

Foire aux questions relative aux cyanobactéries et aux cyanotoxines dans les eaux douces de baignade

Contributeurs : ANSES-LHN, ANSES-LSA, DGS-EA4, UERE, DER

Sommaire

Généralités et contexte réglementaire.....	5
1. <i>Quelles sont les caractéristiques des cyanobactéries planctoniques et benthiques, et dans quel type de baignades doit-on les rechercher ?.....</i>	<i>5</i>
2. <i>Quelles sont les sites à risque devant faire l'objet d'une surveillance et recherche des cyanobactéries ?.....</i>	<i>5</i>
3. <i>L'accumulation sur berge de cyanobactéries est-elle représentative ? Quelle est la surface représentative ?</i>	<i>6</i>
4. <i>Lors de l'atteinte du niveau d'alerte 2, serait-il pertinent de vérifier que les concentrations en cyanotoxines sont également redevenues inférieures aux valeurs guides avant le retour à la normale ?.....</i>	<i>6</i>
5. <i>Après une mortalité animale pour laquelle la responsabilité des cyanotoxines est suspectée, comment lever le niveau d'alerte 2 (surtout si la concentration en biovolume des cyanobactéries toxigènes est inférieure à 1mm³/L et que les concentrations en cyanotoxines sont inférieures aux valeurs guide) ?.....</i>	<i>6</i>
6. <i>Dans le cas des cyanobactéries benthiques, quel critère permet de décider de l'analyse des cyanotoxines ?</i>	<i>7</i>
7. <i>Il existe des différences entre la technique ELISA et la méthode par chromatographie. Comment cette différence est prise en compte dans la mesure de gestion du risque cyanotoxines ?</i>	<i>7</i>
8. <i>Est-il opportun de rechercher directement les cyanotoxines sans avoir identifié et dénombré au préalable les cyanobactéries toxigènes ?.....</i>	<i>8</i>
9. <i>Comment expliquer que les valeurs guides sanitaires définies pour les microcystines soient inférieures pour les eaux de baignade par rapport aux EDCH alors qu'il peut s'agir de sites qui sont également des ressources utilisées pour la production d'EDCH ?.....</i>	<i>8</i>
10. <i>Est-il opportun de conserver l'analyse des cylindrospermopsines et des saxitoxines dans les eaux de baignade alors qu'elles sont peu ou pas retrouvées dans la région ?</i>	<i>8</i>

11.	<i>La variabilité de la limite de détection pour les anatoxines A selon les laboratoires agréés conduit à des différences de gestion en fonction des départements et régions qui sont difficilement explicables. Comment limiter ces différences ?</i>	9
12.	<i>Qu'entend-on par « anatoxine A totale » s'agissant du libellé du code SISE-Eaux « ANTXA » ?</i>	9
13.	<i>Y a-t-il une opportunité de mettre à jour les biovolumes moyens pour les genres de cyanobactéries toxigènes et de réévaluer les valeurs guides pour les cyanotoxines (microcystines et anatoxines notamment) ?</i>	9
14.	<i>Cas des baignades artificielles avec des modalités de gestion différentes</i>	9
15.	<i>Est-il possible de transposer l'instruction nationale DGS aux eaux de mer ?</i>	10
16.	<i>Existe-t-il une norme de prélèvement des cyanobactéries planctoniques et benthiques dans les eaux de baignade ?</i>	10
17.	<i>Existe-t-il une norme d'analyse des cyanobactéries planctoniques et benthiques dans les eaux de baignade ?</i>	10
18.	<i>Quand les laboratoires agréés devront-ils être impérativement accrédités pour l'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines ?</i>	10
19.	<i>Les laboratoires doivent-ils être accrédités pour l'analyse des cyanotoxines produites par les cyanobactéries benthiques pour la matrice substrat / biofilm ?</i>	10
20.	<i>L'accréditation des laboratoires pour la méthode ELISA, doit-elle suivre le LAB GTA 27 ou le LAB GTA 05 ?</i>	11
21.	<i>L'analyse de la chlorophylle A peut-elle être réalisée par sonde dans le cadre du contrôle sanitaire ?</i>	11
Echantillonnage & prélèvements		11
22.	<i>Comment peut-être mis en œuvre le prélèvement pour l'analyse des cyanotoxines de cyanobactéries benthiques ?</i>	11
23.	<i>Pourriez-vous expliquer la notion de dominance utilisée pour les cyanobactéries benthiques ? Dans le cas des cyanobactéries benthiques, un résultat qualitatif est attendu...</i>	12
24.	<i>Dans le cas de 5 cyanobactéries non toxigènes et d'une seule cyanobactérie toxigène mais en nombre bien supérieure à la somme des 5, y a-t-il dominance ?</i>	13
25.	<i>A l'inverse si présence de 5 cyanobactéries toxigènes détectées et une seule cyanobactérie non toxigène mais en nombre bien supérieure à la somme des 5 y a-t-il dominance ?</i>	13
26.	<i>Dans le cas d'une demande d'analyse des microcystines et de l'anatoxine-a en EDCH par l'ARS, quel flaconnage faut-il prévoir ?</i>	13
Protocole analytique : pré-traitement de l'échantillon		13
27.	<i>Sur quelle matrice peut être réalisée l'analyse des cyanotoxines benthiques ?</i>	13
28.	<i>Existe-t-il un protocole d'extraction normalisé pour les échantillons de biofilms ?</i>	14
29.	<i>Existe-t-il un protocole normalisé de lyse pour l'analyse des cyanotoxines de cyanobactéries planctoniques ?</i>	14
30.	<i>Existe-t-il une méthode d'analyse pour les cyanotoxines produites par les cyanobactéries benthiques ?</i>	14

31.	<i>Comment les laboratoires peuvent-ils s'accréditer sur l'analyse des cyanotoxines de cyanobactéries benthiques, sachant que l'unité d'expression des résultats est en masse, donc non compatible avec le domaine de l'hydrologie ?</i>	14
32.	<i>Faut-il utiliser les ultra-sons comme prétraitement des échantillons ?</i>	14
33.	<i>Faut-il filtrer les échantillons ? Dans ce cas, les cyanotoxines sont-elles dans la phase aqueuse ? (Sachant que le protocole pour l'ELISA commence par une centrifugation)</i>	15
Protocole analytique : analyse ELISA		15
34.	<i>Conseil</i>	15
35.	<i>La majorité des kits ELISA cyanotoxines n'ayant qu'un seul fournisseur, comment gérer la situation si celui-ci est dans l'impossibilité de nous fournir suffisamment de kits ?</i>	15
36.	<i>Quel est le lien entre Novakits et Eurofins ? En effet, lors de la participation à un essais inter-laboratoire, l'inscription se fait auprès de Novakits mais le compte-rendu des résultats est envoyé par Eurofins.</i>	16
37.	<i>Est-ce que l'étalon 0 de la gamme utilisé dans la méthode ELISA, peut être considéré comme un LRB s'il n'a pas suivi les étapes de lyse ? Ou faut-il préparer un LRB subissant les mêmes étapes que les échantillons ?</i>	16
38.	<i>Le critère B/B0 <0.35 s'applique-t-il à chaque point de la gamme et/ou aux échantillons ?</i>	16
39.	<i>Pour une analyse des anatoxines par la méthode ELISA, quels variants peuvent être dosés simultanément ? Quel est leur taux de réaction croisée ?</i>	16
Protocole analytique : analyse chromatographique		17
40.	<i>Sur une précédente analyse, les résultats en méthode chromatographique étaient négatifs pour l'anatoxine A, bien qu'il y ait la présence d'un pic sur la même transition mais avec un temps de rétention légèrement inférieur. Est-il possible qu'il y ait eu une présence d'un variant d'anatoxines ayant pu être dosé en ELISA ?</i>	17
41.	<i>Quelle est l'abondance des variants de microcystine-LR, -RR et -YR par rapport aux autres variants de microcystines ? Afin de prendre les mesures de gestions adéquates, en cas de dépassement du seuil de concentrations de la somme des microcystines, quels variants faut-il doser en méthode chromatographique ?</i>	17
Revue de demande & rendu des résultats		18
42.	<i>Comment peuvent s'organiser les laboratoires afin de pouvoir rendre les résultats rapidement ? La méthode ELISA semblant prendre davantage de temps que la méthode chromatographique. De plus, certains laboratoires sous-traitent cette analyse à un autre.</i>	18
43.	<i>Comment le résultat sera-t-il exprimé ?</i>	18
44.	<i>Comment gérer l'incertitude des résultats en cyanotoxines, notamment ceux s'approchant des valeurs guide ?</i>	19
45.	<i>Est-il possible de faire un avenant prenant en compte le surcoût de l'extraction ?</i>	19
46.	<i>Pour une meilleure bancarisation des données, est-il possible de créer des codes SISE-Eaux spécifiques pour chaque méthode d'analyse des cyanotoxines ?</i>	19
Points divers		19
47.	<i>En cas de mortalité de chiens, comment établir le lien de causalité ?</i>	19

48. Quelles espèces sont concernées par la mortalité animale en lien avec une intoxication par des cyanotoxines : chiens, cervidés, sangliers, poissons ?19

GENERALITES ET CONTEXTE REGLEMENTAIRE

1. *Quelles sont les caractéristiques des cyanobactéries planctoniques et benthiques, et dans quel type de baignades doit-on les rechercher ?*

Cyanobactéries planctoniques : les cyanobactéries planctoniques se maintiennent en suspension dans la colonne d'eau grâce à l'existence de vésicules gazeuses intracellulaires qui leur confèrent des propriétés de flottabilité. On les retrouve en abondance (proliférations), généralement dans des eaux stagnantes telles que des plans d'eaux ou encore des rivières à courant très lents.

Cyanobactéries benthiques : les cyanobactéries benthiques se développent au fond des cours d'eau sur des substrats minéraux (ex : blocs, galets, sable, sédiments, etc.), voire à la surface de macrophytes (plantes supérieures et macro-algues). On les retrouve généralement dans des eaux courantes telles que des rivières de moyen gabarit et certains grands fleuves. Néanmoins, elles peuvent également être retrouvées dans des zones de radier caractérisées par de faibles profondeurs, des courants relativement faibles, et parfois en eaux stagnantes (en général le long des berges ou sur le fond des lacs peu profonds ayant une grande transparence de leurs eaux).

Une surveillance adaptée et ciblée doit être mise en œuvre, notamment après une augmentation du débit du cours d'eau consécutive à une période d'étiage. En effet, dans ce cas, les biofilms sont susceptibles d'être détachés de leurs supports, et d'être visibles sous forme de floccs flottant en surface.

2. *Quelles sont les sites à risque devant faire l'objet d'une surveillance et recherche des cyanobactéries ?*

Les sites à risque devant faire l'objet d'une surveillance sont les zones fréquentées par le public ayant déjà présenté des proliférations de cyanobactéries planctoniques ou benthiques (historique connu de prolifération), celles pour laquelle un risque de prolifération de cyanobactéries a été mis en évidence dans le profil de baignade. Par ailleurs, les sites à risque sont également ceux ayant fait l'objet d'un signalement de cas d'intoxication humaine ou de mortalité animale en lien avec la prolifération de cyanobactéries.

Qu'il s'agisse de plans d'eau ou de rivières, il importe de réaliser une **surveillance visuelle** des sites à risque (quel que soit leur type : plan d'eau ou rivière) afin d'identifier la présence éventuelle de signes d'une prolifération de cyanobactéries planctoniques (modification de couleur de la masse d'eau, présence d'accumulation en surface) et/ou d'une variation rapide des concentrations des paramètres suivis par les sondes, et/ou de biofilm qui serait susceptible de remonter à la surface ou d'être présents à proximité (berges), ou encore en cas de mortalité animale (faune domestique ou faune sauvage). En effet, même si cela peut être plus anecdotique, il est possible de retrouver des cyanobactéries benthiques dans la colonne d'eau

(remises en suspension) ou à l'inverse, des cyanobactéries planctoniques dans un échantillon de biofilm (sédimentation, piégeage dans la masse du biofilm).

3. *L'accumulation sur berge de cyanobactéries est-elle représentative ? Quelle est la surface représentative ?*

Selon l'Anses, les modifications de couleur et d'aspect des biofilms sur le fond, l'apparition de biofilms aux extrémités d'hydrophytes ou d'algues filamenteuses portées par le courant ou encore l'accumulation à la surface de biofilms détachés du fond, constituent les principaux critères d'alerte sur la mise en place de proliférations.

4. *Lors de l'atteinte du niveau d'alerte 2, serait-il pertinent de vérifier que les concentrations en cyanotoxines sont également redevenues inférieures aux valeurs guides avant le retour à la normale ?*

En effet, des données de la littérature suggèrent que la mort des cyanobactéries induirait une libération de toutes les cyanotoxines intracellulaires, engendrant une augmentation de la concentration en toxines, ces dernières ayant une certaine stabilité dans l'eau.

Si le dénombrement des genres de cyanobactéries toxigènes est inférieur à 1 mm³/L, la recherche de cyanotoxines n'apparaît pas opportune. En effet, en l'état actuel des connaissances, il n'a pas été montré que la production des toxines augmentait en phase de sénescence. En ce qui concerne les toxines libérées par la lyse cellulaire, celles-ci sont diluées dans la masse d'eau.

5. *Après une mortalité animale pour laquelle la responsabilité des cyanotoxines est suspectée, comment lever le niveau d'alerte 2 (surtout si la concentration en biovolume des cyanobactéries toxigènes est inférieure à 1mm³/L et que les concentrations en cyanotoxines sont inférieures aux valeurs guide) ?*

Cyanobactéries planctoniques :

Si après une nouvelle identification et dénombrement des cyanobactéries toxigènes, la somme des genres toxigènes est toujours supérieure à 1 mm³/L, une nouvelle recherche de toxines doit être engagée :

- en cas de respect des valeurs guides : maintien d'une activité normale sur le site (avec contrôle sanitaire hebdomadaire)
- en cas de dépassement des valeurs guides : maintien de l'interdiction (avec contrôle sanitaire hebdomadaire)

Le retour à la normale intervient si la somme des genres toxigènes est inférieure à 1 mm³/L après une nouvelle identification et dénombrement des cyanobactéries toxigènes, avec la possibilité de repasser à une fréquence bimensuelle sous réserve d'avoir deux dénombrements successifs inférieurs à 1 mm³/L.

Cyanobactéries benthiques :

Le retour à la normale intervient quand il y a absence de dominance de cyanobactéries toxigènes sur le prélèvement de 3 biofilms (donc absence d'anatoxines). Dans ce cas, il peut être envisagé un retour à une fréquence bimensuelle.

6. Dans le cas des cyanobactéries benthiques, quel critère permet de décider de l'analyse des cyanotoxines ?

Comme indiqué dans l'instruction nationale DGS, il s'agit d'un constat de dominance des cyanobactéries benthiques toxigènes dans le prélèvement réalisé de 3 biofilms mélangés.

Selon le rapport de l'Anses, une confirmation de la dominance des cyanobactéries dans les biofilms doit être effectuée en microscopie optique. La dominance est caractérisée si le(s) genre(s) toxigène(s) en présence dominant l'échantillon de biofilm (niveau d'alerte 1). L'analyse des anatoxines est déclenchée une fois la dominance des cyanobactéries toxigènes avérée.

Par défaut, l'analyse des toxines sur biofilm consiste en une analyse qualitative (détection ou non détection). Si la quantification d'anatoxines est demandée, cette dernière doit être exprimée en fonction de la biomasse de biofilm ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de matière fraîche ou matière sèche) ou éventuellement rapportée en fonction de la surface de biofilm collectée ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

7. Il existe des différences entre la technique ELISA et la méthode par chromatographie. Comment cette différence est prise en compte dans la mesure de gestion du risque cyanotoxines ?

La technique d'analyse mise en œuvre par le laboratoire doit avoir une limite de quantification inférieure aux valeurs de gestion définies pour les baignades. En théorie, les deux principes analytiques sont compatibles avec ces valeurs seuils, à l'exception des anatoxines pour lesquelles la meilleure sensibilité doit être visée. Plusieurs laboratoires sont déjà accrédités pour la recherche de cyanotoxines dans les eaux par la méthode chromatographique ou ELISA.

Néanmoins, la méthode ELISA doit être privilégiée par rapport à la méthode chromatographique. En effet, concernant les prescriptions techniques, l'Anses recommande « *l'utilisation du test ELISA comme méthode de contrôle sanitaire pour l'analyse des cyanotoxines dans l'eau, sous réserve de l'emploi d'une méthode validée. Parmi les tests ELISA commercialement disponibles, ceux qui présentent le niveau de réaction croisée le plus important vis-à-vis des différents variants sont à privilégier. Ainsi, pour l'analyse des microcystines, les tests ELISA anti-ADDA doivent être utilisés* ». Par ailleurs, l'instruction nationale DGS reprend cette recommandation et précise que : « *Les tests ELISA sont reconnus comme étant fiables et n'ont pas d'effet matrice sur les différents types d'eau* » et qu'ils permettent d'obtenir « *une remise de l'ensemble des résultats au bout de 72h* ».

La méthode chromatographique, est une technique très répandue dans les laboratoires de contrôle sanitaire, et permet de rechercher les toxines pour lesquelles certains étalons et étalons marqués sont disponibles.

8. Est-il opportun de rechercher directement les cyanotoxines sans avoir identifié et dénombré au préalable les cyanobactéries toxigènes ?

Dans son rapport, l'Anses indique que le risque sanitaire lié aux cyanotoxines est étroitement lié au risque d'exposition aux cyanobactéries toxigènes, dans la mesure où les cyanotoxines restent dans les cellules jusqu'à la sénescence de celles-ci. **Ainsi, la détection et la quantification des cyanobactéries d'une part, et des cyanotoxines d'autre part, sont deux approches nécessaires à l'évaluation du risque sanitaire.**

Par ailleurs, il doit être rappelé que les populations de cyanobactéries toxigènes présentes sur un site de baignade peuvent varier relativement rapidement au cours d'une même saison.

Pour ces raisons, **l'étape d'identification et de dénombrement des cyanobactéries toxigènes en présence, est un préalable nécessaire pour la détermination des cyanotoxines** qui devront être dosées en cas de dénombrement des cyanobactéries toxigènes supérieur à 1 mm³/L.

Ainsi, il n'est pas opportun de rechercher directement les cyanotoxines sans avoir identifié et dénombré au préalable les cyanobactéries toxigènes, sauf dans le cadre d'un recontrôle intervenant à très court terme (4-5 jours maximum) après le premier prélèvement ayant conduit à une détection de cyanotoxines avec des valeurs supérieures aux valeurs guide.

9. Comment expliquer que les valeurs guides sanitaires définies pour les microcystines soient inférieures pour les eaux de baignade par rapport aux EDCH alors qu'il peut s'agir de sites qui sont également des ressources utilisées pour la production d'EDCH ?

Pour l'EDCH, la limite de qualité réglementaire est celle définie par la directive européenne 2020/2184 (directive « eau potable ») qui est de 1 µg/L pour la totalité des microcystines mesurées. Cette valeur est supérieure à la valeur de gestion définie dans le rapport Anses de 2020 qui était de 0,2 µg/L pour les microcystines, et qui a été définie par l'Anses à partir d'études toxicologiques différentes, conduisant ainsi à des différences de seuils entre l'EDCH et les eaux de baignade (0,3 µg/L).

10. Est-il opportun de conserver l'analyse des cylindrospermopsines et des saxitoxines dans les eaux de baignade alors qu'elles sont peu ou pas retrouvées dans la région ?

L'analyse de la littérature scientifique a démontré des épisodes de prolifération de cyanobactéries produisant des saxitoxines en France ces dernières années. L'analyse de ces toxines ne doit être engagée qu'en présence de cyanobactéries toxigènes susceptibles de produire lesdites toxines.

11. La variabilité de la limite de détection pour les anatoxines A selon les laboratoires agréés conduit à des différences de gestion en fonction des départements et régions qui sont difficilement explicables. Comment limiter ces différences ?

L'arrêté du 19 octobre 2017 modifié (arrêté « méthodes ») sera prochainement modifié afin de définir des caractéristiques de performance à respecter pour l'analyse des cyanotoxines. Pour les anatoxines-A, la limite de quantification à respecter pour les laboratoires sera de 0,1 µg/L (par variant) lorsque l'analyse est réalisée par LC/MS-MS, et de 0,2 µg/L par la méthode ELISA. Ceci devrait limiter les différences de gestion observées jusqu'alors.

12. Qu'entend-on par « anatoxine A totale » s'agissant du libellé du code SISE-Eaux « ANTXA » ?

Le code SISE-Eaux « ANTXA » a actuellement pour libellé « anatoxine A totale » et vise la famille des anatoxines qui comprend la molécule mère et ses variants, notamment l'homoanatoxine-A, et la dihydroanatoxine-A.

Les travaux d'expertise de l'Anses ont principalement mis en évidence, au sein de la famille des anatoxines, la présence des anatoxines-A en métropole. L'instruction nationale DGS mentionne les anatoxines totales, et pas uniquement l'anatoxine A, à l'instar des recommandations de l'avis et du rapport Anses.

Par ailleurs, l'anatoxine-A (S) (ou guanitoxine) est une molécule différente de l'anatoxine-A pour laquelle il n'existe pas de données toxicologiques, ni de laboratoires accrédités pour la mesurer à ce jour.

13. Y a-t-il une opportunité de mettre à jour les biovolumes moyens pour les genres de cyanobactéries toxigènes et de réévaluer les valeurs guides pour les cyanotoxines (microcystines et anatoxines notamment) ?

Une saisine de l'Anses est envisagée (programme de travail 2025-2026) pour la mise à jour du tableau des taxons producteurs de cyanotoxines en eaux douce et marine présentant une toxicité avérée pour les vertébrés aquatiques ou terrestres, et des cyanotoxines susceptibles d'être produites. Par ailleurs, en fonction de l'évolution des connaissances scientifiques et toxicologiques, l'opportunité de réévaluer les valeurs guides existantes pourra être examinée dans ce cadre.

14. Cas des baignades artificielles avec des modalités de gestion différentes

Une évolution de la réglementation nationale est en cours afin d'harmoniser les modalités de gestion des baignades naturelles et des baignades artificielles à terme. Les projets de textes réglementaires sont en cours de consolidation.

15. Est-il possible de transposer l'instruction nationale DGS aux eaux de mer ?

Non, car les espèces de cyanobactéries présentes dans l'eau de mer, et les toxines associées, ne sont pas identiques à celles présentes dans l'eau douce. Par ailleurs, le groupe de travail de l'Anses n'a pas discuté de l'effet de l'eau de mer sur la durée de vie des toxines ou sur les techniques analytiques (validité des kits ELISA en eau de mer notamment).

CONTEXTE NORMATIF

16. Existe-t-il une norme de prélèvement des cyanobactéries planctoniques et benthiques dans les eaux de baignade ?

Concernant l'échantillonnage des cyanobactéries planctoniques dans une colonne d'eau, le projet de norme XP T90-330 à paraître intègre une annexe qui traite de l'échantillonnage, du prétraitement de l'échantillon et de son délai d'acheminement. Cette annexe reprend les principaux éléments techniques décrits dans le guide méthodologique « ANSES/LHN/CYAME » publié par le LHN dès 2016 et le rapport ANSES de 2020.

Concernant l'échantillonnage des biofilms de cyanobactéries benthiques, des éléments concernant l'échantillonnage sont disponibles dans le rapport ANSESE de 2020 et ces éléments ont fait l'objet d'une partie dédiée de la présentation de la journée technique du 27 juin dernier et sont présentés ci-après dans la partie concernant les aspects techniques.

A ce stade, la possibilité de rédiger une norme d'échantillonnage qui intégrerait notamment les spécificités propres aux zones de baignade doit encore être statuée avec la commission AFNOR T95F.

17. Existe-t-il une norme d'analyse des cyanobactéries planctoniques et benthiques dans les eaux de baignade ?

La norme XP T90-330 est en consultation jusqu'au 16 septembre au sein des commissions AFNOR T95F et T90D. Consécutivement à cette phase de consultation, la publication de la norme par l'AFNOR devrait intervenir fin 2024 ou début 2025.

18. Quand les laboratoires agréés devront-ils être impérativement accrédités pour l'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines ?

L'arrêté du 7 juillet 2016 modifié (arrêté « agrément ») sera prochainement modifié pour rendre obligatoire l'accréditation des laboratoires mettant en œuvre le contrôle sanitaire des eaux de baignade pour l'analyse des cyanobactéries et des cyanotoxines avant le 1^{er} juin 2026.

19. Les laboratoires doivent-ils être accrédités pour l'analyse des cyanotoxines produites par les cyanobactéries benthiques pour la matrice substrat / biofilm ?

Il n'existe à ce jour pas de norme analytique pour l'analyse des cyanotoxines produites par les cyanobactéries benthiques.

20. L'accréditation des laboratoires pour la méthode ELISA, doit-elle suivre le LAB GTA 27 ou le LAB GTA 05 ?

L'accréditation entre dans le périmètre du LAB GTA 05 « Analyses physico-chimiques des eaux », mais des informations utiles sont disponibles dans le LAB GTA 27 (Essais en immuno-sérologie animale) ou dans la norme NF U 47-019.

21. L'analyse de la chlorophylle A peut-elle être réalisée par sonde dans le cadre du contrôle sanitaire ?

L'instruction nationale DGS indique que « le dosage de la chlorophylle a peut s'appuyer sur la méthode normalisée (NF T90 117 1999) qui est la plus utilisée dans les laboratoires ».

A ce jour, il n'y a pas beaucoup de recul sur l'équivalence des résultats entre les méthodes normalisées et la sonde. S'agissant d'une mesure intermédiaire permettant l'orientation des analyses à suivre, cette solution doit être discutée avec l'ARS en fonction du retour d'expérience du laboratoire.

ASPECTS TECHNIQUES

ECHANTILLONNAGE & PRELEVEMENTS

22. Comment peut-être mis en œuvre le prélèvement pour l'analyse des cyanotoxines de cyanobactéries benthiques ?

Pour la détection des proliférations de cyanobactéries benthiques, l'observation visuelle permettra la définition des zones et périodes de développements des biofilms, mais également aux périodes favorables aux décrochements des biofilms, puis des zones d'accumulation après leur transport par la rivière.

Dans les zones où des développements ou accumulations de biofilms à cyanobactéries sont visibles, trois échantillons de biofilms au minimum, répartis sur la zone de développement ou accumulation, seront prélevés. Dans l'hypothèse où, dans une même zone, des développements sont observés sur des substrats différents (galets et macrophytes par exemple), les prélèvements seront effectués sur ces différents substrats. Des fragments de taille équivalente, de chaque biofilm prélevé, seront regroupés dans un premier tube en vue de l'identification en microscopie. Et un second tube, en vue de la recherche éventuelle de cyanotoxines. Les échantillons de biofilms destinés à l'identification seront complétés avec de l'eau afin d'être totalement immergés dans les tubes.

Les prélèvements seront effectués sur le substrat, soit *in situ* directement dans l'eau ; soit *ex situ*, quand cela est possible, après avoir extrait le support du biofilm de l'eau, pour faciliter la prise d'échantillon.

Pour les échantillons de cyanobactéries benthiques, il faudra veiller, à homogénéiser complètement l'échantillon résultant du mélange de plusieurs fragments de biofilms, dans un flacon.

Les modalités de prélèvements doivent être adaptées en fonction des caractéristiques locales et de leurs éventuelles modifications (par exemple à la suite d'événements pluvieux : augmentation de la profondeur, augmentation du débit, de la vitesse du courant).

Les échantillons de biofilms destinés à l'identification des cyanobactéries peuvent être placés dans des tubes en polypropylène (PP) de 5 mL ou plus.

Le prélèvement s'effectue avec des gants, sur les supports (blocs, galets, végétaux) à l'aide de pinces fines à bout plat, soit directement dans le milieu, soit après avoir sorti le support de l'eau, pour faciliter le travail. Selon les attentes, on pourra choisir de prélever toujours la même surface de biofilms.

Les échantillons destinés à l'identification des cyanobactéries benthiques et à la détermination de leur dominance dans les biofilms, doivent être fixés au lugol alcalin lors du prélèvement, en ajoutant un volume variable de lugol (selon la densité des biofilms) permettant l'obtention d'une couleur orangée (*Rapport ANSES 2020*).

Au laboratoire, ils peuvent être conservés à température ambiante à l'abri de la lumière (*Rapport ANSES 2020*).

Tous les échantillons doivent être transportés dans une enceinte réfrigérée maintenant une température de 5 ± 3 °C, et à l'obscurité jusqu'au laboratoire (*Rapport ANSES 2020*).

L'identification des cyanobactéries dans les biofilms récoltés doit être effectuée sous un microscope optique droit et entre lame et lamelle. En revanche, le GT « Cyanobactéries » ne recommande pas de quantification des cyanobactéries benthiques dans les échantillons de biofilms récoltés, car celle-ci ne permet pas d'évaluer la biomasse de ces organismes à l'échelle de la zone du cours d'eau étudiée."

23. Pourriez-vous expliquer la notion de dominance utilisée pour les cyanobactéries benthiques ? Dans le cas des cyanobactéries benthiques, un résultat qualitatif est attendu.

En situation de prolifération, les biofilms à cyanobactéries sont généralement dominés par un genre de cyanobactérie qui s'est multiplié sur le substrat auquel il est attaché. Pour un biofilm donné, le caractère dominant d'un genre est apprécié par une observation au microscope. Son identification permettra de préciser s'il est toxigène ou non.

24. Dans le cas de 5 cyanobactéries non toxigènes et d'une seule cyanobactérie toxigène mais en nombre bien supérieure à la somme des 5, y a-t-il dominance ?

Oui, il y a dominance puisque les cyanobactéries toxigènes sont moins importantes en espèces mais plus importantes en nombre de cellules.

25. A l'inverse si présence de 5 cyanobactéries toxigènes détectées et une seule cyanobactérie non toxigène mais en nombre bien supérieure à la somme des 5 y a-t-il dominance ?

Non, ce n'est pas le nombre de genres qui compte, mais le nombre d'individus des différents genres selon qu'ils sont ou non toxigènes. Dans ce cas, il n'y aurait pas dominance des cyanobactéries toxigènes présentes car en nombre bien inférieur.

26. Dans le cas d'une demande d'analyse des microcystines et de l'anatoxine-a en EDCH par l'ARS, quel flaconnage faut-il prévoir ?

Dans le cas d'une demande d'analyse de cyanotoxines en EDCH, il faut prévoir 2 flacons en verre ambré. L'un contenant du thiosulfate de sodium, le second de l'acide ascorbique, car le thiosulfate de sodium ne permet pas de préserver l'anatoxine-a. A l'inverse, l'acide ascorbique ne permet pas de conserver les microcystines (méthode US EPA 546 ; Zhou S. et al. 2018 DOI: 10.1021/acs.est.7b06560).

PROTOCOLE ANALYTIQUE : PRE-TRAITEMENT DE L'ECHANTILLON

27. Sur quelle matrice peut être réalisée l'analyse des cyanotoxines benthiques ?

Dans les zones où des développements ou accumulations de biofilms à cyanobactéries sont visibles, trois échantillons de biofilms au minimum, répartis sur la zone de développement, seront prélevés. Dans l'hypothèse où, dans une même zone, des développements sont observés sur des substrats différents (galets et macrophytes par exemple), les prélèvements seront effectués sur ces différents substrats. Des fragments de taille équivalente, de chaque biofilm prélevé, seront regroupés dans un premier tube en vue de l'identification en microscopie. Et un second tube, en vue de la recherche éventuelle de cyanotoxines.

Les échantillons de biofilms destinés à l'identification seront complétés avec de l'eau afin d'être totalement immergés dans les tubes. Les prélèvements seront effectués sur le substrat, soit *in situ* directement dans l'eau ; soit *ex situ*, quand cela est possible, après avoir extrait le support du biofilm de l'eau, pour faciliter la prise d'échantillon.

28. Existe-t-il un protocole d'extraction normalisé pour les échantillons de biofilms ?

Deux protocoles de prétraitement de l'échantillon de biofilm ont été transmis par un fournisseur de kit ELISA il y a quelques semaines, aucune vérification ou test n'ont été effectués pour le moment. Les analyses peuvent être réalisées avec les mêmes kits ELISA cyanotoxines du fournisseur que pour les échantillons d'eau dans le cas de cyanobactéries planctoniques. Ces protocoles seront joints à cette FAQ.

29. Existe-t-il un protocole normalisé de lyse pour l'analyse des cyanotoxines de cyanobactéries planctoniques ?

Si on revient sur le questionnaire envoyé aux laboratoires avant la réunion, les ¾ des laboratoires utilisent la méthode de lyse par 3 cycles de congélation/décongélation. Il n'existe pas de protocole normalisé de lyse pour une analyse par la méthode ELISA, mais la méthode US EPA 546 pour l'analyse des microcystines et des nodularines en ELISA, indique l'emploi d'une lyse par 3 cycles de congélation/décongélation. Quant à la méthode chromatographique, la norme 22104 (2021) et la méthode US EPA 545 mentionnent une lyse par 3 cycles de congélation/décongélation suivie d'une centrifugation et d'une filtration. Tandis que la méthode US EPA 544, préconise une filtration avant de réaliser une extraction au méthanol puis une extraction en phase solide (SPE). Enfin, la norme 20179 (2005) indique une lyse en plusieurs étapes comportant, une filtration, 2 cycles de sonication et une centrifugation avant de terminer par une extraction en phase solide (SPE).

30. Existe-t-il une méthode d'analyse pour les cyanotoxines produites par les cyanobactéries benthiques ?

La méthode d'analyse utilisée pour les cyanotoxines produites par les cyanobactéries benthiques sont les mêmes que les cyanotoxines produites par les cyanobactéries planctoniques. La différence étant le prétraitement de l'échantillon, puisque les cyanotoxines de cyanobactéries benthiques seront à analyser sur substrat/biofilm. Certains fournisseurs commencent à diffuser des protocoles de prétraitement pour ce type d'échantillon.

31. Comment les laboratoires peuvent-ils s'accréditer sur l'analyse des cyanotoxines de cyanobactéries benthiques, sachant que l'unité d'expression des résultats est en masse, donc non compatible avec le domaine de l'hydrologie ?

A ce stade, la priorité d'accréditation reste les cyanotoxines et cyanobactéries planctoniques. Pour les cyanotoxines benthiques, des échanges devront avoir lieu avec le COFRAC.

32. Faut-il utiliser les ultra-sons comme prétraitement des échantillons ?

La norme 20179 (2005) évoque un prétraitement par filtration puis aux ultra-sons. Néanmoins, cette technique n'a pas été maintenue dans les normes les plus récentes (ISO 22104 (2021), méthode US EPA 544, méthode US EPA 545, méthode US EPA 546), préconisant généralement la congélation/décongélation suivi d'une filtration ou/et une centrifugation. Par ailleurs, selon différents retours d'expériences, les ultra-sons sont susceptibles d'engendrer une perte des cyanotoxines.

33. Faut-il filtrer les échantillons ? Dans ce cas, les cyanotoxines sont-elles dans la phase aqueuse ? (Sachant que le protocole pour l'ELISA commence par une centrifugation) ...

Concernant la filtration, de la même manière, la norme 22104 (2021) et la méthode US EPA 546 préconisent une filtration après une lyse par 3 cycles de congélation/décongélation. Cette étape de filtration est également présente dans la norme 20179 (2005), et les méthodes US EPA 544 et 545. Lors de cette étape de filtration, la norme 22104 (2021) et certains fournisseurs préconisent de conditionner le filtre, en filtrant quelques millilitres d'échantillon qui ne serviront pas à l'analyse ; puis de récupérer le volume suivant, afin de pouvoir doser les cyanotoxines totales.

L'étape de lyse précédant l'étape de filtration, libère les cyanotoxines vers la phase aqueuse de l'échantillon. Il faut toutefois veiller à vérifier qu'il n'y ait pas d'interférent matriciel de quelque nature (ex. paroi/membrane bactérienne), pouvant engendrer une perte de toxine.

La centrifugation peut être envisagée comme une alternative à la filtration après la lyse des cyanobactéries de l'échantillon, durant la phase de prétraitement, avant de commencer la méthode ELISA.

PROTOCOLE ANALYTIQUE : ANALYSE ELISA

34. Conseil

A chaque analyse ELISA, il est important de réaliser un blanc expérimental suivant le même « processus complet » que l'échantillon (de l'échantillonnage à l'analyse). Afin d'identifier les risques d'ajout d'interférents pouvant rendre des résultats faux-positifs en lien avec une contamination par les flacons ou leurs bouchons par exemple.

35. La majorité des kits ELISA cyanotoxines n'ayant qu'un seul fournisseur, comment gérer la situation si celui-ci est dans l'impossibilité de nous fournir suffisamment de kits ?

Pour les microcystines, il existe au moins 2 fournisseurs identifiés. En cas de défaut d'approvisionnement, des solutions de sous-traitance de l'analyse peuvent être proposées à l'ARS.

A défaut (en cas d'impossibilité de mettre en œuvre la méthode ELISA), en période de haute saison d'efflorescence, l'analyse par la méthode chromatographique, si elle a été validée et accréditée au laboratoire, peut être réalisée.

36. Quel est le lien entre Novakits et Eurofins ? En effet, lors de la participation à un essai inter-laboratoire, l'inscription se fait auprès de Novakits mais le compte-rendu des résultats est envoyé par Eurofins.

Novakits est le revendeur sur le territoire français des kits ELISA commercialisés par Eurofins. Eurofins est devenu depuis l'année dernière (rachat) Gold Standard Diagnostics. La commande pour la participation à des essais inter-laboratoires, est faite à Novakits qui doit certainement la transmettre à Gold Standard Diagnostics aux Etats-Unis (anciennement Eurofins). Mais c'est Gold Standard Diagnostics qui est organisateur des essais inter-laboratoires, l'envoi des codes uniques laboratoires, et des formulaires de réponses sont édités par Gold Standard Diagnostics. L'envoi des résultats se fait à Gold Standard Diagnostics, les résultats des essais inter-laboratoires, sont donc exploités statistiquement, puis envoyés aux laboratoires ayant participé aux essais inter-laboratoires par Gold Standard Diagnostics.

37. Est-ce que l'étalon 0 de la gamme utilisé dans la méthode ELISA, peut être considéré comme un LRB s'il n'a pas suivi les étapes de lyse ? Ou faut-il préparer un LRB subissant les mêmes étapes que les échantillons ?

Selon la méthode US EPA 546 traitant de l'analyse des microcystines et des nodularines par la méthode ELISA, le Laboratory Reagent Blank (LRB) est différent de l'étalon 0 de la gamme.

« Le LRB concerne un aliquot d'eau réactif qui a subi la même procédure de prétraitement de l'échantillon avant analyse. Et ceux dans le but de déterminer si des microcystines/nodularines ou d'autres interférents ont été introduits à une quelconque étape dans l'échantillon (ex. flaconnage, réactifs, consommables utilisés pour le prétraitement de l'échantillon) » (Méthode US EPA 546, page 7).

38. Le critère $B/B_0 < 0.35$ s'applique-t-il à chaque point de la gamme et/ou aux échantillons ?

Le critère B/B_0 correspond au coefficient d'extinction, permettant d'attester de la bonne compétitivité du test ELISA, si un kit ELISA compétitifs directs ou indirects est utilisé. Ce critère ne s'applique que pour le point le plus haut de la gamme (ex. $B_{(\text{étalon } 6)}/B_{(\text{étalon } 0)}$), et n'est pas à calculer pour les échantillons.

39. Pour une analyse des anatoxines par la méthode ELISA, quels variants peuvent être dosés simultanément ? Quel est leur taux de réaction croisée ?

En fonction des kits ELISA utilisés, les composés et le taux de réactions croisées peuvent différer. Pour les anatoxines, un fournisseur obtient les réactions croisées suivantes :

Variants d'anatoxines	Réaction croisées
(+)Anatoxine-a°	100%
Homoanatoxine-a°	124,8%
(-)Anatoxine-a*	0,3%
Dihydroanatoxine-a cis*	1%

°molécule forme naturelle *molécule forme synthétique

PROTOCOLE ANALYTIQUE : ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

40. Sur une précédente analyse, les résultats en méthode chromatographique étaient négatifs pour l'anatoxine A, bien qu'il y ait la présence d'un pic sur la même transition mais avec un temps de rétention légèrement inférieur. Est-il possible qu'il y ait eu une présence d'un variant d'anatoxines ayant pu être dosé en ELISA ?

Le pic pourrait soit correspondre à l'homoanatoxine-a, ou à la dihydroanatoxine-a. L'utilisation d'un test ELISA aurait certainement donné lieu à un résultats positif (> LD), à condition que le taux de réactions croisées avec les variants d'anatoxines soit satisfaisant pour le test utilisé.

41. Quelle est l'abondance des variants de microcystine-LR, -RR et -YR par rapport aux autres variants de microcystines ? Afin de prendre les mesures de gestions adéquates, en cas de dépassement du seuil de concentrations de la somme des microcystines, quels variants faut-il doser en méthode chromatographique ?

Les variants de microcystine –LR, -RR et –YR ont été les plus dosés en méthode chromatographique jusqu'à maintenant (voir également support de présentation) mais ne sont pas nécessairement les plus toxiques. Par ailleurs, la nature des variants produits est variable dans le temps et dans l'espace.

La détection de tous les variants de microcystines peut être fait au moyen d'un kit ELISA microcystine ciblant le fragment ADDA, et ayant les meilleurs taux de réactions croisées. Ce fragment étant commun à toutes les microcystines.

Sachant qu'il existe 246 variants de microcystines. Il y a donc une différence de couverture des variants de microcystines détectées, entre la méthode ELISA et la méthode chromatographique. Un échantillon négatif en méthode chromatographique, peut être positif en microcystines avec la méthode ELISA.

Par exemple, un laboratoire recherche ces 3 variants par la méthode chromatographique, et obtient un résultat négatif. Ce résultat signifie que ces 3 variants ne sont pas quantifiables dans cet échantillon, mais cela n'indique pas pour autant si l'échantillon est négatif pour l'ensemble des microcystines.

REVUE DE DEMANDE & RENDU DES RESULTATS

42. Comment peuvent s'organiser les laboratoires afin de pouvoir rendre les résultats rapidement ? La méthode ELISA semblant prendre davantage de temps que la méthode chromatographique. De plus, certains laboratoires sous-traitent cette analyse à un autre.

A l'inverse de la méthode chromatographique, la méthode ELISA ne nécessite pas d'investissement matériel important. De ce fait, elle pourrait être plus facilement déployée localement parmi les acteurs analytiques, facilitant une gestion autonome des mesures, et de fait une réduction des délais de sous-traitance. Les mesures en chromatographie générant a priori un niveau de sous-traitance au moins équivalent à celui des mesures réalisées par la méthode ELISA.

De plus, la réactivité étant un facteur essentiel pour la mise en œuvre du dosage des cyanotoxines. Selon les moyens et l'organisation du laboratoire, la méthode ELISA ou chromatographique peut être plus rapide et permet d'éviter un transfert des échantillons vers un autre laboratoire.

Néanmoins, la méthode ELISA apparaît plus intégrative (en particulier, pour les microcystines). En couvrant a priori les 246 variants de microcystines et les nodularines, par le ciblage du fragment ADDA qui leur est commun. L'approche chromatographique étant généralement ciblée sur quelques variants, la représentativité et la prépondérance de ces variants par rapport à l'ensemble des microcystines sont peu documentées à ce jour. Il conviendrait de mener des travaux complémentaires, pour objectiver l'équivalence de ces méthodes.

En général le rendu des résultats pourrait être fait sous 48h après arrivée des échantillons au laboratoire. En comptant, une journée pour réaliser la lyse des échantillons, et une seconde pour la mise en œuvre de la technique analytique, avec un résultat quantitatif rendu en fin de journée.

Selon l'instruction nationale DGS, et compte tenu des éléments ci-dessus, **les analyses de cyanotoxines doivent être réalisées en utilisant la méthode ELISA, avec une remise de l'ensemble des résultats dans le respect du délai de 72h.**

43. Comment le résultat sera-t-il exprimé ?

Cyanobactéries planctoniques :

Le résultat sera exprimé en concentration de ces toxines par unité de volume d'eau. Selon le projet de norme AFNOR XP- en cours de finalisation, il convient de considérer 4 chiffres après la virgule et d'arrondir ce résultat selon les règles habituelles.

Cyanobactéries benthiques :

Le résultat sera exprimé en unité de biomasse ($\mu\text{g/g}$).

44. Comment gérer l'incertitude des résultats en cyanotoxines, notamment ceux s'approchant des valeurs guide ?

L'analyse de traces à des niveaux inférieurs au $\mu\text{g/L}$ est souvent associée à des incertitudes analytiques importantes (de l'ordre de 30%). Tout comme pour les micropolluants organiques régulièrement analysés dans le cadre du contrôle sanitaire, il convient d'interpréter le résultat par rapport à la valeur seuil. En cas de résultat proche de la valeur seuil, une nouvelle analyse peut être réalisée sur un nouveau prélèvement.

45. Est-il possible de faire un avenant prenant en compte le surcoût de l'extraction ?

Ce point doit être traité avec l'ARS dans le cadre du marché public passé avec le laboratoire.

46. Pour une meilleure bancarisation des données, est-il possible de créer des codes SISE-Eaux spécifiques pour chaque méthode d'analyse des cyanotoxines ?

Des codes SISE-Eaux spécifiques à la méthode ELISA pour les paramètres relatifs aux cyanotoxines seront créés prochainement afin de distinguer les résultats en cyanotoxines mesurées par la méthode ELISA et la méthode chromatographique. Une nouvelle version du fichier de ces codes pour les cyanobactéries et les cyanotoxines sera diffusé ultérieurement aux ARS et aux laboratoires agréés.

POINTS DIVERS

47. En cas de mortalité de chiens, comment établir le lien de causalité ?

La mortalité de chien est principalement liée aux cyanobactéries benthiques, et donc à la présence de floc ou de biofilm dans la zone de baignade.

Dans ce cas, seule l'autopsie peut confirmer ou non la cause du décès (en l'absence de signes de prolifération de cyanobactéries sur la zone). Aussi, il est recommandé de se rapprocher des services vétérinaires au niveau local pour disposer d'éléments d'analyse clinique et/ou biologique (ex : autopsie) pouvant mettre en évidence une intoxication.

Un contrôle de la zone à proximité de la zone de baignade et en amont de la zone de baignade apparaît nécessaire pour s'assurer de l'absence de danger (absence de biofilms avec dominance de cyanobactéries toxigènes).

48. Quelles espèces sont concernées par la mortalité animale en lien avec une intoxication par des cyanotoxines : chiens, cervidés, sangliers, poissons ?

Cyanobactéries planctoniques :

Le logigramme figurant dans l'instruction nationale DGS mentionne la mortalité animale au sens large. A noter que les poissons sont également à prendre en compte pour ces cyanobactéries. En effet, en cas de mortalité massive, même si la mortalité n'est probablement pas directement liée aux toxines, elle est souvent liée à un déficit en oxygène, conséquence des proliférations.

Cyanobactéries benthiques :

Le logigramme figurant dans l'instruction nationale DGS mentionne uniquement la mortalité de chiens parce que le lien mortalité - baignade/abreuvement dans l'eau est plus facile à faire quand il est accompagné par son maître mais il pourrait aussi éventuellement s'agir d'autres mammifères retrouvés à proximité de la rivière ou d'un plan d'eau où ils ont pu venir s'abreuver.

49. Après une mortalité animale pour laquelle une intoxication par des cyanotoxines est suspectée, comment la levée d'alerte de niveau 2 doit être réalisée (surtout si la concentration en biovolume des cyanobactéries toxigènes est inférieure à 1 mm³/L et que les concentrations en cyanotoxines sont inférieures aux valeurs guide) ?

Cyanobactéries planctoniques :

Après une nouvelle identification et dénombrement des cyanobactéries toxigènes, si la somme des genres toxigènes est supérieure à 1 mm³/L, une nouvelle recherche de toxines doit être engagée :

- En cas de respect des valeurs guide : maintien d'une activité normale sur le site (avec contrôle sanitaire hebdomadaire)
- En cas de dépassement des valeurs guide : maintien de l'interdiction (avec contrôle sanitaire hebdomadaire)

Le retour à la normale intervient si la somme des genres toxigènes est inférieure à 1 mm³/L après une nouvelle identification et dénombrement des cyanobactéries toxigènes, avec maintien d'une activité normale sur le site et possibilité de repasser à une fréquence bimensuelle sous réserve d'avoir deux dénombrements successifs inférieurs à 1 mm³/L.

Cyanobactéries benthiques :

Le retour à la normale intervient quand il y a absence de dominance de cyanobactéries potentiellement toxigènes sur le prélèvement de 3 biofilms et absence de détection de cyanotoxines. Dans ce cas, il peut être envisagé un retour à une fréquence bimensuelle.