., D.E.S.S. "Ecosystème Méditerranéens" Univ. de Corse : 1-33.
- FERRAT L., FERNANDEZ C. et DUMAY O., 2001.** Analysis of the phenolic compounds in *Posidonia oceanica* from sites colonised by *Caulerpa taxifolia*. *Fourth International Workshop on Caulerpa taxifolia*, Gravez V., Ruitton S., Boudouresque C.F., Le Direach L., Meincsz A., Scabbia G. et Verlaque M. Edit., G.I.S. Posidonie Publ., Fr. : 185-194.
- FOLIN O. et DENIS W., 1915.** A colometric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.* 22, N° 2 : 305-308.
- GIRAUD G., 1977.** Contribution à la description et à la phénologie quantitative des herbiers à *Posidonia oceanica* (L.) Délile. Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle. Université Aix – Marseille II, Fr. : 1-150.
- HARMELIN-VIVIEN M.L., 1983.** Ichtyofaune des herbiers de Posidonies des côtes provençales Françaises. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, 28 (3) : 161-163.
- HELLER W. et FORKMANN G., 1993.** Biosynthesis of flavonoids. *In The Flavonoids : Advances in Research Since 1986*, Harborne J.B. édit., Chapman and Hall Publ., London : 499-535.
- JEUDY de GRISSAC A. et BOUDOURESQUE C.F., 1985.** Rôles des herbiers de phanérogames marines dans les mouvements des sédiments côtiers : Les herbiers à *Posidonia oceanica*. *Coll. Fr. – Japon. Oceanogr.*, Marseille, Fr., 16 – 21, 1 : 143-151.
- KUO J. et CAMBRIDGE M.L., 1978.** Morphology, Anatomy and Histochemistry of the Australian seagrasses of the genus *Posidonia Konig* (Posidoniaceae). II Rhizome and Root of *Posidonia australis* Hook f. , *Aquatic Botany* (5) : 119-206.
- MARKHAM K.R., 1982.** The technique of flavonoides identification. Academic Press. London - New York - Paris : 1-103.
- MC LACHLAN J. et CRAIGIE J.S., 1966.** Antialgal activity of some simple phenols. *J. Phycol.*, 2 : 133-13.
- MOSSE R.A., 1983.** Variations cycliques dans les écailles de *Posidonia oceanica* : Rhizomes Plagiotropes et Orthotropes. Lab. Ecol. Benthos, Fac. Scie. Luminy, Marseille et Parc Nation. Port – Cros (Var), Fr. : 1-276.

- MOSSE R.A., 1984.** Les écailles des rhizomes Plagiotropes de *Posidonia oceanica* : Etude des variations cycliques . *International Workshop on Posidonia oceanica Beds*, Boudouresque C.F., Jeudy de Grissac A. & Olivier J. edit, GIS Posidonie Publ., Fr.,1 : 217-226.
- PELLEGRINI L. et PELLEGRINI M., 1992.** Fine structural observations of the leaf blade of the marine phanerogam *Posidonia oceanica* (L.) Delile, in relation to leaf development. *Cytobios*, 72 : 47-61.
- PELLEGRINI L. et PELLEGRINI M., 1993.** Ultrastructural differentiation of tanniniferous cells in the Marine Phanerogam *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Botanica Marina*, 36 : 179-187.
- PERGENT C., 1988.** Variabilité de l'abondance des cellules à tanins dans les écailles de *Posidonia oceanica*. *Rapp. Comm. Int. Expl. Médit.*, 31 (2) : 7.
- PERGENT G., 1991.** Les indicateurs écologiques de la qualité du milieu marin en Méditerranée. L.B.M.E.B., Faculté des Science de Luminy . *Oceanis*, 74 (4) : 341-350.
- PERGENT G., 1993.** L'herbier à *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Approche structurale, fonctionnelle et appliquée*. Diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches, Université de Corse, Fr. : 1-141.
- PERGENT G., BOUDOUREQUE C.F. et CROUZET A., 1983.** Variations cycliques dans les écailles des rhizomes orthotropes de *Posidonia oceanica*. *Trav. Scie. Parc Nation. Port – Cros*, Fr., 9 : 107-148.
- PERGENT–MARTINI C., 2000.** Utilisation des herbiers de phanerogames marines dans la gestion du littoral mediterraneen. Diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches, specialité écologie marine, Univ. Corse Pascale Paoli, U.F.R. des Sciences et Techniques, Fr. : 1-298.
- PERGENT–MARTINI C., PERGENT G. et RICO–RAIMONDINO V., 1993.** *Posidonia oceanica* Beds, a biological indicator of marine environment quality . *Acte du Colloque Scientifique* , Montpellier : 207-212.
- PERGENT-MARTINI C., RICO–RAIMONDINO V. et PERGENT G., 1994.** Primary production of *Posidonia oceanica* in the Mediterranean Basin. *Marine Biology*, 120 : 9-15.
- POLONOVSKI M. et LESPAGNOL A., 1941.** Chimie organique biologique. 2^{ème} Edition, MASSON et C^{ie} : 1-229.

- QUAKENBUSH R.C., BUNN D. et LINGREN W.E., 1986.** Phenolic compound. *Aquatic Botany*, 24 : 97 - 103.
- RAGAN M.A. et CRAIGIE J.S., 1978.** Phenolic compound in brown and red algae *in* : analysis of chemical constituents. Handbook of phycological methods. J. Helleburst and J.S. Graigie, Eds. *Cambridge Univ. Press*, 2 : 157-179.
- RAGAN M.A. et GLOMBITZA A., 1986.** Phlorotanins, brown algal polyphenols. *Progr. Phycol. Res.*, 4 : 130-241.
- RIBEREAU-GAYON P., 1986.** Les composés phénoliques des végétaux. DUNOD, Paris : I-IV + 1-254.
- SEGUENI O. et NACEUR Y.K., 1996.** Cartographie biomorphosédimentaire de l'anse de Kouâli W. Tipaza. *Mém. Ing., I.S.M.A.L., Alger* : 1-62.
- SELLALI B., BENCHIKH S., OUANADI F., KHIARI N., EDDALIA N., SELLALI-MERABTINE H., REFES N., AZZOUZ M. et BOUDJELLAL B., 1999.** Etude diagnostique du milieu littoral Est de la baie d'Alger : Détermination des causes de l'altération et identification des contaminants. *Contrat I.S.M.A.L.-A.P.P.L.* : 1-33.
- SEMROUD R., 1993.** Contribution à la connaissance de l'écosystème à *Posidonia oceanica* (L.) Delile dans la région d'Alger (Algérie) : Etude de quelques compartiments. Thèse Doct., Océaogr., Inst. Scie. Nature , U.S.T.H.B. Algérie : 1-219 +Annexes.
- VILLELE X. de, 1992.** Etude de l'impact de l'algue tropicale *Caulerpa taxifolia* (VAHL.) C. Agardh sur les herbiers de *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Rapp. de Stage, Faculté des Scie. De Luminy, Univ. d'Aix Marseille* : 1-32 .