

## Foire aux questions suite à la réunion technique cyanotoxines du 11-04-2024

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

### CONTEXTE REGLEMENTAIRE

*Lors d'un niveau d'alerte 2 fixée par l'instruction ministérielle N° DGS/EA4/EA3/2021/76 du 6 avril 2021, les cyanotoxines ayant une certaine stabilité dans l'eau, serait-il pertinent de vérifier que les concentrations en cyanotoxines soient également redevenues inférieures aux valeurs guides, avant le retour à l'activité normale ?*

*Sachant que 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 dans l'eau.*

→ La recherche systématique de cyanotoxines n'apparaît pas opportune, si le dénombrement des genres de cyanobactéries toxigènes est inférieur à 1 mm<sup>3</sup>/L.

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.

*Après une mortalité animale pour laquelle la responsabilité des cyanotoxines est suspectée, comment est réalisée la levée d'alerte de niveau 2 (surtout si la concentration en biovolume des cyanobactéries toxigènes est inférieure à 1mm<sup>3</sup>/L et que les concentrations en cyanotoxines sont inférieures aux valeurs guide) ?*

→ Cyanobactéries planctoniques :

La levée d'alerte peut se faire, après une nouvelle identification et dénombrement des cyanobactéries toxigènes. Si la somme des genres toxigènes est supérieure à 1 mm<sup>3</sup>/L, une nouvelle recherche de toxines doit être engagée:

- si respect des valeurs guides : maintien d'une activité normale sur le site (avec contrôle sanitaire hebdomadaire)
- si 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 mm<sup>3</sup>/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 mm<sup>3</sup>/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 et absence de détection de cyanotoxines. Dans ce cas, il peut être envisagé un retour à une fréquence bimensuelle.

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

→ Comme indiqué dans le logigramme dédié aux cyanobactéries benthiques dans l'instruction nationale, il s'agit d'un constat de dominance des cyanobactéries benthiques toxigènes dans le prélèvement réalisé de 3 biofilms mélangés (Instruction baignade).

« Une confirmation de la dominance des cyanobactéries dans les biofilms, pourra ensuite être effectuée en microscopie optique » (selon Rapport ANSES page 18). Il y a dominance si le(s) genre(s) toxigène(s) en présence dominant l'échantillon de biofilm.

L'analyse des anatoxines est déclenchée une fois la dominance des cyanobactéries toxigènes avérée (niveau d'alerte 1).

*Il existe des différences entre la technique ELISA et chromatographique. Comment est pris en compte cette différence 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.

Concernant les prescriptions techniques, le guide d'évaluation des risques liés aux cyanobactéries et leurs toxines précise :

Le GT « Cyanobactéries », « 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 indique :

« Afin de réduire les délais d'obtention des résultats, des tests ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) peuvent être effectués pour l'analyse des cyanotoxines, permettant ainsi d'obtenir une remise de l'ensemble des résultats au bout de 72h. Les tests ELISA sont reconnus comme étant fiables et n'ont pas d'effet matrice sur les différents types d'eau. »

La méthode chromatographique, est une technique très répandue dans les laboratoires de contrôle sanitaire, et permet de rechercher les toxines pour lesquelles des étalons et étalons marqués sont disponibles. Plusieurs laboratoires sont déjà accrédités pour la recherche de cyanotoxines dans les eaux par la méthode chromatographique ou ELISA.

## CONTEXTE NORMATIF

*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.

## ASPECTS TECHNIQUES

### ECHANTILLONNAGE & PRELEVEMENT

*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

*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).

*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.

*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'interfèrent 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**

*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 période de haute saison d'efflorescence, l'analyse par la méthode chromatographique, si elle a été validée et accréditée au laboratoire, peut être réalisée.

*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.

*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).

*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.

*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%

## PROTOCOLE ANALYTIQUE : ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

*Lors d'une analyse l'année dernière, les résultats d'analyse 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.

*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 dosé en méthode chromatographique ?*

➔ Il n'y a que peu de données bibliographiques permettant d'assurer que ces 3 variants sont les plus représentatifs des microcystines à aller rechercher dans un échantillon. 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. Les variants de microcystine -LR, -RR et -YR ont été les plus dosés en méthode chromatographique jusqu'à maintenant (voir également support de présentation).

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

*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 méthodes 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, 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.

*Comment le résultat sera-t-il exprimé ?*

→Le résultat sera exprimé en concentration de ces toxines par unité de volume d'eau pour les cyanobactéries planctoniques ou par unité de biomasse pour les cyanobactéries benthiques.

*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.

## POINTS DIVERS : CYANOTOXINES DE CYANOBACTERIES BENTHIQUES

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

→ La recherche d'anatoxines susceptibles d'être produites par les cyanobactéries toxigènes identifiées, est alors effectuée sur 3 biofilms mélangés (Instruction baignade).

*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.

*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.

*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.