N° d'ordre 62 Année 2012

جامعة عبد المالك السعدي
Université Abdelmalek Essaadi

UNIVERSITE ABDELMALEK ESSAADI
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES - Tanger

Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur
Formation Doctorale : Sciences et Techniques de l'Ingénieur

THESE DE DOCTORAT

Présentée

Pour l'obtention du

DOCTORAT EN SCIENCES

Par :
Dina Baghdadi Mazini

Discipline : Biosciences de l'environnement et Santé

Spécialité : Biochimie

Pollution de l'environnement marin et santé humaine : Mesure, évaluation et Impact des contaminants chimiques et biologiques dans les produits de la pêche au niveau du littoral marocain.

Soutenue le 29 Décembre 2012 devant le Jury

Pr. A.Azmani (Université Abdelmalek Essaadi. Faculté des Sciences et Techniques-Tanger) Présidente
Pr. M.Nhiri (Université Abdelmalek Essaadi. Faculté des Sciences et Techniques-Tanger) Rapporteur
Pr. S.Hilali (Université Hassan Premier.Faculté des Sciences et Techniques-Settat) Rapporteur
Pr. A.Bendriss (Université Abdelmalek Essaadi. Faculté des Sciences-Tétouan) Rapporteur
Dr. S.Benbrahim (Institut National des Recherches Halieutiques-Casablanca) Examinateur
Dr A.Rachidi (Laboratoire Régional des Analyses et de Recherches,ONSSA-Casablanca) Co-Encadrant
Pr. S.Barrijal (Université Abdelmalek Essaadi. Faculté des Sciences et Techniques-Tanger) Directeur

Structure de recherche accréditée d'accueil :
UAE/E11FST: Equipe de Recherche Valorisation Biotechnologique des Microorganismes, Génomique et Bioinformatique, FST Tanger

THÈSE

Présentée à

La Faculté des Sciences et Techniques de Tanger

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES TECHNIQUES DE L'INGÉNIEUR

Par M^lle *Dina Baghdadi Mazini*

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ

Discipline : Biosciences de l'environnement et Santé

Pollution de l'environnement marin et santé humaine : Mesure, évaluation et Impact des contaminants chimiques et biologiques dans les produits de la pêche au niveau du littoral marocain.

Présentée et soutenue publiquement le 29 ***Décembre 2012***

Encadrants de thèse:

Said Barrijal

Professeur, Département Biologie, Faculté des Sciences et Technique-Tanger.

Abderrazzak Rachidi

Chef du service Biochimie et Bromatologie, Laboratoires d'Analyses et de Recherches-Casablanca.

Année Universitaire : *2012*

Dédicace

A ma mère et à l'âme de mon père

A mes frères et sœurs

Mes collégues, mes amis

Et tous qui me sont chers

Pour leur soutien et amour.

Remerciements

Le grand merci c'est à Dieu " Le puissant" qui m'a aidé de réaliser ce travail.

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'avoir lu les pages de mon manuscrit.

Un très grand merci aussi à mon directeur de thèse Pr.S.Barrijal, de la confiance qu'il m'a témoigné en m'accordant la réalisation de ce projet de recherche. J'ai bénéficié d'un très bon encadrement et de précieux conseils qui m'ont permis de mener ce projet de recherche le mieux possible. Merci de m'encourager à continuer faire de la recherche.

Je voudrais remercier mon co-encadrant Dr A.Rachidi, d'avoir accepté et encadré, afin que j'arrive au bout de ces années avec des résultats à présenter. Ces années d'apprentissage à ses côtés m'ont beaucoup appris et vont m'aider pour la suite de ma carrière professionnelle À ce propos, merci Monsieur, de m'avoir appris des outils bien utiles. Vous m'avez appris tout ce que je sais sur la SAA, la GC/MS et l'HPLC. Merci d'avoir eu l'idée de cette collaboration, c'était une très bonne idée.

Je remercie également toutes les personnes du laboratoire LRARC, que j'ai côtoyé durant ces années et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. En premier lieu, son directeur pour m'avoir accueilli au sein du LRAR et pour sa sympathie. Un très grand merci pour TOUT à savoir Mounia, Nourddine, Amine du département biochimie et bromatologie. Un grand merci également aux autres chercheurs et techniciens… pour leurs aides et leurs conseils. je remercie tous les membres du Labo, permanents, et stagiaires, qui ont croisé ma route, qui ont contribué au bon déroulement de ces travaux, que ce soit pour les manips ou pour la vie de tous les jours.

Je remercie aussi tous les thésards de la FSTT, pour leur soutien moral, leurs bons conseils qu'ils soient scientifiques ou non.

Et enfin, je dois dire un grand merci à ma famille qui m'a toujours soutenue pendant tout mon parcours jusqu'aujourd'hui. Je pense que, maintenant que vous savez ce que c'est qu'une thèse, vous êtes bien contents de ne pas en avoir fait !

Pour terminer, je remercie tous ceux que j'ai involontairement oublié….

Abstract

Advances in technology and population increase led to notable improvements in the production methods. Nevertheless, serious environmental problems can be observed following this mass production and rapid evolution of technology. Marine pollution is one of these problems that pose a threat to human health at long term.

Nowadays, human beings are encouraged to consume more seafood, as it is a good source of protein and minerals considered beneficial for health. However, these sea products contain both essential and toxic elements on a wide range of concentration.

The contamination of fish products (bivalves, fish, cephalopods, etc.) requires a monitoring and an analysis of toxic elements which could present a potential hazard. In recent years, a large number of research studies has been conducted in various countries on the type, quantity and source of contaminants in foodstuffs. In this paper, we evaluate the contamination related to chemical and biological pollutants that deny the safety of fish products.

The concentration mean of different substances (heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines), as well as the level of contamination are still below the levels recommended by the national and international regulations. Therefore, all collected species of seafood can be consumed without great risk to public health. Our work takes also interest in the development of certain analytical methods such as spectrometry and chromatography (AAS, GCMS, HPLC), allowing the possibility of apprehending the risks involved by the consumer.

This report is a summary of the main findings reached during examinations and field evaluation conducted these past years (annually from 2006 to 2009) and enable us to offer our authorities and all actors concerned about the improvement on safety of fish products, a fine and relevant risk assessment in the future.
This study can be considered as a general interpretation of the marine contamination trend, measured in Moroccan fish products.

ملخص

أدى التقدم التكنلوجي والنمو السكاني إلى تحسن كبير في أساليب الإنتاج. لكن بسبب هذا الإنتاج المتضخم والتطور السريع للتكنولوجيا تعاني البيئة مشاكل خطيرة. من بين هذه المشاكل التلوث البحري الذي يُهدد صحة الإنسان على المدى الطويل.

في الوقت الحاضر، يُرغب البشر في استهلاك المنتجات البحرية أكثر فأكثر. فهي مصدر جيد للبروتين والمعادن المفيدة للصحة. بيد أن هذه المنتجات تحتوي في نفس الآن على عناصر أساسية لكن سامة على نطاق واسع التركيز.

يتطلب تلوث المنتجات السمكية (كالمحار ذي الصمامين، والأسماك، والرخويات، إلخ) رصد وتحليل العناصر السامة التي قد تكون خطرا محتملا. وقد أُجريت -في غضون السنوات الأخيرة وفي بلدان مختلفة- العديدُ من الدراسات والأبحاث في كمية الملوثات في المواد الغذائية ونوعها ومصدرها.

نقيَم في هذا البحث التلوث الناجم عن التعرض للملوثات الكيميائية والبيولوجية التي تضر بمنتجات الصيد. يظل متوسط المحتوى من المواد المدروسة (المعادن الثقيلة والمحروقات متعددة الحلقات والعطريات والأمينات الإحيائية)، كما درجة التلوث دون ما تحذر منه التنظيمات الوطنية والدولية. لذا أمكن استهلاك كل أنواع فواكه البحر دون كبير خطر على الصحة العامة.

ويهتم بحثنا أيضا بتطوير بعض مناهج التحليل اللوني وتَمَثُّل الطيف (من قبيل: HPLC ,GCMS ,SAA) والتي تتيح إمكانية تقييمٍ أمثل للمخاطر التي قد تهدد المسهلك.

تسعى هذه إلى أن تكون خلاصة لأهم ما اكتُشف أثناء الاختبارات والتقييم الميداني الذي أُجري خلال السنوات الأخيرة (سنويا من عام 2006 إلى عام 2009)؛ كما يتيح اقتراح تقييم للمخاطر أكثر دقة وتوافقا في المستقبل – سواء على سلطاتنا أو على المعنيين بتحسين السلامة الصحية لمنتجات الصيد.

كما يمكن اعتبار هذه الدراسة محاولة تفسير عام لنزعات التلوث البحري كما قيست في المنتجات السمكية المغربية.

RÉSUMÉ

Les progrès de la technologie et l'augmentation de la population ont conduit à de notables améliorations dans les méthodes de productions. Cependant, de problèmes sérieux d'environnement ont lieu suite à cette production en masse et évolution rapide de la technologie. La pollution marine, est parmi ces problèmes qui constituent une menace à long terme pour la santé humaine.

Afin de diversifier leur alimentation, les populations sont amenées à consommer davantage les produits de mer. Ils représentent de bonnes sources de protéines et des minéraux bénéfiques pour la santé. Pourtant, ces produits contiennent à la fois des éléments essentiels et toxiques sur une large gamme de concentration.

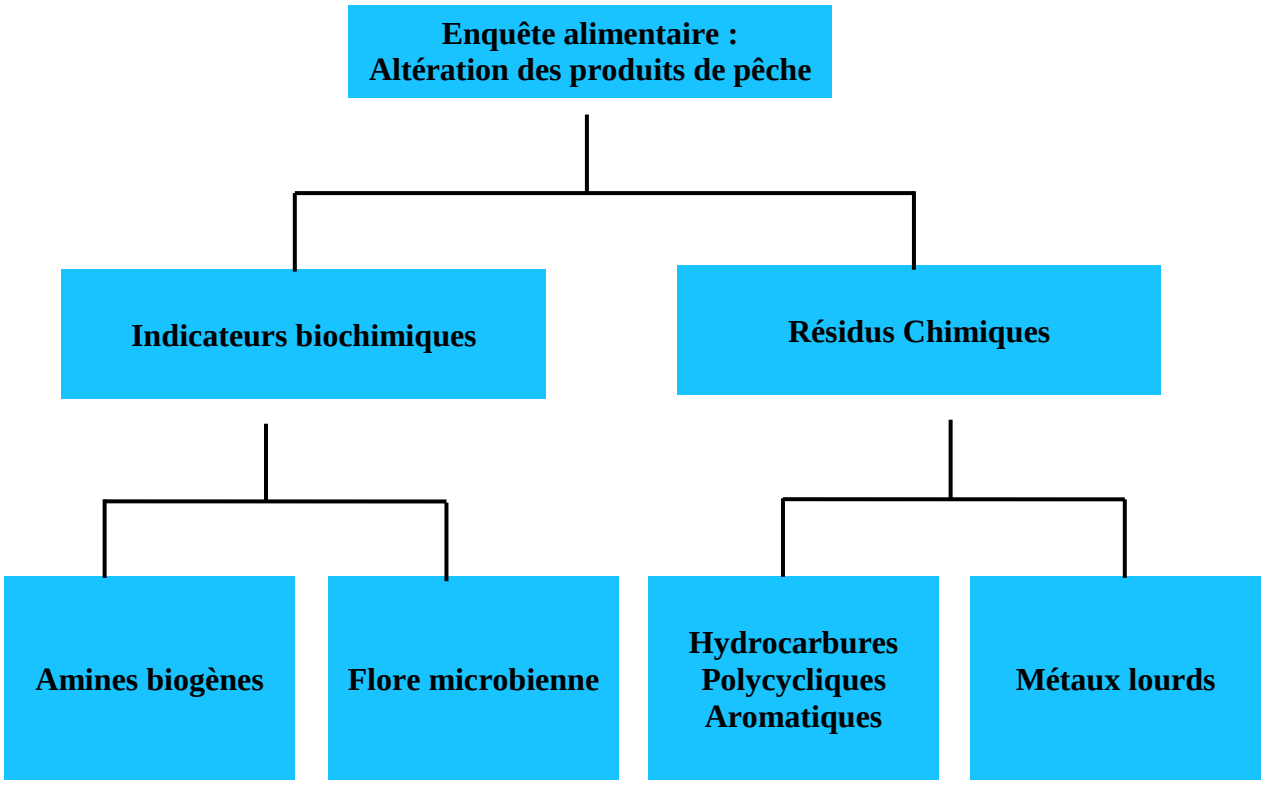
La contamination des produits de mer (bivalves, poissons, céphalopodes, etc..) nécessite la surveillance et l'analyse des éléments toxiques pouvant présenter un danger potentiel. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont été réalisées dans ce domaine. Notre travail s'intéresse principalement à l'évaluation des contaminants chimiques et certaines molécules biochimiques qui peuvent s'accumuler dans les produits de la pêche et affecter leur salubrité.

Les teneurs moyennes de différentes substances étudiées (métaux lourds, hydrocarbures polycycliques aromatique et amines biogènes), ainsi que le niveau de contamination reste inférieur aux niveaux recommandés par la réglementation. Par conséquent toutes les espèces de produits de mer collectées peuvent être consommées sans grand risque sur la santé publique. Notre travail porte aussi intérêt au développement de certaines méthodes analytiques comme la spectrométrie et la chromatographie (SAA, GCMS, HPLC), qui permet de mieux apprécier les risques encourus par le consommateur.

Cette mémoire se veut une synthèse des principales trouvailles aux examens et évaluation de terrain conduite ces dernières années (annuellement de 2006 à 2009) et permet de proposer à nos autorités et à tous les acteurs soucieux de l'amélioration de la sécurité sanitaire des produits de pêche, une évaluation des risques plus fine et pertinente, à l'avenir.

Cette étude peut être considérée comme une interprétation générale des tendances de contamination marine, mesurées dans les produits de pêche marocains.

Description schématique de l'étude



Sommaire

Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des abréviations et sigles
Version abrégée
Avant-propos

Introduction Générale.....1

1. Produits de pêche : richesse, composition et consommation.....4
2. Problématique.....5
3. Plan de surveillance des résidus chimiques.....5
4. Paramètres indicateurs d'altération des produits de pêche.....7
5. Contexte et objectifs.....11

A. Contaminants inorganiques : Eléments traces métalliques

1. Toxiques minéraux: Généralités..... 12
2. Origine des métaux lourds..... 12
3. Phénomène de la bioamplification..... 14
4. Toxicité et persistance..... 16
5. Métaux lourds dans le milieu marin..... 17
6. Eléments traces étudiés..... 17
   6.1. Cadmium..... 18
   6.2. Plomb..... 19
   6.3. Mercure..... 21
7. Matériel et Méthodes..... 24
   7.1. Plan d'échantillonnage..... 24
   7.2. Traitement statistique..... 29
8. Dosage des métaux lourds..... 30
   8.1. Principe 30
   8.2. Procédures de prétraitement d'échantillons..... 30
   8.3. Digestion assistée par microondes 30
9. Analyse du plomb et cadmium..... 31
10. Analyse de mercure 37
11. Etude de la qualité des produits de la pêche par l'évaluation de la Contamination métallique (Cd, Pb et Hg) le long du littoral Marocain..... 40
12. Surveillance chimique du niveau de contamination chez les moules du centre atlantique (Maroc).....51

B. Micropolluants organiques : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques : Définition..... 60
2. Source des HAP..... 61
3. Propriétés chimiques et identification..... 62
4. Mécanisme de formation des HAP..... 63
5. Potentiel toxique..... 64
6. Biodisponibilité des HAP dans l'environnement..... 65
7. HAP d'intérêt..... 66
   7.1. Benzo(a)pyrène.....66

7.2. Pyrène.....67
7.3. Anthracène.....68
7.4. Chrysène.....69
7.5. Fluoranthène.....70
7.6. Phénanthrène.....71
8. Matériel et Méthodes.....73
8.1. Plan d'échantillonnage.....73
8.2. Conservation d'échantillons.....73
8.3. Réactifs.....73
9. Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques.....74
9.1. Principe.....74
9.2. Procédure de prétraitement d'échantillons.....74
9.3. Extraction sous champ micro-onde.....75
9.4. Purification.....76
9.5. Concentration..... 76
9.6. Analyse par GC-MS.....76
10. Vérification du protocole analytique.....79
11. Dosage des HAP dans les produits de peche par GC-MS au niveau des côtes marocaines.....80
12. Biodiponibilité des HAP chez *Mytillus galloprovincialis* de la zone centre atlantique du Maroc.....90

C. Dérivés des acides amines : *Amine biogènes*

1. Amine biogène : Définition et origine..... 99
2. Réaction et formation..... 99
3. Toxicité et importance.....100
4. Molécules étudiées.....102
4.1. Histamine.....102
4.2. Tyramine.....103
4.3. Putrescine.....104
4.4. Cadaverine.....105
5. Intoxication histaminique.....106
6. Réglementation.....107

7. Les facteurs influençant la production d'amines biogènes et maîtrises du risque.....108
8. Bactéries et formation d'amines biogènes.....108
9. Matériel et méthodes.....110
9.1. Échantillons.....110
9.2. Réactifs.....110
9.3. Matériel.....110
9.4. Méthodes utilisées.....111
9.4.1 Examen microbiologique.....111
9.4.2 Dosage des amines biogénes.....111
10. Validation de la méthode 113
11.Evolution des teneurs en amines biogènes en fonction du temps dans la chair du poisson.114
12. Cinétique de formation des amines biogènes dans la chair de sardine et de maquereau suivant l'évolution de la flore bactérienne.....116

D. Discussion Générale : *Bilan de suivi environnemental et action décisive*

1. Identification globale des risques aux mesures de protection du milieu marin……122
2. Influence et importance des éléments étudiés sur la qualité des produits de pèche…..123
   2.1. A-propos des contaminants chimiques ……123
      2.1.1. Métaux lourds……123
      2.1.2. Hydrocarbures polycycliques aromatiques……125
   2.2 A-propos des indicateurs chimiques ……128
      2.2.1 Amines biogènes et intoxication histaminique……128
      2.2.2 contamination et multiplication post-mortem……130
3. Quelques mesures de protection……130
4. Actions correctives……132
   4.1 plan correctif proposé……133

Conclusion Générale……134
Perspectives d'amélioration…… 137

Références bibliographiques……139

Annexes :
Glossaire
Norme HAP
Norme Histamine
Norme ML
Chromatogramme pour HPLC
Chromatogramme pour GS-MS

Liste des figures

N°	Titre	Page
Fig.1	Organisation globale d'un plan de surveillance.	6
Fig.2	Sources et cheminements de la pollution.	13
Fig.3	la chaine trophique contamine par les métaux lourds.	14
Fig.4	Facteur de bioconcentration dans la chaine alimentaire.	15
Fig.5	Carte géographique du Maroc et localisation des sites étudiés.	26
Fig.6	Localisation des sites de récolte des bivalves	28
Fig.7	Système de digestion assistée par micro-ondes en système fermé.	30
Fig.8	Microonde de digestion.	31
Fig.9	Spectromètre d'absorption atomique a four a graphite	33
Fig.10	Courbe d'etalonnage du Plomb	35
Fig.11	Courbe d'etalonnage du Cadmium	35
Fig.12	Spectromètre d'absorption atomique à générateur d'hydrure	37
Fig.13	Courbe d'etalonnage du mercure	38
Fig.14	Distribution spatiale de la contamination métallique (mg/kg de P.F)	45
Fig.15	Plan ½ de l'analyse des composantes principale (ACP) réalisée pour les villes échantillonnées le long du littoral marocain (n=13).	46
Fig.16	Variation annuelle des teneurs des métaux lourds (mg/Kg).	48
Fig.17	Variation saisonnière des teneurs des métaux lourds (mg/kg).	49
Fig.18	Limites réglementaires et variation des Métaux lourds en mg/kg de P.F.	50
Fig.19	Variation mensuelle des teneurs moyennes metalliques en mg/kg de poids frais chez les bivalves prelevées au centre atlantique du littoral marocain.	55
Fig.20	Classification hiérarchique ascendante de la contamination métallique en fonction des sites.	57
Fig.21	Profil des classes (3 classes), en fonction des variables analysées.	57
Fig.22	Présence de la matière organique et interactions entre les différents compartiments au sein du milieu aquatique.	60
Fig.23	Liste des HAP généralement surveillés dans l'environnement selon les Recommandations de l'US EPA (polluants prioritaires).	61
Fig.24	Relation schématique entre la biodisponibilité, l'accumulation et la toxicité d'un contaminant dans l'environnement.	65
Fig.25	Schéma de l'extraction par micro-ondes : système pressurisé (DMAE).	75
Fig.26	Microonde d'extraction des HAP.	75
Fig.27	Chromatographie gazeuse couplée à la spectométrie de masse.	76
Fig.28	Courbe d'étalonnage pour les 6 HAP étudiés.	78
Fig.29	Rendement de quatification pous les composes choisis (moyenne de 10 replicats independants).	79
Fig.30	Distribution spatiale de la contamination organique (ug/kg de P.f).	84
Fig.31	Diagramme d'analyse de composante principale (ACP) réalisé pour les molécules étudiées (n=6)	85
Fig.32	les deux rapports étudiés pour la détérmination des origines des HAP presents dans les produits de mer.	86
Fig.33	Variation saisonnière des teneurs des HAP.	88
Fig.34	Variation annuelle des teneurs des HAP.	88
Fig.35	variation des HAP selon les produits de pêche	89
Fig.36	Structure des molécules étudiées	92

Fig.37	Résultats obtenus de l'analyse du matériel de référence (BCR-458).	93
Fig.38	Concentrations des HAP(µg kg^{-1} du poids frais) et limite normative chez les bivalves.	95
Fig.39	Variation saisonnière des teneurs des HAP chez *Mytillus Provincialis* au centre atlantique côtes Marocaines (µg/Kg du P.F)	97
Fig.40	Plan ½ de l'analyse des composantes principale (ACP) réalisée pour les principaux sites des cotes marocaine au centre atlantique (n=7).	98
Fig.41	Structure de la molécule d'histamine.	102
Fig.42	Formation d'histamine.	103
Fig.43	structure de la molécule de la tyramine.	103
Fig.44	Réaction de formation de tyramine.	104
Fig.45	Structure de la molécule de la putrescine.	104
Fig.46	Les deux voies de formation de la putrescine.	105
Fig.47	structure de la molécule de la cadaverine.	105
Fig.48	Réaction de formation de la cadaverine.	106
Fig.49	Schéma pathogénique lors de l'ingestion de poisson altéré.	107
Fig.50	Les différents composants d'une chaine HPLC de type SHIMADZU.	112
Fig.51	Protocole de dosage des amines biogènes par HPLC.	113
Fig.52	Formation des amines biogènes selon les espèces étudiées.	116
Fig.53	Evolution des teneurs en amines biogènes (mg/k ± écart type) chez le maquereau durant le temps d'incubation.	119
Fig.54	Evolution des flores bactériennes (log UFC/g ± écart type) chez le maquereau durant le temps d'incubation.	119
Fig.55	Evolution des teneurs en amines biogènes (mg/k ± écart type) chez la sardine durant le temps d'incubation.	120
Fig.56	Evolution des flores bactériennes (log UFC/g ± écart type) chez la sardine durant le temps d'incubation.	120
Fig.57	Qualité de produit selon les limites maximales.	127
Fig.58	Variation des teneurs des amines biogènes selon les espèces étudiées.	129

Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
Tab.1	Pourcentages moyens des principaux constituants du filet de poisson.	4
Tab.2	Flux des ML dans l'environnement.	13
Tab.3	Demi-vie biologiques des métaux lourds.	16
Tab.4	Propriétés physico-chimiques du cadmium.	18
Tab.5	Propriétés physico-chimiques du plomb.	20
Tab.6	Propriétés physico-chimiques du mercure.	21
Tab.7	Coordonnées des sites étudiés.	26
Tab.8	Prélèvements et fréquence d'espèces de cephalopodes sur les différents sites d'étude.	27
Tab.9	Prélèvements et fréquence d'espèces de crustacés sur les différents sites d'étude	27
Tab.10	Prélèvements et fréquence d'espèces de poisson sur les différents sites d'étude.	27
Tab.11	Richesse en produits de pêche collectés lors de cette campagne de surveillance.	28
Tab.12	Performances du four à micro ondes.	32
Tab.13	Gamme étalon du plomb en ppb.	32
Tab.14	Gamme étalon du cadmium en ppb.	32
Tab.15	Concentrations du matériel de référence certifié pour cadmium.	36
Tab.16	Concentrations du matériel de référence certifié pour plomb.	36
Tab.17	limite de détection du plomb et cadmium.	36
Tab.18	Gamme étalon du mercure en ppm.	38
Tab.19	Concentrations du matériel de référence certifié.	38
Tab.20	limite de détection du mercure.	39
Tab.21	Performance du contrôle qualité en utilisant ERM-CE278, certifiée comme BCR-278R.	43
Tab.22	Estimation des concentrations des métaux lourds dans les produits de pêche (mg/kg de P.F).	43
Tab.23	Résultats de L'ANOVA des ETM étudiés.	49
Tab.24	Coordonnées des stations d'échantillonnage de bivalves.	53
Tab.25	Analyse de la variance à un facteur.	56
Tab.26	Comparaison des teneurs entre divers localités.	58
Tab.27	Les teneurs moyennes et les limites normatives selon la réglementation(CE) N° 629/2008 et (CE) N° 1881/2006.	58
Tab.28	Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires définis par l'US-EPA.	63
Tab.29	Potentiel cancérigène des HAP génotoxicité et cancérogénicité des 16 HAP prioritaires définis par l'US-EPA.	64
Tab.30	Propriétés physico-chimiques du Benzo(a)pyrène.	66
Tab.31	Propriétés physico-chimiques du pyrène.	67
Tab.32	Propriétés physico-chimiques d'Anthracène.	69
Tab.33	Propriétés physico-chimiques du Chrysène.	70
Tab.34	Propriétés physico-chimiques du Fluoranthène.	70
Tab.35	Propriétés physico-chimiques du Phénanthrène	71
Tab.36	HAPs étudiés et étalons internes.	74
Tab.37	Gamme étalon des 6 HAP en ppb.	78
Tab.38	Limite de détection pour chaque élément étudié et leurs étalons internes.	83
Tab.39	les teneurs totales des 6 HAP doses et l'origine des HAP	86
Tab.40	Analyse de la variance Résultat du test d'ANOVA pour les HAP étudiés.	88
Tab.41	Temps de rétention approximatif et masses en mode ions sélectifs et étalons internes des	93

	HAP analysés.	
Tab.42	Rendement établie avec les solutions standards des HAP et échantillons de moule.	93
Tab.43	Valeurs des deux ratios pour la determination des origines des HAP chez Mytillus galloprovincialis de differents cotes marocaines.	95
Tab.44	Amines biogènes et acides aminés précurseurs.	100
Tab.45	Occurrence et importance des amines biogènes dans l'organisme	101
Tab.46	Caractéristique physico-chimique d'histamine	102
Tab.47	Caractéristique physico-chimique de la tyramine	103
Tab.48	Caractéristique physico-chimique de la putrescine	104
Tab.49	Caractéristique physico-chimique de la cadaverine	106
Tab.50	Récapitulatif de Microflore produisant de l'histamine.	109
Tab.51	Microorganismes et conditions de croissance.	111
Tab.52	Gradient d'élution.	112
Tab.53	Evolution des teneurs en amines biogènes chez le poisson durant le temps d'incubation.	115
Tab.54	Evolution des flores bactériennes chez le maquereau durant le temps d'incubation.	118
Tab.55	Evolution des flores bactériennes chez la sardine durant le temps d'incubation	118
Tab.56	Teneurs moyenne des ML (mg/kg) pendant 4 ans (2006-2009), les concentrations présentées donnent un ordre de grandeur des niveaux de contamination par les ML.	124
Tab.57	Teneurs moyenne des ML (mg/kg) pendant 12 mois (2009-2010), les concentrations présentées donnent un ordre de grandeur des niveaux de contamination par les ML.	124
Tab.58	Teneurs moyenne des HAP (µg/kg) pendant 4 ans (2006-2009), les concentrations présentées donnent un ordre de grandeur des niveaux de contamination par les HAP.	126
Tab.59	Teneurs moyenne des HAP pendant 12 mois (2009-2010), les concentrations présentées donnent un ordre de grandeur des niveaux de contamination par les HAP.	126
Tab.60	Répartition des non-conformités selon les matrices.	127
Tab.61	Classement des sites selon la contamination chimique	128
Tab.62	Variation spatiotemporelle selon le type de contamination.	128
Tab.63	L'ensemble des teneurs des amines biogènes selon les espèces de poisson	129
Tab.64	Résidus chimiques et mesures préventives.	131
Tab.65	Indicateur chimique et mesures préventives.	132

Avant-propos

Avant-propos

Assurer la salubrité des denrées d'origine animale, offerte aux consommateurs, constituent l'une des préoccupations prioritaires de la sécurité alimentaire. De nos jours et pour cette finalité, de nombreux programmes préventifs et répressifs sont régulièrement réalisés à l'échelon national qu'à l'échelon international. De façon à proposer une évaluation et une analyse des risques sanitaires provenant de la consommation des produits de mer. Ce document est conçu dans le cadre d'une mission de surveillance et contrôle des résidus chimiques, il se place dans la lignée des travaux réalisés par le département de Biochimie au Laboratoire Regional des Analyses et de Recherches de Casablanca.

Vu l'importance du secteur de pêche au Maroc, il est important d'étudier de façon spécifique les types de pollution et polluants qui peuvent nuire à la qualité et salubrité des produits de pêche. Ce rapport contient une synthèse sur les concepts de base à propos de :

- Certaines substances potentiellement polluantes ;
- Techniques disponibles pour la détermination de certains résidus ;
- Risques résultants de la consomation de differents produits de mer.

Avant-propos

Ces travaux ont été realisés sous la direction du Dr A.Rachidi du service « Biochimie et Bromatologie », Laboratoire Régional des Analyses et de Recheches de Casablanca (LRARC) et du Pr S.Barrijal de l'équipe de Recherche « Valorisation Biotechnologique des microorganismes, Génomique et Bioinformatique ». Faculté des Sciences et Techniques de Tanger (FSTT).
‹‹ J'ai bénéficié d'une bourse d'excellence octroyée par le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (N° d2/006) et ce dans le cadre du programme des bourses de recherches initié par le Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieurs, de la Formation des Cadres et de la Recheche Scientifique ››.

Introduction Générale

Le Maroc possède des côtes considérées parmi les plus poissonneuses au monde, représenté par une façade méditerranéenne s'étendant sur environ 512 km de Tanger à Saidia et une façade atlantique de 2934 km, allant de Tanger à Lagouira [Laouina, 2006 ; El Hamzaoui et al, 2011]. Le littoral marocain représente un patrimoine valeureux pour le pays, c'est un pôle très structurant de la situation socioéconomique.

En matière de pêche maritime, le Maroc bénéficiant de sa position géographique privilégiée, a pu connaître un développement important. Il est le premier pays producteurs et exportateur des produits de la mer en Afrique et dans le monde arabe, à atteindre actuellement presque 50% des exportations des produits alimentaires. De part sa contribution aux échanges du commerce national et international. La surexploitation de ces ressources halieutiques, associée aux différentes agressions que subit le milieu marin, notamment l'utilisation de méthodes de pêche illicite et la pollution, a mené à une diminution des stocks et une menace sur la viabilité et la variabilité de certaines espèces marines. À cet égard, la connaissance et la surveillance de l'état de l'environnement est devenue une nécessité, pour pouvoir lutter contre toute menace [Nakhli et Ghazi, 2008].

Dans la plupart des mers et océans du globe, on trouve plusieurs classes de contaminants potentiellement toxiques, ce qui affecte la qualité des eaux et des produits de mer. Afin d'atténuer la toxicité de tout type de contaminants et de préserver la santé des écosystèmes marins, Il est impératif de contrôler et surveiller le milieu marin contre les effets préjudiciables des activités humaines et industrielles.

La pollution d'origine chimique (contaminants organiques et inorganiques) constitue actuellement un problème majeur. En effet, la présence de ces éléments dans l'environnement marin, notamment dans les denrées alimentaires ou dans les produits de la pêche représente un risque potentiel pour la consommation humaine. Il en résulte une demande croissante en moyen d'analyse car il est nécessaire de pouvoir identifier les polluants chimiques présents dans l'environnement et de les quantifier au niveau de traces et d'ultra traces à l'aide des méthodes d'analyses fiables, sensibles et reproductibles. Dans ce contexte, l'objectif de ce présent travail est de réaliser une activité de surveillance relative à la pollution marine au niveau des côtes marocaines (méditerranée et atlantique). Pour cela, nous avons choisi d'évaluer les teneurs de certains métaux lourds (plomb, cadmium et mercure) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) trouvés dans divers produits de pêche débarqués dans différents ports du royaume. En outre, ce travail s'inscrit pleinement dans la continuité des activités et campagnes de surveillance imposées par l'Union Européenne (principal importateur des produits de pêche Marocains). Le suivi des teneurs de ces substances nous a permis ; d'identifier celles qui sont très préoccupantes, de localiser les stations les plus polluées et de connaître les niveaux de risques.

L'objectif principal de ce travail est l'évaluation biochimique de l'état de salubrité de produits alimentaires surtout les produits de pêche.

Cette thèse est structurée en deux grands volets : Le premier volet est consacré aux contaminants chimiques, à la détermination des teneurs des métaux lourds et hydrocarbure polycycliques aromatiques dans différents produits de pêche (poisson, moule, etc.). Le

deuxième volet est consacré aux indicateurs biochimiques (Amines biogènes) déterminants l'état de salubrité et d'altération chez certaines espèces de poissons. Ce document est un compplément pour d'autres travaux précédents focalisés aussi sur la contamination des composantes du milieu marin (moules, algues, etc.). Il permet ainsi de récapituler les arguments scientifiques déjà constitués et cités selon nos résultats, les conséquences sanitaires sur les produits de mer et sur le consommateur.

Chaque partie de ce mémoire est organisée de manière à présenter une synthèse bibliographique, suivi du protocole analytique utilisé pour chaque analyte ou éléments. En fin de la partie, on présente l'ensemble des résultats des analyses de chaque élément dosé dans différentes matrices biologiques étudiées (poisson et autres organismes marins), et leur discussion. L'ensemble des travaux de cette thèse est répartie de la façon suivante :

- La première partie rassemble les données générales sur les contaminants inorganiques. l'impact de la pollution métallique. la détermination des teneurs du plomb, cadmium et mercure dans différents produits de pêche. L'analyse des échantillons est effectuée par la spectrométrie d'absorption atomique.

- La seconde partie, Il s'agit d'une présentation du contexte général de la problématique liée aux contaminants organiques. la présence des hydrocarbures polycycliques aromatiques qui peuvent nuire à la qualité des eaux de mer et à la salubrité des produits de pêche (moules et algues). Le dosage des HAP est réalisé grâce à la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Dans ce premier volet de la présente thèse, Les résultats obtenus sont discutés dans le but d'améliorer les connaissances concernant l'évolution de la pollution chimique au Maroc. Nous avons tracé une carte bilan déterminant les sites les plus vulnérables à ce type de pollution. Ce volet permet de porter un jugement sur le degré relatif de la contamination, de mettre en relation l'influence de ces résidus sur l'homme.

- La troisième partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique sur les amines biogènes, largement documentée dans la littérature. Cette partie est consacrée aussi à l'optimisation et à la validation de la méthode d'analyse des amines biogènes. Aussi, une attention particulière est portée aux facteurs influençants la cinétique de formation des amines biogènes, surtout l'histamine chez certaines espèces de poissons.

- La quatrième partie a pour objectif de présenter un inventaire sur tous les éléments et paramètres étudiés et leur influence.

Au cours de ce deuxième volet, Nous avons mis en lumière le caractère de certains contaminants biologiques, d'origine chimique, qui se manifestent par la prolifération des microorganismes menaçant ainsi la salubrité des produits de pêche.
La dernière partie de cette thèse présente une synthèse des conclusions de ces travaux et des perspectives à venir.
Ce projet de thèse avait donc pour but de développer des outils analytiques permettant une étude fiable des interactions entre la matière organique et les contaminants. Ainsi d'essayer de comprendre les phénomènes mis en jeu dans ces interactions.

1. Produits de pêche : richesse, composition et consommation

Le potentiel marocain en ressources halieutiques est estimé à 1.5 millions de tonnes annuellement extraites sans perturbation des équilibres biologiques. Le marché marocain est caractérisé par une très grande diversité d'espèces de poissons, de coquillages, de crustacés et de céphalopodes. Plus d'une centaine d'espèces différentes sont consommées, issues de la pêche en mer, de la pêche en eau douce ou de l'aquaculture et provenant d'origines géographiques variées.

Les produits de pêche sont caractérisés par une diversité d'espèces très importantes, ils renferment des animaux appartenant à différents groupes zoologiques. Il s'agit principalement de poissons [poissons cartilagineux (élasmobranches) et poissons osseux (Ostéichyens)], de mollusques [gastéropodes, céphalopodes et bivalves (huitres)] et de crustacés [Diop et al, 2010]. Ces produits présentent des qualités très variables [Leduc, 2011]. Selon la FAO (Organisation des nations unies pour l'alimentation), la faune aquatique assure 15 à 20% de toutes les protéines animales de l'alimentation humaine. Le poisson a une haute valeur nutritive et constitue un complément précieux dans les régimes alimentaires.

La valeur nutritive d'une denrée est évidemment fonction de sa constitution chimique. Les constituants spécifiques du poisson lui donnent une qualité nutritionnelle et sensorielle qu'apprécie le consommateur. La composition globale dans la plupart des poissons est principalement de l'eau, des protéines et des lipides (Tabl.1). Dans la chair, ces constituants représentent environ 98%, et les autres constituants mineurs comprennent les glucides, les vitamines et les minéraux [Ifremer, 1991 ; Leduc, 2011, Sikorski et al, 1990]. Cependant, cette composition chimique du poisson varie généralement selon les saisons, les zones géographiques, les stades de maturité et la taille.

Tableau.1 : Pourcentages moyens des principaux constituants du filet de poisson [Stansby, 1962 ; FAO, 1995].

Constituant	valeur dans les poissons (%)		
	Min	**Normal**	**Max**
protéines	6	[16-21]	28
Lipides	0.1	[0.2-25]	67
Hydrate de carbone		> 0.5	
Cendres	0.4	[1.2-1.5]	1.5
Eau	28	66-81	96

Compte tenus des éléments composants du poisson, il est considéré comme un précieux allié de l'homme sur le plan santé. Il représente une source précieuse de protéines de haute qualité, de minéraux et de vitamines. En outre, le poisson gras est riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série des omégas 3. Ces acides gras possèdent des propriétés nutritionnelles recherchées et impliquées dans la prévention des maladies cardiovasculaires, cancéreuse et inflammatoires [kamal-Eldin et Yanishlieva, 2002] dont les effets bénéfiques sur la santé sont largement reconnus.

Les poissons auront des périodes de famine pour des raisons naturelles ou physiologiques (telle que la migration) ou à cause de facteurs extérieurs tel que le manque de nourriture. Les poissons qui ont des réserves d'énergie sous forme de lipides feront appel à celles-ci. Les espèces effectuant de longues migrations, avant d'atteindre des lieux spécifiques, peuvent utiliser des protéines en plus des lipides pour puiser de l'énergie et épuisent, de ce fait, leurs

réserves à la fois de lipides et de protéines, ce qui conduit à une réduction générale de la condition physique du poisson. Par surcroît, la plupart des espèces s'alimentent très peu durant leur migration et sont, de ce fait, incapables de se procurer de l'énergie par les aliments. Durant les périodes d'alimentation intense, la teneur en protéines du tissu musculaire va d'abord augmenter jusqu'à un point dépendant de la quantité qui a été perdue, c'est-à-dire en rapport avec la migration. Ensuite la teneur en lipides va marquer une augmentation rapide. La fraction lipidique est le composant qui subit les variations les plus importantes. Souvent la variation dans une espèce donnée montrera une courbe saisonnière caractéristique. Bien que la fraction protéinique soit plutôt constante dans la plupart des espèces, on a pu observer des variations chez certaines espèces pendant de longues migrations [FAO, 1995 ; Huss, 1999].

La consommation du poisson augmente en général le potentiel antioxydant du sang, tout en protégeant le corps des propriétés anti-cancérigènes. Aussi, il s'est avéré selon des tests, avoir un effet amincissant et que les régimes alimentaires dans lesquels le poisson avait une bonne place ont été les plus concluants et les plus réussis.

En effet, Ces effets bénéfiques sur la santé compenseraient largement les risques potentiels de cancers ou d'autres maladies que pourraient causer des contaminants - comme le mercure - contenus dans les poissons. Compte tenu de leur pouvoir accumulateur, ces êtres vivants sont souvent utilisés et qualifiés comme de bioindicateurs pour le milieu marin.

Occupant une place privilégiée dans l'univers, le profil de la demande des produits de pêche est toujours en accentuation, quelque soit les modes de présentation (frais, congelé, conserves...). Toutes les couches de population consomment ces produits, et cela en raison de leur valeur nutritive et leur grande variabilité en espèces qu'en prix.

2. Problématique

Compte tenu des activités industrielles et humaines, plusieurs composés et éléments toxiques se retrouvent jeter dans les milieux marins, générant ainsi une détérioration de la qualité des eaux marines, des nuisances au niveau des organismes aquatiques, et surtout une menace pour la santé de l'homme.

Dans cette étude, nous avons jugé nécessaire de sensibiliser contre les polluants les plus redoutés pour le milieu marin, et leur implication dans les phénomènes de bioamplification et bioaccumulation dans les chaines alimentaires et delà de soulever l'importance des connaissances en matière de risques biochimiques et pollution marine pour pouvoir préserver la santé humaine et la qualité environnementale.

3. Plan de surveillance des résidus chimiques

Les problèmes d'environnement se manifestent de plus en plus souvent sous la forme de menaces sanitaires. Aujourd'hui, l'homme est exposé à une pollution occasionnée par de multiples substances et/ou produits chimiques, qui ont des effets multiples sur la santé publique. Le concept de protection du milieu marin fait son apparition principalement après la prise de conscience des déversements et rejets volontaires de divers polluants dans la mer causant la détérioration globale de la qualité et de la productivité de l'environnement marin. La question était de résoudre le problème de certains types de pollutions marines.

La mise en place des plans de surveillance des résidus s'est avérée une priorité, permettant de garantir au consommateur des denrées alimentaires exemptes de tout risque sanitaire.

Il est devenu primordial de surveiller la qualité du milieu marin, surtout qu'il recouvre à lui seul 71% de la superficie de notre planète.

Les programmes de surveillance exigent des suivis et des contrôles ciblés, limités dans le temps afin d'identifier les infractions et les non-conformités. Aussi, d'apporter des mesures correctives pour pouvoir établir un plan de contrôle adéquat.

La garantie d'un haut niveau de protection constitue l'un des principaux objectifs de la législation alimentaire, c'est à cette fin que sont fixées des limites et des seuils en teneurs de ces contaminants pour ne pas mettre en danger la santé humaine.

Les eaux marines représentent un vecteur important du transfert des polluants (contaminants chimiques et biologiques) de l'environnement vers l'organisme. Pour cette raison, il est essentiel d'appliquer un programme de surveillance continu.

L'objectif principal de notre mission de surveillance des résidus chimiques est l'évaluation des risques liés à la présence de métaux lourds et HAP afin de garantir au consommateur des denrées alimentaires exemptes des risques chimiques.

La surveillance en mer participe à l'assurance que les procédures préconisées par les pouvoirs publics sont bien mises en œuvre (Fig.1). C'est donc un élément supplémentaire dans le renforcement de la fiabilité de la traçabilité.

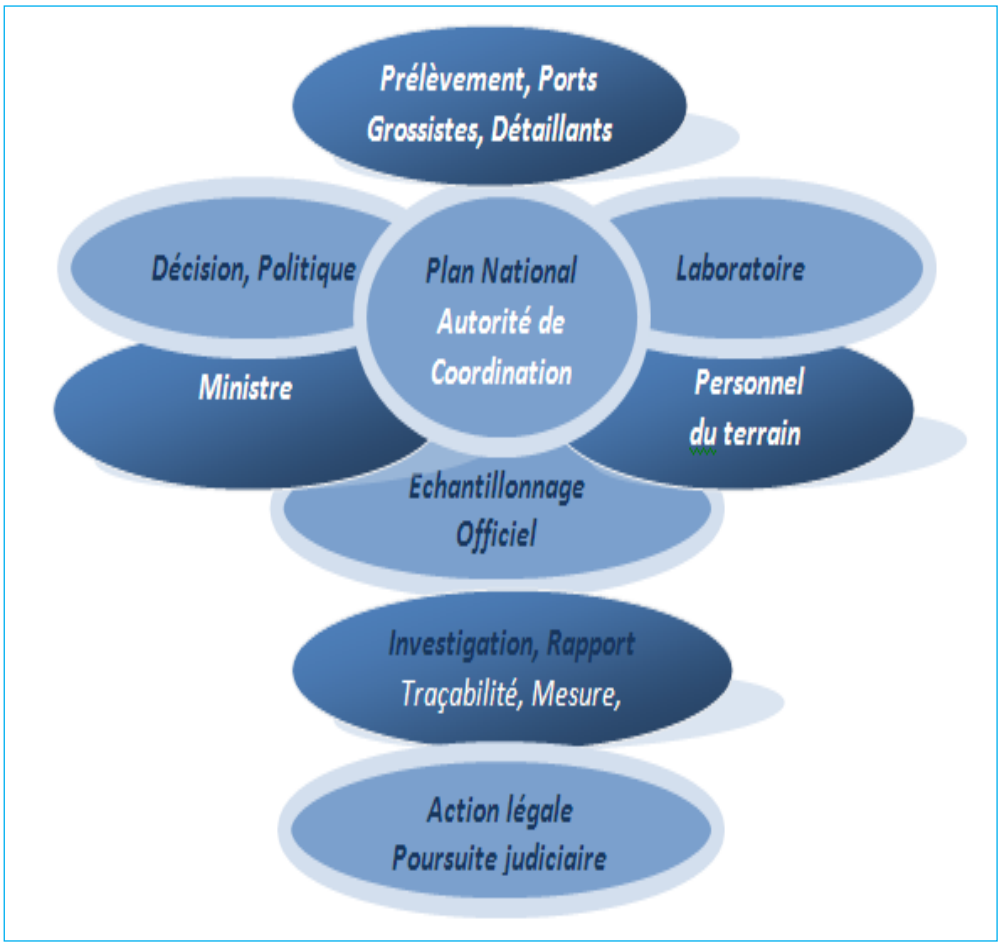


Figure.1 : Organisation globale d'un plan de surveillance.

4. altération des produits de pêche et paramètres indicateurs

Les produits de la mer sont des denrées très périssables et nécessitent une rapide réfrigération afin de limiter leur altération. Il est recommandé de les consommer et de les transformer rapidement après capture afin de limiter le développement bactérien et l'apparition de l'odeur désagréable. La qualité initiale du poisson dépend de ses habitudes alimentaires, des conditions de croissance, de la saison, des conditions de pêche (ex. l'écrasement en fond de chalut ou de cale) [Garthwaite, 1992].
La fraicheur est le plus important attribut lors de l'évaluation de la qualité des produits de la mer et est très préoccupante pour la santé humaine. Il convient donc de disposer d'outils performants pour déterminer précisément le niveau d'altération et comprendre la complexité des mécanismes d'altération. Après la mort, la qualité initiale du poisson se modifie, plusieurs mécanismes se produisent et engendrent la détérioration du poisson, ils posent des problèmes tant hygiéniques que toxicologiques et économiques [Diop et al, 2010].
Il a été établi, depuis de nombreuses années, qu'il existe au moins deux types d'altération du poisson : bactérienne et enzymatique. Dans certaines espèces, les altérations enzymatiques précédentes les changements de la qualité microbiologique. Les premiers changements survenant post mortem dans le poisson sont dus aux enzymes tissulaires et digestives et à l'oxydation des lipides, ensuite c'est le développement bactérien qui est le responsable essentiel de la dégradation du poisson. L'altération met en jeu un ensemble de processus microbiologiques, chimiques et physiques [Leduc, 2011]. Plusieurs approches permettent d'évaluer le niveau d'altération ou de fraicheur du poisson. Elles sont de l'ordre sensoriel, microbiologique et chimique.
Les produits de la mer sont généralement considérés comme des aliments riches en protéines quand ils sont comparés à d'autres produits alimentaires d'origine animale riches en protéines [Leduc.2011]. Tous les aliments protéiniques s'altèrent tôt ou tard, connus par leur grande susceptibilité à la dégradation, ils subissent un processus naturel de décomposition qui est le résultat de la succession de réactions enzymatiques, chimiques et microbiologiques. Mais un certain nombre de mesures peuvent être prises pour réduire la vitesse d'altération.
Les cathepsines seraient les premiers acteurs de la dégradation du tissu musculaire des produits de pêche. Ces enzymes proviennent des lysosomes fragilisés par l'abaissement du pH à la mort du poisson [Kolodziejska et al, 1995]. Elles ont une action ramollissante sur la chair du poisson. Cette action survient dans les prises après 5 à 30 h de stockage à 0 °C [Cheftel et al, 1992]. Elle favorise la diffusion de liquides biologiques et la progression des bactéries dans le muscle du poisson, normalement stérile.
La microflore responsable de la dégradation du poisson frais change avec les variations de température de conservation :

- Aux basses températures (0° à 5° C), ce sont surtout *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, *Aeromonas spp*. et *Pseudomonas spp*.
- Aux températures de conservation élevées (15° C à 30° C) ce sont des *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae* et bactéries à Gram +.

Les activités enzymatiques et microbiennes sont influencées par la température. Les variations de température ont plutôt une plus grande influence sur la croissance microbienne que sur l'activité enzymatique. Par exemple, le taux de croissance (µmax) de la bactérie principale d'altération du poisson, *Shewanella putrefaciens*, est 10 fois moins important à 0 °C qu'à la température optimale de croissance (environ 30° C). L'activité microbienne étant le principal facteur d'altération de la plupart des poissons frais, la maîtrise de la température est donc un facteur clé.

Les indicateurs chimiques d'altération les plus utilisés sont l'ABVT, les amines biogènes et les catabolites de nucléotides [Ifremer, 1991 ; Ababouch, 1994].

5. Contexte et objectifs

Cette recherche est ancrée en partie dans une mission de surveillance destiné à réaliser une étude intégrée de l'environnement marin. Les objectifs de ce travail sont orientés relativement aux questions sociétales et pour apporter des éléments d'aide à la gestion de ce milieu pour les acteurs locaux. Les objectifs de ces travaux sont de renseigner sur la qualité du milieu marins et ses produits.

À l'issue de ce travail, Nous avons réalisé des contrôles biochimiques sur les produits de pêche pour évaluer le potentiel polluant de certaines substances dans le milieu marin. Les principaux objectifs de cette thèse sont subdivisés comme suit, dans deux grandes lignes:

- Rapporter les résultats d'une compagne de surveillance des résidus chimiques (ML et HAP) dans divers produits de pêche.
- Évaluer la corrélation des indicateurs chimiques (AB) et bactériologiques utilisés pour le contrôle de salubrité des produits de pêche.

Nous avons mis le point sur :

- L'évaluation des teneurs des polluants chimiques (ML et HAP) ;
- La distribution spatiotemporelle des contaminants chimiques ;
- La détermination et l'identification des zones à risque ;
- La connaissance de l'état de santé des organismes marins.
- Le suivi régi par la législation et la réglementation nationale et internationale.

A.Contaminants inorganiques : Eléments traces métalliques

Les enjeux environnementaux et sanitaires liés à la pollution chimique dans les milieux aquatiques sont au cœur de nombreux débats de société et la prise de conscience de la nécessité de réduire la pollution toxique est de plus en plus importante. En effet, les polluants métalliques ont des impacts non seulement sur l'environnement, mais aussi sur la santé humaine, avec des conséquences économiques non négligeables. La pollution peut avoir des effets irréversibles sur les écosystèmes comme la disparition d'espèces, la contamination de la chaîne trophique, etc…
Outre l'aspect patrimonial (appauvrissement de la diversité biologique), les conséquences sanitaires peuvent être importantes, voire même mortelles. Dans les années 50 et 60, au Japon, une pollution au cadmium dans les rizières a déclenché de nombreux troubles rénaux et osseux, entraînant une importante mortalité dans les populations de ces régions [Boucheseiche et al, 2002 ; Ghali, 2008].

1. Minéraux toxiques: Généralités

Les métaux occupent une place prépondérante dans l'activité économique mondiale. Ils jouent un rôle stratégique dans certaines applications. Il faut préciser qu'il existe 2 catégories de métaux : ceux qui sont indispensables à la vie, comme le cuivre dont la carence, aussi bien que l'excès, peut provoquer des maladies, et ceux qui ne le sont pas comme le cadmium, qu'il faut éviter [Boucheseiche et al, 2002].
La définition scientifique et technique des métaux lourds évoque leur densité élevée (dépasse 5g/cm^3), leur numéro atomique élevé, en général supérieur à celui du Sodium (Z=11), et leur pouvoir toxique pour les systèmes biologiques [Bloundi, 2005 ; Ghali, 2008 ; INERIS, 2006].
À la différence des autres contaminants, les métaux lourds sont des composés inorganiques, se sont des minéraux, très toxiques, même à de faibles concentrations [Bourrinet et al, 2008]. Leur caractère persistant signifie qu'ils ne se dégraderont jamais, ni dans l'environnement, ni lors de la transformation de produits alimentaires, ni dans le corps. Ces métaux lourds et leurs composés contaminent de plusieurs manières l'alimentation.
Les caractéristiques des micropolluants métalliques sont généralement les suivantes :

- Non biodégradables (dégradation par des organismes vivants).
- Toxiques cumulatifs (accumulation dans les tissus des organismes vivants).
- Toxiques quand ils sont présents en grande quantité [Boucheseiche et al, 2002].

2. Origine des métaux lourds

Les métaux lourds peuvent provenir de plusieurs sources d'origine naturelles ou anthropiques. La dernière phase de la circulation d'un polluant dans la biosphère est constituée par la contamination des êtres vivants et, parfois, par la bioaccumulation dans l'organisme de ces derniers (Fig.2).

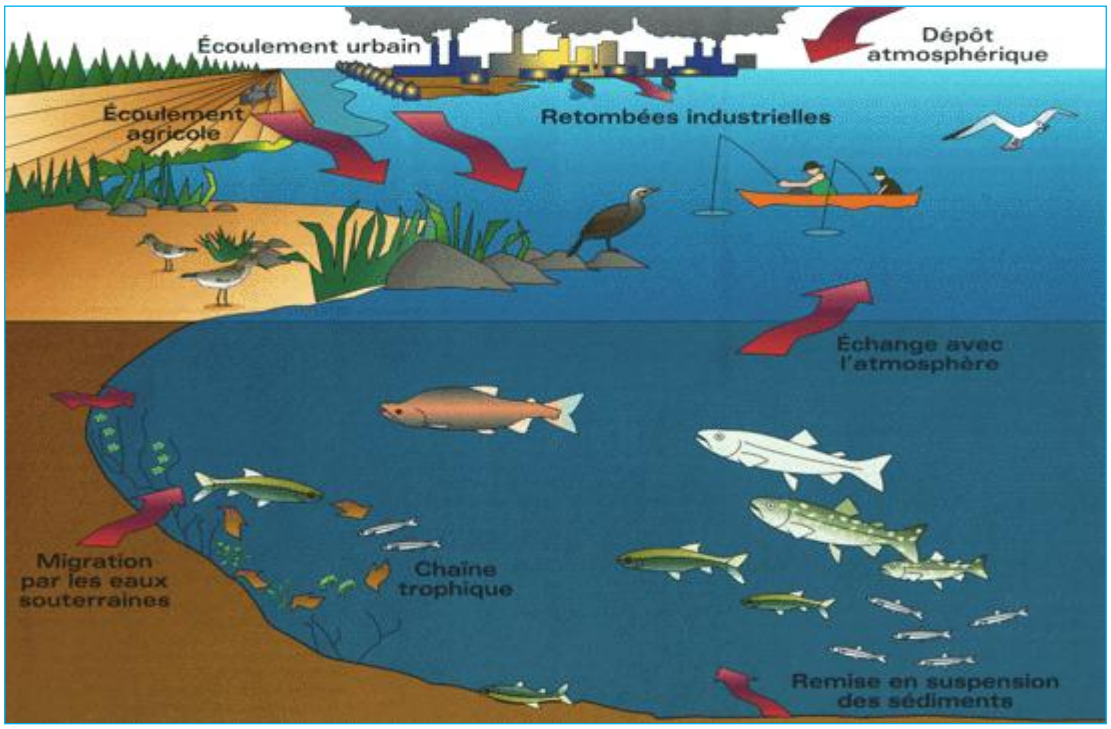


Figure.2 : Sources et cheminements de la pollution.

Origine naturelle : La présence de métaux dans le milieu est d'origine naturelle, du fait de la nature géochimique des terrains drainés par les cours d'eau. [Maanan et al, 2004 ; Glasby et al, 2004].On peut souligner des teneurs moyennes très faibles dans la croûte terrestre, qui sont souvent inférieures à celles du fond géochimique observé dans certaines formations. Elle dépend en premier lieu de la teneur dans la roche qui est à l'origine du sol, mais également des processus qui sont intervenus lors de la formation du sol, qui ont pu lessiver ou plus généralement concentrer l'élément en question [Ghali, 2008].

Origine anthropique : Les métaux lourds sont issus des activités variées : l'industrie, le transport, l'agriculture, les exploitations minières, les décharges et les boues urbaines. Les activités anthropiques peuvent conduire à une augmentation des concentrations naturelles [Boucheseiche et al, 2002].

Les origines anthropiques des métaux lourds sont diverses, le tableau 2 nous renseigne sur les flux naturels (altération des roches,…) et anthropogénique (lié aux activités humaines) [Dietrich, 1998 ; Maanan et al, 2004 ; Glasby et al, 2004].

Tableau.2 : Flux des ML dans l'environnement (en tonnes) [Berthelin et al, 1998].

Eléments	Flux Anthropogénique (1)	Flux naturel (2)	Rapport (1)/(2)
Cd	43	4,5	9,6
Pb	3665	180	20,4
Hg	17,8	0,9	19,8

Ce tableau indique que les rapports (flux anthropogénique/ flux naturel) sont tous supérieurs à 1 c'est à dire que le risque de contamination métallique des cycles biogéochimiques est régie surtout par les activités humaines.

3. Phénomène de la bioamplification

Dans certains écosystèmes, de nombreux êtres vivants, sinon tous, peuvent accumuler dans leur organisme, à des degrés divers, toute substance peu ou non biodégradable [Bourrinet et al, 2008]. Les métaux lourds peuvent être à l'origine de la disparition de certaines espèces animales et/ou végétales et par conséquent, entraînent le dysfonctionnement de la chaîne trophique (faible biodiversité…) [Sirven, 2006]. Ils sont des polluants non biodégradables, qui peuvent affecter la vie aquatique. Depuis les producteurs primaires, le risque de contamination s'amplifie au fur et à mesure que l'on remonte à travers les maillons de la chaîne trophique (phénomène de bioaccumulation).

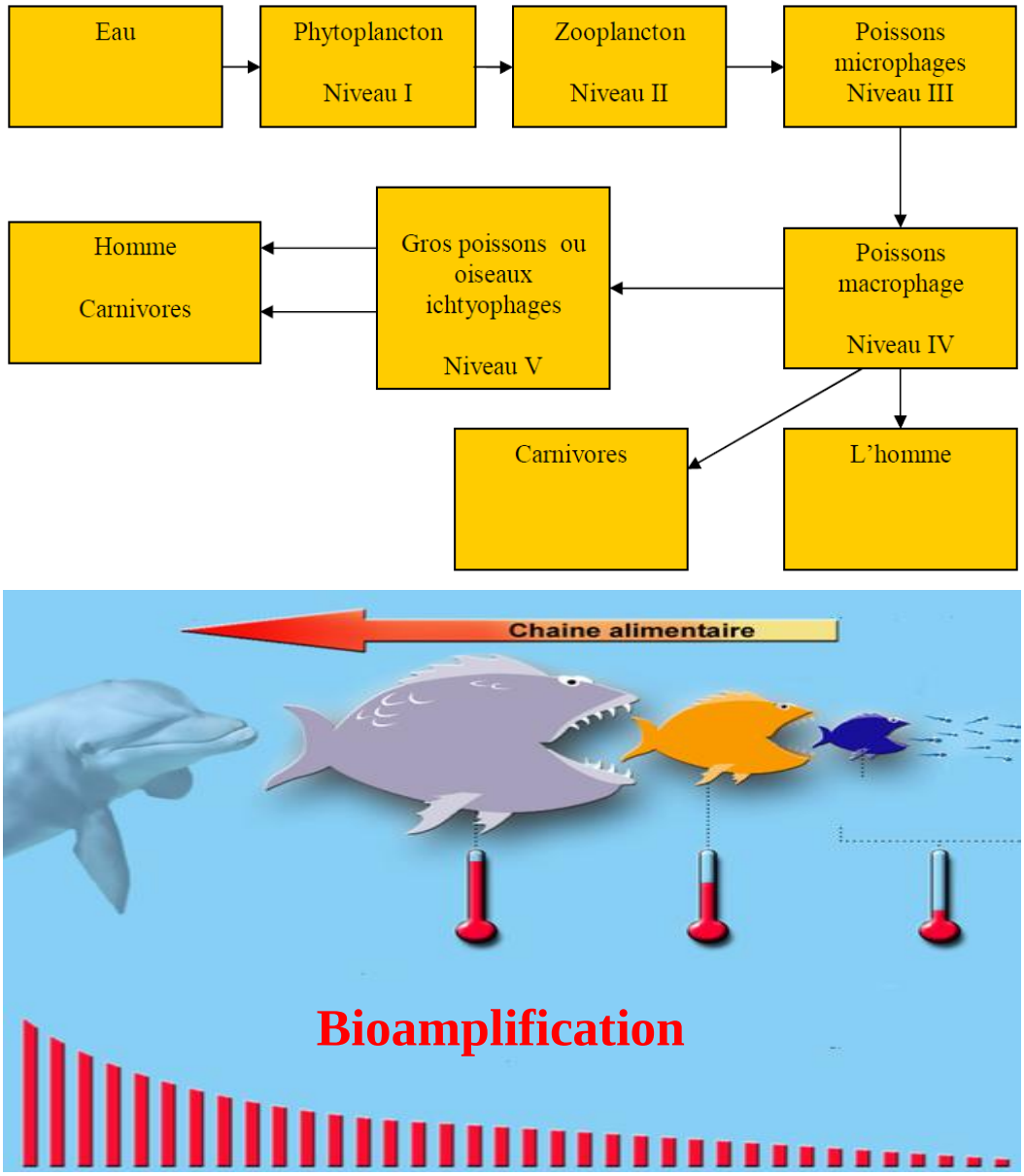


Figure.3 : la chaine trophique contamine par les métaux lourds.

La bioaccumulation est le processus d'assimilation et de concentration des métaux lourds dans l'organisme. Le processus se déroule en trois temps : l'assimilation, la bioaccumulation

par l'individu, ou bioconcentration, et la bioaccumulation entre individus, ou bioamplification.

- **L'assimilation :** Il existe deux voies principales d'exposition aux polluants : la voie externe, par contact (par l'air ou l'eau…) qui provoque un phénomène d'adsorption (la substance toxique reste à la surface), et la voie interne par assimilation ou absorption. Toute absorption d'un polluant n'est pas nécessairement dangereuse. Et cela dépend, d'une part des concentrations du polluant. D'autre part, de la fraction soluble bio disponible. La partie soluble bio disponible, assimilable, se concentre dans certains organes. C'est ce qu'on appelle l'organotropisme. L'assimilation diffère selon les métaux, le cadmium se concentre presque exclusivement dans le tube digestif, le foie et les reins. Le plomb se diffuse dans la peau, les muscles, la colonne vertébrale. Le mercure, dans sa forme organique, se diffuse facilement dans le système nerveux.

- **La bioaccumulation par l'individu :** La bioconcentration concerne tous les métaux lourds, mais plus particulièrement le mercure, lorsqu'il est présent sous forme organique (méthylmercure) qui est la forme la plus toxique pour l'homme. Ce processus de bioaccumulation s'exprime par un ratio entre la concentration du composé étudié dans le milieu et la concentration dans l'organisme. Ce ratio porte le nom de facteur de bioconcentration (BCF). Les organismes vivants concentrent beaucoup plus les métaux que l'eau et l'air. L'analyse des transferts met en évidence une hiérarchie entre les espèces, classées selon leur proportion à concentrer les métaux lourds. Le BCF dans les poissons est de plusieurs milliers, voir de plusieurs dizaines de milliers que celui des mollusques et les invertébrés.

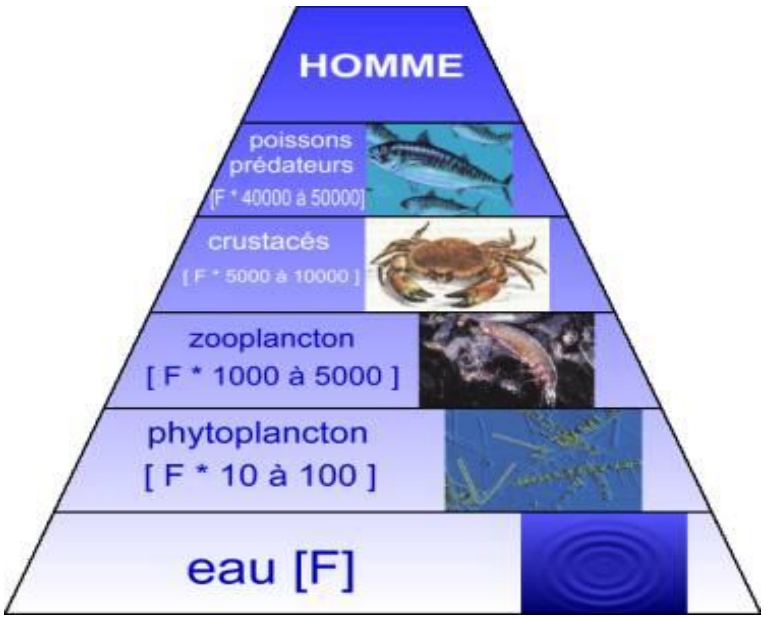


Figure.4 : Facteur de bioconcentration dans la chaine alimentaire.

- **La bioaccumulation entre individus (la bioamplification) :** Les transferts de métaux entre individus suivent un processus classique, dit « transfert trophique ». Le polluant, présent dans les algues et les microorganismes est ingéré par un herbivore, lui-même proie pour un carnivore, lui-même proie d'un super carnivore, animal ou homme (Fig.3) [Bourrinet et al, 2008]. En bout de chaîne, on se trouve donc avec un consommateur

final ayant bioaccumulé les formes solubles des métaux. Les concentrations augmentent au fur et à mesure que l'on progresse dans la chaîne trophique. C'est le cas du plomb et surtout du mercure sous la forme méthylée. Le mercure s'accumule à chaque étape et se retrouve concentré au bout de la chaîne alimentaire, notamment dans les gros poissons piscivores. On appelle ce phénomène la « bioamplification » ou la « biomagnification ».

4. Toxicité et Persistance

La toxicité des métaux lourds est connue depuis l'Antiquité, et pour certains d'entre eux, a été tragiquement illustrée par plusieurs catastrophes telle que celle produite lors de la catastrophe tristement célèbre de la baie de Minamata, au Japon, dans les années 50 : une usine de produits chimiques déversait dans la mer le mercure. Les coquillages et les poissons, largement consommés par la population locale, furent fortement contaminés et des teneurs en mercure furent mesurées jusqu'à deux ordres de grandeur au-dessus des normes de l'OMS. Près de 2000 personnes furent contaminées, et la pêche fut interdite pendant 40 ans dans la baie [Sirven, 2006 ; Bourrinet et al, 2008 ; Ghali, 2008].
Comparés aux polluants organiques, les métaux lourds ont l'inconvénient majeur de ne pas être biodégradables par des processus chimiques ou biologiques : on parle de persistance des métaux.
Quel que soit le mode de contamination, les métaux lourds s'accumulent dans l'organisme : sang, foie, cerveau, reins...et ne sont éliminés que très lentement. La demi-vie biologique des métaux s'étale de quelques jours aux quelques années. On note que certains éléments (plomb, mercure, cadmium) ont des demi-vies biologiques très différentes selon leur organisme cible.

Tableau.3 : Demi-vie biologique des métaux lourds.

Élément	Temps de demi-vie biologique
Pb	20-30 jours dans le sang
	40-60 jours dans les reins, la moelle, le foie, le cerveau
	2-10 ans dans les os
Hg	30-60 jours dans le sang
	1 an dans le cerveau
Cd	30 jours dans le sang
	20-30 ans dans le rein

La dangerosité de ces éléments dépend aussi de la mobilité, la biodisponibilité, ainsi que de la solubilité, puisque les composés en solution sont très mobiles donc facilement bio disponibles. La mobilité dépend également de leur origine, naturelle ou anthropique (ex. le cadmium naturel est souvent immobilisé sous des formes relativement inertes, ce qui est à priori moins le cas du cadmium anthropique, et qui aggrave donc les risques liés à une pollution industrielle). La forme chimique joue aussi un rôle essentiel : deux formes chimiques différentes d'un même élément peuvent avoir des effets très différents.

Pour l'homme, la problématique des métaux lourds est majeure car elle affecte toutes les caractéristiques de la vie. En effet, la cellule est l'unité biologique fondamentale la plus petite or les métaux lourds peuvent entraîner sa dégénérescence. Certains d'entre eux sont cancérigènes, il peut donc y avoir atteinte de l'entité élémentaire de la vie [Ghali, 2008].

Plus précisément, La plupart des métaux lourds, suite à une absorption importante, provoquent des troubles respiratoires et digestifs (diarrhées, vomissements, douleurs abdominales) pouvant être extrêmement graves, jusqu'à entraîner la mort. Les dysfonctionnements rénaux sont également fréquents. En cas d'intoxication chronique, le plomb et le mercure se distinguent par le fait que le système nerveux central est leur cible privilégiée, entraînant des troubles moteurs (coordination des mouvements, tremblements), du comportement, de la mémoire et une altération des capacités intellectuelles. Le plomb perturbe également la synthèse de l'hémoglobine, ce qui provoque l'anémie (défaut de globules rouges). Enfin, certains métaux sont toxiques pour la reproduction, soit parce qu'ils engendrent des malformations ou des troubles chez les enfants, soit parce qu'ils sont responsables d'une diminution de la fertilité.

5. Métaux lourds dans le milieu marin

Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en de très faibles quantités [Ghali, 2008]. Ils sont acheminés dans les écosystèmes marins par voie atmosphérique et par le biais des cours d'eau [Maanan et al, 2004 ; Glasby et al, 2004]. Ces éléments peuvent être incorporés dans les sédiments, les eaux, les matières en suspension et les organismes marins. [Niencheski et Baumgarten, 2000].
Du fait de leur toxicité, ces éléments peuvent changer la productivité primaire des environnements côtiers. Ils perturbent le cycle biologique de beaucoup d'organismes. Leur présence dans les écosystèmes côtiers témoigne surtout d'une influence anthropique [Sunda, 1989, Vazquez et al, 1999].
Le problème de l'élimination des métaux lourds est rendu délicat par le fait de leur activité à des doses souvent très basse. Plusieurs méthodes ont été proposées pour l'élimination de ces métaux, les plus utilisées sont :

- L'Adsorption ;
- La Filtration par membrane ;
- L'Echange d'ions ;
- L'Electrocoagulation-floculation ;
- La Fixation biologique ;
- La Précipitation chimique [Ghali, 2008].

6. Eléments traces étudiés

Parmi les métaux lourds, on distingue principalement trois d'entre eux : le mercure, le plomb et le cadmium. Pourquoi distinguer ces trois métaux ? Il y a, d'une part, une raison historique. Les premiers biochimistes ont distingué ces trois métaux en raison de leur affinité avec le soufre qui permettait d'identifier les protéines « qui précipitent lourdement » ou donnent facilement des sels (sels de mercure, sels de plomb). D'autre part, les trois métaux ont aussi quelques caractéristiques physicochimiques communes :

- Ils se transportent, changent de forme chimique, mais ne se détruisent pas.
- Ils ont une conductivité électrique élevée, qui explique leur utilisation dans de nombreuses industries. Pourtant, ils présentent une certaine toxicité pour l'homme, entraînant notamment des lésions neurologiques plus ou moins graves. Tandis que tous les autres ont une utilité dans le processus biologique, certains d'autres comme les oligoéléments sont même indispensables à la vie (le fer, le cuivre, le nickel, le chrome...),

- Ils sont les plus redoutables, susceptibles d'être métabolisés et concentrés au niveau des organismes marins. Ils peuvent causer des problèmes sérieux de santé.

6.1. Cadmium

Le cadmium fut découvert en 1808 par Magnus Martin Pontin. C'est un métal de transition blanc argenté [Martin-Garin et Simon, 2004 ; INERIS, 2011 ; Ghali, 2008]. La pollution par le cadmium est en forte diminution dans les mers depuis les années 1980, mais les taux restent localement préoccupants, notamment dans les coquillages et organismes du haut de la pyramide alimentaire [Ghali, 2008]. Plusieurs composés contenant du cadmium sont classés dans la liste des produits carcinogènes et peuvent induire beaucoup de types de cancer [Ghali, 2008], c'est une substance classée «dangereuse prioritaire» par la Directive Européenne 2000/60/CE [Boucheseiche et al, 2002].

6.1.1. Identification et caractérisation :

Le cadmium a des propriétés physiques proches de celle du zinc. Lors de son ébullition, il se dégage des vapeurs jaunes toxiques. Il est ductile (résistance à l'étirement), malléable (résistance à l'aplatissement) et résiste à la corrosion atmosphérique, ce qui en fait un revêtement de protection pour les métaux ferreux [Ghali, 2008].
Il s'oxyde très peu à température ambiante et brûle dans l'air en donnant l'oxyde anhydre, insoluble dans un excès d'hydroxyde de sodium. Il réagit avec les acides et les bases. Le cadmium est soluble dans l'acide nitrique dilué et dans les acides chlorhydrique et sulfurique concentrés et chauds.

Tableau.4 : Propriétés physico-chimiques du cadmium

Numéro atomique	48
Masse atomique	112.4 g mol^{-1}
Température de fusion	321°C
Température d'ébullition	767 °C

Le cadmium n'est pas essentiel au développement des organismes animaux ou vegetaux et ne participe pas au métabolisme cellulaire. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du calcium, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus [Martin-Garin et Simon, 2004].

6.1.2. Sources et exposition :

Les origines de la pollution par le cadmium sont multiples. Le cadmium (Cd) est peu répandu dans la croûte terrestre. Il ne se trouve pas à l'état élémentaire dans la nature ; il est généralement présent dans des minerais de zinc ou de plomb. Le cadmium rejeté dans l'atmosphère provient de sources naturelles comme les éruptions volcaniques [INERIS,2011]. Pourtant, Les activités industrielles sont la principale source d'émission dans l'air. Le cadmium retrouvé dans l'eau est issu de l'érosion des sols, sa présence est surtout d'origine anthropique comme les rejets industriels [Martin-Garin et Simon, 2004].

Le cadmium semble quantitativement absorbé d'abord par inhalation et moindrement par absorption gastro-intestinale. Il n'est pas absorbé par la peau. En dehors de l'exposition professionnelle, on peut y être exposé via :

- La fumée et les poussières perdues par certaines industries (métallurgie, recyclage des batteries au cadmium, engrais phosphorés);
- La fumée de cigarette (la source principale de contamination de la population générale);
- Les engrais phosphorés de synthèse (ou naturels parfois), qui en contiennent beaucoup et qui polluent le sol et les nappes;
- Les effluents et boues d'épuration urbaine et/ou industrielles épandues sur les champs ou en forêt sont des sources parfois importantes de cadmium
- Certains aliments (dont par exemple les champignons, ou les organes tels le foie et les reins en contiennent souvent des taux supérieurs aux normes parce que ces organes ont pour rôle justement de capter et réduire les concentrations de cadmium circulant dans le système. Le blé et certains végétaux (ex. épinards) semblent pouvoir l'accumuler plus que d'autres. Certains légumes et les céréales peuvent concentrer le cadmium
- Les cendres et résidus d'incinération, après combustion d'objets contenant du cadmium.
- l'air urbaine (niveaux parfois très élevés près des centres de production) [Ghali, 2008].

6.1.3. Toxicité et Persistance :

Le cadmium, provenant de nombreuses applications industrielles est un danger potentiel pour l'homme et l'environnement. Il est connu depuis les années 50. Très toxique sous toutes ses formes (métal, vapeur, sels, composés organiques), le cadmium est l'un des rares éléments n'ayant aucune fonction connue dans le corps humain ou chez l'animal. Il faut éviter son contact avec des aliments. Chez l'Homme, il provoque notamment des problèmes rénaux, des atteintes pulmonaires et l'augmentation de la tension [Ghali, 2008].

Le Cadmium s'accumule dans les organes tout au long de la vie. Pour l'homme adulte elle peut atteindre 30 à 40 milligrammes, voire plus chez ceux qui y ont été exposés durant leur vie car l'élimination naturelle (urine, excrément, et moindrement règles, éjaculation, perte de phanères (ongles, cheveux) ne compense généralement pas les apports. Il s'accumule provisoirement dans le foie avant de s'accumuler dans les reins où au delà de 200 mg par kg chez l'adulte, il provoque des lésions irréversibles. L'exposition professionnelle au cadmium peut être considérée comme responsable d'une augmentation significative du cancer du poumon. Le CIRC (Centre de Recherche International sur le Cancer) a déterminé qu'il y a suffisamment de preuve chez l'homme quant à la cancérogénicité du cadmium et de ses composés. Il s'avère également que le cadmium a la capacité de modifier le matériel génétique, en particulier les chromosomes. D'après le directeur du centre de recherche de la fondation "vive la santé" le cadmium serait un des facteurs de stérilité [Bisson et al, 2011 ; Lauwerys et al, 1974 ; Suwazono et al, 2006].

6.2. Plomb

Le plomb est l'un des métaux les plus anciennement connus et utilisés par l'homme. C'est l'élément lourd le plus commun, on s'en est servi abondamment depuis l'époque des Romains. Par conséquent, il est fort répandu dans tout l'environnement. [Greenwood et al, 1984].

En raison de sa grande diffusion, sa facilité d'extraction, sa grande malléabilité et son bas point de fusion. On le retrouve dans tous les compartiments environnementaux. Et en raison de sa toxicité, les interdictions d'usage du plomb se multiplient dans le monde.
La classification CEE (étiquetage réglementaire des substances et préparations dangereuses) identifie le plomb comme une substance «présentant des dangers d'effet cumulatif et présentant des risques possibles d'altérations de la fertilité». De plus, il est classé «prioritaire actuellement en examen» par la Directive Européenne 2000/60/CE. [Boucheseiche et al, 2002].

6.2.1. Identification et caractérisation :

Le plomb appartient à la famille des cristallogènes, c'est un métal gris bleuâtre malléable dans son état naturel. Il est mou et résistant à la corrosion. Le plomb est utilisé comme agent de traitement de certaines maladies en agriculture.

Tableau.5 : Propriétés physico-chimiques du plomb.

Numéro atomique	82
Masse atomique	207.2 g mol^{-1}
Température de fusion	327°C
Température d'ébullition	1755 °C

6.2.2. Sources et exposition :

Le plomb peut être présent naturellement. Les principales sources d'émission du plomb sont les industries (fonderies de la métallurgie, les câbles, bâtiments..), les incinérations d'ordures, les peintures et surtout le trafic routier. Par ailleurs, la présence de plomb dans l'eau distribuée pour la consommation humaine peut provenir de tuyauteries anciennes contenant du plomb. La source anthropique principale était, jusqu'à ces dernières années, sa présence dans les carburants automobiles.
La pollution par le plomb a plusieurs origines :

- vieilles canalisations (donc eau courante dans ce cas) ;
- anciennes peintures ;
- batteries au plomb ;
- cablages, plombages, munitions ;
- rejet essence ;
- plastiques PVC ;
- stylos ;
- pesticides ;
- encre d'imprimerie ;
- engrais ;
- cosmétiques ;
- colorants de cheveux.

6.2.3. Persistance et toxicité :

Beaucoup d'utilisations historiques du plomb ou de ses composés sont désormais proscrites en raison de la toxicité du plomb pour le système nerveux (saturnisme en particulier).

Un risque existe dès que le plomb ou certains de ses composés peuvent être inhalés (sous forme de vapeur ou de poussière) ou ingérés, et assimilés par l'organisme. L'intoxication par voie cutanée existe mais reste rare. Les voies de transport sont l'eau, l'air et les aliments.
Les personnes les plus touchées sont les enfants et les femmes enceintes. Il n'existe pas vraiment de seuil de tolérance au plomb pour cette catégorie de personnes. En effet les enfants possèdent un système nerveux en plein développement et une absorption digestive 3 fois plus élevée que celle des adultes ce qui les rend beaucoup plus sensibles vis-à-vis de l'exposition au plomb. L'intoxication chez les enfants se fait sans symptômes, c'est lors de leur développement (durant la scolarisation) que des effets comme l'anémie, des troubles du comportement, des problèmes de rein, des pertes auditives,… se feront ressentir.
Le plomb peut être absorbé par l'organisme par inhalation, ingestion, contact cutané (principalement lors d'une exposition professionnelle) ou par transmission à travers le placenta [Angell et lavery, 1982].

6.3. Mercure

Connu depuis l'Antiquité, les alchimistes puis le corps médical du XVIe au XIXe siècles le désignaient par le nom « vif-argent » et le représentaient grâce au symbole de la planète Mercure, d'où son nom actuel. Son symbole Hg provient du latin, lui-même emprunté au grec, hydrargyrum qui signifie « argent liquide ». Il est utilisé dans le passé pour produire de nombreux remèdes simples ou composés. C'est une substance classée dangereuse prioritaire par la Directive Européenne 2000/60/CE. De plus, la classification CEE (étiquetage réglementaire des substances et préparations dangereuses) identifie le mercure comme «très toxique pour les organismes aquatiques, et pouvant entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique» [Boucheseiche, 2002].

6.3.1. Identification et caractérisation

C'est un métal de couleur argent brillant dont la particularité est de se présenter sous forme liquide à température ambiante.
On trouve le mercure sous forme naturelle ou oxydée. Le mercure se trouve principalement sous forme naturelle comme sulfure de mercure (HgS). Sous les conditions normales de température et de pression, c'est le seul métal à l'état liquide. Il s'agit du seul métal dont la température d'ébullition est inférieure à 650 °C.
Le mercure existe à divers degrés d'oxydation : 0 (mercure métallique), I (ion mercureux Hg22+, Hg2SO4), II (ion mercurique Hg2+, HgO, HgSO3, HgI+, HgI2, HgI3-, HgI42-). Le mercure métallique n'est pas oxydé à l'air sec. Cependant, en présence d'humidité, le mercure subit une oxydation.

Tableau.6 : Propriétés physico-chimiques du mercure.

Numéro atomique	80
Masse atomique	200.59 g mol^{-1}
Température de fusion	-38.9°C
Température d'ébullition	356.6 °C

6.3.2. Source et exposition

Le mercure (Hg) est un métal que l'on retrouve dans la croûte terrestre. Il est plus fréquent dans les zones volcaniques. Du fait de sa grande volatilité, le mercure peut être largement répandu dans la nature sous forme de traces. Il se concentre souvent sur les particules en suspension dans l'eau ou la matière organique ; on peut le retrouver, de ce fait, dans les sédiments, des rivières. Par contre, la présence de mercure dans les eaux souterraines est essentiellement d'origine anthropique, liée à son utilisation dans l'industrie électrique (piles, tubes fluorescents...), et dans l'industrie chimique du chlore. Sa présence dans le milieu est liée également à la combustion des combustibles fossiles et à l'élimination des déchets contenant du mercure : thermomètres, piles, peintures..., ainsi qu'à sa présence dans les amalgames dentaires.

Dans les sédiments, le mercure est transformé par des bactéries en méthylmercure. C'est sous cette forme, très soluble dans les lipides qu'il s'accumule fortement dans les graisses animales et augmente au fur et à mesure que l'on s'élève dans la pyramide trophique.

85 % de la pollution mercurielle d'eau proviendraient directement des activités humaines. Les sources par ordre décroissant d'importance :

- La combustion du charbon dans les centrales.
- Les activités minières (dont l'extraction du mercure, activité relativement discrète, mais aussi l'extraction et le traitement d'autres minerais contaminés par du mercure).
- Les incinérateurs.
- L'usage d'autres combustibles fossiles que le charbon, pétrole en particulier. Le bois ayant poussé sur des sols contaminés ou dans une atmosphère contaminée peut en contenir des taux excessifs, libérés lors de la combustion ou de sa transformation
- Certains processus industriels notamment liés à l'industrie du chlore et de la soude caustique.
- Le recyclage des thermomètres, des voitures, des lampes au mercure etc. qui sont plutôt source de pollutions locales, mais parfois très graves.
- Séquelles industrielles et séquelles de guerre.

6.3.3. Persistance et toxicité

Il suffit de très peu de mercure pour polluer de vastes étendues d'eau (et les poissons à des niveaux dangereux pour la consommation humaine).

Le mercure est toxique et éco-toxique sous toutes ses formes organiques et pour tous ses états chimiques. Son utilisation est souvent réglementée, voire interdite.

La toxicité du mercure dépend notamment de son degré d'oxydation.

- Au degré 0, il est toxique sous forme de vapeur.
- Les ions de mercure II sont bien plus toxiques que les ions de mercure I.

L'effet de la toxicité du Hg chez l'homme se dévoilant sous sa forme vapeur commence par la voie respiratoire, ensuite il se solubilise dans le plasma, le sang et l'hémoglobine. Quand il atteint la circulation sanguine, il attaque les reins, le cerveau et le système nerveux. Le risque chez les femmes enceintes est aussi présent : cette toxine se déplace facilement au travers du placenta pour causer des risques au niveau du fœtus. Même après la naissance les risques sont réels puisque le lait maternel est contaminé.

L'activité bactérienne en milieu aquatique convertit une partie du mercure dissous, essentiellement en monométhylmercure $HgCH_3$, sous cette forme, le mercure est très neurotoxique et bioaccumulable, Il se concentre surtout dans la chaîne alimentaire aquatique.

La consommation de certaines espèces de poissons prédateurs (thon, marlin, espadon, requin..) représente une source importante d'exposition et de risque pour l'humain, en particulier pour les enfants et les femmes enceintes.
Le mercure semble toxique pour toutes les espèces vivantes connues, il peut Inhiber la croissance des algues, des bactéries, des champignons , fait élever la mortalité embryo-larvaire (étudiée par exemple chez les amphibiens), il Inhibe la croissance chez la truite arc-en-ciel, avec une mortalité élevée des embryons et des larves avec une diminution du succès de reproduction chez les oiseaux d'eau vivant en milieux pollués par le mercure.

A.Contaminants inorganiques : Eléments traces métalliques

7. Matériel et Méthodes :

7.1. Plan d'échantillonnage

7.1.1. Présentation du milieu d'étude : le littoral marocain

Deux composantes principales constituent le patrimoine côtier, il comporte des richesses naturelles physiques et biologiques, dont certaines sont à conserver d'urgence car irremplaçables, certaines espèces rares, par exemple, d'autres à gérer, dans un but de durabilité, exemple des plages, des coraux, etc. Et il compte des secteurs d'activités humaines et économiques qui recherchent la localisation littorale, comme site préférentiel ou nécessaire : Ports maritimes, Industrie de raffinage et chimie, Centrales thermiques modernes, Pêche maritime, Aquaculture marine, Tourisme balnéaire et ports de plaisance...

Au Maroc, le littoral tend à devenir un espace suroccupé et surutilisé par l'urbanisation, les activités industrielles, portuaires, halieutiques et de loisirs. Souvent excessive, cette occupation aboutit à la dégradation du milieu physique et à hypothéquer toute possibilité de gestion meilleure de l'espace côtier et marin dans l'avenir. Le Maroc possède un vaste territoire maritime, doté d'une grande variété d'écosystèmes et d'espèces végétales et animales, avec une richesse biologique tout à fait remarquable [Matee, 1999, 2005 et 2006], il possède trois façades maritimes : la Méditerranée, le détroit de Gibraltar et l'océan Atlantique. Chacune se caractérise par une morphologie et une dynamique particulières et offre des potentialités d'occupation humaine qui lui sont propres et qui sont définies par la nature géomorphologique [Laouina, 2006 ; El hamzoui, 2011 ; Nakhli et Ghazi, 2008].

- Au Nord : Les côtes méditerranéennes s'étendent sur 512 kilomètres, elles jouaient le rôle d'étapes dans le cadre des échanges Afrique / Méditerranée. La côte méditerranéenne représentait un milieu d'ouverture pour le Maroc et a connu le développement de sites importants, notamment les villes de Nador et de Tanger,
- A l'Ouest : la façade maritime atlantique représente 2934 kilomètres. Il concentre les principales agglomérations et la majorité des activités : textile, chimie, industrie mécanique et électrique. 77 % des unités sont concentrées sur la côte atlantique, notamment dans les grandes villes entre l'axe de Safi-Kénitra.

Le littoral marocain représente un environnement fragile en équilibre instable. La faune du littoral est très diversifiée et abrite plusieurs espèces. Ce dernier se trouve gravement menacé à l'échelle mondiale [Laouina, 2006].

7.1.2. Mise en place d'une campagne de surveillance et points des prélèvements

La présence des métaux lourds a été évaluée dans le biota (poissons, céphalopodes et crustacés). Dans le cadre d'une mission de surveillance des produits de pêche, un suivi sur les polluants chimiques a été réalisé au niveau des côtes marocaines. Cette évaluation a été menée sur les côtes méditerranéennes, de Tanger à Nador. Et des côtes atlantiques de Tanger à Dakhla.

Fréquence d'échantillon : A chaque mission de prélèvement, six prélèvements de produits sont effectués au niveau de chaque halle. Chaque prélèvement est constitué d'espèces variées, réalisé au hasard, de sorte à refléter un prélèvement global. La prise d'échantillons

est effectuée à intervalles variables répartis sur l'année. Dans le même site d'étude, les échantillons sont prélèvés trimestriellement au cours d'une même année. Chaque prélèvement est placé dans un conditionnement individuel, accompagné d'une fiche d'identification assurant ainsi sa traçabilité.

Critères de choix : La liste de substance à rechercher est conçue en tenant compte :

- de la réglementation nationale : pour les substances à utilisation interdite ou nocive en élevage et les substances qui ont des délais d'attentes importantes.
- De la réglementation internationale : d'autres aspects réglementaires internationaux (Européen en particulier) ont été pris en considération afin de satisfaire aux exigences de nos principaux partenaires commerciaux.

Conditionnement et envoi des prélèvements au laboratoire : Les prélèvements destinés à la détermination de la teneur en métaux lourds doivent être conditionnés dans des sacs en plastique. Ils doivent être congelés le plus rapidement possible après leur réalisation. Les prélèvements doivent être transmis en même temps au laboratoire correspondant pour préparation des échantillons et analyse ultérieure.

- Chaque prélèvement doit être placé dans un conditionnement individuel garantissant son intégrité et porter un code d'identification assurant ainsi sa traçabilité. Il doit également être accompagné d'une fiche de prélèvement.
- Le laboratoire de destination est chargé dans un premier temps de préparer les échantillons (homogénéisation et constitution des échantillons à analyser) et de les transmettre aux laboratoires correspondants si les analyses ne seront pas effectuées dans le même laboratoire.

Préparation des échantillons (Homogénéisation et constitution des échantillons à analyser) : les matrices utilisées par les laboratoires pour la recherche de ces contaminants seront constituées de la chair ou de la partie comestible des espèces concernées, à savoir :

- Pour les poissons: filet ou morceau de chair de poisson éviscéré ;
- Pour les crustacés: dans tous les cas, la chair brune de crabe est exclue ainsi que la tête des crustacés. Ainsi, la partie à analyser sera constituée de la chair blanche du corps, de la queue et des pinces.
- Pour les céphalopodes: la matrice correspondra à la chair de céphalopodes éviscérés.

Site d'échantillonnage : Les prélèvements des produits de la pêche dans le cadre de cette enquête sont effectués au niveau des halles aux poissons des ports de pêche suivants :

- Littoral méditerranéen ; Nador, Al Hoceima, Tétouan et Tanger.
- Littoral atlantique Nord ; Larache, Mehdia, Casablanca, Safi, Essaouira et Agadir.
- Littoral atlantique Sud ; Tan Tan, Laayoune et Dakhla.

Le tableau fournit les coordonnées des sites. La figure.5 présente Leur localisation et leur distribution le long des côtes marocaines.

Tableau.7 : Coordonnées des sites étudiés.

Station	Localisation	Coordonnées GPS
Nador	Méditerranée	35°16°N-256'W
Hoceima	Méditerranée	35° 40°N-3°55' 40 ''W
Tétouan	Méditerranée	35° 41'1''N-5°18'5'' W
Tanger	Detroit de Gibraltar	35°47' 14'N-5°47'34''W
Larache	Atlantique Nord	35°11'N-6°10'W
Kénitra	Atlantique Nord	34° 16'04 ''N-6°39'46W
Casablanca	Atlantique Nord	33° 36'N-7°37'W
Safi	Atlantique Central	32° 19N-9°15'W
Essaouira	Atlantique Central	31°30'N-9°47'W
Agadir	Atlantique Central	30°25'21"N- 9°38'0"W
Tantan	Atlantique Sud	28°30' N -11°21'W
Laayoun	Atlantique Sud	27° 09' N-13° 12' W
Dakhla	Atlantique Sud	23° 42' N-15° 55'W

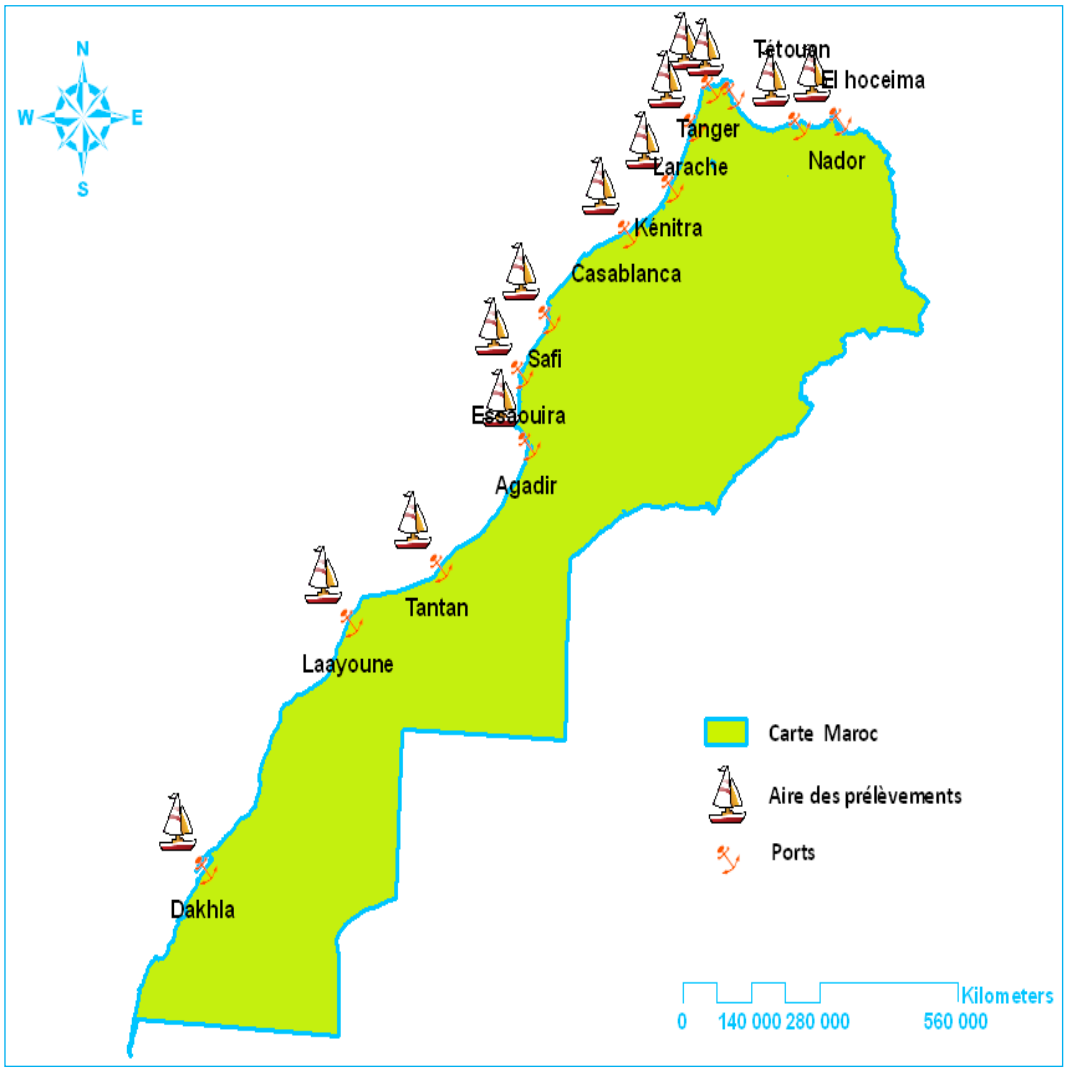


Figure.5 : Carte géographique du Maroc et localisation des sites étudiés.

Taille d'échantillon de céphalopodes

Tableau.8 : Prélèvements et fréquence d'espèces de céphalopodes sur les différents sites d'étude

Espèce prélevée	Na	El	Té	Tg	La	Ké	Ca	Sa	Es	Ag	Da	La	Ta	Fréquence (%) par produit
Calamar (*Loligo forbesi*)	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	150
Poulpe (*Octopus vulgaris*)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	300
Passamar (*Illex coindetti*)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	50
Seiche (*Sepia officinalis*)	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	200

Taille d'échantillon de crustacés :

Tableau.9 : Prélèvements et fréquence d'espèces de crustacés sur les différents sites d'étude

Espèce prélevée	Na	El	Té	Tg	La	Ké	Ca	Sa	Es	Ag	Da	La	Ta	Fréquence (%) par produit
Araigne de mer (*Maja Squinado*)	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	100
Cigale (*Scyllarides latus*)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	80
Crevette (*Parapenaeus longirostris*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	260
Crabe (*Cancer pagurus*)	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	160
Pouce pieds (*Mitella pollicipes*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	20

Taille d'échantillon de poisson

Tableau.10 : Prélèvements et fréquence d'espèces de poisson sur les différents sites d'étude.

Espèce prélevée	Na	El	Té	Tg	La	Ké	Ca	Sa	Es	Ag	Da	La	Ta	Fréquence (%) par produit
Anchois (*Engraulis encrasicolus*)	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	19
Abadéche (*Plectorhynchus mediterraneus*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3
Bar (*Dicentrarchus labrax*)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	27
Bogue (*Boops boops*)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	30
Bonite (*Sarda sarda*)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	11
Breka (*Dentex gibbosus*)	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	16
Capelan (*Trispterus minutus capelanus*)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	30
Céteau (*Dicologoglossa cunetea*)	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	30
Chevrette (*Umbrina canariensis*)	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	22
Chinchard (*Trachurus picturatus*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	35
Courbine (*Argyrosomus regius*)	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	14
Congre (*Congre congre*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3
Coq rouge (*Cephalopholis taeniops*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3
Dente (*Dentex polysteganus*)	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	22
Espadon (*Makaira nigricans*)	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	16
Grondin (*Aspitrigla cuculus*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	32
Lotte (*Lophius budegassa*)	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	14
Loup (*Dicentrarchus punctatus*)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	8
Langouste (*Palinurus elephas*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	5
Maquerau (*Scomber Scombrus*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	32
Merlan (*Merluccius Merluccius*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	35
Mirou (*Epinephelus marginatus*)	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	8
Mostela(*Phycis blennoides*)	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	11
Pageot (*Pagellus erythrinus*)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	32
Ombrine (*Umbrina cirrosa*)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	5
Palomine (*Trachinotus ovatus*)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	5
Raie (*Raja leucoraja*)	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	16

Rascasse (*Scorpaena porcus*)	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	22
Requin (*Carcharhinus altimus*)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	11
Rouget (*Mullus barbatus*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	32
Sabre (*Aphanopus carbo*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	32
Sar (*Diplodus vulgaris*)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	30
Sardine (*Sardina pilchardus*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	35
Sole (*Solea senegalensis*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	32
Tacaud (*Trisoprerus luscus*)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	32
Vive (*Trachinus draco*)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32
Trigla (*Trigla lyra*)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3

Tableau.11 : Richesse en produits de pêche collectés lors de cette campane de surveillance

	Na	El	Té	Tg	La	Ké	Ca	Sa	Es	Ag	Da	La	Ta
Richesse en poisson	18	17	21	18	26	18	26	26	21	19	22	22	22
Nombre d'échantillon collecté	40	43	43	41	63	60	48	53	36	40	38	36	34
Richesse en crustacés	2	2	1	2	1	2	3	2	3	3	4	3	3
Nombre d'échantillon collecté	4	5	5	5	5	6	9	3	6	8	9	6	6
Richesse en céphalopode	3	1	2	1	3	2	2	2	4	2	2	1	3
Nombre d'échantillon collecté	4	1	5	2	4	3	3	4	5	5	8	4	4

7.1.3. Mise en place d'une campagne de mesure chez les bivalves

Cette campagne complète notre mission de surveillance, elle comporte l'analyse des mêmes substances chimiques classées dangereuses pour la vie marine et la santé humaine, chez la moule en particulier l'espèce *Mytilus galloprovincialis* considérées comme sources et cibles de plusieurs polluants.

Les sites de récolte

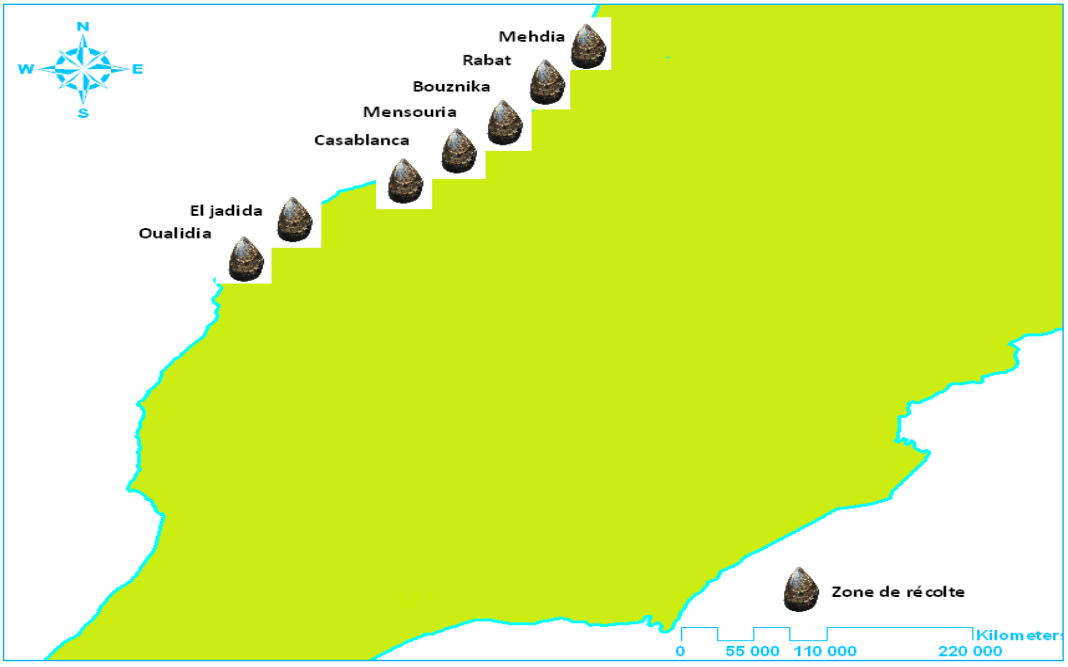


Figure.6 : Localisation des sites de récolte des bivalves.

Taille d'échantillon de bivalves (*Mytilus galloprovincialis*)

Il n'existe pas d'accord international sur la taille des échantillons pour les différentes espèces de mollusques. Il peut y avoir une grande différence de toxicité entre les différents individus de l'échantillon de mollusques. Le nombre de mollusques prélevés pour un échantillon devrait être suffisant pour tenir compte de cette grande différence.

Pour cette raison, le facteur prépondérant pour la taille de l'échantillon devrait être le nombre de mollusques qu'il comprend et non la masse de chair de mollusque. Par ailleurs, la taille de l'échantillon doit être suffisante pour permettre d'effectuer l'essai ou les essais pour lequel/lesquels l'échantillon a été prélevé, et les mollusques prélevés devraient être de la taille de ceux qui sont commercialisés. [Codex alimentarius, 2009].

Fréquence d'échantillons : Les prélèvements sont récoltés à marée basse au niveau des côtes rocheuses des zones suivantes: Mehdia, Rabat, Bouznika, Mensouria, Casablanca, El jadida et Oualidia. Chaque prélèvement est constitué de 20 échantillons pour chaque site, considérés représentatifs pour évaluer les concentrations des HAP chez les moules. Les campagnes de récolte ont été réalisées saisonnièrement pendant une année, de Mai 2009 à Mai 2010.

7.2. Traitement statistique

L'ensemble des données a été rassemblé en fonction des matrices étudiées dans des fichiers Excel, puis traité avec le logiciel *SPSS Statistics 17.0.*

7.2.1. Analyse de variance (ANOVA)

Le but de l'analyse de la variance est de tester la présence de différences significatives ou non entre des moyennes. Cette analyse est appliquée afin d'estimer la contribution de chaque facteur à la variance de la variable dépendante.

7.2.2. Analyse des composantes principales (ACP)

Le but de cette analyse est de résumer la structure de données décrites par les variables quantitatives, tout en obtenant des facteurs corrélés ou non corrélés entre eux. Elle recherche un nombre limité de « variables » fictives appelées « composantes principales », non corrélées entre elles pour résumer le mieux possible l'information contenu dans les tableaux des données brutes. Aussi, d'effectuer une classification automatique en ne tenant compte que de l'information essentielle, c'est-à-dire en ne conservant que les premiers facteurs.

7.2.3. Classification ascendante hiérarchique (CAH)

Cette méthode conduit à la construction d'un arbre de classification (ou dendrogramme). Son but est de former une partition avec un nombre de classes arbitraire, pour obtenir des classes les plus homogènes possibles. Elle permet de Faire un bilan des ressemblances entre individus et des liaisons entre variables. Au départ, il y a autant de groupes que d'individus : n ; puis on agglomère les 2 plus proches en un seul, et on recommence jusqu'à n'avoir plus qu'un seul groupe très grand.

8. Dosage des Métaux lourds

8.1. Principe

Cette partie a pour objet de décrire la méthode de dosage des métaux lourds dans les produits de la pêche par spectrophotométrie d'absorption atomique. Le principe de la méthode consiste d'abord en une minéralisation à l'acide de l'échantillon puis un dosage par spectrophotométrie d'absorption atomique [Auger, 1998 ; Cossa et Bourget, 1980 ; AOAC, 1980 ; Boumehres, 2010 ; Bouabdli et al, 2005, Ghanjaoui, 2009].

8.2. Procédures de prétraitement d'échantillons

La plupart des méthodes d'analyse des éléments traces sont destinées à analyser des solutions homogènes où les analytes qui sont libres ou presque libres de la matrice organique. Par conséquent, l'étape de prétraitement des échantillons avant leur introduction dans ces appareils est une étape importante, surtout dans le cas des échantillons solides dont l'objectif est d'extraire les analytes de la matrice de départ. Le problème majeur de la sélection d'une procédure de prétraitements est lié aux pertes d'échantillon par volatilisation.
Les méthodes les plus utilisées dans le prétraitement des échantillons solides sont : la calcination à haute température et la digestion humide assistée par micro-ondes. Plusieurs groupes de recherche ont utilisé la digestion humide assistée par micro-ondes pour la détermination de nombreux éléments-traces par SAA [Ghangaoui, 2009].

8.3. Digestion assistée par micro-ondes

Il existe deux systèmes de four à microondes : les systèmes ouverts et les systèmes fermés. Les systèmes fermés fonctionnent sous pression et permettant une régulation de température (Fig.7).
La digestion assistée par micro-ondes présente plusieurs avantages par rapport à la digestion humide traditionnelle en utilisant des systèmes de chauffage par convection en termes de recouvrement, de précision, de temps et de perte de certains éléments par volatilité. Il réduit la possibilité de contamination et la consommation de réactifs. Aujourd'hui, la digestion assistée par micro-ondes est la méthode la plus répondue dans le traitement des échantillons. Ce four à micro onde a la capacité d'atteindre une température de 300°C et d'effectuer une pression de 80bars (Fig.8).

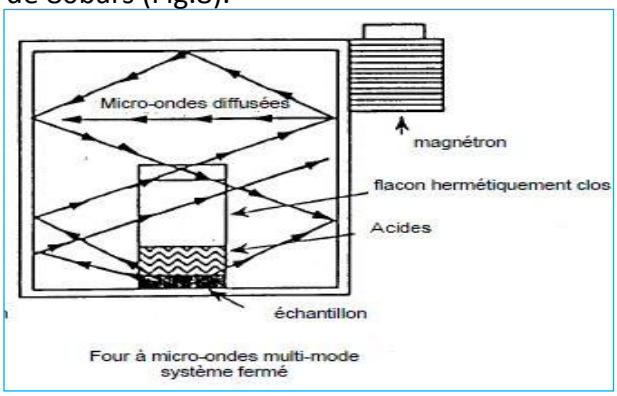


Figure.7 : Système de digestion assistée par micro-ondes en système fermé.

Figure.8 : Microonde de digestion, Ethos Plus.

8.4. Décontamination du matériel

Le matériel utilisé est nettoyé séparément avant usage de la manière suivante :

- séjour d'une nuit (12h) dans un détergent spécial (Micro 90) à 20% ou équivalent ;
- rinçage à l'eau de robinet et l'eau distillée ;
- séjour de 24 h dans l'acide nitrique 10 % ;
- rinçage à l'eau bi distillée ou eau milli-Q ;
- séchage du matériel.

9. Analyse du Plomb et cadmium

9.1. Réactifs

- Acide nitrique HNO_3 concentré à 65% et 5% pour analyse de traces de métaux lourds.
- Eau oxygénée H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) pour analyse de traces de métaux lourds ;
- Ammonium dihydrogène phosphate à 2.5 % ;
- Eau bi distillée ou eau milli-Q ;
- Solution standard certifiée de Plomb d'une concentration de 1000 mg/Kg ;
- Solution standard certifiée de Cadmium, d'une concentration de 1000mg/Kg ;
- Matériel de référence certifié ERM – CE278.

9.2. Appareillage et instruments :

- Spectrophotomètre d'absorption atomique VARIAN de type SpectAA 200 équipé d'un four graphite et d'un passeur d'échantillons pour l'analyse du plomb et du cadmium ;
- Four à microonde ETHOS PLUS pour la minéralisation des échantillons ;
- Système de production d'eau Ultrapure, ADRONA CRYSTAL, résistivité 18.2 MOhm*cm, conductibilité 0,055 µS/cm ;
- fioles en plastique de 50 ml, pipettes et béchers ;
- Réacteurs de minéralisation (bombes en Téflon PTFA) ;
- Tubes en polypropylène (PP) de 50 ml à bouchon à vis incolore ou fioles en plastique de 50 ml ;
- Homogénéisateur IKA JANKE et KUNKLE model T 25 ;
- Bain marie ;
- Balance.

9.3. Prélèvement et préparation des échantillons

Selon la directive CE 22 [2001], et le règlement (CE) 333 [2007], le prélèvement doit être effectué par une personne mandatée à cet effet, prenant en compte les risques de toute altération pouvant modifier la teneur en contaminants ou affecter les analyses ou les échantillons.
Dans les bombes de minéralisation, on pèse précisément environ 0.5g ± 0.001 de chair de poisson, préalablement broyés et homogénéisés par un Moulinex (poids frais). On y ajoute 5 ml d'HNO3 concentré et 2ml d'eau oxygéné dans le but de détruire toute matière organique. Pour vérifier qu'il n'y a pas eu de contamination, inclure dans chaque série d'analyses un essai à blanc : essai réalisé en l'absence de matrice (chair de poisson) avec les mêmes quantités de réactifs et soumis à la minéralisation en même temps que les échantillons.

9.4. Minéralisation :

-

Les échantillons et le blanc sont ensuite mis dans le four à micro ondes 25 min suivant le programme de minéralisation donné par le constructeur (voir tableau ci-dessous). Après refroidissement on les transvase dans des fioles en plastique et on complète à 50 ml avec de l'eau ultra pure (ou milli-Q).

Tableau.12 : Performances du four à micro ondes.

Etapes	Puissance (Wat)	Temps (min)	Température (°C)
1	950	10	120
2	950	5	140
3	950	10	150

9.5. Calibration : Préparation des solutions standards

Plomb:
Le standard utilisé pour l'étalonnage est une solution commercialisée d'une concentration de 1000 ppm (mg/L) certifiée. Cette solution mère est diluée de façon à obtenir une solution de 100 ppb (µg/l) et ensuite de 12 ppb.

Tableau.13 : Gamme étalon du plomb en ppb.

Élément analysé	Étalon 1	Étalon 2	Étalon3	Étalon 4
Pb	2	4	6	12

Cadmium :

Le standard utilisé pour l'étalonnage est aussi une solution de 1000 ppm certifiée, elle est diluée à 100 ppb et ensuite à 6 ppb.

Tableau.14 : Gamme étalon du cadmium en ppb.

Élément analysé	Étalon 1	Étalon 2	Étalon 3	Étalon 4
Cd	2	3	4	6

La solution finale est versée dans les godets du SAA et servira à tracer la courbe d'étalonnage après dilutions nécessaires. Ces dilutions sont faites automatiquement par l'appareil afin de fixer le domaine de validation.

Modificateur de matrice: La solution utilisée comme modificateur de la matrice pour Cd et Pb est fonction de l'appareillage utilisé. C'est une solution d'ammonium dihydrogeno phosphate à 2.5 % ou une solution préparée par 1.01g d'NH4OH, 0.88g de H3PO4, 0.087g de Mg (NO3)2,6H2O et compléter à 50 ml avec de l'eau milli-Q (ou bi distillée). Son rôle est de stabiliser l'atome lors de l'atomisation.

9.5. Dosage du plomb et du cadmium par SAA-FG:

Une fois le matériel préparé, les échantillons et le blanc minéralisés sont mis dans des godets puis placés au niveau du passeur d'échantillons du spectromètre. La solution standard, le blanc (eau bi distillée) et le modificateur sont versés dans des godets appropriés du SAA.
Après avoir tracé la courbe d'étalonnage, les concentrations des métaux lourds dans les échantillons sont données par le spectromètre par comparaison à la gamme étalon. Les dosages du plomb et du cadmium sont effectués par SAA équipé d'un four graphite type et d'un passeur d'échantillons en utilisant des tubes pyrolytiques.

Figure.9 : Spectrometre d'absorption atomique à four à graphite.

Calcul des concentrations : Une fois les résultats affichés, les teneurs en cations métalliques dans les tissus des organismes sont déterminés selon l'équation suivante :

$$\text{C en ppm (mg/kg)} = \frac{(Cs - Cb) * V_f * F_d * 10^{-3}}{p}$$

Tel que :

C : concentration finale ;
Cs : concentration de l'élément dans la solution ;
Cb : concentration de l'élément dans le blanc ;
F_d : facteur de dilution ;
V_f : volume final de d'échantillon (50 ml) ;
P : Prise d'essai en g (poids frais) de l'échantillon.

L'équation peut s'écrire aussi sous la forme (si le Fd = 1) :

$$\text{C en ppm (mg/kg)} = \frac{(Cs - Cb)}{10}$$

Car : $(V_f * F_d * 10^{-3})/P = 1/10$
Tel que : $V_f = 50ml$, $P = 0,5g$, $F_d = 1$

9.6. Validation de la méthode

Selon la Décision [2002/657/CE] et recommandations ISO 17025 [2005], la validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies.
Le laboratoire doit valider les méthodes afin de confirmer qu'elles sont aptes à l'emploi prévu. Lorsque le recours à des méthodes qui ne sont pas normalisées est nécessaire, ces méthodes doivent faire l'objet d'un accord préalable.

9.6.1. Assurance qualité : paramètres de validation

Selon la NF V03-110, plusieurs sont les principaux éléments de la validation d'une méthode d'analyse. Dans ce travail, on se contente de citer les trois éléments suivants:

- L'étude de la fonction d'étalonnage;
- L'exactitude ;
- La limite de détection.

➲ **Étude de la fonction d'étalonnage :**

La fonction d'étalonnage est considérée acceptable dans le domaine étudié si les biais relatifs mesurés sont inferieur à l'EMA fixé par le laboratoire.
D'après l'étude de la relation entre les absorbances (cadmium, plomb) et les concentrations en plomb ou en cadmium, et l'établissement de la gamme de validation, on a obtenu une courbe linéaire exprimée par l'équation suivante pour une plage de concentration de 0 à 12 ppm pour le plomb et de 0 à 6 ppm pour le cadmium : Y = A+B * Concentration

Avec un bon coefficient de corrélation (R) montrant qu'on suit toujours les exigences de la limite de linéarité. Tenant compte de tous les facteurs limitant la méthode, nous travaillons avec un bon niveau de précision et fiabilité.

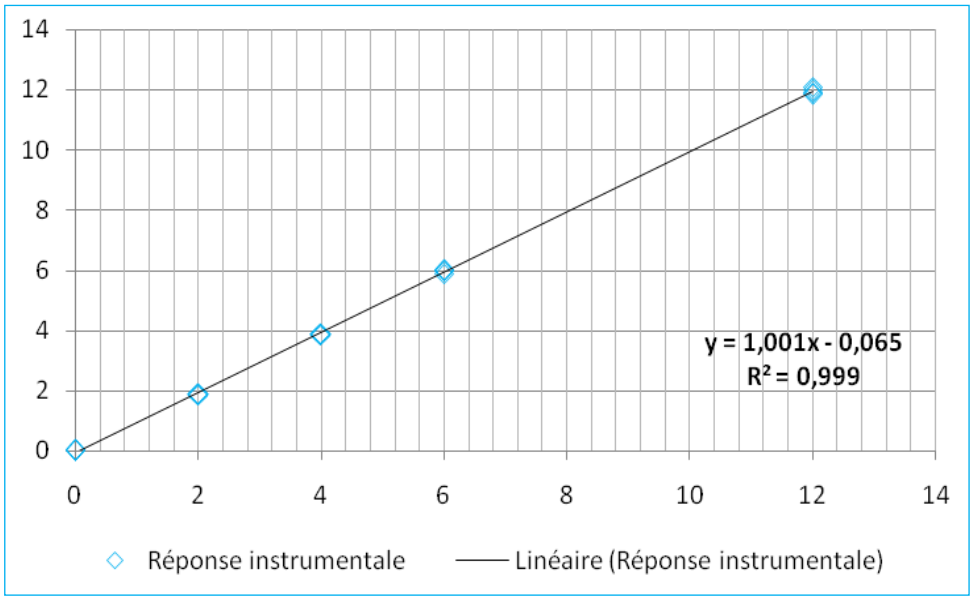


Figure.10 : Courbe d'etalonnage du Plomb
(Valeurs des X : concentrations théoriques ; Y : Concentrations mesurées)

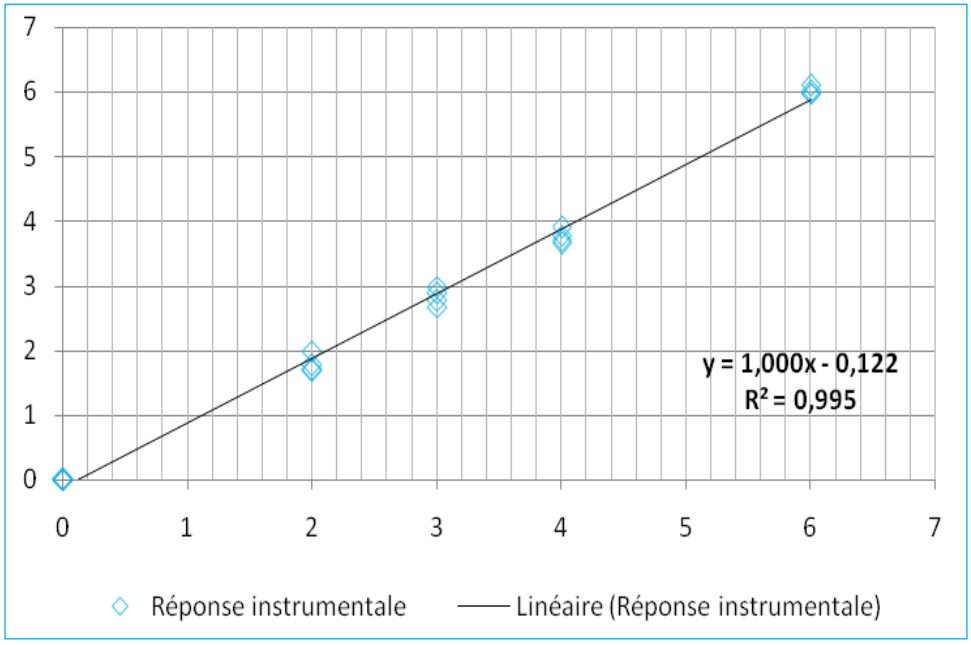


Figure.11 : Courbe d'etalonnage du Cadmium
(Valeurs des X : concentrations théoriques ; Y : Concentrations mesurées)

➲ **Exactitude (ou justesse) :**

L'exactitude permet de fournir une indication sur les erreurs systématiques ; elle consiste à vérifier si la valeur moyenne expérimentale du matériel de référence mesurée par le spectromètre est en accord avec sa valeur théorique suggérée.
L'étude de l'exactitude nécessite une préparation en solution du matériel de référence certifié. Le mode opératoire est identique à celui de la préparation de l'échantillon, on pèse 0,5g du matériel de référence certifié (MRC) contenant des concentrations connues en plomb et en cadmium puis on lui rajoute 5ml d'acide nitrique et 2ml d'eau oxygéné et on le met au four à micro ondes pour la minéralisation.

Cas du cadmium :

Tableau.15 : Concentrations du matériel de référence certifié

Valeur théorique suggérée du MRC	0.348 ± 0.007
Moyenne des valeurs mesurées	0.361 ± 0,009

Erreur relative = $[(V_0 - V_S)/V_s] * 100$
= [(0,361 – 0,348)/0,348] * 100
= 3,735
Justesse = 100 – Erreur relative
= 100 – 3,735
Justesse = 96(%)

Pour plomb

Tableau.16: Concentrations du matériel de référence certifié

Valeur théorique suggérée du MRC	2.00 ± 0.04
Moyenne des valeurs mesurées	1.96 ± 0.07

Erreur relative = $[(V_0 - V_S)/V_s] * 100$
= [(1,96 – 2,00)/2,00] * 100
= -2
Justesse = 100 – Erreur relative
= 100 – (– 2)
Justesse = 102(%)

Sur ce matériel de référence, l'exactitude est vérifié avec un pourcentage de 96% (pour cd) et de 102 (pour pb), ce qui correspond a une étroitesse entre la valeur observée et suggérée.

- **Les limites de détection**

La limite de détection : c'est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Elle est calculée à partir de dix mesures du blanc. et exprimée en µg/g.

$$LD = 3 * S_{blanc}$$

Où S blanc est l'écart-type sur les 10 mesures de blancs.

Tableau.17 : limite de détection du plomb et cadmium.

Eléments	Plomb	Cadmium
Limite de détection	0,037	0,033

10. Analyse de Mercure

10.1. Réactifs

Les mêmes réactifs utilisés pour les analyses de plomb et cadmium ;

- Chlorures stanneux (Chlorure d'Etain).

10.2. Appareils

Les mêmes appareils utilisés ;

- Spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme VARIAN Spectra A240 équipé d'un générateur d'hydrure.

10.3. Prélèvement et préparation des échantillons : voir 9.3 (p 34) (mêmes étapes).

10.4. Minéralisation : voir 9.4 (p 34) (même procédure).

10.5. Dosage du mercure par SAA-GH:

Dans les bombes de minéralisation, on pèse précisément environ 0.5g ± 0.001 de chair de poisson, préalablement broyés et homogénéisés par un Moulinex (poids frais). On y ajoute 5 ml d'HNO3 concentré et 2ml d'eau oxygéné dans le but de détruire toute matière organique [Sanjuan et Cossa, 1993].

Le dosage du mercure par SAA à générateur d'hydrures est réalisé par une solution réductrice de chlorure stanneux à 25% dans 20% d'acide chlorhydrique. (Formule donnée par le constructeur de l'appareil). L'ajout de la solution réductrice est fait automatiquement par le générateur d'hydrures.

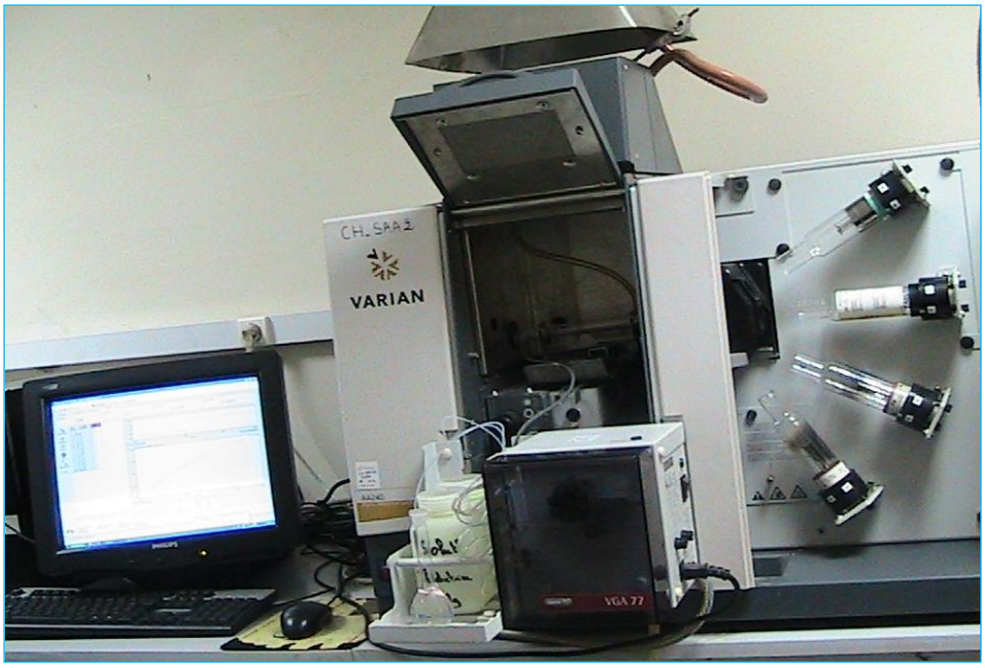


Figure.12: Spectrometre d'absorption atomique à générateur d'hydrure.

Calcul des concentrations : voir 9.5 (p 36) (même formule).

10.6. Calibration Préparation des solutions standards :

Le standard utilisé pour l'étalonnage est une solution commercialisée d'une concentration de 1000 ppm (mg/L) certifiée. Cette solution mère est diluée de façon à obtenir une solution de 10 ppb (µg/l).

Tableau.18 : Gamme étalon du mercure en ppb.

Élément analysé	Étalon 1	Étalon 2	Étalon3	Étalon4
Hg	1	2,5	5	10

- **Fonction d'étalonnage**

La gamme de calibration réalisée à partir d'un mélange d'échantillons blancs et différents niveaux de concentration.

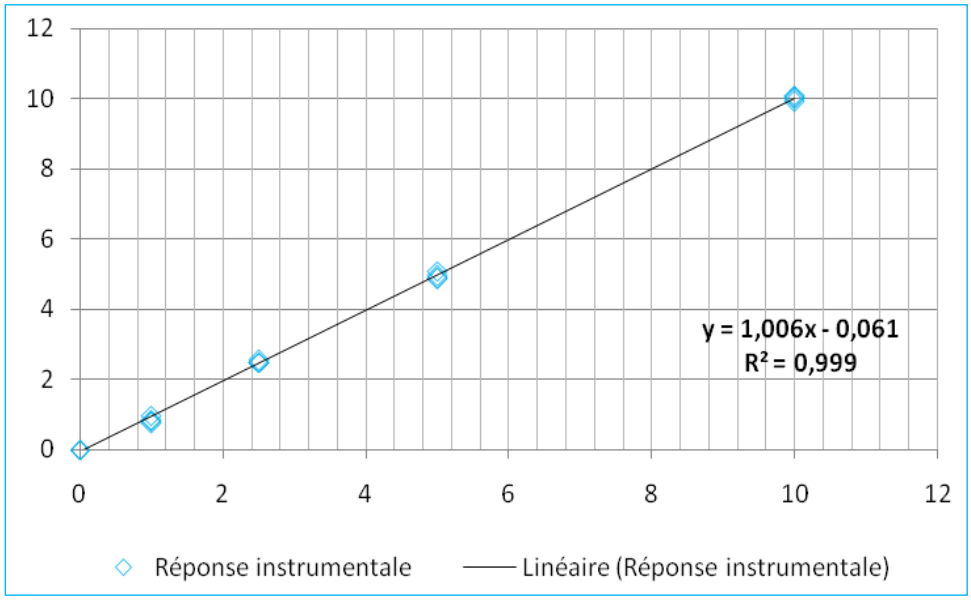


Figure.13 : Courbe d'etalonnage du mercure
(Valeurs des X : concentrations théoriques ; Y : Concentrations mesurées)

Le calcul du coefficient R^2 de la droite de régression (intensité relative à la concentration), montre une réponse proportionnelle des concentrations pour ce domaine de 0 à 10 ppm.

- **Exactitude (ou justesse) :**

Dans la zone quantifiable de la méthode, on applique 10 fois le procédé expérimental (n=10 répliqua) sur un échantillon dont la valeur suggérée est fournie par un organisme reconnu (matériel de référence).

Tableau.19 : Concentrations du matériel de référence certifié

Valeur théorique suggérée du MRC	0,196±0,009
Moyenne des valeurs mesurées	0,183±0.008

Erreur relative = $[(V_0 - V_s)/V_s] * 100$
= [(0,183 – 0,196)/0,196] * 100
= -6,63

Justesse = 100 – Erreur relative
= 100 – (– 6,63)
Justesse = 107(%)

- **La limite de détection :** même formule utilisée.

Tableau.20 : limite de détection du mercure en mg/l

élément	Mercure
Limite de détection	0,038

11.

Etude de la qualité des produits de la pêche par l'évaluation de la Contamination métallique (Cd, Pb et Hg) le long du littoral Marocain.

Baghdadi Mazini D[1]., Rachidi A[2]., Barrijal S[1]., Maatouk M[3], Noël L[4].

[1]Equipe Valorisation des Microorganismes, Génomique, Bioinformatique (EVMGB)-FST-Tanger.
[2] Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches (LRAR)-ONSSA-Casablanca.
[3]Laboratoire Environnement, Océanologie et Risques Naturels (LEORNA)-FST-Tanger.
[4] ANSES Maisons-Alfort Laboratoire de la sécurité alimentaire, Unité des contaminants Inorganiques et minéraux dans l'environnement, France

RÉSUMÉ :

Conscient du problème de la pollution marine, les pouvoirs publics marocains et la communauté scientifique nationale s'intéressent de plus en plus aux études environnementales, en vue d'évaluer les risques et de protéger notre écosystème côtier. Ainsi, plusieurs travaux se sont penchés sur l'étude du degré de contamination des côtes marocaines par les principaux éléments toxiques.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence la variation des teneurs de trois métaux lourds plomb, cadmium et mercure, reconnus très toxiques pour l'homme et pour lesquels il existe également un seuil réglementaire. La dispersion de ces éléments est étudiée à partir des teneurs mesurées dans les produits de pêche débarqués au niveau de 13 ports principaux du littoral Marocain. Les teneurs sont dans l'ensemble faibles pour les trois métaux étudiés, et dépassent rarement les limites normatives exigées dans la chair du poisson. Les résultats obtenus montrent aussi que les teneurs en Hg et Pb, sont du même ordre de grandeur (0,137 ± 0,126 mg/kg et 0,140 ± 0,118 mg/kg), tandis que ceux du Cd sont moins élevés au niveau de toutes les espèces étudiées (0,026 ± 0,022 mg/kg).

Mots-clés : Littoral marin, pollution chimique, produits de pêche, métaux lourds, réglementation.

INTRODUCTION :

Le milieu marin côtier présente une certaine spécificité par rapport aux autres milieux : il est à la fois le milieu récepteur ultime des pollutions terrestres (la zone la plus riche biologiquement), et le milieu où se développent de nombreuses activités (pêche et cultures marines, saliculture, tourisme, etc.). Ce milieu est par conséquent vulnérable à une multitude de substances exogène [Mahyaoui et al, 1989 ; Boumehres, 2010].
Au Maroc, comme partout dans le monde, la densité de populations humaines ne cesse d'augmenter sur la frange littorale, ce qui mène à une accélération continue et rapide de l'utilisation de l'espace littoral et un accroissement des pressions sur les écosystèmes marins et les espèces qu'il renferme. Aujourd'hui, la biodiversité marine est fragilisée par divers types de polluants [El Morhit, 2009 ; Marchand, 2008 ; Banaoui et al, 2004 ; Moukrim et al, 2000].
Les produits chimiques sont parmi les polluants participants à l'érosion de la biodiversité marine, La flore et la faune aquatique peuvent dans ce cas s'appauvrir de façon considérable, non seulement quantitativement mais aussi qualitativement [El Morhit, 2009 ; Ramade, 1993]. Ces produits ont des répercussions à tous les niveaux trophiques, depuis les producteurs primaires jusqu'aux consommateurs supérieurs et, par conséquent, affecte le fonctionnement de tout l'écosystème.
Les métaux lourds sont des contaminants communs aux écosystèmes aquatiques, ils sont considérés dangereux à la vie aquatique en raison de leur persistance, leur toxicité élevée, leur tendance a se bio accumuler, et leurs diverses sources anthropiques [Gary et al, 1987, Miramand et al, 1998]. Ces éléments caractérisés par une demi-vie biologique très longue [Boumehres, 2010], semblent préoccuper la majorité des enquêtes (18%). Ils font l'objet de nombreuses études pour comprendre leur dynamique et leur toxicité et sont situés en tête des risques secondaires les plus préoccupants pour la santé et pour le consommateur [Boumehres, 2010].
Le suivi des concentrations totales des traces métalliques dans le milieu ne renseigne pas directement sur les concentrations biodisponibles dans les écosystèmes, et à la compréhension des processus de contamination. C'est dans cette optique que Goldberg [1978] a proposé de suivre, à l'échelle internationale, les concentrations des contaminants dans les organismes vivants pour surveiller les milieux. C'est le principe des « bio indicateurs quantitatifs » basé sur le fait que les organismes marins concentrent les contaminants [Garrigues et al, 2002]. Ces éléments peuvent incorporer toutes les composantes marines telles que les sédiments, les eaux, les matières en suspension etc.… [Neincheski et baumgarten, 2000].
De nombreuses études ont été menées sur la détermination des niveaux métalliques chez les moules et les poissons comestibles comme indicateurs de la qualité des eaux et des écosystèmes aquatiques [El Morhit, 2009 ; Banaoui et al, 2004 ; Cheggour et al, 2000 ; Chafik et al, 2001 ; Mhamada et al, 2011 ; Kaimoussi, 1996]. Ces travaux ont montré que les connaissances acquises sur le Maroc sont fragmentaires d'où la nécessité d'étudier de manière régulière, précise et plus concrète la présence des métaux lourds dans les divers compartiments du milieu aquatique. Dans cette étude, le choix s'est porté sur les produits de pêche comme matrice biologique, pour déterminer leurs variations le long du milieu côtier marocain. Aussi, pour voir leur impact sur la santé humaine surtout que les produits de pêche constituent un aliment à forte consommation. Les résultats des analyses

biochimiques ont révélé des teneurs métalliques considérables ce qui rend important le suivi de ces métaux dans tous les compartiments du milieu marin [Cheggour et al, 2000].
Cette étude présente une évaluation spatio-temporelle de la contamination chimique des produits de la pêche au Maroc, réalisée en déterminant les teneurs des métaux lourds les plus préoccupants (plomb (Pb), cadmium (Cd) et mercure (Hg)) dans différentes espèces marines entre 2006 et 2009.

MATERIEL ET METHODES

Sites d'étude

Les 13 sites sélectionnés ont été répartis sur la côte méditerranéenne et atlantique afin de couvrir l'ensemble du littoral marocain (Méditerranée, Atlantique nord, Atlantique centre et Atlantique sud). Ces sites représentent les principaux ports du royaume et constituent les points de départ pour le marchandage et la distribution des produits de pêche. La position de sites des prélèvements est identifiée sur la Figure.5 (p 25) et le Tableau.7 (p 27).

Echantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés au niveau des halles aux poissons des ports et constituent l'ensemble des espèces marines généralement pêchées au Maroc. Les échantillons ont été prélevés le long du littoral marocain au moyen de chaluts et casier utilisés pour les crabes. Les campagnes de récolte ont été réalisées trimestriellement au hasard pendant quatre ans, d'août 2006 à décembre 2009. Lors de chaque mission de prélèvement, six prélèvements de six espèces différentes et variées ont été prélevées de telle sorte qu'ils reflètent la variation en quantité des éléments métalliques présents, et en qualité des produits consommés. Chaque prélèvement est constitué de 10 échantillons (individu ou parties d'individu) prélevés sur la même espèce, de sorte que cela constitue un prélèvement global d'au moins 1 kilogramme. Les produits en provenance de l'océan atlantique sont les plus nombreux et variées par rapport à ceux collectés dans la mer méditerranée (Tabeaux 8.9.10 et 11). Chaque prélèvement a été placé dans un conditionnement individuel, accompagné d'une fiche d'identification assurant ainsi sa traçabilité.

Appareils et réactifs : voir partie A-9 & 10.

Dosage des métaux lourds

Les dosages ont été réalisés sur les parties comestibles du poisson, en particulier les muscles, vu qu'ils servent d'indicateur biologique circonstanciel en raison de leurs masses par rapport aux autres organes [Phillips, 1995].
Les échantillons sont étêtés, éviscérés et homogénéisés par broyage. Une prise d'essai d'environ 0.5 g est minéralisée par micro-ondes en système fermé après addition de 3 ml de HNO_3 et 2 ml de H_2O_2 [18, 2]. Le minéralisât est ramené à 50 ml, après addition d'eau ultra pure. La détection a été réalisée par spectromètre d'absorption atomique à four à graphite pour le plomb et cadmium, et à générateur d'hydrure pour le mercure.

Assurance qualité

La fonction d'étalonnage de la méthode a été vérifiée selon la norme NF V03-110 [2010] et l'exactitude par la norme ISO 90-210 [2009]. Elle est considérée acceptable dans le domaine étudié car les biais relatifs mesurés sont inferieurs aux écarts maximaux acceptables (EMA), calculé et fixé par le laboratoire. Les courbes d'étalonnages ont montré des coefficients de

détermination de $r^2 > 0.995$ (cinq points) pour tous les éléments. La limite de détection de chaque élément est respectivement de 0.038, 0.037 et 0.033 mg/kg pour Hg, Pb and Cd. Le protocole a été validé sur une matrice de référence ERM-CE278 (mussel tissue), certifiée comme BCR-278R (Tableau.21).

Tableau.21 : Performance du contrôle qualité en utilisant ERM-CE278, certifiée comme BCR-278R.

Elément	Valeur trouvée (Moy±Sd)	Valeur certifiée (Moy±Sd)
Pb	1.96 ± 0.07	2.00 ± 0.04
Cd	0.361 ± 0,009	0.348 ± 0.007
Hg	0.183 ± 0.008	0.196 0.009

Analyse statistique

Le traitement de l'ensemble des données par ACP et ANOVA a été réalisé avec le logiciel *SPSS version 17.0.* Une analyse de variance (ANOVA) été appliquée pour tester l'influence des variables saison et année. Aussi une analyse des composantes principales (ACP) été utilisée pour déterminer la répartition spatiale des contaminants étudiés.

11. Résultat et Discussion :

11.1. Evaluation des teneurs globales en métaux lourds

La figure.14 est une représentation cartographique donnant une idée générale sur la répartition des métaux lourds sur les côtes marocaines. Les résultats obtenus permettent d'identifier les sites en fonction de leurs vulnérabilités pour chaque élément polluant.

Plomb : Les teneurs du plomb les plus élevées sont notées au niveau des stations : (Ca, Na et Tg), avec des valeurs respectives de 0,229 mg/kg, 0,211 mg/kg et 0,141 mg/kg. En effet, les teneurs varient au niveau des 13 stations, entre une valeur minimale de 0,063 mg/kg à la station (Da) à une valeur maximale de 0,229 mg/kg à la station (Ca).

Mercure : L'examen globale des concentrations de cet élément indique que les teneurs détectées au niveau de toutes les stations varient entre : 0,021 mg/kg et 0,243 mg/kg. Les teneurs les plus élevées sont observés au niveau de la côte méditerranéen (Na, Eh, Tg, Té) et l'atlantique centrale (Ca, Sa et Es).

Cadmium : Les teneurs oscillent entre 0,003 et 0,060 mg/kg pendant ces 4 années d'étude (Tableau.22). Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées au niveau de l'atlantique sud (La, Da, Ta).

Tableau.22 : Estimation des concentrations des métaux lourds dans les produits de pêche (mg/kg de P.F).

Métal	[Min - Max]	Moyenne	SD
Plomb	[0,06 - 0,389]	0,140	0,118
Cadmium	[0,003 - 0,060]	0,026	0,022
mercure	[0,02 - 0,410]	0,137	0,126

L'ensemble des analyses effectuées révèle d'une manière générale, la présence d'une contamination sensiblement faible dans tous les produits de pêche prélevés. Les éléments

sont présents à des teneurs non toxiques. Les charges polluantes métalliques d'origines terrestres au Maroc sont encore très faibles, ce qui influence peu sur la zone côtière, comparées aux données rapportées dans d'autres régions en méditerranée (ex. l'Italie) [WHO, 1995]. En effet les pays méditerranéens ont souvent tendance à considérer la mer comme une décharge : pétrole, polluants chimiques, déchets radioactifs, goudrons, etc.. C'est la raison pour laquelle de très nombreux pays méditerranéens participent au PAM (plan d'action méditerranéen).

Afin de définir la corrélation existante entre les trois contaminants étudiés (Pb, Hg et Cd), une analyse multidimensionnelle en composantes principale (ACP) a été réalisée. Les deux premiers axes de l'ACP expliquent une variance totale d'environ 94,1 % (Figure.15). L'axe F1 sépare les stations influencées surtout par le plomb (Pb) et le mercure (Hg) de celles touchées plus par le cadmium (Cd). Ceci montre aussi que les teneurs moyennes de Pb et de Hg sont positivement corrélées ($r^2 = 0,62$; $p < 0,05$; $n = 13$), ces deux contaminants sont négativement corrélés au Cd ($p > 0,05$). Donc la présence de Hg implique la présence de Pb et vice versa. A l'inverse du cadmium dont l'évolution des teneurs est inversement proportionnelle aux teneurs du Hg et Pb. Deux catégories de sites ont été déterminées par l'axe F2, des ports influencées par la présence des métaux lourds et des ports vraisemblablement non dépendantes de ce type de pollution. Aussi il est à noter que certains sites (exemple : Agadir, Dakhla et TanTan et Laayoun) ont une tendance à avoir les mêmes teneurs en contaminants.

Cependant, si les concentrations enregistrées n'incitent pas à des inquiétudes immédiates et ne peuvent être à l'origine de toxicité aiguë, il faut souligner que le risque éco toxicologique réside dans le caractère cumulatif des métaux lourds, qui interviennent dans les phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification [Boumehres, 2010 ; El Morhit, 2009]. Les métaux lourds peuvent ainsi s'accumuler à des faibles doses dans les différents organes et atteindre le seuil toxique en altérant soit les réactions métaboliques chez les individus, soit en entraînant des perturbations démoécologiques au niveau des populations des écosystèmes touchés. Ils peuvent changer complètement la productivité primaire des environnements côtiers [Boumehres, 2010 ; Sunda, 1989 ; Vasquez et al, 1994].

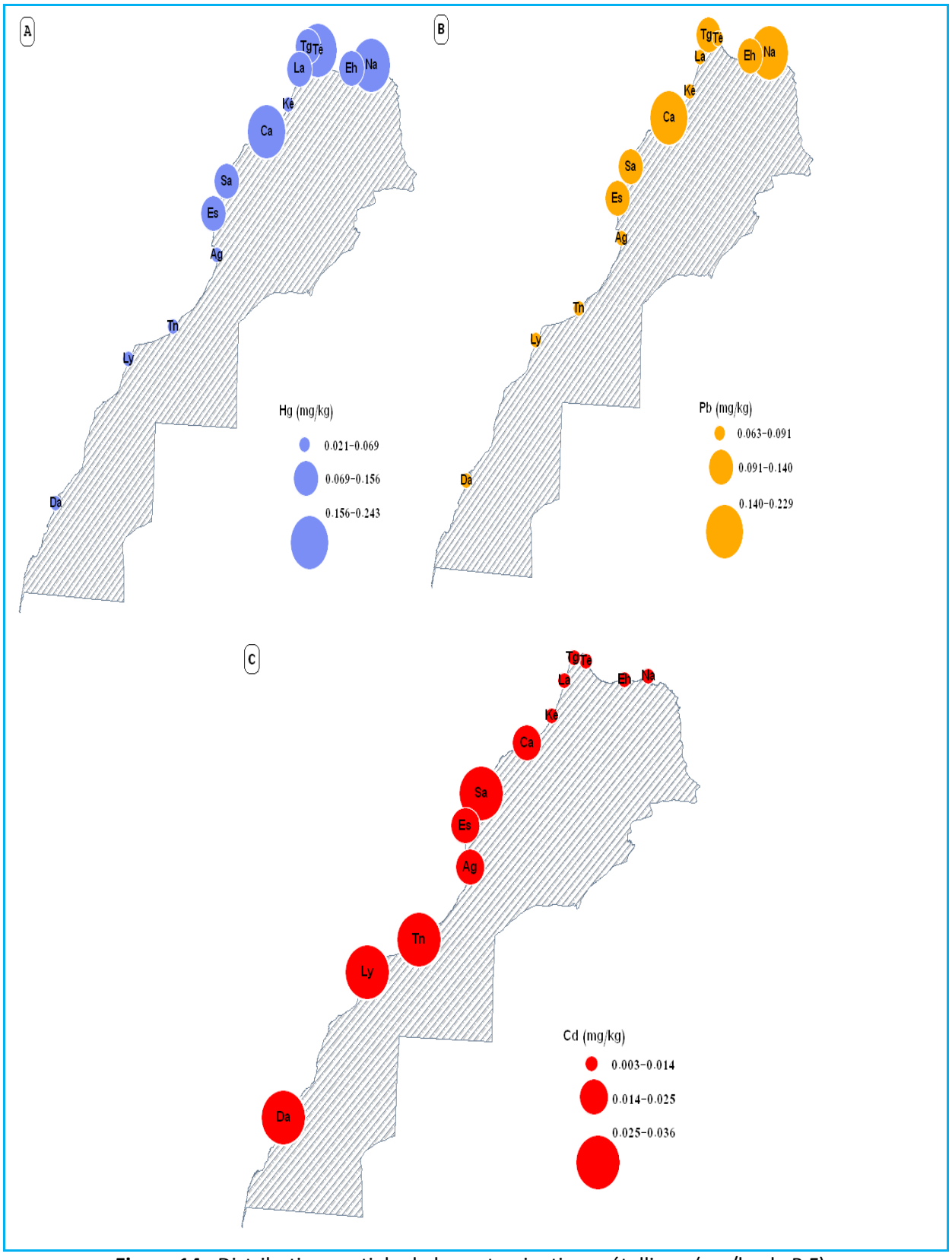


Figure.14 : Distribution spatiale de la contamination métallique (mg/kg de P.F) :
A =cas du Mercure (Hg), B= Plomb (Pb) et C= Cadmium (Cd).

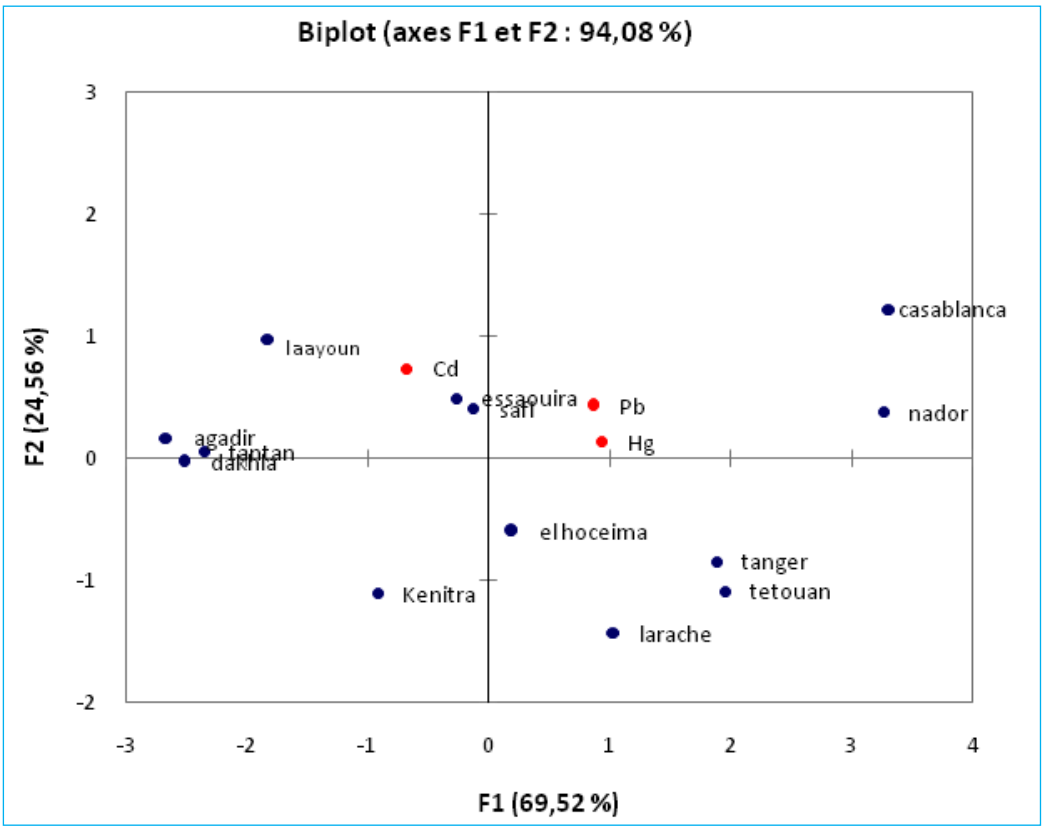


Figure.15 : Plan ½ de l'analyse des composantes principales (ACP) réalisé pour les villes échantillonnées le long du littoral marocain (n=13).

11.2. Variation spatio-temporelle

Les concentrations des métaux dans les organismes aquatiques sont soumises à des variations, car elles reflètent l'effet net de deux processus compétitifs notamment, l'absorption et l'épuration. L'équilibre entre ces deux facteurs dépend des concentrations dans le milieu et les degrés d'importance relatifs des deux processus. Il est aussi affecté par d'autres facteurs [Mance et Worsfold, 1987 ; Ramade, 1978].

11.2.1. Variation spatiale

Les résultats montrent une variation significative dépendante du site du prélèvement (ports) et des deux côtes marocaines (atlantique et méditerranée). Ainsi, comme montré dans la Figure.15, on constate deux principaux types de contamination, une dominée par le couple (Hg - Pb) au niveau des côtes méditerranéennes, atlantique nord et atlantique centre, et une autre contamination connue par des teneurs plus élevées en Cd au niveau des stations situées à l'atlantique sud. En prenant en compte l'espace, on peut dire que ces deux types de pollutions se partagent de façon cohérente le long du littoral marocain.

Rappelons que l'analyse des éléments traces métalliques (ETM) reflète la nature de contaminations des activités humaines [Boumehres, 2010]. Elle permet de distinguer l'origine et la signature des sources pour chaque contaminant [Bouabdli et al, 2005]. Plusieurs études préalables ont montré que l'environnement marin contient des polluants provenant des rejets industriels, agricoles et domestiques [Moustaid et al, 2005 ; Arnac et

Lasssus, 1985]. A noter que les conditions climatiques jouent aussi un rôle important dans les fluctuations constatées dans les milieux étudiés.
Les éléments traces métalliques, sont acheminés dans les écosystèmes par voie atmosphérique et par le biais des cours d'eau et ont diverses origines [Maanan et al, 2004 ; Marchand, 2008 ; Arnac et Lasssus, 1985]: les roches du sol (plomb…), la pollution atmosphérique (plomb, cadmium…), les engrais (cadmium, plomb…), et les boues urbaines (mercure, plomb, cadmium…) [Maanan et al, 2004 ; Glasby et al, 2004]. La présence du Pb et du Cd dans les écosystèmes côtiers témoigne surtout d'une influence anthropique [Sunda, 1989 ; Vasquez et al, 1994 ; Boumehres, 2010].

Les teneurs du Cd sont détectées aux niveaux de toutes les stations, et augmentent surtout en allant vers le sud du Maroc (Ag, La, Tn et Da). Le cadmium est après le mercure le plus toxique des métaux lourds pour les animaux aquatiques [WHO, 1995] et sa présence est expliquée par l'utilisation très fréquente de fertilisation phosphatée, source principale d'apport de cadmium [Boumehres, 2010]. Dans cette étude, l'évolution de la teneur en Cd au sud reflète l'impact des rejets urbains, les activités portuaires et aussi les courants littoraux (upwelling très intense) [Mhamada et al, 2011].
Le plomb, métal toxique a de très nombreuses sources et est généralement présent en faible quantité [Harrison et al, 1981 ; Rooney et al, 1999 ; El Morhit, 2009]. Les teneurs les plus élevées pourraient être attribuées aux rejets des industries chargées en cet élément pouvant être à proximité de ces sites. Le lessivage des stations d'essence et des terres agricoles, le trafic routier, les phénomènes de lixiviation au niveau de la décharge publique, de même les dépôts atmosphériques peuvent contribuer à la charge élevée en plomb.
Les sources du mercure sont à la fois environnementales et anthropogéniques, dues à la combustion de produits fossiles notamment, les rejets industriels et l'incinération des déchets [Leblanc, 2006]. 85 % de la pollution mercurielle d'eau proviendraient directement des activités humaines.
En accord avec certaines études [Maanan et al, 2004], les résultats obtenus font état d'une contamination métallique généralisée le long du littoral marocain. En accord avec d'autres études portant sur la qualité du milieu littoral national montrent que la partie comprise entre Larache et Essaouira connaît toutes les formes de pollution [El Morhit, 2009]. En effet, cette zone concentre plus que la moitié de la population et des activités industrielles (70% des entreprises recensés sont installées dans l'axe Kenitra-Safi) ce qui concorde avec les teneurs moyennes enregistres dans la présente étude. La partie nord du littoral atlantique est affecté par une contamination chimique importante [Cheggour et al, 2000 ; Chafik, et al, 2001 ; Banaoui et al, 2004].

11.2.2. Variation temporelle :

Les concentrations obtenues au niveau des sites d'étude, nous amènent à supposer la présence d'une ou de plusieurs origines de pollution à proximité des stations précitées.

✶ ***Variation annuelle***

Que ce soit pour le plomb, le cadmium ou le mercure, les valeurs moyennes obtenues varient peu pendant les 4 ans de cette étude (Figure.16). En effet, les résultats du test d'ANOVA (Tableau.23), ne révèlent aucune variation annuelle significative ($p > 0,05$). Selon des études précédentes, les résultats lors d'un échantillonnage sont caractéristiques de la

contamination intégrée par l'organisme et ne peuvent pas être extrapolés aisément à des variations annuelles [Garrigues et al, 2002].
L'estimation réelle des effets de ces contaminants sur les écosystèmes touchés est une chose peu aisée. Les résultats de cette étude témoignent plus d'une répartition significative régît dans l'espace que dans le temps.

✶ ***Variation saisonnière***

La variation saisonnière de la concentration des métaux lourds a été étudiée à plusieurs Reprises [Philips, 1976 ; Denton et Burdon-Jones, 1981]. La Figure.17 montre un léger accroissement des teneurs pendant les saisons estivales. Pourtant, Les résultats montrent que les teneurs varient selon les périodes de prélèvement [Mousataid et al, 2005] et semblent dépendre de la saison du prélèvement ($P < 0,05$).
Des études affirment que la variation des teneurs dépend de la saison et montrent que les plus fortes teneurs sont enregistrées au printemps et en automne [Essadaoui et Sif, 2001]. D'autres travaux révèlent une variation importante pendant l'été au niveau des sédiments et pendant l'hiver chez la moule [Tahiri et al, 2005]. Pour les produits de la pêche, la variation est enregistrée au cours des saisons estivales vu que la majorité des unités industrielles ne cessent leurs activités pendant la saison d'été. Conséquemment du faible débit du cours d'eau qui ne semble pas diluer les effluents industriels.
Par contre, La variations des teneurs n'est pas due juste à une modification des rejets comme le laisse penser beaucoup d'études, mais c'est le résultat des changements dans la composition des prélèvements qui peuvent selon les saisons piéger plus ou moins les éléments métalliques du fait des variations des teneurs en matières organiques [Robbe et Marchandis, 1981].

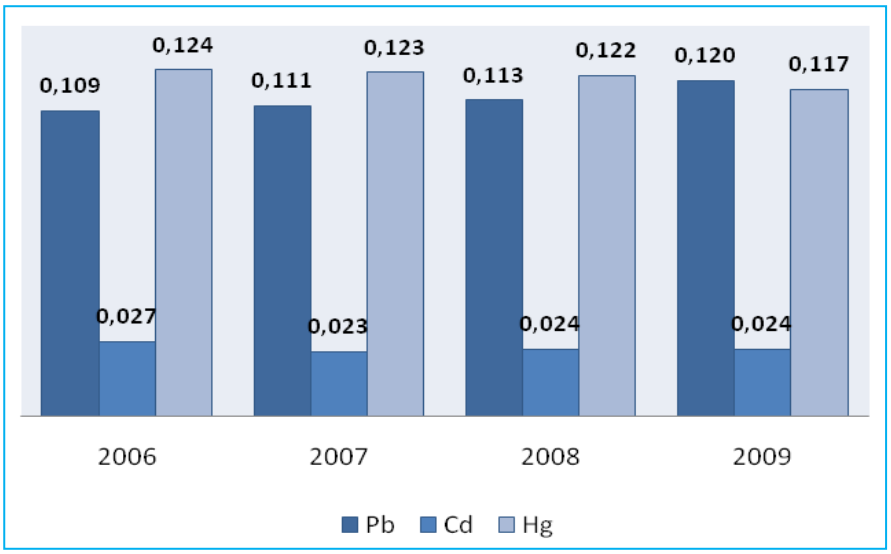


Figure.16 : Variation annuelle des teneurs des métaux lourds (mg/Kg).

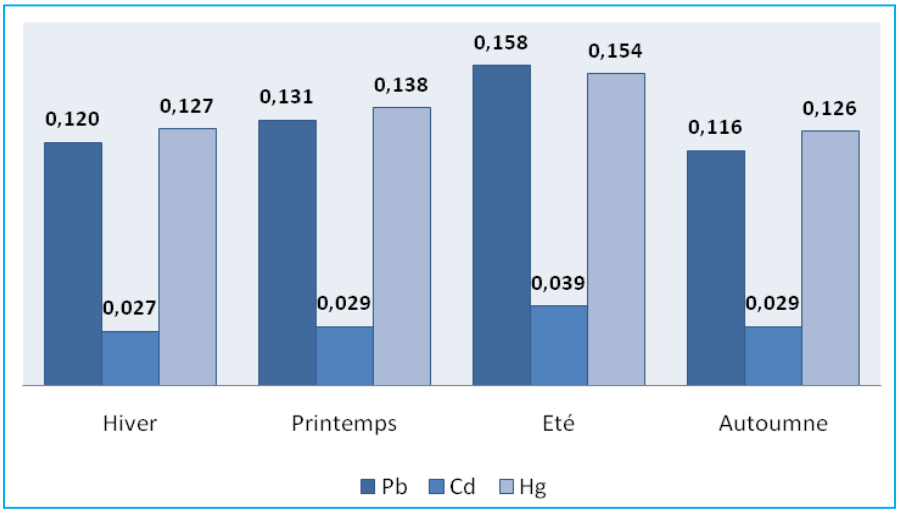


Figure.17 : Variation saisonnière des teneurs des métaux lourds (mg/kg).

Tableau.23 : Résultats de L'ANOVA des ETM étudiés.

Éléments	Saison		Année	
	F	P>F	F	P>F
Pb	4,705	0,003	1,157	0,325
Hg	5,428	0,001	0,893	0,444
Cd	2,726	0,044	0,043	0,988

Les valeurs du test statistiques (F) et celle de la probabilité sont mentionnées [s :(p<0,05) ; ns : (p>0,5)]

11.3. Résultats obtenus et limites réglementaires :

Comme d'autres substances, les métaux lourds sont présents dans notre environnement en quantités plus ou moins importantes [Boumehres, 2010]. Les résultats obtenus au niveau de chaque station sont discutés sur la base des normes relatives aux rejets directs des métaux lourds dans les milieux aquatiques (fruits de mer, chair de poisson, etc.…). Les concentrations maximales requises par la norme précitée sont : 0.3 mg/kg pour le Pb, 0.5 mg/kg pour le Hg et 0.05 mg/kg pour le Cd. Aussi, on se référant aux seuils figurant dans les règlements européens N°629 [2008], N°1881 [2006] et N°221 [2002] fixant les teneurs maximales en contaminants dans les denrées alimentaires. Les valeurs dans les espèces étudiées montrent que les teneurs sont acceptables par rapport aux seuils limites (Figure.18).

Des teneurs maximales obtenues pour le Cd et le Pb au niveau de certaines stations dépassent légèrement les limites normatives pour les produits de la pêche. Elles marquent une rare contamination par ces deux éléments. Quant aux valeurs maximales du mercure sont de l'ordre de 0,41 µg/kg et restent toujours inférieures aux limites seuils. Ce qui démontre l'absence de contamination par le mercure. Cependant, les concentrations moyennes du Pb et Hg et Cd dans la chair du poisson au niveau de toutes les stations se situent en dessous des normes [El Morhit, 2009 ; Arnac et lassus, 1985].

Cette étude indique une biodisponibilité limitée de trois métaux (Cd, Hg et Pb) dans les produits de pêche [El Morhit, 2009], contrairement, à ce qui est le cas pour les sédiments et les moules et les eaux marines, vu leur spéciation et leur forte association à ces compartiments. Les propriétés de bioaccumulation dans la chair de poisson, sont inferieures à celles des moules pour certains métaux [Corvi et al, 2001].

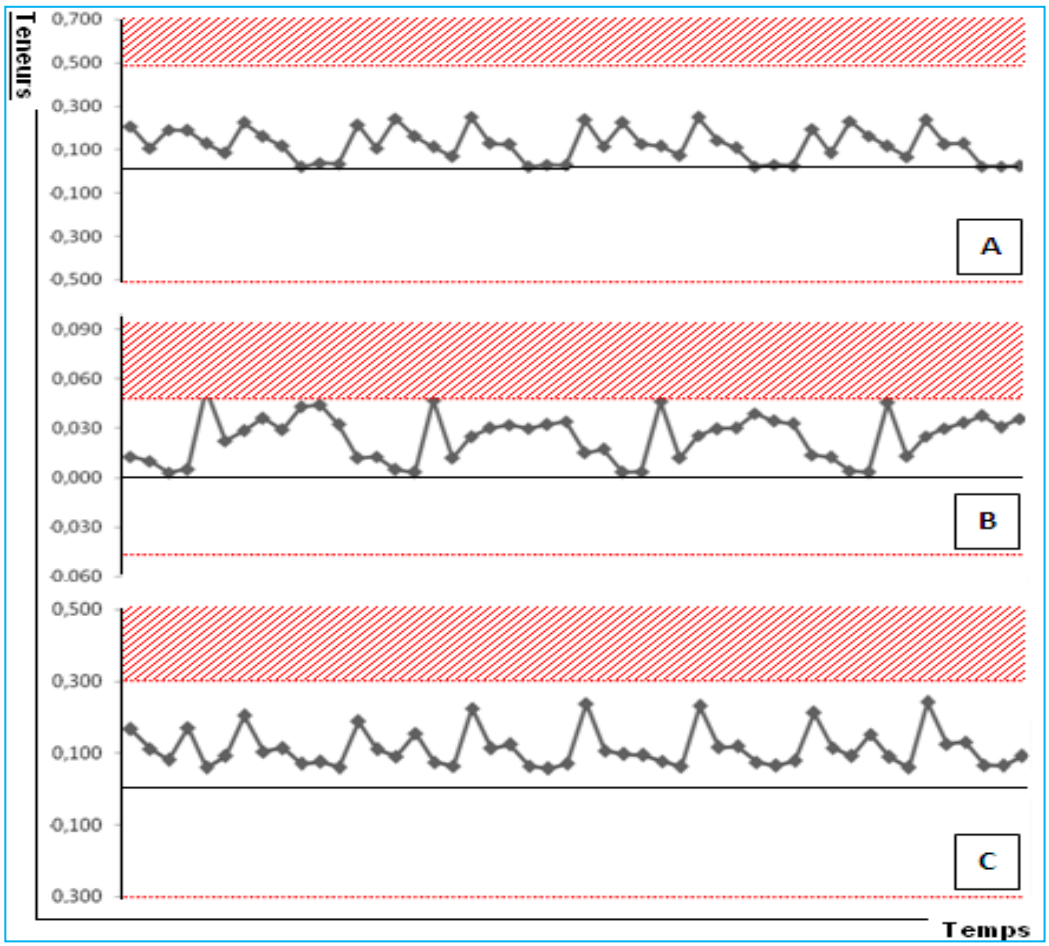


Figure.18 : Limites réglementaires et variation des Métaux lourds en mg/kg de P.F: A =cas du Hg , B= Cd et C= Pb. Les seuils limites sont figurés par une droite horizontale en pointillés rouge. Les valeurs supérieures à ces seuils sont situées dans une zone rouge représentant des valeurs exceptionnellement dangereuse.

CONCLUSION

Les risques de remobilisation, de biodisponibilité et de toxicité de ces traces métalliques sont à craindre, ils constituent des dangers permanents pour toute la chaîne trophique et menacent la santé publique [Boumehres, 2010 ; Arnac et Lassus, 1985 ; Fadil et al, 1997]. Pourtant notre étude ne met pas en évidence des inquiétudes concernant la consommation des produits de la pêche locale. Les intoxications chimiques ont été le plus souvent rattachées aux toxines algales et celles trouvées dans les moules, avec peu d'attention accordée aux métaux lourds dans le poisson.

Au Maroc, des travaux ont été menés sur la détermination des niveaux métalliques chez les moules et les poissons prélevés de la côte atlantique et de la côte méditerranéenne. Ces travaux ont montré que les connaissances acquises sur le Maroc sont fragmentaires d'où la nécessité d'étudier de manière régulière, précise et plus concrète les suivis des métaux lourds dans le milieu aquatique [El Morhit, 2009]. La présente étude vient compléter et apporter des éléments nouveaux aux travaux antérieurs réalisés. Elle illustre la situation de 2006 à 2009, et permet de suivre l'évolution intervenue au niveau du littoral marocain. Par ailleurs, l'autorité compétente (ONSSA) a mis en place un plan de surveillance des résidus chimiques dans les produits de la pêche depuis 2006 pour contrôler la salubrité de ces derniers.

12.

Surveillance chimique du niveau de contamination chez les moules du centre atlantique (Maroc)

Baghdadi Mazini D[1]., Rachidi A[2]., Noël L[3]., Barrijal S[1].

[1]Equipe Valorisation des Microorganismes, Génomique, Bioinformatique (EVMGB)-FST-Tanger.
[2] Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches (LRAR)-ONSSA-Casablanca.
[3] ANSES Maisons-Alfort Laboratoire de la sécurité alimentaire, Unité des contaminants Inorganiques et minéraux dans l'environnement, France.

RÉSUMÉ :

Certains contaminants, comme les polluants inorganiques, tels que les métaux lourds se retrouvent à l'état de traces dans l'environnement, et notamment dans les milieux aquatiques puisque mers et océans sont les réceptacles ultimes de ces composés. Depuis quelques années, des suivis environnementaux se sont avérés nécessaires afin de progresser dans la compréhension des origines et des conséquences de la présence des polluants chimiques dans l'environnement. Les traces métalliques étudiées dans ce travail, sont le plomb, mercure et cadmium, qui font partie de la liste de l'agence américaine de protection de l'environnement. Les teneurs déterminées en métaux lourds sont dosées chez *Mytilus galloprovincialis*, des côtes entre Kenitra et Oualidia.
Les concentrations du cadmium et du mercure varient respectivement de 0,05 à 1,77 mg/kg et de 0,09 à 0,98 mg/kg par rapport au poids frais. La concentration la plus élevée est décelée au niveau d'El jadida pour le cadmium et au niveau de la Mensouria pour le mercure. Quant au plomb, les teneurs sont comprises entre 0,72 et 4,22 mg/kg, les plus élevées des concentrations ont été observées au niveau de Casablanca.
Les concentrations du plomb et cadmium ont été déterminées par absorption atomique à four àgraphite, alors que pour le Mercure, les analyses ont été réalisées par spectrométrie d'absorption atomique à vapeur froide.

Mots-clés : Evaluation, pollution marine, cadmium, plomb, mercure, bivalves, centre Atlantique.

INTRODUCTION :

Les milieux aquatiques sont aujourd'hui le réceptacle d'effluents et de déchets industriels et urbains souvent toxiques pour les organismes vivants [Taleb et Boutiba, 2007 ; Mahyaoui et al. 1989].
Les activités industrielles ont contribués au développement des pays mais elles ont aussi généré plusieurs types de pollutions. Beaucoup d'industries utilisent et rejettent des quantités importantes de produits chimiques, ce qui touche les eaux de surface (océans, rivières, lacs) et les eaux souterraines qui circulent dans le sol. Elle entraîne une dégradation de la qualité de l'eau, ce qui rend son utilisation dangereuse et perturbe beaucoup le milieu aquatique [Ghali, 2008, Taleb et Boutiba, 2007 ; Boutiba et al, 1996 ; Yadav et Trivedi, 2009, Yadav et al, 2012].
Parmi les produits constituants de véritable menace pour l'environnement. On trouve les métaux lourds, connus de fort impact toxicologique. Ils sont présents à de faibles doses dans la nature et dans les organismes vivants [Mahyaoui et al, 1989 ; Attrasi et Saghi., 1992 ; Yadav et al, 2012]. Ces métaux se caractérisent par leur persistance et leur pouvoir d'accumulation dans le milieu naturel, et par conséquent la présence de ces derniers dans l'environnement peut être nuisible à plusieurs variétés d'espèces vivantes [Khansari et al, 2005 ; Merzouki et al, 2009 ; Casas et al, 2007]. Pour cela beaucoup de recherches scientifiques ont été développées pour surveiller et minimiser leurs concentrations [Ghali, 2008, Yadav et al, 2012].
Les métaux lourds tels que le mercure, le cadmium et le plomb peuvent atteindre l'homme par la voie des chaines alimentaires, soit par l'intermédiaire des plantes quand les boues organiques des stations d'épuration riches en métaux lourds sont utilisées comme fertilisants [Kurek et al, 1982], soit par des organismes bio accumulateurs consommés tels que les moules [Mahyaoui et Saghi., 1987]. Dans cette étude, se sont ces trois métaux (cadmium, plomb, et mercure) qui ont été dosés par spectrométrie d'absorption atomique.
Les mollusques bivalves sont actuellement considérés, comme d'excellents indicateurs de pollution. Ils disposent de critères essentiels leur permettant d'être qualifiée d'espèce bio indicatrice [Essedaoui et al, 1998 ; Petrovic et al, 2004 ; Viarengo & Canesi, 1991 ; Regoli & Orlando, 1993 ; Goldberg, 1975 ; Zaldıvar & al, 2011 ; Taleb et Boutiba, 2007 ; RNO,1995]. La moule qui filtre en continu l'eau de mer pour se nourrir et respirer concentre des quantités énormes d'éléments traces si l'eau est polluée, par contre, elle largue ces éléments si elle se trouve dans une eau propre. Cette biologie particulière désigne cet organisme comme un témoin irréfutable de la pollution marine locale au même titre que certains organismes planctoniques marins [Romeo et al, 1987].
Une surveillance des métaux lourds a été mise en place par des organisations internationales, mussel watch [Goldberg, 1986 ; Merzouki et al, 2009 ; Casas et al, 2007]. Aussi, L'étude des perturbations éco-biologiques peut être utilisée avec profit pour caractériser la nature et le degré de l'altération du milieu et des organismes, d'où le concept d'indicateur biologique qui s'impose [Taleb et Boutiba, 2007 ; Essedaoui et al, 1998].
Dans cette optique, notre choix s'est porté sur l'espèce de Moule *Mytilus galloprovincialis* très abondante au niveau des côtes Marocaines. Cette espèce fait l'objet d'une large exploitation commerciale dans la région entre Kenitra et Oualidia.
Le dosage des métaux traces permet d'estimer le degré de contamination de l'environnement. De plus, la contamination de ce mollusque bivalve par les métaux lourds, soulève un problème sanitaire majeur lié directement à sa consommation.

MATERIEL ET METHODES

Sites d'étude

Les échantillons de moules sont aseptiquement prélevés en 7 sites localisés entre Kenitra et Oualidia (Centre Atlantique), région qui constitue une des zones les plus contaminées du littoral Marocain [Azdi et al, 2006]. Le choix des sites de prélèvement des échantillons s'est reposé aussi sur la facilité d'accès et l'abondance de l'espèce dans cette région, afin de

pouvoir disposer d'un nombre suffisant en provenance du même site pendant toute la durée du travail sans risque. La localisation des sites des prélèvements est illustrée sur la Figure.6.

Echantillonnage

Les prélèvements sont récoltés à marée basse au niveau des côtes rocheuses des zones suivantes: Mehdia, Rabat, Bouznika, Mensouria, Casablanca, El jadida et Oualidia (Tableau.24). Chaque prélèvement est constitué de 20 échantillons pour chaque site, considérés représentatifs pour évaluer les concentrations des métaux lourds chez les moules. Les campagnes de récolte ont été réalisées saisonnièrement pendant 12 mois, de Mai 2009 à Mai 2010 de manière à refléter la variation des teneurs chez *Mytilus galloprovincialis.*

Tableau.24 : Coordonnées des stations d'échantillonnage de bivalves

Station du prélèvement	Coordonnées	Description de la station
Mehdia	34°15N 06°41W	Estuaire, Port, exode rurale
Rabat	34°02N 06°05W	Mer, estuaire, métropolisation
Bouznika	33°19N 07°11W	Eaux usées, Plaisance
Mensouria	33°61N 06°55W	Industrie, raffinerie
Casablanca	33°41N 07°25W	Industrie, port, métropolisation
El jadida	33°16N 08°31W	Port, Eaux usées, industrie
Oualidia	32°44N 09°03W	Plaisance, urbanisation

Appareils et réactifs : voir partie A- 9 & 10

.

Dosage des métaux lourds

Dans cette étude, l'analyse des contaminants métalliques Pb, Cd et Hg a été effectuée au laboratoire régional d'analyses et de recherches de Casablanca de l'ONSSA.

Une prise d'essai d'environ 0.5 g est minéralisée par micro-ondes en système fermé après addition de 3 ml de HNO_3 et 2 ml de H_2O_2[Boumehres, 2010 ; Bouabdli et al, 2005, Ghanjaoui, 2009] Le minéralisât est ramené à 50 ml, après addition d'eau ultra pure. La détection a été réalisée par spectromètre d'absorption atomique à four à graphite pour le plomb et cadmium, et à générateur d'hydrure pour le mercure.

Assurance qualité : voir partie A-11 (p 45).

Analyse statistique

Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel *SPSS Statistics 17.0*. Une analyse de variance (ANOVA) a été appliquée pour tester l'influence des saisons. La similitude des concentrations métalliques entre les sites a été étudiée par une classification hiérarchique ascendante (CHA), ce qui détermine la répartition des contaminants et leur corrélation selon les sites du prélèvement. Les concentrations ont été exprimées on milligrammes de l'élément par Kg (mg/Kg) du produit frais.

12. Résultat et Discussion :

L'étude de la pollution chimique par les métaux lourds dans l'environnement marin suscite beaucoup d'intérêt [Mahyaoui et al. 1989]. Selon plusieurs auteurs, les polluants métalliques

sont omniprésents dans les bivalves, avec des concentrations très hétérogènes [Benbrahim et al, 2006].
Durant ces dernières années, l'écosystème côtier de la région centre Atlantique a subi des modifications sous l'effet de plusieurs types de rejets, principalement des rejets industriels. Ces rejets riches en polluants organiques et inorganiques tels que les métaux traces (cadmium, zinc, plomb, mercure…) peuvent être très toxiques vis-à-vis de la faune et de la flore marine.

12.1. Variation temporelle des niveaux de contamination

Les concentrations en métaux lourds relevées chez les moules de l'espèce (*Mytilus galloprovincialis*) sont indiquées dans la Figure.19, Les valeurs enregistrées révèlent les teneurs moyennes calculées en fonction des mois de récolte. Ces résultats montrent une variation temporelle, précisément mensuelle, ce qui est démontré aussi dans d'autres études [Taleb et Boutiba, 2007].
L'accumulation de plomb et de mercure en fonction des périodes de prélèvement montre que les teneurs les plus élevées sont enregistrées pendant les mois de juillet, août et septembre. Ce constat concorde bien avec les études de Kaimoussi et al [2000], Essedaoui et al, [2000] et Orban et al, [2002]. Les concentrations observées sont comprises entre 0,09 et 4,22 mg/kg pour le plomb, entre 0,09 et 0,98 mg/kg pour le mercure.
Pour le cadmium, les concentrations varient de 0,05 à 1,77 mg/kg avec une moyenne de 0,40 mg/kg. En comparant entre les sites, les teneurs sont relativement élevées au niveau de certains sites (ex. S6) surtout pendant les mois de juillet, août et novembre. La variation mensuelle de cette contamination est caractérisée par une augmentation des teneurs de juillet à août (cas de Cd) et/ou de juillet à septembre. Selon la littérature [Moustaid et al, 2005 : Bouthir et al, 2004], cette forme de contamination varient en générale selon les périodes de prélèvement.
Les fluctuations des concentrations métalliques chez les organismes filtreurs et leurs causes ont attiré l'attention d'un grand nombre d'auteurs (Amiard et a1, 1986). La variation saisonnière a été étudiée par plusieurs auteurs, et observée chez diverses espèces de moules, comme : *Mytilus edulis., Myilus galloprovincialis et M. californianus* [Philips, 1976; Amiard et a1,1986], elle est souvent susceptible d'affecter tous les processus physiologiques des bivalves [Essedaoui et Sif, 2001 ; Sif *et al*, 2002]. Les travaux de Bouthir [2004] et de Benbrahim et al [2006] confirment ce type de variation, validée aussi par le test d'ANOVA (Tableau.4, $p < 0,05$) appliqué aux résultats obtenus.
En accord avec cette étude, Uysal [1981] note que la contamination de *M. galloprovincialis* par les différents métaux lourds change en fonction des saisons, l'hiver reste ainsi la saison où les concentrations sont très basses, en raison des forts gradients des courants hivernaux entraînant une meilleure dispersion des éléments polluants, par contre celles les plus élevées sont enregistrées pendant l'été. D'autres travaux révèlent une variation importante pendant l'hiver chez la moule [Tahiri et al, 2005 ; Benbrahim et al, 2006 ; Essedaoui et al, 1998]. Si on considère d'autres données de la littérature, plusieurs auteurs [Amiard et al, 1986 ; Regoli et Orlando, 1993] rapportent que la concentration maximale en métal chez les mollusques sentinelles se fait en hiver et au printemps. Les teneurs en polluants métalliques décelées dans nos échantillons s'expliquent principalement par la charge polluante charriée par les principaux rejets anthropogéniques côtiers. De plus, Le secteur du Centre Atlantique est sous l'effet de plusieurs actions, ce qui entraîne une large

modification des paramètres biotiques et abiotiques et par conséquent une variabilité de la biodiversité marine littorale [Mahyaoui et al, 1989].

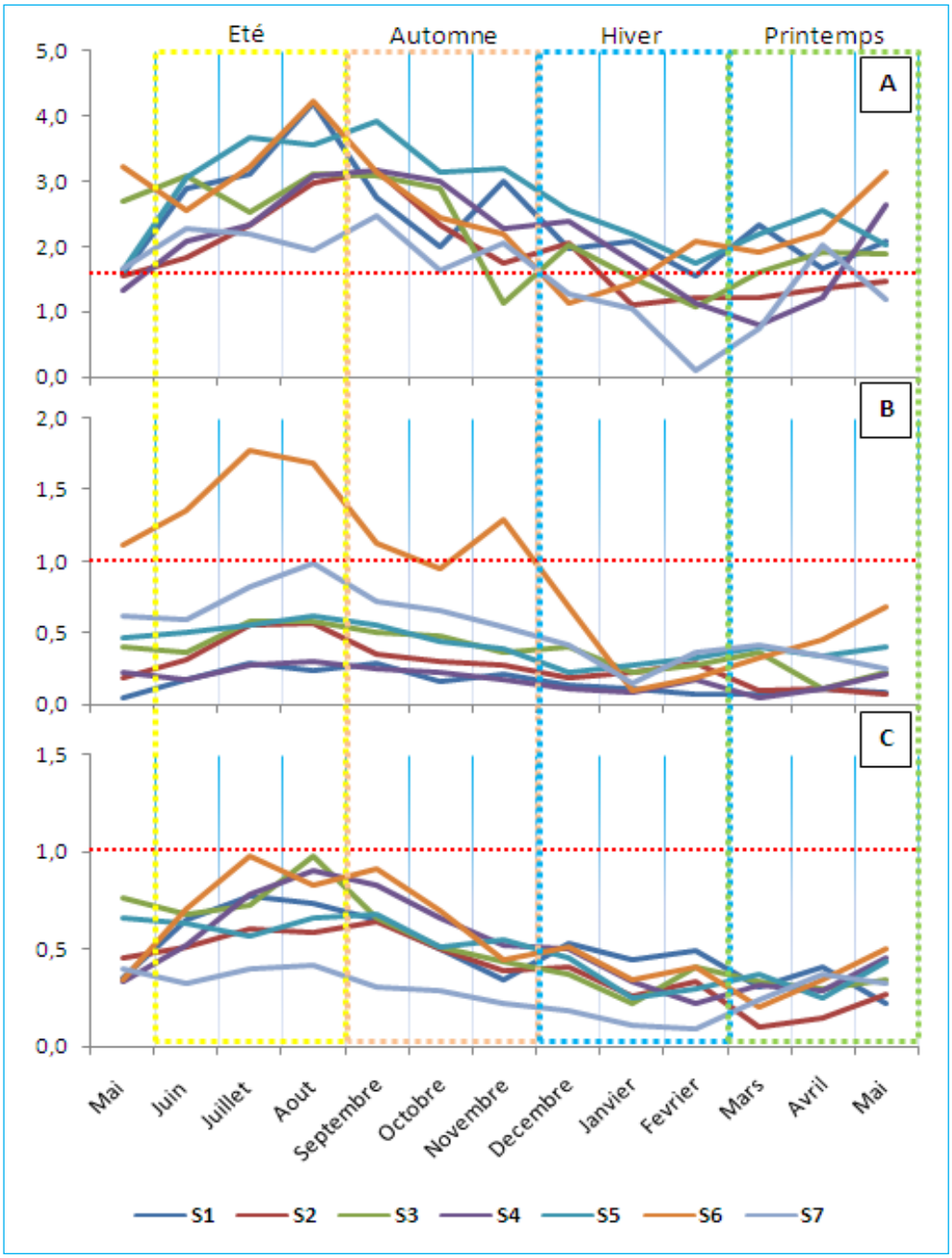


Figure.19 : Variation mensuelle des teneurs moyennes metalliques en mg/kg de poids frais chez les bivalves prelevées au centre atlantique du littoral marocain. A =cas du Plomb (Pb), B= Cadmium (Cd) et C= Mercure (Hg). (S1:Kenitre ; S2:Rabat ; S3:Bouznika ; S4:Mensouria ; S5:Casblanca ; S6:El jadida ; S7:Oualidia).

Phillips [1980] a résumé en trois points les facteurs qui causent les variations saisonnières de l'accumulation des métaux dans les organismes indicateurs : la variation de la décharge de la source de pollution, les changements physiologiques liées au cycle de reproduction et la variation des facteurs du milieu ambiant.

Tableau.25 : Analyse de la variance à un facteur

Élément	Facteur : Saison		
	dl	F	P
Pb	2	8,503	0,022
Cd	1	7,651	0,030
Hg	2	5,026	0,036

Les valeurs du test statistiques (F) et celle de la probabilité sont mentionnées [Significatif :($p<0,05$) ; Non significatif : ($p>0,5$)] ; dl : degré de liberté, F : valeur du test F, P : probabilité.

12.2. Comparaison spatiale de la contamination métallique

Les trois métaux pris en compte dans cette étude, pour ce mollusque bivalve marin, sont classés parmi les éléments les plus toxiques pour la faune et la flore aquatique [Yadav et Trivedi, 2012].

Pour une analyse générale de la répartition spatiale des concentrations des polluants, une classification hiérarchique ascendante (CHA) regroupant les sept sites d'études en fonction des teneurs de contaminants a été réalisée (Figure.20). Ce dendrogramme de répartition permet de regrouper les sites similaires, proches en terme des teneurs et nature de contamination, il laisse apparaitre trois classes ; une première classe = {Rabat, Bouznika et Mehdia} définit par des valeurs semblables en plomb, une deuxième classe = {Mensouria, Casablanca}, caractérisée par des teneurs plus élevées en mercure et une troisième classe = {El jadida, Oualidia}, révélant plus de teneurs en cadmium. Cette dernière classe est soumise directement aux déversements des effluents rejetés en mer par le complexe industriel chimique de Jorf Lasfar, elle est considérée comme la principale source de pollution de cette région [Benbrahim et al, 2006].

Les teneurs les plus importantes de cette contamination métallique ont été enregistrées au niveau soit des sites à proximité du centre industriel (Casablanca, Mohammedia), soit prés de source de contamination minérale (El jadida) [Kaimoussi et al, 2001 ; Cheggour et al, 1999]. La figure.21, montre que le cumul des variations des trois métaux analysés (3 variables) permet de différencier entre les sites étudiés et les classer en trois catégories.

Les valeurs du cadmium, du plomb, et du mercure, déterminées sont répertoriées respectivement dans diverses Localités, les principaux résultats sont donnés dans le tableau 5. Les teneurs les plus élevées en cadmium ont été observées à El jadida, en mercure au niveau du Mensouria et en plomb à Casablanca [Benbrahim et al, 2006].

Les teneurs de ces polluants relevés chez ce Mollusque au niveau de cette frange côtière sont relativement comparables aux études précédentes. Aussi, Mahyaoui [1989] constate que le littoral Atlantique marocain présente des concentrations en métaux comparables à celles de certains sites européens, voire américains. (ex. les côtes françaises méditerranéennes où les teneurs en cadmium enregistrées par le Réseau National d'Observation [RNO, 1995] varient de 0,30 à 2,28 ppm),

La comparaison des résultats obtenus avec d'autres études [Banaoui et al, 2004], montre qu'il y a une diminution ou une stagnation des valeurs pour ce type de contamination (Tableau.26), Ceci semble être dû au choix des sites de prélèvement qui sont loin des points des rejets et d'embouchure d'estuaires ou aux autres facteurs qui peuvent agir sur la bioaccumulation des métaux lourds, tels que l'apport anthropique ou naturel et les paramètres abiotiques,. En générale, La variation des concentrations métalliques semble

dépendre essentiellement de deux facteurs : la saison et le site du prélèvement [Essedaoui et al, 1998].

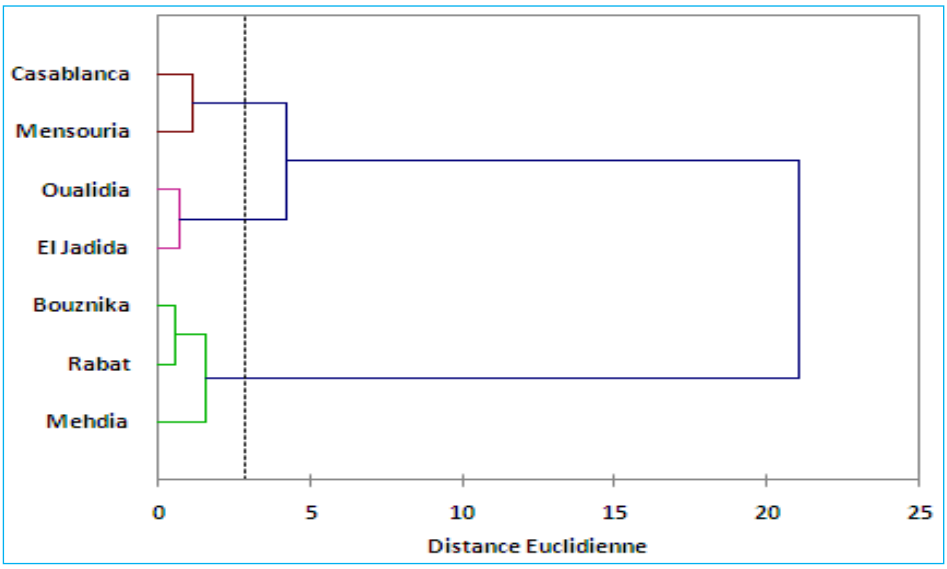


Figure.20 : Classification hiérarchique ascendante de la contamination métallique en fonction des sites.

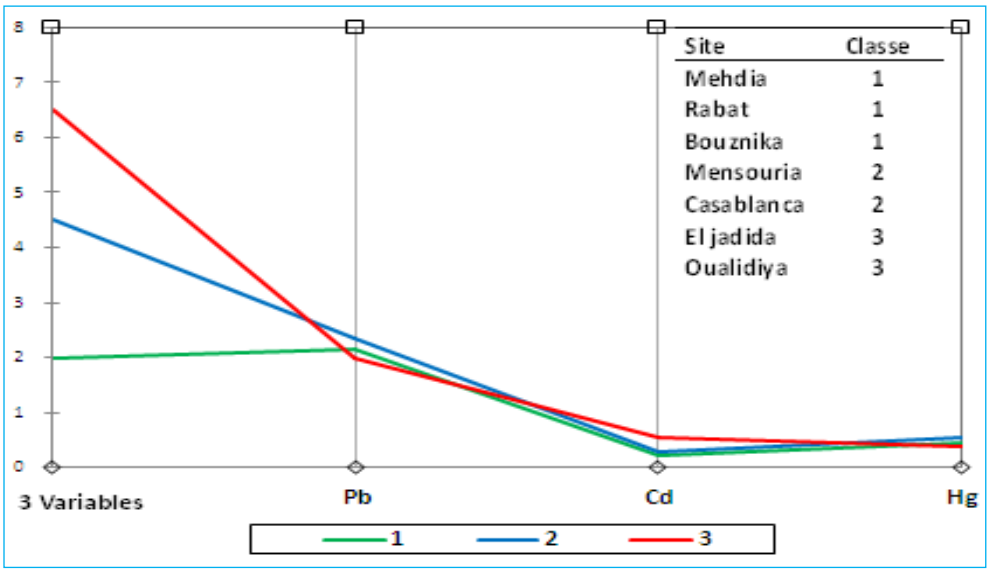


Figure.21 : profil des classes (3 classes), en fonction des variables analysées.

12.3. Consommation de la moule et réglementation

La présence des teneurs élevées en métaux lourds dans un aliment présente un risque énorme pour notre santé [Ghanjaoui, 2009]. La Communauté européenne [CE, 2006, 2008] fixe les concentrations de plomb et de cadmium et de mercure admissibles dans les échantillons de bivalves pour protéger la santé publique (Tableau.27).

Tenant compte de la demande accrue de ce mollusque pendant la saison estivale et se basant sur les concentrations enregistrées, les échantillons analysés sont donc considérés comme contaminés, en comparaison aux doses limites normatives, en particulier pour le plomb. Ceci explique le danger et risque possible sur la santé du consommateur de ce fruit de mer.

Tableau.26 : Comparaison des teneurs entre diverses localités.

Site d'échantillons	Concentration des métaux lourds (mg/kg)(p.f)			Référence
	Cd	Pb	Hg	
Bouadisse plage	0.29	0.90	---	Idardare et al, 2009
Côte de sud Atlantique	0.19	3.6	---	Usero et al, 2005
Mer méditerranéen	0.34	0.90	---	El Sikaily et al, 2005
Atlantique Nord	1.91	3.91	0.29	Besada et al, 2002
Jorf lasfar	29	5	---	Banaoui et al, 2004
El jadida	7.2	9.6	---	Maanen, 2007
El jadida	[11-23]	[0.25-0.75]	---	Moustaid et al, 2005
Oualidia	[80-199]	[0.2-0.5]	---	Moustaid et al, 2005
Bouregreg	0.48	4.08	---	Tahiri et al, 2005
Côte Atlantique	0.93	5.76	---	Echab, 1996
Harhoura	0.32	2.51	0.21	benbrahim et al 2006
Mensouria	0.29	2.35	0.23	benbrahim et al 2006
Ain sbaa	0.30	9.55	0.36	benbrahim et al 2006
Mehdia	0.16	2.32	0.50	présent travail
Rabat	0.20	2.00	0.36	présent travail
Bouznika	0.32	2.16	0.42	présent travail
Mensouria	0.16	1.81	0.58	présent travail
Casablanca	0.40	2.88	0.48	présent travail
El jadida	0.75	2.21	0.54	présent travail
Oualidia	0.35	1.77	0.24	présent travail
Casablanca	[0.34-1.21]	[2.57-11.64]	[0.21-1.53]	Bouthir et al, 2004

Tableau.27 : Les teneurs moyennes et les limites normatives selon la réglementation(CE) N°629/2008 et (CE) N° 1881/2006.

	Pb	**Cd**	**Hg**
Moyenne	2,16	0,33	0,44
[Min-Max]	[0.72-4.22]	[0.05-1.77]	[0.09-0.98]
Seuil limite	1.5	1	1

L'évaluation des contaminants ne diminue en rien le risque potentiel encouru par l'homme à moyen et long termes si des contrôles fiables de la salubrité des produits de la mer ne sont pas exigés avant et pendant leur commercialisation.

En fonction des concentrations métalliques analysées, et par comparaison avec les résultats des études précédentes [Mahayaoui et al, 1989], la hiérarchie entre les trois métaux étudiés dans ces bivalves est la suivante: Pb>>Cd>Hg. Les concentrations en plomb enregistrées au niveau de la moule demeurent alarmantes pour la santé humaine. Pourtant, Les fruits de mer accumulent surtout le cadmium et dans une moindre mesure le plomb, mais peu le

mercure. Les capacités à concentrer les métaux lourds varient selon les espèces et les métaux (ex. la moule concentre deux fois plus de plomb que l'huître, l'huître concentre quatre fois plus de cadmium que la moule).

CONCLUSION :

La pollution marine avec toutes ses formes constitue une menace de dépeuplement de l'écosystème marin. Il devient urgent d'envisager une prise en charge de l'ensemble des questions scientifiques liées aux ressources marines et leurs impacts sur la santé publique [Taleb et Boutiba, 2007]. Ainsi, le réseau de surveillance est une nécessite qui permet d'étudier l'impact de la pollution, de déterminer les mesures préventives et interdire les rejets tout au long du littoral marocain.
Les conséquences de cette pollution peuvent être néfastes sachant qu'il existe à proximité des points de déversement des activités de pêche et de ramassage de coquillages même si celles-ci restent limitées et périodiques, d'où l'intérêt porté à l'évaluation du niveau de contamination par certains métaux lourds toxiques de la moule *Mytilus galloprovincialis*.
Les résultats obtenus à l'issue de ce travail confirment l'intérêt d'utiliser la moule comme Bioindicateur de la pollution en raison de son pouvoir élevé de concentrer les polluants [Taleb et Boutiba, 2007 ; Casas et al, 2007].
Il ressort de cette étude que les teneurs en métaux traces des moules de la zone central des côtes atlantiques marocaines présentent une grande hétérogénéité et variation spatio-temporelle, ce qui reflète le degré de pollution de nos côtes et de nos ressources aquatiques.
De ce fait, il faut sensibiliser de plus en plus les gens sur la situation actuelle, et mettre en place une réglementation imposant des normes de rejets qui oblige les industries à bien traiter leurs effluents et rejets, d'où l'importance de la surveillance continue.

B. Contaminants organiques : Hydrocarbures polycycliques aromatiques

Par opposition aux contaminants inorganiques, Les contaminants organiques sont des composés qui contiennent du carbone. [Munaron, 2004]. Ils sont d'autant plus difficiles à analyser qu'ils sont nombreux (plusieurs centaines). De plus, ils sont présents sous forme de mélanges au sein de matrices souvent très complexes [De Perre, 2009].
L'ensemble des micro-polluants organiques hydrophobes (POH) regroupe un très grand nombre de molécules. Parmi les POH se trouvent certains groupes de molécules bien connus pour leur toxicité comme les Polychlorobiphényles (PCB), les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), les pesticides organochlorés (DDT, atrazine), les dioxines… Cet ensemble, bien que très divers, possède des caractéristiques chimiques communes (hydrophobie, solubilité, persistance) qui leur confèrent des « traits de comportement » similaires dans l'environnement [Gourlay, 2004].
Les milieux aquatiques subissant une pression anthropique forte reçoivent la plus grande partie des micro-polluants rejetés issus de l'activité humaine et industrielle. Ces milieux sont aussi chargés en MO (Fig.22), sont susceptibles d'interagir avec les micropolluants présents dans le milieu. Par ailleurs, ces MO anthropiques peuvent subir une biodégradation dans le milieu aquatique et leur affinité pour les micropolluants peut en être affectée [Servais et al, 1998 ; Gourlay, 2004].

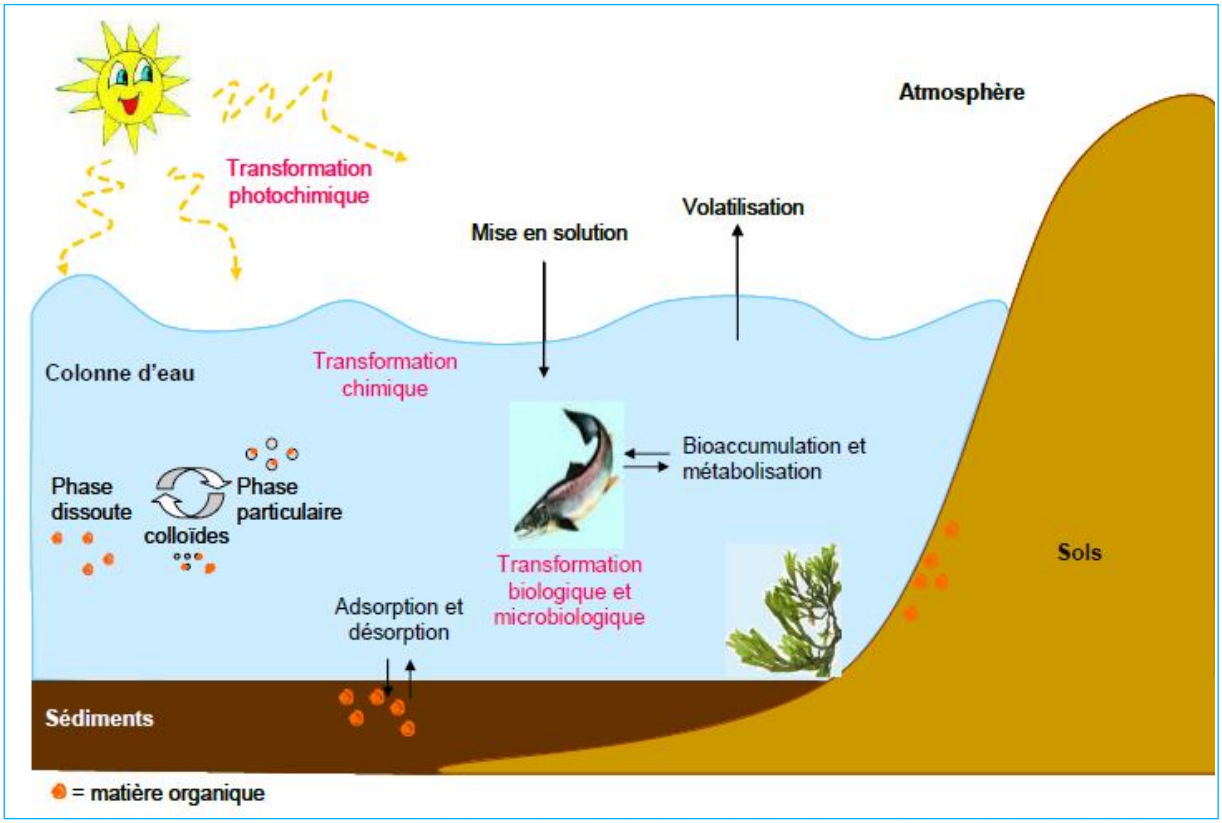


Figure.22 : présence de la matière organique et interactions entre les différents compartiments au sein du milieu aquatique.

1. Hydrocarbures polycycliques aromatiques : Définition

Depuis de nombreuses années, les HAP sont très étudiés car ce sont des composés présents dans tous les milieux environnementaux et qui montrent une forte toxicité. Ils font partie

des polluants organiques persistants (POPs) [Gabet, 2004 ; Samanta et al. 2002]. D'ailleurs, c'est l'une des raisons qui a conduit à leur ajout dans la liste des polluants prioritaires par l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA US Environmental Protection Agency), dès 1976. Aujourd'hui, ils font également partie des listes de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et de la communauté européenne [Gabet, 2004 ; Gourlay, 2004 ; Bonnard, 2010, Roussel, 2002].

Le nombre théorique de HAP susceptibles d'exister s'élève à plus de 1000 [NIST, 2002]. Toutefois, en raison de la grande réactivité de certains, beaucoup moins de HAP existent dans l'atmosphère. Ainsi seulement plus d'une centaine de HAP différents y ont été identifiés.

La Figure 23 présente les seize HAP principalement étudiés et recherchés dans l'environnement car déclarés comme substances prioritaires par l'Environmental Protection Agency (US EPA).

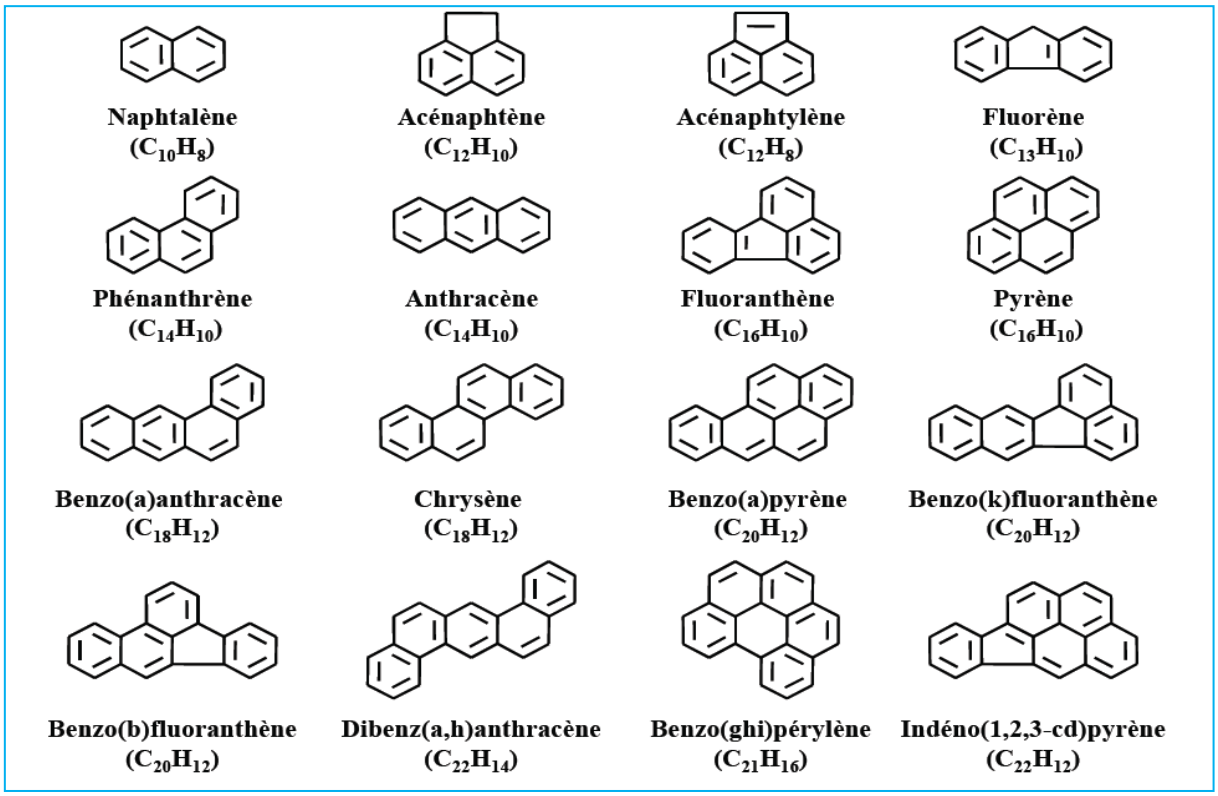


Figure.23 : Liste des HAP généralement surveillés dans l'environnement selon les Recommandations de l'US EPA (polluants prioritaires).

2. Source des HAP

Les composés organiques dans l'environnement sont issus de nombreuses sources : industrielles, agricoles, domestiques et naturelles, qui peuvent être directes ou indirectes, ponctuelles ou diffuses. Il existe des centaines de milliers de contaminants organiques et leur présence dans l'environnement est initialement conditionnée par leur origine. [De Perre, 2009 ; Samanta et al.2002 ; Gourlay, 2004].

Les HAP ont été détectés dans tous les compartiments environnementaux (air, eau, sols et sédiments) [Menzie et al, 1992 ; Gabet, 2004]. Émis principalement par voies atmosphériques. Les HAP atteignent les eaux de surface principalement par retombées

atmosphériques, mais aussi par les effluents urbains et industriels [Srogi, 2007,]. En effet, les effluents urbains ne passent pas tous systématiquement par une station de traitement et les effluents traités ne permettent pas l'élimination complète de tous les HAP [Abrajano et al, 2003]. Une fois dans l'environnement aquatique et à cause de leur propriété hydrophobe, ils s'associent rapidement aux particules en suspension dans l'eau et sont déposés sur les sédiments.

Les HAP peuvent avoir une origine naturelle ou anthropique [Gabet, 2004, Nicolaou et al, 1984]. Ils sont principalement produits à des températures à partir de 500 °C par combustion incomplète de la matière organique (incendies, moteurs à combustion, chauffage, industries…)[Samanta et al.2002], ces HAP sont dits pyrolytiques. Ils sont également présents dans le pétrole brut (HAP pétrogéniques) et peuvent être introduits dans l'environnement par des suintements naturels ou accidentellement lors du transport de produits pétroliers [De Perre, 2009 ; Gabet, 2004 ; Hill et Goshal, 2002 ; EFSA, 2008, Ledesma et al, 2000].

Ils proviennent des Sources naturelles (origine pétrogénique) comme :

- Biosynthèse par des organismes vivants
- Présents dans les pétroles bruts (forte proportion d'HAP substitués ou ramifiés)

Ou des sources anthropiques (origine pyrogénique)

- Industrie chimique, sidérurgie, incendies, moteurs à combustion, incinérateurs de déchets urbains…
- Pertes lors du transport et de la transformation des carburants fossiles, marées noires. (HAP les plus abondants dans l'environnement, non ramifiés) [Munaron, 2004].

3. Propriétés chimiques et identification

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, communément appelés HAP, sont une famille de composés chimiques constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure des molécules comprend au moins deux cycles aromatiques condensés [Munaron, 2004 ; Gabet, 2004 ; EFSA, 2008 ; Bonnard, 2010, Ferreira, 2001, Li et Chen, 2002]. Les HAP sont apolaires et hydrophobes. Leur caractère hydrophobe augmente avec le nombre de cycles aromatiques, alors que leur solubilité et leur volatilité diminuent. Le devenir et la mobilité des HAP dans l'environnement sont principalement contrôlés par leurs propriétés chimiques. A l'état pur, les HAP sont des solides souvent colorés et cristallins à température ambiante. Leurs propriétés physico-chimiques varient avec leur masse molaire et leur structure [De Perre, 2009 ; Gabet, 2004 ; Bonnard, 2010, Wilson et Jones, 1993].

Les HAP se subdivisent en deux groupes : les légers, dont la masse molaire est comprise entre 150 et 180 g. mol^{-1} (HAP de moins de quatre cycles) et les lourds (au moins quatre cycles) ; dont les masses molaires varient de 200 à 280 g. mol^{-1}(tab). Les HAP ont un point de fusion supérieur à 100°C et un point d'ébullition élevé (supérieur à 300°C). Ce sont des composés neutres et non polaires [Gabet, 2004 ; Bonnard, 2010].

Les HAP ont un comportement comparable à celui des PCB dans l'environnement :

- Très volatiles ;
- Grande affinité pour les particules solides (ex. sédiments) ;
- Relativement persistants dans l'environnement mais plus sujet à la dégradation photo-chimique que les PCB ;
- Très hydrophobes, mais s'accumulent moins bien dans les organismes car plus métabolisables que les PCB ;

- Caractère cancérigène et mutagène.

Tableau.28 : Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires définis par l'US-EPA.

HAP	Poids Moléculaire (g/mol)	Log K_{cc} [b] sans unité	Solubilité (mg/L)	Log K_{cw} [a] sans unité	Pression vapeur (Pa à 25°C)
Naphtalène	128	3.11	31.7	3.4	10.4
Acénaphtylène	152	3.83		4.07	8.9*10-1
Acénaphtène	154	3.79	3.93	3.92	2.9*10-1
Fluorène	166	4.15	1.98	4.18	8.0*10-2
Phénanthrène	178	4.22	1.29	4.6	1.6*10-2
Anthracène	178	4.41	0.073	4.5	8.0*10-4
Fluoranthène	202	4.74	0.26	5.22	1.2*10-3
Pyrène	202	4.82	0.135	5.18	6.0*10-4
benzo(a)anthracène	228	5.25	0.014	5.61	2.8*10-5
Chrysène	228	5.37	0.002	5.91	8.4*10-5
benzo(b)fluoranthène	252	5.89	0.001	6.12	6.7*10-5
Benzo(k)fluoranthène	252	5.89	0.0008	6.84	1.3*10-8
Benzo(a)pyrène	252	5.71	0.0038	6.5	7.3*10-7
Dibenzo(a,h)anthracène	278	5.97	0.0005	6.5	1.3*10-8(20°C)
Benzo(g,h,i)pérylène	278		0.00026	7.1	1.4*10-8
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	278	6.14	0.0062	6.58	1.3*10-8(20°C)

[a] : donnée de Environmental health Criteria 202 (IPCS, 1998)

[b] : données de Sverdrup et al (2002)

4. Mécanisme de formation des HAP

Les HAP sont principalement formés lors de la combustion incomplète de matières organiques et lors de la lente maturation de la matière organique accumulée dans les milieux sédimentaires profonds. Ces deux origines présentent des mécanismes de formation distincts qui se réalisent avec différentes cinétiques, et induisent des distributions moléculaires variables (liées à la stabilité) [Marr et al, 1999].

Ces deux principales origines des HAP peuvent être ainsi différenciées :
- les processus pyrolytiques par lesquels les HAP sont formés suite à la combustion incomplète de matières organiques à hautes températures (> 500 °C) ; ces processus se réalisant sous contrôle cinétique. Les HAP nécessitant de fortes énergies de formation sont formés plus rapidement et sont prédominants.
- la formation lors de la diagénèse puis de catagénèse de la matière organique soumise au gradient géothermique des milieux sédimentaires profonds ; à basse température (< 200 °C) et haute pression, seuls les HAP les plus stables sont formés sous contrôle thermodynamique. Une part minoritaire des HAP est également issue de la diagénèse précoce [Laflamme et Hites, 1978, Baeck et al, 1991].

La formation des HAP peut avoir de nombreuses origines qui peuvent être regroupées en trois catégories. On peut distinguer les origines pyrolytiques, diagénétiques et pétrogéniques. Cependant, les deux dernières sont négligeables dans l'atmosphère, en comparaison des sources pyrolytiques [EFSA, 2008].

5. Potentiel toxique

Les HAP présentent un risque toxicologique important même à de faibles concentrations, notamment par leurs propriétés cancérigènes et/ou mutagènes [IARC, 2002 ; White, 2002 ; Denissenko et al, 1996] (Tableau.29). Du fait de leur forte hydrophobicité liée à la présence de noyaux aromatiques, ces molécules s'adsorbent fortement aux matières particulaires rendant leur élimination et/ou leur transformation par réaction chimique difficile. De plus, les HAP sont peu biodégradables car faiblement biodisponibles, ce qui les rend persistants dans l'environnement. Ainsi leur sort dans l'environnement est devenu un sujet préoccupant [Gabet, 2004].
Les HAP peuvent s'accumuler dans une grande variété d'organismes. Des facteurs de bioconcentration (FBC) compris entre 4 et 7800 ont été signalés pour divers HAP dans des algues unicellulaires. La vitesse d'élimination chez les invertébrés aquatiques est beaucoup plus faible que le taux d'absorption, ce qui explique la longue demi-vie des HAP chez ces derniers. L'IARC (International Agency for Research on Cancer, 1983) indique que les HAP les plus potentiellement carcinogènes sont les benzofluoranthènes, le benzo[a]pyrène, le benzo[a]anthracène, le dibenzo[a,h]anthracène et l'indéno[1,2,3-cd]pyrène.

La toxicité des HAP peut s'exprimer selon différents modes. Plusieurs mécanismes toxiques sont mis en jeu suivant la molécule, le type d'exposition (aiguë ou chronique), les cellules et l'organisme touchés ainsi que les conditions environnementales. Les trois mécanismes de toxicité cités dans la littérature sont : la narcose non polaire, la toxicité photo-induite par les UV et l'activation biochimique qui est responsable des effets tératogènes et cancérigènes [Clément et al, 2000 ; Gourlay, 2004, Pickering et al, 1999].

Tableau.29 : Potentiel cancérigène des HAP génotoxicité et cancérogénicité des 16 HAP prioritaires définis par l'US-EPA.

HAP	Nbr noyaux	TEFs [a]	Classification de cancérogénicité		classification de génotoxicité
			(IARC) [b]	(US EPA) [c]	(SCF) [d]
Naphtalène	2	0.001			PNG
Acénaphtylène	3	0.001		D	DI
Acénaphtène	3	0.001			DI
Fluorène	3	0.001	3	D	DI
Phénanthrène	3	0.001	3	D	E
Anthracène	3	0.01	3	D	L
Fluoranthène	4	0.001	3	D	E
Pyrène	4	0.001	3	D	NG
benzo(a)anthracène	4	0.1	2A	B2	G
Chrysène	4	0.01	3	B2	G
benzo(b)fluoranthène	5	0.1	2B	B2	G
Benzo(k)fluoranthène	5	0.1	2B	B2	G
Benzo(a)pyrène	5	1	2A	B2	G
Dibenzo(a,h)anthracène	5	5	2B	D	G
Benzo(g,h,i)pérylène	6	0.01	3	D	G
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	6	0.1	2B	B2	G

[a] : Facteur d'équivalent toxique en B[a]P selon Nisbet & LaGoy (1992) ; [b] : IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ; 2A: Probablement cancérigène pour les humains ; 2B: peut-être cancérigène pour les humains ; 3: non classifiable ; [c] : US-EPA, IRIS (*Integrated Risk Information System*) ; B2: Probablement cancérigène pour les humains ; D: non classifiable ; [d] : EC, SCF (*Scientific Committee on Food*) (2002) ; PNG: Probablement non génotoxique ; DI: Base de donnée inadéquate pour l'évaluation ; L: preuve limitée ; E: suspecté ; NG: non génotoxique ; G: génotoxique.

6. Biodisponibilité et biodégradation des HAP dans l'environnement

Les HAP sont des composés ubiquistes présents dans tous les compartiments environnementaux : atmosphère, colonne d'eau, biota, sédiment, sols. Cette large distribution est due à leur grande stabilité et multiplicité de sources [Gourlay, 2004]. Leur distribution dans l'environnement résulte de multiples processus abiotiques et biotiques, contrôlés par leurs propriétés physico-chimiques : volatilisation, transport à longue distance, dépôt atmosphérique, adsorption sur les particules, sédimentation, bioaccumulation, activités microbiennes, oxydation chimique et photooxydation. Les HAP d'origine pyrolytique constituent la majeure partie des HAP introduits dans l'environnement et sont présents sur une échelle géographique très large.
La notion de biodisponibilité se situe à l'interface entre le milieu et l'organisme. Elle dépend à la fois du polluant, de son devenir dans l'environnent et de la physiologie de l'organisme exposé (Figure.24) [Gourlay, 2004].

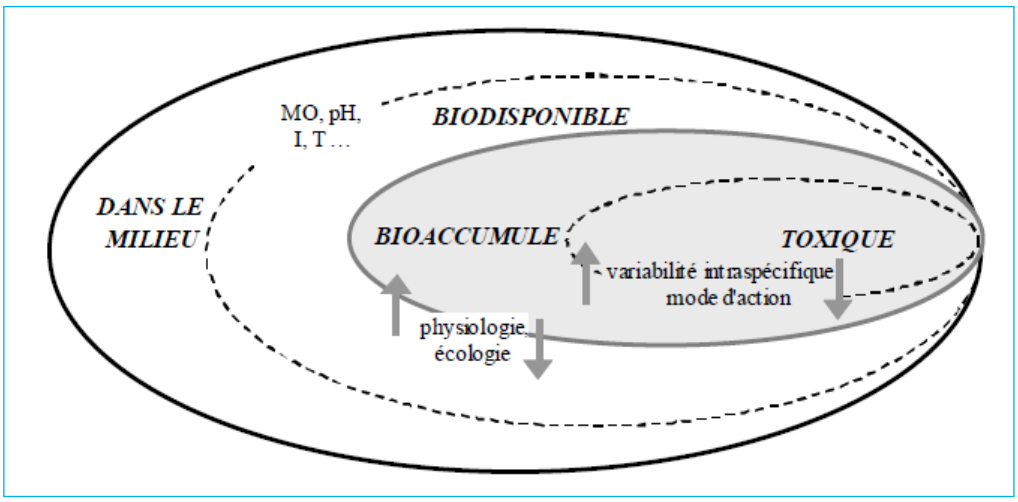


Figure.24 : Relation schématique entre la biodisponibilité, l'accumulation et la toxicité d'un contaminant dans l'environnement.

Les contaminants organiques ont la faculté de pouvoir être dégradés par des phénomènes physiques, chimiques et/ou biologiques [Bleeker et al, 2002]. Ainsi la photodégradation, la biodégradation ou encore l'hydrolyse sont les principaux processus de dégradation permettant l'élimination des contaminants organiques dans l'environnement. Ces mécanismes mènent rarement à une dégradation totale (transformation en CO2, H2O et minéraux uniquement) mais le plus souvent à des produits de dégradation qui peuvent être plus toxiques ou plus persistants que la molécule initiale. Pour les contaminants qui se dégradent peu, une préoccupation supplémentaire est due à leur persistance puisqu'ils peuvent être transportés sur de longues distances et ne sont pas dégradés lors de leur

ingestion par les organismes vivants et peuvent s'accumuler tout au long de la chaîne alimentaire (bioaccumulation et bioamplification) [De Perre, 2009].
Les transformations chimiques comme l'hydrolyse, les réactions redox et les réactions d'élimination ne sont pas des voies de dégradation dominantes des HAP dans les systèmes aquatiques peu profonds [Abrajano et al. 2003]. Par ailleurs, la biodégradation est peut-être le mécanisme de réaction le plus important pour la dégradation des HAP dans les environnements aquatiques. La dégradation bactérienne (aérobie ou anaérobie) a été reconnue comme le mécanisme le plus proéminant pour éliminer les HAP des environnements contaminés, même si les HAP de hauts poids moléculaires semblent plus résistants aux processus de dégradation bactérienne et tendent à persister plus longtemps dans les environnements contaminés [Abrajano et al. 2003, Bonnard, 2010].

7. HAP d'intérêt

7.1. Benzo(a)pyrène

Identification et caractéristiques : Le benzopyrène ou benzo[*a*]pyrène est un composé de formule $C_{20}H_{12}$, Il est l'un des plus connus des HAP. C'est un polluant persistant préoccupant ; structurellement formé de cinq cycles fusionnés.
A température ambiante ordinaire, le b(a)p se présente sous forme de cristaux jaunes inodores. Il est très peu soluble dans l'eau mais solubles dans de nombreux solvants organiques (aromatiques, chlorés…). Le b(a)p est une substance stable jusqu'à des températures très élevées. En solution, il s'oxyde sous l'influence de la lumière, de l'air et de la chaleur. Ses principales caractéristiques sont ;

Tableau.30 : Propriétés physico-chimiques du Benzo(a)pyrène

Masse Molaire	252,32
Température de fusion	175°C
Température d'ébullition	475°C à la pression atmosphérique
Densité	1,351

De tels hydrocarbures se rencontrent dans les produits complexes formés de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de matériaux organiques.

Principales sources d'exposition : Le benzo(a)pyrène est présent dans les combustibles fossiles. Il est également formé lors de combustions incomplètes puis rejeté dans l'atmosphère ou il est présent majoritairement dans la phase particulaire du fait de sa tension de vapeur extrêmement faible. Dans l'atmosphère, la phase vapeur dépasse rarement 10 % de la concentration totale en benzo(a)pyrène.
Les sources naturelles d'émission sont les éruptions volcaniques et les feux de forets. Le benzo(a)pyrène est également synthétisé par des plantes, des bactéries et des algues.
Sa présence dans l'environnement est d'autre part d'origine anthropique : raffinage du pétrole, du schiste, utilisation du goudron, du charbon, du coke, du kérosène, sources d'énergie et de chaleur, revêtements routiers, fumée de cigarette, échappement des machines, carburants, aliments fumés ou grillés au charbon de bois, huiles, graisses, margarines, etc.… [INERIS, 2007].

Devenir dans l'organisme : Par voie digestive, le benzo[a]pyrène est absorbé rapidement. Chez le rat, moins de 20 % de la dose administrée par voie orale sont retrouvés dans la

lymphe. Ce faible taux mesuré dans la lymphe pourrait être lié soit à une absorption incomplète, soit à un temps de passage court dans la circulation [IARC, 1983]. Par inhalation, l'absorption est rapide, mais dépend de la forme sous laquelle le benzo[a]pyrène est administré et plus spécifiquement de la taille des particules sur lesquelles il est adsorbé. Par voie cutanée, le taux d'absorption est estimé 3 % après 24 heures sur un modèle *in vitro* de peau d'origine humaine [Kao et al, 1985].

Le benzo(a)pyrène est rapidement distribué dans les différents organes internes en quelques minutes à quelques heures [Kotin et al, 1959]. Du fait de sa forte liposolubilité, le benzo[a]pyrène est stocké dans les glandes mammaires et les autres organes riches en graisses. Il est ensuite progressivement largué dans la circulation sanguine [IARC, 1983].

Il existe différentes voies métaboliques du benzo(a)pyrène comprenant de nombreuses réactions. Cependant, par rapport au risque cancérigène, la formation d'adduits à l'ADN semble être le mécanisme principal [INSERM, 2001].

Dans ce cas, le benzo(a)pyrène a un métabolisme qui s'effectue principalement au niveau hépatique en deux phases. Dans un premier temps, le benzo(a)pyrène subit une oxydation induite par les cytochromes P450, ce qui donne lieu à la formation d'époxyde. Puis, après transformation par les époxy-hydrolases mitochondriales, il y a formation de dihydrodiols. Ces derniers sont alors oxydés en diol époxydes puis en tétrols par les cytochromes P450.

Les tétrols sont capables de se lier de façon covalente aux macromolécules des cellules, et en particulier aux protéines et à l'ADN pour former des adduits. L'implication des adduits à l'ADN dans les mécanismes de cancérogenèse a été largement étudiée. Une partie de ces adduits, s'ils ne sont pas réparés, s'accompagnent de mutations génétiques dans les tissus. De ce fait ce sont des agents d'initiation de la cancérogenèse.

Le système enzymatique microsomal des cytochromes P450 est présent dans de nombreux tissus, en particulier au niveau pulmonaire, hépatique et cutané.

Il y a un polymorphisme génétique des principales enzymes impliqués dans la formation de ces adduits. De plus, le métabolisme du benzo[a]pyrène peut être influencé par le métabolisme oxydatif [INSERM, 2001].

Le benzo[a]pyrène et ses métabolites sont principalement éliminés dans les fèces (70 . 75 %). Seuls 4 à 12 % sont éliminés par voie urinaire. L'élimination par voie urinaire se fait à 80 % sous la forme de métabolites (métabolites polaires et dérivés phénoliques) et très faiblement sous la forme de benzo[a]pyrène non métabolisé [Yamazaki et Kakiuchi, 1989]. C'est un agent mutagène très cancérogène.

7.2.Pyrène

Identification et caractéristiques : Le pyrène est un composé chimique de formule $C_{16}H_{10}$ de la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), organisé en quatre noyaux benzéniques fusionnés. C'est un solide incolore présent naturellement dans la houille et dans les résidus de combustion incomplète des composés organiques. Il se forme dans les conditions les plus diverses.

Tableau.31 : Propriétés physico-chimiques du pyrène

Masse Molaire	202,26
Température de fusion	151°C
Température d'ébullition	404°C
Densité	1.27

Principales sources d'exposition : Le pyrène est présent dans les combustibles fossiles. Il est libéré dans l'atmosphère lors de la combustion incomplète de charbon et de produits pétroliers : huile, essence, fioul. Des concentrations de 19,2 ng/m^3 et 35,1 ng/m^3 ont été mesurées respectivement dans les gaz d'échappement de véhicules essence et Diesel.

Le pyrène est également présent dans le goudron des revêtements routiers (teneur pouvant atteindre 4,2 %) [IPCS, 1998]. Verschueren [2001] cite d'autre part les valeurs suivantes : 1,5 à 1,7 ng/kg dans l'essence, 23 à 41 mg/L dans le fioul, 3,5 et 4,5 mg/L dans des huiles Brutes, jusqu'à 750 mg/L dans des huiles de moteur usagées et 20 g/L dans de la créosote provenant du goudron de charbon.
la combustion de déchets, la fumée de tabac, les fonderies et la production d'aluminium, de fer et d'acier, constituent également des sources d'exposition de l'environnement au pyrène.

Devenir dans l'organisme : Il existe peu de données sur la toxicité du pyrène envers les hommes. Les études mises en œuvre ont été réalisées sur des mélanges et bien qu'induisant des effets cancérigènes, elles n'ont donc pas pu mettre en évidence le caractère toxique du pyrène seul. L'IARC a classé le pyrène non carcinogène envers les animaux. Les équipes de recherche évaluant la toxicité d'une molécule s'accordent à dire que le pyrène n'est pas un carcinogène humain, mais il est cependant classé comme tératogène. Il est moins dangereux que le benzopyrène, le pyrène s'est révélé être toxique pour les reins et le foie.

Chez l'homme les principales voies de pénétration des hydrocarbures aromatiques polycycliques sont l'inhalation, la voie orale et la voie dermique [ATSDR, 1995].
Une application cutanée de goudron de houille chez un volontaire sain, 2 jours consécutifs pendant 8 heures montre que le pyrène passe la barrière cutanée [Storer *et al.,* 1984]. Une autre étude montre la presence d'1-hydroxypyrene dans les urines chez un patient traité avec un shampoing aux goudrons et une solution de 500 g de pyrène en solution dans du toluène [Viau et Vyskocil, 1995].
Il n'existe pas de données chez l'homme relatives à la distribution des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'organisme. Le caractère lipophile des hydrocarbures aromatiques polycycliques leur confère une grande facilité à franchir les membranes cellulaires et leur permet d'être stockés dans les différents tissus. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont métabolisés en composés plus hydro-solubles ce qui facilite leur élimination. Ce métabolisme est observé dans les différents tissus, il utilise de nombreux systèmes enzymatiques. Les analogies structurales entre les différents hydrocarbures aromatiques polycycliques sont à l'origine d'analogies de métabolisme.
La plupart des hydrocarbures aromatiques polycycliques sont excrétés dans les fèces et les urines.

7.3. Anthracène

Identification et caractéristiques : L'anthracène est un composé de formule $C_{14}H_{10}$ synthétisé pour la première fois par Richard Anschütz. C'est un hydrocarbure aromatique polycyclique composé de trois noyaux benzèniques (benzène) fusionnés en alignement. L'anthracène est incolore, mais présente une fluorescence bleue à 400 et 440 nm lorsqu'il est soumis aux ultraviolets, lesquels peuvent également provoquer sa photodimérisation.

Tableau. 32 : Propriétés physico-chimiques d'Anthracène

Masse Molaire	178,23
Température de fusion	217,5°C
Température d'ébullition	340°C
Densité	1,24

Principales sources d'exposition : L'anthracène est naturellement présent dans les combustibles fossiles (12 g/kg de charbon). Il est présent dans le fioul (100 à 300 mg/L), dans l'essence (1,55 mg/L à 2,6 mg/L pour les essences à indice d'octane élevé) [Verschueren, 1996].

Les principales sources anthropiques d'exposition sont :

- les échappements des moteurs d'automobiles (0,02 à 6,45 µg/m3 [IPCS, 1998],
- la cokéfaction et la gazéification du charbon et plus généralement les émissions des fours à charbon et des fours à fioul,
- le raffinage du pétrole,
- l'utilisation des huiles d'imprégnation pour le traitement du bois,
- la préparation de l'asphalte pour les revêtements routiers,
- la fumée de charbon de bois,
- la combustion de déchets de pneumatiques (caoutchouc).

D'une manière générale, l'anthracène est présent dans les fumées émises lors de combustions incomplètes.

Devenir dans l'organisme : Chez l'homme, les principales voies de pénétration des hydrocarbures aromatiques polycycliques sont l'inhalation, la voie orale et la voie dermique. Une application cutanée de goudron de houille chez le volontaire sain 2 jours consécutifs pendant 8 heures, montre que l'anthracène passe la barrière cutanée [ATSDR, 1995 ; Storer *et al.*, 1984].Il n'existe pas de données chez l'homme relatives à la distribution des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'organisme. Cependant, l'analyse toxicologique à partir de foie et de graisses prélevées en court d'autopsie montre la présence d'anthracène (110 à 240 ppt et 25 à 575 ppt) [Obana et al, 1981].

Le caractère lipophile des hydrocarbures aromatiques polycycliques leur confère une grande facilité à franchir les membranes cellulaires et leur permet d'être stockés dans les différents tissus. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont métabolisés en composés plus hydrosolubles ce qui facilite leur élimination. La plupart des hydrocarbures aromatiques polycycliques sont excrétés dans les fèces et les urines.

7.4.Chrysène

Identification et caractéristiques : Le chrysène est un composé chimique de formule $C_{18}H_{12}$ formé de quatre noyaux benzéniques fusionnés. Comme la plupart des HAP, le chrysène présente une forte fluorescence aux ultraviolets.

Tableau.33 : Propriétés physico-chimiques du Chrysène

Masse Molaire	228,25°C
Température de fusion	258,29°C
Température d'ébullition	448,05°C
Densité	1,27

Principales sources d'exposition : Le chrysène est présent à des concentrations plus élevées que la plupart des autres HAP dans les combustibles fossiles tels que l'huile brute et la lignite. Il fait partie des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) prédominants dans les émissions particulaires provenant des incinérateurs d'ordures ménagères, des appareils ménagers à gaz naturel et des dispositifs de chauffage domestique, en particulier ceux utilisant la combustion du bois.

Devenir dans l'organisme : Chez l'homme, très peu de données sont disponibles concernant le devenir dans l'organisme du chrysène.
Des preuves indirectes de l'absorption du chrysène après inhalation ou contact cutané ont été fournies par la détection de HAP, dont le chrysène et ses métabolites, dans des urines de fumeurs [Becher, 1986], des urines d'ouvriers dont l'environnement atmosphérique est contaminé par de fortes concentrations de HAP [Becher et Bjorseth, 1983] ou encore dans des urines de personnes utilisant des crèmes au goudron de houille [Clonfero et al, 1986].
Une étude menée chez 24 femmes pour la présence de chrysène, benzo[a]pyrène et dibenz[a,c]anthracène dans des échantillons de placenta, de lait maternel, de sang maternel et de cordon ombilical [Madhavan et Naidu, 1995]. Les concentrations les plus élevées de chrysène ont été détectées dans le lait et le sang de cordon ombilical (de 0,002 à 2,8 ppm).

7.5.Fluoranthène

Identification et caractéristiques : Le fluoranthène est un hydrocarbure aromatique polycyclique dérivant structurellement d'un naphtalène lié à un benzène par deux liaisons simples formant avec celui-ci un cycle pentagonal. Il s'agit donc d'un HAP dit *non alternant*, isomère structurel du pyrène, qui est, lui, un HAP alternant ; les électrons π ne sont pas délocalisés dans l'ensemble de la molécule, contrairement au pyrène, qui est, pour cette raison, plus stable que le fluoranthène.

Le fluoranthène est un polluant cancérogène inscrit sur la liste des cancérogènes du groupe 3 du CIRC considéré comme l'un des plus nocifs.

Tableau.34 : Propriétés physico-chimiques du Fluoranthène

Masse Molaire	202,25
Température de fusion	110.8°C
Température d'ébullition	383,5°C
Densité	1,23

Principales sources d'exposition : Les principales sources naturelles de HAP dans l'environnement sont les feux de forêts et les éruptions volcaniques. Les émissions des cheminées et des fours à bois domestiques, des incinérateurs d'ordures ménagères, des

unités de production de goudron et d'asphalte, des unités de craquage du pétrole, constituent les principales sources anthropiques. Ces sources stationnaires représentent environ 80 % des émissions. Les sources mobiles sont constituées par les échappements des véhicules essence et Diesel.

Les rejets dans l'environnement sont principalement atmosphériques. Les HAP sont généralement associés à des particules, surtout les plus fines, mais peuvent également être présents dans la phase gazeuse. La présence de HAP dans les eaux de surface provient du dépôt de particules en suspension dans l'atmosphère, des rejets de lixiviation des aires de stockage de charbon, des effluents des usines de traitement du bois et autres industries, de l'utilisation de composts et de fertilisants. Le fluoranthène fait partie des HAP prédominants dans les émissions des incinérateurs d'ordures ménagères.

Devenir dans l'organisme : Très peu de données sur le devenir dans l'organisme du fluoranthène sont disponibles chez l'homme. En ce qui concerne l'absorption du fluoranthène, chez l'homme seule l'absorption cutanée a été étudiée. Après application de 2 % de goudron sur la peau de volontaires sains, 2 jours consécutifs pendant 8 heures, la présence de phénanthrène, d'anthracène, de pyrène et de fluoranthène a été détectée dans le sang des sujets étudiés, alors qu'aucune trace de benzo[a]pyrène n'a été mesurée dans le sang de ces individus [Storer et al, 1984]. Aucune autre donnée ne traite spécifiquement de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion du fluoranthène chez l'homme.

7.6. Phénanthrène

Identification et caractéristiques : Le phénanthrène, provenant de phényl et anthracène de formule C_{14} H_{10}. C'est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) composé de trois anneaux (noyaux ou cycles) de benzène, dit tricyclique. Ces anneaux sont fusionnés et il a cinq structures de résonance. C'est un composé organique (toxique) qui fait partie des polluants organiques persistants (POPs). On le trouve dans l'environnement surtout dans les sols et les sédiments, et il est essentiellement produit avec les goudrons, par une mauvaise combustion des hydrocarbures ou du bois (inserts, foyers fermés faiblement alimentés en air). Très peu soluble dans l'eau et dans l'air (à température ambiante), il est peu mobile dans le sol où il s'adsorbe sur les particules grasses ou la matière organique (lipides notamment).
Il n'est pas considéré comme très toxique parmi les HAP.

Tableau.35 : Propriétés physico-chimiques du Phénanthrène

Masse Molaire	178,24
Température de fusion	101°C
Température d'ébullition	332°C
Densité	1.17

Principales sources d'exposition : La présence de phénanthrène dans l'environnement provient le plus souvent de la combustion incomplète de certains composés organiques tels que le bois et les combustibles fossiles. Il est détecté dans la fumée de cigarette, les échappements de moteur diesel ou essence, dans les viandes grillées au charbon de bois, dans les huiles de moteur usagées, etc…

Devenir dans l'organisme :

Très peu de données concernant l'absorption et le devenir du phénanthrène dans l'organisme humain sont disponibles. Les données toxicologiques montrent que comme tous les HAP, le phénanthrène pénètre dans l'organisme par voie pulmonaire, orale ou cutanée.

Seule, l'absorption cutanée du phénanthrène a été étudiée chez l'homme. Ainsi, l'application pendant 2 jours consécutifs (8 heures par jour), de 2 % de goudron de houille, sur la peau de 5 volontaires sains (sans dermatose) a permis de montrer que le phénanthrène a bien été absorbé par voie cutanée puisque des traces de phénanthrène ont été retrouvées, après dosage par CPG-SM (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse), dans les prélèvements sanguins effectués sur les volontaires [Storer *et al*., 1984].

Aucune donnée, chez l'homme, ne traite spécifiquement la distribution dans l'organisme du phénanthrène et son métabolisme. Toutefois, la similitude de structure entre le phénanthrène et les autres composés aromatiques tel que le naphtalène, laisse penser que la dégradation du phénanthrène dans l'organisme est similaire à celle du naphtalène et par conséquent induit la formation de quinones, de phénols et peut se conjuguer au glutathion. Une fois absorbé, le phénanthrène est principalement excrété dans les urines. Une étude a montré, chez des salariés travaillant dans une cokerie, une corrélation entre le taux des différents HAP absorbés (le phénanthrène, le pyrène et le benzo[a]pyrène) et le taux de leurs principaux métabolites excrétés (phénols et dihydrodiol) dans les urines [Grimmer et al, 1993].

B. Contaminants organiques : Hydrocarbures polycycliques aromatiques

Plusieurs méthodes couplées sont couramment utilisées pour l'analyse quantitative et qualitative des HAP. On peut distinguer les méthodes basées sur la séparation en phase liquide (chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur UV (HPLC-UV), ou couplée à un fluorimètre (HPLC-FLUO)) de celles basées sur la séparation des HAP en phase gazeuse (chromatographie gazeuse couplée à un détecteur spectromètre de masse (GC-MS) ou à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)). D'autres techniques de couplage, telles que la spectrométrie de masse (simple ou en tandem) couplée à la chromatographie liquide ou la spectrométrie de masse en tandem, couplée à la chromatographie en phase gazeuse, sont apparues plus récemment et peuvent permettre d'améliorer l'identification et la quantification de HAP dans des matrices environnementales très complexes [Roussel, 2002].

8. Matériel et Méthodes :

8.1. Plan d'échantillonnage : même plan des métaux lourds

8.2. Conservation d'échantillons

Les prélèvements doivent être congelés le plus rapidement possible après leur réalisation, et ne doivent pas être en contact avec les matériaux polymères tel que le plastique. Ils doivent rester à l'abri de la lumière et de la chaleur afin de minimiser la perte des HAPs. Les échantillons sont conservés au froid au congélateur dans des feuilles de papier d'aluminium jusqu'au moment d'analyse.

8.3. Réactifs

Les réactifs et substances chimiques respectant les exigences liées à l'analyse par GC-MS.

- N-hexane ;
- Dichlorométhane ;
- Sulfate de sodium anhydre ;
- Silice pour chromatographie ;
- Sulfate de magnésium anhydre ;
- Terre de diatomée ;
- Iso-octane ;
- Solutions standards :
  - Anthracène ;
  - Pyrène ;
  - Fluoranthène ;
  - Benzo(a)pyrène ;
  - Chrysène ;
  - Phénanthrène.
- Standards deutérés :
  - Phénanthrène-d10 ;
  - Pyrène-d10 ;
  - Chrysène - d12 ;
  - Benzo(a)pyrène-d12.

8.4. Instruments et appareillage

- Micro onde ;
- Evaporateur sous courant d'azote ;
- Chromatographe en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse ;

Ce système comprend également :

- Colonne capillaire en silice vitreuse, 30 m x 0.25 mm, VF-5MS film de 0.25 µm ;
- Analyseur de masse quadripôle ;
- Système à vide : pompe turbo moléculaire et pompe rotative ;
- Mode d'ionisation : EI (impact d'électrons) ;
- Sensibilité en EI : 1 pg d'OFN dans l'iso octane ;
- Mesure simultanée SCAN/SIM ;
- Ajustement automatique du temps de rétention ;
- Logiciel de pilotage, d'acquisition de données et de quantification fonctionnant sous Windows XP Pro ;
- Bibliothèque spectrale NIST 05 avec environ 190.000 spectres de masse et logiciel de recherche en bibliothèque avec affichage des structures moléculaires.

8.5. Décontamination du matériel

Après lavage normal, la verrerie est rincée, au hexane/DCM. Puis exposée à 300° C en étuve pendant 24 heures pour éliminer toute trace de contamination.

9. Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques

9.1. Principe

Cette procédure a pour objet de décrire la méthode du dosage de 6 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) étudiés. Pour toute série d'échantillons, Le protocole du dosage dans les tissus biologiques se base sur une succession d'étapes depuis la préparation des échantillons jusqu'à l'injection en GC/MS. les étapes de ce protocole analytique sont : l'extraction, la purification et la concentration. Les molécules recherchées sont citées dans le tableau ci-dessous.

Tableau.36: HAPs étudiés et étalons internes.

Composé à quantifier	Etalon interne
Anthracène	Phénanthrène-d10
Phénanthrène	
Fluoranthène	Pyrène-d10
Pyrène	
Chrysène	Chrysène-d12
Benzo(a)pyrène	Benzo(a)pyrène-d12

9.2. Procédures de prétraitement d'échantillons

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont extraits de l'échantillon à analyser par du n-hexane/DCM. L'extrait est concentré par évaporation et le résidu est repris dans du solvant (iso-octane) approprié pour l'analyse GC-MS. les extraits sont purifiés avant quantification.

9.3. Extraction sous champ micro-onde

La technique d'extraction par micro-ondes consiste à chauffer le solvant d'extraction contenant l'échantillon à l'aide des micro-ondes (générées par un magnétron). L'emploi des micro-ondes peut permettre de diminuer le temps d'extraction (jusqu'à 10 à 20 minutes), ainsi que les volumes de solvants (jusqu'à 15 à 30 ml). L'avantage des micro-ondes est le chauffage homogène et reproductible de l'échantillon. Les solvants utilisés doivent avoir un moment dipolaire afin de pouvoir absorbé l'énergie des micro-ondes et de la transformer en chaleur. L'application des micro-ondes utilise actuellement deux technologies, l'extraction à pression atmosphérique (Focused Microwave Assisted Extraction) et l'extraction à pression et température contrôlées (Pressurized ou Diffused MAE) (figure.25, 26) [Roussel, 2002]. Cette dernière, (MAE) est un système clos qui permet l'extraction simultanée de 14 échantillons [Camel, 2000]. Cette méthode a été testée sur des échantillons de moules et a donné des rendements d'extraction équivalents à ceux obtenus avec le Soxhlet [Budzinsky et al, 1997 et 1999 ; Roussel, 2002 ; Baumard et al, 1998a, 1998b, 1999a, et 1999b].

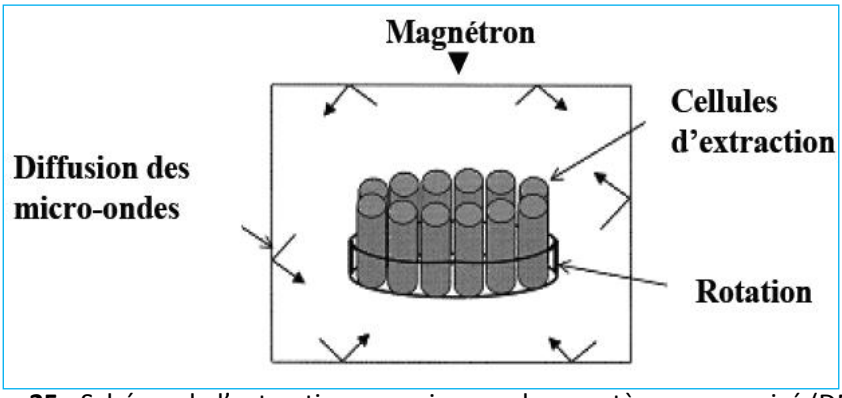


Figure.25 : Schéma de l'extraction par micro-ondes : système pressurisé (DMAE)

Figure.26 : Microonde d'extraction des HAP

Aux vues des données, l'efficacité d'extraction des HAP parait être sensiblement équivalente d'une méthode d'extraction à l'autre [Camel, 2000 ; Heemken et al, 1997 ; Schantz et al, 1997]. Ainsi, le choix de la méthode doit être effectué sur d'autres critères tels que le coût économique (englobant le matériel et la consommation de solvant) ou la simplicité du développement et de la mise en œuvre.

9.4. Purification

L'étape de purification permet d'éliminer une partie des composés pouvant représenter une source potentielle de bruit de fond lors de l'analyse. Pour les HAP, différents matériaux ont été testés, et les plus efficaces sont les cartouches en silice [Gundel et al, 1995]. Différents solvants d'élution, d'affinité croissante pour les HAP vont passer successivement au travers de cette colonne. Les HAP sont typiquement recueillis par du dichlorométhane [Collin, 2000] ou du cyclohexane [Gundel et al. 1995]. Cette technique de purification est simple et efficace [Marcé et Burrull, 2000]. Toutefois les cartouches disponibles sur le marché utilisent un support plastique pour contenir la silice, qui peut être une source de contaminations provenant de sa dissolution partielle suite au passage des différents solvants [Gundel *et al*, 1995]. Il est donc conseillé de fabriquer soit même ces cartouches, en utilisant comme support un matériau plus inerte comme le verre [Collin, 2000] ou le Téflon [Wang et al, 2001].

9.5. Concentration

En raison des faibles concentrations de HAP dans les échantillons, il est nécessaire de concentrer l'extrait obtenu sous jet d'azote jusqu'à l'obtention de 100 µl.

9.6. Analyse par GC-MS

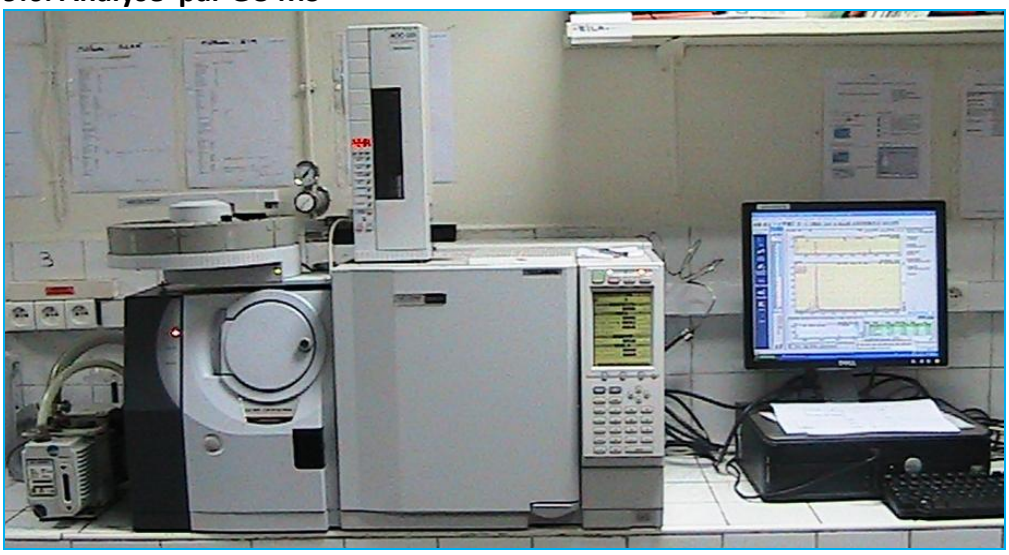


Figure.27 : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

9.6.1. Séparation [Roussel, 2002].

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation de composés gazeux susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans dégradation. Les colonnes chromatographiques utilisées sont des colonnes capillaires. Dans ce type de colonne la phase stationnaire est un film liquide directement déposé sur la paroi de la colonne (épaisseur de l'ordre de quelques µm) et la phase mobile est un gaz inerte. L'hélium est le plus souvent utilisé comme gaz vecteur car il donne la meilleure résolution. Les constructeurs ont développé des colonnes spécifiquement adaptées à la séparation des HAP.

9.6.2. Détection

Le détecteur à spectrométrie de masse (SM) est un détecteur couramment utilisé pour l'analyse des HAP. Il améliore l'identification des molécules, par fragmentation de ces dernières et identification des ions fragment formés. L'ensemble de ces ions fragments constitue un spectre de masse caractéristique de certaines structures moléculaires. Pour les HAP, l'ion moléculaire (M+) est généralement le plus abondant. L'identification est effectuée en comparant le spectre obtenu avec ceux d'une spectrothèque [Roussel.2002]. Il existe différents types de spectromètres de masse, le plus utilisé est le quadripôle, en raison de ses bonnes performances.
En raison de la stabilité des HAP, l'analyse de ces molécules par spectrométrie de masse utilise le plus souvent l'ionisation par impact électronique (bombardement d'électrons, 70 eV). Deux modes d'acquisition complémentaires permettent une identification et une quantification précise des échantillons :

- Le mode qualitatif (mode FULL **SCAN** : une gamme de masses est balayée tout au long de l'analyse), permet l'identification des composés présents dans l'échantillon par comparaison avec les spectres de masse disponibles dans les banques de données,

- Le mode quantitatif (mode **SIM,** single Ion Monitoring : un ou quelques ions caractéristiques des composés recherchés sont sélectionnés) permet d'améliorer grandement la sélectivité et la limite de détection, en abaissant le bruit de fond.

Conditions du chromatographe en phase gazeuse :

- Injecteur : « On column » (splitless)
- Colonne: Colonne de type DB-5MS d'une longueur de 30 m × 0,25 mm Di avec une phase stationnaire de 0,25 µm
- Débit constant de 1 ml/min
- Température initiale : 90 °C durant 1 minute, 1er palier de programmation (10 °C/min jusqu'à 180 °C), 2e palier de programmation (5 °C/min jusqu'à 290 °C pendant 5 minutes)
- Volume d'injection: 1 µl

Conditions du spectromètre de masse :

- Mode d'ionisation : impact électronique
- Mode d'acquisition : SCAN puis SIM (ion sélectif)
- Interface : directe à 290 °C
- Multiplicateur : tel que requis

Les paramètres suivants se sont révélés satisfaisants pour l'analyse des HAP dans les matrices solides.

9.7. Courbe et solution d'étalonnage

On prépare des solutions mères des 6 HAPs à 1000, ces solutions peuvent être stockées à l'abri de la lumière à 4°C pendant au moins six mois. On prépare des solutions intermédiaires (SI) à 1 ppm (100 µl de la solution mère / 100 ml d'iso-octane) et à partir de la solution intermédiaire, une gamme étalon contenant un mélange des 6 HAPs a été réalisée.
On prépare un minimum de 5 solutions étalons par dilution dans l'isooctane à l'aide de micropipettes (par exemple : 10, 8, 5, 2, et 0,5 ppb).

La linéarité de la fonction d'étalonnage est déterminée après injection des 5 solutions étalons.

Tableau.37 : Gamme étalon des 6 HAP en ppb

Eléments analysés	Étalon 1	Étalon 2	Étalon 3	Étalon 4	Étalon 5
Benzo(a)pyrène	0,5	2	4	8	10
Phénanthrène	0,5	2	4	8	10
Fluoranthène	0,5	2	4	8	10
Anthracène	0,5	2	4	8	10
Chrysène	0,5	2	4	8	10
Pyrène	0,5	2	4	8	10

Le cœfficient de corrélation obtenu est égal à 0.989. Ceci montre une bonne linéarité vue que R^2 égale ou supérieur à 0,98 (Fig.28).

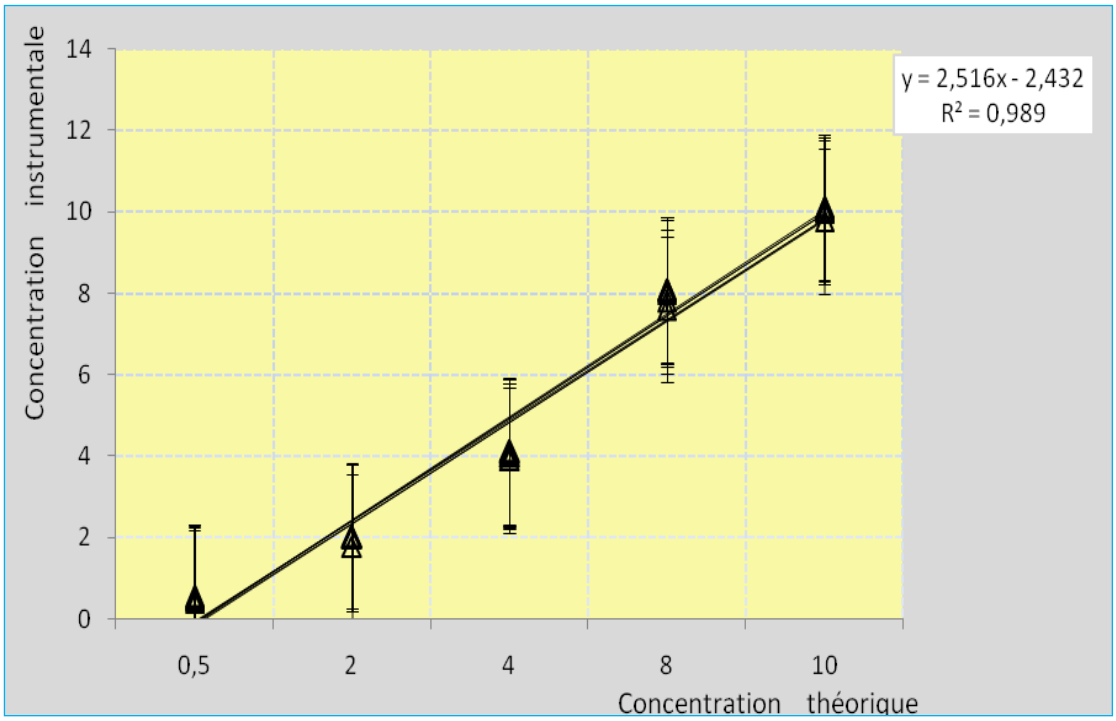


Figure.28 : Courbe d'étalonnage pour les 6 HAP étudiés.

9.8. Calcul des concentrations réelles

La quantification est effectuée par étalonnage (gamme étalon comprise entre 0,5 et 10 µg.Kg-1; 5 points d'étalonnage) et par rapport au rendement des étalons internes (Fig.29).

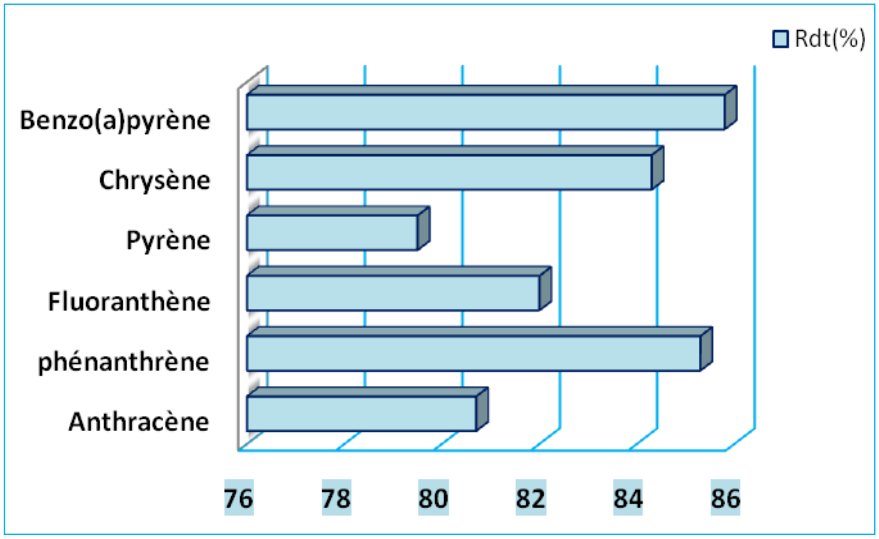


Fig.29 : Rendement de quatification pous les composés choisis
(moyenne de 10 replicats independants)

Sachant qu'on part d'une prise d'essai de 2g pour les moules et de 5g pour d'autres produits de pêche, après une cascade d'étapes, on arrive à 1ml à injecter avec un rendement de 80%. La formule de la concentration de chaque élément est de :

[C_f] : Concentration finale **[C_i] :** Concentration instrumentale obtenue par GC-MS.

$$[Cf] = ([Ci] \times mt \times d) / (Vf \times r)$$

Avec :
Vf : volume final de l'extrait
mt : masse d'éch. analysé
d : dilution éventuelle
r : rendement (0 à 1) dans notre cas 0,8

10. Vérification du protocole analytique

Les étapes pré-analytiques (extraction, filtration, concentration) que subit l'échantillon peuvent être à l'origine de pertes de HAP. Ces pertes peuvent être induites par volatilisation, dégradation, et par récupération incomplète de l'échantillon. L'ensemble de ces étapes ont fait l'objet d'une vérification par l'analyse d'une matrice de référence « BCR-458 ».
Les pertes ne sont pas considérés importantes d'après les résultats de ce test, pour les concentrations mesurées.
Aussi, avant de procéder aux analyses des échantillons, le bon fonctionnement de l'appareil est vérifié en injectant 1 ou 2 fois, une des solutions étalons, cela est répété avant chaque série d'échantillons.
Un contrôle de la réponse du système est réalisé toutes les 10 injections avec la solution étalon du milieu de la gamme. Les résultats ne doivent pas s'écarter plus de 15 à 20 % des concentrations théoriques.

11.

Dosage des HAP dans les produits de pêche par GC-MS au niveau des côtes marocaines

Baghdadi Mazini D[1]., Rachidi A[2]., Maatouk M[3]., Noël L[4]., Barrijal S[1].

[1]Equipe Valorisation des Microorganismes, Génomique, Bioinformatique (EVMGB)-FST-Tanger.
[2] Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches (LRAR)-ONSSA-Casablanca.
[3]Laboratoire Environnement, Océanologie et Risques Naturels (LEORNA)-FST-Tanger.
[4] ANSES Maisons-Alfort Laboratoire de la sécurité alimentaire, Unité des contaminants Inorganiques et minéraux dans l'environnement, France

RÉSUMÉ :

Les HAP étant largement répandus et fortement susceptibles d'entraîner des effets biologiques néfastes, ils ont fait l'objet de plusieurs études et évaluation. Ils présentent un risque toxicologique important même à de faibles concentrations, liés surtout à leurs propriétés cancérigènes et/ou mutagènes. De plus, les HAP font partie des contaminants peu biodégradables ce qui les rend persistants dans les milieux naturels. Ainsi, leur sort dans l'environnement est devenu un sujet préoccupant.

Pour l'homme, la source majoritaire d'exposition aux HAP pour les non fumeurs est l'ingestion des denrées alimentaires (viandes, poissons, légumes, etc..). Cette étude est menée sur les produits de pêche prélevés le long du littoral marocain, débarqués au niveau des principaux ports du royaume. Les analyses des teneurs moyennes des HAP dans les produits locaux variaient significativement selon les sites ($p<0,05$). Les résultats montrent une qualité satisfaisante de ces produits pour la consommation.

Les sites des prélèvements sont choisis de manière à diagnostiquer l'état de la contamination organique dans les différents produits pêchés. Le dosage de ces polluants est réalisé par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Mots-clés : Produits de pêche, littorale marocain, contamination chimique, HAP, GC/MS.

INTRODUCTION :

Depuis la révolution industrielle, les teneurs de polluants résultants des processus anthropiques n'ont cessé d'augmenter, en raison des besoins énergétiques croissants de l'homme. Parmi ces polluants, les HAP sont maintenant quotidiennement présents dans notre proche environnement. L'attention particulière qu'on leur accorde provient de leur action cancérogène reconnue sur certains animaux et soupçonnée chez l'homme [Roussel, 2002].

Les HAP sont des composés ubiquistes présents dans tous les compartiments environnementaux : atmosphère, colonne d'eau, biota, sédiment, sols. Cette large distribution est due à leur grande stabilité et multiplicité de sources. Leur distribution dans l'environnement résulte de multiples processus abiotiques et biotiques, contrôlés par leurs propriétés physico-chimiques : volatilisation, transport à longue distance, dépôt atmosphérique, adsorption sur les particules, sédimentation, bioaccumulation, activités microbiennes, oxydation chimique et photooxydation [Crespo, 2009]. Ils se caractérisent par leur forte hydrophobicité liée à la présence de noyaux aromatiques, ces molécules s'adsorbent fortement aux matières particulaires rendant leur élimination et/ou leur transformation par réaction chimique difficile [Gabet, 2004] Le mode d'alimentation (filtreur, déposivore, prédateur carnivore/herbivore) est également un facteur important qui détermine le degré d'accumulation des HAP, à l'instar des caractéristiques du biotope, des sources et de la teneur lipidique des tissus [Crespo, 2009 ; Burgess et al. 2003]. Les organismes déposivores semblent avoir un potentiel d'accumulation plus important que les organismes filtreurs potentiellement liés à une plus grande capacité d'ingestion [Burgess et al. 2003].

La bioaccumulation des HAP concerne principalement les organismes invertébrés lesquels ne possèdent que de faibles capacités de métabolisation [Neff, 1979 ; Varanasi et al, 1985]. Les molécules bioaccumulées peuvent toutefois être remobilisées lorsque l'organisme est amené à puiser de l'énergie dans ses réserves [Bruner et al.1994].

Plusieurs éléments poussent à s'intéresser à l'étude de ces substances dites bioaccumulables. Tout d'abord, les organismes qui bioaccumulent peuvent être utilisés pour étudier la contamination environnementale. Ensuite, la consommation d'organismes contaminés comme les poissons ou les mollusques peut exposer le consommateur à des doses importantes de contaminants. Enfin, la réponse d'un organisme à une substance toxique dépend de la quantité de cette substance qui atteint l'organe ou le tissu cible [Bachelot, 2010].

Il a été largement démontré que les HAP, pouvaient se retrouver en concentration plus importantes dans des organismes aquatiques que dans le milieu environnant [Andral et al. 2004; Goldberg 1975 ; Bachelot, 2010]. Ces organismes peuvent être des algues, des moules, des poissons, etc…Ainsi, cette étude est focalisée sur la surveillance des HAP et l'évaluation de leurs teneurs présents dans les produits de mer (poisson, céphalopodes et crustacés), destinés au marché national et international.

Ce travail a été réalisé le long du littoral marocain, au niveau des deux côtes du Maroc, l'atlantique et la méditerranée. Les contaminants visés sont surtout ceux qui ont tendance à s'accumuler dans les organismes marins [Pelletier et al, 1997, Gobeil et al. 1997].

MATERIEL ET METHODES

Plan d'échantillonnage :

Les prélèvements ont été effectués le long du littoral marocain, sur 13 sites, représentant les principaux ports du royaume (Nador, El hoceima, Tétouan, Tanger, Larache, Kénitra, Casablanca, Safi, Essaouira, Agadir, Tantan, Laayoune et dakhla). La localisation de ces sites est reportée sur la carte géographique en Figure.5 (p 27).

Le plan d'échantillonnage été réalisé trimestriellement depuis août 2006 jusqu'à décembre 2009. Il porte sur une variété d'espèces marines la plus consommée (poisson, céphalopode et crustacés). Les échantillons ont été prélevés au hasard au niveau des halles aux poissons des ports au moyen de chaluts et casier. Pour chaque station et campagne de récolte, six prélèvements d'espèces différentes ont été faits dans de telle sorte qu'elles reflètent les caractéristiques chimiques des produits de mer.

Chaque prélèvement était constitué de 10 échantillons prélevés sur la même espèce, de sorte que cela constitue un prélèvement global d'au moins 1 kilogramme. Le nombre d'échantillons collectés selon les sites du prélèvement est indiqué dans les Tableau 8, 9 et 10.

Matériel et réactif : voir partie B-9 (p 80)

Méthode du Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Plusieurs éléments organiques sont déclarés toxiques pour l'environnement marin, parmi lesquels six molécules d'HAP ont été choisies pour évaluer la contamination organique. Les composés analysés sont: Benzo(a)pyrène (BaP), chrysène (Chry), anthracène (Ath), fluoranthène (Flu), pyrène (Py) et phénanthrène (Ph).

Le protocole du dosage des HAP dans les tissus biologiques se base essentiellement sur trois étapes : l'extraction, la purification et la quantification par GC/MS [Mzoughi et al, 2002, De Perre, 2009 ; Baumard et al. 1998 ; Porte.2002]. La détermination des concentrations des HAP dans les échantillons dépende du rendement (Rdt ≈ 80 %) des étalons internes deuterés utilisés : Benzo(a)pyrène-d12, Chrysène-d12, Pyrène-d10 et Phénanthrène-d10, choisis en raison de leurs propriétés physico-chimiques, proches de celles des molécules étudiées [Budzinsky et al, 1999]

A une prise d'essai de 5 g d'échantillon homogénéisé ont été ajoutés 2 g de Sulfate de magnésium ($MgSO_4$), 2 g de Sulfate de sodium (Na_2So_4) pour absorber l'humidité et 2 g de Terre de Diatomée.

Apres broyage des échantillons et ajouts d'étalons internes deutérés. Les HAP sont extraits par application d'un champ micro-ondes en présence de n-hexane/dichlorométhane (v/v) (30 ml) [Le Du Lacoste., 2008]. L'extracteur micro-ondes est programmé pour produire un champ d'ondes de puissance de 800 W pendant 30 min. Les HAP sont ainsi transférés de la matrice au solvant et l'extrait organique est définitivement séparé de la matrice par purification sur colonne de silice/Oxyde d'alumine. Les extraits sont récupérés dans l'éluât avec du DCM et reconcentrés sous flux d'azote jusqu'à 100 µl. La récupération se fait avec de l'isooctane (1ml) [Budzinski et al, 1999 ; His et al, 1997 ; Pena et al, 2006 ; Letellier et al, 1999].

Afin de contrôler la méthode adoptée, un blanc de manipulation est effectué à chaque série d'analyse afin de tenir compte d'éventuelles contaminations lors du protocole. De plus les étalons internes du protocole permettent de vérifier le rendement de récupération des substances dosées.

Cette méthode permet d'atteindre une limite de détection de 0,03 µg/Kg pour le benzo(a)pyrène. La justesse analytique a été évaluée avec un matériel biologique de référence « BCR-458 ».

Tableau 38 : Limite de détection pour chaque élément étudié et leurs étalons internes.

Composé quantifié	limite de détection	Etalon interne
Anthracène	0,05	Phénanthrène-d10
Phénanthrène	0,02	
Fluoranthène	0,12	Pyrène-d10
Pyrène	0,03	
Chrysène	0,06	Chrysène-d12
Benzo(a)pyrène	0,03	Benzo(a)pyrène-d12

Traitement statistique :

L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel SPSS (version 17.0). Une analyse de variance (ANOVA) a été appliquée pour tester l'influence du temps (saison et année) et des sites. Le tableau d'ANOVA à pour objectif d'indiquer le degré des relations existante entre deux variables, d'après la théorie, il existe une relation lorsque le degré de signification est inférieur à 0,05.Aussi, une analyse des composantes principales (ACP) a été utilisée pour déterminer la corrélation présente entre les contaminants étudiés. Les concentrations ont été exprimées on microgrammes de l'élément par Kg (µg/Kg) du produit frais.

11. Résultat et Discussion :

11.1. Sources et niveau de contamination :

Les résultats obtenus montre la présence d'une variété d'HAP, avec des concentrations aussi variantes (Figure.30), ce qui est démontré avec les études de Azdi et al [2006] .Du fait des sources multiples de HAP et de leur ubiquité, ils sont généralement présents dans l'environnement sous forme de mélanges complexes [Burgess et al. 2003]. C'est pourquoi de nombreuses études se sont focalisées sur l'évaluation de la toxicité des mélanges de HAP et ont permis de mettre en évidence une additivité des toxicités des composés individuels [Erickson et al, 1993].

La carte factorielle résultante d'analyses des composantes principales, affirme une corrélation positive entre les 6 molécules (Figure.31). Cette corrélation est très forte surtout entre (benzo(a)pyrène et anthracène), un peu moins forte avec (pyrène et chrysène), excepté le cas du phénanthrène et le fluoranthène. Ces deux derniers s'éloignent un peu du deuxième axe démontrant ainsi une différence d'évolution avec les autres contaminants. Ces résultats indiquent que la présence d'une de ces molécules soupçonne la présence des autres, surtout la présence du benzo(a)pyrène. Il est fréquemment utilisé comme élément représentatif et indicatif de l'ensemble des HAP [Tarantini, 2009].

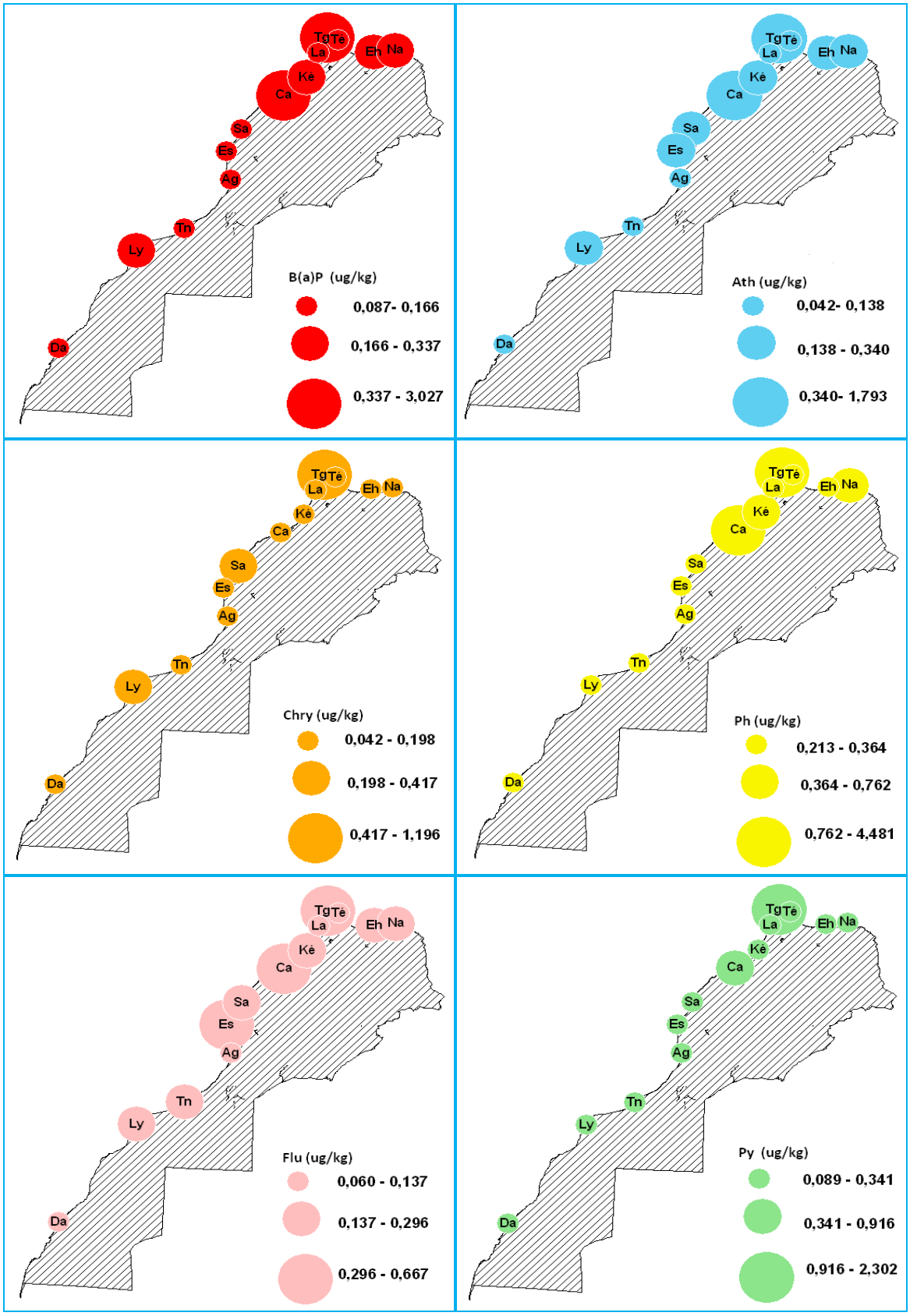
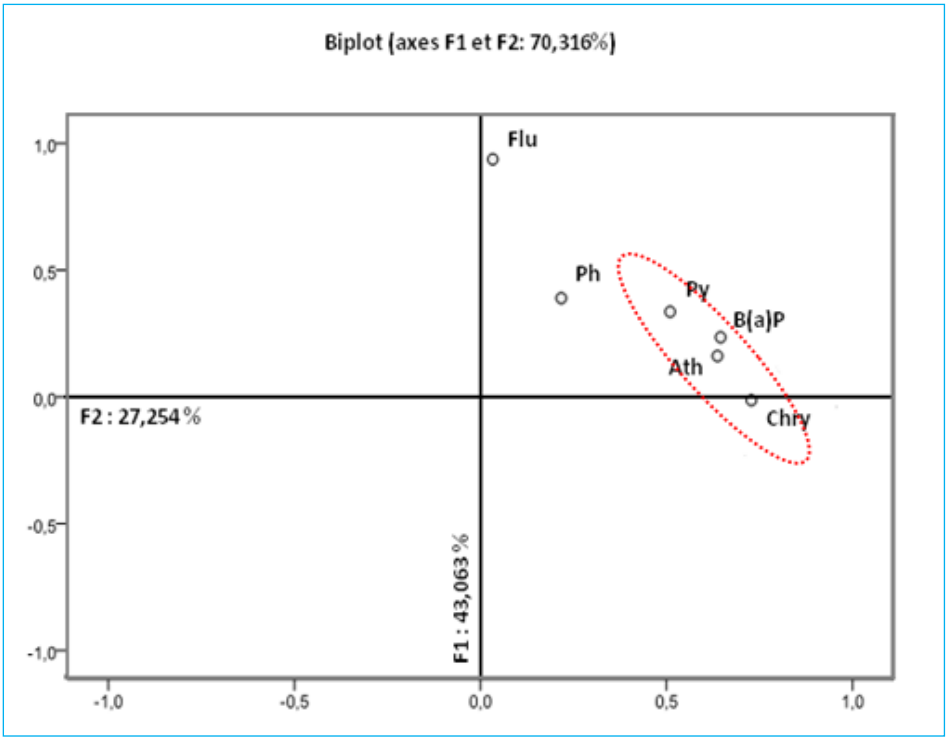


Figure.30 : Distribution spatiale de la contamination organique (ug/kg de P.f).



Figue.31 : Diagramme d'analyse de composante principale (ACP) réalisé pour les molécules étudiées (n=6)

Ces HAPs pénètrent dans le milieu naturel à des concentrations différentes dans des conditions qui ont ou peuvent avoir un effet défavorable sur l'environnement. D'importantes quantités d'HAP proviennent de diverses sources et sont libérées dans l'environnement chaque année [McElroy et al, 1989 ; Environnement Canada, 1998].
Dans cette étude, l'origine des HAP (petrogénique ou pyrolytique) a été déterminée en utilisant les deux rapports suivants : Phénanthrène/Anthracène (Ph/Ath) et Fluoranthène/Pyrène (Flu/Py) [Azdi et al, 2006 ; Budzinski et al, 1997], les résultats sont présentés dans la Figure.32 et Tableau.39**.** C'est surtout une origine mixte (pétrogenique et pyrolytique) qui est mise en évidence pour ces HAP, Pour certaines sites, l'origine de ces derniers est pyrolytique. Les HAP d'origine pyrolytique constituent la majeure partie des HAP introduits dans l'environnement et sont présents sur une échelle géographique très large. Ils sont émis par les processus naturels tels que les feux de forêt et irruptions volcaniques, et par les activités anthropiques reposant sur la combustion de bois ou de produits pétroliers telles que les industries, incinérateurs, chaufferies à bois, et le transport. Contrairement, à l'introduction des HAP pétrogéniques qui a lieu sur une échelle géographique plus restreinte, sur des niveaux "locales" comme lors des suintements naturels de pétrole et des marées noires accidentelles en mer qui sont les principales causes [Crespo.2009 ; Thorson, 2004].

Les HAP étudiés font partie des polluants principalement recherchées dans l'environnement car déclarés comme substances prioritaires par l'Environmental Protection Agency (US EPA) [Gourlay, 2004 ; Perraudin, 2005 ; Pena et al, 2006], et par d'autres organismes de référence [Rababah et Matsurawa, 2002 ; Hatch et Burton, 1999]. Du fait du caractère toxique de ces composés, il est important de règlementer les teneurs maximales admissibles pour éviter tout risque environnemental, ils sont aussi surveiller dans le cadre de plusieurs directives

européennes et exigences nationales qui doivent être prises en compte dans les objectifs de qualité des produits à atteindre pour la consommation humaine. Les valeurs moyennes obtenues depuis 2006 au 2009 dans divers sites (Figure.34) sont inférieures aux valeurs limites recommandées par la réglementation européenne [CE N° 1881/2006 ; CE N°835/2011]. Cette évaluation ne révèle aucun danger suite à la consommation des produits de pêche. En général, Les HAP se fixent préférentiellement sur les particules et se concentrent plus dans les sédiments que dans d'autres espèces marines [Gourlay, 2004, Porte et Albaiges, 1993 ; Baumard et al, 1999 ; Landrum et Robbins, 1990 ; Casas, 2007].

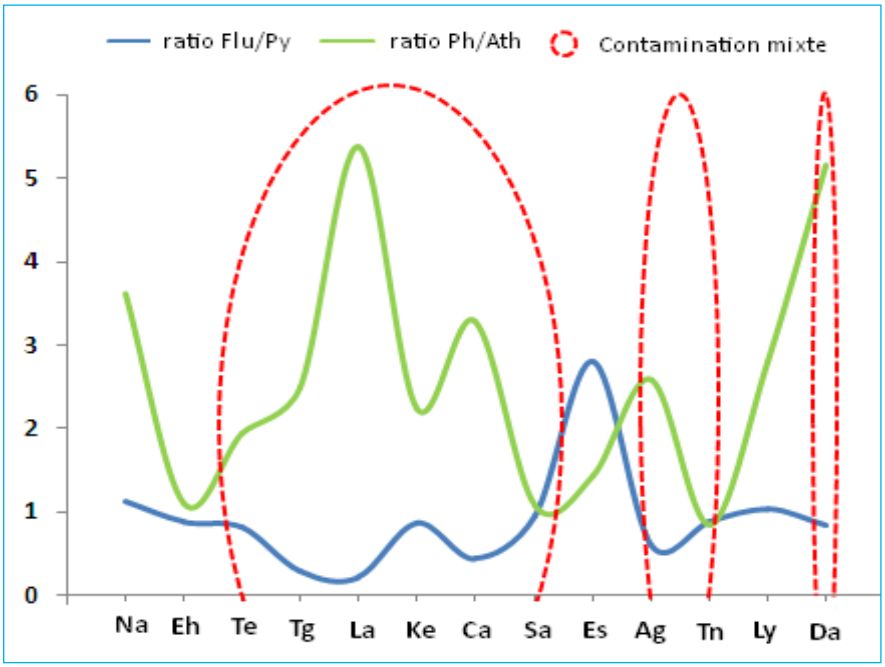


Figure.32 : les deux rapports étudiés pour la détérmination des origines des HAP presents dans les produits de mer. (Ph/Ath :(Phenanthrene)/(Anthracene) ; Flu/Pyr=(Fluoranthne)/(Pyrene) ; Na :Nador, El : El Hoceima ; Té : Tétouan ; Tg : Tanger ; La : Larache ;Ké : Kenitra ; Ca : Casablanca ; Sa : Safi ; Es : Essaouira ; Ag : Agadir ; Da : Dakhla ; La : Laayoun, Ta : TanTan).

Tableau.39: les teneurs totales des 6 HAP doses et l'origine des HAP

Station	Σ HAP totaux	Origine de contamination
Nador	1,635	pyrolitique
El hoceime	1,545	pyrolitique
Tétouan	0,950	mixte
Tanger	**13,466**	mixte
Larache	0,811	mixte
Kénitra	2,194	mixte
Casablanca	**7,236**	mixte
Safi	1,540	mixte
Essaouira	1,402	pyrolitique
Agadir	0,822	mixte
Tantan	0,554	mixte
Laayoune	1,023	pyrolitique
Dakhla	1,291	mixte

11.2. Distribution des HAP en fonction du temps, des sites et d'espèces marines étudiées:

La Figure.30 est une cartographie de projection des concentrations moyennes présentes dans chaque site choisi pour cette campagne de surveillance. Au vu de ces cartes, les sites les plus influencés par ce type de contaminants, disposant de plus de contaminants sont principalement Casablanca, et Tanger (Tableau.41). Ces deux zones sont connues par une forte contamination urbaine, aussi elles sont sujet de la contamination industrielle. Cette figure révèle la variation spatiale, approuvée par la majorité d'études concernant la contamination chimique [Porte et Albaiges, 1993 ; Casas, 2007]. Les résultats du test d'ANOVA (Tableau.40) confirment aussi cette variation.
Les Figures 34 et 35 exposent les teneurs moyennes présentes dans les différents produits selon les périodes des prélèvements. Les niveaux des HAP mesurés lors de cette campagne sont très modérés et le risque de dépasser les seuils d'évaluation, en moyenne annuelle, paraît aussi minime.
Les variables (HAP/année) et (HAP/saison) selon le tableau.4 n'affirment aucune variation significative ($p>0,05$), ce qui désapprouve la variation temporelle, évidente et démontrée par Beliaeff et Bocquené [2004]. Ces résultats ne peuvent être justifiés qu'au vu des faibles teneurs retrouvés d'HAP, elles ne peuvent pas permettre de déterminer mieux leur évolution et variation dans le temps. L'analyse d'ANOVA, indique seule une évolution des teneurs en fonction des aires de récolte.
Beaucoup de facteurs peuvent moduler la présence d'un composé chimique dans l'environnement. Un composé toxique peut être immobilisé sur des particules, transformées par des bactéries (par exemple), incapable de traverser les membranes biologiques pour qu'il soit absorbé par les individus et être accumulé. Ceci illustre l'importance de la biodisponibilité, traduisant la portion de contaminants introduite dans l'organisme. Une des approches permettant d'estimer la biodisponibilité est le dosage chimiques de ces composés dans les tissus [Minier, 1998]. Ainsi, dans cette étude, les concentrations des HAP a été mesures dans les tissus des poissons, céphalopodes et crustacés. La variation des teneurs en fonction des organismes marins est illustrée dans la Figure.35. Ces résultats confirment la variation selon l'espèces ou matrice étudiée. Cette variation est un autre indice de condition limitant l'accumulation et le transfert des polluants a travers la chaine trophique [Yunker et al, 2001].
En général. les niveaux et les caractéristiques de la contamination organique peuvent dépendre de plusieurs facteurs : Facteurs biologiques, chimiques et environnementaux [Yunker et al, 2001, Neff, 1979]. Cette étude s'intéresse surtout aux facteurs environnementaux : le temps de l'exposition, la position du site, la source de polluants, et la quantité présente en espèces marines.

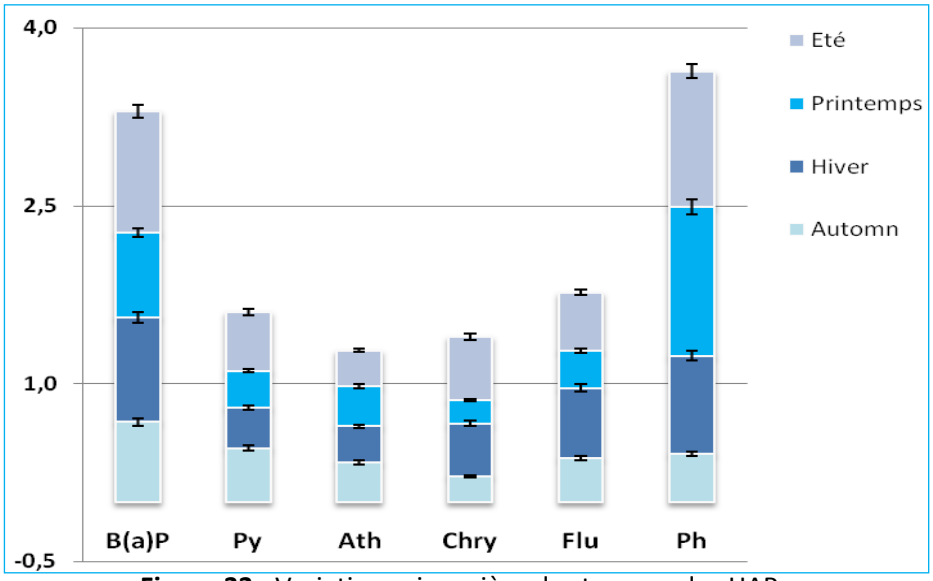


Figure.33 : Variation saisonnière des teneurs des HAP.

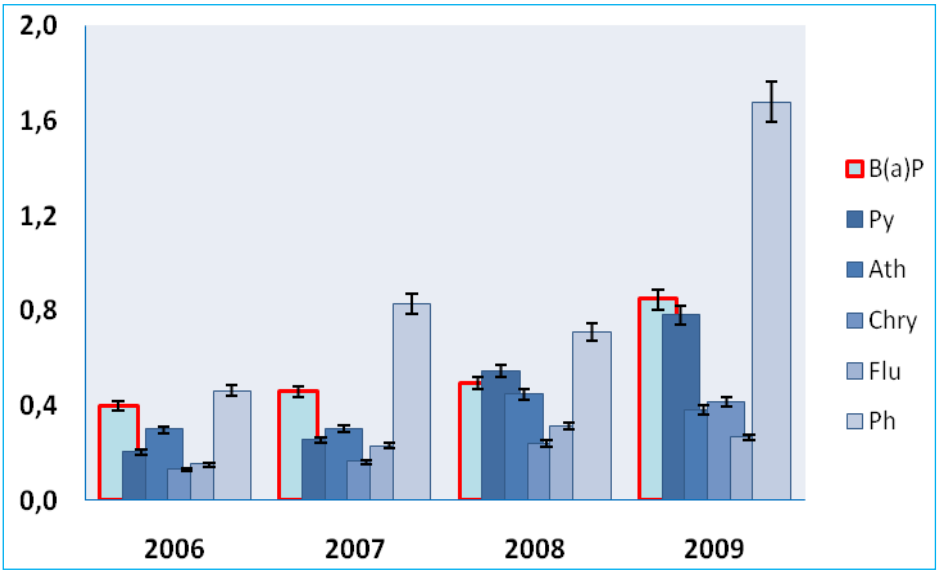


Figure.34 : Variation annuelle des teneurs des HAP.

Tableau.40 : Analyse de la variance Résultat du test d'ANOVA pour les HAP étudiés.

Éléments	Saison		Année		Site	
	F	P	F	P	F	P
Benzo(a)pyrène	0,893	0,444	1,157	0,325	5,428	0,001
Pyrène	0,043	0,988	1,061	0,933	2,725	0,044
Athracène	0,786	0,502	1,941	0,122	2,696	0,045
Phènanthrène	0,483	0,733	1,128	0,237	2,796	0,040
Chrysène	0,471	0,691	1,315	0,268	4,205	0,002
Fluoranthène	0,566	0,352	1,450	0,092	3,189	0,023

Les valeurs du test statistiques (F) et celle de la probabilité sont mentionnées [Significatif :($p<0,05$) ; Non significatif : ($p>0,5$)] ; F : valeur du test F, P : probabilité.

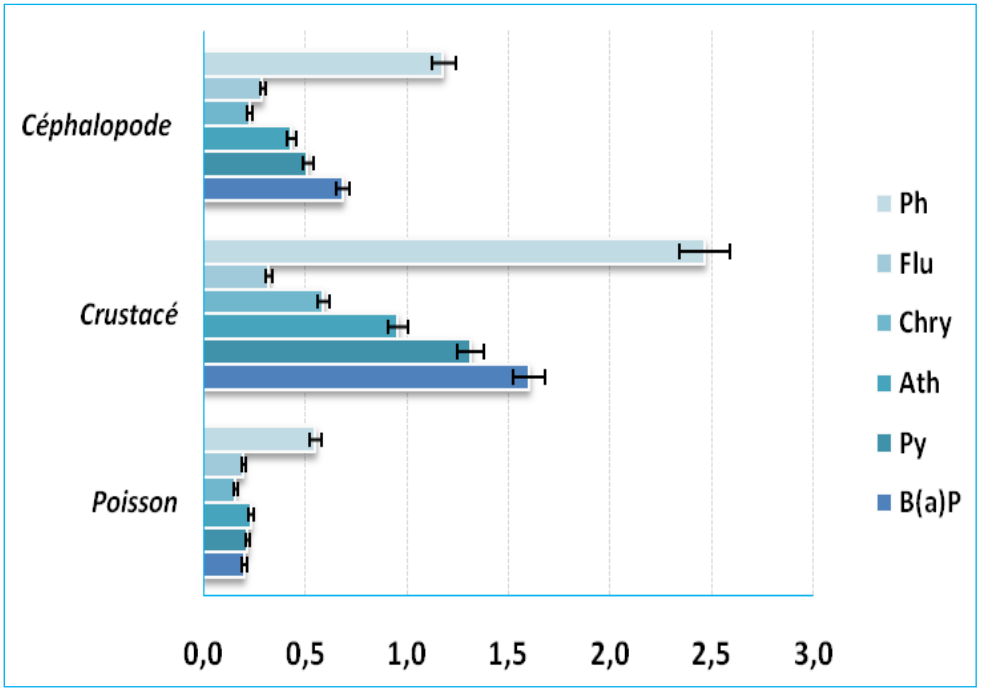


Figure.35 : variation des HAP selon les produits de pêche.

CONCLUSION :

Depuis quelques années, les suivis environnementaux se sont avérés nécessaires pour progresser dans la compréhension des origines et des conséquences de la présence des polluants chimiques dans l'environnement. La préoccupation actuelle est due au fait que de plus en plus de molécules sont synthétisées à des fins industrielles, agricoles, domestiques ou thérapeutiques et que l'on ignore pour beaucoup d'entre elles les effets à moyen et long termes sur la flore et la faune. C'est pourquoi une liste de substances prioritaires qui constituent un risque important pour le milieu aquatique a été identifiée pour pouvoir instaurer des mesures de contrôle convenables.

La mesure de la concentration des contaminants chez les organismes marins, en tant qu'outil d'évaluation de la contamination des milieux aquatiques, est très largement utilisée dans les pays développés. Au Maroc, l'étude de la contamination des organismes marines surtout les poissons par les HAP et leurs effets restent moins traitée et abordée [Azdi & al, 2006]. Pourtant les teneurs dans les organismes augmentent depuis une dizaine d'années, pour s'approcher aux valeurs guides pour la consommation humaine. Cette étude fait partie des campagnes de surveillance et de suivi des résidus chimiques. Elle a permis de dresser un bilan de la qualité des produits de pêche contaminés par ce type de contaminants [substances prioritaires selon les directives, CE N° 1881/2006 ; CE N°835/2011] pouvant induire des effets toxiques chez le biota aquatique. Ce travail a permis d'identifier l'origine de cette contamination organique qui peut être soit naturel, indirectement liée à l'activité humaine ou directement causée par l'activité humaine locale afin de penser au moyens nécessaires de préservation du milieu aquatique.
Les concentrations des HAP trouvées dans ces aliments dépendent principalement de leur source. Par exemple, le poisson provenant des zones polluées contient généralement de plus fortes concentrations de HAP que celui qui vient des régions moins polluées.

12.

Biodisponibilité des HAP chez *Mytilus galloprovincialis* de la zone centre atlantique du Maroc

Baghdadi Mazini D[1]., Barrijal S[1]., Noël L[2]., Rachidi A[3].

[1]Equipe Valorisation des Microorganismes, Génomique, Bioinformatique (EVMGB)-FST-Tanger.
[2] ANSES Maisons-Alfort Laboratoire de la sécurité alimentaire, Unité des contaminants Inorganiques et minéraux dans l'environnement, France
[3] Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches (LRAR)-ONSSA-Casablanca.

RÉSUMÉ :
Les bivalves du genre *Mytilus galloprovincialis* sont utilisés comme indicateur de pollution dans de nombreux programmes de surveillance à travers le monde. Ils sont très sensibles à la pollution et représentent un réservoir pour plusieurs contaminants. Parmi ces contaminants, on peut citer les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) catalogués comme polluants prioritaires de l'environnement, vu leur persistance dans le milieu, leur solubilité et leur accumulation dans les tissus gras des organismes vivants.
La méthode utilisée pour l'extraction de ces composés est une extraction sous champs microondes. Pour évaluer l'efficacité de cette méthode, on s'est basée sur les taux de récupération d'étalons internes deutérés ajoutés au début de l'étape d'extraction. Selon les résultats du rendement (≈90%), la méthode a été adoptée pour sa simplicité et sa rapidité d'exécution, de même elle a été utilisée dans de nombreuses études antérieures. Le dosage des HAPs a été réalisé par GC/MS. Les teneurs en HAPs dosées chez *Mytilus galloprovincialis*, révèlent des variations selon les sites de prélèvement et la saison.

Mots-clés : Evaluation, extraction, HAP, *Mytilus galloprovincialis*, GC/MS.

INTRODUCTION :

Diverses sont les perturbations qui peuvent changer les caractéristiques d'un milieu marin, tels que les aménagements littoraux, la surexploitation de produits de la mer, la pollution et l'introduction de nouveaux composés exogènes.

Le milieu marin est menacé surtout par la présence de nombreuses substances chimiques rejetées par les industries, l'agriculture et les communautés urbaines [Azdi & al, 2006 ; Talebal & Boutiba, 2007 ; Petrovic & al, 2004]. Les zones côtières, sous forte influence continentale, sont les plus touchées par la contamination chimique [Casas, 2007].

La présence de contaminants organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans l'environnement marin pose la question importante de leur devenir dans les réseaux trophiques et, finalement, celle de l'exposition des consommateurs finaux, y compris l'homme [Abarnou et al, 2004 ; Wssel, 2010 ; Perraudin, 2004].

Les HAP constituent une classe de Polluants Organiques Hydrophobes (POH) étudiés et recherchés dans l'environnement depuis les années 70 [Mzoughi,& al, 2002 ; Gourlay, 2004 ; Perraudin, 2004, Geffard, 2001]. Ils sont considérés comme des contaminants prioritaires des écosystèmes terrestres et marins. Ils sont associés à une série d'effets défavorables sur la santé des organismes aquatiques du fait de leur activité mutagène et cancérigène [Tfouni & al, 2007 ; Baumard & al ,1998 ; Azdi et al, 2006 ; Casas, 2007 ; Jamp, 2002 ; Perraudin, 2004 ; Viegas & al, 2012 ; Mojtaba & al, 2010 ; Wenzl & al, 2006]. Les HAP sont des polluants difficilement dégradables et peuvent s'accumuler dans différents compartiments. On les trouve dans l'environnement suite à la combustion incomplète de matières organiques [Jamp, 2002 ; Viegas, 2012, Mojtaba et al, 2010 Wenzl, 2006 ; Efesa, 2008], en particulier lors des processus industriels ; incinération des ordures et combustion de combustibles fossiles. En raison de leur transport à longue distance, ils sont omniprésents dans l'environnement [Casas, 2007 ; Perraudin, 2004]. Ils sont principalement libérés dans l'atmosphère, adsorbés sur les particules en dépôts sur les organismes aquatiques et terrestres.

Les études des HAP sont devenues d'un intérêt majeur, depuis que le benzo [a] pyrène a été signalé cancérigène [Perraudin, 2005 ; Kennaway, 1955]. L'évaluation des HAP dans différents milieux et organismes a été étudiée par plusieurs auteurs [Le du-lacoste, 2008 ; Baumard, 1999-a ; Baumard, 1999-b ; Er-Raioui, 2009 ; Azdi & al, 2006].

La moule *Mytilus galloprovincialis* est le mollusque le plus recommandé dans les programmes de bio surveillance vu sa grande sensibilité à la pollution. Elle dispose de critères essentiels lui permettant d'être qualifiée d'espèce bio indicatrice par excellence [Petrovic et al, 2001 ; Viarengo et Canesi, 1991 ; Regoli et Orlando, 1993 ; Goldberg, 1975 ; Zaldıvar et al, 2011]. Elle possède la propriété d'accumuler les contaminants présents dans le milieu jusqu'à atteindre un équilibre avec lui [Talebal & Boutiba, 2007]. Son mode de vie sessile et sa grande capacité de filtration de l'eau de mer lui permet la résistance à des niveaux élevés de pollution. En relation avec sa répartition géographique, son intérêt écologique et économique, la moule a constitué la matrice biologique pour ce travail, aussi vu qu'elle est très consommées dans cette région (vecteur de contamination). Elle pose donc un risque potentiel pour la santé des personnes [Zaldıvar et al, 2011].

L'objectif de cette étude est de déterminer la distribution des HAP au niveau de la côte centre atlantique marocaine et particulièrement chez un bivalve *Mytillus galloprovincialis*.

MATERIEL ET METHODES

Plan d'échantillonnage :

Les sites choisis pour cette étude sont parmi les principaux points de récolte des moules au centre atlantique marocain. Les six sites sont répartis sur la côte du centre d'atlantique comme indiqué sur le Tableau.24 (p 56) et la Figure.6 (p 29).

Matériel et réactifs : voir partie B-9 (p 80)

Méthode de Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

L'ensemble des HAP analysés appartiennent aux substances définies dans les directives N° 835/2011, N°1881/2006 principalement étudiées et recherchées dans l'environnement car déclarées comme substances prioritaires par l'Environmental Protection Agency Américaine (US EPA) [Jamp, 2002 ; Gourlay, 2004 ; Perraudin, 2005 ; Pena & al, 2006]. La Figure.36 présente les six HAP dosés au cours de cette étude.

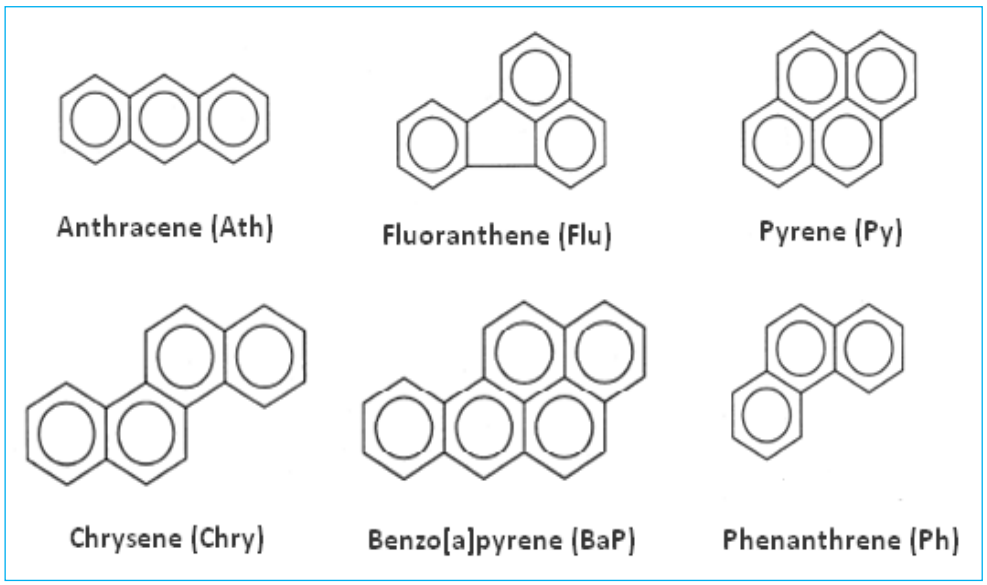


Fig.36 : Structure des molécules étudiées.

Le dosage des HAP nécessite au préalable une étape d'extraction, de purification suivie d'une quantification par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) [Mzoughi & al, 2002]. Pour chaque échantillon analysé deux répliques ont été préparées.

Contrôle Qualité

Le protocole d'extraction a été évalué sur la base des taux de récupération. L'utilisation des étalons internes a montré des rendements près de 80 % (Tableau.41). Ces résultats sont considérés satisfaisants pour la détermination des teneurs en µg Kg^{-1} [Horwitz, Kamp, et Boyer, 1980].

L'évaluation de cette méthode d'extraction a été validée par plusieurs auteurs [Budzinski et al. 1999 ; Letellier et al, 1999]. Les courbes d'étalonnage ont été déterminées en mesurant la réponse des composés cibles en fonction de leur concentration.

Le seuil de détermination varie d'un composé à l'autre, pour le benzo(a)pyrène, il est de 0,03 µg/kg (P.F) (Tableau.42).

En outre, la matrice de référence ‹‹BCR-458›› certifiée, a été choisie pour valider l'extraction et la mesure des HAP. Les résultats montrent un excellent accord avec le correspondant concentration certifiée (Figure.37).
Une solution d'étalonnage a été préparée pour différents HAP étudiés, et a été injectée avant chaque séquence d'analyse de 10 échantillons afin de Vérifier et surveiller les conditions du système de détection.

Tableau.41 : Temps de rétention approximatif et masse en mode ions sélectifs et étalons internes des HAP analysés.

Composé quantifié	Temps de rétention (min)	Masse enregistré (m/z)			Etalon interne	m/z
		ion sélectif	ions caractéristiques			
Anthracène	11,11	178	176	179	Phénanthrène-d10	188
Phénanthrène	11,01	178	176	179		
Fluoranthène	13,8	202	200	203	Pyrène-d10	212
Pyrène	14,31	202	200	203		
Chrysène	17,26	228	226	229	Chrysène-d12	240
Benzo(a)pyrène	20,18	252	250	253	Benzo(a)pyrène-d12	264

Tableau.42 : Rendement établie avec les solutions standards des HAP et échantillons de moule

Composé quantifié	limite de détection	Rendement (%)	
		standards	moule
Anthracène	0,05	80,7	90,3
phénanthrène	0,02	85,3	76,2
Fluoranthène	0,12	82,0	80,5
Pyrène	0,03	79,5	83,9
Chrysène	0,06	84,3	86,1
Benzo(a)pyrène	0,03	85,8	88,3

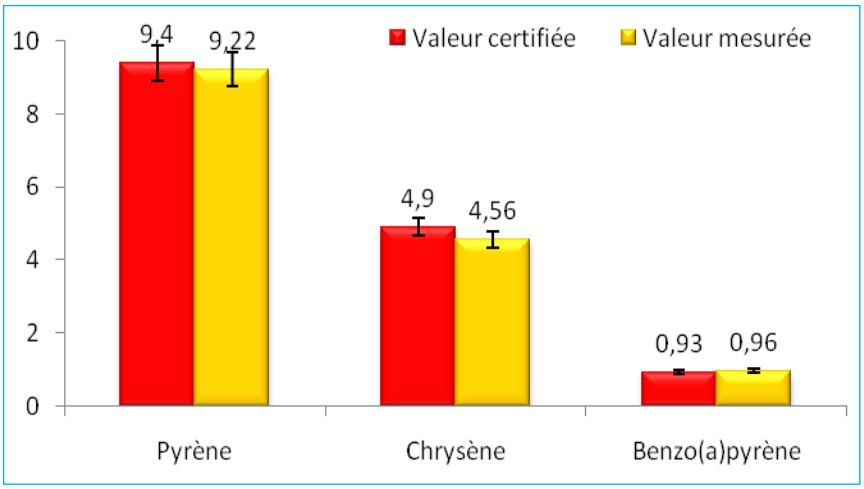


Figure.37 : Résultats obtenus de l'analyse du matériel de référence (BCR-458)

Traitement statistique :

Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel SPSS (version 17.0). Une analyse de variance (ANOVA) a été appliquée pour tester l'influence des saisons et une analyse des composantes principales (ACP) a été utilisée pour déterminer la répartition des contaminants et leur corrélation selon les sites de prélèvement. Les concentrations ont été exprimées en microgrammes de l'élément par Kg (µg/Kg) du produit frais.

11. Résultats et Discussion :

11.1. Origines des Molécules recherchées

Le choix des HAP à analyser n'est pas simple, tant en raison des différences qui se manifestent entre ceux qui résultent d'une combustion d'une part [Viegas & al, 2012], et ceux qui sont issus du pétrole et des produits pétroliers d'autre part [Jamp, 2002].

L'origine des HAP (petrogénique ou pyrolytique) a été déterminée en utilisant les deux rapports suivants : Phenanthrène/Anthracène (Ph/Ath) et Fluoranthène/Pyrène (Flu/Py) [Azdi et al, 2006 ; Budzinski et al, 1997]. Les HAP ont une origine petrogénique si Ph/Ath>>20 et Flu/Py <<1, ils sont en majeur partie d'origine pyrolytique ou mixte quand Ph/Ath= [1-10] et Flu/Py>1.

Les deux ratios du Flu/Pyr et/ou Ph/Ath calculés (Tabl.43) montrent une origine pyrolytique des HAP pour la plupart des sites étudiés. Les résultats indiquent aussi une origine petrogénique au niveau de Mensouria, ce qui est expliqué par la présence d'une raffinerie (la SAMIR), aussi l'influence du principal point du débarquement du pétrole (port de Mohammedia). Au niveau d'El Jadida, les études d'azdi et al [2006] sont en accord avec notre étude, révélant une origine petro génique des HAP, liée principalement au trafic manutentionné au port de Jorf Lasfar (connu comme un des plus important Parcs industriels Marocains). Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) peuvent avoir plusieurs origines, naturelles ou anthropiques. Ils sont principalement générés par la combustion incomplète de la matière organique (origine pyrolytique), ils sont ainsi formés lors des feux de forêts (naturels ou brûlage volontaire) et de la combustion des produits pétroliers, du charbon, du bois [Geffard, 2001 ; Andral et al, 2004 ; Perez et al, 2000]. Les HAP sont aussi présents dans le pétrole brut (origine pétrolière). Dans ce cas, ils sont diffusés dans l'environnement lors de fuites de pétrole lors du transport routier et fluvial. Ils sont prédominants dans le zones urbaines où se concentrent les usagés de produits pétroliers (automobiles, industrie, chauffage) [Gourlay, 2004].

En général, Les données montrent une mixture entre une origine pyrolytique et petrogénique dans l'environnement aquatique, ce qui est aussi prouvé par d'autres recherches [Azdi et al, 2006 ; Beliaeff et al, 2002]. Les niveaux de contamination chez *Mytillus galloproncialis* le long des sites étudiés du centre atlantiques (ΣHAP totaux = [10,22 - 21,13 µg kg^{-1}]) (Tableau.4) sont un peu semblables à ceux enregistrés le long de la mer baltique et qui sont entre 4 à 87 µg kg^{-1} [Baumard et al, 1999]. Pourtant, ils apparaissent très inférieurs aux concentrations totales déterminées chez *Perna Perna* (Maroc) et Mytillus gslloprovincialis (Italie) qui varient entre 5,79 et 222 µg kg^{-1} [Azdi & al, 2006 ; Piccardo & al, 2001]. Au niveau de la côte centre Atlantique, les résultats (Fig.5) enregistrent des teneurs faibles par rapport aux valeurs enregistrées par des études réalisées au niveau des côtes méditerranéennes, qui sont démontrées plus polluées que les côtes Atlantiques [Azdi & al, 2006 ; Piccardo & al, 2001]. Et cela vu l'hydrodynamisme et les flux limités avec d'autres mers et océans, de plus des activités industrielles et le trafic maritime intense qui les caractérisent [Azdi et al, 2006 ; Piccardo et al, 2001]. La différence des niveaux de

contamination est due aussi à la physiologie des moules, La concentration et l'accumulation des polluants chez les organismes aquatiques sont des processus assez complexes. Les degrés d'assimilation et de rétention des contaminants organiques varient entre les différents genres et espèces et dépendent des propriétés biochimiques de chaque élément [Eisler, 1981]. Pour certains contaminants, la croissance agit comme un facteur de dilution de la quantité de contaminant incorporée et l'amaigrissement comme un facteur de concentration [Casas & Bacher, 2006].

Tableau.43 : Valeurs des deux ratios pour la determination des origines des HAP chez Mytillus galloprovincialis de differentes côtes marocaines. Ph/Ath=(Phenanthrene)/(Anthracene), Flu/Pyr=(Fluoranthne)/(Pyrene).

Sites	Ratio Ph/Ath	Origine	Ratio Flu/Py	Origine	Σ HAP totaux	Source de contamination
Mehdia	1,81	pyrolytique	2,09	pyrolitique	14,516	**Pyrolitique**
Rabat	3,29	pyrolytique	2,02	pyrolitique	10,646	**Pyrolitique**
Bouznika	2,81	pyrolytique	1,68	pyrolitique	15,650	**Pyrolitique**
Mensouria	1,04	pyrolytique	0,81	petroginique	20,490	**Mixte**
Casablanca	1,78	pyrolytique	2,44	pyrolitique	21,134	**Pyrolitique**
El jadida	3,34	pyrolytique	0,97	petrogenique	14,598	**Mixte**
Oualidiya	2,75	pyrolytique	1,65	pyrolitique	10,222	**Pyrolitique**

11.2. Teneurs des HAP et seuils normatifs :

Les HAP sont parmi les familles de composés largement étudiées depuis plusieurs décennies, et ont fait l'objet de contrôles et de mesures de réduction. [Perraudin, 2004]. D'après la Figure.38, les valeurs obtenues dans divers sites sont inférieures aux valeurs limites recommandées par la réglementation européenne [CE N° 208/2005, N° 1881/2006 et N°835/2011].

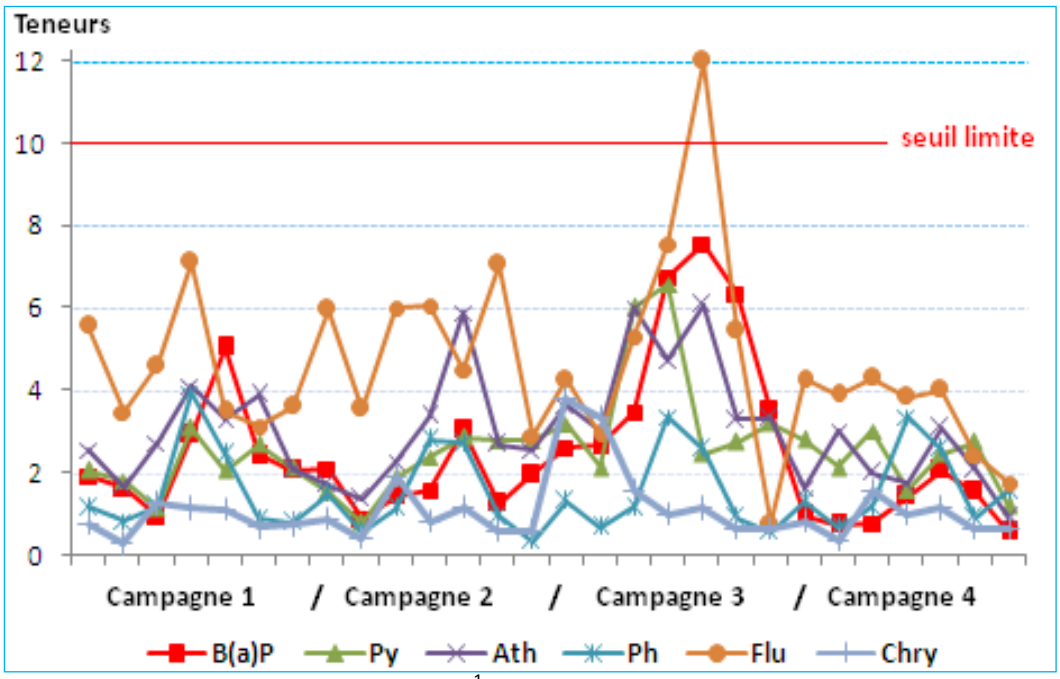


Figure.38 : Concentrations des HAP(µg kg^{-1} du poids frais) et limite normative chez les bivalves.

L'estimation des risques liés à l'exposition aux HAP est rendue difficile par le fait que les populations sont pratiquement toujours exposées à des mélanges souvent complexes et divers, ce qui les rend difficiles à caractériser. Afin de contourner cette difficulté, différentes approches s'appuyant sur un seul composé ; Benzo(a)pyrène, représentatif de l'ensemble des autres composés [Tarantini, 2009]. Le long de la période de cette étude, Les concentrations du benzo(a) pyrène trouvées ne dépassent pas 10 µg kg^{1}, qui est le seuil limite pour la consommation humaine (Figure.39). La surveillance de l'exposition des populations aux HAP est donc un enjeu considérable pour estimer les risques sanitaires [Tarantini, 2009]. Cette étude a permis de voir l'impact de ces polluants sur la santé humaine, surtout que les bivalves sont parmi les produits de pêche les plus consommés dans certaines zones.
Les bivalves sont principalement exposés à la fraction dissoute des contaminants organiques hydrophobes, ils peuvent filtrer et adsorber les plus petites particules. Ce qui explique pourquoi les concentrations des HAP dans les moules ne varient pas beaucoup comme dans les sédiments [Porte & Albaiges, 1993 ; Baumard & al, 1998 ; Landrum & Robbins, 1990 ; Casas, 2007]. Les HAP se fixent préférentiellement sur les particules et se concentrent plus dans les sédiments [Gourlay, 2004].

11.3. Evaluation spatiotemporelle

Des données acquises depuis plusieurs années ont donné une vue synoptique de la distribution spatiale de la contamination, de même qu'elles mettent en évidence des évolutions temporelles [Ifremer]. Dans cette étude, les valeurs moyennes obtenues pour le benzo(a)pyrène varient entre [0,87 - 3,03 µg kg^{-1}] en été et [2,60 - 7,53 µg kg^{-1}] en hiver. Aussi, pour le fluoranthène, elles sont de [2,87 – 7,03 µg kg^{-1}] en été et entre [0,746 – 11,98 µg kg^{-1}] en hiver. Ces résultats révèlent une variation qui dépend des périodes de prélèvement le long des cotes centre Atlantique Marocaines (Fig.39), ce constat est confirmé par les résultats significatifs au seuil de 5% du test d'ANOVA ($F = 2.372$ avec $P = 0.024$) pour le benzo(a)pyrène. Cette variation saisonnière est aussi prouvé par plusieurs autres études [Claisse, 1989 ; Claisse & al. 2001 ; Beliaeff & Bocquené, 2004]. Globalement, les HAP sont observés en plus forte concentration en hiver qu'en été [Bodin & al, 2004 ; Mzoughi & al, 2002 ; PPSHAP, 2004].

Au vu de la Figure.39, les sites les plus influencés par ce type de contaminants sont surtout Casablanca, Mensouria et Bouznika. Cette zone est connue par une forte contamination industrielle et pétrochimique, elle est aussi sujet de la contamination urbaine. Selon l'analyse des composantes principales (ACP), l'axe F1 sépare entre les sites les plus et les moins contaminés, il montre aussi la corrélation positive existante entre les HAP étudiés (Flu, Ath, Chry, B(a)P, Ph et Py) ($p<0,05$; $n=7$). Ceci montre que la présence de l'un des HAP implique la probabilité de la présence des autres (Fig.40). Les différences observées des teneurs des HAP au niveau des sites sur des échelles temporelles et spatiales sont influencées par une variété de facteurs environnementaux et biologiques. [Porte & Albaiges, 1993 ; Casas, 2007 ; Baumard & al, 1998]. Les niveaux mesurés sont la résultante de processus impliqués à différentes échelles: à l'échelle du contaminant (nature du contaminant, taille molécule, spéciation chimique, biodisponibilité, etc.), à l'échelle de l'organisme récepteur (propriétés membranaires, voies d'entrée, voies de sortie, cycle de vie, filtration, nutrition, etc.) mais aussi à l'échelle de l'environnement intra et extracellulaire (température, conditions trophiques, contamination du milieu, etc.) [Goldberg, 1975; Philips & al, 1977; Cossa & al, 1998; Regoli & Orlando 1993].

Les conséquences de cette pollution au niveau des sites étudiés peuvent être néfastes, surtout qu'il existe à proximité des points de déversement des activités de pêche et de ramassage de coquillages même si celles-ci restent limitées et périodiques. D'où l'intérêt de l'évaluation quotidienne du niveau de contamination pour certains éléments toxiques de la moule *Mytilus galloprovincialis* au niveau de ces zones touchées [Geffard, 2001 ; Azdi & al, 2006].

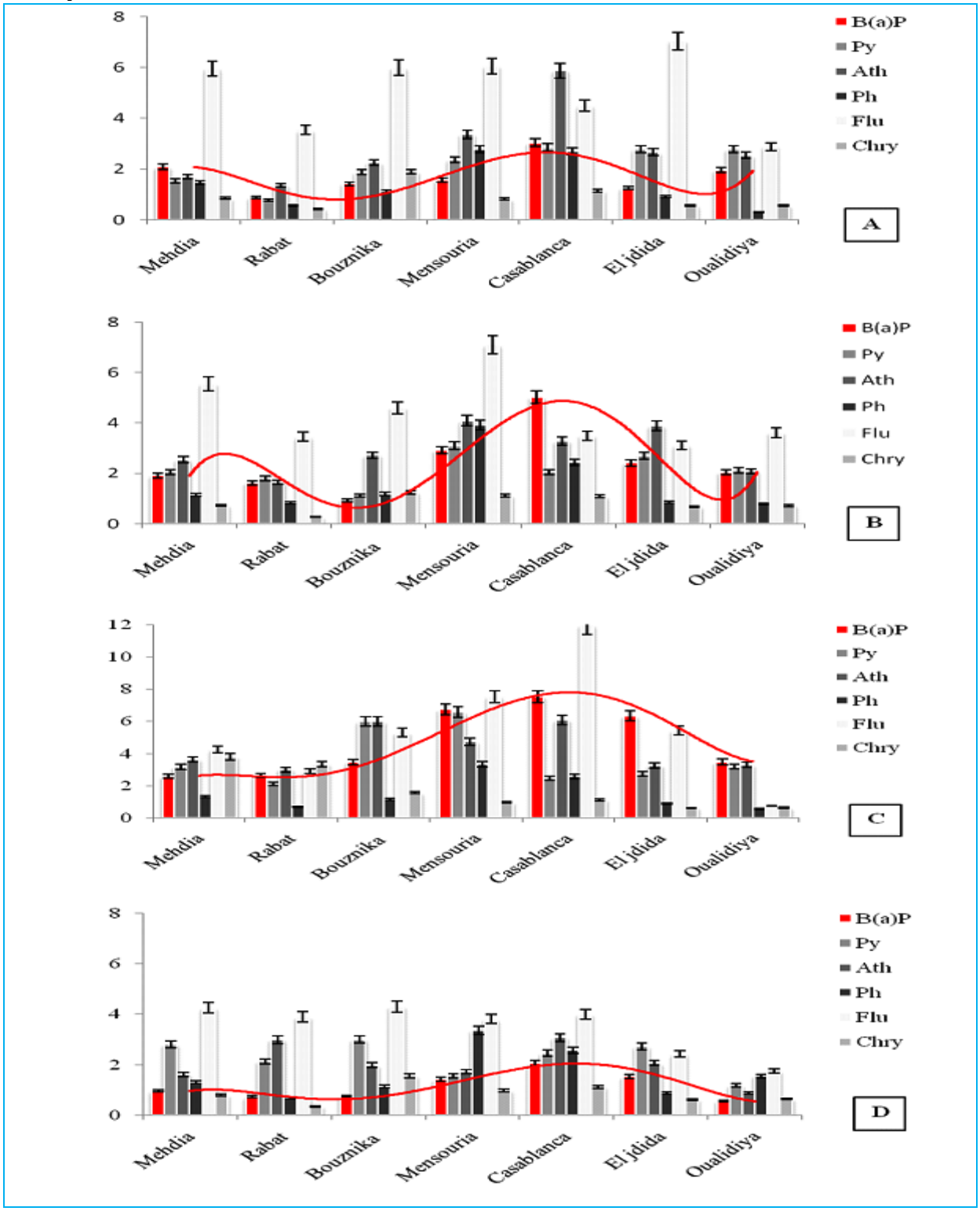


Figure.39: Variation saisonnière des teneurs des HAP chez *Mytillus Provincialis* au centre atlantique côtes Marocaines (µg/Kg du P.F). A : Eté ; B : Automne; C : Hiver, D : Printemps

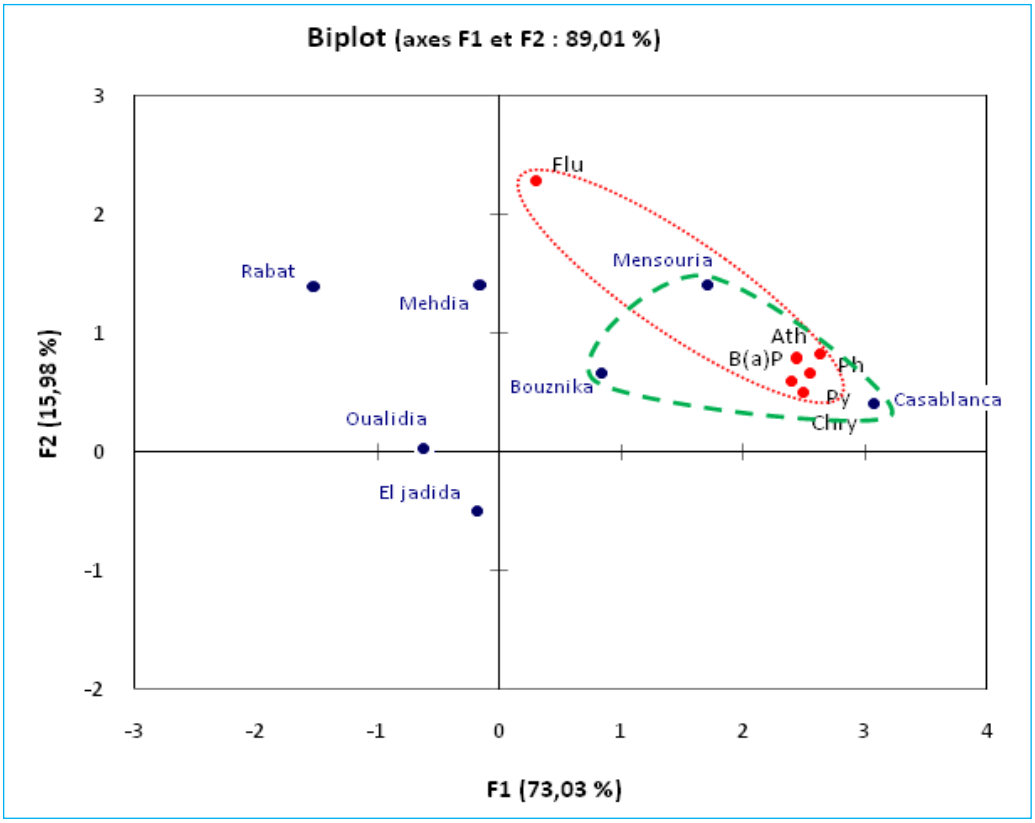


Figure.40: Plan ½ de l'analyse des composantes principale (ACP) réalisé pour les principaux sites des côtes marocaines au centre atlantique (n=7).

CONCLUSION :

Les bivalves se révèlent être des organismes indicateurs dans les programmes de surveillance environnementale pour identifier la variation entre les sites, les contaminants chimiques et de contribuer à la compréhension des tendances de la contamination du littoral [Fang et al, 2007 ; Goldberg et al, 1978 ; O ' Connor et al, 1996 ; Perez & al, 2000].

Au Maroc, l'étude de la contamination du milieu marin par les HAP et son effet sur les organismes reste moins traitée et abordée [Azdi et al, 2006]. Pourtant, les zones côtières sont des biotopes riches et où de nombreuses espèces animales se reproduisent et méritent donc à ce titre d'être protégées. Surtout, qu'aujourd'hui les perturbations environnementales ont des répercussions sur la santé publique [Geffard, 2001].

L'information fournie au cours de cette étude permet d'avoir une image instantanée du niveau de contamination du milieu. Afin de mieux documenter les résultats de cette étude et d'éviter les problèmes futurs, il faut s'intéresser davantage à des campagnes de surveillance. Car elles permettent d'approfondir la connaissance du degré d'exposition de ces organismes aux HAP, et de voir l'influence des périodes d'échantillonnage (liée à la période de reproduction), du sexe et/ou de l'âge des bivalves.

Aujourd'hui, la mise au point de matrices de références environnementales, et notamment biologiques [Chambers et al. 1996 ; Wise, 2002] permet de mieux approcher la représentativité des mesures faites, mais ces techniques ne sont pas encore utilisées en routine [Gourlay, 2004].

C. Dérivés des acides amines : Amines biogènes

Les eaux marines contiennent des matières minérales et organiques sous forme dissoute ou en suspension ainsi que des microorganismes et tout particulièrement des bactéries et virus d'origine fécale, dont certains sont utilisés comme indicateurs de contamination et du niveau de pollution.

1. Amine biogène : Définition et origine

Les amines biogènes sont des composés très répandus dans la nature, Le terme ‹‹amines biogènes›› englobe environ 20-30 composés d'origine biologique qui se forment dans les tissus chez l'homme, des animaux et des plantes mais qui peuvent aussi être contenus dans divers aliments protéagineux [ALP, 2009 ; Bach, 2011 ; Bonnin-Jusserand, 2011]. Certains de ces amines participent à des fonctions biologiques, représentent d'importants précurseurs de vitamines ou d'autres substances et provoquent en partie des réactions physiologiques [Duflos, 2009 ; Chaabouni, 2011].
Les amines biogènes sont une famille de molécules provenant du catabolisme des cellules vivantes. Dans le domaine alimentaire, les amines biogènes sont généralement d'origine microbienne [Santos, 1996 ; Bonnin-Jusserand, 2011 ; FAO/OMC, 2011]. Ces molécules sont considérées comme des traceurs de la dégradation des protéines, et traduisent la fraîcheur des aliments. Elles existent cependant à l'état naturel en quantités infimes dans certains produits comme l'épinard, la banane, la tomate ou l'orange [Chaabouni, 2011].
Les principales molécules rencontrées sont au nombre de 9 : les polyamines Putrescine, Cadavérine, Agmatine, Spermidine, et Spermine, les monoamines Tyramine et Phényléthyamine, et les amines hétérocycliques Histamine et Tryptamine.
Certains de ces composés sont produits en quantités considérables lors de processus fermentaires réalisés par des bactéries directement issues de la matière première et qui permettent la transformation qualitative de la texture et du goût [Santos, 1996 ; Bach, 2011 ; Bonnin Jusserand, 2011]. Les aliments fermentés et le poisson peuvent contenir de l'histamine et d'autres amines biogènes [FAO/OMC, 2011].

L'objectif du présent travail est d'étudier l'importance des amines biogènes dans le poisson et de sa présence dans certaines espèces de produits de mer.

2. Réaction et formation

Les amines biogènes sont des molécules qui proviennent de la décarboxylation (perte d'une molécule de CO2) d'un acide aminé par des enzymes bactériennes ou tissulaires, de l'amination de cétones ou d'aldéhydes, ou de l'hydrolyse de composés azotés par des enzymes endogènes ou exogènes [ALP, 2009 ; Duflos, 2009 ; Bonnin-Jusserand, 2011 ; FAO/OMC, 2011].
En raison de leur formation, la structure des amines biogènes est étroitement liée à celle des acides aminés. C'est pourquoi quelques amines portent le nom de leur acide aminé d'origine. Ainsi par ex., l'histamine provient de l'histidine et la tyramine de la tyrosine (Tableau.44). D'autres amines biogènes telles que la cadavérine et la putrescine peuvent être issues de la décomposition microbienne de tissu mort. Du point de vue chimique, il s'agit d'un groupe d'environ 20 liaisons azotées basiques [ALP, 2009].

Tableau.44 : Amines biogènes et acides aminés précurseurs [Ten brink ,1990].

Acides Aminés	Décarboxylases	Amines Biogènes
Hétérocycliques		Hétérocycliques
Histidine	Histidine décarboxylase	Histamine
Tryptophane	Tryptophane décarboxylase	Tryptamine/Sérotonine
Aromatiques		Aromatiques
Tyrosine	Tyrosine décarboxylase	Tyramine
Phénylalanine	Tyrosine décarboxylase ?	2-Phényléthylamine
Basiques		Aliphatique
Ornithine	Ornithine décarboxylase	Putrescine
Lysine	Lysine décarboxylase	Cadaverine
Arginine	Arginine décarboxylase	Agmatine

Les amines biogènes sont des produits naturels du métabolisme que l'on trouve dans presque tous les organismes vivants. Leur formation par l'organisme s'effectue de manière analogue à celle des acides aminés, principalement dans le foie. En outre, des amines se forment également dans des cellules nerveuses, dans la médullosurrénale, dans les cellules sanguines ainsi que dans d'autres tissus et organes ou sont absorbées directement au travers de la nourriture. La flore intestinale constitue une autre source car elle est capable de former des quantités considérables de cadavérine, de putrescine et d'agmatine.
La formation d'amines dépend des conditions du milieu [Bach, 2011]. La température idéale est comprise entre 26 et 37°C. Le pH optimal pour les bactéries est situé dans un milieu acide, légèrement acide à basique pour les tissus [Bonnin-Jusserand, 2011].
Les amines sont stockées en partie dans le corps et libérées à nouveau en cas de besoin. Ce processus a été le mieux analysé dans le cas de l'histamine stockée dans des cellules de l'immunité personnelle (mastocytes). Elle est également liée à des protéines muqueuses (mucines) dans le canal intestinal. La dégradation d'amines biogènes se fait au travers de l'oxydation en acides carboxyliques. La dégradation des amines biogènes absorbées, s'effectue d'habitude dans la muqueuse intestinale par les enzymes monoamine oxydase (MAO) et la diamine oxydase (DAO). Ce mécanisme protège le corps contre une absorption excessive d'histamine [ALP, 2009].
L'absorption d'amines biogènes dépend de différents facteurs tels que leur type et la composition des aliments (les aliments liquides agissent plus rapidement) mais également de la combinaison des aliments [Santos, 1996 ; Bonnin-Jusserand, 2011 ; FAO/OMC, 2011]. Ainsi, on pense que l'alcool augmente la vitesse de résorption des amines. Le corps dispose d'autre part de différents mécanismes pour diminuer l'absorption d'amines biogènes [Bach, 2011].
Les plus étudiées sont les amines aliphatiques (putrescine, cadavérine, spermine et spermidine) et les amines aromatiques (histamine, tryptamine, tyramine). On les retrouve dans les aliments riches en protéines [Duflos, 2009 ; Bonnin-Jusserand, 2011].

3. Toxicité et importance

Les amines biogènes sont des substances physiologiquement actives qui exercent une fonction importante dans le corps, mais qui peuvent aussi, à hautes doses, avoir des effets nuisibles pour la santé voire toxiques [Bach, 2011 ; Chabouni, 2011 ; FAO/OMC, 2011].

Toutes ces molécules sont toxiques à des degrés divers et sont la deuxième cause d'intoxications alimentaires en Europe [Bonnin-Jusserand, 2011], bien que ne provoquant que des affections généralement bénignes. Une de leurs caractéristiques biochimiques est leur relative stabilité à la chaleur et au froid.
Bien que diverses barrières limitent l'absorption d'amines biogènes administrées oralement, des aliments fortement contaminés peuvent engendrer des problèmes de santé [Duflos, 2009]. Ceci est en particulier le cas lorsque la régulation propre à l'organisme est perturbée par la prise de médicaments (inhibiteurs MAO et DAO) ou d'affections chroniques de l'intestin (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa). Dans la plupart des cas, les symptômes peuvent s'expliquer avec les effets de l'histamine et de la tyramine [Bach, 2011, Shalaby, 1996]. On connaît peu de choses au sujet des effets nocifs pour la santé d'autres amines biogènes (cadavérine et putrescine par ex.).
En général, les amines biogènes absorbées au travers de la nourriture n'engendrent pas de problèmes car ils sont dégradées dans les muqueuses de l'intestin grêle par des enzymes correspondants (monoamine oxidase, diamine oxidase) [Santos, 1996 ; Bauza et al, 1995 ; Halasz et al, 1994]. C'est pourquoi il faut s'attendre à avoir un impact négatif uniquement lors de situations particulières: un apport très élevé au travers d'aliments, une hypersensibilité individuelle ainsi qu'une prise de médicaments qui ralentissent la dégradation des amines [Duflos, 2009, FAO/OMC, 2011]. Dans les aliments, ce sont surtout les amines l'histamine et la tyramine qui sont indésirables car les deux peuvent provoquer d'importants problèmes de santé [Bonnin-Jusserand, 2011 ; Chabouni, 2011].
On a rapporté des cas d'hypertension provoqués par la tyramine dans le fromage et de fortes migraines d'origine tyramine et phényléthylamine. L'histamine provoque quant à elle des nausées, des vomissements et des diarrhées, en plus des réactions allergiques bien connues chez les sujets sensibles [Bach, 2011 ; Duflos, 2009].
Du point de vue de la toxicité alimentaire, ce sont surtout les intoxications à l'histamine et les crises d'hypertension provoquées par la tyramine qui sont significatives. Les fonctions des amines propres à l'organisme sont multiples (Tableau.45).
Les voies de biosynthèse des amines biogènes sont étudiées en raison des effets indésirables de ces molécules sur la santé [Bonnin-Jusserand, 2011].

Tableau.45 : Occurrence et importance des amines biogènes dans l'organisme [ALP, 2009].

Amine biogène	Origine	Occurence et importance
Agmatine	Arginine	Bactéries (flore intestinale), précurseur de la putrescine dans certains organismes
Aminocétone	2-amino acide acétoacétique	Précurseur des cobalamines (vitamine B12)
Cadavérine	Lysine	Ribosomes, bactéries, précurseur de l'alcaloïde
Cystéamine	Cystéine	Composant de la coenzyme A
Dopamine	DOPA	Neurotransmetteur, précurseur des catécholamines, de la noradrénaline et de l'adrénaline ainsi que de l'alcaloïde
Ethanolamine	Sérine	Phosphatide, précurseur d'hormones, neurotransmetteur
Histamine	Histidine	Hormone tissulaire
Phénéthylamine	Phénylalanine	Présence dans le cerveau
Putrescine	Ornithine	Ribosomes, bactéries, précurseur pour des polyamines
Sérotonine	5-hydroxytryptophane	Neurotransmetteur, précurseur de l'hormone mélatonine, du poison de crapeau, la bufoténine
Tryptamine	Tryptophane	Provoque une contraction de la musculature lisse, favorise la croissance chez les plantes
Tyramine	Tyrosine	Provoque une contraction de la musculature lisse
Noradrénaline	DOPA	Neurotransmetteur, catécholamine, provoque un rétrecissement des vaisseaux et une augmentation de la pression artérielle

4. Molécules étudiées

La putrescine, la cadavérine, la tyramine, sont parmi les agents de potentialisation de l'histamine [Bauzas et al, 1995]. Ces quatre molécules sont les principales amines biogènes présentes et très importantes à étudier lors des intoxications alimentaires par les amines biogènes.

4.1. Histamine

L'histamine est la diamine la plus connue.

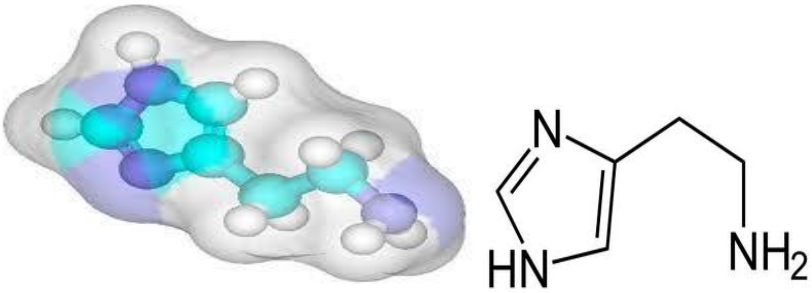


Figure.41 : Structure de la molécule d'histamine

Tableau.46 : Caractéristique physico-chimique d'histamine

Formule chimique	$C_5H_9N_3$
Masse molaire	111,145 $g.mol^{-1}$
T° de fusion	86 °C
T° d'ébullition	209,5 °C

L'histamine est un médiateur tissulaire propre à l'organisme et est connue en tant que substance messagère (neuro-médiateur) lors d'allergies [Duflos, 2009]. Elle revêt de nombreuses fonctions dans l'organisme humain dont la participation aux réactions de défense [Shalaby, 1996]. Chez environ 1 % de la population (surtout des femmes), la consommation d'aliments contenant de faibles quantités d'histamine provoque déjà des réactions pseudo-allergiques en raison d'une intolérance individuelle à l'histamine [Duflos, 2009 ; ALP, 2009, Chaabouni, 2011].

L'intoxication alimentaire par l'histamine entraîne des réactions de types allergiques comme des éruptions cutanés, rougeurs et oedèmes faciales, bouffées de chaleur, démangeaisons de la gorge, picotement de la peau. Ils peuvent être suivis d'étourdissements, de palpitations cardiaques et de céphalés. Les symptômes secondaires sont de types gastro-intestinaux [ALP, 2009 ; Chaaboun, 2011].

L'histamine peut être considérée toxique étant donné que, lors d'un apport très important, elle peut provoquer des états de choc et avoir ainsi un effet mortel. Le seuil de tolérance pour l'histamine est d'environ 100 mg/kg, les écarts pouvant être très importants selon les personnes. C'est pourquoi on différencie entre intolérance à l'histamine et intoxications graves à l'histamine par rapport aux problèmes de santé engendrés: Intolérance à l'histamine [Duflos, 2009, Shalaby, 1996].

Dans la plupart des cas, les symptômes apparaissent environ 45 minutes après l'ingestion d'aliments contaminés et ne disparaissent qu'après quelques heures [Duflos, 2009]. La valeur standard pour un taux d'histamine normal dans le sang est de 1 mg/ml. Des

concentrations plus importantes indiquent une absorption d'histamine accrue ou une dégradation d'histamine amoindrie.
Les bactéries impliquées dans la décarboxyaltion de l'histidine sont des entérobactéries, Clostridium perfringes et certains lactobacilles.

L'histamine provient de la décarboxylation bactérienne de la L-histidine [Duflos, 2009 ; Chaaboune, 2011], selon la réaction suivante :

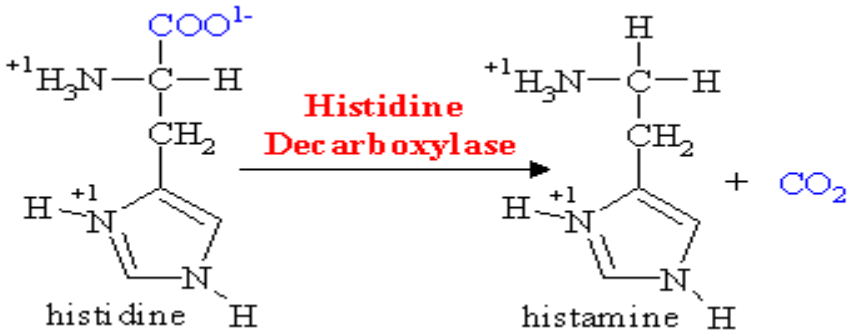


Figure.42: Formation d'histamine

4.2. Tyramine

La tyramine, une substance présente dans la plupart des aliments communs, qui peut être responsable de l'augmentation de la pression sanguine, et de maux de tête [ALP, 2009].

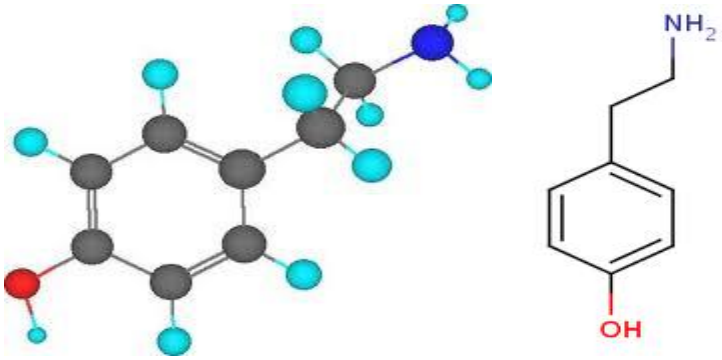


Figure.43 : structure de la molécule de la tyramine.

Tableau.47 : Caractéristique physico-chimique de la tyramine

Formule chimique	$C_8H_{11}NO$
Masse molaire	137,179 $g.mol^{-1}$
T° de fusion	164,5 °C
T° d'ébullition	325,2 °C

La tyramine est considérée comme le principal déclencheur des crises d'hypertension dues à l'alimentation. Le fait que de telles crises soient aussi qualifiées de « Cheese Effect » montre clairement qu'elles sont souvent déclenchées par une consommation de fromage. L'élévation de la tension artérielle est couplée à des maux de tête, des vertiges, des troubles de la vue, des nausées et plus rarement des diarrhées et des vomissements. Dans les cas extrêmes, une élévation massive de la pression artérielle peut provoquer des ruptures de

vaisseaux déjà endommagés et déboucher sur une hémorragie cérébrale mortelle. Les personnes en bonne santé supportent en général sans problème une dose de tyramine de 25-250 mg/kg. L'absorption de quantités plus élevées de tyramine est problématique en particulier lors de traitement simultané avec des médicaments inhibiteurs de la MAO, car, dans ce cas, la dégradation enzymatique dans la muqueuse intestinale est freinée et davantage de tyramine parvient dans la circulation sanguine. Lors de la prise de tels médicaments, il faut éviter de consommer des aliments à risque [ALP, 2009].
La consommation simultanée de boissons alcoolisées renforce les symptômes étant donné que l'alcool favorise vraisemblablement l'absorption de tyramine et retarde sa dégradation. Vu que les symptômes, en comparaison d'une intoxication à l'histamine, n'apparaissent qu'après 3 heures et durent souvent jusqu'à 24 heures, on n'établit pas forcément une relation avec l'ingestion d'aliments.

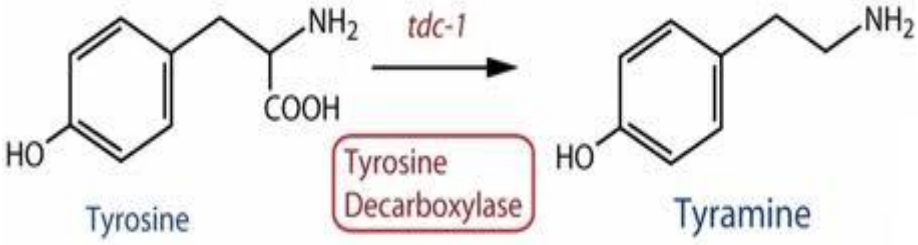


Figure.44 : Réaction de formation de tyramine

4.3. Putrescine

La Putrescine est une amine biogène produit par la dégradation des acides aminés dans les produits biologique, elle est toxique à fortes doses. Elle est l'amine biogène majeure du vin [Marcobal et al, 2005].

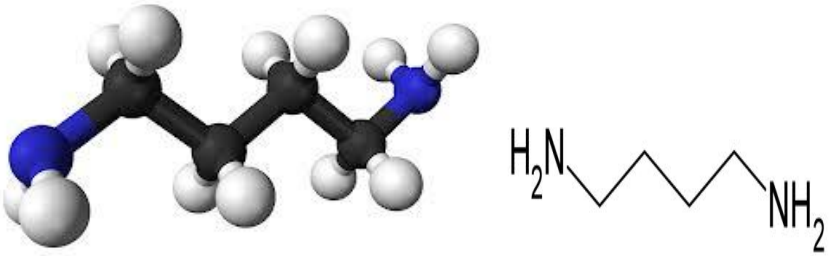


Figure.45: structure de la molécule de la putrescine

Tableau.48 : Caractéristique physico-chimique de la putrescine

Formule chimique	$C_5H_{12}N_2$
Masse molaire	88,151 $g.mol^{-1}$
T° de fusion	27°C
T° d'ébullition	158 à 160 °C

La putrescine fait partie des molécules appelées «polyamines» qui sont présentes dans tout le corps à la médiation des fonctions essentielles telles que la division cellulaire. Elle est l'une des plus simples facteurs de croissance nécessaire à la division cellulaire. Comme de

nombreuses diamines, elle est aussi utilisée dans des processus de polymérisation [Mangani et al, 2005].
C'est un composé largement responsable de la mauvaise odeur suite à la putréfaction bactérienne de la matière organique. Il est également présent dans certaines microalgues, avec des molécules apparentées comme la spermine et la spermidine .
La putrescine est biosynthétisé en petites quantités par les cellules vivantes en bonne santé à partir de l'ornithine par l'action de l'ornithine décarboxylase. Il existe au moins deux voies métaboliques conduisant à la formation de putrescine : la voie de l'ornithine décarboxylase (ODC) et la voie de l'agmatine déiminase (AgDI) [Arena et Manca de Nadra, 2001]. Dans ce dernier cas, il ne s'agit pas alors d'une décarboxylation, mais d'une déimination qui conduit à la production de putrescine. L'existence de ces deux voies s'explique par le fait que la putrescine peut être synthétisée à partir de deux précurseurs : l'ornithine ou/et l'agmatine.

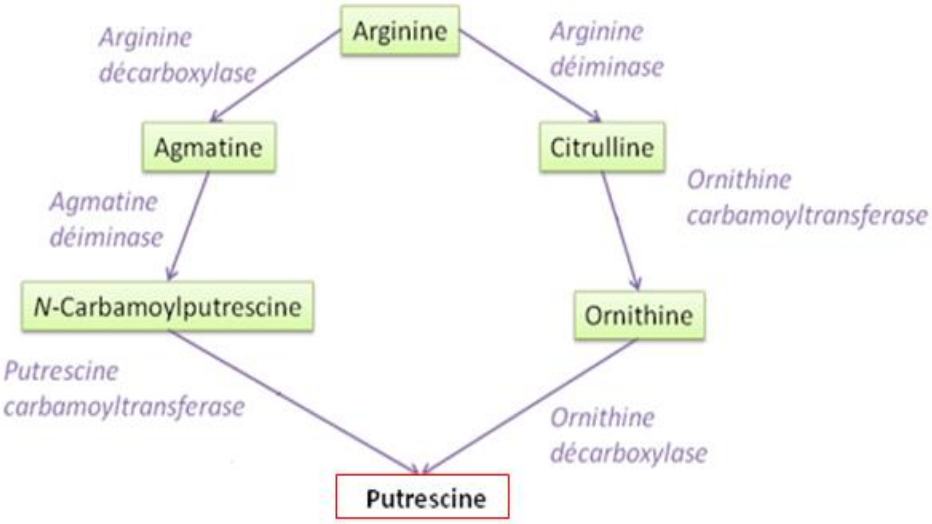


Fig.46 : les deux voies de Formation de la putrescine [Bonnin-Jusserand, 2011].

4.4. Cadaverine

La cadavérine, 1,5-diaminopentane ou encore pentaméthylènediamine est un composé organique appartenant à la famille des diamines. Structurellement proche de la putrescine, avec laquelle elle partage la toxicité et une odeur nauséabonde, elle est comme elle issue de l'hydrolyse de certaines protéines lors de la putréfaction de cadavres d'animaux, d'où elle tire son nom.

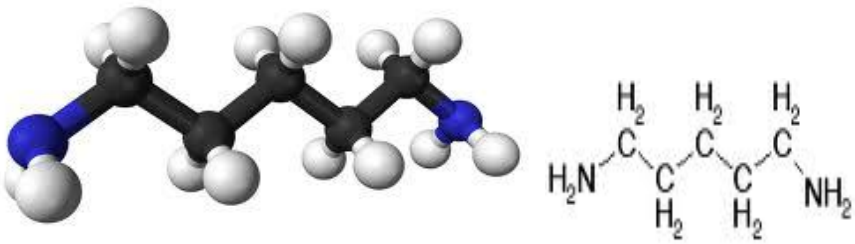


Figure.47 : structure de la molécule de la cadaverine

Tableau.49 : Caractéristique physico-chimique de la cadaverine

Formule chimique	$C_4H_{14}N_2$
Masse molaire	102,178 $g.mol^{-1}$
T° de fusion	14 °C
T° d'ébullition	178 à 180 °C

Ce sont les micro-organismes saprophytes qui sont les principaux responsables de sa production. Cependant, la cadavérine n'a pas strictement pour origine la putréfaction. Elle est aussi produite en petite quantité par les êtres vivants supérieurs. Elle est par ailleurs responsable d'une partie de l'odeur caractéristique de l'urine et du sperme
La cadavérine est le produit de la décarboxylation de la lysine par la lysine décarboxylase.

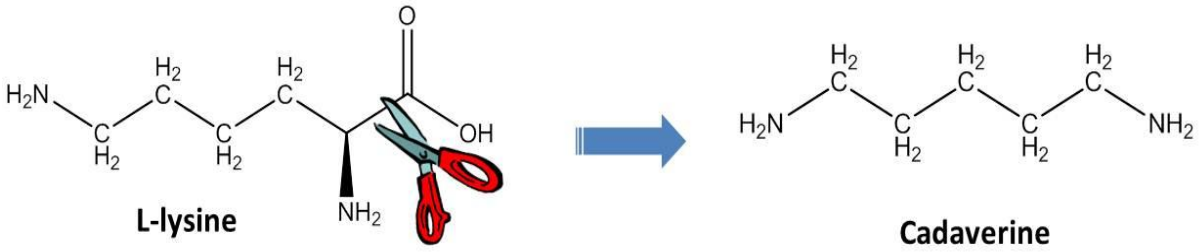


Figure.48 : Réaction de formation de la cadaverine.

Enfin, la cadavérine et la putrescine peuvent réagir avec les nitrites pour former des nitrosamines cancérigènes [Halasz et al, 1994].

5. Intoxication histaminique : [Boutin et al, 1998]

L'intoxication à l'histamine est une intoxication chimique liée à la consommation d'aliments contenant de grandes quantités d'histamine. Lorsque plusieurs cas surviennent à la suite de la consommation d'un même aliment, cette intoxication entre dans le cadre des Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) qui sont des maladies à déclaration obligatoire en France. L'aliment en cause est presque toujours un poisson. Les plus souvent incriminés appartiennent aux familles des Scombridae (thon, germon, bonite, maquereau) et des Scomberesocidae (balaou, scombérésoce) d'où le terme anglais très répandu de « Scombroid Fish Poisoning ». En fait, les espèces en cause sont nombreuses et variées débordant le cadre de ces deux seules familles. La littérature récente permet de recenser au moins 28 espèces appartenant à 11 familles. De plus, de véritables intoxications d'origine histaminique liées à la consommation de fromage, de types Emmental, Cheddar et Gouda, Il est préféré d'utiliser les termes d'Intoxication à l'Histamine ou Histaminique qui rendent mieux compte de l'étiologie et de la diversité des aliments en cause [Ahmed, 1991 ; Taylor,1989 ; Boutin et al, 1998].
L'intoxication histaminique se déclare quand plusieurs facteurs sont réunis :

- La production d'histamine sous l'effet de décarboxylase tissulaires et surtout bactériennes, et peut être aussi la libération d'histamine depuis les mastocytes ;
- La présence de composés inhibant le catabolisme histaminique (autres amines biogènes, médicaments) ;

- Ou encore des conditions physiques augmentant l'absorption intestinale de l'histamine (altération de la mucine) ;

Si ces paramètres ne sont pas réunis, une forte consommation ne s'accompagne pas des symptômes caractéristiques de l'intoxication

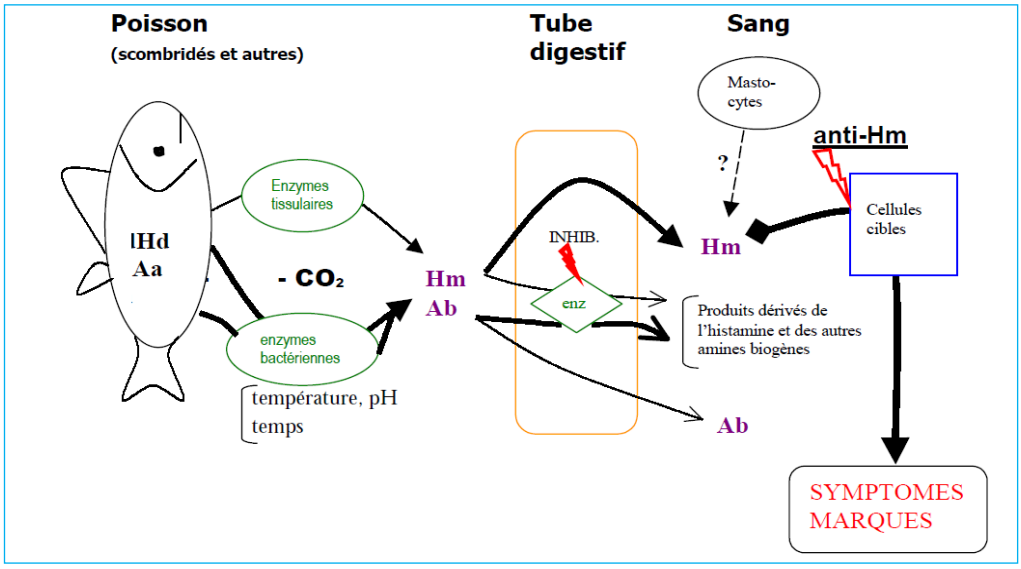


Fig.49 : Schéma pathogénique lors de l'ingestion de poisson altéré.

Hd :histidine ; Hm :histamine ; Aa :acides amines ; Ab: amines biogènes ; enz: enzyme du catabolisme de l'histamine (HMT, MAO, DAO) ; INHIB : Inhibiteurs des enzymes du catabolisme de l'histamine : Anti-Hm : anti-histaminiques.

6. RÉGLEMENTATION

Les règlements communautaires 2073 [2005], puis 11441 [2007] fixent les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche. Lors d'un plan de surveillance, neuf échantillons sont prélevés sur chaque lot :

- la teneur moyenne ne doit pas dépasser 100 mg.kg-1
- deux échantillons peuvent dépasser 100 mg.kg-1 sans atteindre 200 mg.kg-1
- aucun échantillon ne doit dépasser 200 mg.kg-1.

Selon AFSSA :

- Des teneurs <50mg d'histamine /Kg sont sans effet toxique
- De 5o a 100 mg d'histamine /kg, on observe quelques intoxications légères
- De 100 a 1000 mg d'histamine /Kg , le produit est toxique.

Ces limites s'appliquent seulement aux poissons des familles suivantes :

- *Scombridés* : (maquereaux, auxides, thonites, thons, thazards, palomettes, bonites),
- *Clupeidés* : (harengs, menhadens, ethmaloses, harengules, chardins, sardines, sardinelles, sardinops, sprats, shadines),
- *Engraulidés* : (anchois),
- *Coryphaenidés* : (coryphènes).

Toutefois, les poissons de ces familles, qui ont subi un traitement de maturation enzymatique dans la saumure, peuvent avoir des teneurs en histamine plus élevées mais ne dépassant pas le double des valeurs indiquées ci-dessus [Duflos, 2009].

7. Les facteurs influençant la production d'amines biogènes et maitrise du risque

Le premier maillon de la chaîne est la pêche. Les bateaux ont pour but de collecter de grosses quantités de poisson. Les poissons sont souvent malmenés et abîmés. Le découpage est aussi une étape importante au cours de laquelle les règles d'hygiène doivent être rigoureuses. La maîtrise de ces étapes est cruciale pour éviter toute contamination bactérienne entraînant une augmentation de la quantité d'histamine. Des travaux de recherches s'engagent actuellement dans la limitation de l'activité de l'enzyme, l'histidine décarboxylase, pour éviter la production d'histamine [Duflos, 2009].
Les conditions environnementales (pH, T°C, etc…) permettant aussi la croissance optimale des bactéries et la production de l'activité enzymatique [Mazzoli et al, 2008 ; Codex alimentarius, 2009], ainsi que la disponibilité en protéines et acides aminés libres (Landete *et al*, 2006) sont les facteurs essentiels à la production d'amines biogènes. En général, de nombreux facteurs influencent la synthèse d'amines biogènes. [Konings *et al*, 1997 ; Bonnin-Jusserand, 2011, Codex alimentarius, 2009].
En bref, Les plus importants des facteurs étant la température de l'eau, la teneur en sel, la proximité des zones de récolte des habitations, la quantité et l'origine des aliments consommés par le poisson, et la méthode de récolte [Codex alimentarius, 2009].

8. Bactéries et formation d'amines biogènes

Le muscle du poisson vivant est stérile. Cependant, la peau, le mucus, les branchies et tout le tractus gastro-intestinal contiennent une flore bactérienne importante, dont la composition et la quantité varient en fonction de l'espèce considérée, de l'alimentation, de la température de l'eau, la salinité, la teneur en oxygène dissout, le degré de pollution …
A la mort du poisson et au cours des opérations d'éviscération, étêtage, filetage et parage, les micro-organismes peuvent contaminer la chair et se retrouvent souvent tout au long de la chaîne de fabrication et jusque dans le produit fini [Leroi, 2009].
Il y a deux grands groupes de bactéries dangereuses pour la santé publique qui peuvent contaminer les produits au moment de la capture – celles qui sont normalement ou accidentellement présentes dans le milieu aquatique, c'est-à-dire la microflore latente, et celles introduites par la contamination de l'environnement par des déchets domestiques et/ou industriels [codex alimentrius, 2009].

Les bactéries majoritaires des poissons marins sont généralement des bacilles psychrophiles à Gram négatif, appartenant aux genres *Pseudomonas, Shewanella, Acinetobacter, Aeromonas, Vibrio, Moraxella, Flavobacterium*… mais des bactéries à Gram positif comme *Micrococcus, Corynebacterium*, *Bacillus* ou *Clostridium,* peuvent également être présentes dans des proportions variables [Shewan, 1971 ; Hobbs, 1983 ; Gram et Huss, 1996]. Chez les poissons tropicaux, la flore a globalement la même composition, mais avec a prédominance est les bactéries à Gram positif et d'entérobacteries [Liston, 1980 ; Leroi, 2009].

La famille des *Enterobacteriaceae*, constitue la famille la plus représentée parmi les flores histaminogènes. Elle est composée de bacilles Gram-, mesurant de 0,3 à 1 µm de largueur sur 1 à 6 µm de longueur. Ces bacilles peuvent être mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles. Ils sont aero-anaérobies facultatifs et poussent sur les milieux ordinaires. Elles fermentent le glucose avec ou sans production de gaz, réduit les nitrates en nitrites. Elles ne sont pas halophiles et sont oxydase -.

La plupart des bactéries produisant beaucoup d'histamine et autres amines biogènes sont des mésophiles, c'est-à-dire qu'elles croissent à des températures modérées (10 à 40 °C environ). Cependant de récente recherche ont permis de mettre en évidence l'existence de bactéries psychrotolérantes vivant à des températures proches de 0 °C et productrices de grandes quantités d'histamine [Emborg et al, 2006].
Les bactéries productrices d'histamine sont détectables quelque soit la température de conservation de poisson. Puisqu'il existe des espèces mésophiles et autres psychrophiles. De plus, bien souvent ces bactéries peuvent produire d'autres amines biogènes qui potentialisent l'action de l'histamine chez l'homme après ingestion du poisson altéré.
Il existe des bactéries qui sont utilisées pour la dégradation des amines biogènes. A titre d'exemple, *Staphylococcus xylosus qui* a la capacité de dégrader l'histamine et la tyramine dans des anchois fermentés [Mah et Hwang, 2010] et *Lactobacillus sakei* réduit l'accumulation d'amines biogènes dans la charcuterie à condition que les mesures d'hygiène soient respectées.les bactéries lactiques et également *Brevibacterium linens* et *Micrococcus* sp. sont de bons candidats. De plus, *Micrococcus varians* présente une activité tyramine oxydase. Lors de la fermentation d'une sauce de poissons, des bactéries ayant une activité amine oxydase ont été utilisées.
La sélection de nouveaux microorganismes est d'actualité pour la bioconservation des aliments et l'augmentation des qualités organoleptiques. Ainsi, une archée halophile, *Haloarcula marismortui*, dénuée d'activité protéolytique, a été utilisée pour diminuer le taux d'histamine dans la production d'anchois [Aponte et al, 2010].

Tableau.50 : Récapitulatif de Microflore produisant de l'histamine.

	Entérobactéries	Autres bactéries
Bactéries fortes productrices	*Proteus morganii* *Klebsiella pneumoniae* *Klebsielle oxytoca* *Enterobacter aerogenes*	*Clostriduim perfringens* *Staphylococcus sp.*
Bactéries faibles productrices	*Hafnia alvei* *Citrobacter frendii* *Serratia spp* *Plesiomonas shigelloides* *Escherchia coli*	*Vibrio spp* *Photobacterium phosphoreum* *Pseudomonas spp* *Lactobacillus sp* *Bacillus sp*
Bactéries potentiellement productrices	*Proteus mirabilis*	*Streptococcus faecalis* *Acinobacter lwoffi* *Aeromons sp*

C. Dérivés des acides amines : Amines biogènes

De nombreuses méthodes ont été publiées dans la littérature scientifique et sont utilisées pour le dosage des amines biogènes. La séparation et la quantification d'histamine et d'autres amines biogènes peuvent être réalisées par la chromatographie sur couche mince (CCM), la spectrofluorimètrie [Lerke et Bell, 1976] et les méthodes Immuno-enzymatiques (ELISA), etc...(Tableau.53)
Au cours de ce travail, on a eu recours à une méthode de référence pour la recherche de l'histamine et qui est la Chromatographie Liquide à Haute Performance [Duflos et al, 1999]. Cette méthode originale est basée sur une extraction acide de l'échantillon, suivie d'une séparation par HPLC. En raison de la structure des molécules, la détection se fait par l'intermédiaire de dérivés marqués préparés automatiquement en sortie de colonne de chromatographie [Codex œnologique international, 2010].

9. Matériel et Méthodes

9.1. Échantillons

L'étude porte sur deux espèces de poissons : le maquereau (*Scomber japonicus*) appartenant à la famille des *Scombridae* et la sardine (*Sardina pilchardus*) appartenant à la famille des *Clupeidae*. Une quantité suffisante de poisson est étêtée, éviscérée et filetée. Après broyage et homogénéisation une pâte est constituée et subdivisée en portions d'environ 50 g. Les portions obtenues sont exposées à 25°C afin de favoriser leur décomposition durant 32 heures. A intervalle de temps régulier des examens microbiologiques et le dosage d'amines biogènes sont réalisés simultanément.

9.2. Réactifs

- Eau peptonée tamponnée : Buffered peptone water, Biolife, Italie;
- Peptone sel : Maximum recovery diluents, Biolife, Italie;
- Gélose de dénombrement : Tryptic glucose yeast Agar, Biolife, Italie;
- Gélose sélective pour coliformes : Violet Red Bile Lactose Agar, Biolife, Italie;
- Histamine dihydrochloride, Fluka, France ;
- Putrescine dihydrochloride, MP Biomedicals, USA ;
- Cadavérine dihydrochloride, Sigma Aldrich, Switzerland;
- Tyramine, Sigma chemical, USA ;
- Acétone, qualité HPLC, Sharlau, Spain ;
- Acétonitrile qualité HPLC, Sharlau; Spain ;
- Toluène qualité HPLC, Merck, Germany ;
- Acide perchlorique à 70 % p.a Merck; Germany ;
- 1,3 diaminopropane, Sigma Aldrich, Switzerland
- Carbonate de sodium pour analyse; Sharlau; Spain
- Chlorure de Dansyl ; Sigma Aldrich, Switzerland
- L-Proline. Sigma Aldrich, Switzerland

9.3. Matériel

- Centrifugeuse réfrigérée; Hermle, Germany
- Bain marie, Balance, Broyeur, vortex, rotavapeur;

- Evaporateur sous flux d'azote; Eyela, Japan ;
- Chaîne HPLC Shimadzu Prominence LC-20A. Japan ;
- Injecteur automatique Shimadzu SIL 20 AC réfrigéré à 4°C ; Japan ;
- Détecteur à barrettes diodes Shimadzu SPD M 20 A, Japan.

9.4. Méthodes utilisées

9.4.1. Examens microbiologiques

La préparation des échantillons, l'ensemencement des dilutions décimales et les calculs des unités formant colonies sont réalisés selon la norme NM 08.0.101[2008]. Les suspensions mères et les dilutions décimales sont préparées suivant les normes NM 08.0.100 [2001] et NM 08.0.118 [2007]. La détermination des charges bactériennes est effectuée, respectivement, pour la Flore Mésophile Aérobie Totale, la Flore Psychrotrophe Aérobie Totale, les Coliformes Totaux et les Coliformes Fécaux suivant les normes NM 08.0.102 [2007], NM 08.0.157. [2007], NM 08.0.109 [2009] et NM 08.0.124 [2009]. Les milieux de cultures et les paramètres d'incubation sont reportés dans le Tableau.51.

Tableau.51: Microorganismes et conditions de croissance.

Flore étudiée	Milieux de culture	Paramètres d'incubation
Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)	Tryptic glucose yeast Agar, Biolife, Italie	30°C, 24 à 48 heures
Flore Psychrotrophe Aérobie Totale (FPAT)	Tryptic glucose yeast Agar, Biolife, Italie	20°C, 24 à 48 heures
Coliformes Totaux (CT)	Violet Red Bile Lactose Agar, Biolife, Italie	30°C, 24 à 48 heures
Coliformes Fécaux (CF)	Violet Red Bile Lactose Agar, Biolife, Italie	44°C, 24 à 48 heures

La composition des milieux de culture est choisie pour permettre une croissance optimale des bactéries étudiées.

9.4.2. Dosage des amines biogènes

Principe

La méthode HPLC de Duflos et al. [1999] a été utilisée pour la détermination du taux des amines biogènes étudiées : histamine, putrescine, cadavérine et tyramine. Cette méthode permet de séparer et de quantifier les amines biogènes présentes dans les matrices biologiques. L'extraction des amines se fait après une étape de déprotéinisation par l'acide perchlorique 0,2M, elles sont marquées avec le chlorure de dansyl. Après marquage, la proline est ajoutée pour neutraliser l'excès de chlorure de dansyl. Les amines sont séparées sur une colonne C_{18} utilisant un gradient d'élution eau/acétonitrile. La durée de séparation chromatographique est de 30 minutes. L'analyse du chromatogramme permet d'identifier les différents pics et leurs surfaces correspondantes par une mesure à 254 nm.

Quantification des amines biogènes par HPLC (Fig.51)**:**

Dans la littérature et selon le règlement CE 2073 [2005], l'HPLC se révèle être une méthode fiable de choix pour l'identification et la quantification, due à la nature hydrophobe des amines biogènes [Busto et al, 1997 ; Pereira et al, 2008 ; Anli et al, 2004 ; Dugo et al, 2006].

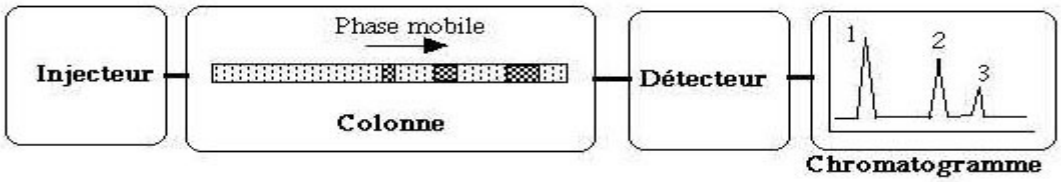


Figure.50 : Les différents composants d'une chaine HPLC de type SHIMADZU.

Conditions chromatographiques :

- Colonne Wacosil C18 RS 5µm, 100 Å (25 cm X 4.6 mm)
- Phase Mobile (A : Eau / B : Acétonitrile). Suivant un gradient développé par Duflos et al (Tableau) et obtenu par 2 pompes Shimadzu LC-20 AD.

Tableau.52 : Gradient d'élution [Duflos et al. 1999].

Temps (min)	Eau	Acétonitrile
0	40%	60%
6	25%	70%
8	25%	75%
13	5%	95%
20	5%	95%
20.01	40%	60%
30	40%	60%

Ce gradient permet de séparer les amines biogènes avec un débit de 1ml/min. L'identification des pics s'effectue à l'aide du chromatogramme de référence de Duflos et al, [1999]. Une vérification du temps de rétention est effectuée à l'aide de la gamme d'étalonnage (voir Article).

9.4.3. Schéma analytique du protocole

Les échantillons ont été préparés à partir de la chair des poissons (Maquereaux, sardine). Le protocole expérimental est résumé sur la Figure.51.

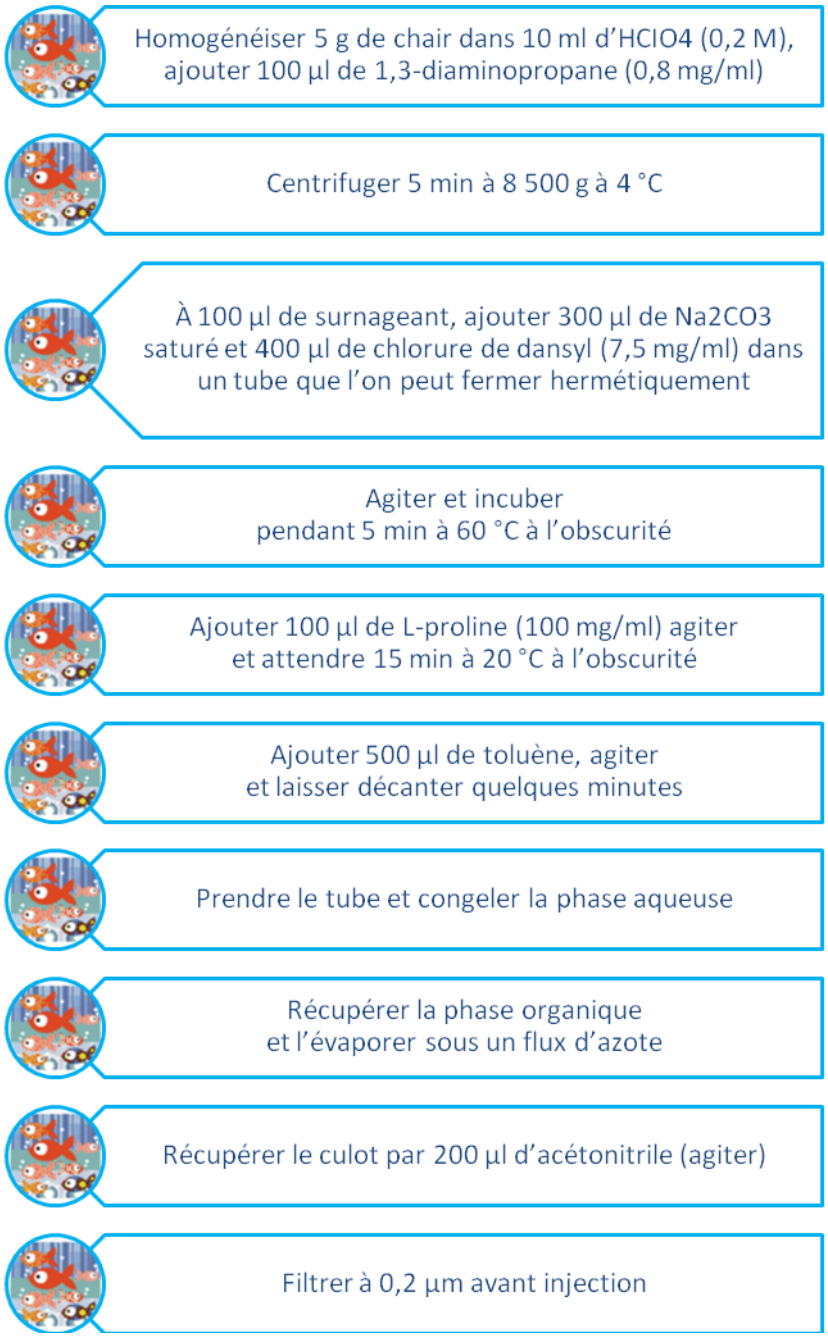


Figure.51 : Protocole de dosage des amines biogènes par HPLC.

10. Validation de la méthode du dosage de l'histamine :

Depuis toujours, la chromatographie en phase liquide à haute pression est une méthode fiable pour la détermination des taux d'histamines et amines biogènes dans les produits de pêche [Hui et Taylor, 1983 ; Mietz et Karmas, 1978].

C. Dérivés des acides amines : Amines biogènes

La détermination de l'état de fraîcheur du poisson est importante pour évaluer sa qualité hygiénique [Connell, 1975]. Des tests organoleptiques, microbiologiques et chimiques ont été développés pour estimer la qualité du poisson depuis sa capture, sa manutention jusqu'à sa consommation [Koutsoumanis et al, 2002].
Le contrôle chimique de la salubrité des produits de la pêche repose essentiellement sur le dosage des composés azotés tels que l'ABVT (Azote Basique Volatile Total) dans les produits frais et congelés [CE/2074/2005] et celui de l'histamine dans les produits transformés [CE/2073/2005]. L'histamine fait partie des amines biogènes qui sont produites par la décarboxylation d'acides aminés suite à l'action d'enzymes d'origine bactérienne. Malgré la bonne corrélation entre la teneur en amines biogènes et l'altération sensorielle [Rachidi et al, 1995] seules les concentrations en histamine dans les produits de la pêche sont réglementées pour des raisons de sécurité sanitaire [CE/2073/2005].
Cette étude tient compte de la :

- Variabilité des amines biogènes selon 4 espèces de poisson (Pageot, Bonite, maquereux et sardine) ;
- Formation de ces 4 amines biogènes en fonction de la croissance de la flore bactérienne (FMAT, CT, MT et CF) chez deux espèces de poisson (maquereaux et sardine).

L'objectif de cette étude est de suivre simultanément dans le temps l'évolution de la concentration de quatre amines biogènes : l'histamine, la putrescine, la cadavérine et la tyramine ainsi que quatre groupes de flores bactériennes : la flore mésophile aérobie totale (FMAT), la flore psychrotrophe aérobie totale (FPAT), les coliformes totaux (CT) et les coliformes fécaux (CF) dans la chair des espèces de poissons les plus susceptibles à l'altération, incubée à 25°C.

11. Evolution des teneurs en amines biogènes en fonction du temps dans la chair du poisson

Les amines biogènes sont des composés non-volatils qui sont présents à de faibles concentrations dans le poisson frais mais qui s'accumulent rapidement dans la chair après altération du poisson par les flores bactériennes de contamination [Fernandez - Salguero et Mackie, 1987]. Ainsi, l'histamine et d'autres amines biogènes (putrescine, cadaverine, tyramine) ont été proposées comme marqueurs pour évaluer l'état de fraîcheur du poisson [Mietz et Karmas, 1977; Yamanaka et al, 1987; Veciana-Nogues et al, 1997].
Les concentrations en amines biogènes (histamine, putrescine, cadavérine et tyramine) durant le temps d'incubation, chez le maquereau, la bonite, le pageot et la sardine, sont présentées dans le Tableau.53.

Tableau.53 : Evolution des teneurs en amines biogènes chez le poisson durant le temps d'incubation.

	Histamine		Putrescine		Cadaverine		Tyramine	
Sardine								
Temps en (hr)	Moy	Ecart type	Moy	Ecart type	Moy	Ecart type	Moy	Ecart type
0								
4	2,0	0,3	1,0	0,2	2,0	0,3	0,5	0,1
8	2,7	0,3	1,7	0,4	2,7	0,6	0,8	0,2
12	3,8	0,3	2,9	0,4	4,1	0,4	4,0	0,7
20	243,7	41,7	14,5	0,4	6,8	1,0	72,5	3,2
24	701,3	64,1	44,0	2,5	23,9	1,9	111,9	8,3
28	2254,6	222,3	126,5	17,5	61,9	0,9	208,4	8,5
32	1940,8	193,6	111,8	9,3	74,4	2,1	171,4	20,1
Bonite								
Temps en (hr)	Moy	Ecart type	Moy	Ecart type	Moy	Ecart type	Moy	Ecart type
0								
4	1,4	0,2	2,3	0,5	0,8	0,2	1,9	0,4
8	2,4	0,1	2,3	0,7	2,3	0,5	2,7	0,9
12	4,1	0,5	3,5	0,7	3,1	0,9	4,5	0,7
20	222,5	33,7	19,7	0,7	15,1	2,6	58,3	4,2
24	868,4	84,2	53,2	1,9	40,9	4,8	123,6	10,7
28	2000,9	116,5	155,7	20,5	141,6	3,9	162,9	15,8
32	1697,5	88,6	120,4	11,3	108,4	3,0	86,5	13,4
Pageot								
Temps en (hr)	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
0								
4	1,6	0,1	1,3	0,2	0,8	0,1	1,9	0,6
8	2,6	0,1	1,3	0,2	2,3	0,2	2,7	0,5
12	5,3	0,3	2,5	0,6	3,1	0,3	4,5	0,8
20	189,625	24,0	14,5	0,4	9,2	0,8	37,9	5,8
24	577,34	48,7	44,2	2,5	61,0	1,4	82,6	8,3
28	1009,2	233,0	101,7	17,5	133,4	1,4	114,2	13,4
32	903,7	69,2	121,4	9,3	89,6	3,5	107,3	16,3
Maquereaux								
Temps en (hr)	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
0								
4	3,1	0,5	1,4	0,4	1	0,2	1,1	0,4
8	9,1	1	2,5	0,7	3	0,9	2,9	1,1
12	91	16,4	19,7	2,9	22,6	9,4	11,9	2,8
20	337,9	31	71,3	7,6	47,3	13,4	70,8	11,8
24	1028,3	163,6	111,5	14	67,4	9,8	130,8	15,9
28	2065,3	271,3	126,7	9,1	72	4	210	16,8
32	2228,2	169,1	123,6	13,7	71	2,5	199,3	27,1

En générale les concentrations en histamine, rencontrées chez le maquereau, sont plus élevées que chez les autres espèces. Par rapport aux concentrations de l'histamine, le seuil de rejet [CE/2073/2005] est presque atteint au bout de 12 heures chez le maquereau alors qu'il n'est largement dépassé qu'au bout de 20 heures d'incubation chez la sardine, le pageot et la bonite. Dans les quatre matrices étudiées, teneurs en histamine formée au bout de 32 heures sont 20 à 30 fois plus importantes que les teneurs des autres amines biogènes. Les quantités de putrescine, cadavérine et tyramine formées après 32 heures sont équivalentes dans les matrices étudiées (maquereau, sardine, pageot et bonite). Cependant, les taux de putrescine et tyramine sont plus importants que ceux de la cadavérine.

Par ordre de valeur croissante des taux des amines biogènes. Les résultats montrent que l'espèce la plus vulnérable et susceptible d'être facilement altérée est le maquereau suivis de la sardine, bonite et finalement le pageot (Fig.52).

Figure.52 : Formation des amines biogènes selon les espèces étudiées.

Les résultats obtenus des teneurs moyennes d'histamine déterminent pourquoi la plupart des études, concernant les amines biogènes, sont portées uniquement sur l'histamine qui est responsable de nombreuses épisodes d'intoxication surtout après consommation de poissons de la famille *Scombridés* et *Scomberesocideae* qui sont impliqués communément dans les incidents dus à l'histamin [Taylor, 1986].

12.Cinétique de formation des amines biogènes dans la chair de sardine et de maquereau suivant l'évolution de la flore bactérienne

Le poisson est une denrée très périssable, après capture, il présente une microflore de contamination qui l'altère rapidement. On y a isolé de nombreuses espèces bactériennes telles que des bactéries aérobies gram négatives comme *Pseudomonas sp.* et *Shewanella sp*. [Gram et Huss, 2000]. Les poissons de certaines familles contiennent de hauts niveaux d'histidine libre dans leurs muscles et l'histamine est produite par décarboxylation de l'histidine sous l'action d'enzyme d'origine bactérienne. Parmi ces poissons on peut citer le maquereau, le thon et la bonite. Cependant, des espèces n'appartenant pas aux *Scombridés* peuvent contenir d'important niveaux d'histidine libre dans le muscle, telles que la sardine, le pilchard, l'anchois et le hareng qui ont aussi été impliqués dans des cas d'intoxication histaminique [Taylor, 1986].

Selon les résultats du dosage des amines biogènes et d'après la littérature, nous avons choisi d'étudier l'évolution des taux des amines biogènes en fonction de la croissance bactérienne pour deux espèces de poisson.
L'évolution des flores bactériennes étudiées, flore mésophile aérobie totale (FMAT), flore psychrotrophe aérobie totale (FPAT), coliformes totaux (CT) et les coliformes fécaux (CF) durant le temps d'incubation, chez le maquereau et la sardine, sont présentées dans les Tableaux 54 et 55 et sont illustrés par les Figures 54 et 56.
Les différentes flores étudiées se développent plus rapidement chez le maquereau que chez la sardine et les UFC/g observées après 32 heures d'incubation sont environ deux fois plus importantes chez le maquereau.
Les seuils de rejet [Arrêté du MADR, MS et MICT, 2004], pour les flores étudiées sont largement dépassés après 20 heures d'incubation. Les charges bactériennes rencontrées après 4 heures d'incubation supposent qu'il existait une charge bactérienne initiale dans les matrices de maquereau et sardine. Cette charge initiale va rapidement se développer de façon exponentielle après 12 heures d'incubation puis on observe un ralentissement de ce développement après 20 heures aussi bien chez le maquereau que chez la sardine.

Les études de Paleologos et al [2004], évoquent le même nombre de bactéries que sa soit pour les CT ou les FMAT retrouvé au cours de notre étude. Jorgensen et al, [2000] ont décrit trois scénarios possibles pour la formation de ces amines biogènes chez le saumon suivant la nature de la flore bactérienne : un premier avec une prédominance de bactéries lactiques, un second avec prédominance d'*Enterobacteriaceae* et un troisième avec une prédominance de *Photobacterium phosphoreum* ou des bactéries de la famille des *Vibrionaceae*. Dans tous les cas on constate une production d'agmatine, d'histamine et de putrescine allant de 3 µg/g à 200-300 µg/g.
Les poissons frais peuvent être contaminés par une population bactérienne mixte composée de bactéries psychrotrophes, de bactéries Gram-négatives telles que les entérobactéries et de bactéries Gram-positives telles que les bactéries lactiques. Les entérobactéries et les entérocoques sont particulièrement actifs vu leur arsenal enzymatique. En effet, les entérobactéries ont été souvent décrites en tant que producteurs de fortes concentrations en histamine, putrescine et cadavérine dans le poisson [Fadhlaoui-Zid et al. 2012].

Paleologose et al [2004] a travaillé sur des substrats tel que le bar où il y a peu ou pas d'histidine libre, l'histamine n'a pas été déterminée ni formée. Contrairement à cette étude, ou la matrice choisie (sardine et maquereau) est très riche en histidine et elle est facilement dégradable, favorisant ainsi la formation des amines biogènes et en particulier de l'histamine.
Plusieurs facteurs peuvent limiter l'accumulation des amines biogénique dans les aliments ; la disponibilité du substrat, le pH, la concentration du sel, la température, jouant ainsi sur les effets de l'accumulation de ces molécules (amines biogènes). Le phosphate de pyridoxal aussi, est un des facteurs nécessaire pour la décarboxylation de certaines bactéries. Les additifs alimentaires tels que le sorbate de potassium peut être utilisé pour limiter la formation d'amines biogènes dans les aliments. Il est intéressant de mentionner que les niveaux d'amines dosés varient considérablement non seulement entre les différentes variétés d'aliments, mais aussi dans les variétés elles-mêmes [Shalaby, 1996].
En général, de faibles concentrations d'amines biogènes sont naturellement présentes dans la plupart des aliments, mais la croissance et l'activité des bactéries qui est nécessaire pour produire des concentrations élevées d'amines biogènes, qui peuvent être responsables des

intoxications d'origine alimentaire ou utilisés comme indices de détérioration du poisson [Glória, 2006]. Les amines biogènes sont engendrées suivant différentes voies métaboliques impliquant diverses enzymes conditionnés par la nature des flores bactériennes [Jorgensen et al, 2000].

Tableau.54: Evolution des flores bactériennes chez le maquereau durant le temps d'incubation.

	Flore Mésophile Aérobie		Flore Psychrotrophe Aérobie		Coliformes Totaux 30°C		Coliformes Fécaux 44°C	
Temps (heures)	moyenne UFC/g	Ecart type	moyenne UFC/g	Ecart type	moyenne UFC/g	Ecart type	moyenne UFC/g	Ecart type
4	3,83E+03	1,06E+03	2,96E+02	1,10E+02	8,00E+00	2,58E+00	2,00E+00	8,16E-01
8	4,82E+03	7,78E+02	8,03E+02	1,26E+02	4,35E+01	7,33E+00	1,20E+01	4,55E+00
12	4,70E+04	1,51E+04	3,44E+04	1,17E+04	8,58E+01	1,59E+01	5,98E+01	1,70E+01
20	3,64E+08	1,28E+08	3,44E+07	1,06E+07	8,23E+02	9,88E+01	2,08E+02	7,57E+01
24	3,08E+09	7,10E+08	3,04E+08	8,97E+07	3,02E+03	1,15E+03	6,48E+02	2,64E+02
28	6,30E+09	1,09E+09	5,04E+08	2,34E+08	2,10E+04	7,25E+03	4,11E+03	2,02E+03
32	4,12E+09	1,60E+09	3,40E+08	1,01E+08	2,69E+04	1,10E+04	2,92E+03	2,25E+03

Tableau.55 : Evolution des flores bactériennes chez la sardine durant le temps d'incubation.

	Flore Mésophile Aérobie Totale 30°C		Flore Psychrotrophe Aérobie Totale 20°C		Coliformes Totaux 30°C		Coliformes Fécaux 44°C	
Temps (heures)	moyenne UFC/g	Ecart type	moyenne UFC/g	Ecart type	moyenne UFC/g	Ecart type	moyenne UFC/g	Ecart type
4	2,00E+03	3,07E+02	2,28E+02	9,56E+01	1,60E+01	6,27E+00	2,25E+00	1,50E+00
8	2,45E+03	3,36E+02	2,90E+02	9,75E+01	3,98E+01	1,21E+01	5,75E+00	2,50E+00
12	2,27E+04	4,08E+03	1,82E+04	4,08E+03	6,75E+01	1,43E+01	3,08E+01	7,63E+00
20	1,55E+08	3,73E+07	2,04E+07	7,30E+06	5,51E+02	1,47E+02	1,35E+02	3,82E+01
24	1,51E+09	4,17E+08	1,59E+08	4,79E+07	1,91E+03	5,60E+02	2,23E+02	6,52E+01
28	2,83E+09	2,85E+08	2,21E+08	6,45E+07	1,37E+04	3,79E+03	2,15E+03	8,63E+02
32	2,02E+09	5,61E+08	2,25E+08	5,87E+07	1,43E+04	4,80E+03	1,50E+03	7,50E+02

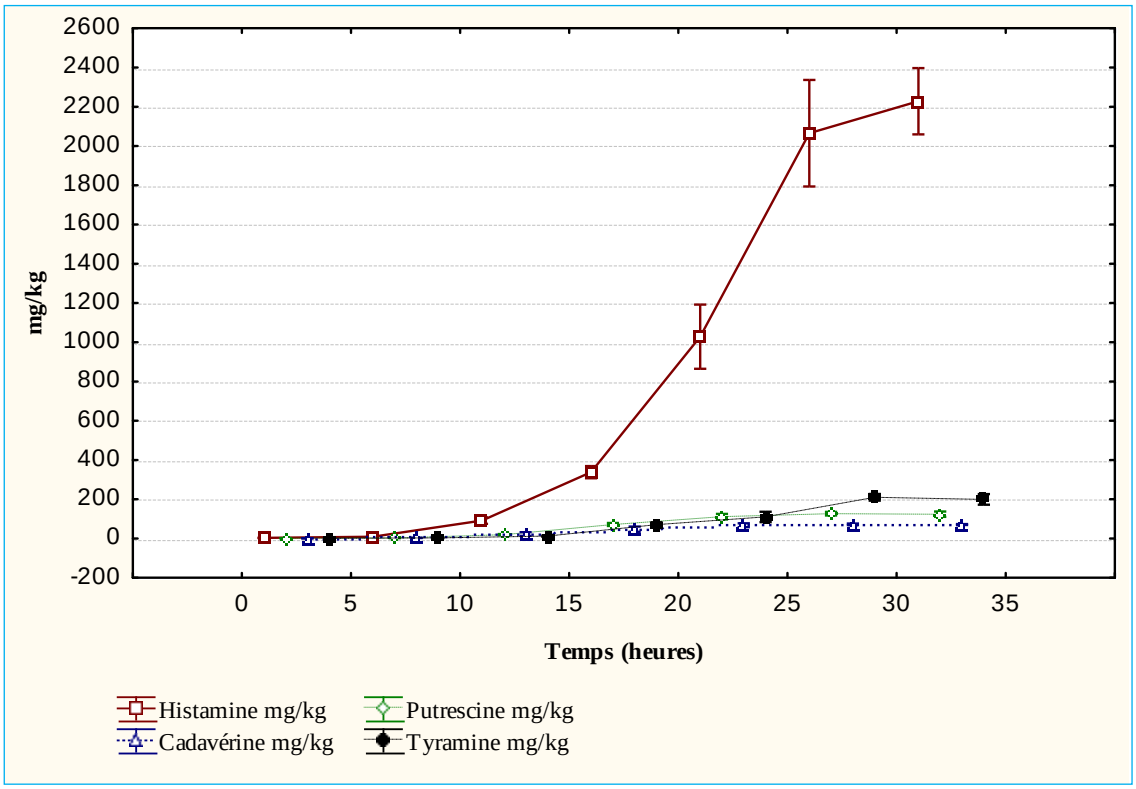


Figure.53 : Evolution des teneurs en amines biogènes (mg/kg ± écart type) chez le maquereau durant le temps d'incubation.

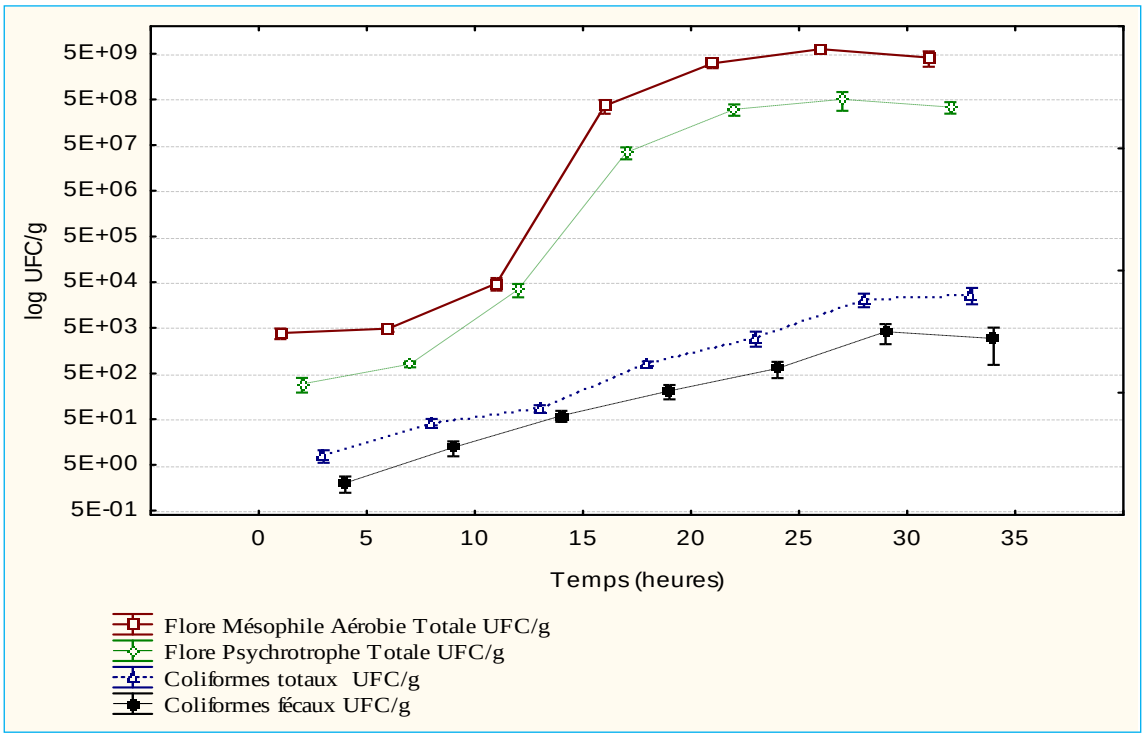


Figure.54 : Evolution des flores bactériennes (log UFC/g ± écart type) chez le maquereau durant le temps d'incubation.

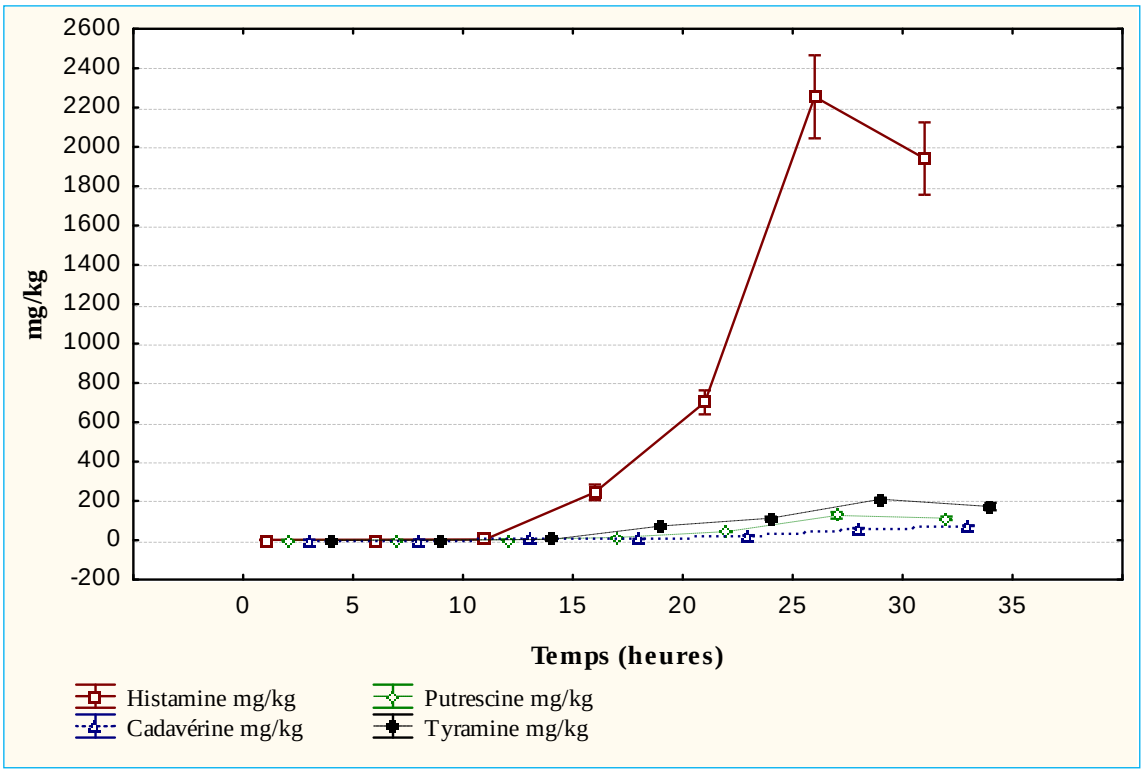


Figure.55 : Evolution des teneurs en amines biogènes (mg/kg ± écart type) chez la sardine durant le temps d'incubation.

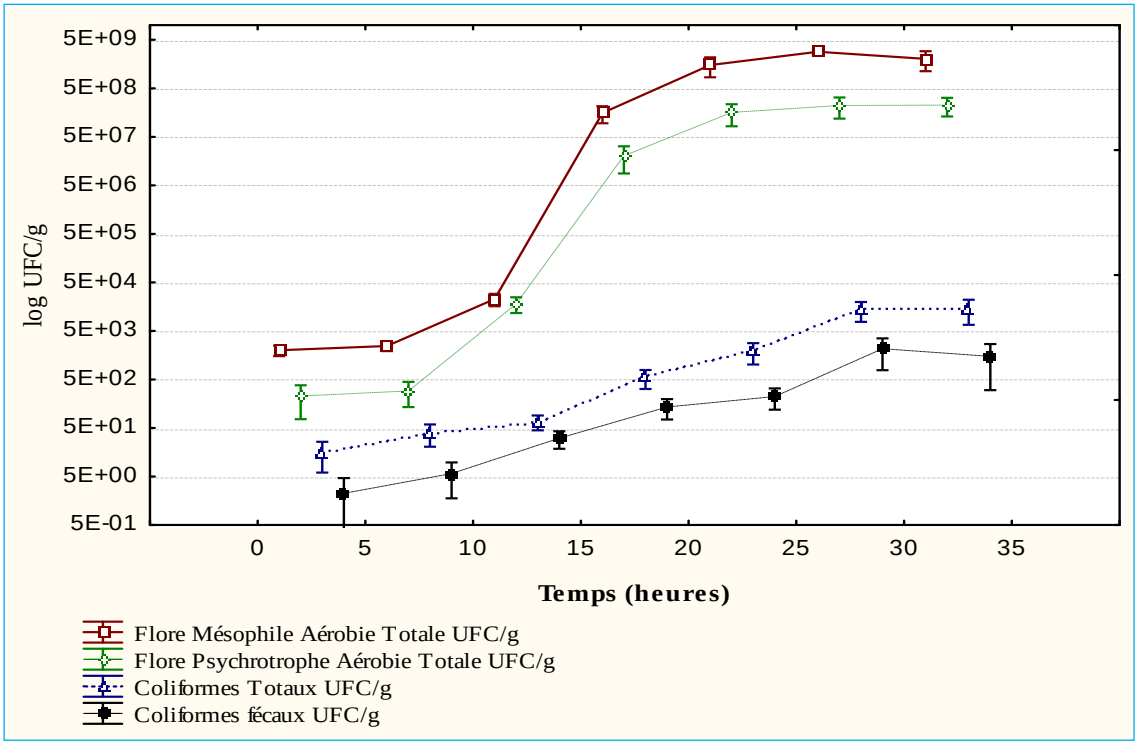


Figure.56 : Evolution des flores bactériennes (log UFC/g ± écart type) chez la sardine durant le temps d'incubation

Conclusion :

Les amines biogènes sont des produits naturels et antinutrition et sont importantes d'un point de vue hygiénique car elles ont été considérées comme les agents étiologiques dans un nombre d'épisodes d'intoxication alimentaire. L'histamine, putrescine, cadavérine, la tyramine, sont considérées parmi les plus importantes amines biogènes présentes dans les aliments, les amines biogènes sont généralement formées par l'activité enzymatique des bactéries, tandis que le type et niveaux d'amines biogènes dépendront de la flore microbienne spécifiques et du comptage [Halaz et al, 1994; Veciana-Noguès et al, 1997]. La production d'amines biogènes, à l'exception de la spermine et la spermidine, est évidente quand la charge bactérienne (Total Viable Count) s'approchent de 7 log ufc / g [Dainty et al, 1986].
Il est incontestable que les poissons et les produits de pêche ont reçu une grande attention en termes de surveillance du contenu en amines biogènes. Pourtant, il semble généralement que la l'histamine et sa formation en fonction des charges bactérienne reste le meilleur indicateur pour la sécurité alimentaire, représente le meilleur indicateur de dégradation des produits de la pêche. Malgré que La putrescine et la cadavérine agissent en synergie sur la toxicité de l'histamine [Al Bulushi et al, 2009].

Actuellement. Les méthodes d'analyse qui déterminent le profil des amines biogènes peuvent aider facilement à identifier le type de bactérie responsable de leur formation et de cette façon contribuer à une meilleure compréhension et gestion du problème d'intoxication histaminique [Dalgaard & Emborg, 2009].

D. Discussion générale : Bilan de suivi environnementale et Action décisive

1. Identification global des risques aux mesures de protection du milieu marin

Le système marin est en train de se modifier en profondeur, suite au changement global planétaire, avec notamment le relèvement du niveau de la mer et des transformations biogéochimiques importantes ayant des impacts multiples en termes de biodiversité du milieu et de productivité halieutique et donc de ressources [Laouina, 2006, Berrahou, 1996, 2006 ; DEPF, 2008, Nakhli et Ghazi, 2002].

Une très forte pression est exercée sur le milieu marin côtier qui constitue des risques majeurs pour son équilibre. On peut identifier ces risques par :

- **La littoralisation :** représente un facteur fondamental d'évolution. La population côtière (zone côtière à moins de 60 km du littoral) représente plus de 60 % de la population mondiale et continue de croître rapidement par immigration; le taux sera de 75 % en 2020, Cela a pour conséquences l'extension de la pression sur le terrain littoral et de la pression sur les ressources marines [Laouina, 2006].
- **L'urbanisation :** qui constitue, de point de vue environnement, une réelle menace pour les espaces naturels du pays et leurs composantes biologiques [QRNB, 2009]. Une multiplication de projets immobiliers et touristiques se développe. Les responsables, partagés entre le souci d'encourager l'investissement, et ne sont pas toujours en mesure de formuler des arbitrages qui prennent en considération la composante environnementale dans un milieu à évolution rapide [Mansour, 2003, Nakhli et Ghazi, 2002].
- **Les pressions anthropiques et les transformations de l'espace :** pour satisfaire les besoins en développement socio-économique, on provoque des dégradations plus ou moins prononcées des ressources biologiques et paysagères.
- **La surpêche :** Au Maroc, pays maritime par excellence, même si ses eaux sont considérées parmi les plus poissonneuses au monde, plusieurs indices montrent que ces ressources ne sont pas inépuisables et qu'elles souffrent, comme toute autre ressource biologique, des répercussions des activités anthropiques et des prélèvements (Efforts de pêches, Engins non adaptés, non respect des périodes de reproduction et de recrutement): Il est aujourd'hui communément admis que les ressources marines naturelles, partout dans le monde, sont pleinement exploitées et que tout effort de pêche ne peut se faire qu'au détriment de la pérennité de ces ressources [QRNB, 2009 ; DEPF, 2008].
- **Les changements climatiques :** les écosystèmes marins demeurent très sensibles aux conséquences des changements climatiques dans la mesure où ils font déjà face à plusieurs facteurs de stress tels que la surpêche et la destruction des habitats causée par la pêche commerciale, le développement côtier et la pollution [QRNB, 2009 ; DEPF,2008].
- **La pollution :** c'est une menace difficile à prouver au large, mais elle est très visible et très contraignante dans de nombreux points côtiers et littoraux. Pratiquement c'est sur de nombreux points de la côte où sont mis en place des collecteurs d'eaux usées domestiques ou industrielles ou encore des décharges non contrôlées. La pollution n'affecte pas uniquement la biodiversité en tant qu'écosystème, espèce ou ressource génétique, mais cause d'importants dégâts sur le plan socio-économique [QRNB, 2009]. La pollution qui menace le littoral s'explique aussi par des raisons externes. Le cas du Maroc, du fait de sa proximité des grandes voies de passage des principales lignes maritimes de transport des hydrocarbures (20 % environ du tonnage total mondial des

cargaisons pétrolières transitent par la Méditerranée venant des pays producteurs du Moyen Orient et se dirigeant vers les pays consommateurs d'Europe et d'Amérique. L'accident survenu dernièrement au pétrolier Kharg 5 et la marée noire qui en a résulté a bien mis en évidence cette vulnérabilité du littoral marocain [Laouina, 2006].

2. Influence et importance des éléments étudiés sur la qualité des produits de pêche

Les produits de la mer disponibles au Maroc recouvrent la majorité des grandes familles halieutiques et offrent de ce fait une potentialité de développement très large [DEPF, 2008]. La grande diversité de ressources halieutiques conduit à une très grande variation de leurs valeurs nutritionnelles et organoleptiques. De nombreux autres facteurs peuvent encore faire varier ces propriétés au sein d'une même espèce, il en est ainsi de l'âge, du sexe, de l'année, du lieu et de la saison de pêche, et aussi de la partie musculaire considérée [Bouthir, 2004 ; Rachidi, 1997].

Compte tenu des difficultés de collecte d'échantillons valides pour des analyses de traces et molécules chimiques dans l'eau et de la faible représentativité spatiale et temporelle de celles-ci [Bouthir, 2004 ; Mauri, 1985]. Cette surveillance porte en priorité sur la matière vivante, compartiment mieux adapté pour répondre aux objectifs de notre campagne de surveillance. Les organismes marins (poissons, céphalopodes, crustacés et moules) sont utilisés comme indicateurs quantitatifs de contamination marine.

2.1. A propos des contaminants chimiques :

Les poissons capturés sur les côtes ou dans des estuaires suscitent plus de préoccupations que les poissons pris en pleine mer. Des substances chimiques, des composés organochlorés et des métaux lourds peuvent s'accumuler dans des produits et poser des problèmes de santé publique. Le poisson peut également être contaminé par des produits chimiques comme le gazole quand il est manipulé sans précaution à bord des bateaux et par des détergents ou des désinfectants quand il n'est pas soigneusement rincé [codex alimentarius, 2009].

Les produits de la pêche présentent la faculté d'accumuler certains contaminants chimiques présents naturellement et/ou introduits accidentellement lors de pollutions chroniques ou ponctuelles du milieu aquatique [DGAL, 2011].

2.1.1. Métaux lourds

Les métaux lourds peuvent affecter la vie aquatique depuis les producteurs primaires. Le risque de la contamination métallique s'amplifie au fur et à mesure que l'on remonte à travers les maillons de la chaîne trophique (phénomène de bioaccumulation ou de biomagnification). La contamination métallique de l'environnement marin est le plus souvent d'origine humaine, plus rarement d'origine naturelle [berrahou, 1996].
Dans les écosystèmes aquatiques les métaux lourds peuvent être bio accumulé dans les moules, les huîtres, les crevettes, les langoustines et les poissons. La sensibilité aux contaminants peut varier considérablement entre les organismes marins.

Bilan des Ml dans les produits de pêche : Les métaux lourds ont un fort impact toxicologique sur les produits de consommation courante et sur l'homme. Il a été nécessaire

de réglementer les teneurs en métaux lourds dans les produits destinés à la consommation (Annexe), et aussi réglementés et contrôlés les rejets industriels. D'après les résultats obtenus (Tabl.56), les métaux sont classés comme suit, par ordre décroissant de toxicité spécifique :

[Hg] > [Pb] >> [Cd]

Tableau.56 : Teneurs moyenne des ML (mg/kg) pendant 4 ans (2006-2009), les concentrations présentées donnent un ordre de grandeur des niveaux de contamination par les ML.

Site	Pb	Cd	Hg	Σ ML totaux
Nador	0,211	0,014	0,215	0,440
El hoceima	0,110	0,014	0,104	0,229
Tétouan	0,092	0,004	0,227	0,323
Tanger	0,141	0,004	0,156	0,301
Larache	0,079	0,047	0,116	0,241
Kénitra	0,064	0,013	0,070	0,147
Casablanca	0,229	0,026	0,243	0,498
Safi	0,116	0,031	0,137	0,283
Essaouira	0,124	0,032	0,120	0,275
Agadir	0,069	0,037	0,021	0,127
Tantan	0,074	0,034	0,027	0,135
Laayoune	0,080	0,035	0,029	0,144
Dakhla	0,063	0,034	0,029	0,126
Σ [élément]	1,452	0,323	1,495	3,270

La répartition métallique sur le littoral est assez homogène, ce qui met en évidence quelques sites plus contaminés. Les sites présentant des niveaux plus élevés que le reste du littoral sont : Casablanca, Nador, Tétouan et Tanger.

[Hg] >> [Pb] > [Cd]

Bilan des Ml chez les moules :

Chez les bivalves, les métaux sont classés comme suit (Tabl.57):

Tableau.57 : Teneurs moyenne des ML (mg/kg) pendant 12 mois (2009-2010), les concentrations présentées donnent un ordre de grandeur des niveaux de contamination par les ML.

Site	Cd	Pb	Hg	Σ ML totaux
Mehdia	0,16	2,32	0,50	2,97
Rabat	0,20	2,00	0,36	2,55
Bouznika	0,32	2,16	0,42	2,91
Mensouria	0,16	1,81	0,58	2,55

Casablanca	0,40	2,88	0,48	3,76
El jadida	0,75	2,21	0,54	3,49
Oualidiya	0,35	1,77	0,24	2,35
Σ [élément]	2,33	15,14	3,11	20,58

D'après les tableaux, Nous constatons que la contamination métallique chez les mollusques est beaucoup plus supérieurs que chez les autres produits de pêche, ce qui est en accord avec les études de Bouthir [2004]. Les mollusques sont généralement considérés des vrais accumulateurs de polluants, en particulier, l'espèce *mytilus galloprovincialis* qui retienne les substances indésirables trouvées à l'état de traces dans le milieu [Metayer et al, 1985]. Cependant, les teneurs moyennes des trois métaux restent dans les niveaux moyens de contamination, elles dépassent rarement les limites acceptables.
Que ça soit pour les moules ou les autres produits de pèche, la contamination métallique est influencée plus par les teneurs en mercure et plomb qu'en cadmium.
La problématique des métaux lourds repose surtout sur le fait qu'ils sont très utiles, voire indispensables à l'homme. En effet, de par leurs propriétés, ils entrent dans la composition d'une grande variété de produits. Il semble donc assez difficile de s'en passer et de les substituer [Ghali, 2008].

2.1.2. Hydrocarbures polycycliques aromatiques :

Les micropolluants organiques ce sont en grande majorité des produits de synthèse issus de l'activité anthropique [Boucheseiche, 2002]. L'importance du trafic maritime, le développement de l'exploitation Off-Shore et l'implantation littorale d'unités de raffinage, sont autant de causes chroniques ou accidentelles de rejets d'hydrocarbures dans le milieu marin. Parmi les principales classes d'hydrocarbures, les HAP représentent la classe la plus importante en raison de leur caractère toxique. Ils peuvent avoir un caractère toxique aigu ou chronique pour les organismes vivants et leur environnement.
Dans le milieu marin, les concentrations des HAP sont rarement élevées pour provoquer, sur le coup, la mort des organismes aquatiques. Habituellement, les changements physiques et biochimiques sont les résultats d'expositions prolongées à des concentrations relativement faibles, par l'intermédiaire de la consommation du poisson ou des coquillages contaminés [Berrahou, 2006].

Bilan des HAP dans les produits de pêche :
Les teneurs résultantes montrent que les produits de la pêche (hors les moules) sont très faiblement exposé à une contamination en benzo(a)pyrène (Tableau.58), ce qui est évoqué aussi par DGAL [2011].

Tableau.58 : Teneurs moyenne des HAP (µg/kg) pendant 4 ans (2006-2009), les concentrations présentées donnent un ordre de grandeur des niveaux de contamination par les HAP.

Site	B(a)P	Py	Ath	Chry	Flu	Ph	Σ HAP totaux
Nador	0,193	0,180	0,195	0,159	0,202	0,706	1,635
El hoceima	0,206	0,245	0,329	0,187	0,214	0,364	1,545
Tetouan	0,115	0,170	0,138	0,123	0,137	0,267	0,950
Tanger	3,027	2,302	1,793	1,196	0,667	4,481	13,466

Larache	0,094	0,278	0,050	0,059	0,060	0,270	0,811
Kenitra	0,337	0,341	0,340	0,119	0,296	0,762	2,194
Casablanca	1,745	0,916	0,930	0,183	0,403	3,059	7,236
Safi	0,166	0,245	0,229	0,417	0,235	0,248	1,540
Essaouira	0,123	0,180	0,174	0,172	0,504	0,250	1,402
Agadir	0,154	0,157	0,091	0,092	0,093	0,234	0,822
Tantan	0,087	0,089	0,042	0,042	0,075	0,219	0,554
Laayoune	0,147	0,191	0,076	0,198	0,199	0,213	1,023
Dakhla	0,173	0,237	0,273	0,166	0,210	0,231	1,291
Σ [élément]	6,567	5,532	4,660	3,114	3,294	11,303	34,470

Les valeurs de toutes les composées dosées sont peu variées, mais se rapprochent aux valeurs du benzo(a)pyrène, à l'exception du phénanthrène.
On peut classer Les molécules d'HAP comme suit:

[Ph] >> [B(a)P] > [Py] > [Ath] > [Flu] > [Chry]

Bilan des HAP chez les moules :

En étudiant les teneurs des HAP enregistrées, les valeurs observées chez les moules, sont trois fois plus que celle trouvées chez les poissons (Tabl.59).

Tableau.59 : Teneurs moyenne des HAP pendant 12 mois (2009-2010), les concentrations présentées donnent un ordre de grandeur des niveaux de contamination par les HAP.

Site	B(a)P	Py	Ath	Ph	Flu	Chry	Σ HAP totaux
Mehdia	1,893	2,391	2,375	1,311	5,003	1,544	14,516
Rabat	1,469	1,710	2,244	0,683	3,447	1,094	10,646
Bouznika	1,643	3,000	3,237	1,153	5,049	1,569	15,650
Mensouria	3,162	3,396	3,479	3,352	6,126	0,974	20,490
Casablanca	4,413	2,450	4,581	2,573	5,989	1,128	21,134
El jadida	2,885	2,729	2,972	0,891	4,501	0,621	14,598
Oualidiya	2,008	2,317	2,204	0,800	2,246	0,646	10,222
Σ [élément]	17,474	17,992	21,092	10,763	32,360	7,575	107,257

Les concentrations du fluoranthène sont les plus considérées que les autres molécules.

Le gradient de pollution pour ces HAP est comme suit:

[Flu] >> [Ath] > [Py] > [B(a)P] > [Flu] > [Chry]

Dans leur ensemble, les normes relatives aux milieux marins ont été conçues en fonction de la présence de certains éléments et substances pour voir la conformité d'aliment et delà protéger la santé humaine (Fig.57).

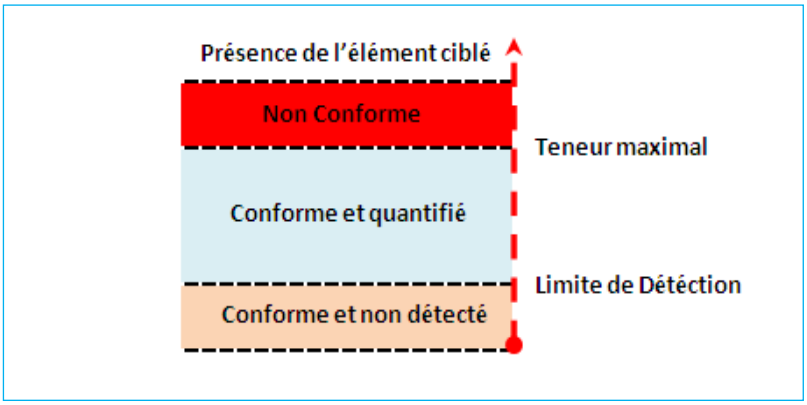


Fig.57 : Qualité de produit selon les limites maximales.

Avec le souci du consommateur à disposer de denrées ne présentant pas de danger. Notre étude était conduite sur les principaux résidus et contaminants chimiques actuellement identifiés comme étant susceptibles de présenter un risque pour la santé publique (via la consommation des produits de mer, débarqués dans divers ports et/ou vendus sur le marché).

Le suivi de ces résidus, constitue un indicateur essentiel de la sécurité sanitaire des produits de pêche et contribue au même temps à la valorisation des fruits de mer marocains. Comme présenté le tableau ci-dessous, 52 non conformité ont été observées dans le cadre de notre campagne de surveillance.

Tableau.60 : Répartition des non-conformités selon les matrices.

Produits surveillés	ML	HAP	Total
Poissons et autres	2 Pb 0 Hg 7 Cd	11 Ph 7 B(a)P 2 Py 0 Flu 0 Ath 0 Chry	**29 (NC)**
Moule	9 Pb 0 Hg 4 Cd	3 Ph 1 B(a)P 1 Ath 5 Flu 0 Py 0 Chry	**23 (NC)**
Total			**52 (NC)**

Ce nombre de prélèvement non conformes (NC) montre que les produits de la pêche mis sur le marché sont très majoritairement conformes, quel que soit l'élément chimique auquel ils sont exposés.

Pour la prise de décision sur les sites les plus pollués, on a établit un pré-diagnostic à partir d'une évaluation simplifiée des risques (ESR). Cette évaluation repose sur les teneurs obtenues conduisant à réaliser une grille de notation qui permet, d'affecter au site l'une des trois classes suivantes :

- Classe C : sites nécessitant un diagnostic approfondi et une évaluation détaillée des risques ;

- Classe B : sites à surveiller pouvant nécessiter des mesures de protection particulières ;
- Classe A : sites banalisables ne nécessitant pas de mesures particulières.

Les sites de prélèvements surveillés sont classés en catégories A, B, et C (Tableau.61). Les points classés en catégorie C durant ces années consécutives doivent être contrôlés de manière continue sauf si des améliorations significatives apparaissent.

Tableau.61 : Classement des sites selon la contamination chimique

Catégorie	Critère	Sites
A	Bonne qualité	Larache, Agadir, Tantan, Dakhla.
B	qualité moyenne	El hoceima, Kenitra, Safi, Essaouira, Laayoune.
C	Modérément pollue	Tanger, Casablanca, Nador, Tétouan.

Nous voyons donc que selon les paramètres étudiés et la matrice utilisée, On peut classer les différents sites étudiés. Théoriquement, cette classification est associée aux sources de pollution et d'apports. Associer chaque site à différentes sources (domestique, agricole, industrielle, etc.) ou définir l'origine de sa pollution constitue aussi l'un des objectifs de ce travail.

Aussi, nous avons étudié, par paramètre (analyte), les variations liées au site, à l'année, la saison et/ou les mois. Des corrélations peuvent exister entre certains paramètres, leurs niveaux de concentration et le temps de prélèvements dépendamment des sites. Au cours de ce travail, l'année n'a pas d'effet sur les paramètres analysés, ce sont les facteurs "saison" et surtout "site" qui intervient significativement dans la variation des teneurs (Tabl.62).

Tableau.62 : variation spatiotemporelle selon le type de contamination

	Contamination métallique	Contamination organique
Variation Spatiale	✓	✓
Variation temporelle		
annuelle	✗	✗
Saisonnière	✓	✓

2.2. A propos des indicateurs chimiques :

2.2.1 Amines biogènes et intoxication histaminique

L'empoisonnement par l'histamine (ou empoisonnement scombroide) est un type d'intoxication causé par la consommation de certains poissons qui ont été incorrectement manipulés, stockés et/ou mal conservés (rupture de la chaine du froid).

L'objectif de ce travail vise surtout à évaluer l'exposition du consommateur au risque lié à l'histamine et autres amines biogènes, après la mise sur le marché et de vérifier le respect des teneurs établies par le règlement (CE) N°2073 [2005], fixant les seuils de non-conformité d'histamine dans les produits de la pêche.

Tous les prélèvements de poissons analysés ont des teneurs en amines biogènes faibles. Cependant, les maquereaux et les sardines présentent des concentrations supérieures aux deux autres espèces de poissons, cela peut être expliqué que les maquereaux appartiennent à la famille des scombridés riche en histidine libre, et que selon El Marrakchi et al [1993],

l'histidine décarboxylase à une activité optimale dans la sardine marocaine après capture (à température ambiante et à pH 6-6,5). En bref, l'espèce et la variété de poisson joue un rôle évident sur la concentration de l'histamine [Alaoui, 1984].

La somme des teneurs des quatre amines biogènes présente une bonne qualité hygiénique, et montre que la qualité du poisson devienne non satisfaisante entre 12 et 20 h à température ambiante à cause de l'augmentation des concentrations des amines (Tabl.63). Le poisson frais peut être facilement altéré quand il est soumis à de mauvaises conditions ou de nombreuses manipulations [Rachidi et al, 1995].

Tableau.63 : l'ensemble des teneurs des amines biogènes selon les espèces de poisson

Temps en heures	Σ Amines biogènes totaux			
	Sardine	Bonite	Pageot	Maquereaux
4	5,5	6,4	5,6	6,6
8	7,9	9,7	8,9	17,5
12	14,7	15,2	15,4	145,2
20	337,5	315,6	251,2	527,3
24	880,9	1086,1	765,1	1338
28	2651,3	2461,1	1358,5	2474
32	2298,3	2012,8	1222,0	2622,1

Pour les quatre groupes de substances étudiées, Les teneurs mesurées dans la chair de poissons présentent une large variabilité entre espèces. (Fig.58 et Tabl.63). L'ordre décroissant en teneurs pour ces molécules est :

[His] >>> [Tyr] > [Put] > [Cad]

Les teneurs en tyramine augmentent en parallèle après l'histamine dans le poisson. La tyramine serait ainsi comme un autre indice de mauvaise qualité.

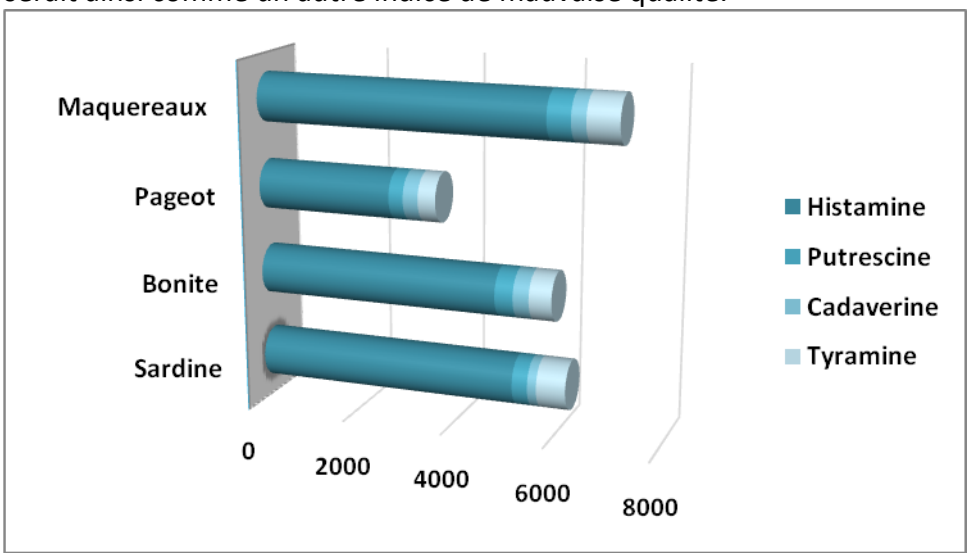


Fig.58 : Variation des teneurs des amines biogènes selon les espèces étudiées.

Malgré que les fortes teneurs des amines soient enregistrées pour seule l'histamine, les autres substances amines agissent en synergie avec cette molécule au cours des intoxications scombroidiques [Arnold et Brown, 1978], elles intensifient l'action de l'histamine dans l'organisme humain. On ne peut établir le seuil de putréfaction à partir des concentrations d'une seule amine biogène, surtout que les teneurs varient beaucoup selon les espèces et la nature de poisson.
La détermination des taux d'histamine dans le poisson est un indice essentiel pour l'évaluation de la qualité, tant du point de vue hygiénique que toxicologique. L'histamine peut s'accumuler dans le poisson sans que ce dernier présente des signes d'altération [Lopez-Sabater et al, 1993]. Elle présente une réponse objective sur la salubrité des produits de la pêche [Ababouch et Afilal, 1989] que l'ABVT, indiquant la flore de putréfaction.
Très souvent, le poisson parait frais alors qu'il contient de l'histamine (présence de la flore histaminogène, 0,1 a 1% de bactéries totales du poisson))
La majorité des odeurs dégagées lors de l'altération de poissons est le produit de la dégradation des acides amines [El Marrakchi et al, 1990].

2.2.2. Contamination et multiplication post-mortem

Après sa capture, le poisson est le siège dans un premier temps, d'une activité enzymatique intense de nature autolytique. Ensuite sous l'effet de la prolifération microbienne rapide, il se produit des transformations chimiques profondes avec souvent une accumulation de substances toxiques (amines biogènes et toxines bactériennes…), ce qui rend le poisson impropre à la consommation.
Parmi les critères d'appréciation de la qualité hygiénique du poisson, le dosage de l'histamine et l'examen bactériologique. L'étude de la formation des amines biogènes dans le poisson en fonction de la charge bactérienne a montré que la flore bactérienne joue un rôle important dans la production des amines biogènes, surtout de l'histamine [Rachidi, 1997]. Nos résultats révèlent une corrélation étroite entre les taux de formation d'histamine et les charges microbiennes.
L'examen microbiologique réalisé confirme la décomposition et l'altération de muscles du poisson en fonction de la formation des amines biogènes à température ambiante. A cette température, le poisson s'altère plus rapidement de 24 à 36h [El Marrakchi et al, 1993]. L'augmentation des teneurs des amines biogènes indique une contamination bactérienne du poisson après sa capture [Sbihi, 1992]. Les études de Yoshinaga et Frank [1982], déclarent un gradient de concentration d'histamine au niveau du poisson frais, prés de la cavité abdominale du poisson, les taux d'histamine sont plus importants et tendent à diminuer vers la queue. La cavité abdominale est très riche en germes, la décarboxylation à ce niveau est plus importante.

3. Quelques mesures de protection

Les risques d'intoxication alimentaires associés aux produits de mer sont liés surtout à des écosystèmes côtiers, où le potentiel de contamination de l'environnement est plus élevé qu'en haute mer.
Les données acquises lors de cette campagne viennent s'ajouter aux résultats d'autres travaux réalisés permettant ainsi de mettre en évidence certaines mesures de protection. L'objectif toujours est de préserver les ressources d'eau et l'usager. Notre suivi peut se résumer ainsi :

1) Diagnostic initial et évaluation simplifiée des risques ;

2) Recensement des sites (potentiellement) pollués ;
3) Evocation des mesures et actions pour la protection.

Il est important d'examiner les dangers et risques menaçant la santé des organismes marins. Dans le secteur des pêches, la maîtrise de la sécurité sanitaire des produits est étroitement liée à l'amélioration des conditions d'hygiène et de manipulation des produits à tous les niveaux de la filière (Tabl.67 et 68). Cette démarche permet de [GBPHAP-HACCP, 2010] :

- Protéger la santé des consommateurs ;
- Valoriser la matière première et assurer l'approvisionnement des unités de traitement des produits halieutiques en matière première salubre ;
- Améliorer la gestion préventive des risques encourus à toutes les étapes de la filière, lors de la production primaire, de la manutention, le transport, le traitement et la transformation des produits de la pêche, … et assurer ainsi la maîtrise de la sécurité sanitaire des produits halieutiques mis en marché ;
- Améliorer la qualité sanitaire et assurer la salubrité des produits halieutiques frais et transformés ;
- Réduire les pertes occasionnées par les produits de qualité non conforme ;
- Renforcer la compétitivité des produits marocains sur les marchés extérieurs et répondre aux exigences réglementaires nationales et internationales pour la protection des consommateurs.

La surveillance est réalisée essentiellement sur la qualité et la salubrité des produits de la pêche commercialisés, Elle s'exerce avant l'exposition à la vente pour s'assurer que les poissons ne sont pas impropres à la consommation humaine et éventuellement après la vente ou avant enlèvement des lots pour attester de l'agréage et de l'origine des lots (certificat de salubrité et, pour l'exportation, un certificat sanitaire d'origine).

Les points à surveiller sont :

- L'absence de poissons toxiques,
- L'état de fraîcheur des produits de la mer,
- Leurs niveaux de contamination.

Tableau.64 : Résidus chimiques et mesures préventives.

Danger	Origine	Effets sur la santé	Mesure préventive
HAP	Naturelle Et/ou anthropique	Contaminations de l'environnement Eau de mer Effet carcinogène	**S**élection en fonction des zones de pêche. **E**valuation et respect de la réglementation. **S**urveillance de la qualité du milieu et ces compartiments.
ML	Naturelle et/ou anthropique	Poissons carnivores Contamination de l'environnement Intoxication alimentaire	**S**urveillance surtout des gros poissons (bioaccumulation). **S**élection en fonction des zones de pêche. **R**églementation et contrôle continu.

Tableau.65 : Indicateur chimique et mesures préventives.

Danger	Origine	Effets sur la sante	Mesure préventive
Scombrotoxine (**histamine**)	Dans les muscles de certains poissons, riche en histidine, tel que : thon, maquereau, anchois, espadon, sardine, etc.. poisson mal refroidit Contamination par flore histaminogène	Eruption cutanée. Rougeurs, enflure du visage. nausée. maux de tête, vomissement, diarrhée, maux d'estomac, etc.	**R**éfrigération rapide après capture ; **R**espect de bonne pratique d'hygiène ; **E**viscération précoce ; **T**° de poisson (chaine du froid) ; **F**ormation du personnel, manipulation ; **G**estion du temps hors glace ; **C**ontrôle quotidien.

4. Actions correctives

Au travers des différents textes réglementaires traitant de la qualité des milieux aquatiques ou plus spécifiquement des rejets industriels, la prise en compte des pollutions à caractère toxique implique deux modes d'actions :

- limiter l'exposition des milieux aquatiques aux polluants en agissant sur la source (autorisations de rejets, règles d'homologation des substances produites, maîtrise des émissions,…),
- concilier les usagers de manière à préserver un milieu de qualité satisfaisante (programme d'actions territoriales notamment).

Les dispositifs de surveillance constituent le principal moyen de limiter les impacts de la pollution sur l'environnement et la biodiversité. Dans ce sens, l'INRH dispose de plusieurs antennes le long de la côte marocaine et qui, avec le LPEE et le laboratoire du département de l'environnement, effectuent des campagnes d'évaluation de l'état de salubrité des plages nationales et de certaines ressources littorales.

Actuellement, Plusieurs sont les activités d'incitation positive et de suppression des effets pervers pour la protection de l'environnement ont pris place [DEPF, 2008]. Parmi ces activités les programmes cités ci-dessous [QRNB, 2009, Nakhli et Ghazi, 2002] :

- **Programme FODEP (Fonds de Dépollution industrielle) :** C'est un programme qui peut être considéré comme une stratégie de portée nationale constituant, de par ses objectifs, un moyen et un outil de sensibilisation destiné à faire participer, conscientiser et encourager les investisseurs et industriels à se rallier aux efforts consentis par le pays pour produire propre et adopter un comportement éco citoyen.
- **Le Mécanisme de Développement Propre (MDP)** : C'est une structure qui vise principalement l'incitation d'institutions compétentes à s'engager dans des activités de renforcement des capacités, de conseil, de recherche et développement durable.
- **Le Programme de « Repos Biologique »**. C'est un programme préventif établi par le département des pêches maritimes pour protéger les ressources halieutiques des effets pervers des activités humaines et plus particulièrement la surpêche. C'est une approche qui préconise la mise au repos de stocks de ressources vivantes pour des périodes déterminées afin que les populations puissent reconstituer leurs stocks et assurer leur pérennité.

A l'état actuel des choses, nous ne pouvons donner mieux comme réponse ou action corrective autre que La sensibilisation, l'information, la communication et l'éducation, elles sont considérées comme une démarche prioritaire. En effet, il est communément admis que rien ne peut se faire dans le domaine de la préservation des ressources naturelles sans la participation, la contribution et l'intégration des populations locales. Il est ainsi primordial, d'adhérer tous les usagers, directs ou indirects des ressources naturelles du Maroc, que soit mise à leur disposition toute l'information utile, suffisante et nécessaire pour qu'ils puissent s'intégrer dans tout processus de conservation et protection de ces ressources contre toute contamination et déséquilibre.

L'objectif ultime de ces campagnes de surveillance et études de pollution marine, est surtout la responsabilisation sur les ressources et les risques qui nous entourent. Mais Il reste nécessaire d'harmoniser entre la législation nationale et l'engagement international du Maroc. Il faudrait surveiller de manière suffisamment fréquente les contaminants présents dans les milieux marins pour établir avec confiance qu'aucune source ne contamine les produits. Les zones où il n'existe pas de sources connues de contamination chimique ne devraient nécessiter de contrôles occasionnels qu'à intervalles de quelques années. Lorsqu'il existe des sources connues spécifique, les produits devraient nécessiter des contrôles de routine plus fréquents.

4.1. Plan correctif proposé :

Les analyses en matière de polluants devraient être renforcées. Pour non seulement répondre aux besoins de certification sanitaire, mais aussi d'assurer un suivi de la qualité environnementale dans son ensemble. Les programmes de suivi de la qualité du milieu marin, en utilisant notamment des espèces indicatrices, doivent être développés.
Les bilans environnementaux devraient être publiés sur une base régulière pour informer le public et les usagers du milieu marin.
Un plan d'action articulé autour des actes suivants devrait être mis en application :

- Avoir une plus grande rigueur en matière de suivi et de contrôle des activités en mer et les produits sur le littoral ;
- Mettre en place de normes des procédures concernant les navires et le respect de la réglementation en vigueur ;
- En matière de lutte contre la pollution par les rejets, des normes nationales doivent être rigoureusement appliquées.
- Renforcer la protection des zones avec comme objectif principal, l'augmentation de la contribution des zones protégées à la conservation de la diversité biologique.
- Programmer une gestion durable des ressources biologiques.
- Appuyer des capacités humaines à conserver les milieux naturels.
- Valorisation des connaissances et les pratiques de conservation.
- Préserver des variétés locales et races d'organismes marins pour la préservation du patrimoine national.

La réussite de ces actions correctives nécessite un engagement soutenu. D'après notre étude, les interventions doivent être menées en priorité dans les régions les plus menacées comme Casablanca et Tanger.

Conclusion Générale

Depuis plusieurs décennies, Les dommages causés par les divers types de pollutions sont de plus en plus élevés et atteignent de hauts niveaux. Les évaluations de la qualité du milieu marin et ses composantes constituent une partie intégrante des programmes de protection des zones marines et côtières. Elles donnent, en effet, la possibilité de réunir et d'évaluer les résultats de la recherche scientifique à la pratique de surveillance.

La contamination mesurée dans les organismes marins reflète celle de l'environnement aquatique ambiant. Cette étude a été initiée dans le but de réactualiser la connaissance des niveaux de présence de divers contaminants et indicateurs chimiques dans un nombre limité d'espèces de produits de pêche exploitées, représentatives de différentes zones du littoral marocain. L'objectif principal est d'évaluer à partir des teneurs :

- la salubrité des produits de pêche : L'ensemble des résultats sont globalement satisfaisants. Pourtant, Il semble que la campagne de prélèvements et d'analyse dont il est question dans ce travail doit être étendue au cours des prochaines années Ainsi, nous aurons des données qui couvrent une décennie pour optimiser les points de contrôle.

- la possibilité de différencier entre les zones côtières selon leur niveau de contamination : Les sites de prélèvement, ont été choisis de manière à représenter la diversité géomorphologique et urbaine de la zone côtière et en insistant tout particulièrement sur les sites qui sont relativement plus fréquentés.

Au terme de cette étude, nous retiendrons que les produits de mer sont des denrées très périssables, pouvant contenir des substances toxiques telles que ML, HAP et AB. Déclarant ainsi la présence d'une contamination légère.
D'après l'analyse des différentes parties, il s'est avéré que La flore et la faune marine les plus contaminées se rencontrent évidemment dans les zones littorales des sites les plus industrialisés. La pollution chimique de la mer en nutriments, en métaux lourds et en composés organiques pourrait rapidement atteindre des niveaux alarmants dans certaines zones industrielles. La majorité des industries marocaines est localisée dans la plaine côtière ou sur les rives des rivières qui sont à régime torrentiel débouchant assez rapidement dans la mer.

La pollution marine et la contamination des produits de pêches est une préoccupation forte à la fois de la population, des collectivités locales, des scientifiques et de l'Etat, tant pour ses effets sur la santé que sur l'environnement. La surveillance de la qualité du milieu est indispensable et doit s'inscrire dans une stratégie de surveillance basée sur la réglementation actuelle et prochaine. Notre étude reste une étape préliminaire prendra la forme de campagnes de mesure sur un nombre limité de sites potentiellement soumis à d'importants niveaux de HAP et/ou métaux lourds et AB. Cette campagne a permis de diagnostiquer, d'observer et d'estimer objectivement la contamination des produits de pêche suite à des mesures temporaires.

Cette étude comporte:

- Des analyses biochimiques des HAP et ML dans les produits de pêche (poisson, céphalopodes et crustacés) depuis 2006 au 2009 au niveau de 13 ports ;
- Des mesures mensuelles des HAP et ML chez les bivalves, au cours de 2009 et 2010 au niveau de 7 sites ;
- Des mesures de teneurs des amines biogènes dans certaines espèces de poisson pendant 2010-2011 au niveau du marche de Casablanca.
- Des mesures pour la cinétique de formation des amines biogènes en fonction des charges des flores bactériennes.

Nous achevons ce travail en avançant des propositions pour un nouveau plan de contrôle et surveillance des milieux marins, avant de déceler des teneurs alarmantes en éléments et substances polluantes d'ici les jours à venir.

La zone côtière et ses composantes est un milieu dynamique, en pleine expansion, qui continu d'être un des secteurs clés et prometteur pour le développement du Maroc. La mise en place de nouveaux plans de surveillances et l'approfondissement des connaissances concernant le milieu marin ne peut qu'aider pour cesser la pollution d'augmenter « prospective d'évolution des milieux marins ».

Perspectives d'amélioration

Cet écrit se veut une synthèse des principales trouvailles afférentes aux études de terrain conduites sur les produits de pêche du littoral marocain. Il n'est pas facile de comparer entre les programmes et compagne de surveillance. Outre les stratégies d'échantillonnage, la comparaison des données se heurte au choix d'espèces différentes et à l'influence variable de facteurs environnementaux.

Pourtant, Il existe différentes étapes et approches pour caractériser la contamination marine ainsi que les risques possibles :
1/ l'analyse chimique : permet d'évaluer la qualité et d'identifier les sources ;
2/ l'évaluation écotoxicologique : via les approches prédictives et géochimiques, permet de comparer les dosages chimiques à des niveaux de référence ;
3/ l'analyse biostatistique : permet d'extrapoler les données pour déterminer des critères de qualité ; méthode basée sur l'occurrence d'effets biologiques et de gradients de concentrations pour déterminer des niveaux sans ou avec effets.

Actuellement, La modélisation mathématique est l'une des principales perspective qui doit être utilisée pour fédérer les connaissances monodisciplinaires ainsi acquises et les coupler et aussi pour étudier la prévision des conséquences de certaines actions sur le milieu et/ou des effets sur les écosystèmes côtiers. Une compilation des données sur au moins 10 années (2006 à 2016) réalisée chaque année par couple (analytes/espèces) et (analyte/site), permettrait d'obtenir une approche prévisionnelle sur l'évolution de la contamination marine.

Aussi dans une perspective d'aménagement équilibré du territoire, avec redistribution spatiale des hommes et des activités, il va être nécessaire d'adopter des restrictions sérieuses dans l'urbanisation des côtes et dans les rejets d'eaux usées et de déchets. Il faut appliquer des réglementations plus strictes concernant le rejet d'eaux usées en mer, dans le but d'éviter les impacts négatifs sur la flore et la faune marine et les habitats côtiers.
Il faut faire avec tous les moyens nécessaires pour que les teneurs dans les organismes ne s'approchent aux valeurs guide pour la consommation humaine.

Bibliographie et documents consultés

A

Ababouch L., (1994). Analyse des risques et maîtrise des points critiques pour l'assurance qualité des produits de pêche. Stage de perfectionnement en matière d'inspection des denrées animales et d'origine animale.IAV.Hassan II. Agadir.

Ababouch L., Afilal ME., (1989). L'histamine dans la sardine marocaine fraîche et en conserve. Evolution au cours du stockage sous glace et en présence de sel. Mircen.J.Appl.Microbial5.pp, 77-86.

Abarnou A., (2004). Contaminants organiques dans les organismes de l'estuaire et de la baie de Seine : dioxines (PCDD/F) et PCB apparentés aux dioxines (PCB-DL). Rapport Seine- Aval 2003, thème 1, 32 p.

Abouhala A., Boukabous R., (1996). In. Marketing of aquaculture products, Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 1996. p. 103-108: 1. (Cahiers Options Méditerranéennes; v. 17), Seminar of the CIHEAM Network on Socio-economic and Legal Aspects of Aquaculture in the Mediterranean (SELAM), 1995/10/11-13, Thessaloniki (Greece).

Abrajano Jr.T.A., Yan B., Song, J., Bopp, R., O'Malley V., Heinrich D.H .,Karl K.T. (2003). High-Molecular-Weight Petrogenic and Pyrogenic Hydrocarbons in Aquatic Environments. In Treatise on Geochemistry, Vol. 9, pp. 1-50. Oxford: Pergamon.

Ahmed F.E., (1991). Naturally occuring seafood toxins. *J Toxicol Toxin Reviews* ; *10* : 263-287.

Alaoui M.M., (1984).L' histamine dans les boites de conserves de poisson au Maroc. Mémoire à l'institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat.

Amiard J.C., Amiard-triquet C., Berthet B., Metayer C., (1986). Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel Mytilus edulis. Field study. Mar.Biol., 90, pp. 425-431.

Andral b a., Stanisiere J.Y., Sauzade D., Damier E., Thebault H., Galgani F., Pierre C.,(2004). Biossery Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging Marine Pollution Bulletin 49 704–712.

Angell N.F., Lavery J.P., (1982).The relationship of blood lead levels to obstetric outcome. Am. J. Obstet. Gynecol., 142: 40.

Anli R.E., Vural N., Yilmaz S., Vural Y.H., (2004). The determination of biogenic amines in Turkish red wines, , Journal of Food Composition and Analysis, 17: 53-62.

Al Bulushi I., Poole S., Deeth H. C., Dykes.G. A., (2009). Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49, 369-377.

ALP, Station de recherche Agroscope liebefeld Posieux.., (2009). Importance des amines biogènes dans l'alimentation et présence dans les différents fromages. Groupe de discussion Gruyère. N° 73 f. ISSN 1661-0814 / 27.10.2009

AOAC , Association of Official Analytical Chemists AOAC – 13ème Ed. (1980). Page 405.

Aponte M., Blaiotta G., Francesca N., Moschetti G., (2010). Could halophilic archaea improve the traditional salted anchovies (*Engraulis encrasicholus*) safety and quality, , J.Microbiology, 51: 697-703.

Arena M. E., Manca de Nadra M.C., (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. Journal of Applied microbiology, 90: 158-162.

Arnac M., Lassus C., (1985). Accumulation de métaux lourds (Cd, Cu, Pb ET Zn) chez l'eperlan (Osmerus mordax) prélevé sur la rive nord de l'estuaire. Water Res. Vol. 19, No. 6. pp. 725-734.

Arnold S.H., Brown.W.D., (1978). Histamine,toxicity from fish products.Adv.Food.Res.113-154.

Arrêté conjoint du 8 avril (2004), du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, du Ministère de la Santé et du Ministère de l'Industrie, du Commerce et des Télécommunication N°1737-02

relatif aux normes microbiologiques auxquelles doivent répondre les denrées animales ou d'origine animale

Attrassi B., Saghi M., (1992). Résistance bactérienne aux métaux lourds chez les souches isolees des moules du littoral Atlantique marocain. Hydroecol,Appl.Tome 4 vol 2,pp.1-7.

ATSDR. (1995), *Toxicological profile for* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)Updata, U.S. Department of Health & Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Governement Printing Office

Auger D., (1989). Méthode de dosage du cadmium, du cuivre, du plomb et du zinc dans la chair de poisson. Rapport IFREMER, n° DERO 89-07-MR.

Azdi M., Moukrim A., Burgeot T. Budzinski H., Chiffoleau J.F., Kaaya A., Zekhnini A., Narbonne J.F., Guarrigues Ph., (2006). Hydrocarbon pollution along Moroccan coasts and BPH Activity in the Mussel *perna perna.* Polycyclic Aromatic compounds, 26:4,265-282.

B

Bach B., (2011) Composés naturels présents dans le vin et les aliments, les amines biogènes peuvent provoquer des allergies et des mauvais goûts. Pour mieux les connaître, le Service technique d'Inter Rhône a participé au programme européen de recherches Biamfood. Bilan.,septième programme-cadre de la convention de subvention KBBE-211441-BIAMFOOD. N° 771

Bachelot M., (2010). Contamination de moules (Mytilus sp.) en milieu marin par des substances pharmaceutiques et produits de soin. Thèse d'Université Montpellier 1.

Baek S.O., Field R.A., Goldstone M.E., Kirk P.W., Lester J.N., (1991) A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons : sources, fate and behavior. *Water*, *air*, *and soil pollution*, 60, 279-300.

Banaoui A., Chiffoleau JF., Moukrim A., Azdi M., Kaaya A., Auger D., Rozuel E., (2004). Trace metal distribution in mussel *Perna perna* along the Moroccan coast. Mar Pollut Bull 48:378-402

Baumard P,. Budzins H, Garrigues P., Sorbe J. C., Burgeot T., Bellocq J., (1998a) Concentrations of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in Various Marine Organisms in Relation to those in Sediments and to Trophic Level.PII: S0025-326X (98)00088-5. *Marine Pollution Bulletin,* Vol. 36, No. 12, pp. 951-960,

Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., (1998b).Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean sea. Environmental Toxicology and Chemistry, 17,765-776.

Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., Narbonneb J.F., Burgeot T., Michel X., Bellocq J., (1999a).Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (Mytilus sp.) in diferent marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability Marine Environmental Research 47 415±439.

Baumard P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer H., Hansen P.D., (1999b). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in recent sediment and mussels (*mytilus edulis*) from the western Baltic Sea: occurrence, Bioavailability and seasonal variations, marine environmental research 47, p.17-47.

Bauza T., Blaise A., Teissedre P.L., Cabanis J.C., Kanny G., Moneret-Vautrin D.A., Daumas F., (1995), Les amines biogènes du vin: metabolism et toxicité, Bulletin de l'OIV ISSN 0029- 7127, 68: 42-67.

Beliaff B.,Bocquenceg.,(2004). Exploratory data analysis of the Mediterranean component of the BEEP programme. Marine Environmental Research, 58:239-244.

Beliaeff B., O'Connor P., Munschy C., Raffin b., Claisse D., (2002). Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in mussels and oysters in france and united states, environmental toxicology and chemistry 21, p.1783-1787.

Benbrahim S., Chafik A., Chfiri R., Bouthir F.Z.,(2006).Etude des facteurs influençant la répartition géographique et temporelle de la contamination des cotes atlantiques marocains par les métaux lourds :cas du mercure, du plomb et du cadmium. Mar.life-Vol, 16, pp.37-47.

Becher G. (1986). Determination of exposure to PAH by analysis of urine samples. Mechanisms in tobacco carcinogenesis. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.

Becher G. and Bjorseth A. (1983) - Determination of exposure to polycyclic aromatichydrocarbons by analysis of human urine. *Cancer Lett,* 17, 3, 301-311.

Berrahou, A., (1998). Ressources halieutiques et potentialités aquacoles au Maroc. Expo 98. Edit. Okad. 82 p.

Berrahou A., (2006). Évaluation du milieu marin. pp 217-345.

Berthelin J., Bourrelier P-H., (1998). Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. Académie des sciences. Rappel n°42. Technique et documentation.

Besada V., Fumega J., Vaamonde A., (2002). Temporal trends of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Spanish North-Atlantic coast 1991e1999. Science of the Total Environment 288, 239-253.

Bisson M., DiderichI R., Houeix N., Hulot C., Lacroix G., Lefevre J.P., Leveque S., Magaud H., Morin A., Pepin G., Pichard A., (2011). Cadmium et ses dérivés. INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. DRC-11-117259-10308A.

Bleeker E.A.J., Pieters B.J., Wiegman S., Kraak M.H.S., (2002). Comparative (photoenhanced toxicity of homocyclic and heterocyclic PACs. Polycyclic Arom. Comp. 22, 601-610.

Bloundi M.K., (2005). Etude géochimique de la lagune de Nador (Maroc oriental) : Impacts des facteurs anthropiques. Thèse de Doctorat. Université Mohamed V, 238 p.

Bodin N., Burgeot T., Stanisiere J.Y., Bocquene G., Menarda D., Minier Boutet C., Amat A., Cherel Y., Budzinski H. (2004) Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea.Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 138, 411 –427.

Bonnard M., (2010)., Relations « Biodisponibilité- Génotoxicité- Ecotoxicité » Des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans les sols de friche industrielles. Thèse d'Université PAUL VERLAINE – METZ, UFR Sciences Fondamentales et Appliquées. CNRS UMR 7146.

Bonnin-Jusserand M., (2011). Etude du métabolisme des amines biogènes chez les bactéries lactiques du vin. Thèse d'Université de Bourgogne.

Bourrinet P., Ramade F., Remond-Gouilloud M., (2008). Pollution. cbhg.org/wp-content/uploads/2008/06/pollution-eu.pdf.

Bouabdli A., Saidi N., M'rabet S., Escarre J., Leblanc M., (2005). Oued Moulaya : vecteur de transport des metaux lourds (Maroc). Revue des Sciences de L'eau, Rev. Sci.Eau 18/2, 199-213.

Boucheseiche C., Crémille E., Pelte T., Pojer K., (2002). Pollution toxique et écotoxicologie : Notions de base. Guide technique n°7 du SDAGE Rhône-Méditerranée-Corse, 83p.

Boumehres A., (2010). Etude comparative des techniques d'extraction des éléments traces métalliques dans le foie, le rein et le lait et leur détermination par spectrométrie d'absorption atomique (flamme et four graphite). Mémoire de Magister en médecine vétérinaire.

Bouthir F.Z., (2004). Evaluation de la contamination métalliques le long du littoral de la wilaya du grand casablanca.au niveau des différents compartiments (moules, algues, poissons et sediments) : Etude d'impact des apports anthropiques.

Bouthir F.Z., Chafik.A.,Banbrahim,S.,Souabi.S.,(2004).Qualité physico-chimique des eaux côtières du littoral de la wilaya du grand Casablanca (Ocean Atlantique marocain) utilisant la moule *Mytilus galloprovincialis* comme indicateur de la contamination métallique. Mar.life,14(1-2),pp.59-70.

Boutiba Z., Taleb, M. Z., Bouderbala M., Abdelghani F., (1996), La pollution : menace sur le peuplement marin en Méditerranée. 3ème Colloque national Climat – Environnement «L'environnement côtier» (ARCE), 16-17, Oran : 15 p.

Boutin J.-P., Puyhardy J.-M., Chianea D., Andreu P., Paez S., Fize L., Vauthier J.-M., Chapalain J.-C., Grippari J.-L., Corbe H., Bietrix P., (1998). Les intoxications alimentaires histaminiques. *Santé publique*, volume 10, no 1, pp. 29-37

Bruner K. A., Fisher S. W., Landrum P. F., (1994). The role of the zebra mussel, *Dreissenia polymorpha*, oncontaminant cycling: I.The effect of body size and lipid content on the bioconcentration of PCBs and PAHs. *Journal of Great Lakes Research* 20(4):725-734.

Budzinski H., Letellier M., Garrigues P., Menach K. LE (1999). Optimisation of the microwave-assisted extraction in open cell of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and sediments study of moisture effect journal of chromatography A,837.pp.187-200.

Budzinsky H., Jones I., Bellocq C., Pierard C., Garrigues P., (1997). Evaluation of sediment contamination by polycyclic hydrocarbons in the gironde estuary, Marine chemistry 5. p, 85-97.

Burgess R.M., Ahrens M.J., Hickey C.W., (2003). Geochemistry of PAHs in aquatic environments: source, persistence and distribution. Series Ecological & Environmental Toxicological, PAHs: an ecotoxicological perspective. Editor: P.E.T. Douben, Wiley. ISBN 0-47156024-3.

Busto O., Guasch J., Borrull F., (1996). Determination of biogenic amines in wine after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate , Journal of Chromatography A, 737: 205-213.

C

Camel V., (2000). Microwave assisted solvent extraction of environmental samples.*Trends in analytical chemistry*, 19, 229-248

Casas S., (2007). Modélisation de la bioaccumulation des contaminants organiques (PCB, DDT et HAP) chez la moule *Mytilus gallprovincialis,* en milieu Méditerranéen. Direction des Opérations, Convention Agence de l'Eau Rhône Méditerranée et Corse n° 2006-1898-Laboratoire Environnement Ressources Provence Azur Corse-RST/LER/PAC/07-14.

Casas S., Bacher C., (2006). Modeling trace metal (Hg and Pb) Bioaccumulation in the Mediterranean Mussels, *Mytilus Galloprovincialis*, Applied to environmental Monitoring, Journal of sea research 56, pp.186-181.

Casas S., Andral B., Caixach J., Calvo M., Cossa D., Bacher C.D., Gonzalez J.L., (2007). Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean mussel, Mytillus galloprovincialis, optimized by the use of dynamic energetic budget (DEB) Model*. Rapp. Comm. int. Mer Medit., 38.*

CCME, Conseil canadien des ministres de l'environnement. (1999). Recommandations canadiennes pour la qualité des sédiments : protection de la vie aquatique, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), dans Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, 1999, Winnipeg, le Conseil

Chaabouni M., (2011). L'Histamine dans les produits de la pêche. Bulletin d'information des Services Veterinaires n° 7. DGSV pp.,1-8.

Chafik A., Cheggour M., Cossa D., Benbrahim S., Sifedine M., (2001). Quality of Moroccan Atlantic coastal waters: water monitoring and mussel watching. Aquat. Living resour. 14, pp 239-249. doi:10.1016/S0990-7440(01)01123-8

Chambers L., Gardinali P., Chambers H., Wade T.L., Jackson T., Brooks J.M., (1996). Organics in marine sediment as certified reference materials for polychlorinated dioxins and furans in marine ecosystems. Chemosphere 32, 25-30.

Cheftel J.C., Cheftel H., (1992). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. 7eme éd. Paris : Lavoisier Technique & Documentation.

Cheggour M., Langston WJ., Chafik A., Texier H., Kaimoussi A., Bakkas S., Boumezzough A.,(2000). Metals in the bivalve molluscs Scrobicularia plana (Da Costa) and Cerastoderma edule (L.) and associated surface sediment from Oum Er Rbia Estuary (Moroccan Atlantic Coast). Toxicol Environ Chem 7:49-77

Claisse D., (1989). Chemicals concentration of french coast : the result of ten year mussel watch.Mar. Pollut. Bull. 20: 523-528.

Claisse D., D. Cossa J. Bretaudeau-Sanjuan G., Touchard., Bombled B., (2001). Methylmercury in molluscs along the French coast. Mar. Pollut. Bull. 42(4): 329-332.

Clément., B., Müller C., Verrhiest G., (2000). Influence of exposure conditions on the bioavailability of fluoranthene to Daphnia magna (Cladocera). Polycyclic Arom. Comp. 20, 259-274.

Clonfero E., Zordan M., Cottica D., Venier P., Pozzoli L., Cardin E.L., Sarto F. and Levis A.G**.** (1986). Mutagenic activity and polycyclic aromatic hydrocarbon levels in urine of humans exposed to therapeutical coal tar. *Carcinogenesis,* 7, 5, 819-823.

Codex alimentarius., (2009). Code d'usages pour les poissons et les produits de pêche,1ere édition. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires ISBN 978-92-5-205914-1 ISSN 1020-2560.

Collin F., (2000) Détermination des signatures granulométriques et chimiques de particules prélevées à l'échappement de moteurs diesel et en atmosphère urbaine. Thèse d'Université Paris VI, Paris.

Connell, J.J., (1975). Control of Fish Quality. 1st Edition. Fishing News Books Limited, London.

Corvi C., Khim-HeANG S., Zimmerli P., (2001). Métaux et micropolluants organiques dans les poisons et les moules du Léman. Campagne 2000.145-159.

Cossa D., Bouget E., (1980). Trace element in *Mytilus edulis* from the estuary and gulf of St. Lawrance, Canada: Lead and cadmium concentrations. Environ.Pollut.Ser.A., 23 : 1-8.

Cossa D., Abarnou A., Andral B., Bougrier S., Buestel D., Claisse D., Hatt P. J., Stanisiere J. Y., (1998). De l'usage de la méthode des transplants de moule pour le suivi de la contamination chimique le long des cotes méditerranéennes françaises. Compte rendu et recommandations de l'atelier RINBIO, Rapport DEL/PC, RA708, Ifremer: 76

Crespo A., (2009). Présence et sources des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le bassin d'Arcachon N° d'ordre : 3981.thèse à l'université Bordeaux1.

D

Dainty R.H., Edwards R.A., Hibbard C.M., Ramantanis S.V., (1986). Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beef. Journal of Applied Bacteriology 61, 117-123.

Dalgaard P., Emborg J., (2009) : Histamine fish poisoning - new information to control a common seafood safety issue. Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control (pp. 1140e1160). In C.d. W. Blackburn, & P. J. McClure (Eds.), Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.

De Perre.C., (2009). Étude des interactions matière organique dissoute-Contaminants organiques dans l'environnement aquatique. N° d'ordre : 3933. Thèse d'Université Bordeaux 1.

De Perre C., Crespo A., Abou Mrad N., Le Ménach K., Jaber F., Parlanti É., Budzinski H., (2009). Intérêt de la micro-extraction sur phase solide couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les eaux. Spectra analyse n° 266, 28-35.

Denissenko M.F., Pao A., Tang M., Pfeifer G.P., (1996). Preferential formation of benzo[a]pyrène adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, 274, 430-432.

Denton G.R.W., Burdon-Jones C., (1981). Influence of temperature and salinity on the uptake distribution and depuration of mercury, cadmium and lead by the black lip oyster Saccostrea echinata. Marine Biology 64:317-326.

DEPF (Direction des Etudes et des Prévisions Financières) (2008). Analyse du secteur des pêches et de l'aquaculture dans le nouveau contexte. http://www.finances.gov.ma/depf/depf.html

DGAL (2011). Bilan 2010 des plans de surveillance et de contrôle. Sous direction du pilotage des ressources et des actions transversales, Bureau des laboratoires et de la coordination des contrôles officiels. agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/recueil_tt_public_PSPC_2010_v4.pdf.

Dietrich. M., (1998). Les métaux lourds et leurs effets sur la santé, conférence, l'école polytechnique de Zurich.

Diop M B., Destain J., Tine E., Thonart P., (2010). Les produits de la mer au Sénégal et le potentiel des bactéries lactiques et des bactériocines pour la conservation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(2), 341-350.

Duflos G., (2009). Histamine risk in fishery products. Bull. Acad. Vét. France (2009) - Tome 162 - N°3 http://www.academie-veterinaire-defrance.org

Duflos G., Dervin C., Malle P., (1999). Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (Pleuronectes platessa) and whiting (Merlangus merlangus). Journal AOAC international, vol 82, n°5, 1097-1101

Dugo G. Mo., Vilasi F., La Torre G.L., Pellicano T.M., (2006). Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines, Food Chemistry , 95: 672-676.

E

Edward D. Goldberg E.D ., (1975). Volume 6/Humber. The Mussel Watch- A First Step in Global Marine Monitoring/Scripps Institution of Oceanography,.La dolla, CA 92037, U.S.A.

EC SCF., (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons-occurrence in foods, dietary exposure and health effects. European Commission, Scientific Committee for Food (SCF), Brussels, Belgium, SCF/SC/CNTM/PAH29Final (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154_en. pdf).

Echab A., (1996). Contamination of Mohammadia coastal city by heavy metals (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb), p. 109–112. In International Symposium on Environment Pollution and Impact Assessment. Mohammadia, Maroc.

EFSA., (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Q-2007-136) The EFSA Journal 724, 1-114.

Eisler R., (1981). Trace Metal Concentrations in Marine Organisms Pergamon Press, Inc., Elmsford, NewYork.

El hamzoui R., Raissouni A., El arrim A., (2011). L'apport de la géomatique dans la gestion des zones côtières. Application d'un SIG côtier (Rif nord occidental, Maroc).Conférence Méditerranéenne Côtière et Maritime, EDITION 2, TANGER, MAROC. Disponible en ligne – http://www.paralia.fr.

El Marrakchi A., Bennour M., Hammama A., Khaidar S., (1993). Bactéries actives dans l'altération de la sardine entrepose sous glace et a température ambiante. Réunion communes des commissions C2,D1,D2 et D3.Institut International du froid.

El Marrakchi A., Bennour M.,Bouchriti N.,Hammama A, Tagafait H.,(1990).,Sensory, Chemical and microbial assesement of moroccan sardines (sardine pilchardus)stored in ice. J Food Prot.153.pp, 600-605.

El Morhit M., (2009), Hydrochimie, éléments traces métalliques et incidences écotoxicologiques sur les différentes composantes d'un écosystème estuarien (Bas Loukkos). Thèse Univ. Mohamed V, FS. Rabat. p 260.

El Skaily A., Khaled A. El Nemr A., (2005). Heavy monitoring using bivalves from Mediterranean Sea and Red Sea. Environ. Monitor. Assessment, 98, 41-58.

Emborg J., Dalgaard P., Ahrens P., (2006). Formation histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna : an investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoninh.journal of food protection.69:897-906.

Erickson D. C., Loehr R. C., Neuhauser E. F., (1993). PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Water Research* 27(5):911-919.

Er-Raioui.H., Bouzid.S, Marhaoui.M. Saliot, A., (2009). Hydrocarbon pollution of the Mediterranean coastline of Morocco. Ocean & Coastal Management 52, p.124-129.

Essedaoui A., Sif J., (2001). Bioaccumulation des métaux lourds et induction des métallo-protéines au niveau de la glande digestive de Mytilus galloprovincialis. Actes Inst. Agron. Vet., Rabat, 21, 1, 17-25.

Essedaoui A., Masse H., Sif J., (1998). Etude de l'effet du cadmium sur l'activité de l'estérase C4, l'α-amylase, la valine arylamidase et la β galactosidase chez le mollusque *Mytilus galloprovincialis* dans la région de Jorf-Lasfar (El Jadida, Maroc) *Bulletin de l'Institut Scientifique,* Rabat, 1997-1998, n°21, pp. 89-94.

Essedaoui A. Sif J. (2000). Variation des activités estérasiques sous l'effet de la pollution métallique chez *Mytilus galloprovincialis* de la région de Jorf-Lasfar (Maroc). *J. Rech. Océanogr*., 25, 3/4, 34-42.

F

Fadil F,. Maarouf A,. Zaid A. (1997). Utilisation de Gammarus gauthieri pour tester la toxicité des sédiments des eaux douces. Annls. Limnol. 32:73–78.

Fadhlaoui-Zid K., Curiel J A., Landeta G., Fattouch S., Reverón I., De las Rivas B., Sadok S., Muñoz R.,(2012) Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardineand mackerel. Food Control 25, 89-95.

Fang J., Wang K-X. (2007). Multiresidual Analysis of Organochlorine Pesticides,Polychlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Shellfishes by Gas Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. Chinese journal of analytical chemistry.Volume 35, Issue 11

FAO (Organisation des Nations unies pour l'Agriculture et l'Alimentation) (1995). Quality and changes in fresh fish. Chemical composition. http://www.fao.org/docrep/V7180E/V7180e05.html.

FAO/OMC (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Organisation mondiale de sante). (2011)., Activités mixtes FAO/OMS sur CTIVITÉS MIXTES FAO/OMS SUR L'évaluation des risques microbiologiques présentes par les aliments, risque pour la sante publique présente par l'histamine et les autres amines biogènes présentes dans le poisson et produits de pêche : recherche de données et experts.

Fernandez-Salguero J., Mackie I.M., (1987). Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (Melanogammus aeglefinus) and herring (Clupea arengus) as determined by the formation of non-volatile and volatile amines. Int. J. Food Sci. Technol. 22, 385–390.

Ferreira M.M.C., (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons: a QSPR study. *Chemosphere*, 44, 125-146.

G

Gabet S., (2004). Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique.Thèse n° : 12-2004 L'Université de Limoges.

Garthwaite G.A., (1992).Chilling and freezing of fish in fish processing technology.Hall.G.M.(Ed).Blackie Academic & Professional.new York: 89-113.

Garrigues P., Narbonne J.F., Budzinski H., Morin B., Augagneur S, Mora P.,Clerandeau C., (2002). Etude de la contamination chimique de l'estuaire de la seine par l'utilisation de biomarqueurs, de bioessais et couplage avec ces analyses chimiques. UMR 5472 CNRS, p 40.

Gary J., Atchison., Mary G., Henry., Mark B. Sandheinrich., (1987). Effects of metals on fish behavior: a review. Environmental Biology of Fishes Vol. 18, No. 1, pp. 11-25.

GBPHAP-HACCP., (2010). Guide de Bonne Pratique d'Hygiène et d'application des Principes d'HACCP, vol.3, halles à marée marche de gros.TMIS et 2F conseil. Ministère d'agriculture et pêche maritime. pp, 148.

Ghali S., (2008). Étude de la carbonisation d'un précurseur végétal, les noyaux d'olives. Utilisations dans le traitement des eaux. Mémoire de Magister. République Algérienne démocratique et populaire Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique. Université de 20 août 55-SKIKDA.

Ghanjaoui M.A., (2009). Mise au point de nouvelles méthodes analytiques spectroscopiques et électrochimiques de détection des éléments traces dans différents types de matrices. Thèse d'Université Hassan II.FSTM.

Geffard O., (2001). Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, Biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Université Bordeaux 1.

Glasby G.P., Szefer P., Geldon J., Warzocha J., (2004). Heavy-metal pollution of sediments from Szczecin Lagoon and the Gdansk Basin, Poland. Science of the Total Environment 330 (2004) 249–269.

Glória M. B. A., (2006). Bioactive amines. In Y. H. Hui (Ed.), Handbook of Food Science, Technology and Engineering, Vol. I (pp. 13.1e13.38). Boca Raton, LA: CRC Press

Gourlay C., (2004). Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : Influence de la matière organique naturelle et anthropique. Thèse à l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts Centre de Paris.

Gram L., Huss H.H., (2000). Fresh and processed fish and shellfish. In: Lund, B.M., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W. (Eds.), The Microbiological Safety and Quality of Foods, 1st Edition. Chapman & Hall, London, pp. 472–506.

Gram L. ,Huss H.H., (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.

Greenwood N.N., Earnshaw A., (1984). Chemistry of the elements. Première édition. Pergamon Press, Oxford. 248 pp.

Grimmer G., Dettbarn G., Jacob J.**,** (1993). Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in highly exposed coke plant workers by measurement of urinary phenanthrene and pyrene metabolites (phenols and dihydrodiols). *Int Arch Occup Environ Health,* **65,** 3, 189-199. *Biochemisches Institut Umweltcarcinogene, Grosshansdorf, Germany.*

Gobeil C., Macdonald W., Sundby B., (1997). Diagenetic separation of cadmium and manganese in suboxic continental margin sediments, Geochim. Cosmochim. Acta, 61, 4647-4645, 1997.

Goldberg E. D., Bowen V. T.., Farrington J. W., Harvey G., Martin J. H., Parker P. L., Risebrough R. W., Robertson W., Schneider E., Gamble E., (1978). The Mussel Watch. Envir. Conserv. 5: 101-125.

Goldberg Edward D. (1975) The Mussel Watch- A First Step in Global Marine Monitoring/Scripps Institution of Oceanography, La dolla, CA 92037, U.S.A/ Volume 6/Humber 7.

Golgberg E.D., (1986). The mussel watch Concept. Environ. Monitor and Assess, 7, pp. 91 – 103.

Gundel L.A., Mahanama K.R.R., Daisey J.M., (1995) Semivolatile and particulate PAH's in environmental tobacco smoke : cleanup, speciation and emission factors. *Environ*. *Sci*. *Technol*., 29, 1607-1614.

H

Halasz A., Barath A., Simon-Sarkadi L., Holzapfel W., (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food, Trends in Food Science & Technology, 5: 42-49.

Harrison R., Laxen, D., Wilson S., (1981). Chemical associations of lead, cadmium, copper and zinc in street dusts and roadside soils. Environmental Science and Technology 15, 1378-1383.

Hatch A.C., BurtonJr G.A., (1999). Photo-induced toxicity to *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*: effects of mixtures and behavior, *Environ. Pollut.*, 106, 157-167.

Heemken O.P., Theobald N., Wenclawiak B.W., (1997). Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, Sonication, and Methanolic Saponification Extractions for the Determination ofOrganic Micropollutants in Marine Particulate Matter. *Anal*. *Chem*., 69, 2171-2180.

Hill A.J., Ghoshal S., (2002). Micellar solubilization of naphthalene and phenanthrene from nonaqueous-phase liquids, Environ. Sci. Technol., 36, (18), 3901-3907.

His E., Budzinski H., Geffards O., Beiras R., (1997). Effetcs of a hydrocarbon-polluted sediment on Crassostrea gigas (Thunberg) metamorphosis.C.R.Acad.Sci.Paris.Sciences de la vie.320, p.797-803.

Hobbs G., (1983). Microbial spoilage of fish. *In:* Food Microbiology Advances and prospects. *Academic Press (Ed), London. The society for applied bacteriology symposium, series 11.* Pp 217-229.

Horwitz W., Kamps L.R., Boyer K.W., (1980). Quality Assurance in the analyses of foods for traces constituents. Journal of the association of analytical chemistry,63(3),1344-1354.

Huss H.H., (1999). La qualité et son évolution dans le poisson frais. FAO, Documents Techniques sur les pêches-T 348.Rome :196 p.

I

IARC (1983) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals in humans, Polynuclear aromatic compounds, Part.1, Chemical, Environmental and Experimental Data, Lyon

IARC, WHO. (2002). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume**.**82 some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene.

Idardare Z., Moukrim A., Chiffoleau J.F., Ait alla A., (2011). Trace metals in the clam *Donax trunculus* L. from the Bouadisse sandy beach, discharge zone of a plant sewage outfall in Agadir Bay (Morocco). Bayed A. (ed.). Sandy beaches and coastal zone management – Proceedings of the Fifth International Symposium on Sandy Beaches, 19th-23rd Rabat, Morocco.*Travaux de l'Institut Scientifique*, Rabat, série générale, 2011, n°6, 51-58.

Ifremer., (1991). Connaissance de la matière première et étude des barèmes de traitement thermique de cuisson sous vide du poisson en cycle court Etude et expérimentation d'un pasteurisateur industriel pour la préparation de plats cuisinés en cycle court. Convention: Afrem – Ifremer. Rapport final.

INERIS (2006) éléments traces métalliques, guide méthodologique. Recommandation pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. DRC-06-66246/DESP-R01a. Rapport d'étude.

INERIS (2011). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Cadmium et ses dérivés. Ineris-DRC-01-25590-V1, Version N°3.2-septembre.

INERIS (2007) Fiche toxicologique, Benzo[a]pyrene. FT144. Numéro Cas 50-32-8. Numéro CE 200-028-5.Index 601-032-00-3.

INSERM (2001) - Expertise collective - Susceptibilités génétiques et expositions professionnelles. Paris, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. INSERM.

IPCS, (1998). International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria, 202: Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbon. WHO, Geneva, Switzerland (http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm).

ISO/CEI 17025. (2005). Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, Deuxième édition 2005-05-15 ; Version corrigée 2005-11-01.

ISO 90-210. (2009). Qualité de l'eau. Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire-ISSN 0335-3931.

J

JAMP., (2002). Guidelines for Monitoring Contaminants in Sediments. Commission OSPAR. Lignes directrices de la surveillance continue. Réf. No: 2002-16.

Jorgensen, L.V., Huss, H.H., Dalgaard, P., (2000). The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. Journal of Applied Microbiology, 89, 920-934

Jorgensen, L.V., Dalgaard, P., Huss, H.H., 2000. Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (Salmon salar) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. J. Agric. Food Chem. 48, 2448–2453.

K

Kamal-Eldin A., Yanishlieve N.V., (2002). N-3 fatty acids for human nutrition: stability considerations. European Journal of Lipid Science and Technology 104 (12):825-836

Kaimoussi, A. (1996). Etude de la variabilité de l'accumulation des métaux lourds dans les différents compartiments (sédiments, mollusques et algues) du littoral de la région d'El Jadida. Thèse 3ème Cycle, Univ. Chouaib Doukkali, FS. El Jadida, 147 p.

Kaimoussi, A., Chafik, C., Mouzdahir, A., Bakkas, S., (2001). The impact of industrial pollution on the Jorf Lasfar coastal zone (Morocco, Atlantic Ocean): the mussel as an indicator of metal contamination. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences 333, 337-341.

Kao J., Patterson F.K.,. Hall J., (1985) . Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an *in vitro* study with benzo[a]pyrene and testosterone. *Toxicol Appl Pharmacol,* 81, 3, 502-516.

Kennaway, D.M., Ernest D.Sc, F.R.S. (1955). The identification of carcinogenic compounds in coal-tar. British Medical Journal, 749–752.

Khansari Emami F., Khansari Ghazi M. , Abdollahi M.,(2005). Food Chemistry 93 293–296. Heavy metals content of canned tuna fish.

Kolodziejska I., Sikorski Z.E., (1995). Muscle cathepsins of marine fish and invertebrates. Pol. J. Food Nutr. Sci., 45,3-10.

Konings W.N., J.S. Lolkema., H. Bolhuis., H.W. van Veen., B. Poolman., Driessen A.J.M., (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria, Ant.van Leeuwenhoek, 71: 117-128.

Kotin P., Falk H.L., Busser R., (1959). Distribution, retention, and elimination of 14C -3,4-benzpyrene after administration to mice and rats. *J Natl Cancer Inst,* 23, 541-555.

Koutsoumanis, K., Giannakourou, M.C., Taoukis, P.S., Nychas, G.J.E., (2002). Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. Int. J. Food Microbiol. 73, 375–382.

Kurek E.,Czaban J. and Ballag J.M.,(1982).Sorption of cadmium bay microorganismes in competition with other soil constituents.Appl.and Env. Microbiol., 43(5) ,1011-1015.

L

Landete J.M., Pardo I., Ferrer S., (2006). Histamine, histidine, and growth-phase mediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine, FEMS Microbiology Letter, 260: 84-90.

Laflamme, R.E., Hites, R.A., (1978). The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. Geochim. Cosmochim. Acta 42, 289e303.

Landrum, P.F., Robbins, J.A., (1990). Bioavailability of Sediment Associated Contaminants to Benthic Invertebrates. Lewis Publisher, Michigan.

Laouina A, (2006). Identification des risques Le littoral marocain, milieux côtier et marin. pp.1-30.

Lauwerys R.R., Buchet J.P., Roels H.A., Brouwers J. and Stanescu D. (1974). Epidemiological survey of workers exposed to cadmium. *Arch Environ Health,* 28, 145-148.

Leblanc J-C., (2006). Etude des consommations alimentaires de produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, Polluants et Oméga 3. Calipso. (www.paris.inra.fr /metarisk /content/download/.../CALIPSO_FR).

Ledesma E.B., Kalish M.A., Nelson P.F., Wornat M.J., Mackie J.C. (2000). Formation and fate of PAH during the pyrolysis and fuel-rich combustion of coal primary tar. *Fuel*, 79, 1801-1814.

Le du-lacoste M., (2008). Etude des phénomènes de biotransformation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par les organismes aquatiques (poisson). Relation-Exposition-Génotoxicité. N° d'ordre : 3929. Thèse d'Université Bordeaux 1.

Leduc F., (2011). Evaluation de la qualité des poissons frais par des approches chimiques. Thèse d'Université Lille1 - Sciences et Technologies N° d'ordre 40 769. http://ori-nuxeo.univ-lille1.fr/nuxeo/site/esupver.

Leroi F, (2009). Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications Industrielles des bactéries lactiques" Djamel Drider et Hervé Prévost coordonnateurs, Préface Dr. Alexandra GRUSS November 2009, Chapter V, Pages 459-474 ISBN 9782717856767 ÉCONOMICA.

Letellier M., Budzinski H., Bellocq J., Connan J. (1999). Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes from sediments and source rocks Organic Geochemistry 30, pp. 1353-1365

Li J.,Chen B.H, (2002). Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants, *Chemical Engineering Science*, 57, (14), 2825-2835.

Liston J., (1980). Microbiology in fishery science. *In :* Advances in Fishery Science and Technology. *J.J. Connell (Ed.), Fishing News Books, Farnham, England.* Pp. 138-157.

Lopez Sebater.E.I., Rodriguez J.J., Rois-Sagues.A.X., Mora ventura.M.T., (1993).Determination of histamine in fish using an enzymic method.Food.add and Contam.10.5.pp, 593-602.

M

Maanan M., Zourarah B., Carruesco C., Aajjane A., Naud, J., (2004). The distribution of heavy metals in the Sidi Moussa lagoon sediments (Atlantic Moroccan Coast). Journal of African Earth Sciences 39. 473–483.

Maanan M., (2007). Biomonitoring of heavy metals using the intertidal mussel Mytilus galloprovincialis in Safi coastal waters, Morocco. Environmental Toxicology 22, 525-531.

Madhavan N.D., Naidu K.A., (1995).Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta,maternal blood, umbilical cord blood and milk of Indian women. *Hum Exp Toxicol,* 14, 6, 503-506. *Department of Biochemistry and Nutrition, Central Food Technological ResearchInstitute, Mysore, India.*

Mah J-H., Hwang H-J., (2010). Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture, , Food Control, 20: 796-801.

Mahyaoui M. Saghi M., (1987). Etude de la pollution de l'eau de mer par les metaux lourds.Rev. int.Oceanogr.Med. 87-88, pp. 115-124.

Mahyaoui M., Saghi M., Krchaf I., (1989), Etude de la pollution (Cd,Cu,Pb, Zn) du littoral atlantique Marocain entre Kénitra et Témara., Chemosphere, Vol.18, Nos.7-8, pp 1639-1655,

Mance, G., Worsfold P.J. (1987).Pollution threat of heavy metals in aquatic environment. Elsevier, ISBN 1-85166-03919.372pp.

Mangani S., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M., (2005). Putrescine Accumulation in Wine: Role of *Oenococcus oeni*, Current Microbiology, 51 : 6-10.

Mansour M., (2003). Environnements littoraux et aménagement durable: Apport de l'information spatiale, Maroc 2nd FIG Regional Conference Marrakech, Marocco.

Marcé R.L., Burrull F., (2000). Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *J. of Chromatography A*., 885, 273-290.

Marchand M., (2008). La pollution chimique marine, Quelles politiques pour une protection durable de l'océan et des mers côtières ? L'actualité chimique - N° 325.

Marcobal A., Polo M.C., Martin-Alvarez P.J., Moreno-Arribas M.V., (2005). Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines, Food Research International, 38: 387-394

Martin-Garin.A., Simon,O., (2004). Fiche Radionucléide, Cadmium et environnement. Direction de l'environnement et de l'intervention-Service d'étude du comportement des radionucléides dans les écosystèmes.

Marr L.C., Kirchstetter T.W., Harley R.A., Miguel A., Hering S.V., Hammond S.K., (1999) Characterization of PAH's in motor vehicle fuels and exhaust emissions. *Environ*. *Sci*. *Technol*., 33, 3091-3099.

Matee. (2006)., Audit intégral du littoral marocain, MATEE, INEA-TEC 2006 p6.

Matee. (1999)., Biodiversité et milieu naturel -rapport sur l'état de l'environnement du Maroc, p162.

Matee/DE/CL, (2005). Eléments pour une stratégie de protection et de gestion intégrée du littoral. Cellule du Littoral / MedWetCoast Maroc.

Mauri M., (1985). Les Mollusques Bivalves marins comme bioindicateurs pour les metaux lourds.Symbiose.17.pp, 89-98.

Mazzoli R., Lamberti C., Coisson J.D., Purrotti M., Arlorio M., Giuffrida M.G., Giunta C., Pessione E., (2008). Influence of ethanol, malate and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from an Italian red wine, Amino Acids, 36: 81-89.

McElroy A.E., Farrington J.W.., Teal. J.M.,(1989). Bioavailability of PAHs in the aquatic environment. In: Metabolism of PAHs in the aquatic environment, U. Varanasi, ed. CRC Press, Inc., Boca Raton,FL.

Menzie C.A., Potocki B.B., Santodonato J., (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. Environmental Science and Technology 26(7), 1278-1284.

Merzouki M., Talib N., Sif J., (2009). Indice de condition et teneurs de quelques métaux (Cu, Cd, Zn et Hg) dans les organes de la moule *Mytilus galloprovincialis* de la côte d'El Jadida (Maroc) en mai et juin 2004. *Bulletin de l'Institut Scientifique*, Rabat, section Sciences de la Vie, n°31 (1), 21-26.

Metayer C., Amiard J.C., Amiard-Triquet C. et Berthet B., (1985). Facteurs biologiques et écologiques contrôlant le niveau d'éléments traces (Cd, Pb, Cu, Zn) chez les moules et les huîtres de la baie Bourgneuf. Bull. Sco. Sc. Nat., Nlle série, 7(2) : 53-69.

Mhamada M., Ould mohamed Cheikh M., Daridge A., Er-raoui H., (2011). Etat de la contamination des côtes atlantiques de Nouadhibou par les métaux lourds (Mauritanie) Conférence Méditerranéenne Côtière et Maritime EDITION 2, TANGER, MAROC.

Mietz J.L., Karmas E., (1977). Chemical quality index of canned tuna as determined by high pressure liquid chromatography. J. Food Sci. 42, 155–158.

Minier C., Bocquené G., Jaouen A., Guyot T., Tutundjian R., Miramand P., Abarnou A., Leboulenger F., (1998), Mesure des contaminants et suivi des biomarqueurs de pollution chez la moule *Dreissena polymorpha* en Seine Aval fluvial. Séminaire Seine Aval, Rouen

Miramand P, Fichet D, Bentley D, Guary J-C, Caurant F., (1998).Concentrations en metaux lourds (Cd, Cu, Pb, Zn) observées le long du gradient de salinite dans le reseau trophique pelagique de l'estuaire de la Seine.C.R.Acad.Sci.paris,Sciences de la terre et des planetes/Earth & Planetary Sciences,327,259-264

Mojtaba S., Jalal H.,(2010). A novel miniaturized homogenous liquid–liquid solvent extraction-high performance liquid chromatographic-fluorescence method for determination of ultra traces of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment samples Journal of Chromatography A, 1217,p 4877–4882.

Moukrim A., Kaaya A., Najimi S., Roméo M., Gnassia-Barelli M., Narbonne JF., (2000). Assessment of the Trace Metals Level in Two Species of Mussels of the Agadir Marine Bay (south of Morocco). Bull Environ Contam Toxicol 65:478-485

Moustaid K., Nasser B., Baudrimont I., Anane R., El Idrissi M., Bouzidi A, Creppy E.E., (2005), Évaluation comparée de la toxicité des moules (Mytilus galloprovincialis) de deux sites du littoral atlantique marocain sur des souris. C. R. Biologies 328 (281–289).

Munaron D., (2004). Principaux contaminants organiques, séminaire-RSL-contamination chimique, Sète. Ifremer.

Mzoughi N., Hellal F., Dachraoui M., Villeneuve J-P., Cattini C., De Mora S.J., El Abed, A., (2002). Méthodologie de l'extraction des hydrocarbures aromatiques polycycliques .Application a des sédiments de la lagune de Bizerte (Tunisie).C.R Géoscience 334, p.893-901.

N

Nakhil S., Ghazi A. (2008). Quels outils pour un développement durable des zones côtières marocaines. Actes du Coll. Int. "Le littoral : subir, dire, agir", Lille, France,pp 1-7. [disponibe sur : http://www.meshs.fr/documents/pdf/publications/actes/colloque_littoral/Nakhli-Ghazi.pdf]

NEFF J.M., (1979). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the aquatic environment – sources, fates and biological effects. Applied Science Publishers LTD, Essex, England, 1979, ISBN 0-85334-832-4.

NF V03-110., (2010). Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude - ISSN 0335-3931.

Nicolaou K., Masclet P., Mouvier G. (1984). Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere–a critical review. *The science of the total environment*, **32**, 103-123.

Niencheski L.F, Baumgarten, M.G.Z, (2000). Distribution of particulate trace metal in the southern part of the patos lagoon estuary. Aquatic Ecosystem Health and Management, vol 3, issue 4, pp 515-520.

Nisbet I.C., Lagoy P.K., (1992). Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Regulatory Toxicology and Pharmacology, 16, 290-300.

NIST special publication.(2002). *Document internet, http://ois.nist.gov/pah*

Norme marocaine (2008) - Microbiologie des aliments : Règles générales pour les examens microbiologiques; NM 08.0.101- (ISO 7218/2007)

Norme marocaine (2001) - Microbiologie des aliments : Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 1 : Règles générales

pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales; NM 08.0.100 – (ISO 6887-1/1999)

Norme marocaine (2007) - Microbiologie des aliments : Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique – Partie 3 : Règles spécifiques pour la préparation des produits de la pêche; NM 08.0.118 – (ISO 6887-3/2003)

Norme marocaine (2007) - Microbiologie des aliments : Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes – Technique par comptage des colonies à 30°C; NM 08.0.102 – (ISO 4833/2003)

Norme marocaine (2007) - Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes psychotropes; NM 08.0.157 – (ISO 17410/2001)

Norme marocaine (2009) - Microbiologie des aliments : Dénombrement des Entérobactéries présumées par comptage des colonies à 30°C ou à 37° C; NM 08.0.109 – (NF V 08-054/2009)

Norme marocaine (2009) - Microbiologie des aliments : Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44°C; NM 08.0.124 – (NF V 08-060/2009)

O

Obana H., ori S., Kashimoto T. and Kunita N. (1981). Polycyclic aromatic hydrocarbons in human fat and liver. *Bull Environ Contam Toxicol,* 27**,** 1, 23-27.

O'Connor T.P., (1996). Trends in chemical concentrations in mussels and oysters collected along the US coasts from 1986 to 1993.Marine Environmental Rresearch 41,183-200.

Orban E., Di Lena G., Nevigato T., Casini I., Marzetti A., Caproni R. (2002). Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *FoodChemistry,* 77, 57-65

P

Paleologos E.K.,. Savvaidis I.N, Kontominas M.G. (2004); Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (Dicentrarchus labrax) - Food Microbiology 21; 549–557

Pena.T.,Pensado.L.,Casais.C,Mejuto.C.,Phan-Tan-Luu.R.,Cela.R.(2006).Optimization of a microwave-assisted extraction method for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples.journal of chromatography A,1121,p.163-169.

Pelletier M.C., Burgess R.M. H. K. T., Kuhn A., McKinney R.A., Ryba S.A., (1997). Phototoxicity of individual PAHs and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:2190-2199.

Perraudin E., (2004). Réactivité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) adsorbés sur des particules modèles d'intérêt atmosphérique : mesures cinétiques, développements analytiques et analyse des produits d'oxydation. Thèse N° 2919 Université Bordeaux I

Perraudin E, Budzinski H, Villenave E., (2005). Kinetic study of the reactions of NO2 with polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on silica particles. Atmospheric Environment 39 6557–6567.

Pereira V., Pontes M., Câmara J.S., Marques J.C., (2008). Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldeyde derivatization procedure, Journal of Chromatography A, 1189: 435-443.

Perez T., Sartoretto S., Soltan D., Capos S., Fourt M., Dutrieux E., VaceletJ., Harmelin J.G., Rebouillon P. (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, 642 pp.

Petrovic S., Ozretic B., Krajnovic-Ozreti M., Bobinac D., (2001). Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytillus galloprovincialis*) as biomarkers in a field study. Marine Pollution Bulletin Vol. 42, No.12, pp.1373-1378.PII:S0025-326X (01)001679.

Petrovic S, Semencic L, Ozretic B, Ozreti M. (2004). Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). Marine Pollution Bulletin 49, pp.713–720.

Phillips D.J.H., (1995).The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. Mar. Pollut. Bull. , 31 (4–12) : 193–200.

Phillips D.J.H., (1976). - The common mussel Mytilus edulis as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I - Effets of environmental variables on uptake of metals. Mar. Biol., 38, pp. 59-69.

Phillips D.J.H., (1980). Quantitative aquatic biological indicators. Applied Science Publishers, Essex, UK.

Philps D.J.H., (1977) The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in the marine and estuarine environment, Environment pollution 13 :281-313.

Piccardo M.T.,Coradeghini R.,Valerio F,(2001). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons pollution in native and caged mussels, Marine pollution bulletin 42, p.951-956.

Pickering R.W., Phil M., Biol F.I. (1999) A toxicological review of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Toxicol*. *Cut & ocular Toxicol*., 182, 101-135.

Porte C, Escartin E., Luz M., De la Parra G., Biosca X, Albaigés J., (2002). Assessment of coastal pollution by combined determination of chemical and biochemical markers in Mullus barbatus Vol. 235: 205–216. Mar Ecol Prog Ser

Porte, C., Albaiges, J., (1993). Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans and fishes. Archives of environmental Contamination and toxicology.26, 273-281.

PPSHAP., (2004). Programme pilote de surveillance des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Qualité de l'air, études Airfobep (association pour la surveillance de la qualité de l'air de la région de l'Etang de Berre et de l'ouest des Bouches du Rhones.wwww.airfobep.org

Q

QRNB (Quatrième rapport National sur la biodiversité).,(2009) Secrétariat d'Etat auprès du Ministère de l'Energie, des Mines, de l'Eau et de l'Environnement, chargé de l'Eau et de l'Environnement. Département de l'Environnement.Dépôt Légal : 2009 / 3367. ISBN : 978 - 9954 - 475 - 39 – 3

R

Rababah A., Matsuzawa S., (2002). Treatment system for solid matrix contaminated with fluoranthene. II - Recirculating photodegradation technique, *Chemosphere*, 46, 49-57.

Rachidi A., Alvinerie M., Dalal A., (1995). Evaluation de l'état de fraîcheur des produits de la pêche I. Intérêt et limites de l'évaluation sensorielle et chimique du poisson frais. Revue de Médecine Vétérinaire, 146, 5, 327-332.

Rachidi A., (1997). Evaluation des critères d'appréciation de l'état de fraicheur et de la qualité hygiénique du poisson. Faculté des Sciences Semlalia.

Ramade F., (1993). Environmental and ecotoxicological problems in the Mediterranean countries. The Science of the Total Environment. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Ramade F., (1978). Elements d'ecologie appliqué.2nd edition. Mc Graw Hill. Paris. 451 p.

Règlement (CE) N° 2005/10 de la commission du 4 février (2005). Directive portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en benzo(a)pyrène des denrées alimentaires.

Règlement (CE) N° 2074/2005 de la commission du 5 décembre (2005). Règlement établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) no 853/2004 du Parlement européen

Règlement (CE) N° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre (2005). Règlement concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires

Règlement (CE) N°22/2001, Directive 2001/22/CE de la commission du 8 mars (2001) portant fixation de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en plomb, cadmium, mercure et 3-MCPD dans les denrées alimentaires

Règlement (CE) N°333/2007, de la commission du 28 mars 2007 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en plomb, en cadmium, en mercure, en étain inorganique, en 3- MCPD et en benzo(a)pyrène dans les denrées alimentaires.

Règlement (CE) N°657/2002 du Conseil du 12 août (2002) - Journal officiel des Communautés européennes du 17.08.2002

Règlement (CE) N°11441/2007, de la Commission du 5 décembre (2007), modifie concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) (JO L 338 du 22.12.2005, p. 1)

Règlement (CE) N° 221/2002 de la commission, modifiant le règlement (CE) N°466/2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. « Journal officiel des communiés européennes ». Fait à Bruxelles, le 19 janvier 2005. Par la Commission. « Markos KYPRIANOU » Membre de la Commission.

Règlement (CE) N° 629/2008 de la commission modifiant le règlement (CE) N°1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. « Journal officiel des communiés européennes ». Fait à Bruxelles, le 2 juillet 2008. Par la Commission « Androulla VASSILIOU » Membre de la Commission.

Règlement (CE) N°1881/2006 de la commission portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. « Journal officiel des communiés européennes ». Fait à Bruxelles, le 19 décembre 2006. Par la Commission « Markos KYPRIANOU » Membre de la Commission.

Règlement (CE) N o 835/2011 de la commission du 19 août 201.Modifiant le règlement (CE) N°1881/2006 en ce qui concerne les teneurs maximales pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les denrées alimentaires. Journal officiel de l'Union européenne

Regoli F., Orlando E., *(*1993). *Mytilus galloprovincialis* as a bioindicator of lead pollution: biological variables and cellular responses' the Total Environment, Supplement. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

RNO., (1995). Surveillance du milieu marin. Travaux du Réseau National d'Observation. Edition 1995. Ifremer et Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement., IFREMER (France).

Robbe D., Marchandise P., (1981). Analyse du transfert des micropolluants metallique dans le milieu naturel. L'étang de Baslin près de l'autoroute A6. Bull. Liaison Labo P. et Ch, 112,pp 229-234.

Romeo M., Gnassia-Barelli M., Carre C., (1987). Trace metals: Cd , Cu, Pb and Zn in gelatinous macroplankton from the northwestern Méditerranéan. *Wat. Res.* 21(10) : 1287-1292.

RooneyC.P., Mclaren R.G. and Crosswell R.J. (1999). Distibution and phytoavailability of lead in a sail contaminated with lead shot. Water, air and soil pollution, 116, p, 535-548.

Roussel B.T., (2002). Contribution à l'étude de la partition des HAP entre les phases gazeuse et particulaire : Validation de la technique de prélèvement par tube Denuder annulaire. Université de Provemce - Aix-MareseilleI.pp 209

S

Sanjuan J.,Cossa D., (1993). Dosage automatique du mercure total dans les organismes marins par fluorescence atomique. Rapport IFREMER, n° R.INT.DEL/93.12/NANTES.

Samanta S.K., Singh O.M., Jain R.K., (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation – review, Trends in Biotechnology, 20, (6), 243- 248.

Santos M.H.S.,(1996). Biogenic amines: their importance in foods, Int. J. Food Microbiol. 29 213–231.

Sbihi B., (1992). Cinetique de formation des amines biogènes dans les produits de pêche. Thèse de doctorat vétérinaire. IAV Hassan II.

Servais, P., Billen, G., Garnier, J., Idlafkih, Z., Mouchel, J.-M., Seidl, M., Meybeck, M. (1998). Carbone organique: origines et biodégradabilité. Meybeck, M., de Marsily, G. et Fustec, E. La Seine en son bassin: fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé. Paris, Elsevier: pp. 483-529.

Schantz M.M., Nichols J.J., Wise S.A. (1997). Evaluation of pressurized fluid extraction for the extraction of environmental matrix reference material. *Anal*. *Chem*., 69,4210-4219.

Shalaby A.R., (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health, , Food Research International, 29: 675-690.

Shewan, J.M. (1971). The microbiology of fish and fishery products-a progress report. *Journal of Applied Bacteriology* **34**, 299-315.

Sif J., Essedaoui A., Ferssiwi A., (2002). Concentration du Cu, Zn etCd au niveau de la glande digestive de *Mytilus galloprovincialis* : rôle des métallothionéines dans la détoxication des métaux lourds. *J. Rech. Océanogr*. 27, 3, pp.284-287.

Sikorski Z.E., Lolakowska A., Pan B.S., (1990). The Nutritive Composition of the Major Groups of Marine Food Organisms. In: Resources Nutritional Composition and Preservation, Sikorski, Z.E. (Ed.). CRC Press-Inc., Boca Raton, Florida, pp: 30-52.

Sirven J-B., (2006). Détection de métaux lourds dans les sols par spectroscopie d'émission sur plasma induit par laser (LIBS) N◦ d'ordre : 3219 Thèse d'Université Bordeaux 1.

Srogi K., (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. Environmental Chemistry Letters 5(4), 169.

Stansby, M. E. (1962). Proximate composition of fish. Fish in nutrition, In E. Heen and R. Kreuzer (editors), p. 55-60. Fish. News (Books) Ltd., Lond.

Storer J.S., DeLeon I., Millikan L.E., Laseter J.L. and Griffing C. (1984). Human adsorption of crude coal tar products. *Arch Dermatol,* 120, 874-877.

SUNDA, W. G. (1989). Trace metal interactions with marine phytoplankton. Biol. Oceanogr. 6: 411–442.

Suwazono Y., Sand S., Vahter M., Filipsson A.F., Skerfving S., Lidfeldt J. and Akesson A.(2006) - Benchmark dose for cadmium-induced renal effects in humans. *Environ Health Perspect,*114, 7, 1072-1076.

Sverdrup L.E., Jensen J., Krogh P.H., Stenersen J., (2002). Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environmental Science and Technology*, 36, 2429-2435.

T

Tahiri L., Bennasser, L., Idrissi L., Fekhaoui M., El Abidi A., Mouradi A., (2005). Contamination métallique de Mytilus galloprovincialis et des sédiments au niveau de l'estuaire de Bouregreg (Maroc) Water Qual. Res. J. Canada.Volume 40, No. 1, pp. 111–119.

Taleb M. Z., Boutiba Z., (2007), La moule *Mytilus galloprovincialis* : Bioindicatrices de pollution marine- cas du port. Sciences & Technologie C – N°25, pp.59-64.

Tarantini A., (2009). Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélange.. Thèse Université Joseph Fourier, Grenoble

Taylor, S. L. (1986). Histamine food poisoning: toxicity and clinical aspects. Critical Reviews in Toxicology, 17, 91e128

Taylor S.L., Stratton J.E., Nordlee J.A. (1989). Histamine poisoning (Scombroid Fish Poisoning) : an allergylike intoxication. *Clinical Toxicology*; *27* : 225-240.

Ten Brink B., Damink C., Joosten H. M. L. J., Huis in't Veld J. H. J., (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods, International Journal of Food Microbiology, 11: 73–84.

Tfoni Silvia.A.V., Toledo.f., Cecilia.M., (2007).Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. Food control 18, p.948-952.

Thorson A W., Cope W.G., Shea D., (2004).Bioavailability of PAHs: Effects of Soot Carbon and PAH Source. Department of Environmental and Molecular Toxicology, North Carolina State University, Box 7633, Raleigh, North Carolina 27695.

U

Usero J., Morillo J. & Gracia I., (2005). Heavy metal concentrations on molluscs from Atlantic caost of soutern spain. *Chemosphere,* 59, 1175-1181.

Uysal, H., (1981). Levels of trace elements in some food chain organisms from the Aegean coasts. *Ves Journées Etud. Pollution*, Cagliari, C.I.E.S.M : 503-512.

V

Varanasi U., Relchert W.L. S. J. E., Brown D.W., Sanborn H.R.,. (1985). Bioavailability and biotransformation of PAHs in benthic organisms exposed to desiment from an urban estuary. Environmental Science & Technology 19(836-841).

Vasquez G., Antorrena G., Gonzalez j., Doval M.D., (1994). Adsorption of heavy metal ions by chemically modified *Pinus pinaster* bark. Bioresource Technol., 48, 251-255.

Veciana-Nogues, M.T., Marine-Font, A., Vidal-Carou, M.C., (1997). Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. J. Agric. Food Chem. 45, 2036–2041.

Verschueren K., (1996).Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. New York, Van Nostrand Reinhold Co, pp. 295-30, 3rd Ed.

Viarengo A., Canesi L. (1991). Mussels as biological indicators of pollution. Aquaculture 94,225-243.

Viau C., Vyskocil A., (1995). Patterns of 1-hydroxypyrene excretion in volunteers exposed to pyrene by the dermal route. Sci. Total Environ. 163, 187–190.

Viegas O., Novo P., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O. (2012). A comparison of the extraction procedures and quantification methods for the chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal grilled meat and fish. Talanta 88.p 677– 683.

W

Wang Z., Hennion B., Urruty L., Montury M., (2000). Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography: a complementary technique to solid-phase microextraction gas chromatography for the analysis of pesticide residues in strawberries. Food Additivies and Contaminants, 17, 915–923.

Wenzl T, Rupert S, Kleiner J, Anklam E.,(2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. Analytical Chemistry, Vol. 25, No. 7.

Wessel N., (2010). Étude des voies de bio activation du benzo[a]pyrène et du fluoranthène chez la sole commune (Solea solea) : Profil métabolique et génotoxicité. Thèse Université de Nantes.

White P.A. (2002). The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 515, 85-98.

WHO. (1995). Concern for Europe s Tomorrow: Health and Environment in the WHO European Region. WHO European Centre for Environment and Health. Wiss. Verl.-Ges. Stuttgart.

Wilson, S.C., et K.C. Jones. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Environ. Pollut. 81(3):229–249.

Wise, S.A. (2002). Standard Reference Materials (SRMs) for the determination of polycyclic aromatic compounds - twenty years of progress. Polycyclic Arom. Comp. 22, 197-230.

Y

Yadav, K.K.., Trivedi S.P.,(2009). Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, Channa punctata. Chemosphere 77, pp. 1495-1500

Yadav H. Nanganuru, Korrapati N.,(2012) Studies on biosorption of cadmium by Pseudomonas putida. International Journal of Engineering Research and Applications (IJERA) ISSN: 2248-9622 Vol. 2, Issue 3, pp.2217-2219.

Yamanaka, H., Shiomi, K., Kikuchi, T., (1987). Agmatine as a potential index for freshness of common squid (Tobarodes pacificus). J. Food Sci. 52, 936–938.

Yamazaki H. and Kakiuchi Y. (1989) The uptake and distribution of benzo[a]pyrene in rat after continuous oral administration. *Toxicol Environ Chem,* 24, 1/2, 95-104.

Yoshinaga D.H., Frank .H.A., (1982). Histamine producing bacteria in decomposing skipjack tuna (katsuwonus pelarmis).Appl.Environ.Microbiol.44.p,447-452

Yunker M.B., Macdonald R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S., (2002). PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. Organic Geochemistry 33, 489– 515.

Z

Zaldıvar J.M., Marinov D., Dueri S., Castro-Jimenez J., Micheletti C., Worth A.P. (2011) An integrated approach for bioaccumulation assessment in mussels: Towards the development of Environmental Quality Standards for biota. Ecotoxicology and Environmental Safety74,pp. 244–252

Annexes

Glossaire

Action corrective : Action visant à éliminer la cause d'une non-conformité détectée ou d'une autre situation indésirable.

Analyte : Objet de la methode d'analyse. On distingue les analytes biologiques et les analytes physicochimiques.
Les toxines naturelles marines et les composes biochimiques tels que l'histamine sont classes, dans cette note, dans les analytes biologiques.

Conformité : Qui répond aux exigences d'une règle, d'une norme ou d'un cahier des charges.

Contaminant : Tout agent biologique ou chimique, toute matière étrangère ou toute autre substance n'étant pas ajoutée intentionnellement aux produits alimentaires et pouvant compromettre la sécurité ou la salubrité des aliments.

Directive : Décision de droit communautaire visant à favoriser l'harmonisation des législations nationales des états membres de l'Union européenne. Elle impose aux états membres un objectif à atteindre, tout en leur laissant le choix quant aux moyens pour y parvenir (lois, décrets, principes arrêtés). Contrairement au règlement européen, qui s'impose directement aux ressortissants de l'Union, la directive n'a pas vocation à s'appliquer directement aux entreprises et aux particuliers, et nécessite une transposition.

Echantillon : Entité composée d'une ou plusieurs unites, prelevée(s) a un instant t sur un lot ou un individu et destinée(s) a être utilisée(s) pour la recherche d'un ou plusieurs analytes et qui sert de base a la decision concernant le lot ou l'individu.
Un echantillon peut donner lieu, selon la base juridique, a plusieurs echantillons identiques pour assurer la possibilite d'une contre-expertise.

Etalonnage : Ensemble des opérations établissant, dans des conditions spécifiques, la relation entre les valeurs de la grandeur indiquée par un appareil de mesure ou un système de mesure, ou les valeurs représentées par une mesure matérialisée ou par un matériau de référence, et les valeurs correspondantes de la grandeur réalisées par des étalons.

Évaluation Quantitative : Évaluation des risques exprimés numériquement et indication des incertitudes concomitantes.

Évaluation Qualitative : Évaluation des risques basée sur des données qui tout en constituant une base inadéquate pour des estimations numériques des risques, permet toutefois lorsqu'elle est déterminée par une expertise antérieure et l'identification des incertitudes concomitantes, le classement des risques ou leur répartition en diverses catégories descriptives des risques.

Limite maximale de residus : Valeur maximale de la concentration d'un residus au-dela de laquelle un produit est considere comme non conforme.

Matrice : Ensemble des constituants de l'echantillon de laboratoire autres que l'analyte.

Prélèvement : Fait de prendre en une seule fois une quantite de matiere dans une quantite de matiere plus importante.
NB : par abus de langage, on appelle souvent un prelevement : le resultat du prelevement qu'est l'echantillon.

Règlement : Dans le cadre communautaire, il correspond à la loi dans le système national. Il a une portée générale et est applicable à tous les états membres immédiatement. Il est obligatoire dans tous ses éléments, c'est-à-dire dans ses modalités d'application et d'exécution.

Résidus : un residu de substances ayant une action pharmacologique, de leurs produits de transformation, ainsi que d'autres substances se transmettent aux produits animaux et susceptibles de nuire a la sante humaine.

Salubrites des aliments : Assurance que les aliments sont acceptables pour la consommation humaine, conformément à l'usage auquel ils sont destinés.

Surveillance/Procede de suivi : Mise en œuvre d'une série préétablie d'observations ou de mesures en vue de s'assurer qu'un CCP reste maîtrisé.

Histamine

Maximum permitted levels in seafood

These are the levels that apply to products on the market in the EU up to the end of their shelf life.

Food category	Maximum permitted level of histamine
Fishery products from fish species associated with a high amount of histidine	Nine samples to be taken, of which: • the average histamine content must be 100mg/kg or less; • no more than 2 samples may have levels between 100mg and 200mg/kg; and • no sample may have a level above 200mg/kg.
Fishery products which have undergone enzyme maturation treatment in brine, manufactured from fish species associated with a high amount of histidine	Nine samples to be taken, of which: • the average histamine content must be 200mg/kg or less; • no more than 2 samples may have levels between 200mg and 400mg/kg; and • no sample may have a level above 400mg/kg.

Fish species associated with a high amount of histidine include those of the families *Scombridae* (mackerel, tuna, bonito), *Clupeidae* (herring, sardine), *Engraulidae* (anchovy), *Coryphaenidae* (mahi mahi), *Pomatomidae* (bluefish) and *Scomberesosidae* (saury).

PAH

Maximum levels of PAHs permitted from 1 September 2012

Seafood Product	Maximum permitted level of benzo(a)pyrene (µg/kg wet weight)	Maximum permitted level of the sum of benzo(a)pyrene , benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene and chrysene (µg/kg wet weight)
Muscle meat of smoked fish and smoked fishery products, excluding fishery products listed below. The maximum level for smoked crustaceans applies to muscle meat from appendages and abdomen. In case of smoked crabs and crab-like crustaceans (*Brachyura* and *Anomura*) it applies to muscle meat from appendages.	5.0*	30.0*
Smoked sprats and canned smoked sprats (*Sprattus sprattus*)	5.0	30.0
Bivalve molluscs (fresh, chilled or frozen)	5.0	30.0
Smoked bivalve molluscs	6.0	35.0

*Lower levels come into force on 1 September 2014 as detailed below.

Maximum levels of PAHs permitted from 1 September 2014

Seafood Product	Maximum permitted level of benzo(a)pyrene (µg/kg wet weight)	Maximum permitted level of the sum of benzo(a)pyrene , benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene and chrysene (µg/kg wet weight)
Muscle meat of smoked fish and smoked fishery products, excluding the 3 last categories listed in the table above. The maximum level for smoked crustaceans applies to muscle meat from appendages and abdomen. In case of smoked crabs and crab-like crustaceans (*Brachyura* and *Anomura*) it applies to muscle meat from appendages.	2.0	12.0

ML

Cadmium

Maximum permitted levels in seafood

Seafood product	Maximum permitted cadmium level (mg/kg wet weight)
Muscle meat of: • bonito (*Sarda sarda*) • common two-banded sea bream (*Diplodus vulgaris*) • eel (*Anguilla anguilla*) • grey mullet (*Mugil labrosus labrosus*) • horse mackerel or scad (*Trachurus trachurus*) • louvar or luvar (*Luvarus imperialis*) • mackerel (*Scomber* species) • sardine (*Sardina pilchardus*) • sardinops (*Sardinops* species) • tuna (*Thunnus* species, *Euthynnus* species, *Katsuwonus pelamis*) • wedge sole (*Dicologlossa cuneata*)	0.10
Muscle meat of bullet tuna (*Auxis* species)	0.20
Muscle meat of: • anchovy (*Engraulis* species) • swordfish (*Xiphias gladius*)	0.30
Muscle meat of fish species not mentioned above	0.05
Crustaceans: muscle meat from appendages and abdomen. In case of crabs and crab-like crustaceans (*Brachyura* and *Anomura*) muscle meat from appendages.	0.50
Bivalve molluscs	1.0
Cephalopods (without viscera)	1.0
Food supplements consisting exclusively or mainly of dried seaweed, products derived from seaweed, or of dried bivalve molluscs	3.0

Mercury

Maximum permitted levels in seafood

Seafood product	Maximum permitted mercury level (mg/kg wet weight)
Muscle meat of: • angler fish (*Lophius* species) • Atlantic catfish (*Anarhicas lupus*) • bonito (*Sarda sarda*) • eel (*Anguilla anguilla*) • emperor, orange roughy, rosy soldierfish (*Hoplostethus* species) • grenadier (*Coryphaenoides rupestris*) • halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) • kingklip (*Genypterus capensis*) • marlin (*Makaira* species) • megrim (*Lepidorhombus* species) • mullet (*Mullus* species) • pike (*Esox lucius*) • pink cusk eel (*Genypterus blacodes*) • plain bonito (*Orcynopsis unicolor*) • poor cod (*Tricopterus minutes*) • Portuguese dogfish (*Centroscymnes coelolepis*) • rays (*Raja* species) • redfish (*Sebastes marinus*, *S. mentalla*, *S. viviparus*) • sail fish (*Istiophorus platypterus*) • scabbard fish (*Lepidopus caudatus* , *Aphanopus carbo*) • seabream, pandora (*Pagellus* species) • shark (all species) • snake mackerel or butterfish (*Lepidocybium flavobrunneum*, *Ruvettus pretiosus*, *Gempylus serpens*) • sturgeon (*Acipenser* species) • swordfish (*Xiphias gladius*) • tuna (*Thunnus* species, *Euthynnus* species, *Katsuwonus pelamis*)	1.0
All fishery products and muscle meat of fish other than those mentioned above	0.5
Crustaceans: the maximum level applies to muscle meat from appendages and abdomen. In case of crabs and crab-like crustaceans (*Brachyura* and *Anomura*) it applies to muscle meat from appendages.	0.5

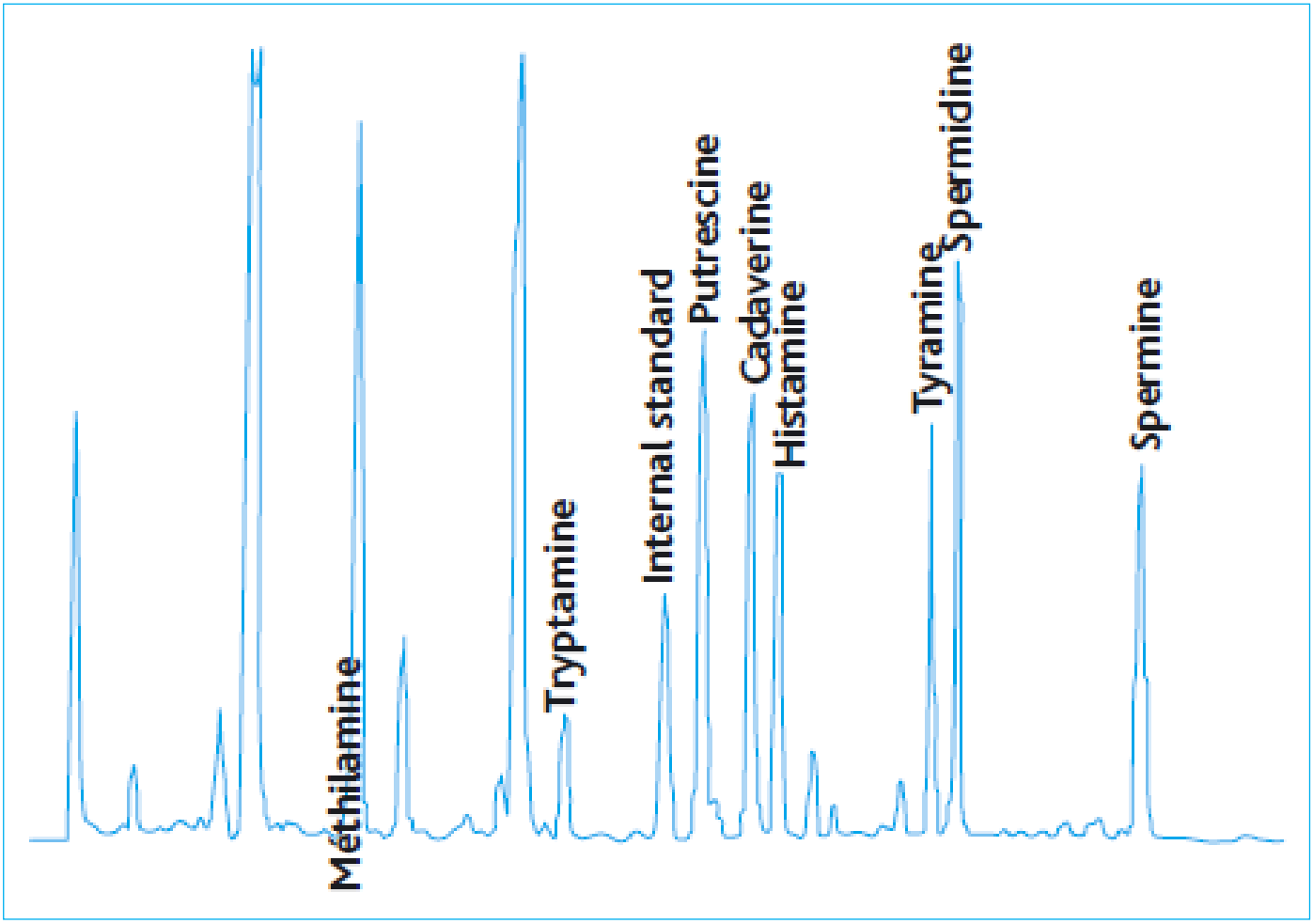
Lead

Maximum permitted levels in seafood

Seafood product	Maximum permitted lead level (mg/kg wet weight)
Muscle meat of fish[1]	0.30
Crustaceans: muscle meat from appendages and abdomen. In case of crabs and crab-like crustaceans (*Brachyura* and *Anomura*) muscle meat from appendages.	0.50
Bivalve molluscs	1.5
Cephalopods (without viscera)	1.0

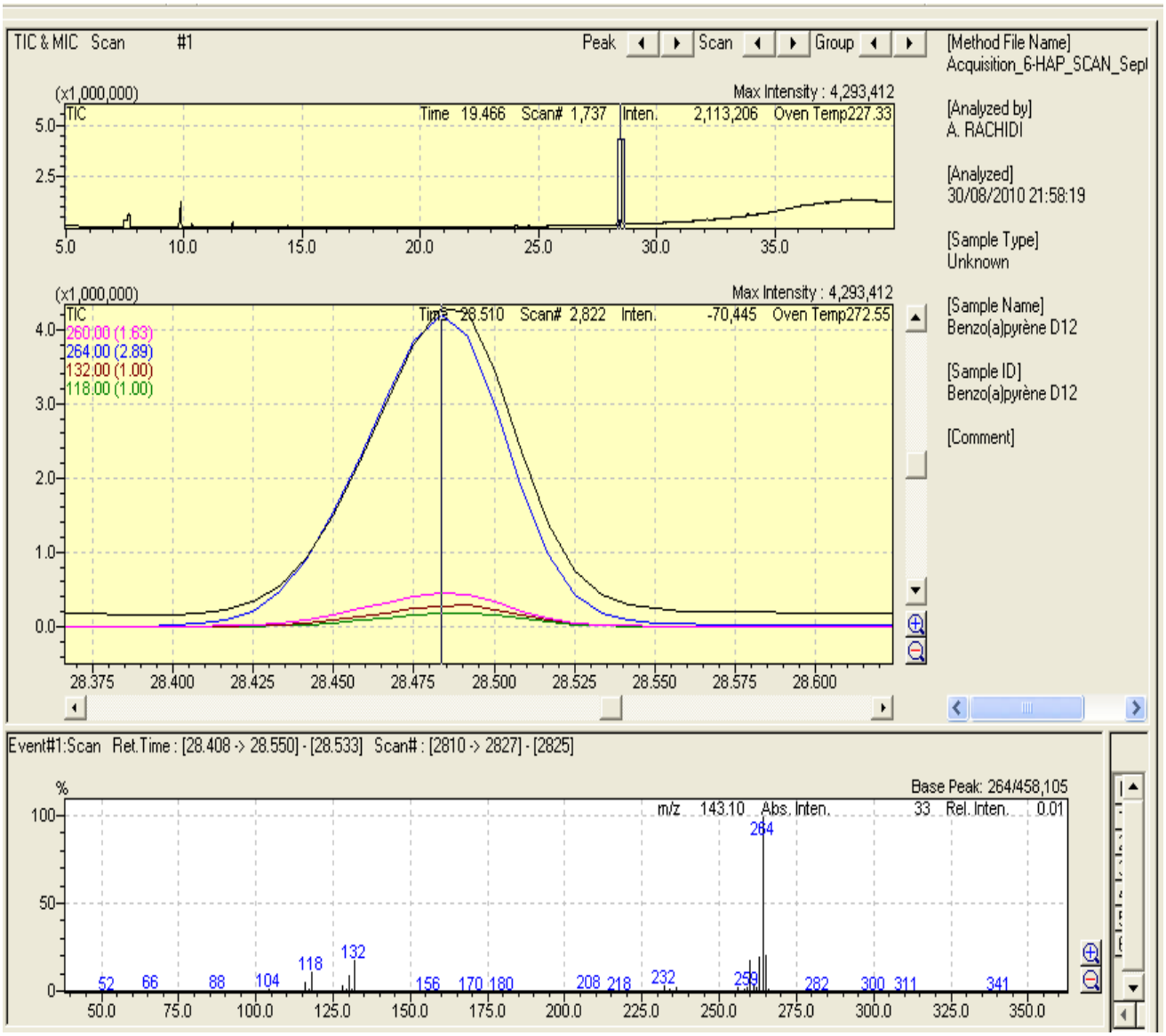
[1] When the fish is intended to be eaten whole, the maximum level applies to the whole fish, not just the muscle meat.

Chromatogramme pour HPLC



Chromatogramme de référence [Duflos et al, 1999].

Chromatogramme pour GC-MS



Chromatogramme du benzo(a)pyrene d12

Pollution de l'environnement marin et santé humain : Mesure, évaluation et Impact des contaminants chimiques et biologiques dans les produits de la pêche au niveau du littoral marocain.

Résumé : Les progrès de la technologie et l'augmentation de la population ont conduit à de notables améliorations dans les méthodes de productions. Cependant, de problèmes sérieux d'environnement ont lieu suite à cette production en masse et évolution rapide de la technologie. La pollution marine, est parmi ces problèmes qui constituent une menace à long terme pour la santé humaine.

Afin de diversifier leur alimentation, les populations sont amenées à consommer davantage les produits de mer. Ils représentent de bonnes sources en protéines et en sels minéraux bénéfiques pour la santé. Pourtant, ces produits peuvent contenir des éléments toxiques sur une large gamme de concentration.

La possible contamination des produits de la pêche (bivalves, poissons, céphalopodes, etc..) est une réalité et elle nécessite la surveillance régulière par l'analyse des éléments toxiques pouvant présenter un danger potentiel. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont été réalisées dans ce domaine. Notre travail s'intéresse principalement à l'évaluation des contaminants chimiques et certaines molécules biochimiques qui peuvent s'accumuler dans les produits de la pêche et affecter leur salubrité.

Les teneurs moyennes de différentes substances étudiées (métaux lourds, hydrocarbures polycycliques aromatique et amines biogènes), ainsi que le niveau de contamination reste inférieur aux niveaux recommandés par la réglementation. Par conséquent, toutes les espèces de produits de mer collectées peuvent être consommées sans grand risque sur la santé publique. Notre travail a porté aussi sur l'intérêt au développement de certaines méthodes analytiques comme la spectrométrie et la chromatographie (SAA, GCMS, HPLC), qui permettent de mieux apprécier les risques encourus par le consommateur.

Ce mémoire de thèse se veut une synthèse des principaux résultats aux examens et évaluation sur le terrain conduits ces dernières années (de 2006 à 2009) au LRAR Casablanca et par-là de proposer à l'autorité compétente et à tous les acteurs soucieux de l'amélioration de la sécurité sanitaire des produits de pêche, une évaluation des risques plus fine et pertinente, à l'avenir.

Cette étude peut être considérée comme une interprétation générale des tendances de contamination marine, mesurées dans les produits de pêche marocains.

Mots clés : Evaluation, Contaminants (HAP, Ml, AB), SAA, GC-MS, HPLC, Produits de la pêche. Réglementation.