

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME  
D'INGENIEUR D'ETAT EN SCIENCES DE LA MER

OPTION : Environnement

Thème :

**Etude de la bioaccumulation des métaux traces  
par le merlu (*Merluccius merluccius*, Linnaeus,  
1758) de la côte algérienne**

Présenté par :

Mlle DENDENE Lynda

Soutenu le 05/11/2014 devant le jury suivant :

<b>Mr R. BELKESSA</b>	<b>Professeur (ENSSMAL)</b>	<b>Président</b>
<b>Mr A. INAL</b>	<b>Attaché de recherche (CNRDPA)</b>	<b>Promoteur</b>
<b>Mr M. BOULAHDID</b>	<b>Professeur (ENSSMAL)</b>	<b>Co-promoteur</b>
<b>Mme Z. BOUBCHICHE</b>	<b>Maitre assistante A</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mr S. BACHOUCHE</b>	<b>Attaché de recherche (CNRDPA)</b>	<b>Examineur</b>

Promotion : 2014



## Résumé

La présente étude porte sur l'évaluation de la bioaccumulation des métaux traces : le Mercure, le Nickel et le Zinc par le Merlu (*Merluccius merluccius* L., 1758) de la cote algérienne dans des organes accumulateurs potentiels (foie, chair et gonades) et l'étude des variations de celle-ci en fonction de la taille et du sexe. L'échantillonnage des individus étudiés a été effectué au mois de Juin 2013.

L'utilisation du merlu comme bio indicateur dans l'évaluation de la contamination par les 03 métaux lourds (Hg, Ni et Zn) a permis de mettre en évidence la présence de ces micropolluants au niveau des 03 organes cibles (le foie, la chair et les gonades).

Ces résultats ne font que révéler l'existence d'une relation étroite entre la pollution marine et les nombreux rejets industriels et urbains au niveau de la cote algérienne plus précisément : la baie de Ghazaouet, Mostaganem, Beni saf et BouIsmaïl.

A cette étude est ajoutée une analyse biochimique afin de déterminer la composition chimique (taux des protéines, des lipides et des glucides) de chaque organe (la chair, le foie, et les gonades) du Merlu.

**Mots clés :** *Merluccius merluccius*, Métaux traces, Mercure, Nickel, Zinc, Bioaccumulation, Contamination, Composition biochimique, Glucides, Lipides, Protéines, Cote algérienne.

*You are the reason I have a smile on my face every day "My Family"*

*A la mémoire de ma chère grand mère, t'avais toujours cru en moi, Merci pour le réconfort que tu m'as apportais dans les moments les plus durs et pour tes prières qui, j'en suis sur, sont la raison de ma réussite, je te dédie « Ayi » ce modeste travail.*

*Qu'Allah t'ouvre les portes du paradis.*

*A vous mes très chers parents, aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ma gratitude envers vous. Ce travail est le fruit de votre soutien inébranlable, de vos interminables conseils et de vos innombrables sacrifices, vous avez toujours cru en moi malgré tout.*

*En témoignage de ma reconnaissance et mon affection je vous dédie ce modeste travail dans l'espoir que vous en serez fiers.*

*Quisse Allah, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive. Votre satisfaction sera toujours mon but.*

*A mon grand frère et ma petite sœur, mes exemples de persévérance dans la vie.*

*En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et qu'Allah, le tout puissant, vous protège et vous garde.*

*A mes meilleurs amis (es), à mes amis (es), je vous dédie ce travail et vous souhaite un avenir à la hauteur de vos ambitions.*

*« Pour un esprit scientifique, toute connaissance est une réponse à une question. S'il n'y a pas eu de question, il ne peut y avoir connaissance scientifique. Rien ne va de soi. Rien n'est donné. Tout est construit. »*

*Gaston Bachelard*

## **Remerciements**

*Je remercie Allah de m'avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce mémoire de fin d'étude.*

*Je tiens à remercier mon promoteur Mr A. INAL pour avoir accepté de diriger ce travail.*

*Mes remerciements vont à mon Professeur et Co-promoteur Mr M. BOULAHIDJ d'avoir accepté de faire parti des membres du jury.*

*Mes remerciements vont à Mr R. BELKESSA d'avoir accepté de présider le jury.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Z. BOUBCHICHE et Mr S. BACHOUCHE qui ont bien voulu examiner ce mémoire.*

*J'exprime ma profonde gratitude à mes professeurs du laboratoire de Sidi Fredj, en particulier Mme F. OUNADI et Mme N. EDDALIA, pour leur aide, générosité et gentillesse.*

*Mes remerciements s'adressent également à tout le personnel de la bibliothèque pour leur disponibilité, aide et gentillesse en particulier Chérif, Fatima, Youcef et Mme BESSAOU.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude à tous mes enseignants, depuis ma première année fondamentale, jusqu'à la cinquième année universitaire.*

*Mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce modeste travail, vous vous reconnaitrez.*

## Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Acronymes

**Introduction.....14**

### Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les éléments traces métalliques « ETM ».....	17
1.1. Définition et classification des ETM.....	17
1.2. Origine.....	17
1.3. Cycle biogéochimique des ETM dans le milieu marin.....	19
1.4. Biodisponibilité et toxicité des ETM.....	20
1.4.1. Processus physiologiques de bioaccumulation des ETM.....	21
1.4.1.1. La bioaccumulation.....	21
1.4.1.2. La bioconcentration.....	21
1.4.1.3. La bioamplification.....	22
2. Choix d'un bioindicateur de la contamination métallique.....	22
2.1. Présentation de l'espèce bioindicatrice.....	23
2.1.1. Systématique.....	23
2.1.2. Distribution géographique.....	23
2.1.3. Caractères distinctifs.....	24
2.1.4. Habitat et biologie.....	25
2.1.5. Age et croissance.....	26
2.1.6. Pêche et engins de pêche.....	26
3. Présentation des principaux ETM.....	27
3.1. Le Mercure (Hg).....	27
3.2. Le Plomb (Pb).....	27
3.3. Le Cadmium (Cd).....	27
3.4. Le Zinc (Zn).....	28
3.5. Le Cuivre (Cu).....	28
3.6. Le Nickel (Ni).....	29

### Chapitre II: Zone d'étude

1. Caractéristiques générales de la Méditerranée.....	31
2. Description de la cote algérienne.....	32

2.1. Caractéristiques des fonds.....	33
2.2. Baies et golfes de la cote algérienne .....	33
2.3. Courantologie, Hydrologie et facteurs du milieu.....	34
2.3.1. Circulation des eaux le long des côtes algériennes .....	34
2.3.2. Température et salinité des eaux littorales .....	35
2.4. Principales Caractéristiques climatiques.....	36
2.4.1. Température .....	36
2.4.2. Les précipitations .....	36
2.4.3. Régime des vents.....	36
2.5. Réseau hydrographique.....	37
3. Principales pressions anthropiques le long de la côte algérienne .....	38

### **Chapitre III : Matériels et Méthodes**

1. Travaux effectués en mer.....	41
1.1. Choix et intérêts de l'espèce .....	41
1.2. Prélèvement des échantillons.....	41
1.3. Positionnement des stations .....	41
1.4. Organes prélevés .....	42
1.5. Conservation des échantillons .....	43
2. Travaux effectués au laboratoire.....	43
2.1. Le dosage des métaux traces.....	43
2.1.1. Nettoyage des instruments .....	43
2.1.2. Lyophilisation .....	44
2.1.3. Broyage.....	44
2.1.4. Homogénéisation .....	44
2.2. Extraction des métaux traces.....	44
2.2.1. Minéralisation ou combustion par voie humide .....	44
2.2.1.1. Minéralisation à blanc.....	44
2.2.1.2. Minéralisation des sous-échantillons .....	45
2.3. Analyse des métaux traces.....	45
2.3.1. Spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA).....	45
2.3.1.1. Principe.....	45
2.3.1.2. Appareillage.....	46
2.3.2. Etalonnage.....	49
2.3.2.1. Méthodes des standards seuls.....	49
2.3.2.2. Calcul des concentrations des métaux .....	49
2.4. Analyse biochimique : Méthodes d'analyse des Glucides, Lipides et Protéines .....	50
2.4.1. Dosage des glucides.....	50
2.4.1.1. Présentation de la méthode .....	50
2.4.1.2. La courbe d'étalonnage.....	51
2.4.1.3. Préparation des échantillons.....	51

2.4.2. Dosage des lipides.....	51
2.4.2.1. Présentation de la méthode .....	52
2.4.2.2. Principe .....	52
2.4.2.3. Mode opératoire.....	52
2.4.3. Dosage des protéines.....	53
2.4.3.1. Présentation de la méthode .....	53
2.4.3.2. Principe .....	53
2.4.3.3. Mode opératoire .....	54

## **Chapitre IV : Résultats et Discussions**

Partie I : Résultats des métaux traces (ETM).....	57
1. Variations des concentrations en ETM.....	58
1.1. Le Mercure (Hg).....	58
1.1.1. Organes.....	58
1.1.2. Zones.....	59
1.1.3. Sexe .....	59
1.1.4. Taille.....	59
1.2. Le Zinc (Zn) .....	59
1.2.1. Organes .....	60
1.2.2. Zones.....	60
1.2.3. Sexe.....	60
1.2.4. Taille.....	61
1.3. Le Nickel (Ni) .....	61
1.3.1. Organes.....	62
1.3.2. Zones.....	62
1.3.3. Sexes .....	62
1.3.4. Taille.....	62
Partie II : Résultats des analyses biochimiques.....	63
1. Présentation graphique des résultats.....	64
1.1. Glucides.....	65
1.2. Lipides .....	65
1.3. Les protéines .....	65
2. Variations de la composition biochimique dans les trois organes.....	65
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>67</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>70</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>80</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Schéma synthétisant les sources d'ETM dans le compartiment aquatique (adapté de Gaillardet <i>et al.</i> , 2003).....	18
<b>Figure 2 :</b> Schéma des différents transferts dans les milieux aquatiques (Devallois, 2009)...	20
<b>Figure 3 :</b> <i>Merluccius merluccius</i> (Linnaeus, 1758) ( <a href="http://www.google.fr">www.google.fr</a> ).....	23
<b>Figure 4 :</b> Répartition géographique du merlu européen (Source: <a href="http://www.seaaroundus.org">www.seaaroundus.org</a> ).....	24
<b>Figure 5 :</b> <i>Merluccius merluccius</i> (Linnaeus, 1758): Merlu, merlan (FAO, 1987).....	25
<b>Figure 6 :</b> Tête de <i>Merluccius merluccius</i> en vue dorsale (avec crête en forme de V) (FAO, 1987).....	25
<b>Figure 7 :</b> Principales étapes du cycle de vie du merlu (Bodiguel, 2008).....	26
<b>Figure 8 :</b> Méditerranée, localisation des principaux bassins, détroits et mers marginales (PAM/PNUE-CAR/PB, 2009).....	32
<b>Figure 9 :</b> Carte du bassin algérien (A : région Ouest ; B : région Centre ; C : région Est).....	33
<b>Figure 10 :</b> Baies et golfes de la cote algérienne.....	34
<b>Figure 11 :</b> Circulation de l'eau de surface d'origine Atlantique (AW) dans le Bassin Occidental de la Méditerranée (d'après Millot & Taupier-Letage, 2005).....	35
<b>Figure 12 :</b> Les principaux oueds Algériens (Grimes, 2010).....	37
<b>Figure 13 :</b> Présentation schématique de l'appareil du spectromètre d'absorption atomique (Perkin Elmer® AAnalyst 700).....	47
<b>Figure 14 :</b> Méthode de traçage de la courbe d'étalonnage des glucides.....	51
<b>Figure 15 :</b> Variations des concentrations moyennes en Mercure (Hg) chez le Merlu par organes (A), zones (B), sexe (C) et la taille (D) (C : chair, F : foie, G : gonades).....	58
<b>Figure 16 :</b> Variations des concentrations moyennes en Zinc (Zn) chez le Merlu par organes (A), zones (B), sexe (C) et la taille (D) (C : chair, F : foie, G : gonades).....	60
<b>Figure 17 :</b> Variations des concentrations moyennes en Nickel (Ni) chez le Merlu par organes (A), zones (B), sexe (C) et la taille (D) (C : chair, F : foie, G : gonades).....	61
<b>Figure 18 :</b> variations des taux glucidiques (A), lipidiques (B) et protéiques (C) en fonction des organes du Merlu (C : chair, F : foie et G : gonades).....	64
<b>Figure 19 :</b> Histogramme empilé des pourcentages glucidiques, lipidiques et protéiques de chaque organe (chair, foie et gonades).....	65
<b>Figure 1 :</b> Lyophilisateur (CHRIST BETTA 1-8).....	Annexe I
<b>Figure 2 :</b> Broyage à l'aide d'un mixeur.....	Annexe I
<b>Figure 3 :</b> Echantillons broyés.....	Annexe I
<b>Figure 4 :</b> Minéralisation des échantillons.....	Annexe I
<b>Figure 5 :</b> L'acide nitrique (HNO <sub>3</sub> ) et le bichromate de potassium (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , 5%)....	Annexe I
<b>Figure 6 :</b> Spectrophotométrie d'Absorption Atomique Perkin Elmer® AAnalyst 700.....	Annexe I
<b>Figure 7 :</b> Préparation des étalons et échantillons.....	Annexe I
<b>Figure 8 :</b> Les solutions échantillons et le spectrophotomètre.....	Annexe I

<b>Figure 9</b> : Le réfrigérant et Appareil de Soxhlet.....	Annexe I
<b>Figure 10</b> : Le rot a vapeur.....	Annexe I
<b>Figure 11</b> : Appareil de minéralisation.....	Annexe I
<b>Figure 12</b> : Echantillons après minéralisation et filtration.....	Annexe I
<b>Figure 13</b> : Appareil de distillation.....	Annexe I
<b>Figure 14</b> : Titrage, Tashiro et pH mètre.....	Annexe I
<b>Figure 1</b> : Droites d'étalonnage des métaux traces analysés, mercure (A), zinc (B), nickel (C).....	Annexe II
<b>Figure 1</b> : Courbe d'étalonnage des glucides.....	Annexe III

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Sources principales des contaminants métalliques (d'après Adriano (2001); Boucheseiche <i>et al.</i> , (2002) et Meybeck <i>et al.</i> , (2007)).....	19
<b>Tableau 2</b> : Classification des métaux et des métalloïdes en fonction de leur toxicité et de leur disponibilité (Wood, 1974 <i>in</i> Förstner et Wittmann, 1979).....	21
<b>Tableau 3</b> : Principales sources de la pollution industrielle des wilayas littorales ( <b>D</b> : Domestique – <b>I</b> : Industrielle) (Grimes, 2010).....	38
<b>Tableau 4</b> : Coordonnées géographiques des traits de pêche.....	42
<b>Tableau 5</b> : Teneurs en métaux (Hg, Ni et Zn) exprimées en µg/g du poids sec dans les différents organes chez <i>Merluccius merluccius</i> de la côte Algérienne (cote Ouest).....	57
<b>Tableau 6</b> : Comparaison des teneurs en métaux lourds (ppm P.S) dans le muscle chez <i>Merluccius merluccius</i> par rapport aux Doses Maximales Admissibles (D.M.A).....	62
<b>Tableau 7</b> : Valeurs de la composition biochimique du Merlu (glucides, lipides et protéines) exprimées en concentration (mg/ml) et pourcentages dans les différents organes (chair (C), foie (F) et gonades (G)).....	63
<b>Tableau 1</b> : Gammes-étalons des métaux traces analysés dans le biote.....	Annexe II
<b>Tableau 1</b> : poids des échantillons avant et après extraction.....	Annexe III
<b>Tableau 2</b> : Titrage de la solution (acide borique + ammoniacque entraîné à la vapeur d'eau) par l'acide chloridrique (HCl).....	Annexe III

## Liste des acronymes

**A.I.E.A (I.A.E.A)** : Agence Internationale de l'Énergie Atomique.

**ALDEM** : Algérie Démersale.

**ANS** : Absorbance Non Spécifique.

**A.O.A.C** : Association of Official Agricultural Chemists.

**CNRDPA** : Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et l'Aquaculture.

**ENSSMAL** : Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral.

**ETM** : Eléments Traces Métalliques.

**FAO** : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation de l'ONU pour l'alimentation et l'agriculture).

**FIAS** : Flow Injection Atomic Spectrometry.

**ICES (CIEM)** : International Council for the Exploration of the Sea (conseil international pour l'exploitation de la mer).

**IFREMER** : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer.

**I.U.P.A.C (UICPA)** : International Union of Pure and Applied Chemistry (Union internationale de chimie pure et appliquée).

**MHS** : Mercury Hydride System.

**MEDICIS** : projet pour l'étude des apports, de l'état et du devenir de la contamination chimique en Méditerranée occidentale, par une action de recherche pluridisciplinaire et intégrée.

**MED POL** : la composante d'évaluation et de maîtrise de la pollution marine du PAM (plan d'action pour la Méditerranée).

**MERLUMED** : Merlu de Méditerranée. Programme coordonné de recherche pluridisciplinaire "PIM-Médicis" (Projet Intégré Méditerranée), piloté par l'Ifremer.

**O.N.M** : Office National de la Météorologie.

**O.N.E.D.D** : Observatoire National de l'Environnement et du Développement Durable.

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**P.N.U.E (U.N.E.P)** : Programme des Nations Unies pour l'Environnement.

**S.A.A (AAS)** : Spectrophotométrie d'Absorption Atomique.

# Introduction

De nombreux produits chimiques sont rejetés dans l'environnement aquatique. Les courants marins les répandent d'un bout à l'autre de la planète. La pollution des eaux est un facteur de destruction bien plus important pour l'écosystème marin, que la pêche industrielle à outrance, elle-même plus dévastatrice que la petite pêche artisanale.

Si les marées noires ont un impact direct sur l'opinion publique elles n'en demeurent pas moins très limitées géographiquement avec des effets à court terme. Les pollutions les plus néfastes pour l'équilibre fragile de la vie marine ne sont pas les plus visibles. Bien au contraire, ce sont celles qui se voient le moins. Les métaux lourds (le Mercure, le Plomb, le Cadmium et d'autres produits chimiques toxiques) et rejets divers, provenant des usines du bassin méditerranéen rejetant des produits très dangereux sous forme organique mais aussi sous forme de plastique, de peinture, de pâte à papier, de pille et certains fongicides, sont souvent illicites, constituent la plus grande menace pour la survie des mammifères marins et la préservation de l'environnement. Leur transfert s'effectue alors par voie alimentaire dans les réseaux trophiques, où ils sont susceptibles de se bioamplifier d'un maillon trophique à un autre (Burreau *et al.*, 2004; Nfon et Cousins, 2006). Les prédateurs de rang trophique élevé sont donc particulièrement exposés, et peuvent renfermer des concentrations en éléments traces très importantes, pouvant avoir des effets sur leurs fonctions physiologiques (Ahlborg *et al.*, 1994; Loonen *et al.*, 1996). Tous les consommateurs finaux, y compris l'Homme, sont donc exposés.

Vu la solubilité des métaux lourds, l'analyse de l'échantillon d'eau de mer ne peut pas être considérée comme un moyen fiable pour déterminer le degré de pollution métallique du milieu marin (Philips, 1977). De ce fait, le recours aux organismes vivants présente l'intérêt d'observer la vie sous ses différentes formes et permet de servir, dans les conditions de perturbation, de signal d'alarme. Le développement de la bio-indication ouvre ainsi la voie à une surveillance plus large et écologique, intégrant les effets sur l'environnement grâce à des organismes sentinelles.

Parmi les espèces démersales pêchées le long du littoral algérien nous avons choisi, dans le cadre de ce mémoire, le Merlu (*Merluccius merluccius* L., 1758) qui représente la plus importante des espèces de poissons démersaux exploitées, d'une part, et par le rang trophique élevé qu'il occupe, d'autre part, le Merlu est potentiellement exposé à la bioaccumulation des composés inorganiques (Belhoucine, 2012), son utilisation comme outil biologique est donc fort importante pour estimer l'impact de l'activité anthropique dans l'écosystème marin.

Pour ce faire, des analyses toxicologiques sont réalisées afin d'évaluer la bioaccumulation des métaux traces présumés, à savoir, le Mercure, le Nickel et le Zinc par le Merlu de la cote algérienne dans des organes accumulateurs potentiels (chair, foie, et gonades) et d'étudier les variations de celle-ci en fonction de la taille et du sexe. Ajoutant à ce ci, une analyse biochimique a été effectuée par le dosage des glucides, lipides et protéines afin de déterminer si ces derniers ont un rôle dans l'accumulation des métaux traces.

La présentation de notre travail s'articule, principalement, autour de quatre chapitres :

Le premier chapitre représente une synthèse bibliographique, divisée en deux parties : la première comporte des généralités sur le phénomène de bioaccumulation et les métaux traces, la deuxième présentant les caractéristiques générales de l'espèce bioindicatrice.

Le second chapitre, sont présentées les caractéristiques de notre zone d'étude : la cote algérienne.

Le troisième chapitre présente les techniques de prélèvement, de conservation, de traitement des échantillons et de la mise en œuvre du dosage des deux analyses, à savoir, chimiques et biochimiques.

Le dernier chapitre contient l'essentiel des résultats obtenus et leur interprétation suivi d'une conclusion générale.

# Synthèse bibliographique

## **1. Les éléments traces métalliques « ETM »**

### **1.1. Définition et classification des ETM :**

Un métal est une matière, issue le plus souvent d'un minerai ou d'un autre métal, doté d'un éclat particulier, bon conducteur de chaleur et d'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité (Miquel, 2001).

On appelle en général métaux lourds les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 grammes par cm<sup>3</sup>. On retrouve dans certaines publications anciennes l'appellation de « métal pesant ». Quarante et un métaux correspondent à cette définition générale auxquels il faut ajouter cinq métalloïdes.

Comme tous les composants chimiques de la croûte terrestre, Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantités très faibles. On dit que les métaux sont présents “ en traces ”. Ils sont aussi “ la trace ” du passé géologique et de l'activité de l'homme.

La classification en métaux lourds est d'ailleurs souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement “ lourds ” (le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic par exemple).

Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation “ éléments en traces métalliques ” -ETM- ou par extension “ éléments traces ” (Miquel, 2001).

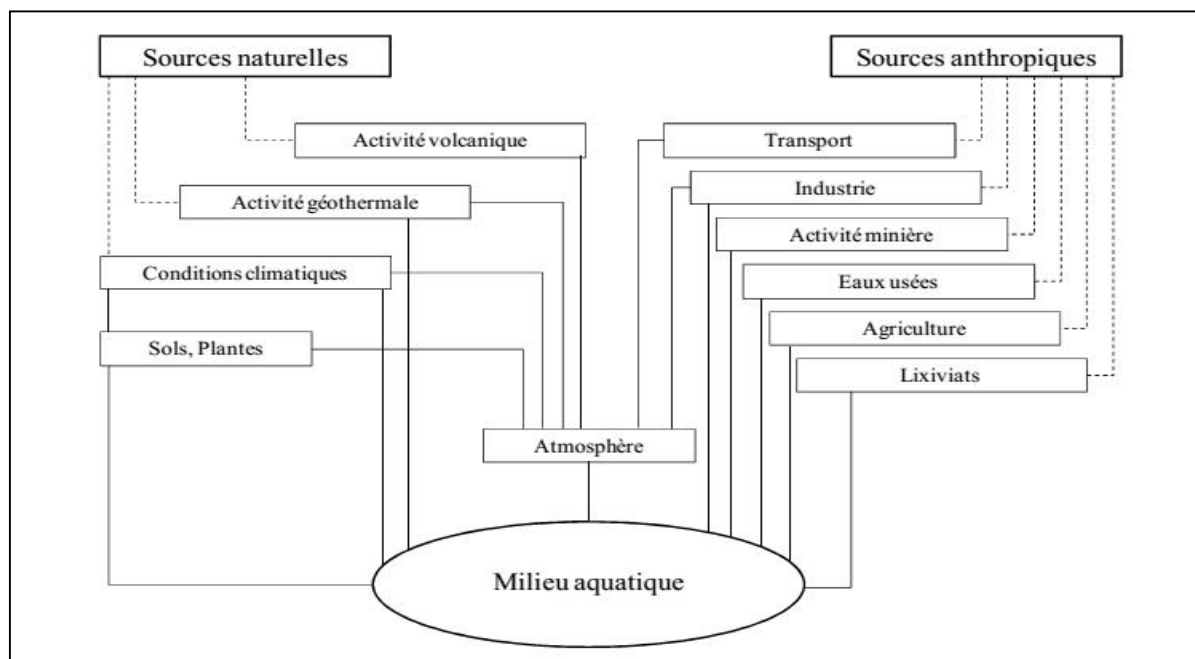
Les ETM peuvent être classés en fonction de leur caractère essentiel pour les organismes vivants :

- Certains éléments métalliques, comme Cu, Zn, Co, Fe, Mn, Ni, Cr, V, Mo, Se, Sn, sont essentiels pour les organismes : ce sont les oligo-éléments (la liste des oligo-éléments a été fixée par l'OMS (WHO, 2003) : au total 21 éléments sont reconnus comme tels, dont 14 métaux), indispensables en quantités minimes, l'augmentation de leur concentration dans l'environnement peut aboutir à des phénomènes de toxicité.

- D'autres éléments ne sont pas nécessaires pour les organismes et présentent des effets toxiques dès les faibles teneurs (de l'ordre du µg/l) : ce sont principalement le plomb, le mercure et le cadmium (Sigg *et al*, 2001).

### **1.2. Origine :**

Dans les écosystèmes aquatiques les ETM ont diverses origines, qui peuvent être regroupées en deux catégories : naturelle et anthropique (Figure 1).



**Figure 1:** Schéma synthétisant les sources d'ETM dans le compartiment aquatique (adapté de Gaillardet *et al.*, 2003).

Tout d’abord, il est nécessaire de rappeler que les sols se sont formés aux dépens de roches ignées (ex: basaltes, granites), métamorphiques ou sédimentaires (ex: calcaires, alluvions, moraines). Un sol hérite donc de son matériau parental un certain nombre de propriétés majeures, notamment une signature géochimique. Les teneurs en ETM mesurées aujourd’hui dans les sols résultent de processus de lixiviation ou d’accumulation relative ou absolue liés aux processus pédogénétiques naturels. Chaque sol de chaque région du monde possède donc une concentration en ETM qui lui est propre, correspondant au « fond géochimique » ou « background ». Ces ETM liés à des phases porteuses (constituants des sols comme la matière organique, les argiles, les carbonates, les oxy-hydroxydes de Fe, ...), peuvent ensuite se retrouver au fil du temps dans les cours d’eau par translocation physique de particules (érosion mécanique) ou par transfert sous forme dissoute (érosion chimique). Enfin, les retombées atmosphériques naturelles par l’intermédiaire des aérosols (poussières volcaniques ou éoliennes) peuvent aussi apporter des ETM au milieu aquatique (Di Leonardo *et al.*, 2009 ; Gaillardet *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2011 ; Weber *et al.*, 2009).

Les sources d’ETM anthropiques peuvent être multiples. Elles peuvent être liées à des déversements industriels continu/diffus ou accidentels. Elles peuvent aussi être issues des activités agricoles (pesticides, engrais), d’exploitation de minerais et utilisation des métaux dans de nombreux secteurs d’activité (Tableau 1). Les retombées atmosphériques anthropiques sont aussi importantes par l’intermédiaire des combustions d’hydrocarbures, des usines d’incinération de déchets ménagers, du chauffage urbain, ... Au final l’apport d’ETM par ces activités vient enrichir les cours d’eau par l’intermédiaire du ruissellement, des exutoires urbains et industriels, des rejets de STEP, ... (Bay *et al.*, 2003 ; Bothner *et al.*, 2002 ; Gonzalez *et al.*, 1999 ; Matthai *et al.*, 2002 ; Nicolau *et al.*, 2012).

**Tableau 1 :** Sources principales des contaminants métalliques (d'après Adriano (2001); Boucheseiche *et al.*, (2002) et Meybeck *et al.*, (2007)).

<b>Eléments métalliques</b>	<b>Origines anthropiques</b>
Arsenic (As)	Métallurgie, tannerie, coloration des verres et céramiques, pesticides, protection du bois, combustibles fossiles
Cadmium (Cd)	Métallurgie, traitement de surface, céramique, colorants, usure des pneumatiques, incinération des déchets, engrais phosphatés
Cuivre (Cu)	Métallurgie, électricité, photographie, traitement de surface, pigments, industrie textile, fongicide
Chrome (Cr)	Fabrication de l'acier, traitement de surface, industrie textile, céramique, verrerie, photographie, cimenterie
Mercure (Hg)	Piles, batteries, tubes fluorescents, industrie chimique du chlore, combustibles fossiles, incinération des déchets
Nickel (Ni)	Fabrication d'acier et d'alliages, dépôts chimiques et électrolytiques
Plomb (Pb)	Batteries, pigments, imprimerie, métallurgie, canalisations, raffinage
Zinc (Zn)	Galvanisation, imprimerie, teintures et pigments, insecticides, usure des pneumatiques, bâtiments et toitures

Une fois rejetés dans l'environnement, les ETM se caractérisent par leur non-biodégradabilité, qui induit un pouvoir d'accumulation important dans la biosphère, ainsi que par leur faible volatilité (à l'exception de l'arsenic et du mercure).

### **1.3. Cycle biogéochimique des ETM dans le milieu marin :**

C'est le cheminement des ETM par divers processus physiques, chimiques et biologiques à travers les principales matrices du milieu marin.

Les ETM sont devenues à la mer par différentes apports (éoliennes, ruissellements, industrielles, volcaniques) qui y sont transférés se présentent dans la colonne d'eau et le sédiment sous deux formes :

\* Dissoute dans la colonne d'eau et l'eau interstitielle de la colonne sédimentaire, c'est la forme la plus mobile et donc la plus biodisponible pour les populations aquatiques.

\* Fixée sur les particules des sédiments ou en suspension dans la colonne d'eau qui peuvent s'accumuler dans le compartiment sédimentaire formant ainsi des stocks de polluants potentiellement toxiques pour l'environnement (Devallois, 2009).

Leur déroulement semble s'effectuer selon deux grandes étapes :

\* Une première consisterait en un piégeage des polluants métalliques par les particules en suspension, la biomasse marine et le sédiment en fonction des conditions physico-chimiques du milieu marin et cela par : précipitation, absorption et adsorption et sédimentation.

\* Une deuxième étape inverse à la première consisterait à un relargage de ces polluants par désorption, diffusion ou propagation dans le milieu marin, décomposition des matières organiques, dissolution et parfois même par une redistribution par l'activité des organismes marins (bioturbation).

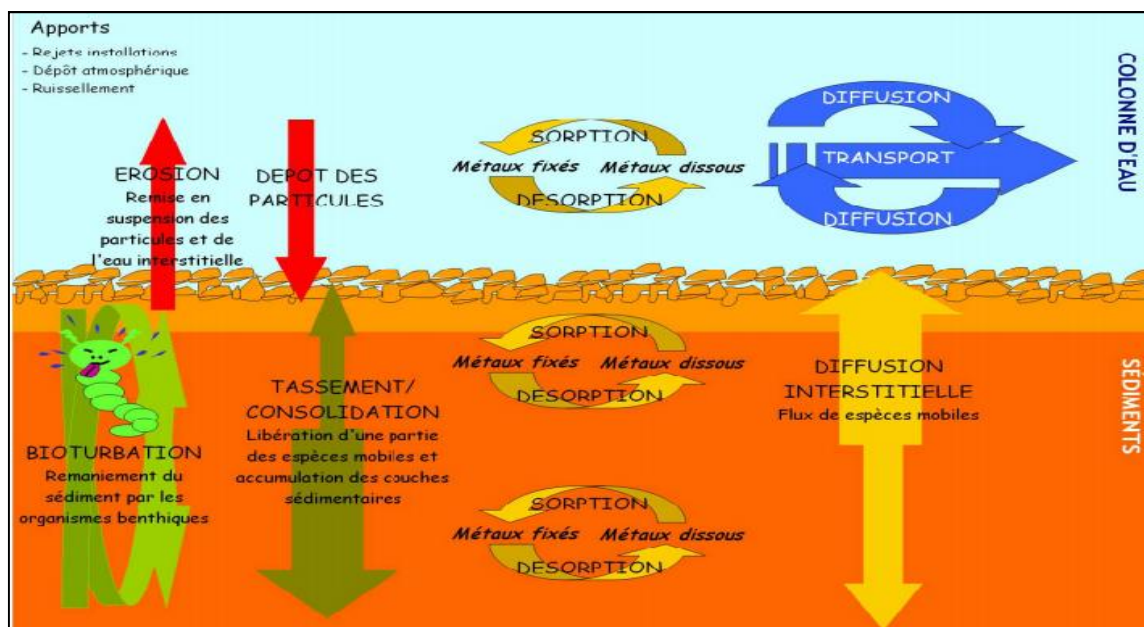


Figure 2 : Schéma des différents transferts dans les milieux aquatiques (Devallois, 2009).

### 1.3.1. Biodisponibilité et toxicité des ETM :

Le terme « biodisponible » se réfère à la « fraction de produit chimique présent dans le milieu environnemental qui est disponible pour être accumulée par les organismes ; L'environnement peut inclure l'eau, les sédiments, les particules en suspension et la nourriture » (Rand et al., 1995 ; Gourlay, 2004).

Les formes dissoutes libres et ioniques des ETM sont généralement considérées comme les formes les plus facilement disponibles pour les organismes vivants (Garnier, 2004). Les formes particulaires deviennent biodisponibles principalement via l'ingestion du sédiment (Förstner, 1989). Eggleton et Thomas (2004) précisent également que la toxicité est davantage en relation avec les concentrations en contaminants dans les eaux interstitielles qu'avec les concentrations sédimentaires.

La toxicité des métaux dépend de nombreux facteurs. En effet Wood (1974) in (Förstner et Wittmann, 1979) a classé différents métaux et métalloïdes en fonction de leur toxicité (action chez l'organisme vivant) et leur disponibilité dans l'environnement (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Classification des métaux et des métalloïdes en fonction de leur toxicité et de leur disponibilité (Wood, 1974 *in* Förstner et Wittmann, 1979).

Pas toxiques			Toxiques, mais peu solubles ou rares		Très toxiques et relativement disponibles		
Na	C	F	Ti	Ga	Be	As	Au
K	P	Li	Hf	La	Co	Se	Hg
Mg	Fe	Rb	Zr	Os	Ni	Te	Tl
Ca	S	Sr	W	Rh	Cu	Pb	Pb
H	Cl	Al	Nb	Ir	Zn	Ag	Pb
O	Br	Si	Ta	Ru	Sn	Cd	Bi
N			Re	Ba		Pt	

Les plus dangereux sont le mercure et le cadmium qui ne possèdent aucune activité biologique favorable. Ils bloquent l'activité enzymatique indispensable au métabolisme (oxygénation, reproduction...). Viennent ensuite le plomb, le cuivre, le nickel, le chrome ou encore le zinc dont l'accumulation dans les organes cibles (foie, reins...) peut entraîner la mort (Bogusz, 1992).

### 1.3.2. Processus physiologiques de bioaccumulation des ETM :

#### 1.3.2.1. La bioaccumulation:

On désigne par bioaccumulation le processus d'absorption par lequel les êtres vivants peuvent accumuler dans leur organisme des nutriments, toute autre substance présente naturellement dans son environnement ou encore un polluant organique de synthèse, quelle que soit la voie de pénétration dans l'organisme considéré. Chez les organismes aquatiques, la bioaccumulation sera la somme des absorptions par contact et par ingestion plus celle faite par la voie transbranchiale. La bioaccumulation n'implique pas obligatoirement un accroissement de concentration d'un polluant quand il passe du biotope dans l'organisme considéré.

On appelle facteur de concentration  $F_c$ , le rapport entre concentration d'un polluant dans les tissus d'un organisme donné à sa concentration dans le biotope. On rencontre souvent dans la littérature écotoxicologique le terme de facteur de bioaccumulation (symbole : FBA ou encore  $F_{BA}$ ) qui est généralement pris comme synonyme du précédent.

Selon le groupe taxonomique, les valeurs de  $F_c$  peuvent varier considérablement. Cependant, on constate en règle générale que, pour la plupart des polluants et des espèces vivantes, les  $F_c$  ( $=F_{BA}$ ) sont inférieurs à un, ce qui signifie que la concentration dans le biotope est supérieure à celle dans l'organisme considéré (Ramade, 2011).

#### 1.3.2.2. La bioconcentration :

On désigne par bioconcentration le processus par lequel une substance prélevée dans un biotope par un être vivant va se rencontrer dans l'organisme de ce dernier à des concentrations supérieures à celles auxquelles il se trouve selon le cas dans les eaux, l'air et/ou les sols.

Il n'existe pas de différence fondamentale entre les processus de bioaccumulation et de bioconcentration, cette dernière ne constituant qu'un cas particulier de la précédente : celui où existe un accroissement de concentration quand le polluant passe du biotope dans la biomasse, quel que soit le niveau trophique de l'organisme concerné.

On dénomme facteur de bioconcentration ( $F_{BC}$ ), la valeur par laquelle la concentration d'un polluant dans un organisme donné excède celle dans le biotope. Celui-ci correspond en définitive aux cas  $F_c(F_{BA}) > 1$  (Ramade, 2011).

### 1.3.2.3. La bioamplification :

La bioamplification est le processus par lequel le prédateur concentre une substance (ou un élément) à un niveau supérieur à celui où il se trouve dans la proie.

Le concept de bioaccumulation résulte de la balance nette des processus de capture, de stockage et d'excrétion d'une substance dans un organisme, due à une exposition dans l'eau, la nourriture, le sédiment et l'air (Neff, 2002). La pénétration, le stockage dans les organes cibles et l'élimination seront sous la dépendance des facteurs abiotiques du milieu, de la nature du contaminant et des caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'organisme ou de l'espèce considérée.

Quand la contamination se fait, les barrières cutanées et respiratoires (pour la contamination directe), et intestinales (pour la contamination trophique) montrent des propriétés biologiques liées à leur structure et aux conditions physico-chimiques de l'environnement (température, pH, électrolytes, etc.) (Casas, 2005). La membrane plasmique est la structure primaire impliquée dans ces processus (Luoma, *et al.*, 1982).

## 2. Choix d'un bioindicateur de la contamination métallique

Les bio-indicateurs sont des organismes vivants utilisés pour surveiller la santé de l'environnement. Ils sont un moyen de détecter et de contrôler les impacts des interventions humaines sur l'environnement, dans le but de minimiser leurs effets négatifs. Les scientifiques utilisent les bio-indicateurs pour quatre raisons : déceler des changements dans l'environnement, détecter la présence de polluants et en mesurer la teneur, déterminer les effets de la pollution sur un écosystème et confirmer l'amélioration de la qualité de l'environnement naturel de l'organisme (Beaumont, 2010).

Il existe plusieurs espèces de poissons qui peuvent être utilisés pour surveiller les impacts de la pollution aquatique et cela pour leurs avantages comme bio indicateurs.

- Ils sont de bons indicateurs de la pollution à long terme, ils intègrent l'ensemble des perturbations sur plusieurs années.
- Par leur mobilité, ils sont représentatifs des perturbations à l'échelle de portions de bassin versant.

- Ils sont consommés par les humains, leur utilisation comme bioindicateur permet l'évaluation de contaminants présents dans leurs tissus. Ils permettent d'évaluer le potentiel de pêches récréatives et commerciales (Barbour *et al.*, 1999).

## **2.1. Présentation de l'espèce bioindicatrice :**

Le Merlu est connu depuis l'antiquité. C'est lui qu'Aristote nommait « Onos » (ane) à cause de sa coloration grise et de la longue ligne noire qui parcourt son flanc. Belon (1553) naturaliste, par analogie avec le brochet, l'appela Maris Lucius d'où son nom actuel de Merluccius (Belloc, 1923).

### **2.1.1. Systématique :**

En Atlantique Nord - Est et en Méditerranée, le genre merlu est présenté par le merlu européen (*Merluccius merluccius* L.). Sur le plan systématique, le merlu occupe la position suivante :

Embranchement : Vertébrés

Sous embranchement : Gnathostomes

Super classe : Poissons

Classe : Osteichthyens

Sous classe : Actinoptérygiens

Super ordre : Téléostéens

Ordre : Gadiformes

Famille : Merluccidés

Sous famille : Merlucinéés

Genre : Merluccius

Espèce : merluccius

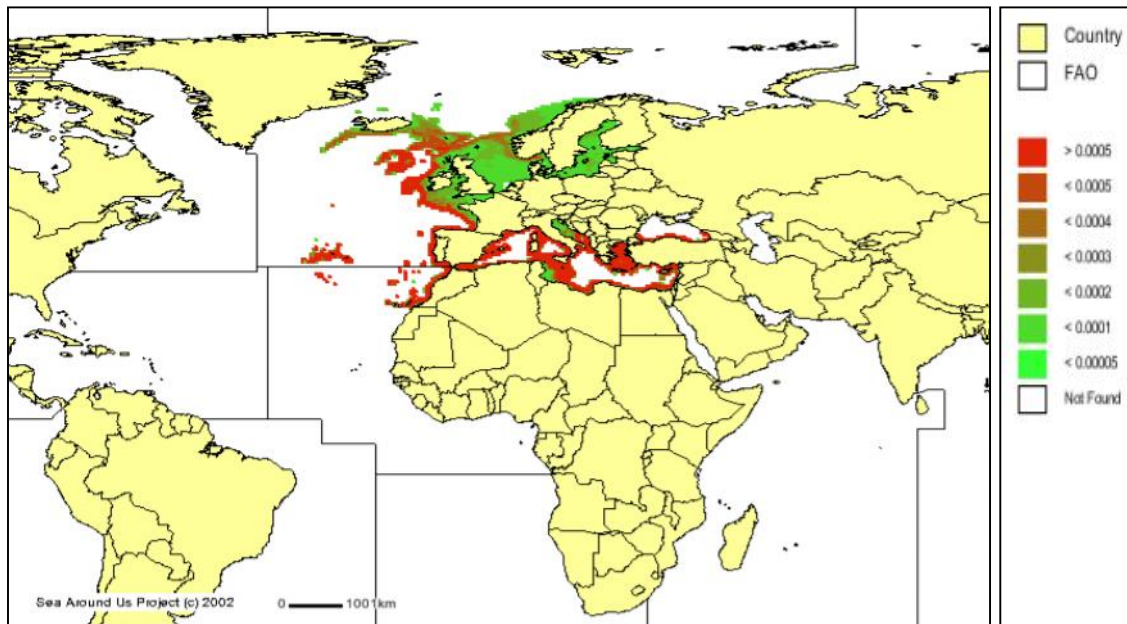


**Figure 3:** *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) ([www.google.fr](http://www.google.fr)).

On en trouve 14 espèces appartenant au genre *Merluccius* connu sous le nom de merlu. Il est largement réparti entre les deux hémisphères, dans les océans atlantique, pacifique et indien. Le merlu européen, *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) ou merlan, ainsi appelé en méditerranée, est la seule espèce de merlu sur les côtes algériennes.

### **2.1.2. Distribution géographique :**

Sur le plan répartition géographique, l'espèce vit le long des côtes du continent européen et du nord de l'Afrique, depuis la Norvège jusqu'en Mauritanie, et en Méditerranée (Figure 4). On la rencontre entre 0 et 1000 mètres de profondeur (Kacher, 2005).



**Figure 4 :** Répartition géographique du merlu européen (Source:www.seararoundus.org).  
L'échelle des couleurs illustre le pourcentage de merlu par rapport au total mondial.

### 2.1.3. Caractères distinctifs :

Corps long, mince et comprimé latéralement. Face supérieure de la tête aplatie, avec une crête basse en forme de V (Figure 6) ; bouche largement fendue, le maxillaire s'étendant jusqu'à la verticale du centre de l'œil; mâchoire inférieure dépassant légèrement la supérieure; dents des mâchoires fortes et inclinables; pas de barbillon au menton; nombre total de branchiospines sur le premier arc 8 à 12. Pas de rayons épineux aux nageoires; deux nageoires dorsales distinctes, la première courte, haute et triangulaire, à 8-11 rayons, la seconde longue et échancrée dans sa partie moyenne, à 35-40 rayons; anale semblable à la seconde dorsale; pectorales longues et minces: pelviennes situées en avant des pectorales; caudale plus petite que la tête, et devenant progressivement fourchue avec la croissance. Ligne latérale plus ou moins parallèle au profil dorsal. Petites écailles cycloïdes, 127-156 le long de la ligne latérale (FAO, 1987).

Taille : Maximum 130 cm (110 en Méditerranée) ; commune de 12 à 60 cm.

Coloration : gris acier sur le dos, plus clair sur les côtés et blanc argenté sur le ventre (FAO, 1987).

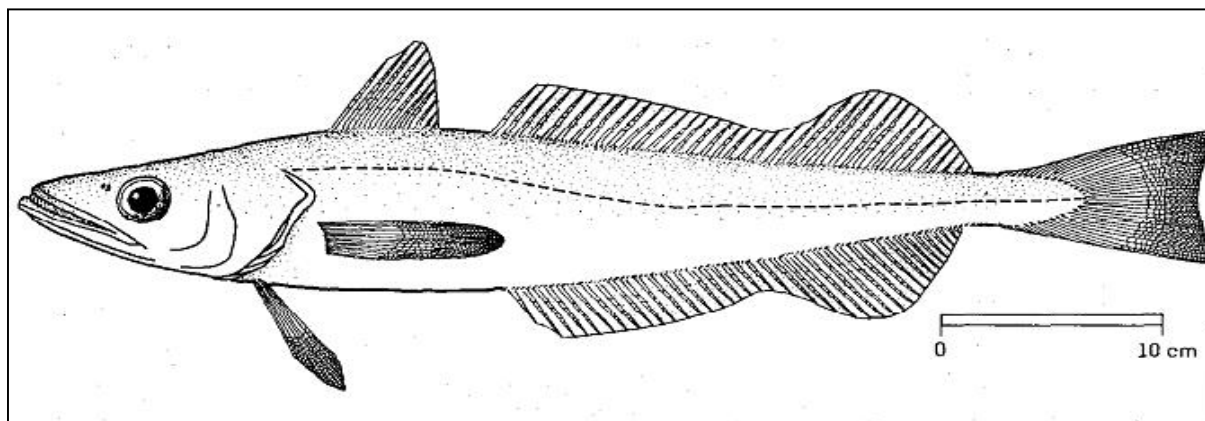


Figure 5 : *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758): Merlu, merlan (FAO, 1987).

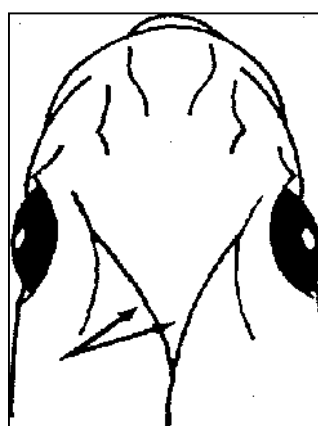


Figure 6 : Tête de *Merluccius merluccius* en vue dorsale (avec crête en forme de V) (FAO, 1987).

#### 2.1.4. Habitat et biologie :

Démersale à bathypélagique, généralement à des profondeurs de 70 à 370 m, très commune sur le bord du talus continental, mais peut se rencontrer des eaux côtières (30 m) jusqu'à 1000m. Vit près du fond pendant le jour, mais s'en éloigne la nuit pour se nourrir.

La période de frai s'effectue toute l'année en Méditerranée mais surtout en hiver et au printemps (Décembre – Juin), sur des fonds de 100 à 300 m.

Les stocks méditerranéens se développent plus lentement. La fécondité est de 2 à 7 millions d'œufs par femelle (FAO, 2010).

La biologie de l'ensemble des espèces du genre merlu est liée aux caractéristiques hydrodynamiques et écologiques du milieu dans lequel elles évoluent. Les rapports entre le merlu et son milieu sont semblable quel que soit le secteur géographique (Jeffrey & Taggart, 2000 ; Olivar *et al.*, 2003 ; Alvarez *et al.*, 2004).

Les différents stades de vie du merlu (Figure 7) montrent une distribution fortement liée à la profondeur. Les juvéniles sont localisés sur le plateau continental au printemps majoritairement, avec des abondances plus fortes sur les fonds de 100 à 200 m. Les jeunes adultes sont également

répartis sur le plateau continental, alors que les adultes plus âgés vivent à des profondeurs plus importantes au niveau de la pente continentale et des têtes de canyons (Belhoucine, 2012).

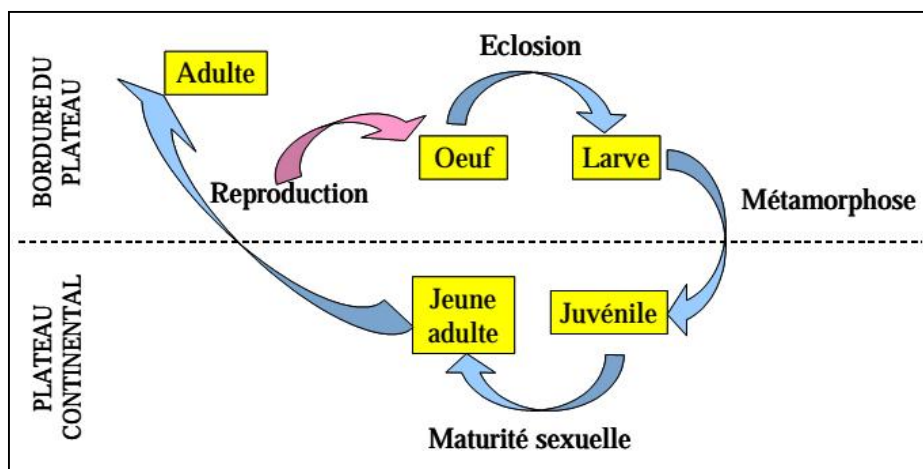


Figure 7 : Principales étapes du cycle de vie du merlu (Bodiguel, 2008).

### 2.1.5. Age et croissance :

La première maturité est atteinte pendant la septième année pour la plupart des femelles (57 cm) et pendant la cinquième année pour les mâles (40 cm) pour la population atlantique ; en Méditerranéen, les mâles mûrissent à 26-27 cm, femelles à 36-40 cm (FAO, 2010).

De nombreux auteurs ont décrit pour le merlu européen, une croissance plus rapide des femelles, comparée à celle des mâles, aussi bien pour la population atlantique (Pineiro & Sainza, 2003) que méditerranéenne (Aldebert & Carries, 1989a ; Recassens *et al.*, 1998). Les tailles maximales observées pour les femelles sont également plus importantes que pour les mâles. Elle atteignent 100.7 cm pour les femelles et 72.8 cm pour les mâles en méditerranée (Aldebert & Recassens, 1995) et respectivement 110 et 80 cm en atlantique (Lucio *et al.*, 2000).

Les raisons physiologiques de ce dimorphisme sexuel n'ont néanmoins jamais été identifiées.

Selon ICES (2006), le merlu européen peut atteindre 1,40 mètre de longueur et un poids 15 kg. Actuellement, on pense que sa durée de vie est de l'ordre de 12 ans (FAO, 2010).

Les adultes se nourrissent généralement de poissons (jeunes merluccidés, anchois, sardines et espèces de gadidés) et de calmars; les jeunes se nourrissent de crustacés (spécialement euphausiacés et amphipodes) (FAO, 2010).

### 2.1.6. Pêche et engins de pêche :

La pêche du merlu, en Algérie est essentiellement dirigée vers le merlu blanc (*Merluccius merluccius*). La population du merlu blanc en Méditerranée algérienne est considérée comme un seul stock. La flottille d'Algérie est composée de plus de 4000 unités de pêche (chalutiers, senneurs, petits métiers) distribuée sur 29 ports, ciblant plusieurs espèces démersales dont le merlu et espèces pélagiques. Leur production annuelle est d'ordre de 150 mille tonnes par an

(FAO, 2007). Les débarquements de merlu en Algérie durant la période de 2002 à 2012 est d'environ 515.00 T (FAO, fishstat, 2012). La pêche au merlu est réalisée principalement par les chalutiers, mais aussi par les petits métiers (filets fixes et palangres de fond) (FAO, 2007).

### 3. Présentation des principaux ETM:

#### 3.1. Le Mercure (Hg):

Le mercure est un métal dont la dynamique dans l'environnement est conditionnée par trois propriétés fondamentales : physique, par sa volatilité à température ambiante ; chimique, par la stabilité de ses liaisons avec le carbone et le soufre ; et biologique par sa très forte bioconcentration et sa toxicité. Les composés du mercure se divisent en deux classes chimiques principales : le mercure inorganique (incluant le mercure élémentaire) et le mercure organique (incluant le méthyl mercure) (Casas, 2005).

Le mercure est le plus toxique des métaux traces, plus particulièrement sous ses formes organiques. La méthylation du mercure est effective dans les sédiments sous l'action des microorganismes et, dans la colonne d'eau, en présence de phytoplancton. La croissance du plancton et de larves de bivalves est retardée à de très faibles concentrations. La bioaccumulation du mercure est très importante dans les chaînes trophiques ; des concentrations en méthyl mercure toxiques pour l'homme peuvent être atteintes dans la chair de poissons situés en fin de chaîne alimentaire (thonidés, squalés) (Lampert, 2007).

#### 3.2. Le Plomb (Pb):

Élément chimique métallique d'un gris bleuâtre, rarement disponible à l'état natif, le plomb est très souvent associé au zinc dans les minerais, Le principal minerai du plomb est la galène (PbS) très souvent associée à la blende et à la pyrite (Chiffolleau *et al.*, 2001).

Le plomb présente une forte affinité pour la matière particulaire. A peine 10 % du plomb se trouve sous cette forme dans l'océan. L'adsorption du plomb sur la matière particulaire est fonction du pH et augmente avec ce dernier (Casas, 2005).

Dans les poissons, les teneurs moyennes sont, la plupart du temps inférieurs à 0.1 µg/g. Pour les crustacés ou les mollusques, les teneurs sont en moyenne de 5 à 10 fois plus élevés (Mennad, 2008).

#### 3.3. Le Cadmium (Cd):

Le cadmium n'existe pas à l'état natif. Son minerai, très rare, est un sulfure, la greenockite (CdS), mais il se trouve dans presque tous les minerais de zinc et il est exploité industriellement comme un sous-produit de la métallurgie du zinc. Il est principalement utilisé pour la fabrication de batteries et le traitement de surfaces des aciers (revêtements anti-corrosion) (Lampert, 2007).

Le cadmium est un élément rencontré en milieu aquatique sous diverses formes physiques (dissoute, colloïdale, particulaire) et chimiques (minérale ou organique). Un ensemble de variables physico-chimiques du milieu (salinité, pH, potentiel redox, caractéristiques sédimentologiques, nature géochimique des particules, concentration en chlorures) gouvernent les transformations du cadmium dans l'environnement (Gonzalez *et al.*, 1999 ; Chiffolleau *et al.*, 2001). Les concentrations du cadmium dans les organismes marins varient d'une famille à

l'autre, les planctons présentent une concentration de 0.3 à 24 µg/g, dans les poissons elle varie entre 0.03 et 2.6 µg/g (Cossa et Lassus, 1989).

### 3.4. Le Zinc (Zn):

Il s'agit d'un oligo-élément indispensable au développement de la vie. Les usages du zinc sont multiples : peintures antisalissures, produits pharmaceutiques et phytosanitaires, conduits d'évacuation des eaux pluviales (gouttières, tuyaux de descente, etc.) et piles. Une grande partie des apports en zinc dans l'environnement est imputable à la métallurgie, à la combustion des bois et des charbons (Andral, 2001).

Le zinc est indispensable au métabolisme des êtres vivants (oligo-éléments) ; en particulier comme coenzyme. Le zinc existe dans l'eau de mer sous diverses formes : ion hydraté ( $Zn(H_2O)_n^{2+}$ ), zinc complexé par les ligands organiques (acides fulviques et humiques) et zinc adsorbé sur de la matière solide (Casas, 2005).

Beaucoup de composés de zinc sont solubles dans l'eau et s'accumulent dans les organismes. C'est un élément essentiel pour tous les organismes et pour l'Homme (Drif, 2012).

Sa toxicité pour les organismes aquatiques n'en fait pas un contaminant prioritaire, bien qu'il agisse à de fortes concentrations sur la reproduction des huîtres et la croissance des larves (Lampert, 2007).

### 3.5. Le Cuivre (Cu):

Le cuivre est un oligo-élément nécessaire à la vie, mais qui peut présenter des effets toxiques à partir d'un certain seuil de concentration. L'utilisation de l'oxyde CuO comme matière active des peintures antisalissures marines constitue une source importante d'introduction dans les zones portuaires. Dans le milieu aquatique le cuivre existe sous forme particulaire, colloïdale et dissoute. Il a tendance à former des complexes avec des bases fortes telles que carbonates, nitrates, sulfates, chlorures (Andral, 2001). Le cuivre est l'un des métaux les plus employés à cause de ses propriétés physiques et de sa conductibilité électrique et thermique. Il est utilisé dans la métallurgie, dans la fabrication des alliages de bronze (avec l'étain), de laiton (avec le zinc) ou de joaillerie (avec l'or et l'argent). Il est très largement employé dans la fabrication de matériels électriques (fils, enroulements de moteurs, transformateurs), dans la plomberie, dans les équipements industriels, dans l'automobile et en chaudronnerie (Amiard, 2011). Les caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, dureté, teneurs en autres inorganiques) agissent sur le degré de dissociation entre les formes métalliques et ioniques. Le cuivre complexé est moins toxique que le cuivre à l'état ionique (Casas, 2005).

La toxicité de ce métal pour les organismes aquatiques dépend de la forme chimique et de l'état d'oxydation dans lequel il se trouve. Néanmoins, la concentration létale apparaît pour certaines espèces à partir de 2Kg/L (larve d'huître par exemple) alors que des retards de croissance sont observés chez le phytoplancton au-delà de 4 Kg/L (Fairbrother *et al.*, 2007 *in* Inal, 2011).

### **3.6. Le Nickel (Ni) :**

Le nickel est un élément métallique très répandu dans la croûte terrestre. Le principal secteur d'utilisation du nickel correspond aux aciers inoxydables (62%) (Chiffolleau, 2001). Il entre également dans la composition de nombreux alliages en raison de ses caractéristiques de dureté et de résistance à la corrosion (12%). Les autres formes d'utilisation sont les traitements de surfaces (10%), les batteries Nickel-Cadmium et les catalyseurs Nickel-Aluminium (Caplat, 2001).

Le transport du nickel vers le milieu marin s'effectue *via* les fleuves sous forme particulaire et *via* l'atmosphère, conséquence de l'utilisation des combustibles fossiles et la production de métaux non ferreux (Caplat, 2001).

Le nickel est beaucoup moins toxique pour les organismes marins que le cadmium ou le mercure. Faiblement bioaccumulable, des effets sur le développement embryonnaire d'invertébrés marins ont cependant été observés (Lampert, 2007).

Zone d'étude

Dans cette partie, sont présentées les caractéristiques de la Méditerranée et sa portion sud-occidentale, le bassin algérien.

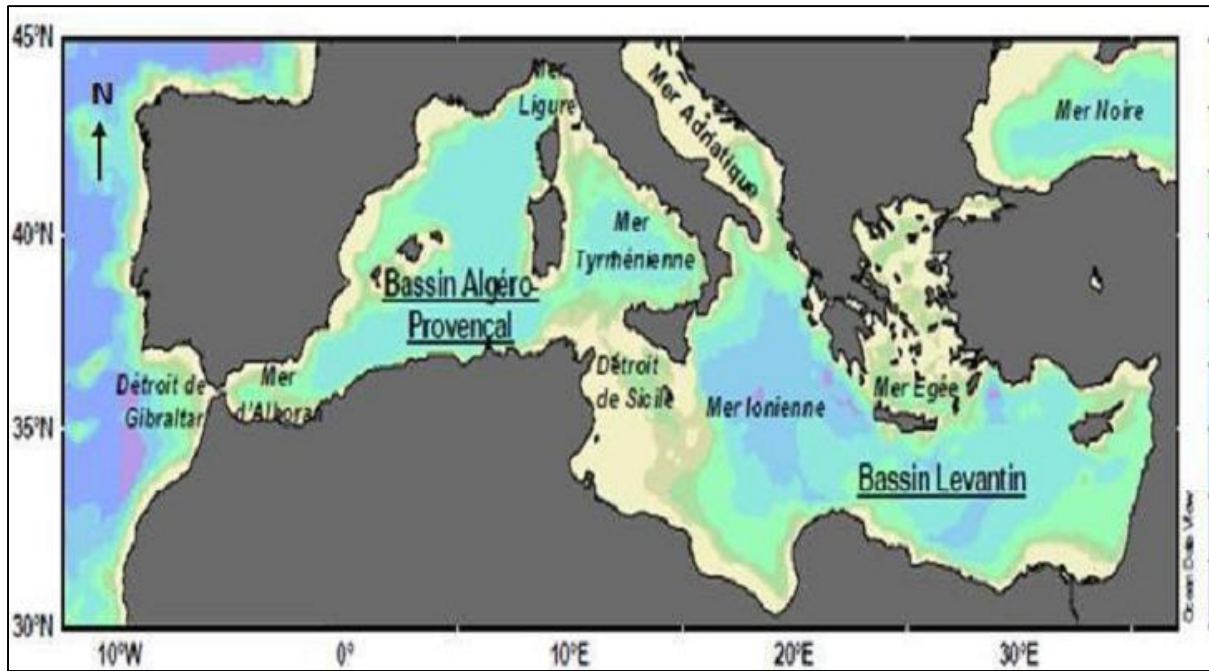
### **1. Caractéristiques générales de la Méditerranée**

La Méditerranée est une mer épicontinentale semi-fermée de 4 000 km de long, de 800 km de large et de 1500 m de profondeur en moyenne. D'une superficie totale de près de 3 millions de km<sup>2</sup> (mer Noire comprise), la Méditerranée représente respectivement 0.7 % et 0.3 % de la surface et du volume de l'océan mondial (Béthoux *et al.*, 1999). Elle est bordée par trois continents : au Nord par l'Europe, au Sud par l'Afrique et à l'Est par l'Asie (Quignard, 2002; Astruc, 2005).

Elle est caractérisée par l'étroitesse de son plateau continental et de sa zone littorale et un bassin hydrographique restreint, particulièrement dans la partie nord. Cette côte méditerranéenne se présente sous la forme de quatre grandes concavités. Elle est constituée de plages sableuses, de platiers rocheux, de falaises mortes ou vives et de grandes dunes dominant immédiatement la côte. Ces structures sont interrompues au niveau des embouchures d'oueds et des lagunes. La Méditerranée est bordée par 23 pays (dont Gibraltar et les Territoires Palestiniens). 69 fleuves se jettent dans la Méditerranée, les plus importants étant le Pô, le Rhône, le Nil et l'Ebre (Béthoux *et al.*, 1999).

La Méditerranée se divise en deux bassins principaux de profondeur comprise entre 2 500 et 5000 m, le bassin Algéro-Provençal et le bassin Levantin, séparés par le détroit de Sicile dont la faible profondeur contribue au découplage hydrodynamique et écologique des deux bassins (Crise *et al.*, 1999). A l'inverse d'autres mers épicontinentales, les marges continentales sont peu développées, à l'exception du plateau Catalan, du plateau Tunisien et du Golfe du Lion, ce qui favorise les interactions directes entre eaux côtières et eaux profondes (Figure 8).

Les mers marginales (mer Adriatique, mer Egée) contribuent par leurs apports à mitiger les conditions d'oligotrophie généralisées en Méditerranée (Crise *et al.*, 1999). Les eaux méditerranéennes sont en effet considérées comme parmi les plus oligotrophes de la planète et se caractérisent par un gradient d'oligotrophie qui s'accroît d'ouest en est (Jacques & Tréguer, 1986).



**Figure 8** : Localisation des principaux bassins, détroits et mers marginales de la Méditerranée (PAM/PNUE-CAR/PB, 2009).

## 2. Description de la cote algérienne

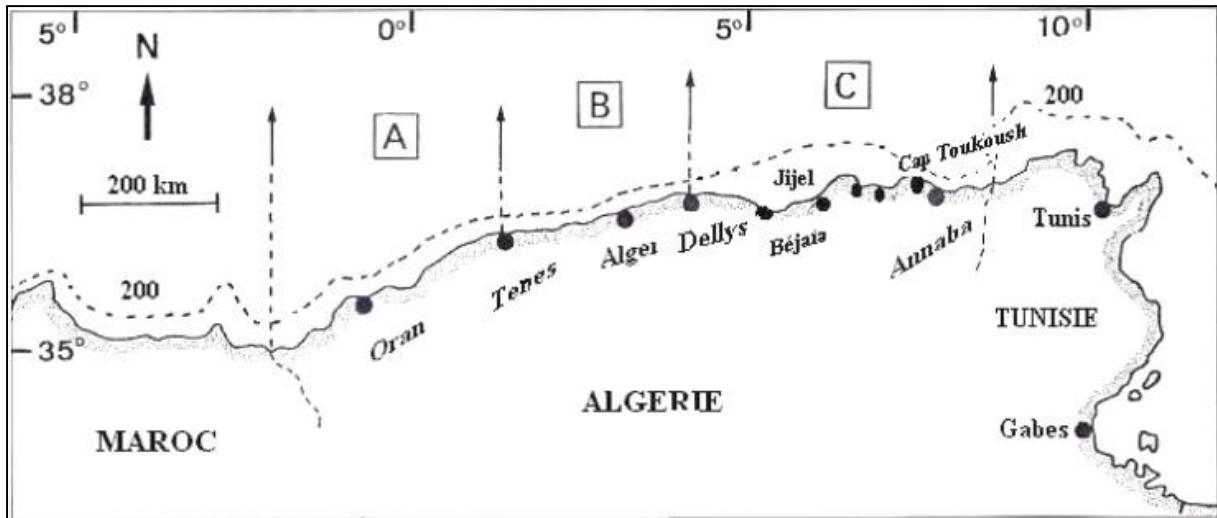
Le bassin algérien est localisé au Sud du bassin occidental méditerranéen à une latitude de 35° à 40° Nord pour une longitude de 2° Ouest à 7° 45' Est. Il est situé à l'Est de la Mer d'Alboran, entre l'Algérie au Sud, les îles Baléares au Nord Ouest et la Sardaigne au Nord Est.

L'Algérie dispose d'une large façade maritime qui se situe au cœur de la Méditerranée. Partie intégrante du sous continent Nord Africain, et s'étend sur une superficie de 2 381 741 km<sup>2</sup>, longe d'Est en Ouest la Méditerranée sur 1 622 km et s'étire du Nord vers le Sud sur près de 2000 km. Du point de vue écologique, le littoral algérien est riche et diversifié.

Sa façade maritime longue alterne rivage rocheux, plages sablonneuses et zones humides. Ce littoral est caractérisé par un plateau continental réduit à l'exception de la région de Ghazaouet (wilaya de Tlemcen) à l'extrême Ouest, et la région d'El Kala (wilaya d'El Taref) à l'extrême Est (Benzohra & Millot, 1995).

Ainsi la côte algérienne peut se diviser en trois grands secteurs (Figure 9) :

- le secteur occidental (A) : de la frontière algéro-marocaine à l'Ouest jusqu'à Ténès à l'Est
- le secteur central (B) : de Ténès à Dellys
- le secteur oriental (C) : de Dellys à l'Ouest jusqu'à la frontière Algéro-tunisienne à l'Est



**Figure 9 :** Carte du bassin algérien (A : région Ouest ; B : région Centre ; C : région Est).

La superficie maritime sous juridiction nationale offre environ 10 millions d'hectares aux activités de pêche, mais la majeure partie de la flottille exploite seulement le plateau continental (Lalami, 1979).

### 2.1. Caractéristiques des fonds :

La côte algérienne se caractérise par une nature essentiellement rocheuse. De petites chaînes de montagne séparent certaines plaines (comme la Mitidja et la plaine d'Annaba) du rivage. La topographie sous-marine correspond à celle de la côte:

- une succession de baies d'importance inégale présentent un fond à substrat meuble, favorable aux arts traïnants. Ces fonds s'étendent en pente douce jusqu'à l'isobathe 800m bien que souvent interrompus de vallées sous-marines ;
- des fonds rocheux avec des fosses profondes, correspondant aux zones littorales montagneuses.

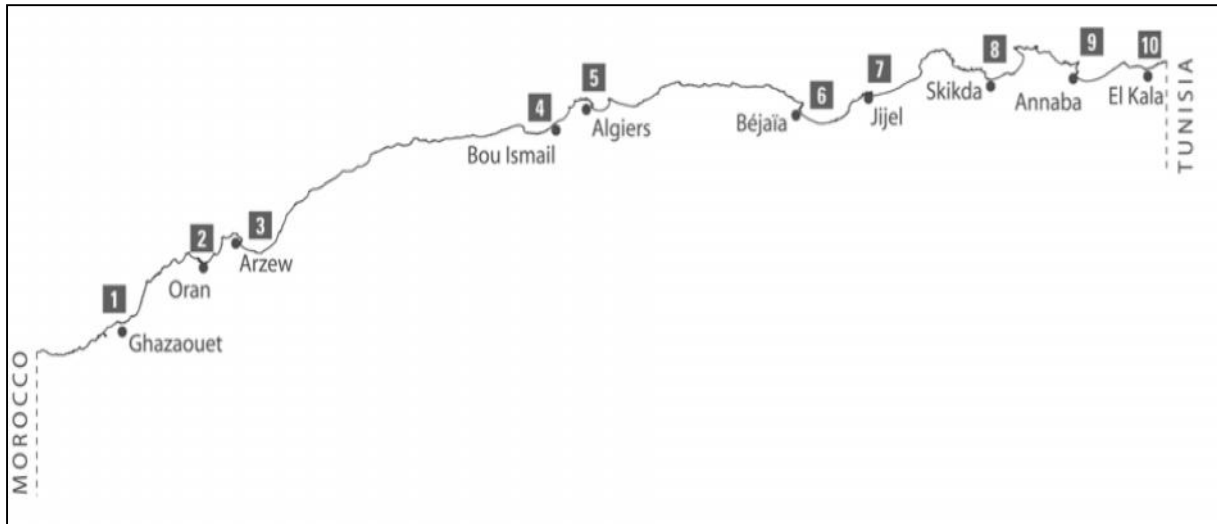
Les différents secteurs de la côte sont caractérisés par un plateau continental très réduit, voire absent. Le talus continental est très étroit ; sa largeur est d'environ 10 milles marins (Lalami, 1979). Les fonds de 500 m sont distants d'environ 3 milles marins de la côte sur près de la moitié de la longueur du littoral (FAO, 1980).

### 2.2. Baies et golfes de la cote algérienne :

La cote algérienne, elle se présente comme une succession de baies et de golfes plus au moins ouverts séparés par des régions très escarpées. Les hautes falaises qui bordent en générale cette côte sont naturellement soumises à des érosions marines et éoliennes (Grimes, 2010), et selon Refes (2011), ces falaises forment des abris efficaces contre les vents d'Ouest et du

Nord-Ouest, en conséquent, les baies et golfes algériens sont généralement plus protégés à l'Ouest qu'à l'Est.

Allant d'Ouest en Est, les baies et golfes se présentent comme suit : golfe de Ghazaouet ; golfe d'Oran ; golfe d'Arzew ; baie de Bou-Ismaïl ; baie d'Alger ; golfe de Bejaïa ; baie de Jijel ; golfe de Skikda ; golfe de Annaba ; cote d'El Kala (Figure 10).



**Figure 10 :** Baies et golfes de la cote algérienne.

### **2.3. Courantologie, Hydrologie et facteurs du milieu :**

#### **2.3.1. Circulation des eaux le long des côtes algériennes :**

Le flux d'eau d'origine Atlantique venant du détroit de Gibraltar vient rejoindre les côtes algériennes aux environs d'Oran (ouest algérien) vers 0° d'où la grande influence du courant Atlantique sur la côte oranaise. Ce courant turbulent prend la dénomination de courant Algérien à cause de son caractère spécifique d'écoulement le long des côtes algériennes (Millot, 1985).

La côte algérienne est caractérisée par deux couches d'eaux superposées, l'eau Atlantique modifiée et l'eau Méditerranéenne. En effet, l'eau Atlantique pénètre dans la mer d'Alboran où ses caractéristiques initiales commencent à s'altérer, donnant ainsi naissance à l'eau Atlantique modifiée (Benzohra, 1993).

Le long des côtes algériennes, l'eau Atlantique modifiée décrit un écoulement plus ou moins stable avant de se diviser en deux branches. Dans le bassin Algérien, l'eau Atlantique modifiée pénétrerait (Millot, 1987 ; Benzohra, 1993) sous forme d'une veine de courant étroite qui donne naissance à des méandres et tourbillons côtier associés à des upwellings (Taupier-Letage et Millot, 1988) (Figure 11). Ces derniers favoriseraient une forte productivité biologique et par conséquent, augmentation des capacités trophiques du milieu (Rouane, 2013).

Ces tourbillons joueraient aussi un rôle important dans le transfert des polluants d'un site à un autre. Il est observé dans les baies des courants locaux avec des vitesses de l'ordre de 0.3 m/s (METAP, 1994).

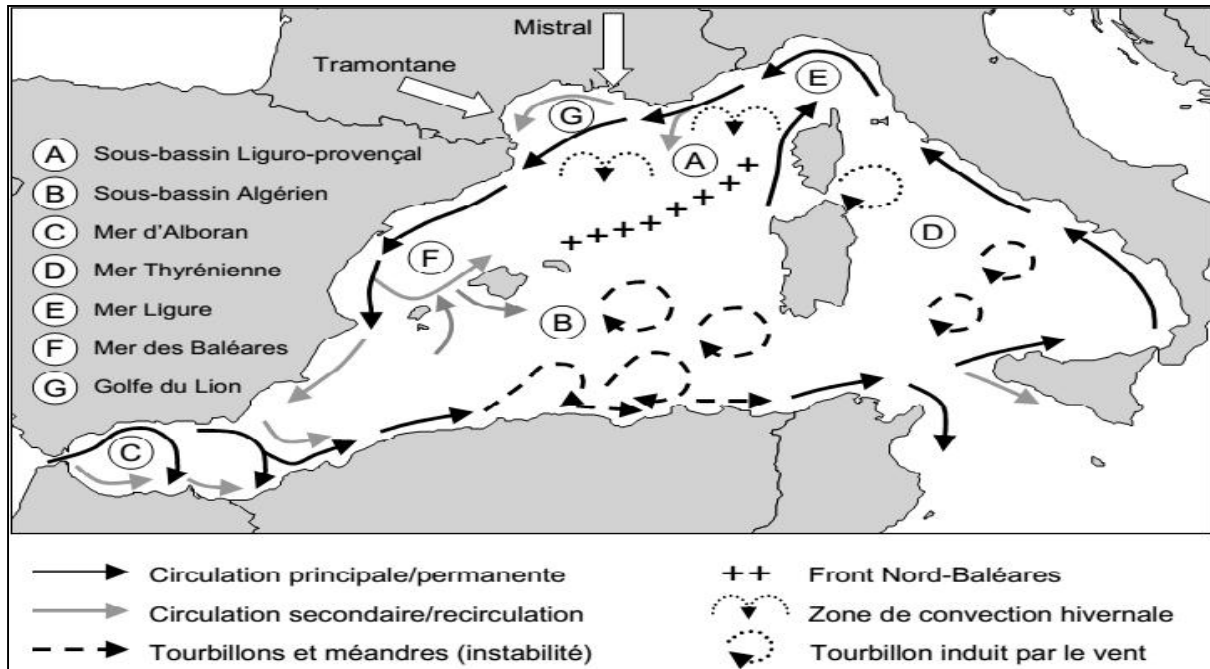


Figure 11 : Circulation de l'eau de surface d'origine Atlantique (AW) dans le Bassin Occidental de la Méditerranée (d'après Millot & Taupier-Letage, 2005).

### 2.3.2. Température et salinité des eaux littorales :

Les courants constituent les mouvements les plus puissants et les plus continus qui affectent les eaux marines. En surface, l'eau du courant algérien est présente tout le long de la côte algérienne et se caractérise par une température moyenne de 20,50° C et une salinité inférieure à 37,10 ‰ (Millot, 1985).

Selon le même auteur, au niveau de 20 m, le taux de salinité accuse une diminution très nette. Au niveau de 50 m et 100 m, le courant algérien s'éloigne sensiblement du littoral en raison de son instabilité, le taux de salinité est alors de 36,8 ‰ dans le secteur Ouest et 37 ‰ dans le secteur Est. Les températures maximales des niveaux 50 et 100 m varient entre 15,50° et 16,27°C.

A 200 m, l'influence du courant sur la frange côtière algérienne est marquée par une salinité légèrement plus basse que celle des eaux du large; celle-ci varie entre 38,3 ‰ et 38,6 ‰ (Boutiba, 1992).

## **2.4. Principales Caractéristiques climatiques :**

Le littoral algérien à l'instar de l'ensemble de la région méditerranéenne est caractérisé par son climat typique ; chaud et sec en été, doux et relativement humide en hiver. Ces conditions sont dues à l'alternance de brise de mer fraîche et humide et de brise de terre chaude et sèche.

### **2.4.1. Température :**

Les régions côtières sont caractérisées par un climat modéré. Généralement, sur le littoral algérien la température minimale de l'air ne s'abaisse pas au dessous de 0° C et la maximale ne dépasse pas 4° C. La moyenne annuelle de température est de 20, avec des moyennes mensuelles extrêmes de 28 à 35° C en mois d'août et 23° C en avril (Boutiba, 2004).

### **2.4.2. Les précipitations :**

Les précipitations du nord de l'Algérie sont liées principalement à l'influence de l'arrivée de fronts dépressionnaires du Nord Nord-Ouest, souvent de l'Atlantique.

Des variations spatiotemporelles sont mises en évidence dans le littoral algérien, avec une diminution considérable de la cote vers l'intérieur du pays, à une trentaine de kilomètres de la mer au Sud, le pic de janvier est déjà réduit d'environ 30%, ainsi la saison des pluies est essentiellement en hiver.

La région Est de la côte algérienne est caractérisée par un climat méditerranéen à caractère subhumide avec une pluviométrie moyenne de 900 mm par an, dont la période d'octobre à avril représente 75 % de la pluviométrie moyenne annuelle avec des précipitations maximales au mois de décembre (O.N.M, 2010).

Dans la région occidentale plus de 60 % du total annuel des pluies est enregistré pendant la seule saison hivernale. Le mois de janvier enregistre 30 % de la pluie littorale annuelle, tandis que le mois de décembre en enregistre 10 % (Bouras *et al.*, 2007).

### **2.4.3. Régime des vents :**

Dans la région orientale du littoral Algérien, les observations réalisées par les stations météorologiques d'El Kala, d'Annaba, de Skikda, de Jijel et de Bejaïa entre 2000 et 2005 indiquent la prédominance absolue des vents du Nord - Ouest, particulièrement en période hivernale, où on remarque une légère diminution de la fréquence des vents en printemps et en été. Cette diminution de la fréquence des vents de secteur Nord - Ouest est compensée par une augmentation des vents du Nord - Est en période estivale (O.N.M, 2005).

Les observations marines côtières et les données axées sur 30 ans montrent que les vents du secteur Ouest Algérien sont dominants pendant les saisons automnales et hivernales, avec une direction presque perpendiculaire par endroit à la côte, variant entre 0 et 80 Km/h.

Selon Ghodbani (2001), les mois de sécheresse sont les mois à prédominance des vents Nord - Est. Il existe, par ailleurs, des vents chauds (Sirocco) provenant du Sud et Sud – Ouest, ce sont des vents chauds et secs de 09 à 16 jours par an.

En plus, le vent est une des forces régissant les courants et les houles (Zeghdoudi, 2006).

Ces dernières constituent un facteur écologique très important le long du littoral algérien en absence des courants permanents et des marées puisqu'ils sont les seuls à agir activement au niveau des baies et des golfes de la côte au large (Boutiba, 1992).

Les effets de houles ont été étudiés pendant plus de deux ans le long du littoral algérien par Leclaire (1972). Cet auteur a pu caractériser le régime saisonnier de ces houles par une rose annuelle avec deux directions principales :

- La première direction est représentée par 80 % de ces houles de direction W.N.W. (300°) qui se produisent l'hiver et qui dure en moyenne de 8 à 10 s.
- La deuxième direction est N.N.E. (20 - 40°) dont la majorité se produit pendant l'été.

## 2.5. Réseau hydrographique :

Le réseau hydrographique aboutissant en mer compte 31 oueds, dont les plus importants sont les oueds Tafna, Chelliff, Mazafran, El Harrach, Soummam, Sebaou, Isser, El Kebeir, Saf Saf, Seybouse (Figure 12). Ce réseau alimente le milieu marin en apports terrigènes. Les oueds constituent des collecteurs de tous les polluants issus des activités humaines, agricoles et industrielles (Grimes, 2010).

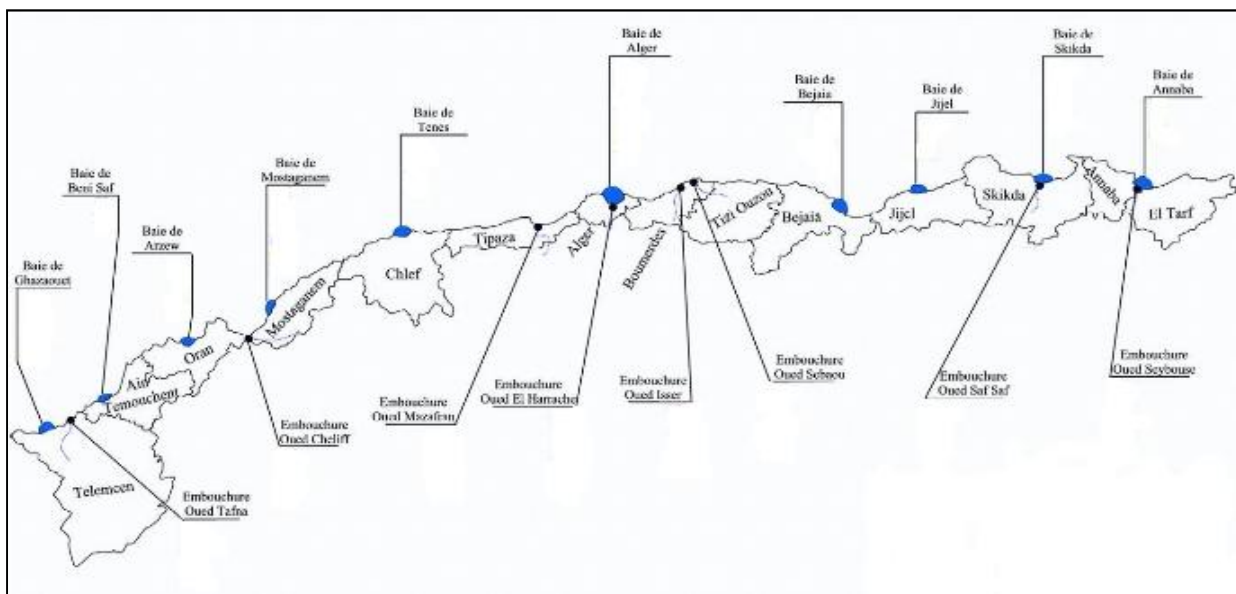


Figure 12 : Les principaux oueds Algériens (Grimes, 2010).

### **3. Principales pressions anthropiques le long de la côte algérienne**

La population du domaine exclusivement littorale présente une densité très élevée, soit près de 800 hab/km<sup>2</sup>, très loin de la moyenne nationale. Cette forte pression humaine, qui le plus souvent s'explique par des considérations socio-économiques, génère de fortes pollutions multiformes (organique, chimique, thermique, bactérienne...).

L'industrie algérienne dominée par les activités pétrochimique, chimique, sidérurgique et aujourd'hui agroalimentaire s'est concentrée dans la bande littorale où l'on recense plus de 50 % des unités industrielles nationales. La zone algéroise concentre à elle seule 38 % des unités industrielles du pays.

Les zones côtières les plus affectées par la pollution hydrique, sont adjacentes aux grandes métropoles (Alger, Oran, Annaba) ou bien voisines des complexes industrialo-portuaires (Ghazaouet, Mostaganem, Arzew, Béjaia, Skikda). Ces zones sont le réceptacle de diverses sources de pollution :

- Les rejets domestiques des grandes villes maritimes ; Alger, Annaba et Oran sont les villes les plus exposées aux conséquences de la pollution organique.
- Les rejets des industries chimiques et pétrochimiques ; même s'il est difficile d'être exhaustif et sans les hiérarchiser on retrouve : **les métaux lourds**, les hydrocarbures et les composés organiques, l'acide sulfurique, les matières fibreuses et les substances chromiques, les éléments basiques, les composés azotés, les cyanures, les catalyseurs usagés et les goudrons, la soude, les pesticides, les détergents les organochlorés.
- Les rejets des centrales thermiques: les eaux de refroidissement des unités de SONELGAZ augmentent la température des eaux marines et leur teneur en chlore (Marsat El Hadjadj, Alger, Cap Djinet).
- Le lessivage des sols des grands périmètres agricoles (littoral centre et plaine d'Annaba surtout) élève la teneur en éléments nutritifs des zones marines voisines (rejets du à la fabrication des fertilisants agricoles à Annaba) (Grimes, 2010).

**Tableau 3** : Principales sources de la pollution industrielle des wilayas littorales (**D**: Domestique – **I** : Industrielle) (Grimes, 2010).

<b>Wilayas Littorales</b>	<b>Sources de Pollutions</b>
Tlemcen	ALZINC <b>(D-I)</b>
Béni Saf	Ciment, Ferphos Sablière Terga <b>(D)</b>
Oran	Pétrochimie, ENGI, Alzofer, EMB, Fertilge <b>(D)</b>
Mostaganem	Soachlore, Giplait, Megisserie, Papier, Sucre, Agro-alimentaire <b>(D-I)</b>
Chlef	PMI-PME, Alufer, Alumetal, Papier, verrerie <b>(D)</b>
Tipaza	PMI-PME, Alufer, Alumetal, Papier, verrerie <b>(D)</b>
Alger	Corps gras, Agroalimentaire, Papier, Cosmétique, Centrale électrique, Tannerie Hydrocarbures <b>(I-D)</b>
Boumerdès	Laiterie, Agroalimentaire, Aluminium, Médicaments, Centrale électrique <b>(D-I)</b>
Tizi-Ouzou	Abattoirs, Agroalimentaire, Laiterie, Huilerie, Electroindustrie Cotonnière <b>(D-I)</b>
Bejaïa	Agro-alimentaire, Corps gras, Emballage, Hydrocarbures, Naphtal <b>(I-D)</b>
Jijel	Conserverie, Agroalimentaire, Verre, Centrale électrique, Tannerie <b>(D)</b>
Skikda	Pétrochimie, Centrale électrique, Gaz industriels <b>(I-D)</b>
Annaba	Agro-alimentaire, Ferphos, Ferroviaire Arcelor Mittal, Centrale électrique, engrais azotés et phosphatés <b>(I-D)</b>
El Kala	Conserverie, Agroalimentaire, Galvatube, Aciérie, Centre d'enfutage <b>(D)</b>

# Matériels et Méthodes

## **1. Travaux effectués en mer**

### **1.1. Choix et intérêts de l'espèce**

Les polluants bioaccumulateurs peuvent avoir des effets toxiques sur les organismes. Ainsi il a été proposé qu'ils soient utilisés en tant que sentinelles des effets de pollution (Bayne, 1989).

Pour ce travail, nous avons choisi le Merlu comme espèce bioindicatrice car elle répond à plusieurs caractéristiques dont l'abondance, l'accessibilité, la longévité ainsi qu'une taille facilitant les manipulations. Aussi, le choix de cette espèce est intéressant car elle forme un maillon important dans la chaîne trophodynamique et est très appréciée par une forte population ichtyophage donc susceptible d'accumuler d'importantes quantités de polluants contenus dans l'eau de mer.

L'Homme, dernier maillon de la chaîne alimentaire, restera pour toujours exposé aux problèmes de la contamination par consommation de ce produit de pêche. La bioaccumulation des ETM dans son organisme pouvant engendrer des conséquences pathologiques les plus sévères. Il est donc impératif que le problème de toxicité puisse être appréhendé dans son ensemble pour non seulement, la conservation de notre environnement mais aussi pour la sauvegarde de notre état sanitaire.

Parmi les projets intégrés de méditerranée (MEDICIS), on y trouve le programme pluridisciplinaire et multidisciplinaire MERLUMED entrepris entre 2005 et 2008 par l'IFREMER, dans le but de comprendre le transfert et la bioaccumulation des contaminants dans le merlu (*Merluccius merluccius*) du golfe du Lion en Méditerranée Nord Occidentale et dans les espèces principales de son réseau trophique.

Un projet qui montre tout l'intérêt qu'on devrait consacrer aux organismes marins pour de telles études.

### **1.2. Prélèvement des échantillons**

L'échantillonnage a été effectué à bord du navire de recherche « Grine Belkacem » lors de la campagne d'évaluation des ressources démersales (ALDEM 2013) réalisée par le Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et l'Aquaculture « CNRDPA ». Ceci nous permet d'être sûrs de leur état de fraîcheur, de connaître la date de leur capture et de leur lieu de pêche.

### **1.3. Positionnement des stations**

Les dates, les coordonnées géographiques, correspondant à la position du navire scientifique en début et en fin de chaque pêche réalisées sont regroupées et présentées sous forme de tableau (Tableau 4).

Le paramètre de stratification retenu est la profondeur, avec les limites bathymétriques suivantes: strate A (20-50m), strate B (51-100m), strate C (101-200m), strate D (201-500m) et strate E (501-800m).

**Tableau 4** : Coordonnées géographiques des traits de pêche :

n° trait	Wilaya	Date	Strate	Début de filage		Fin de virage	
				Latitude	Longitude	Latitude	Longitude
39	Tipaza (Bou Ismail)	20/06/13	D	36° 49,891N	002° 45,795E	36° 52,069N	002° 51,283E
43		21/06/13	C	36° 40,096N	002° 36,279E	36° 42,746N	002° 40,067E
47	Mostaganem	22/06/13	B	35° 59,777N	000° 01,326E	35° 57,161N	000° 00,872W
49		23/06/13	D	36° 03,361N	000° 03,640W	36° 05,249N	000° 00,736W
55	Ain Temouchent (BeniSaf)	24/06/13	B	35° 37,252N	001° 07,515W	35° 35,934N	001° 10,736W
63	Tlemcen	27/06/13	C	35° 12,093N	001° 55,546W	35° 11,327N	001° 59,621W
67		28/06/13	D	35° 17,806N	001° 45,094W	35° 19,566N	001° 41,494W
68			C	35° 18,392N	001° 40,695W	35° 16,670N	001° 43,853W

#### 1.4. Organes prélevés

Il peut être intéressant de distinguer les concentrations dans divers organes ou tissus des êtres vivants. Lors des dissections il faut utiliser de préférence des outils en plastique blanc (dont la polymérisation n'a pas été effectuée avec des métaux) et éventuellement pour les organes durs des outils en acier inoxydable, à condition de ne pas chercher à doser le chrome ou le nickel. Dans certains cas l'utilisation d'outils en titane peut être nécessaire (Amiard, 1994).

Vu que le dosage contient les éléments toxiques, nous avons utilisé des ustensiles en plastique. Cependant, il faut veiller au nettoyage du lieu de travail (paillasse) par désinfection à l'eau de javel et l'utilisation de film alimentaire et des feuilles en aluminium.

- **Le foie** : ses fonctions de détoxification et de stockage des contaminants en font un bon indicateur d'exposition, en particulier à des contaminations chroniques non seulement par voie directe mais également par voie indirecte (trophique). Après leurs prélèvements, les foies de l'espèce sont mis dans des piluliers stérilisés, fermés hermétiquement et étiquetés.

- **Le muscle** : sa quantité de graisse importante en fait un organe privilégié pour le stockage des contaminants lipophiles (mercure, contaminants organiques...). Après dissection et éviscération des poissons, ils sont lavés à l'eau distillée, et à l'aide d'un couteau en plastique, enlever les écailles (difficile à minéraliser) et découper des filets de muscle au niveau de la partie abdominale de l'individu. Les filets prélevés sont mis dans des piluliers stérilisés préalablement, fermer hermétiquement et étiqueter.

- **Les gonades** : l'étude de ces organes est très intéressante car pendant la période de reproduction, les poissons consomment de l'énergie, et donc ont tendances à stocker davantage de nutriments, présents dans le milieu contaminé, ce qui a pour conséquence une bioaccumulation

au niveau des organes de reproduction. Après prélèvement, on effectue la même procédure que pour le foie et le muscle.

### **1.5. Conservation des échantillons**

Afin de conserver l'état de fraîcheur des organes à traiter, ils sont transportés au laboratoire dans une glacière, les échantillons sont conservés dans une chambre froide à -18° C au niveau du navire « Grine Belkacem » jusqu'à leur traitement (lyophilisation).

Lors de la conservation, les principales causes de pertes des éléments métalliques sont l'adsorption sur le flacon, la perte par volatilisation, les transformations chimiques et biochimiques (Amiard, 1994).

## **2. Travaux effectués au laboratoire**

### **2.1. Le dosage des métaux traces**

Le dosage d'éléments métalliques en trace dans le milieu marin nécessite un contrôle rigoureux et permanent des différentes étapes, car il existe des risques de contamination des échantillons du moment de prélèvement à celui de l'analyse finale. Pour cela, un soin particulier a été apporté aux prélèvements et aux méthodes de dosage des métaux (AIEA, 2001).

Le dosage a été réalisé au laboratoire des métaux traces de la station de recherche de Sidi Fredj et l'analyse à l'Observatoire National de l'Environnement et du Développement Durable « O.N.E.D.D ».

#### **2.1.1. Nettoyage des instruments :**

Afin d'éviter les contaminations, tout instrument utilisés sont minutieusement nettoyés et conditionnés selon le protocole suivant :

- Lavage aux détergents commerciaux ;
- Rinçage à l'eau courante (eau du robinet) ;
- Rinçage à l'eau bidistillée obtenue sur système Milli Q (Millipore) et ayant une résistivité de 18M ;
- Séchage à l'étuve à 70° C pour le matériel en Téflon et à environ 40° C pour le matériel en polyéthylène (tels que les tubes coniques) ;
- Rinçage à l'eau acidulée (100ml pour 1000ml, 10%) préparée à partir d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) concentré à 69% pour analyse ;
- Rinçage à l'eau bi distillée ;
- Séchage à l'étuve.

Ces opérations doivent être effectuées impérativement avant chaque utilisation du matériel.

### **2.1.2. Lyophilisation :**

La détermination des concentrations en éléments traces nécessite une lyophilisation. La lyophilisation est le procédé de déshydratation par sublimation. C'est à dire que l'eau contenue dans l'échantillon passe directement de l'état solide à l'état gazeux sans passer par l'état liquide, ce qui permet à l'échantillon de maintenir ses propriétés chimiques initiales.

Les échantillons congelés sont immédiatement mis à sécher dans le lyophilisateur à basse température (-50 à -60°) C et sous vide ( $10^{-1}$ bar) pendant 48 h par un lyophilisateur (modèle CHRIST BETTA 1-8) (Figure 1, Annexe I).

### **2.1.3. Broyage :**

Les échantillons lyophilisés sont broyés à l'aide d'un mixeur et quelques uns effrités a la main jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette étape permet d'éviter les problèmes de granulométrie lors de l'analyse. Les échantillons en poudre sont récupérés dans les piluliers étiquetés (Figure 2, Annexe I).

### **2.1.4. Homogénéisation :**

Avant chaque pesée, on effectue une homogénéisation manuelle des échantillons ceci dans le but d'avoir une répartition homogène des particules dans l'échantillon.

## **2.2. Extraction des métaux traces**

### **2.2.1. Minéralisation ou combustion par voie humide :**

Dans le cas des échantillons biologiques, la minéralisation sera pratiquement similaire que l'on ait à faire à des matières fraîches ou des matières sèches. La méthode de minéralisation retenue dépendra de l'appareillage d'absorption atomique que l'on possède et surtout de la correction des absorbances non spécifiques. Ainsi si l'on dispose d'une correction à effet Zeeman, une simple dilution dans l'acide nitrique sera dans la plupart des cas suffisant. La température de minéralisation a une grande importance pour les éléments volatils notamment Hg, Se, Cd, Pb, ... ou des pertes non négligeables sont détectables dès 100°C. Le recours aux réacteurs fermés en téflon et aux fours à micro-ondes peuvent être dans certains cas indispensables (Amiard, 1994).

**Principe :** La minéralisation est nécessaire avant la mesure des métaux. Elle a pour but de détruire la matière organique et de mettre les éléments à analyser dans leur état ionique le plus oxydé (Andral, 2002).

#### **2.2.1.1. Minéralisation à blanc :**

Cette étape doit permettre l'élimination des matières minérales et des matières organiques tout en rendant la matrice moins ou plus volatile, par l'utilisation d'une température de minéralisation optimisée et contrôlée améliore notablement la sensibilité, ou en utilisant des composés oxydants comme certains gaz (oxygène ou air) et/ou des réactifs chimiques oxydants (acide nitrique, nitrates d'ammonium, de magnésium, ...). La stabilisation de l'élément à doser est obtenue en le transformant en ses formes les plus stables thermiquement (Amiard, 1994).

**Pratique :** Mettre 5ml d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) concentré à 69% dans chaque godet à téflon, puis fermer hermétiquement, et poser sur plaque chauffante à 120° C pendant 2:30 heures. Laisser refroidir les godets, verser l'acide dans un récipient en travaillant sous hotte puis rincer les godets à l'eau bidistillée et sécher à l'étuve à environ 70°C pendant 20 minutes (Figure 4, Annexe I).

### 2.2.1.2. Minéralisation des sous-échantillons :

Selon le protocole décrit par le PNUE MED POL (2003 et 2004), la minéralisation a lieu sous hotte aspirante.

**Pratique :** Dans un godet en téflon, peser environ 0,5g d'échantillon lyophilisé. Y ajouter 5ml d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) concentré à 69%, puis fermer hermétiquement. Laisser les échantillons agir à température ambiante pendant une nuit (minéralisation à froid) afin d'éviter un début de réaction trop brusque, puis les mettre sur plaque chauffante à 120° C pour le nickel, le zinc, et à 90° C pour le mercure pendant 2:30 à 3 heures.

Une fois le temps écoulé et après refroidissement, ouvrir délicatement les godets, et rincer les parois au minimum trois fois avec de l'eau bidistillée puis récupérer les rinçages dans des tubes en polypropylène de 50ml. Dans le cas du mercure, on a ajouté 1 ml de bichromate de potassium ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 5%) (50g pour 500ml à 10%) (Figure 5, Annexe I).

Pour chaque série de minéralisation on réserve un godet pour témoin (le blanc) et un godet pour l'échantillon d'intercalibration.

Les tubes, bien étiquetés, sont ensuite conservés au réfrigérateur à + 4° C jusqu'au moment du dosage afin d'éviter toute perte et contamination.

## 2.3. Analyse des métaux traces

Sur la base de l'évaluation de la qualité des produits de la mer Méditerranée par référence à leur teneur en métaux traces faites par le PNUE MED POL (2003 et 2004), et l'AIEA (2004), la méthode indiquée est la spectrophotométrie d'absorption atomique SAA.

### 2.3.1. Spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) :

La spectrométrie d'absorption atomique (AAS) est une technique décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois par Walsh (1955). AAS étudie les absorptions de lumière par l'atome libre. C'est une des principales techniques mettant en jeu la spectroscopie atomique dans le domaine UV-visible utilisée en analyse chimique. Elle permet de doser une soixantaine d'éléments chimiques (métaux et non-métaux). Les applications sont nombreuses étant donné qu'on atteint couramment des concentrations inférieures au mg/L (ppm).

**2.3.1.1. Principe :** Son principe consiste à porter les éléments à leur état atomique sur le trajet même d'un rayon lumineux, et à effectuer simultanément une mesure de l'absorption des atomes formés à une longueur d'onde. La proportionnalité entre l'absorbance et la concentration permet

de calculer les teneurs dans les échantillons. La formation d'atomes neutres peut être réalisée de deux manières différentes :

- Par vaporisation et atomisation dans une flamme (SAA flamme) ;
- Par pyrolyse et atomisation dans un four en graphite (SAA sans flamme ou Four).

Le premier procédé (SAA flamme) est moins sensible et est employé pour déterminer les teneurs en Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb et Zn dans la matière vivante. La seconde technique (SAA sans flamme) est utilisée pour le Cd dont les teneurs sont beaucoup plus faibles en règle générale (Perez *et al.*, 2000).

**Loi de Beer – Lambert :** L'intensité de l'absorption dépend directement du nombre de particules absorbant la lumière selon la loi de Beer-Lambert. D'après cette dernière, la densité optique d'une solution d'une substance absorbante dans un solvant transparent est proportionnelle à l'épaisseur de la solution traversée et à la concentration des substances absorbante de la solution (Audigie *et al.*, 1985).

$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot L \cdot C}$$

La lecture s'effectue en absorbance (A) ou en densité optique (DO) :

$$A = DO = \log I_0/I = \epsilon \cdot L \cdot C$$

Où : I : Intensité de l'énergie lumineuse transmise (émergente).

$I_0$  : Intensité de l'énergie lumineuse émise (incidente).

$\epsilon$  : Coefficient d'absorption atomique (constante).

L : Longueur du trajet optique (constante).

C : Concentration de l'élément absorbant (analyte).

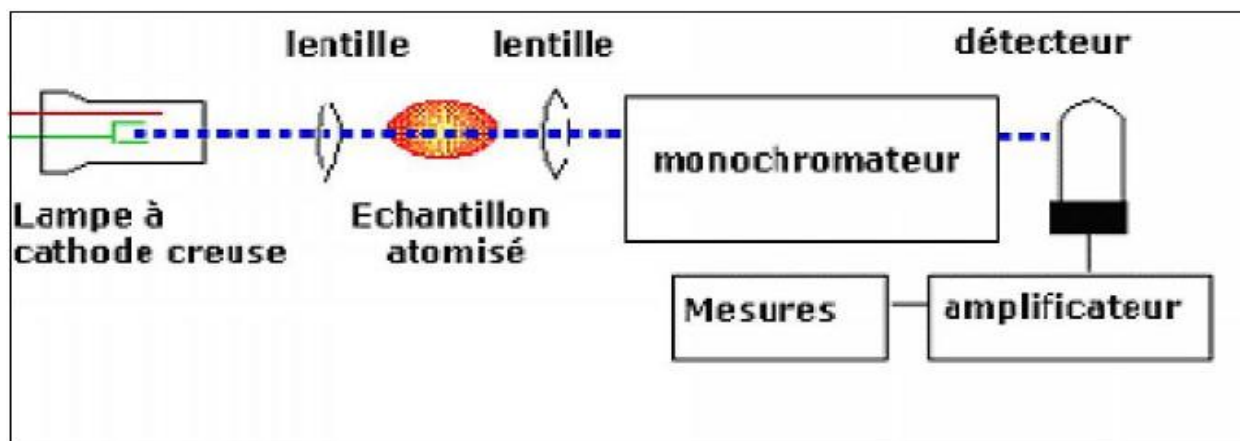
### **2.3.1.2. Appareillage :**

L'appareil utilisé est un Perkin Elmer® AAnalyst 700 (Figure 6, Annexe I) constitué d'un générateur de photons destiné à fournir un flux de photons d'intensité constante dans le temps et de fréquence bien définie correspondant à l'élément à doser, des lampes à cathode creuse constituée du métal (ou des métaux) à doser qui est volatilisé et excité par décharge cathodique dans une atmosphère gazeuse (néon ou argon) à très basse pression, d'un générateur d'atomes, d'un monochromateur à double faisceaux destiné à la sélection de la longueur d'onde et dont l'un des faisceaux atteint directement le récepteur sans traverser la flamme permet d'éliminer les fluctuations de la source et d'un récepteur constitué par un photomultiplicateur associé à un amplificateur linéaire et logarithmique.

Il est équipé d'un générateur d'hydrures, d'un four à graphite et un système par flamme avec injecteur automatique (AS 800 Perkin Elmer) piloté par le logiciel Winlab 32 pour absorption atomique qui permet de très hautes performances d'analyse.

Les parties les plus importantes du Spectrophotomètre d'Absorption Atomique sont (Figure 13) :

1. Source de radiation.
2. Dispositif de transformation de l'échantillon en atomes libres.
3. Un ensemble de mesure du degré d'absorption de la radiation.



**Figure 13 :** Présentation schématique de l'appareil du spectromètre d'absorption atomique (Perkin Elmer® AAnalyst 700).

**a. Source de radiation :** La source de radiation est spécifique selon les métaux étudiés. Pour cela nous utilisons une lampe à cathode creuse. Cette dernière, constituée par le métal à analyser, émet sous tension le spectre de l'élément.

La lampe à cathode creuse est actuellement la plus fréquemment adoptée. Sa fabrication est bien maîtrisée et sa durée de vie a sensiblement été améliorée. En effet, elle fournit généralement un service supérieur à 500 heures, dépassant souvent 1000 heures.

**b. Source d'atomisation :** Afin de permettre le passage des métaux de la forme ionique à la forme atomique, deux types de sources d'atomisation sont utilisés.

- Source d'atomisation par flamme :

Aux origines de la spectrophotométrie d'absorption atomique, l'échantillon devait être une solution et le générateur d'atomes une flamme. Ce moyen d'atomisation, selon Pinta (1979) reste très employé. Il présente de nombreuses possibilités telles que :

- L'analyse rapide et de routine pour des concentrations supérieures à quelques dizaines de  $\mu\text{g/ml}$  dans le milieu solide et quelques dizaines de  $\text{ng/ml}$  pour les liquides ;
- Des résultats facilement reproductibles ;
- Une bonne précision.

La source d'atomisation par flamme est utilisée pour la détection du chrome (Cr), du manganèse (Mn), du Zinc (Zn), le Cuivre (Cu), le Nickel (Ni) et le fer (Fe). Les métaux sont atomisés par le biais d'un brûleur à flamme, alimenté par le mélange air-acétylène. Au brûleur

est couplé un nébuliseur qui transforme la solution aspirée au moyen d'un capillaire en aérosol, injectable directement dans la flamme (Asso, 1982).

- Source d'atomisation par four à graphite

L'atomisation s'effectue dans un tube de graphite, avec revêtement pyrolytique interne. L'ensemble est porté à haute température par effet joule programmable en intensité et en durée. Le four est placé sous courant d'azote continu pour éviter l'oxydation trop rapide. Il est Refroidi en permanence par une circulation d'eau. Cette méthode, particulièrement adoptée aux dosages des faibles quantités d'échantillons permet de mesurer des faibles concentrations de l'ordre du nano gramme par millilitre (Asso, 1982). La source d'atomisation par four à graphite est utilisée pour la détermination du plomb (Pb), du cadmium (Cd).

**c. Monochromateur :** Lorsqu'on utilise une lampe à cathode creuse et non une source continue, les systèmes optiques utilisés en absorption atomique ne nécessitent qu'une faible résolution (0.05 à 0.2 nm), leur rôle est de séparer la raie étudiée des autres raies de la source, principalement celle du gaz de remplissage. Le domaine d'utilisation s'étend de 180 à 900 nm. La bande passante (en nm) est définie par le produit de la largeur de la fente (en nm) par la dispersion du sélecteur de radiation (en nm/mm). Une bande passante de l'ordre de quelques dixièmes de nanomètre suffit généralement. La dispersion des radiations est obtenue par un réseau de diffraction monté dans un système monochromateur.

Pour que l'absorption soit proportionnelle à la concentration des atomes, seuls ceux-ci doivent absorber. En réalité, la flamme elle-même, certaines espèces moléculaires et des particules solides contenues dans la flamme absorbent également. Ces absorptions non spécifiques encore appelées « fond » peuvent être corrigées par l'une des deux méthodes suivantes, qui sont les plus utilisés sur les instruments commercialisés :

- La lampe à émission de spectre continu, employée pour l'atomisation dans la flamme ou le four graphite électrothermique.
- L'effet Zeeman utilisé plus couramment avec l'atomisation électrothermique (Pinta, 1979).

**d. Détecteur et dispositif de mesure :** Dans les méthodes physiques d'analyse, l'appareil utilisé fournit un résultat qui sera le plus souvent un signal électrique représentatif de la grandeur à mesurer : le détecteur est donc un "transformateur" qui fournit un courant ou une tension à partir d'une caractéristique physico-chimique.

En spectrophotométrie d'absorption, la grandeur physique observée est le flux lumineux reçu par un détecteur de photons. Il existe trois types de détecteurs:

- Les détecteurs thermiques ;
- Les détecteurs pyroélectriques ;
- Le photomultiplicateur.

La plupart des spectromètres modernes utilisent comme détecteur un photomultiplicateur relié à un étage d'amplification (Pinta, 1979).

Les chambres d'absorption les plus utilisées en spectrométrie sont la flamme et le four graphite qui sont capables, à partir d'éléments présents en solution, de fournir des atomes libres en proportion suffisante pour utiliser la technique d'absorption.

Il existe également la méthode FIAS (Flow Injection Atomic Spectrometry) et FIAS Hydrures/Mercure dans certains cas particuliers.

**e. Système à hydrure (Vapeurs froides) :** Technique utilisée pour la détermination de la teneur en traces du mercure (Hg) par le système MHS10 (mercury hydrure system). Le mercure est d'abord transformé en  $\text{Hg}^{2+}$  en traitant l'échantillon par un mélange oxydant d'acides nitrique et sulfurique, suivi d'une réduction du cation à l'état métallique par  $\text{SnCl}_2$ . Le mercure élémentaire est alors entraîné par un courant de gaz inerte (Argon) à travers un long tube, sous une pression de 2,8 bars, ou l'absorbance est mesurée à 253,7 nm. La limite de détection est de quelques parties par milliard. Certains fabricants proposent des appareils d'analyse automatique adaptés à de nombreux types d'échantillons (Douglas *et al.*, 2003).

## **2.3.2. Etalonnage :**

### **2.3.2.1. Méthodes des standards seuls**

Pour tous les métaux étudiés, nous avons utilisé des solutions standards. La calibration du spectrophotomètre est réalisée à partir de cinq solutions ( $S_0, S_1, S_2, S_3, S_4, S_5$ ) de concentration croissantes, seul  $S_0$  est toujours le même.

Les absorbances de ces solutions standards sont mesurées, ce qui permet de tracer la courbe d'étalonnage : absorbance = f (concentration), pour les faibles concentrations, c'est à-dire pour les faibles absorbances, la courbe est quasi linéaire, donc de la forme :

$$Y = a X + b$$

Où : Y : Densité optique (DO).

X : Concentration du métal à analyser.

a : Pente de la courbe.

b : Ordonnée à l'origine.

A l'aide de la droite d'étalonnage, nous pouvons déterminer les concentrations inconnues en métaux des échantillons à analyser (Figure 1, Annexe II).

### **2.3.2.2. Calcul des concentrations des métaux**

La concentration du métal dans l'échantillon minéralisé est obtenue à partir de la droite d'étalonnage par une régression linéaire aux moindres carrés.

**a. Calcul du poids corrigé des échantillons :** Après lyophilisation, les échantillons piègent un certain nombre de particules d'eau dû à la période qui sépare la lyophilisation et l'analyse. Par conséquent, les poids pesés ne sont pas les vrais poids secs, pour cela on passe par le calcul du taux d'humidité afin de pouvoir corriger ces poids et avoir les poids secs réels.

Le calcul se fait par l'application de la formule suivante (AIEA, 2001) :

$$A\% = ((P1 - P2) / P1) * 100$$

Où : A : Taux d'humidité (%).

P1 : Poids de la coupelle vide + le poids de l'échantillon dans la coupelle (g).

P2 : Poids de l'échantillon dans la coupelle après 24 heures à 105 °C (g).

A la fin, les poids secs corrigés sont obtenus comme suit :

$$Pc = P - ((A\% / 100) * P)$$

Où : Pc : Poids de l'échantillon corrigé (g).

P : Poids de l'échantillon pesé pour la minéralisation (g).

A : Taux d'humidité (%).

**b. Détermination de la concentration au niveau des échantillons :** La concentration du métal dans l'organisme est calculée selon la formule suivante (Asso, 1982) :

$$Cps = ((Cc - Cb) / Pc) * V$$

Où : Cps : Concentration du métal en poids sec ( $\mu\text{g/g}$  ou  $\text{ng/g}$ ).

Cc : Concentration du métal présent dans l'analyte ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Cb : Concentration du blanc.

Pc : Poids sec corrigé de l'échantillon biologique minéralisé (g).

V : dilution ou le volume de la solution finale après minéralisation (50 ml).

## **2.4. Analyse biochimique : Méthodes d'analyse des Glucides, Lipides et Protéines**

Le dosage des glucides, lipides et protéines a été réalisé au laboratoire de chimie et de biochimie de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral « ENSSMAL ».

### **2.4.1. Dosage des glucides**

Le dosage des sucres totaux solubles est réalisé par la méthode de Dubois *et al.*, (1956), Méthode au phénol-sulfurique.

#### **2.4.1.1. Présentation de la méthode :**

Les oses totaux sont dosés selon Dubois *et al.*, (1956). Les glucides donnent une couleur orangée lorsqu'ils sont traités avec du phénol et par l'acide sulfurique concentré. La réaction est sensible

et la coloration est stable. Les glucides totaux sont ainsi dosés par spectrophotométrie à 485nm. Une courbe d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution de glucose.

#### 2.4.1.2. La courbe d'étalonnage :

Introduire 87.5mg du glucose dans 500ml d'eau distillée, préparer la solution de phénol à 5%. 5 tubes à essais sont remplis de la solution glucose (0ml, 2.5ml, 5ml, 7.5ml, 10ml) puis compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 10ml. Ajouter 1ml de la solution phénol + 5ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Les tubes sont placés au bain Marie à 30° C pendant 20 minutes, puis ils sont refroidis sous l'eau de robinet à 20° C. L'absorbance est mesurée à 485 nm puis on trace la courbe d'étalonnage (Figure 14).

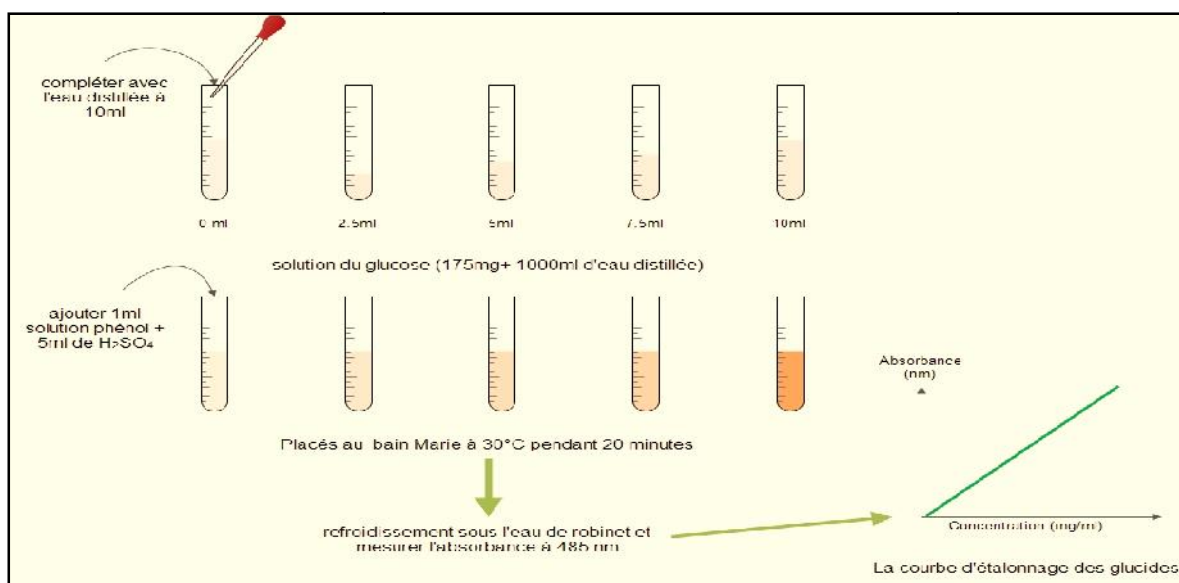


Figure 14 : Méthode de traçage de la courbe d'étalonnage des glucides.

#### 2.4.1.3. Préparation des échantillons :

Peser 0.1g de chaque échantillon (6 échantillons) dans des fioles de 50ml et compléter d'eau distillée. Prendre 10ml de chaque solution, mettre dans des tubes à essai, ajouter 1ml de phénol et 5ml d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figure 7, Annexe I). Les tubes sont placés au bain Marie à 30° C pendant 20 minutes, puis ils sont refroidis au réfrigérateur.

- Après Refroidissement, la densité optique (absorbance) des six échantillons est mesurée à 485 nm contre le blanc de la série étalon par spectrophotométrie (Figure 8, Annexe I).

La concentration en glucides (mg/ml) dans chaque échantillon est tirée de l'équation obtenue de la courbe d'étalonnage des glucides (Figure 1, Annexe III).

#### 2.4.2. Dosage des lipides

Les lipides sont insolubles dans l'eau et très solubles dans les solvants organique, tel que l'éther éthylique. La plupart des méthodes de dosage des lipides, exploitent ces propriétés physiques pour extraire les lipides des aliments dans le but de mesurer leur concentration.

L'extraction des lipides est réalisée par la méthode de Soxhlet.

#### **2.4.2.1. Présentation de la méthode :**

Selon l'A.O.A.C (2002) la méthode Soxhlet est l'une des méthodes de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés. C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction.

#### **2.4.2.2. Principe :**

L'aliment solide est pesé et placé dans une capsule de cellulose (cartouche). L'échantillon est extrait en continu par l'éther éthylique à ébullition (P.E. 35° C) qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'éther est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif, et la matière grasse est pesée.

#### **2.4.2.3. Mode opératoire :**

L'appareil de Soxhlet « Behr Labor-Technik » est équipé de quatre postes de travail, d'une plaque chauffante, de ballons, des matrasses et un réfrigérant.

- On allume d'abord le réfrigérant « Huber minichiller » pour atteindre la température de 2° C;
- Ensuite on pèse chaque ballon vide, soit  $P_0$  ce poids ;
- On met chaque échantillon lyophilisé et broyé dans une cartouche tarée et on pèse, soit  $m$  ce poids ;
- On place les ballons vides et pesés sur la plaque chauffante, et les cartouches dans les matrasses (Figure 9, Annexe I) ;
- On verse environ 150 à 200ml d'éther éthylique dans chaque matras et on ferme ;
- On chauffe progressivement jusqu'à l'ébullition du solvant, on maintient la même température de sorte à maintenir l'ébullition de solvant stable. On garde le même rythme pendant 5h 30 minutes qui correspond à 34 cycles (un cycle dure en moyenne 10 minutes) ; afin de dissoudre tous les lipides présents dans l'échantillon à la fin de l'extraction, on laisse les ballons refroidir ;
- On met chaque ballon contenant le solvant et l'extrait (lipides) dans un rot à vapeur « Buchi Rotavapeur R.210 » (Figure 10, Annexe I) à 40° C et à une vitesse de rotation de 6 à 7 tours/mn, pour concentrer l'extrait et récupérer le solvant ;
- On sèche les ballons dans l'étuve à 37° C, puis on les laisse refroidir dans un dessiccateur et on pèse (ballons remplis), soit  $P$  ce poids (Tableau 1, Annexe III).

La quantité des lipides est déterminée selon la formule suivante :

$$\% \text{ lipides} = \frac{M}{m} * 100$$

Ou : M : quantité des lipides ( $P - P_0$ ) en g.  
P : poids du ballon rempli de lipides en g.  
 $P_0$  : poids du ballon vide en g.  
m : poids de l'échantillon en g.

### **2.4.3. Dosage des protéines**

Les analyses des protéines ont été effectuées selon la méthode de Kjeldahl (1883).

#### **2.4.3.1. Présentation de la méthode :**

La méthode de Kjeldahl (1883) est la méthode de référence pour la détermination des protéines dans les aliments. Il existe deux versions de la méthode qui utilisent le même principe : la méthode macro-Kjeldahl et la méthode micro-Kjeldahl. Elles diffèrent seulement par l'appareillage utilisé et les quantités d'échantillons : la masse d'échantillon analysée par la méthode macro-Kjeldahl est environ 5 fois plus élevée que celle analysés par la méthode micro-Kjeldahl.

#### **2.4.3.2. Principe :**

La détermination des protéines par la méthode micro-Kjeldahl s'effectue en trois étapes :

##### **Etape 1 : Digestion ou minéralisation de l'échantillon**

Pendant l'étape de la digestion, l'azote protéique est transformé en azote ammoniacal par oxydation de la matière organique dans l'acide sulfurique concentré à haute température, en présence d'un catalyseur et d'un sel :

-l'acide sulfurique  $H_2SO_4$  concentré a pour but d'oxyder la matière organique et de transformer l'azote protéique en ammoniac  $NH_3$ . Il sert également à piéger l'ammoniac gazeux sous la forme de sulfate d'ammonium, par action de la base avec l'acide.

-l'addition du sel de sulfate de potassium  $K_2SO_4$  a pour but d'élever le point d'ébullition de solution pour accélérer la réaction de minéralisation de la matière organique.

-le catalyseur utilisé est le sulfate de cuivre  $CuSO_4$ .

La réaction chimique est la suivante :  $H_2SO_4 + N \text{ (aliment)} \rightarrow SO_4(NH_4)_2$ .

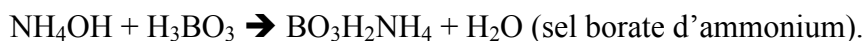
##### **Etape 2 : Distillation de l'ammoniac**

Avant de distiller l'ammoniac a la vapeur d'eau, on doit le libérer par l'addition d'une solution concentrée de NaOH en excès. La transformation chimique est :



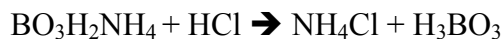
L'ammoniac est ensuite distillé par la vapeur d'eau et piégé dans une solution d'acide borique. L'ammoniac réagit avec l'acide borique pour former des sels de borates d'ammonium.

La transformation chimique est :



### **Etape 3 : Titrage de l'ammoniac**

L'ammoniac sous la forme de borate d'ammonium est titré directement à l'aide d'une solution standardisée d'acide chlorhydrique HCl, et d'un indicateur (le Tashiro) :



#### **2.4.3.3. Mode opératoire :**

##### **a. Minéralisation**

La minéralisation permet de dénaturer les protéines (casser les liaisons) et de libérer les acides aminés, ensuite transformer l'azote organique en azote minéral.

Elle est effectuée à l'aide d'un appareil de minéralisation « Inkjel. M, Behr labor-technik GmbH » équipé : d'une plaque chauffante, un porte matras, un collecteur de fumée et un thermostat. Tout le système est relié à une pompe à vide qui est relié à un piègeur de fumée (Figure 11, Annexe I).

Dans un matras de Kjeldahl, on met :

- 0.5g de l'échantillon de poisson lyophilisé, 3.5g de sulfate de potassium  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , une pincée de sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4$ , 1ml d'eau oxygénée et 10ml d'acide sulfurique  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré ;
- On agite et on place le matras dans le dispositif de minéralisation ;
- On chauffe doucement et progressivement jusqu'à l'apparition des fumées noires ;
- On poursuit le chauffage durant 30 à 45 minutes jusqu'à l'obtention d'une couleur limpide. A la fin de la minéralisation, on laisse les matras refroidir.

##### **b. Filtration et dilution du minéralisât**

Après refroidissement des matras, on filtre chaque minéralisât dans un erlenmeyer. On rince le matras et on filtre aussi l'eau de rinçage.

On ajuste à 100ml, avec l'eau distillée. On transvase les minéralisât dilués et filtrés dans des erlenmeyers à bouchon (Figure 12, Annexe I). On étiquette les erlenmeyers et on les conserve au réfrigérateur à 4° C.

##### **c. Distillation**

On prélève dans un matras de Kjeldahl 20ml du minéralisât filtré et dilué pour la distillation. Ensuite, on place le matras dans l'appareil de distillation « Behr, Labor-Technik » (Figure 13, Annexe I).

A l'aide d'un bouton on ajoute 40ml de la soude NaOH à 40% dans le matras et on débute la distillation. On recueille le distillat (ammoniaque entraîné à la vapeur d'eau) dans un erlenmeyer de collecte, contenant 20ml d'acide borique à 4% dont le pH a été préalablement déterminé.

On continue la distillation jusqu'à obtenir 100ml de solution (acide borique + ammoniaque entraîné à la vapeur d'eau), l'opération dure 5 à 10 minutes. On relève de nouveau la valeur du pH.

**d. Le titrage**

On ajoute au distillat obtenu, 10 gouttes de la solution d'indicateur « Tashiro », On titre directement la solution obtenue par une solution d'acide chlorhydrique HCl à 0.2N (Tableau 2, Annexe III) jusqu'à l'obtention du pH initial de la solution d'acide borique (Figure 14, Annexe I).

Expression des résultats

Soit : 1ml de HCl → 2.803 mg N (azote)

Le taux des protéines est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de protéine} = X * F = \frac{2.803 * V * 100}{100 * m} * F$$

Ou : X : quantité d'azote dans 100g de chair.

F : facteur dépendant du type d'aliment analysé = 100/16 = 6.25 (protéine animale).

V : volume d'HCl.

m : le poids de l'échantillon en g.

# Résultats et Discussions

### Partie I : Résultats des métaux traces (ETM)

Une étude des concentrations pour trois ETM dans ce travail a permis d'évaluer le niveau de contamination du merlu *Merluccius merluccius* et, par conséquent, de son habitat naturel.

Dans le muscle, le foie et gonades de ce bioindicateur, les métaux suivants ont été recherchés : Mercure (Hg), Nickel (Ni) et le Zinc (Zn) et dont les taux ont été déterminés par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique (SAA).

Les concentrations moyennes des différents métaux ont été calculées par rapport au poids sec du muscle, du foie et les gonades du merlu et sont exprimées en µg/g.

Afin de procéder à une interprétation minutieuse, nous nous sommes proposés de faire des représentations graphiques sur les différentes variations des éléments métalliques et ceci en fonction des zones, des organes et des paramètres biologiques propres à l'espèce (le sexe et la taille (maturité sexuelle)).

Les résultats de l'analyse des ETM au niveau des organes (chair, foie et gonades) pour le merlu *Merluccius merluccius* sont représentés dans le tableau 5 :

**Tableau 5 :** Teneurs en métaux (Hg, Ni et Zn) exprimées en µg/g du poids sec dans les différents organes chez *Merluccius merluccius* de la côte Algérienne (cote Ouest).

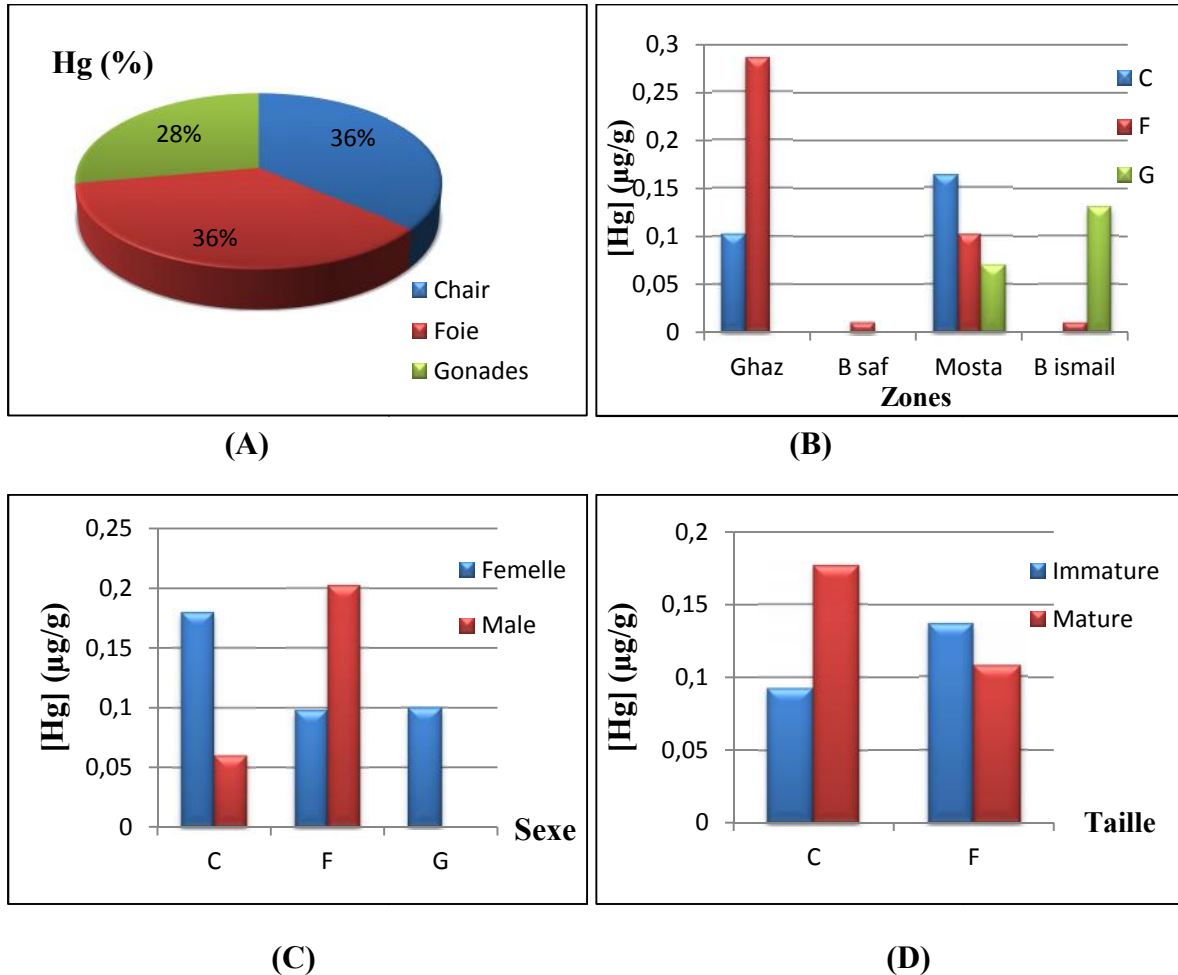
Métaux		Hg (µg/g)		Ni (µg/g)		Zn (µg/g)	
Zones et organes (N échantillons = 16)							
Ghazaouet	Chair (n=4)		0.10		11.68		35.31
	Foie (n=2)	0.16	0.28	9.61	5.49	42.79	57.75
	Gonades /		/		/		/
Benisaf	Chair /		/		/		/
	Foie (n=1)	0.01	0.01	3.09	3.09	54.78	54.78
	Gonades /		/		/		/
Mostaganem	Chair (n=3)		0.16		2.39		31.72
	Foie (n=3)		0.30		5.83		82.56
	Gonades (n=1)	0.12	0.07	4.02	3.53	76.41	192.05
Bou Ismail	Chair /		/		/		/
	Foie (n=1)		0.01		5.45		56.87
	Gonades (n=1)	0.07	0.13	6.02	7.07	123.92	189.97

- N = le nombre d'échantillons analysés pour chaque organe.
- Les valeurs en rouge représentent les concentrations moyennes des métaux analysés dans chaque région.
- / = pas de valeur.

## 1. Variations des concentrations en ETM

### 1.1. Le Mercure (Hg) :

Les variations des concentrations du mercure en fonction des zones, de sexe, des organes et de la taille sont illustrées dans les graphes ci-dessous.



**Figure 15 :** Variations des concentrations moyennes en Mercure (Hg) chez le Merlu par organes (A), zones (B), sexe (C) et la taille (D) (C : chair, F : foie, G : gonades).

#### 1.1.1. Organes :

Les résultats, par pourcentage, montrent une égalité dans le taux d'accumulation du mercure par le foie et la chair qui est de 36%. Pour les gonades, on remarque une légère différence avec un taux de 28 %.

On explique ce taux de mercure dans la chair par sa fixation rapide sur des protéines cytosoliques et son transport à travers la membrane basale des cellules qui favorisent cette diffusion en maintenant sa concentration, de plus son transfert le long du réseau trophique (ou bioamplification) du au régime alimentaire du merlu explique ces résultats même au niveau du foie qui est un organe de stockage.

**1.1.2. Zones :**

Les résultats ont montré une différence pour la teneur en mercure entre les quatre régions étudiées. Il y a donc un effet région quant à la quantité moyenne de mercure. On obtient le classement suivant : Ghazaouet >> Mostaganem >> BouIsmaïl >> Béni-Saf.

Cette différence est du probablement à une pollution de ces zones côtières surtout Ghazaouet et Mostaganem qui sont voisines des complexes industrialo-portuaires, elles sont le réceptacle de diverses sources de pollution.

**1.1.3. Sexe :**

Dans la chair, le taux d'accumulation du mercure par rapport aux deux sexes montre une différence, les femelles accumulent plus que les mâles, les concentrations moyennes sont respectivement de 0.18 µg/g et 0.098 µg/g.

Pour le foie c'est le contraire, les mâles accumulent plus que les femelles, les concentrations moyennes sont respectivement de 0.2 µg/g et 0.06 µg/g.

Les valeurs chez les femelles, qui sont faibles par rapport aux mâles, pourrait être lié à la période de reproduction et de ponte chez les femelles merlus ou les réserves sont épuisés donc largage du mercure qui est stocké au niveau du foie.

**1.1.4. Taille :**

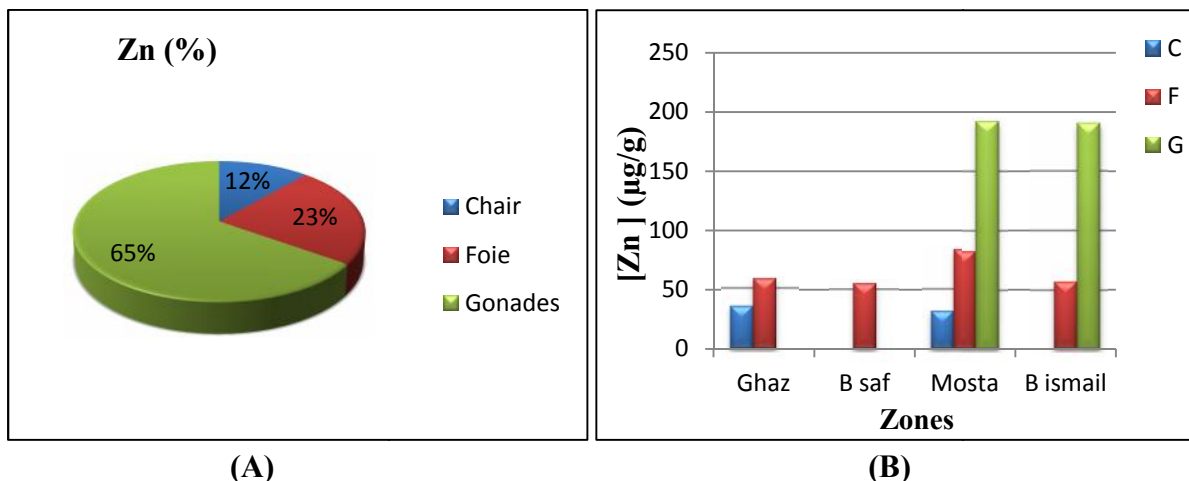
Dans la chair, le taux d'accumulation du mercure montre une différence chez les organismes matures et immatures, les concentrations moyennes sont respectivement de 0.18 µg/g et de 0.09 µg/g.

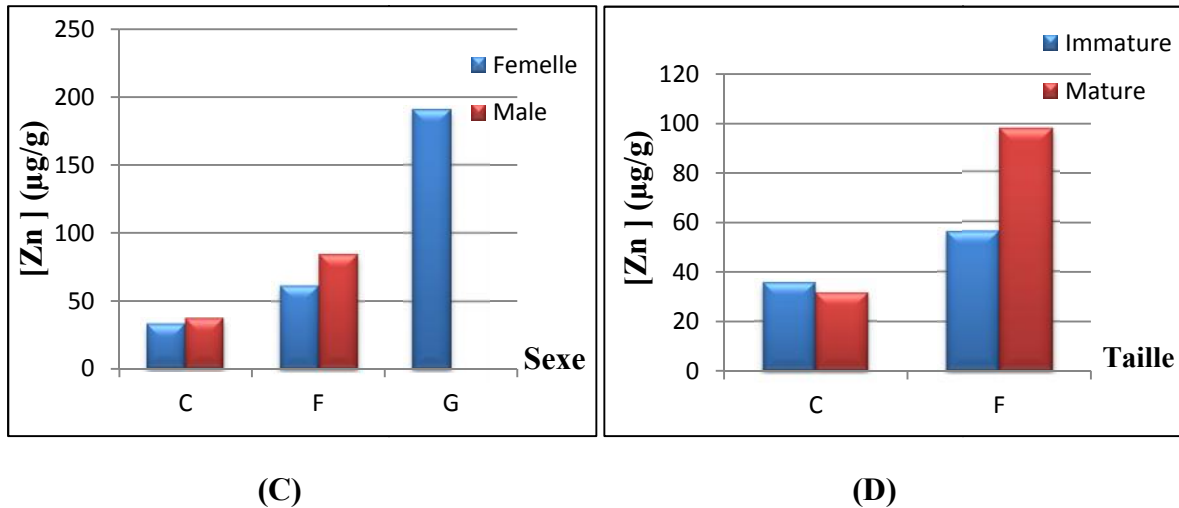
Pour le foie l'accumulation de l'Hg montre une légère différence, autrement dit, la concentration moyenne chez les immatures est de 0.13 µg/g tandis que pour les matures est de 0.1 µg/g.

Cette différence est du probablement au phénomène de détoxification au niveau du foie, tandis que pour la chair on explique cela par le temps d'exposition du merlu.

**1.2. Le Zinc (Zn) :**

Les variations des concentrations du zinc en fonction des zones, de sexe, des organes et de la taille sont illustrées dans les graphes ci-dessous.





**Figure 16 :** Variations des concentrations moyennes en Zinc (Zn) chez le Merlu par organes (A), zones (B), sexe (C) et la taille (D) (C : chair, F : foie, G : gonades).

### 1.2.1. Organes :

Les résultats, par pourcentage, montrent que le taux d'accumulation du Zn par les gonades est plus élevé par rapport aux autres organes et donc on obtient le classement suivant : Gonades >> Foie >> Chair.

Ce classement est du certainement a la période de reproduction, sachant que le prélèvement s'est effectué en juin (période de reproduction et de ponte chez les merlus) et donc les espèces ont tendance à accumuler des réserves nutritives dans les gonades et le foie, ce qui explique les pourcentages élevés, respectivement de 65 % et 23 %.

### 1.2.2. Zones :

Les résultats ont montré une différence pour la teneur en zinc entre les quatre régions étudiées. Il y a donc un effet région quant à la concentration moyenne de zinc. On obtient le classement suivant : BouIsmaïl >> Mostaganem >> Béni-Saf >> Ghazaouet.

Cette différence est du probablement aux divers rejets dans ces zones côtières, BouIsmaïl et Mostaganem font parties des villes les plus exposées à la pollution chimique.

### 1.2.3. Sexe :

Au niveau de la chair, le taux d'accumulation du zinc par rapport aux deux sexes ne montre pas une différence significative, par contre pour le foie une différence est observée, les males accumulent plus que les femelles.

Sachant que le zinc est un élément essentiel, la différence entre la concentration moyenne dans le foie chez les males qui est de 84.4 µg/g et celle des femelles qui est de 61.41 µg/g est du probablement aux différences dans les processus de stockage et/ou les processus de détoxification entre les deux sexes.

**1.2.4. Taille :**

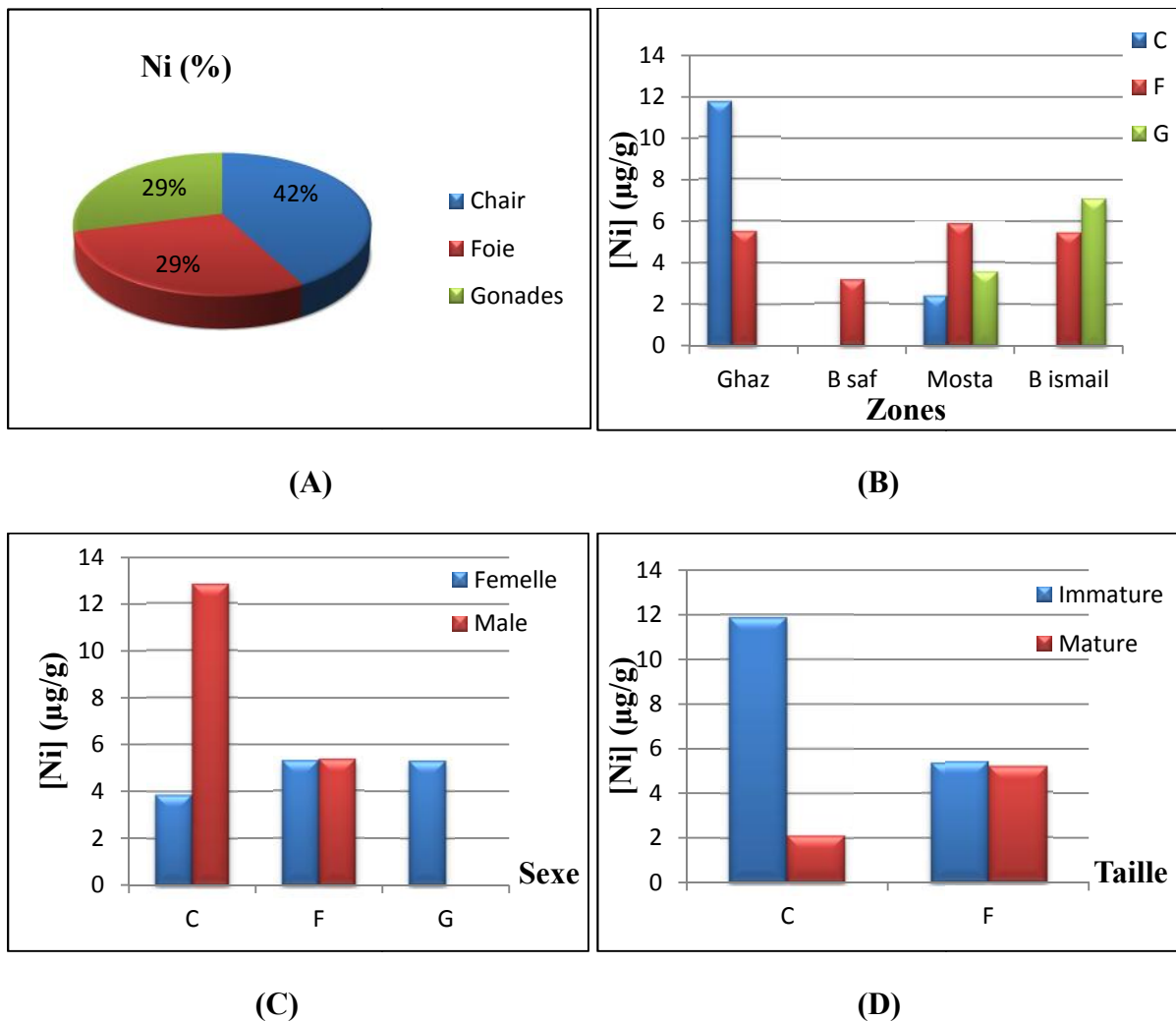
Dans la chair, les concentrations du zinc sont relativement homogènes chez les individus matures et immatures, tandis que pour le foie les individus matures ont des concentrations supérieures à celles des immatures.

Ces concentrations pour le foie chez les matures sont du a la croissance du merlu et donc il a tendance à épuiser cet élément essentiel pour des besoins en énergie.

Les concentrations élevées en zinc chez le merlu confirment son rôle principal de co-facteur dans de nombreux systèmes enzymatiques, impliquées dans l'utilisation de presque tous les nutriments (Schlenk et Benson, 2001) et donc plus accumulable par les organismes marins.

**1.3. Le Nickel (Ni) :**

Les variations des concentrations du nickel en fonction des zones, de sexe, des organes et de la taille sont illustrées dans les graphes ci-dessous.



**Figure 17 :** Variations des concentrations moyennes en Nickel (Ni) chez le Merlu par organes (A), zones (B), sexe (C) et la taille (D) (C : chair, F : foie, G : gonades).

### 1.3.1. Organes :

Les résultats, par pourcentage, montrent que le taux d'accumulation du nickel par la chair est légèrement plus élevé par rapport aux autres organes, ou la différence entre le foie et les gonades est peu significative, et donc on obtient le classement suivant : Chair >> Gonades > Foie.

Ce classement est du probablement au rôle du Ni, celui-ci aurait un rôle structural dans les membranes cellulaires des organes comme dans l'ADN et les ARN.

### 1.3.2. Zones :

Les résultats ont montré une différence pour la teneur en nickel entre les quatre régions étudiées. Il y a donc un effet région quant à la concentration moyenne du nickel. On obtient le classement suivant : Ghazaouet >> BouIsmaïl >> Mostaganem >> Béni-Saf.

Cette différence est du probablement aux divers rejets dans ces zones côtières, Ghazaouet et BouIsmaïl qui font parties des zones dont les industries qui prédominent sont la transformation de l'énergie et l'industrie manufacturière (ex : agroalimentaire).

### 1.3.3. Sexes :

Dans la chair, le taux d'accumulation du nickel par rapport aux deux sexes ne montre pas une différence significative, par contre pour le foie une différence est observée, le male accumule plus que la femelle. On obtient le Classement : chair >> foie = gonades.

### 1.3.4. Taille :

Dans la chair, le taux d'accumulation du nickel s'observe plus chez les organismes immatures que matures, et pour le foie c'est le contraire.

Cette différence est du probablement au fait que les immatures sont en plein croissance et donc l'accumulation se fait davantage dans la chair et/ou au temps d'exposition aux métaux.

En comparant nos résultats en métaux lourds dans le muscle du merlu *Merluccius merluccius* par rapport au seuil tolérés (Tableau 6), nous pourrions déduire que les valeurs les plus élevés restent au dessous des valeurs critiques de contamination (OMS CNRMS)

**Tableau 6** : Comparaison des teneurs en métaux lourds ( $\mu\text{g/g}$  P.S) dans le muscle chez *Merluccius merluccius* par rapport aux Doses Maximales Admissibles (D.M.A).

ETM	Hg	Ni	Zn
Poissons	0.5 - 1 $\mu\text{g/g}$ (a)	/ (b)	5 000 $\mu\text{g/g}$ P.S (c)
Présente étude M. merluccius	<b>0.16 (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>11.68 (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>35.31 (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>

(a) : OMS, (b) : /, (c) : CNRMS d 'Australie (1992) [Conseil National pour la Recherche Médicale et de la Santé].

La comparaison des teneurs enregistrées dans le poisson étudiée montre que les teneurs en oligo-éléments (Zn, Ni) sont plus élevées par rapport à celles des éléments toxiques (Hg). Ceci est typiquement lié à sa toxicité.

Cependant, les teneurs en zinc les plus élevées (35, 31  $\mu\text{g/g}$  P.S) ne constituent pas un danger pour le consommateur car elles sont nettement inférieures aux D.M.A (5000  $\mu\text{g/g}$ ).

De même, pour les teneurs en mercure (0.16  $\mu\text{g/g}$  P.S), qui sont inférieurs aux D.M.A fixées pour les poissons par l’OMS.

## Partie II : Résultats des analyses biochimiques

Les échantillons utilisés pour l’analyse biochimiques sont au nombre de six, ils représentent les différents organes (chair, foie et gonades) du Merlu « *Merluccius merluccius* » répartis entre males et femelles, la liste de ces échantillons est comme suit :

Codes	Echantillons males	Codes	Echantillons femelles
1	T63 Ghazaouet male < 23 C	4	T49 Mostaganem femelle $\geq$ 52 G
2	T49 Mostaganem male $\geq$ 48 C	5	T49 Mostaganem femelle $\geq$ 52 C
3	T49 Mostaganem male $\geq$ 48 F	6	T49 Mostaganem femelle $\geq$ 52 F

Le choix c’est porté sur des échantillons susceptibles de confirmer l’objet de cette analyse à savoir, le rôle des réserves glucidiques, lipidiques et protéiques dans la bioaccumulation des éléments traces par le merlu.

Le dosage et l’analyse des glucides, lipides et protéines ont été effectués selon trois méthodes : la méthode Dubois pour les glucides, la méthode de Soxhlet pour les lipides et la méthode de Kjeldahl pour les protéines.

Les taux obtenus ont été calculé selon des formules propre a chaque composés, ce ci en suivant des protocoles.

Les résultats de nos analyses sont énumérés dans le tableau 7 :

**Tableau 7 :** Valeurs de la composition biochimique du Merlu (glucides, lipides et protéines) exprimées en concentration (mg/ml) et pourcentages dans les différents organes (chair (C), foie (F) et gonades (G)) :

Echantillons	1	2	3	4	5	6
Composition biochimique	C	C	F	G	C	F
[Glucides] (mg/ml)	0.9391	0.9083	0.5003	5.1732	1.0315	0.8698
% Lipides	10.04	87.00	68.33	16.58	2.78	50.83
% Protéines	16.11	15.94	4.69	6.65	12.43	5.08

Les résultats obtenus montrent une légère différence dans la concentration des glucides, parmi les échantillons, on remarque que les gonades ont une concentration relativement plus élevée comparant au foie et la chair.

Pour le taux des lipides, une certaine hétérogénéité est remarquée, les lipides atteignent un taux plus au moins élevé chez les males matures qu'immatures, et concernant les femelles les taux au niveau du foie sont relativement élevés comparant a la chair et les gonades.

Concernant les protéines, des taux faibles sont remarqués sur les deux sexes au niveau du foie et gonades tandis que la chair enregistre un taux significatif.

### 1. Présentation graphique des résultats

Les variations des taux glucidiques, lipidiques et protéiques en fonction des organes du Merlu (C : chair, F : foie et G : gonades) sont illustrées dans les graphes ci-dessous.

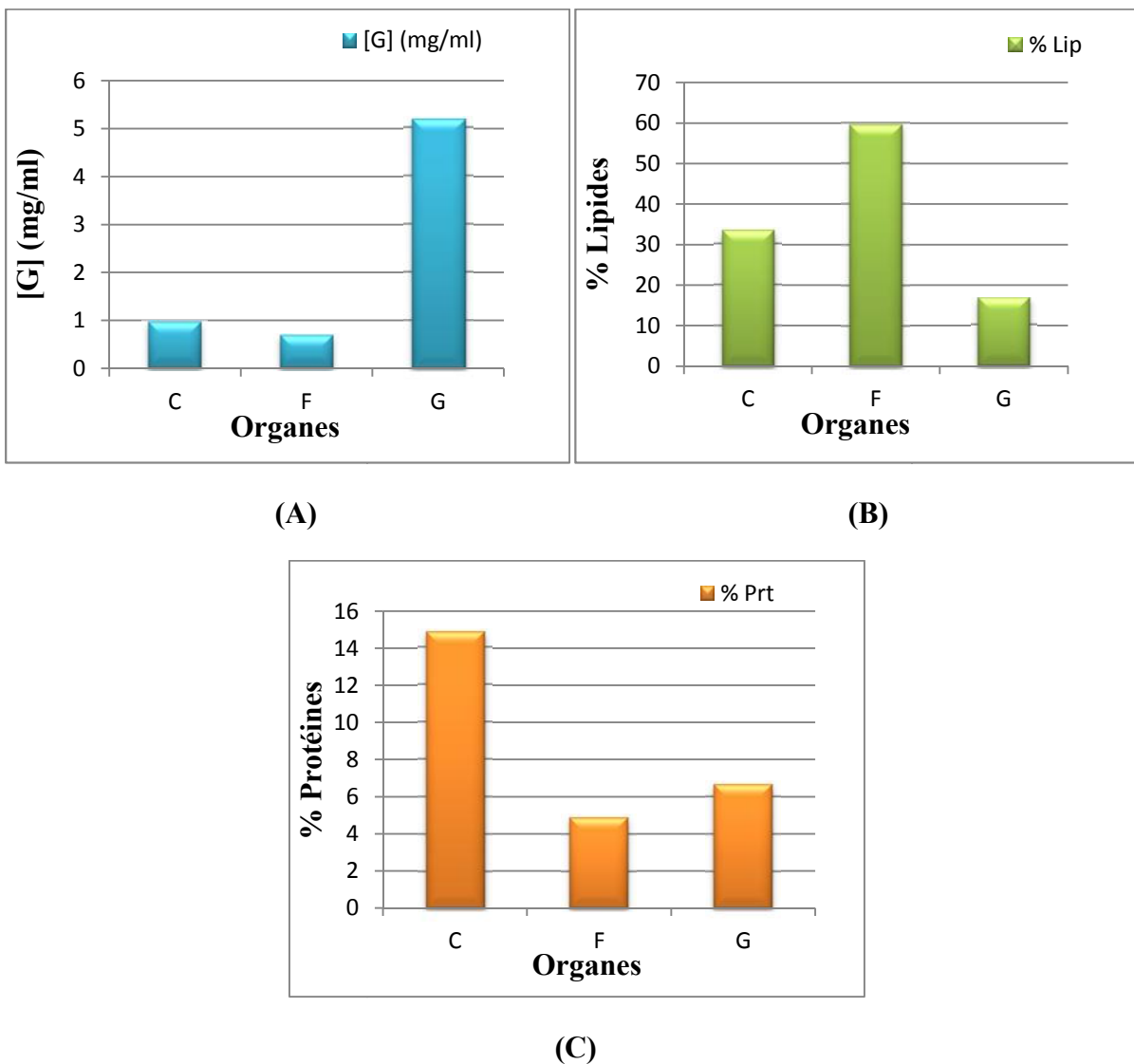


Figure 18 : variations des taux glucidiques (A), lipidiques (B) et protéiques (C) en fonction des organes du Merlu (C : chair, F : foie et G : gonades).

### 1.1. Glucides :

D'après le graphe des glucides, on remarque que les concentrations moyennes les plus élevées chez le Merlu se trouvent au niveau des gonades avec 5.17 mg/ml suivit de la chair avec 0.96 mg/ml et le foie de 0.68 mg/ml.

### 1.2. Lipides :

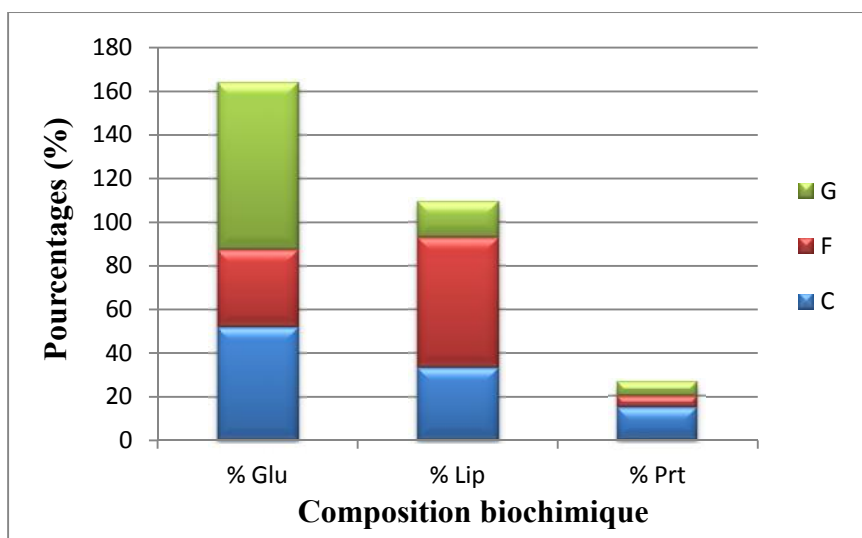
Pour les lipides, le taux le plus élevé se trouve au niveau du foie avec un pourcentage de 59.38 % suivit de la chair avec 33.27 % et le taux le plus bas est au niveau des gonades avec 16.58 %.

### 1.3. Les protéines :

Pour ce composé, les taux élevés observés sont au niveau de la chair avec un pourcentage de 14.83 % suivit des gonades et le foie a des valeurs faibles par rapport a la chair, elles sont, respectivement, de 6.65 % et 4.88 %.

## 2. Variations de la composition biochimique dans les trois organes

L'histogramme ci-dessous représente les pourcentages glucidiques, lipidiques et protéiques de chaque organe étudié (la chair, foie et gonades).



**Figure 19** : Histogramme empilé des pourcentages glucidiques, lipidiques et protéiques de chaque organe (chair, foie et gonades).

On remarque que pour les glucides, les taux les plus élevés sont au niveau des gonades, pour les lipides c'est le foie et les protéines c'est au niveau de la chair.

Chez le Merlu, on constate une différence entre les taux des trois composés, le classement est comme suit : Glucides >> Lipides >> Protéines.

# Conclusion générale

Dans l'ensemble, notre étude nous a permis de mettre en évidence la présence effective des trois métaux lourds dans les organes (chair, foie et gonades) du *Merluccius merluccius* à sexe confondu dans les baies de Ghazaouet, Mostaganem, Beni-saf et BouIsmaïl, qui sont perturbé par les divers rejets domestiques, industriels et agricoles.

Parmi les métaux dominants, le zinc se détache nettement des deux autres éléments à des teneurs très importantes. Les concentrations suivent un ordre décroissant du nickel au mercure.

Par rapport à la taille des individus, la classe la plus petite (ou immatures) semble être la plus contaminée, ce facteur est intimement lié à la croissance qui impose aux individus un régime alimentaire très riche. Le merlu étant de type carnivore, il augmenterait potentiellement les risques de bioaccumulation.

Concernant la maturité sexuelle, une relation a été établie entre la période de reproduction du merlu et les valeurs élevées des éléments traces métalliques étudiés qui correspond à une activité hépatique accrue survenant lors de l'engraissement de poisson.

Par ailleurs, les doses moyennes des métaux lourds relevées dans le merlu pêché au niveau des baies qui sont de 0.16 µg/g pour le Hg et 35,31 µg/g pour le Zn comparées aux D.M.A., ne sont pas inquiétantes et ne semblent pas présentées un véritable danger.

Toutefois nous affirmons qu'il n'existe aucun risque de toxicité pour la santé humaine pour l'instant ; et, par conséquent cette ressource halieutique merluère se prête bien à la consommation ; mais il est à rappeler que ces micropolluants ont un effet cumulatif à travers la chaîne trophique, et qu'ils ont aussi un effet néfaste à long terme sur la santé publique.

*Merluccius merluccius* pourrait être considérée comme un bon bioindicateur de la qualité de l'environnement des écosystèmes aquatiques (espèce sentinelle). En effet, le recours à cette espèce qualifiée de sentinelle semble un moyen rapide et performant pour évaluer la qualité de l'environnement marin. En fonction de sa large répartition géographique, de sa longévité, de la permanence de sa population tout le long de l'année, de la facilité de prélèvement, de son abondance et de sa capacité à accumuler une gamme des métaux lourds, ce poisson démersale apparaît comme un organisme potentiellement intéressant.

Nos résultats révèlent aussi l'existence d'une relation entre le taux de bioaccumulation des trois métaux traces et le degré de la pollution marine au niveau des quatre baies.

Il serait toutefois souhaitable que :

- Le comportement du bioindicateur choisi devrait être étudié vis-à-vis des autres contaminants chimiques incluant d'autres éléments traces et substances organiques ;

- L'analyse expérimentale des transferts existants au sein des réseaux trophiques peut être menée sur des modèles écotoxicologiques plus ou moins complexes (chaîne trophique, micro-écosystème...);
- L'étude de spéciation de différentes formes de répartition des métaux traces à l'échelle de l'écosystème et à l'échelle cellulaire.

Les eaux marines et océaniques sont un milieu menacé. Une prise de conscience générale s'impose pour sauver ses écosystèmes à travers :

- La prise en compte de toutes les activités humaines ayant un impact sur le milieu marin récepteur et qui pourraient nécessiter un réajustement des politiques menées ;
- L'assurance de protection et de conservation de l'environnement côtier avec une mise en place d'un réseau de surveillance écologique marin, côtier et continental ;
- La prévoyance de construction des stations d'épurations qui constitue la seule réponse possible et nécessaire contre la dégradation de ce milieu ;
- L'instauration d'un programme de contrôle et de surveillance continue des différentes sources de pollution et de leur effet sur l'environnement, en obligeant les industriels à se doter de systèmes de traitement des eaux résiduelles, ainsi que le recyclage des déchets ;
- La réalisation de nouvelles unités pour le stockage des résidus chimiques.

# Bibliographie

**ADRIANO, D.C. (2001).** Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. Allemagne: Springer.

**AHLBORG, U.G. & HANBERG, A. (1994).** Toxic equivalency Factors for dioxon-like PCBs. *Environmental Science and Pollution Research International*. Vol.1. pp. 67-68.

**A.I.E.A., 2001.** The performance study for MED POL : determination of trace elements and methylmercury in estuarine sediment sample. 64p

**A.I.E.A. (2004).** Gestion des déchets radioactifs avant stockage définitif et le déclassé. 35p.

**ALDEBERT, Y. & CARRIES, C. (1989a).** La croissance du merlu dans le Golf du Lion. Méthodologie. Problèmes posés. *Report of the age-reading workshop on mediterranean hake and sardine*. Palma de Mallorca, Espana. pp. 66-70.

**ALDEBERT, Y. & RECASSENS, L. (1995).** Estimation de la croissance du Merlu dans le Golf du Lion par l'analyse des fréquences de tailles. *Rapport de la commission internationale sur la mer méditerranée*. Vol. 34. 236p.

**ALVAREZ, P. et al. (2004).** Distribution and abundance of European hake *Merluccius merluccius* (L.), eggs and larvae in the North East Atlantic waters in 1995 and 1998 in relation to hydrographic conditions. *J. plank. Res.* pp. 811-826.

**AMIARD, J.C. (1994).** Les problèmes liés à l'échantillonnage et à la détection des éléments traces en écotoxicologie. Actes du Symposium « Pollution, Bioconversion, Toxicologie » (Monastir, Avril 1993), Vol. 1, N° spécial. pp. 172-195.

**AMIARD, J.C. (2011).** Les risques chimiques environnementaux: Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Paris : Lavoisier. 775p.

**ANDRAL, B. et al. (2001).** Les guides méthodologiques du RLM : Evaluation de la contamination chimique et radiologique du sédiment. Rapport Ifremer. 43p.

**ANDRAL, B. (2002).** Evaluation de la contamination chimique basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules. Guide méthodologique. RINBIO en Méditerranée. Ifremer. 21p.

**A.O.A.C. (2002).** Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis. Washington, D.C.

**ASSO, A. (1982).** Contribution à l'étude des polluants métalliques chez la moule *Perna* (L), dans la région d'Alger. Mémoire de Magister en Océanologie Biologique, Université d'Aix-Marseille II, 138p.

**ASTRUC, G. (2005).** Exploitation des chaînes trophiques marines de Méditerranée par les populations de Cétacés. Thèse de Doctorat de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Université Montpellier II, France.

**AUDIGIE, C. et al. (1985).** Principes des méthodes d'analyse biochimique. France : Doin, Tome1. 190p.

**BARBOUR, T.M. et al, (1999).** Rapid Bioassessment Protocols for use in streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and fish. U.S: EPA.

**BAY, S.M. et al. (2003).** Temporal and spatial distributions of contaminants in sediments of SantaMonica Bay, California. *Mar. Environ. Res.* Vol.56. pp. 255-276.

**BAYNE, B.L. (1989).** Measuring the biological effect of pollution: the mussel watch approach. *Water Sci. Technol.* Vol.21. pp. 1089-1100.

**BEAUMONT, M.P. (2010).** Utilisation d'un bioindicateur pour le suivi des rejets radioactifs aqueux de la centrale nucléaire Gentilly-2.These de Maître sciences.Univ. Laval. Québec. 91p.

**BELHOUCINE, F. (2012).** Etude de la biologie de la croissance et de la reproduction d'un poisson téléostéen le merlu (*Merluccius merluccius* L., 1758) et son utilisation comme indicateur biologique de la pollution par les métaux lourds (Zinc, Plomb et Cadmium) dans la baie d'Oran (Algérie).These de Doctorat. Univ. d'Oran. 326p.

**BELLOC, G. (1923).** Note sur la croissance du merlu. *Notes Mem. Off. Scient. Tech. Peches Marit*, Vol.21. pp. 1-32.

**BENZOHRA, M. (1993).** Les structures hydrodynamiques le long des côtes algériennes. Dans : *Circulation des eaux et pollution des côtes méditerranéennes des pays du Maghreb*, Rabat.

**BENZOHRA, M. & MILLOT, C. (1995).** Characteristics and circulation of surface and intermediate water masses off Algeria. *Deep-sea research I.* Vol.42. pp.1803-1830.

**BÉTHOUX, J. P. et al. (1999).** The Mediterranean Sea: a miniature ocean for climatic and environmental studies and a key for the climatic functioning of the North Atlantic, *Prog.Oceanogr.*, Vol.44. pp.131–146.

**BODIGUEL, X. (2008).** Caractérisation et modélisation des processus de bioaccumulation des PCB chez le merlu (*Merluccius merluccius*) du golfe du Lion. These Doctorat. Univ. Montpellier I. 216p.

**BOGUSZ, D. (1992).** Toxicités et substances toxiques - Colloque – La restauration des rivières et des canaux, Bouvines–chapitre1. 16p.

**BOTHNER, M.H. et al. (2002).** The effect of the new Massachusetts Bay sewage outfall on the concentrations of metals and bacterial spores in nearby bottom and suspended sediments. Mar. Pollut. Bull. Vol.44. pp.1063-1070.

**BOUCHESEICHE, C. et al. (2002).** Bassin Rhône – Méditerranée – Corse. Guide technique n°7, Pollution toxique et écotoxicologie : notion de base. Lyon, Agence de l'Eau Rhône – Méditerranée – Corse. 83p.

**BOURAS, D. et al. (2007).** Évolution bioclimatique et actions de développement sur le littoral occidental algérien. Laboratoire Réseau de Surveillance Environnementale, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d'Oran. BP 1524, Es Senia, Oran 31000, Algérie.

**BOUTIBA, Z. (1992).** Les mammifères marins d'Algérie. Statut, Répartition, Biologie et Ecologie. Thèse Doct. Etat. 575p.

**BOUTIBA, Z. (2004).** Quid de l'Environnement Marin : Dar El Gharb. 273p.

**BURREAU, S. et al. (2004).** Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) studied in pike (*Esox lucius*), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea. Chemosphere. Vol.55. pp.1043-1052.

**CAPLAT, C. (2001).** Caractérisation géochimique de sédiments fins du littoral du Calvados (Baie de Seine) – Comparaison de matériaux portuaires contaminés à des matériaux non contaminés de la baie des Veys, Université de Caen, Th.Univ. Sciences de la Terre et de l'Univers. 182p.

**CASAS, S. (2005).** Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Thèse de doctorat en océanologie biologique, Environnement marin . Université du sud Toulon Var. 363p.

**CHIFFOLEAU, J.F. (1994).** Le chrome en milieu marin. Rapports scientifiques et techniques de l'IFREMER, N°08. 49p.

**CHIFFOLEAU, J.C. (2001).** La contamination métallique, IFREMER, Région Haute Normandie, (Programme scientifique Seine-Aval). Vol.8. 39p.

**CHIFFOLEAU, J.F. et al. (2001).** La contamination métallique. Programme Seine-Aval, fascicule N°8. Plouzané : IFREMER. 39p.

**COSSA, D. et LASSUS, P. (1989).** Le Cadmium en milieu marin Biogéochimie et écotoxicologie. Rapport Scientifiques et Technique de l'IFREMER. 76p.

**CRISE, A. et al. (1999).** The Mediterranean pelagic ecosystem response to physical forcing. Progress in Oceanography. Vol.44. pp.219–243.

**DEVALLOIS, V. (2009).** Transferts et mobilité des éléments traces métalliques dans la colonne sédimentaire des hydro systèmes continentaux. Thèse de doctorat Université de Provence. 262p.

**DI LEONARDO, R. et al. (2009).** Sedimentary record of anthropogenic contaminants (trace metals and PAHs) and organic matter in a Mediterranean coastal area (Gulf of Palermo, Italy). J. Marine Syst. Vol.78. pp.136-145.

**DOUGLAS, A. et al. (2003).** Principes d'analyse instrumentale. De Boeck Diffusion s. a. 954p.

**DRIF, F. (2012).** Distribution des métaux traces chez les bivalves (Mollusques) dans le golfe d'Annaba (Nord-est Algérien). Thèse de doctorat Université de BADJI MOKHTAR, Annaba. 154p.

**DUBOIS, M. et al. (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* DOI. pp.350–356.

**EGGLETON, J. & THOMAS, K.V. (2004).** A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. Environment International. Vol.30. pp.973-980.

**F.A.O. (1980).** Extrait du rapport de la consultation technique pour l'évaluation des stocks dans les divisions Baléares et golfe du Lion. Rapport sur les pêches n° 227.

**F.A.O. (1987).** Fiche FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche : Méditerranée et mer noire, zone de pêche 37, révision1, volume 2.

**F.A.O. (2007).** Rapport N°856 sur les pêches : dixième session du comité scientifique consultatif Nicosie, Chypre. pp.22-26.

**F.A.O. (2010).** *Fisheries and Aquaculture Department FishFinder*. Rome.

**F.A.O. (2010).** Rapport du Groupe de travail FAO/COPACE sur l'évaluation des ressources démersales – sous groupe Nord. Banjul , Gambie. novembre 2007. pp.6-14.

**F.A.O. (2012).** Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. FISHSTAT.Rome.Italie.

**FAIRBROTHER, A. et al. (2007).** Framework for Metals Risk Assessment, Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 68. pp.145–227.

**FÖRSTNER, U., & WITTMANN, G.T.W. (1979).** Metal pollution in the aquatic environment. New-York: Springer. 475p.

**FÖRSTNER, U. (1989).** Contaminated Sediments: Lectures on Environmental Aspects of Particle-Associated Chemicals in Aquatic Systems, Berlin, Allemagne.

**GAILLARDET, J. et al. (2003).** Trace Elements in River Waters, in: Editorsin-Chief: Heinrich, D.H., Karl, K.T. (Eds.), *Treatise on Geochemistry*. Pergamon, Oxford. pp.225-272.

**GARNIER, C. (2004).** Modélisation et évaluation des équilibres de complexation entre la matière organique naturelle, les métaux traces et le proton. Thèse de Doctorat, Université du Sud, Toulon, France.

**GHODBANI, T. (2001).** Extension urbanistique dans le littoral d'Oran et ses effets sur l'environnement. *Thèse de Magister*. Université d'Oran. Département de géographie et de l'aménagement du territoire. 387p.

**GONZALEZ, J.L. et al. (1999).** Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire. Programme Seine-Aval, fascicule n°10, Plouzané :IFREMER. ISBN. 31p.

**GOURLAY, C. (2004).** Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : influence de la matière organique naturelle et anthropique. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, Paris, France.

**GRIMES, S. (2010).** Peuplements benthiques des substrats meubles de la cote algérienne : Taxonomie, structure et statut écologique. Thèse de Doctorat, Univ. d'Oran. 362p.

**HEMIDA, F. (2005).** Les sélaciens de la côte algérienne : bio systématique des requins et des raies ; écologie, reproduction et exploitation de quelque populations capturées. Thèse de Doctorat, USTHB. 233p.

**ICES, (2006).** Report of the Working Groupe on the Assessment of Hake; Monk and Megrim (WGHMM).

**INAL, A. (2011).** Les métaux traces dans les sédiments de la baie de Bou-Ismaïl. Surveillance de la pollution et étude des processus géochimiques. Mémoire de Magister en Sciences de la Mer, Option: Gestion et Surveillance de l'Environnement Marin et Littoral,ENSSMAL. Alger.

**JACQUES, G., & TREGUER, P. (1986).** Ecosystème pélagique marin. Collection d'écologie. Paris: Masson. 243p.

**JEFFREY, J.A. & TAGGART, C.T. (2000).** Growth variation and water mass associations of larval silver hake (*Merluccius bilinearis*) on the Scotian Shelf. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol.57. pp.1728-1738.

**KACHER, M. (2005).** Le merlu du golfe de Gascogne et de la mer celtique : Croissance, Répartition spatiale et bathymétrie, Ecologie alimentaire et Assemblages. 200p.

**KJELDAHL, J. (1883).** Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern, *Z. Anal. Chem.* Vol.22. pp.366-382.

**LALAMI, Y. (1979).** Etude biologique et halieutique du Rouget de vase (*Mullus barbatus* L.) des côtes algériennes. Thèse Doctorat es Sciences (Sciences Naturelles) Univ. Sc Tech. Languedoc, Montpellier. 510p.

**LAMPERT, L. (2007).** Suivi de la contamination métallique et organique de deux lots de moules (*Mytilus edulis*) implantés au port de Goury et à l'Anse des Moulinets (Manche) - rapport-3832.

**LECLAIRE, L. (1972).** La sédimentation holocène sur le versant méridional du bassin algéro-baléares (Précontinent algérien).Mém. Mus. Natn. Hist. Nat., Paris. Vol.24. 391p.

**LOONEN, H. et al. (1996).** Ecological Hazard assessment of Dioxins: Hazards to organisms at different levels of aquatic food webs (fish-eating birds and mammals, fish and invertebrates). *The Science of the Total Environment.* Vol.182. pp.93-103.

**LUCIO, P. et al. (2000).** Growth and reproduction of hake (*Merluccius merluccius*) in the bay of Biscay during the period 1996-1997. *Ozeanografika.* Vol. 3. pp. 325-354.

**LUOMA, N. et al. (1982).** Scavenging of heavy metals from particulates by brown seaweed. *Mar. pollut. Bull.* Vol.13. pp.394-396.

**MATTHAI, C. et al. (2002).** Anthropogenic trace metals in sediment and settling particulate matter on a high-energy continental shelf (Sydney, Australia). *Mar. Environ. Res.* vol. 54. pp.99-127.

**MENNAD, M. (2008).** Approche des systèmes d'information géographique (SIG) pour l'analyse spatio-temporelle de la pollution marine des eaux côtières. Application à la baie d'Alger. Mémoire de magister en océanographie biologique et environnement marin, U.S.T.H.B. 110p.

**METAP, (1994).** Etude de protection contre la pollution des ports et du littoral Algérien. Rapport final, Banque Européenne d'Investissement - Ministère du transport - Direction des ports; Algérie. 170p.

**MEYBECK, M. et al. (2007).** Historical perspective of heavy metals contamination (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) in the Seine River basin (France) following a DPSIR approach (1950–2005). *Science of the Total Environment.* Vol.375. pp.204-231.

**MILLOT, C. (1985).** Some features of the Algerian current. *J. geophy. Res.* Vol.90 (C4). pp.7169-7176.

**MILLOT, C. (1987).** Circulation in the western Mediterranean Sea. *Oceanog. Acta.* Vol. 10 (2). pp.144-149.

**MILLOT, C. & TAUPIER-LETAGE, I. (2005).** Circulation in the Mediterranean Sea. *The Mediterranean Sea: the handbook of environmental chemistry.* Volume 5: water pollution. Saliot A. N.Y:Springer. pp.1–30.

**MIQUEL, G. (2001).** Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport de l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. 365p.

**NEFF, J.M. (2002).** Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of contaminants from oil well produced water. Amsterdam:Elsevier Science Publishers. pp.43-468.

**NFON, E. & COUSINS, I.T. (2006).** Interpreting time trends and biomagnification of PCBs in the Baltic region using the equilibrium lipid partitioning approach. *Environmental Pollution.* Vol.144. pp. 994-1000.

**NICOLAU, R. et al. (2012).** Base flow and storm water net fluxes of carbon and trace metals to the Mediterranean seaby an urbanized small river. *Water Res.*

**OLIVAR, M.P. et al. (2003).** Spatial and temporal distribution and abundance of European hake, *Merluccius merluccius*, eggs and larvae in the Catalan coast (NW Mediterranean). Fish. Res. vol.60.pp. 321-331.

**O.N.M, (2005).** Office National de Météorologie.

**O.N.M, (2010).** Office National de Météorologie.

**PEREZ, T. et al. (2000).** Etude bibliographique sur les bioindicateurs de l'état du milieu marin. Système d'évaluation de la Qualité des Milieux littoraux – Volet biologique. Rapport Agences de l'Eau, 4 fascicules, 642p. + 1 Cd-rom.

**PHILIPS, D.J.H. (1977).** The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. Environmental pollution. Vol.13. pp.283-317.

**PINEIRO, C. & SAINZA, M. (2003).** Age estimate, growth and maturity of the European hake (*Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758) from Iberian Atlantic waters. *ICES Journal of marine Science*. Vol.60. pp.1086-1102.

**PINTA, M. (1979).** Spectrométrie d'absorption atomique. Application à l'analyse chimique. Masson – O.R.S.T.O.M. Tome 1, 2<sup>ème</sup> édition. 262p.

**P.N.U.E. et MED POL. (2003).** Élaboration d'indicateurs de l'état écologique et de réduction du stress pour la région Méditerranéen. Prog. Acti. Stra. Lignes directrices. 83p.

**P.N.U.E/P.A.M. et MED POL. (2004).** Lignes directrices pour l'élaboration d'indicateurs d'état écologique et de réduction du stress. Rapports techniques du PAM. No 154. 106p

**P.N.U.E/PAM-Plan Bleu, (2009).** Etat de l'environnement et du développement en Méditerranée. Programme des Nations Unies pour l'environnement / Plan d'action pour la Méditerranée (PNUE/PAM)-Plan Bleu, Athènes, ISBN. 208p.

**QUIGNARD, J.P. (2002).** La Méditerranée. Formation en Cétologie méditerranéenne, Montpellier.

**RAMADE, F. (2011).** Introduction a l'ecochimie : les substances chimiques de l'écosphère à l'homme.Paris:Lavoisier. pp.162-465.

**RAND, G.M. et al. (1995).** Introduction to Aquatic Toxicology. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment, (Ed. by G. M. Rand). Taylor & Francis, Etats-Unis.

**RECASSENS, L. et al. (1998).** Spatiotemporal variation in the population structure of the European hake in the NW Mediterranean. *J. Fish. Biol.* Vol.53. pp.387-401.

**REFES, W. (2011).** Contribution à la connaissance de la biodiversité des fonds chalutables de la côte algérienne : les peuplements ichtyologiques des fonds chalutables du secteur oriental de la côte algérienne. Thèse Doctorat en science de la mer. Univ. Badji Mokhtar, Annaba. 280p.

**ROCHA, L. et al. (2011).** The water-soluble fraction of potentially toxic elements in contaminated soils: Relationships between ecotoxicity, solubility and geochemical reactivity. *Chemosphere.* vol.84. pp.1495-1505.

**ROUANE-HACENE, O. (2013).** Biosurveillance de la qualité des eaux côtières du littoral occidental algérien, par le suivi des indices biologiques, de la biodisponibilité et la bioaccumulation des métaux lourds (Zn, Cu, Pb et Cd) chez la moule *Mytilus galloprovincialis* et l'oursin *Paracentrotus lividus*. Doctorat.Oran. 295p.

**SCHLENK, D. & BENSON, W.H. (2001).** Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, Volume 1- Organs. London: Taylor and Franchis.

**SIGG, L. et al. (2001).** Chimie des milieux aquatiques: chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. Paris:Dunod, 567p.

**TAUPIER-LETAGE, I., et MILLOT, C. (1988).** Surface circulation in the Algerian Basin during 1984. *Oceanologica acta.* Vol.5. pp.79-85.

**WALSH, A. (1955).** Application of atomic absorption spectra to chemical analysis. *Spectrochim. Acta* 7.

**WEBER, F.A. et al. (2009).** Multi-metal contaminant dynamics in temporarily flooded soil under sulfate limitation. *Geochim. Cosmochim. Ac.*

**WHO, (2003).** World Health Organization (Organisation mondiale de la santé).

**ZEGHDOUDI, E. (2006).** Modélisation bioéconomique des pêcheries méditerranéennes. Application aux petits pélagiques de la baie de Bou-Ismaïl.Barcelone. 71p.

# Annexes

Annexe I :



Figure 1 : Lyophilisateur (CHRIST BETTA 1-8). Figure 2 : Broyage a l'aide d'un mixeur.



Figure 3 : Echantillons broyés.



Figure 4 : Minéralisation des échantillons.



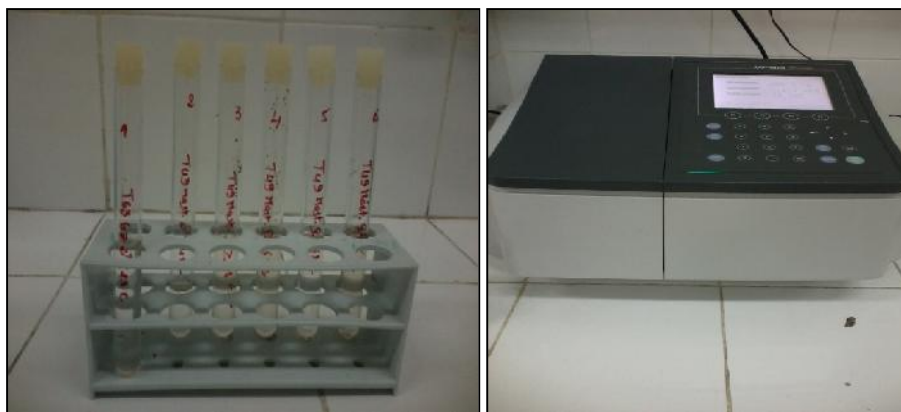
Figure 5 : L'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) et le bichromate de potassium ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 5%).



Figure 6 : Spectrophotométrie d'Absorption Atomique Perkin Elmer® AAnalys 700.



Figure 7 : Préparation des étalons et échantillons.



**Figure 8 :** Les solutions échantillons et le spectrophotomètre.



**Figure 9 :** Le réfrigérant et Appareil de Soxhlet.



**Figure 10 :** Le rot a vapeur.



**Figure 11 :** Appareil de minéralisation.



**Figure 12 :** Echantillons après minéralisation et filtration.



Figure 13 : Appareil de distillation.



Figure 14 : Titrage, Tashiro et Ph mètre.

## Annexe II :

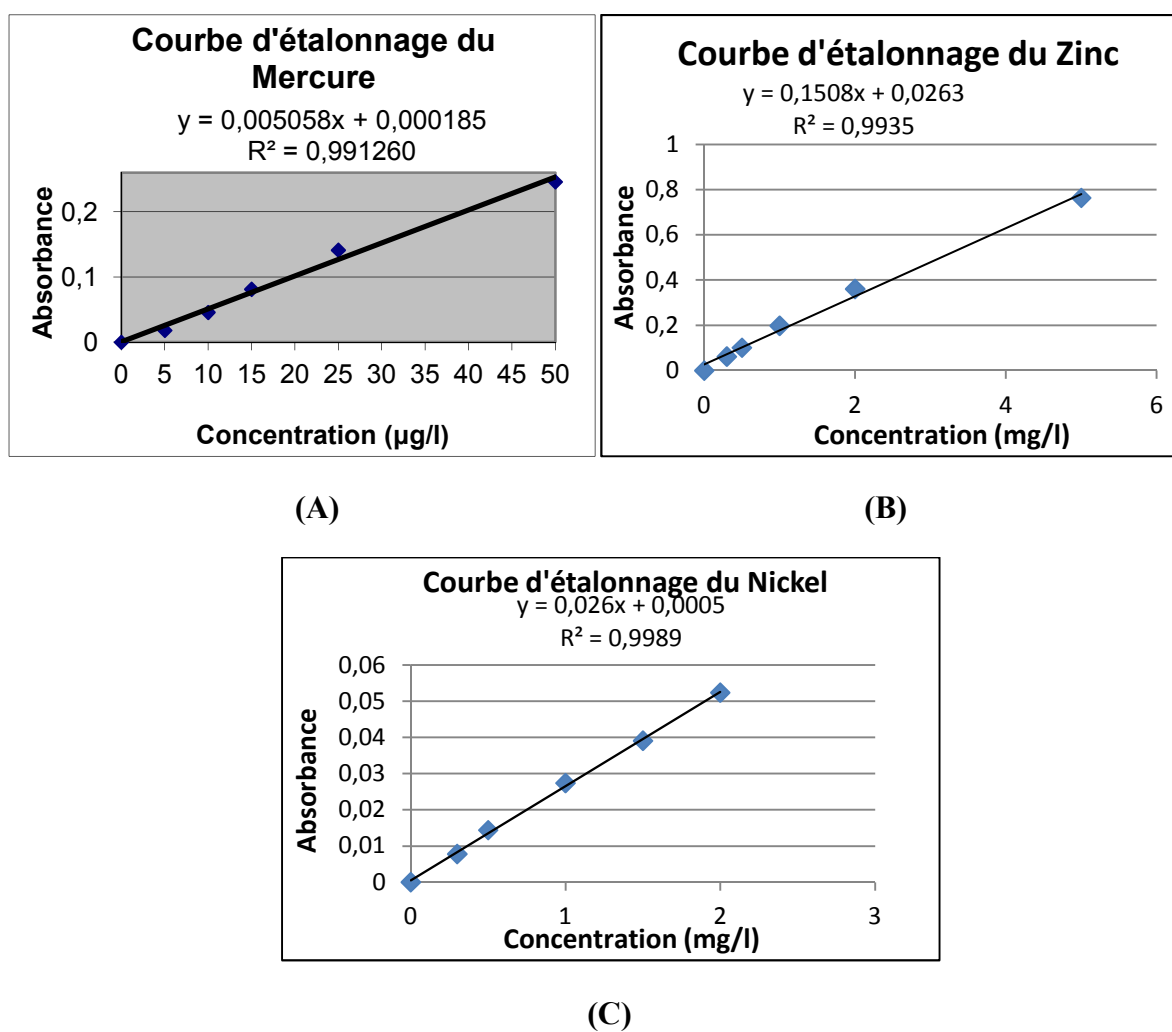


Figure 1 : Droites d'étalonnage des métaux traces analysés, mercure (A), zinc (B), nickel (C).

**Tableau 1** : Gammes-étalons des métaux traces analysés (mercure (A), zinc (B), et nickel (C)) dans le biote.

N° STD	Absorbance	Concentra. µgHg/l
Blanc	0	0
STD1	0,018	5
STD2	0,0458	10
STD3	0,0812	15
STD4	0,1412	25
STD5	0,246	50

N° STD	Absorbance	Concentra. mgZn/l
Blanc	0	0
STD1	0,0616	0,3
STD2	0,101	0,5
STD3	0,1981	1
(A) STD4	0,3606	2
STD5	0,7637	5

N° STD	Absorbance	Concentra. mgNi/l
Blanc	0	0
STD1	0,0078	0,3
STD2	0,0144	0,5
STD3	0,0274	1
STD4	0,0391	1,5
STD5	0,0524	2

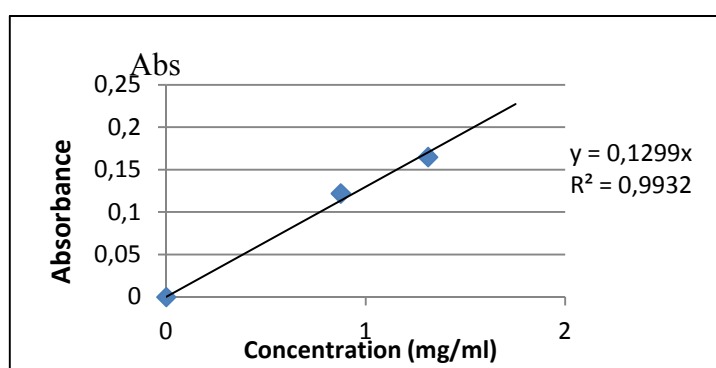
(C)

**Annexe III :****1. Dosage des glucides :**

Solution du glucose préparée : 87.5 mg → 500 ml

Calcule des concentrations du glucose dans les différents volumes 0 ml, 2.5 ml, 5 ml, 7.5 ml, 10 ml et détermination des absorbances des 6 échantillons.

V (ml)	0	2.5	5	7.5	10
[C] (mg/ml)	0	0.4375	0.875	1.3125	1.75



Echs	Poids pesés m (g)	Abs (nm)
1	0.1004	0.122
2	0.1015	0.118
3	0.1006	0.065
4	0.1006	0.168
5	0.1004	0.134
6	0.1006	0.113

**Figure 1** : Courbe d'étalonnage des glucides.

## 2. Dosage des lipides :

**Tableau 1** : poids des échantillons avant et après extraction.

Echantillons	Poids ech. <b>m</b> (g)	Pds blns à vide <b>P<sub>0</sub></b> (g)	Pds blns <b>P</b> (g)	Pds extrais <b>M</b> (g)
1	0.5009	109.3942	109.4445	0.0503
2	0.5025	112.9377	113.3749	0.4372
3	0.2577	123.7574	123.9335	0.1761
4	0.5001	112.9328	113.0157	0.0829
5	0.5005	108.4154	108.4293	0.0139
6	0.5005	109.3909	109.6453	0.2544

## 3. Dosage des protéines :

**Tableau 2** : Titrage de la solution (acide borique + ammoniacque entrainé à la vapeur d'eau) par l'acide chloridrique (HCl).

Echantillons	Pds ech. <b>m</b> (g)	Vol <sub>HCl</sub> titré <b>V</b> (ml)
1	0.5001	4.6
2	0.5001	4.55
3	0.5043	1.35
4	0.5003	1.9
5	0.5001	3.55
6	0.5002	1.45