



MINISTÈRE
DU TRAVAIL
DE LA SANTÉ
ET DES SOLIDARITÉS

*Liberté
Égalité
Fraternité*



anses

RÉUNION TECHNIQUE SUR LES CYANOBACTERIES



MINISTÈRE
DU TRAVAIL
DE LA SANTÉ
ET DES SOLIDARITÉS

*Liberté
Égalité
Fraternité*



anses

Consignes pour la réunion :

- *Ne pas utiliser la vidéo*
 - *Couper son micro*
 - *Si nombreuses interventions demander la parole en levant la main ou poser la question via le tchat*
 - *Donner son nom lorsque prise de parole / préciser dia le cas échéant*
 - *Si Pb : contact mail sarah.leroy@anses.fr / thierry.chesnot@anses.fr ou portable (06 28 48 74 23)*

 - *Réunion TEAMS enregistrée*
-

1- Contexte réglementaire

4 – Perspectives : Projet de
norme échantillonnage

5- Retour sur la ½ journée
« cyanotoxines

2- Contexte normatif
(analyse)

6- Echanges / points divers

3- Méthode CYAMF (analyse)

7- Conclusions

1 — Contexte réglementaire

1 — Contexte réglementaire

Instruction nationale DGS pour les eaux de baignade

- **Rapport d'expertise** (avril 2020) et **avis Anses** (mai 2020) relatif à l'actualisation de l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, les eaux de loisirs et les eaux destinées aux activités de pêche professionnelle et de loisir
 - **Instruction ministérielle** N° DGS/EA4/EA3/2021/76 du 6 avril 2021 relative à la gestion en cas de prolifération de cyanobactéries dans les eaux douces de baignade et de pêche récréative
 - Publiée en avril 2021 avec **application possible dès la saison balnéaire 2021**
 - Date application : 15 avril 2022 → mise en œuvre par **toutes les ARS à compter de la saison balnéaire 2022**
 - **Retex DGS réalisé auprès des ARS** en mars 2022 :
 - + : Mesures de gestion graduelles avec une meilleure appréciation du risque sanitaire
 - - : Réserves sur dosage systématique de la chlorophylle A, délai analytique trop long compliquant la gestion, surcoût associé pour les gestionnaires
- Ajustements proposés pour le logigramme « cyanobactéries planctoniques »



1 — Contexte réglementaire

Surveillance et contrôle sanitaire des eaux de baignade naturelles (1/2)

- Pour quels sites ?
 - Sites de baignade identifiés à risque de prolifération de cyanobactéries → un **prélèvement avant la saison balnéaire** puis à une **fréquence bimensuelle pendant la saison balnéaire**
 - Profil de baignade mettant en évidence un risque de prolifération de cyanobactéries
 - Historique connu de prolifération de cyanobactéries
 - Signalement de cas d'intoxication humaine ou de mortalité animale en lien avec la prolifération de cyanobactéries
 - Sites de baignade non à risque de prolifération de cyanobactéries → **pas de recherche de cyanobactéries** sauf décision de l'ARS (au cas par cas, selon le contexte local)
- Définition de **valeurs guide pour les cyanotoxines** dans l'instruction N° DGS/EA4/EA3/2021/76 du 6 avril 2021

Tableau V : Concentrations maximales tolérables en cyanotoxines proposées pour l'EDCH et les eaux récréatives

	Microcystines* (en $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Cylindrospermopsines* (en $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Saxitoxines* (en $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Anatoxines *
EDCH	0,2	1	0,8	< LD
Eaux récréatives	0,3	42	30	< LD

* Somme des variants recherchés et quantifiés

1 — Contexte réglementaire

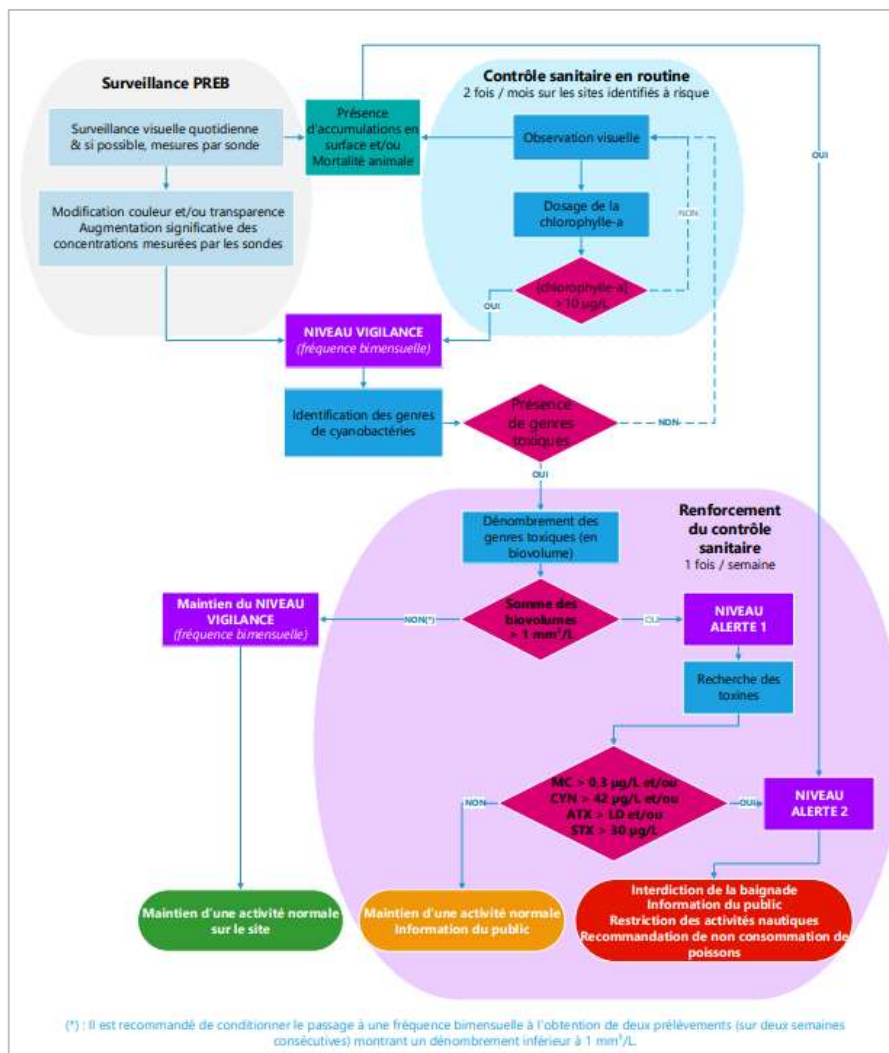
Surveillance et contrôle sanitaire des eaux de baignade naturelles (2/2)

	Cyanobactéries planctoniques	Cyanobactéries benthiques
	<i>Sur sites à risque de prolifération de cyanobactéries</i>	<i>Situés dans les zones de rivières ou plans d'eau, fréquentées par le public et/ou ayant déjà présenté des proliférations de cyanobactéries benthiques, et en cas de sollicitation du gestionnaire</i>
Surveillance PREB	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle visuel quotidien de la masse d'eau (+ suivi de pigments photosynthétiques par sonde) - Information de l'ARS pour suivi complémentaire en cas de signe de prolifération de cyanobactéries (modification couleur et/ou transparence de la masse d'eau, présence d'accumulation en surface, et/ou d'une variation rapide des concentrations des paramètres suivis par les sondes ou en cas de mortalité animale) 	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle visuel quotidien de la masse d'eau - Information de l'ARS pour suivi complémentaire en cas de signe de prolifération de cyanobactéries (développement / accumulation de biofilms détachés en surface)
Contrôle sanitaire ARS	<ul style="list-style-type: none"> - Observation visuelle de la masse d'eau + dosage de chlorophylle A (prélèvement de pré-saison uniquement pour les sites avec un historique connu de prolifération de cyanobactéries) - Identification des genres de cyanobactéries, et en cas de présence de genres toxiques, dénombrement des genres toxiques et des cyanotoxines susceptibles d'être produites 	<ul style="list-style-type: none"> - Observation visuelle de la masse d'eau - En cas d'observation de biofilms, prélèvements aux fins d'identification, et en cas de dominance de cyanobactéries potentiellement toxigènes, recherche d'anatoxines

1 — Contexte réglementaire

Modalités de gestion pour les cyanobactéries planctoniques

- Cyanobactéries planctoniques : 3 niveaux de risque
 - Niveau Vigilance
 - si dépassement du seuil de 10 µg/L en chlorophylle A → identification des genres de cyanobactéries / [fréquence bimensuelle](#)
 - si identification de genres potentiellement toxiques → renforcement du contrôle sanitaire / [fréquence hebdomadaire](#)
 - [Retour à la normale](#) : absence de genres de cyanobactéries potentiellement toxigènes
 - Niveau Alerte 1
 - si somme des biovolumes des genres toxigènes > 1 mm³/L → recherche des toxines susceptibles d'être produites + information du public (affichage)
 - Niveau Alerte 2
 - si somme des biovolumes des genres toxigènes > 1 mm³/L avec dépassement des valeurs guides pour les cyanotoxines OU présence d'une accumulation en surface et/ou de mortalité animale → interdiction de la baignade + restriction des activités nautiques + information du public (affichage)
 - Si somme des genres toxigènes > 1 mm³/L après une nouvelle identification et dénombrement des cyanobactéries toxigènes → nouvelle recherche de toxines :
 - Si respect des VG : maintien d'une activité normale sur le site (avec contrôle sanitaire hebdomadaire)
 - Si VG dépassées : maintien de l'interdiction (avec contrôle sanitaire hebdomadaire)
 - [Retour à la normale](#) : si somme des genres toxigènes est inférieure à 1 mm³/L après une nouvelle identification et dénombrement des cyanobactéries toxigènes → maintien d'une activité normale sur le site (avec possibilité de repasser à une fréquence bimensuelle sous réserve d'avoir deux dénombrements successifs inférieurs à 1 mm³/L)



Logigramme 1 : cyanobactéries planctoniques

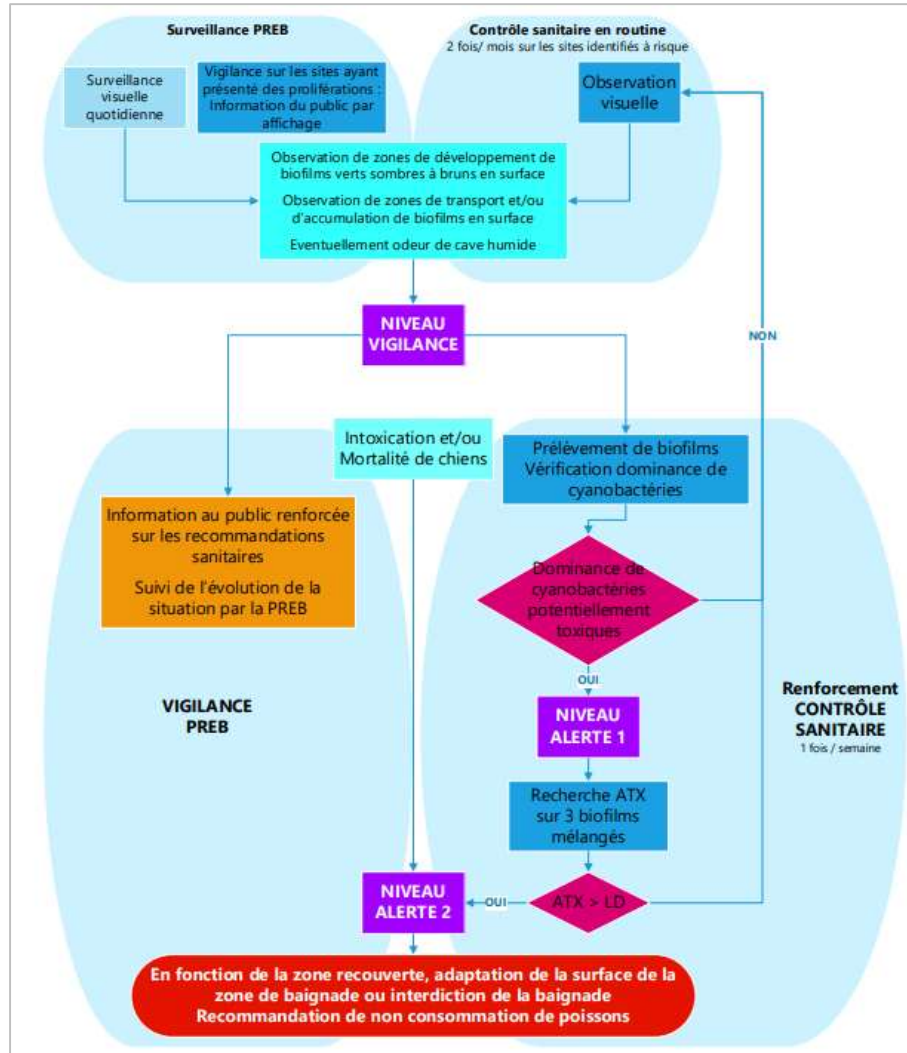
(*) : Il est recommandé de conditionner le passage à une fréquence bimensuelle à l'obtention de deux prélèvements (sur deux semaines consécutives) montrant un dénombrement inférieur à 1 mm³/L.

1 — Contexte réglementaire

Modalités de gestion pour les cyanobactéries benthiques

- Sites de baignade concernés : situés dans les zones de rivières ou plans d'eau fréquentées par le public et/ou celles ayant déjà présentées des proliférations de cyanobactéries benthiques
- Cyanobactéries benthiques : 3 niveaux de risque
 - Niveau Vigilance :
 - En cas d'observation de biofilms → renforcement du contrôle sanitaire (fréquence hebdomadaire) + prélèvement d'échantillons pour vérifier si dominance des cyanobactéries potentiellement toxigènes
 - Niveau Alerte 1
 - si confirmation de la dominance des cyanobactéries potentiellement toxigènes → recherche d'anatoxines susceptibles d'être produites sur 3 biofilms mélangés + information du public (affichage)
 - Niveau Alerte 2
 - si anatoxine détectée (ou en cas d'intoxication / mortalité animale) → mesures de restriction (en fonction de la zone recouverte, adaptation de la surface de la zone de baignade ou interdiction de la baignade) + recommandations sanitaires + information du public (affichage)
 - Retour à la normale : retour à une fréquence bimensuelle si absence de biofilms et absence de dominance de cyanobactéries potentiellement toxigènes donc absence de détection d'anatoxines

Logigramme 2 :
cyanobactéries benthiques



1 — Contexte réglementaire

Sites de loisirs nautiques et aquatiques

- **Sites concernés** : planche à voile, paddle, ski nautique, structures gonflables (water jumps), dériveur, canoë-kayak, ...
- **Risques sanitaires potentiels** : immersion ponctuelle et/ou contact étroit et prolongé
- Pour les **sites de loisirs nautiques et aquatiques avec activité de baignade** :
 - ARS compétentes pour mettre en œuvre le contrôle sanitaire
 - **En cas de niveau d'alerte 2** : recommandation d'interdire la pratique des activités de loisirs nautiques précitées sur les sites concernés ou à proximité + information / communication vers le public par le gestionnaire
- Pour les **sites de loisirs nautiques et aquatiques sans activité de baignade** :
 - ARS non compétentes pour mettre en œuvre le contrôle sanitaire
 - Invitation des gestionnaires à mettre à disposition du public les recommandations sanitaires liées au risque de prolifération des cyanobactéries, si elle en a connaissance
 - **Saisine des services juridiques** des ministères sociaux en cours

1 — Contexte réglementaire

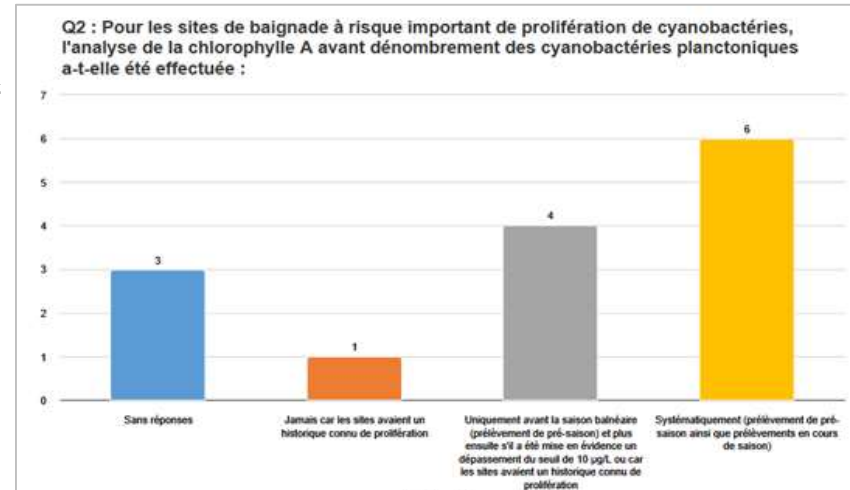
Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- Niveau de participation : 14 ARS (sur 18) ayant répondu à l'enquête (hors 4 DOM)
- Articulation des mesures de gestion proposées dans l'instruction :
 - Logigrammes clairs et compréhensibles par les acteurs (PREB) pour une meilleure évaluation du risque sanitaire
 - Cohérence des logigrammes d'un point de vue théorique mais délai de rendu des résultats en cyanotoxines trop long si toutes les étapes du logigramme suivies (chlorophylle A, identification des cyanobactéries/dénombrement, recherche des cyanotoxines) → simplification nécessaire pour faciliter la gestion des sites et la réactivité
 - Résultats variables : pas toujours de corrélation entre la teneur en chlorophylle A et le biovolume retrouvé, parfois des cyanotoxines retrouvées malgré un biovolume $< 1 \text{ mm}^3/\text{L}$
 - ARS NA : pas de recherche de chlorophylle A et recherche systématique des cyanotoxines dès que le biovolume $> 0,5 \text{ mm}^3/\text{L}$ à compter de la saison balnéaire 2024
- Impact financier de la mise en œuvre de l'instruction perçu comme très important pour les PREB, accru dans certaines régions avec le basculement vers la technique ELISA (identification des cyanobactéries : étape la plus onéreuse)

1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

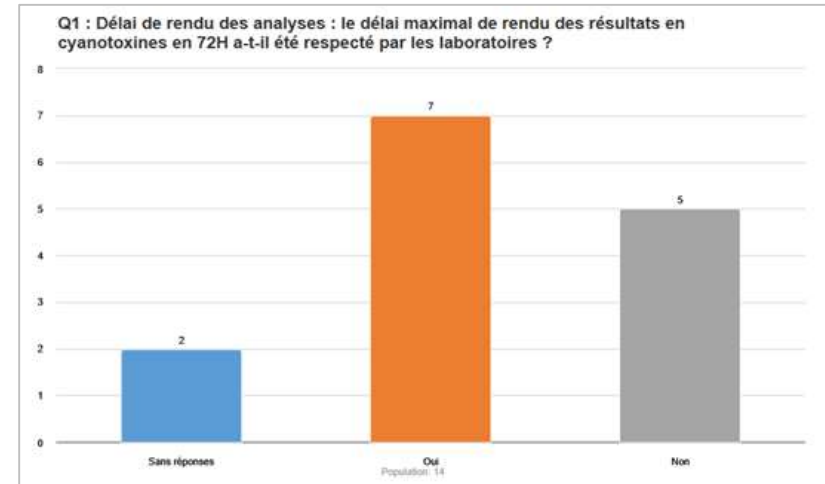
- **Analyse de la chlorophylle A**
 - **Au sein d'une même région, variabilité en fonction des départements**
 - Pour 10 ARS : analyse systématique avant et pendant la saison (parfois jusqu'à atteinte de la valeur de 10 µg/L), ou uniquement avant saison (prélèvement de pré-saison)
 - Analyse réalisée par la méthode de référence pour la majorité des répondants (pour un département, analyse effectuée par sonde)
 - Commentaires ARS :
 - Recherche systématique : permet de limiter les coûts analytiques liés à la recherche et au dénombrement des cyanobactéries toxigènes pour les PREB
 - Analyse pouvant retarder les analyses de cyanobactéries / cyanotoxines → analyses réalisées simultanément pour certaines ARS
 - Interrogation sur l'opportunité de maintenir cette analyse systématique avant saison



1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

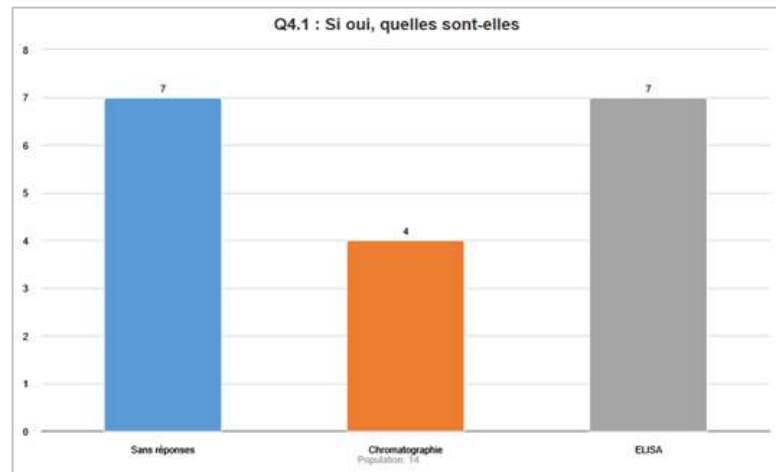
- Délai maximal de rendu des résultats en cyanotoxines
 - Pour les 5 ARS concernées par un délai non respecté sur au moins une des deux saisons :
 - Retards liés à des problèmes d'ordre organisationnel internes (délai lié à l'identification des cyanobactéries, lancement des analyses au-delà d'un certain nombre d'échantillon, co-traitance)
 - Délai maximal pas nécessairement fixé à 72h dans le marché du CS
 - Certaines ARS notent une prestation améliorée en 2023



1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

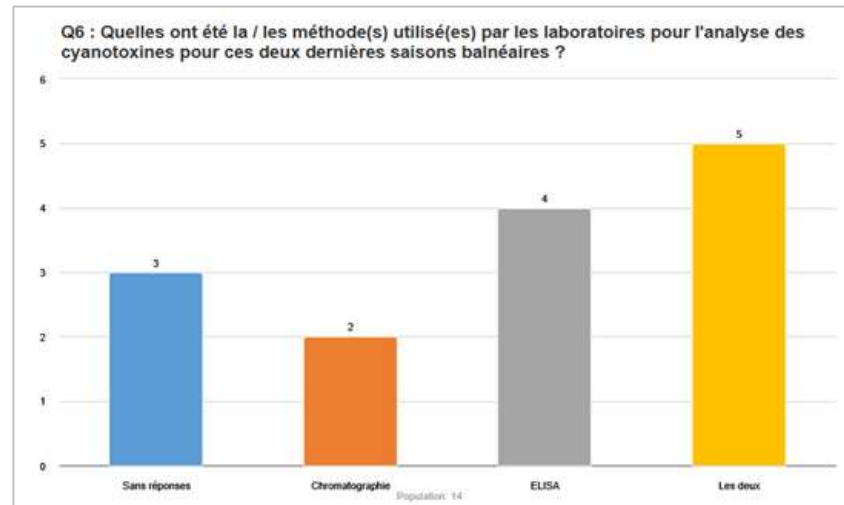
- **Marché du contrôle sanitaire – méthode d’analyse des cyanotoxines**
 - CCTP :
 - Pour 4 ARS : méthodes chromatographique et ELISA
 - Pour 3 ARS : seule méthode ELISA
 - Variabilité possible selon les laboratoires et les départements au sein d’une même région
 - Pas toujours de méthode imposée dans les marchés du CS mais souhait de généraliser la méthode ELISA dans les prochains marchés conformément aux recommandations nationales



1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- **Méthodes d'analyse des cyanotoxines utilisées sur les saisons 2022 et 2023 :**
 - Les deux méthodes (5 ARS), méthode par ELISA (4 ARS), méthode par chromatographie (2 ARS)
 - Variabilité selon les laboratoires et départements au sein d'une même région
 - Raisons avancées pour les ARS ayant exclusivement utilisé la méthode par chromatographie : surcoût associé à l'ELISA (coûts diminués pour des grandes séries d'analyses avec la chromatographie), notamment pour les recontrôles

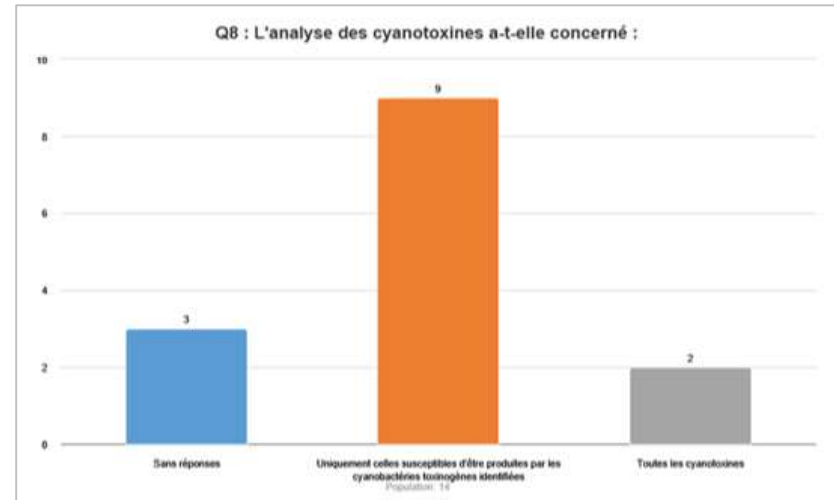


1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

• Nature des cyanotoxines analysées

- Pour la majorité des ARS répondantes (9 ARS) : uniquement les cyanotoxines susceptibles d'être produites par les cyanobactéries toxigènes identifiées
- Pour 2 ARS : toutes les cyanotoxines sont mesurées systématiquement pour des raisons diverses :
 - Aux fins de simplification (analyse groupée par chromatographie), ou sur proposition du laboratoire (attractivité du tarif groupé)
 - Pour les sites à risque avec dépassement récurrent des valeurs guide sanitaires : gain de temps, réactivité pour les décisions de fermeture/réouverture
- Pas de validation préalable ARS s'agissant des cyanotoxines à analyser en fonction des cyanobactéries toxigènes en présence pour la majorité (10) sauf 2 ARS avec possibilité d'ajustement au niveau DDARS pour l'une d'entre elles → allongement des délais

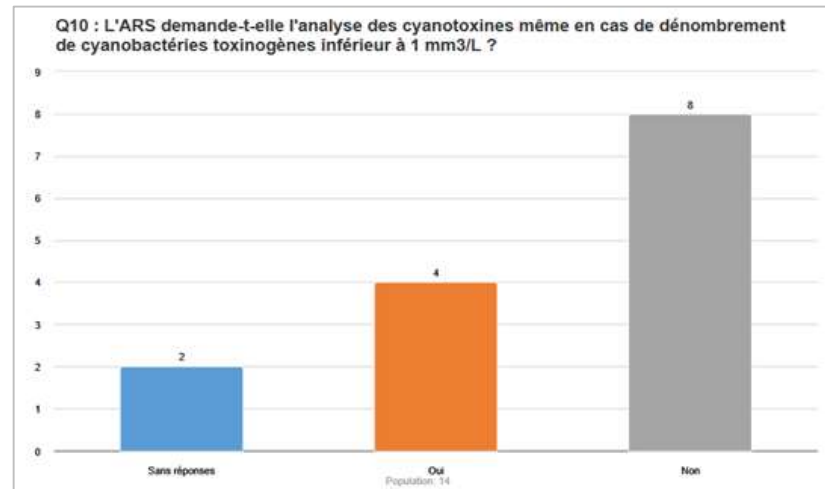


1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- Analyse de cyanotoxines pour un biovolume inférieur à 1 mm³/L

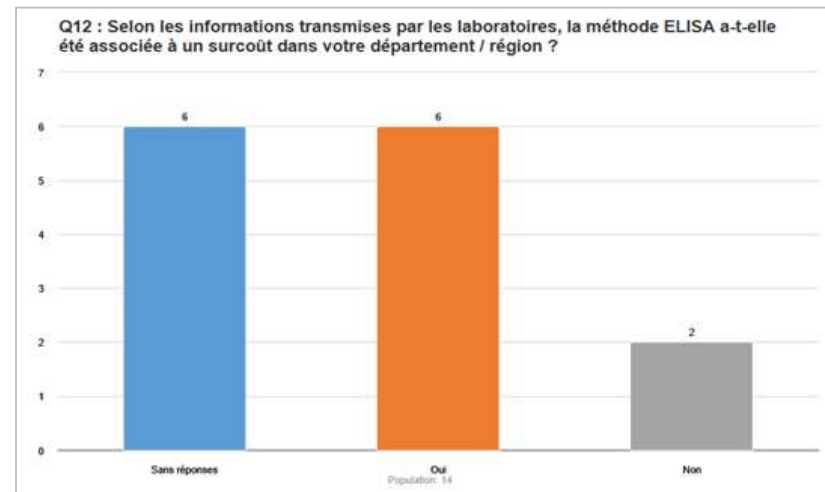
- Pour la majorité des ARS répondantes (8 ARS) : pas d'analyse de cyanotoxines en cas de biovolume < 1 mm³/L
- Pour 4 ARS : analyse ponctuelle réalisée < 1 mm³/L :
 - Aux fins de vérification : biovolume proche de 1, site à fort risque de prolifération
 - Mais nombre faible de prélèvements concernés → résultats positifs pour des biovolumes proches de 1, pour des sites à haut risque de cyanobactéries ou à la suite de signalements terrain



1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

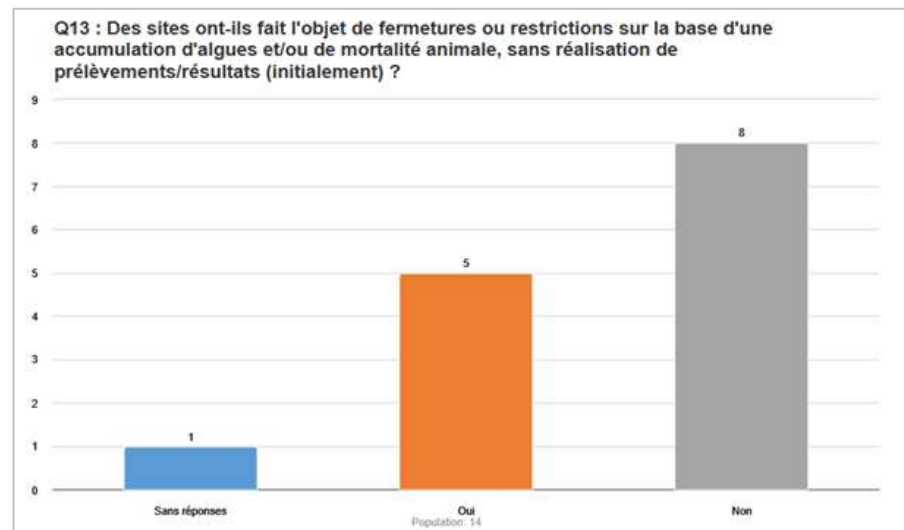
- Coût associé à la méthode ELISA
 - Surcoût annoncé pour la moitié des ARS répondantes (6 ARS) :
 - Coût de la méthode fixée dans le marché mais variable selon les régions / sites (laboratoires)
 - Méthode ELISA moins onéreuse si nombre d'échantillons important



1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- Mesures de fermeture ou restrictions sans réalisation préalable de prélèvements :
 - Pas de fermeture / restriction préventive en cas de mortalité animale pour la majorité des ARS répondantes (8)
 - Fermeture et/ou restriction préventive dans l'attente de la réalisation de prélèvements pour une partie des ARS (5) à l'initiative de la PREB ou à la demande / sur recommandation ARS

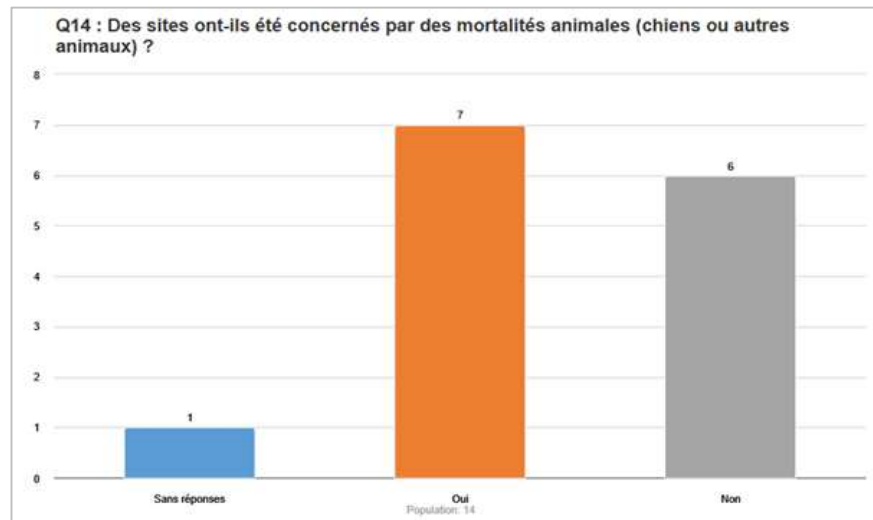


1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- **Mortalités animales (chiens ou autres animaux) :**

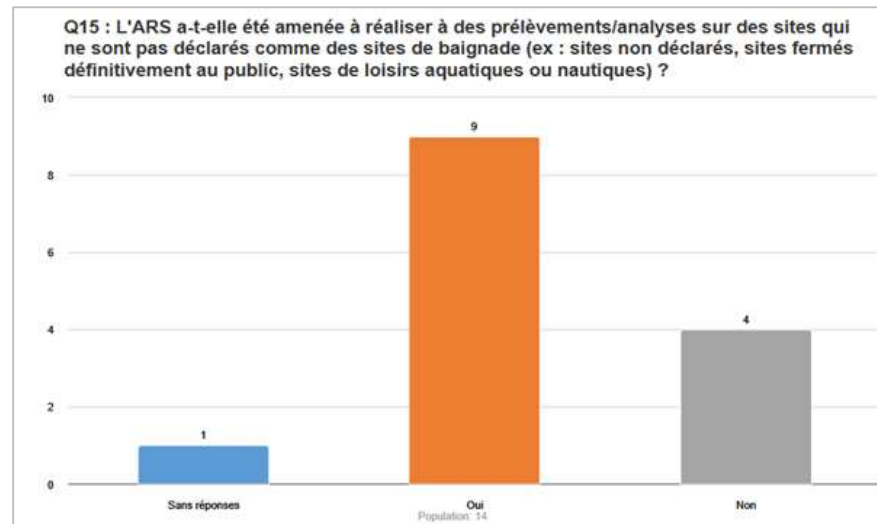
- 7 ARS répondantes concernées contre 6 non concernées
- Sites concernés : rivières (notamment à faible débit) mais aussi plans d’eaux, pas toujours des sites de baignade déclarés
- Identification de la cause de la mortalité/intoxication :
 - Pour une partie des ARS → anatoxines d’origine benthique
 - Pour les autres : suspicion d’une mortalité / intoxication en lien avec les cyanobactéries sans lien de causalité établi formellement
- Commentaires ARS :
 - Cause de la mort généralement déterminée par le vétérinaire sur la base d’une observation des symptômes
 - Autopsies rarement réalisées (question sur la prise en charge financière)
 - Fréquents signalements non étayés / non vérifiés sur les réseaux sociaux, sur lesquels il est difficile d’investiguer



1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

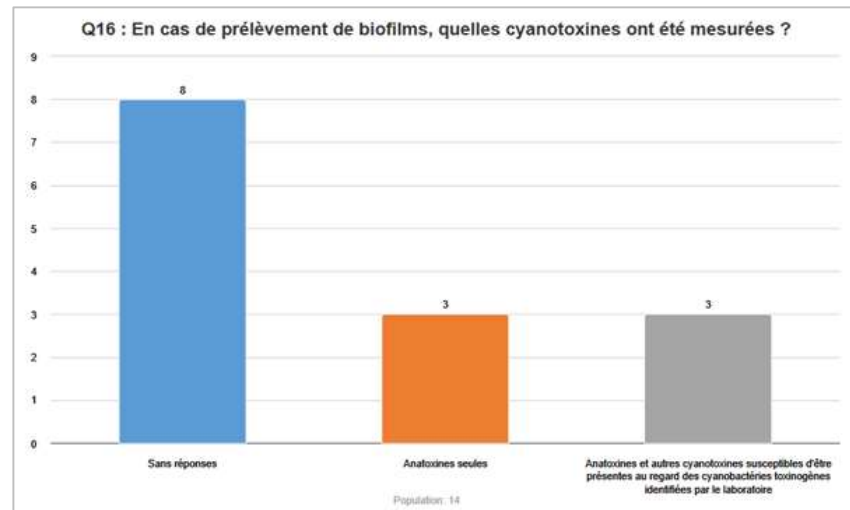
- **Mortalités animales (chiens ou autres animaux) sur des sites autres que des sites de baignade :**
 - 9 ARS répondantes concernées
 - Sites concernés : sites de loisirs nautiques et aquatiques (dont water jumps), sites non déclarés, sites interdits et/ou ouverts ponctuellement à des activités nautiques/aquatiques/nage en eau libre
 - Prise en charge financière des analyses : gestionnaire du site (si loisirs nautiques), et plus rarement ARS



1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- Analyse de cyanotoxines dans les biofilms :
 - Pour les 6 ARS répondantes :
 - Analyse des anatoxines seules
 - Analyse des anatoxines et autres cyanotoxines susceptibles d'être présentes

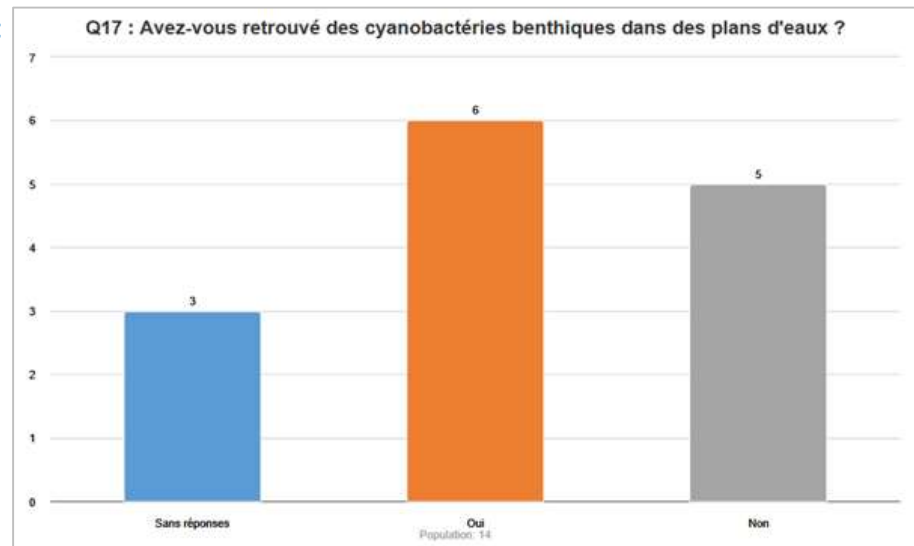


1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- **Cyanobactéries benthiques retrouvées dans des plans d'eau :**

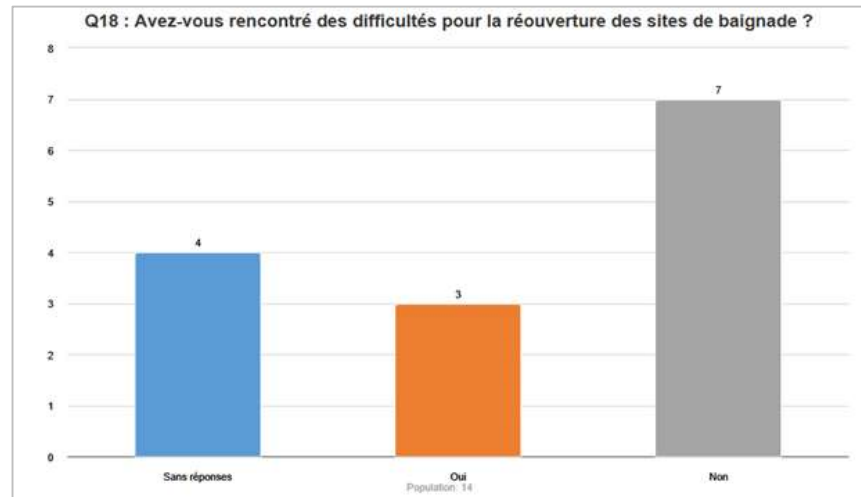
- Pour 6 ARS répondantes :
 - Peu de sites concernés / très sporadique
 - Présence de biofilms et/ou floccs en suspension
- Commentaires ARS :
 - Préleveurs (saisonniers) pas toujours formés à la reconnaissance des cyanobactéries benthiques ce qui pose des difficultés



1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- Réouverture des sites de baignade :
 - Pas de difficulté remontée pour la majorité des ARS répondantes
 - Raisons des difficultés rencontrées pour certaines ARS :
 - Délai de rendu des résultats ++
 - Mortalité animale malgré des analyses conformes
 - Difficultés liées à des multiples fermetures/réouvertures au cours d'une même saison



1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- Points soulevés par les ARS (1/3) :
 - **Questionnement de l'intérêt de l'analyse de chlorophylle A** : délai de rendu de résultat pouvant prendre jusqu'à 24H
 - Délai de rendu des résultats par les laboratoires : délai de 72H évalué comme trop élevé en termes de gestion (fermeture intervenant 3 jours après le prélèvement initial) → contestations PREB même si prestation améliorée sur la saison 2023 avec meilleur respect des délais
 - Cyanotoxines :
 - Opportunité de rechercher directement les cyanotoxines sans identification et dénombrement préalable des cyanobactéries toxigènes ?
 - Valeurs guides sanitaires définies pour les cyanotoxines, en particulier les microcystines (inférieure à la limite de qualité réglementaire pour l'EDCH) sur des sites qui sont également des ressources utilisées pour la production d'EDCH
 - Comment gérer l'incertitude des résultats en cyanotoxines, et ceux s'approchant des valeurs guide (ex: microcystines à 0,29 puis 0,32 µg/L + résultats compris entre 0,3 et 1 µg/L) ?
 - Différence de gestion selon le département / région pour l'anatoxine A en raison de LD variables selon les laboratoires
 - Opportunité de conserver l'analyse des cylindrospermopsines et saxitoxines car peu ou pas retrouvées dans une région
 - Problématique de stabilisation des échantillons pour l'analyse des cyanotoxines

1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- Points soulevés par les ARS (2/3) :

- Cyanobactéries benthiques :
 - Demande de précisions pour la gestion des cyanobactéries benthiques
 - Variabilité spatio-temporelle, analyses onéreuses perçues comme peu utiles
 - Importance d'une meilleure reconnaissance visuelle chez les acteurs et usagers des rivières, et pour l'information du public
- **Méthodes d'analyse** : ELISA plus adaptée en termes de gestion mais coût parfois plus élevé
- Travaux de normalisation : **état d'avancement**
- **Intérêt d'une accréditation obligatoire** des laboratoires pour l'analyse des cyanotoxines ?
- Bancarisation des données : opportunité de création de codes SISE-Eaux spécifiques pour chaque méthode d'analyse des cyanotoxines ?
- Evolution connaissances scientifiques / taxonomie :
 - Opportunité de mise à jour des biovolumes moyens pour les genres de cyanobactéries toxigènes ?
 - Opportunité de réévaluer les valeurs guides pour les cyanotoxines (notamment pour microcystines, LD pour anatoxine) ?

1 — Contexte réglementaire

Enquête menée auprès des ARS sur les saisons balnéaires 2022-2023

- Points soulevés par les ARS (3/3) :

- Communication vers le grand public :
 - Incompréhension du public en raison du classement des eaux de baignade ne prenant pas en compte actuellement le paramètre « cyanobactéries » (ex : baignades « excellentes » ou « bonnes » confrontées à des proliférations en cyanobactéries)
 - Affichage des résultats en cyanobactéries (biovolume) et cyanotoxines sur le site internet « Baignades »
- Cas des baignades artificielles avec des modalités de gestion différentes → harmonisation nécessaire
- Activités nautiques et aquatiques : cadre réglementaire à préciser (sécurisation juridique nécessaire) : sites pouvant rester ouverts au public alors que la baignade est interdite au public pour cause de prolifération de cyanobactéries
- Mortalités animales (chiens) : envisager la possibilité d'une prise en charge financière des autopsies en lien avec les services de l'Etat concernés (ex: DDETSPP?), échanges accrus avec les acteurs santé animale / santé humaine
- Question sur la transposition éventuelle de l'instruction aux eaux de mer (Mayotte)

1 — Contexte réglementaire

Liste des paramètres relatifs aux cyanobactéries et cyanotoxines du référentiel SISE-Eaux (1/2)

- **Mise à disposition d'un fichier Excel des paramètres relatifs aux cyanobactéries et cyanotoxines** existants dans le référentiel SISE-Eaux et des codes SISE-Eaux associés pour les baignades naturelles et artificielles :
 - Ajout de nouvelles familles relatives aux cyanobactéries
 - Ajout du biovolume moyen standard attribués par genre de cyanobactéries et des toxines susceptibles d'être produites par genre

Contexte	Type de cyanobactéries	Code SISE-Eaux	Libellé court	Statut Baignade	Nature	Nouvelle famille de paramètre	Unité	Biovolume moyen standard (mm ³ /L)	Toxines susceptibles d'être produites
Baignades naturelles	Cyanobactéries benthiques	CYTOXBQ	DOMINANCE DE CYANOBACTÉRIES BENTHIQUES-TOXINOGENES (O/N)	Actif	Qualitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	SANS OBJET	/	/
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB01	ANABAENA SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	89	Microcystines, Anatoxine-a, Cylindrospermopsines, Saxitoxines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB02	ANABAENOPSIS SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	125	Microcystines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB03	APHANIZOEMON SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	72	Anatoxine-a, Cylindrospermopsines, Saxitoxines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB04	APHANOCAPSA SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	2	Microcystines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB06	CALOTHRIX SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	215	Microcystines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB63	CHRYSOSPORUM SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	133	Cylindrospermopsines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB61	CUSPIDOTHRIX SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	95	Anatoxine-a, Saxitoxines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYAT0XB	CYANOBACTÉRIES TOXINOGENES	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	/	/
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB10	CYLINDROSPERMOPSIS SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	70,2	Anatoxine-a, Cylindrospermopsines, Saxitoxines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB11	CYLINDROSPERMUM SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	65,7	Anatoxine-a
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB60	DOLICHOSPERMUM SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	290	Anatoxine-a, Anatoxine-a(5), Cylindrospermopsines, Saxitoxines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB12	FISCHERELLA SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	261,3	Microcystines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB51	GEITLERINEMA SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm ³ /L	19,7	Microcystines

1 — Contexte réglementaire

Liste des paramètres relatifs aux cyanobactéries et cyanotoxines du référentiel SISE-Eaux (2/2)

- **Modifications relatives des codes SISE-Eaux** à venir → fichier simplifié en termes de nombre de codes disponibles pour les cyanobactéries et enrichi pour les cyanotoxines
 - Harmonisation à venir des modalités de gestion « baignades artificielles » vs. « baignades naturelles » : **gel des codes SISE-Eaux correspondants aux baignades artificielles** (CYANSXX notamment)
 - Création prochaine de **nouveaux codes pour les cyanotoxines pour chacune des méthodes d'analyse (ELISA, chromatographie)** afin de bancariser les données (mais discontinuité des données)

1 — Contexte réglementaire

Eaux de baignade artificielles – contrôle sanitaire et limites de qualité

- [Arrêté du 15 avril 2019 modifié](#) relatif au programme d'analyses de la qualité de l'eau et aux limites et références de qualité des baignades artificielles
 - Paramètres recherchés
 - Cyanobactéries : 1 analyse à une fréquence mensuelle, lorsque le profil a mis en évidence un risque de prolifération
 - En cas d'efflorescence visible → prélèvement réalisé en surface pour confirmer origine (cyanobactéries ou microalgues) et dans la colonne d'eau pour dénombrer les cyanobactéries
 - Limites de qualité réglementaires
 - Eau de la baignade artificielle (systèmes ouvert et fermé) : limite de qualité = 100 000 cellules / mL
 - Eau de remplissage (systèmes ouvert et fermé) : limite de qualité = absence d'efflorescence (observation visuelle de terrain d'une accumulation en surface dû à une prolifération de phytoplancton)

1 — Contexte réglementaire

Evolutions réglementaires (1/3)

- Eaux de baignade artificielles : **harmonisation des mesures de gestion proposées par l'instruction « cyanobactéries »** après modification des textes réglementaires
- **Arrêté du 15 avril 2019 modifié** relatif au programme d'analyses de la qualité de l'eau et aux limites et références de qualité des baignades artificielles
 - Pour le paramètre « cyanobactéries » : **suppression de la limite de qualité réglementaire** de 100 000 cellules/mL et de la **fréquence d'analyse pour ce paramètre (mensuelle actuellement) pour les sites à risque de prolifération**
- **Arrêté du 15 avril 2019** relatif au contenu des dossiers de déclaration des baignades artificielles et d'autorisation d'utilisation d'une eau autre que l'eau destinée à la consommation humaine pour l'alimentation d'une baignade artificielle
 - **Contenu de la demande d'autorisation d'utilisation d'une eau autre que l'EDCH pour l'alimentation d'une baignade artificielle : ajustements des intitulés des paramètres à rechercher** pour correspondre aux modalités actuelles de recherche et gestion du risque

1 — Contexte réglementaire

Evolutions réglementaires (2/3)

- [Arrêté du 5 juillet 2016 modifié](#) relatif aux conditions d'agrément des laboratoires pour la réalisation des prélèvements et des analyses du contrôle sanitaire des eaux
 - Annexe II (Eaux de baignade, y compris baignade artificielle) - Liste I-2 : Analyses chimiques complémentaires :
 - [Ajout du paramètre « cyanotoxines »](#) (total microcystines, cylindrospermopsines, anatoxines et saxitoxines)
 - Suppression du paramètre « Total microcystines »
 - Annexe IV (Paramètres ne nécessitant ni accréditation ni EIL) - Liste E1 et I-1 : Analyses microbiologiques complémentaires
 - [Report de la date limite pour l'accréditation](#) des laboratoires pour le paramètre « [cyanobactéries](#) » au [31 décembre 2025](#) pour les EDCH et les eaux de baignade
 - [Ajout d'une date limite d'accréditation](#) pour les paramètres « cyanotoxines » et « phytoplancton macroalgues » (accréditation et EIL désormais disponibles) au [31 décembre 2025](#) pour les eaux de piscine et de baignade.

1 — Contexte réglementaire

Evolutions réglementaires (3/3)

- [Arrêté du 19 octobre 2017 modifié](#) relatif aux méthodes d'analyse utilisées dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux
- **Ajout d'une annexe VII** sur les caractéristiques de performance des méthodes de mesure pour les analyses de cyanotoxines (total microcystines, cylindrospermopsines, anatoxines et saxitoxines) des eaux de baignade → [LoQ \(méthode ELISA et méthode LC/MS-MS avec une incertitude de 50%\)](#)

Paramètres	CMT Bai	Limite de quantification	Incertitude en % exprimée
Total microcystines	0,3	0,1 µg/L lorsque l'analyse est réalisée par LC/MS-MS (par variant) 0,2 µg/L par méthode ELISA	50
Cylindrospermopsines	42		
Saxitoxines	30		
Anatoxines	<LD		

- **Mise à jour du référentiel d'analyses du contrôle sanitaire des eaux (Anses) à venir** : [ajout de la norme expérimentale XP T90-330](#) associée et du [mode opératoire Anses « CYAMF »](#) pour les baignades naturelles et artificielles

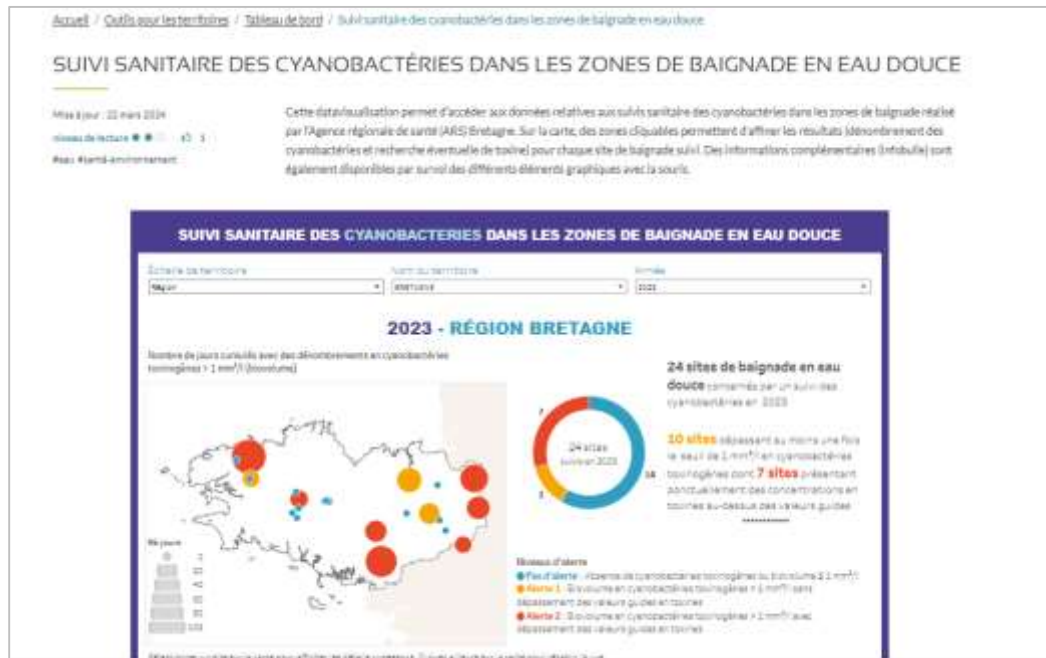
1 — Contexte réglementaire

Conclusions

- **Modification de la réglementation applicable :**
 - **Accréditation obligatoire** pour les laboratoires agréés pour les paramètres « cyanobactéries » et « cyanotoxines » avant le 31 décembre 2025
 - **Caractéristiques de performance** pour l'analyse des cyanotoxines à respecter
 - **Harmonisation des modalités de recherche et de gestion** des cyanobactéries et cyanotoxines pour les baignades naturelles et artificielles → renvoi à l'instruction « cyanobactéries »
 - **Actualisation de l'instruction « cyanobactéries »** avant la saison balnéaire 2025 afin de tenir compte des dernières connaissances scientifiques et retours d'expérience
- **Possible actualisation des tableaux de taxons de cyanobactéries toxigènes (travaux d'expertise Anses / nomenclature)**
- **Actualisation des codes SISE-Eaux relatifs aux cyanobactéries** (après harmonisation) et cyanotoxines (à venir prochainement)
- Saisine des services juridiques des ministères sociaux (DAJ) en cours concernant les activités de loisirs nautiques et aquatiques hors champ CSP
- Site internet national « Baignades » : résultats « cyanobactéries » → ligne supprimée après passage au biovolume : **pas d'évolution** envisagée à court terme compte tenu de la refonte prévue des sites internet « eaux » dans le cadre du projet Aqua-SISE

1 — Contexte réglementaire

Intervention de l'ARS Bretagne – présentation du site internet régional « cyanobactéries »



- Lien URL : <https://bretagne-environnement.fr/tableau-de-bord/suivi-sanitaire-des-cyanobacteries-dans-les-zones-de-baignade-en-eau-douce>

2 — Contexte normatif (analyse)

Harmonisation des méthodes de référence par le LHN – publiées en 2018



Réseau Eaux et Santé
Eaux d'alimentation
Eaux minérales naturelles
Eaux de loisirs

anses
Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Rechercher sur le site

Accueil | Accueil | Référence | Recherche | Bases documentaires | Produits de veille | Animation

Site de partage du Réseau Eaux et Santé

Le Laboratoire d'Hydrologie de Nancy a élaboré ce site dans le but de mettre à disposition de ses partenaires :

- Des pages thématiques présentant ses différents travaux scientifiques et techniques dans le cadre de ses relations de laboratoire de référence et de recherche
- Les principaux textes réglementaires de référence et une grande partie de la production scientifique du LHN répartie en 4 bases documentaires
- Un formulaire « Fiches de signalement » afin de faciliter les échanges d'informations sur des méthodes d'analyses, des textes normatifs ou textes réglementaires entre les différents acteurs du domaine des eaux de consommation et de loisirs
- L'Eau à la bouche... Un service de veille scientifique, réglementaire et documentaire dans les domaines de l'eau, de la santé et de l'environnement

Actualités / Evénements

Cyanobactéries : mise en consultation de 2 méthodes d'analyse

Publié le 12/11/2018

Journée technique Prélèvement et dénombrement des Cyanobactéries dans les eaux de baignade et les ressources : le programme est disponible !

Publié le 12/11/2018

Clôture de la Consultation sur les délais de mise en analyse des échantillons d'eau

Publié le 12/11/2018



anses
Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Méthode d'analyse en circuit ouverte dans les eaux

REFFÉRENCE : ANSES/INCYAMF - Version 1 (en consultation)
Révisé en 2018

Dénombrement et identification des cyanobactéries dans les eaux intérieures après observation directe de l'échantillon ou après concentration par filtration.

Laboratoire préposé de Nancy
Laboratoire National de Référence Eau-Cyanobactéries-Eta-Contamination
Nancy, Eau Minérale Naturelle et Eau de Loisir



anses
Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Méthode d'analyse en circuit ouverte dans les eaux

REFFÉRENCE : ANSES/INCYAMU - Version 1 (en consultation)
Révisé en 2018

Dénombrement et identification des cyanobactéries dans les eaux intérieures après sédimentation (méthode Ütermöhl).

Laboratoire préposé de Nancy
Laboratoire National de Référence Eau-Cyanobactéries-Eta-Contamination
Nancy, Eau Minérale Naturelle et Eau de Loisir



Formalisation et harmonisation des pratiques

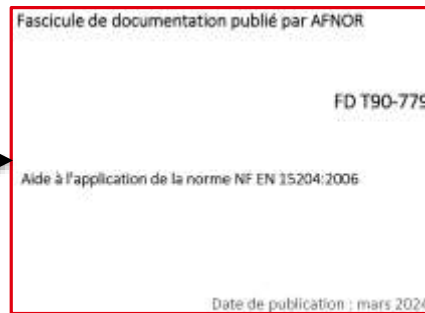
IDENTIFICATION ET DÉNOMBREMENT DES
 CYANOBACTÉRIES PAR MICROSCOPIE DANS LES EAUX
 INTÉRIEURES ET LES EDCH APRÈS OBSERVATION DIRECTE
 DE L'ÉCHANTILLON OU APRÈS CONCENTRATION



NORME GUIDE
 NF EN 15204 (DÉC. 2006)

Recommandations générales dans le cas d'observation
 et de dénombrement d'échantillons de phytoplancton
 marin et d'eau douce par microscopie inversée

PHYTOPLANCTON
 (dont cyanobactéries)



FASCICULE DE DOCUMENTATION
 FD T90-779 (MARS 2024)

Support d'application à la norme
 NF EN 15204



NORME EXPÉRIMENTALE
 XP T90-330 (2024)

- consultation T90D et T95F
- révision dans les deux ans,
- prend en compte le contexte de la surveillance sanitaire mais pas uniquement.

CYANOBACTÉRIES
 uniquement

FD T90-779 :
Domaine d'application :
Phytoplancton dont cyanobactéries

POINTS PERTINENTS pour
l'identification et le dénombrement
de cyanobactéries

Repris directement ou par renvoi au
fascicule dans la norme
XP T90-330

Avant-propos.....	3
Introduction	4
1 Domaine d'application	6
2 Termes et définitions	6
3 Précision sur le domaine d'application	7
4 Notion d'objet algal	8
5 Préparation de l'échantillon	9
5.1 Homogénéisation	9
5.2 Calibration des chambres de sédimentation	9
5.3 Prise d'essai de faibles volumes d'échantillon	12
5.4 Méthode de dilution	12
5.4.1 Dilution avec fiole jaugée	12
5.4.2 Dilution avec pipette et cône	13
5.5 Traitement spécifique pour l'identification des diatomées	13
5.5.1 Préparation de la lame.....	14
5.5.2 Identification, comptage	14
6 Fidélité du comptage	15
7 Validation de la méthode de dénombrement et incertitudes associées	15
Annexe A (normative) Tableau des valeurs du facteur de correction Z pour de l'eau distillée en fonction de la température de l'eau et de la pression barométrique absolue (tableau issu de la norme NF EN ISO 8655-6)	16
Annexe B (informative) Pipette modifiée pour la prise de petit volume d'échantillon	17
Annexe C (informative) Résultats des tests de préparation de lame diatomées réalisés sur quelques échantillons selon différentes méthodes	19
Annexe D (informative) Détermination du pourcentage de surface maximale à compter	25

1 LEVÉE DE L'AMBIGUÏTÉ CONCERNANT LA TERMINOLOGIE « AMAS DE SURFACE » ET PRISE EN COMPTE DU POTENTIEL DE FLOTTABILITÉ

CYANOBACTÉRIES
≠
« AMAS FLOTTANT »

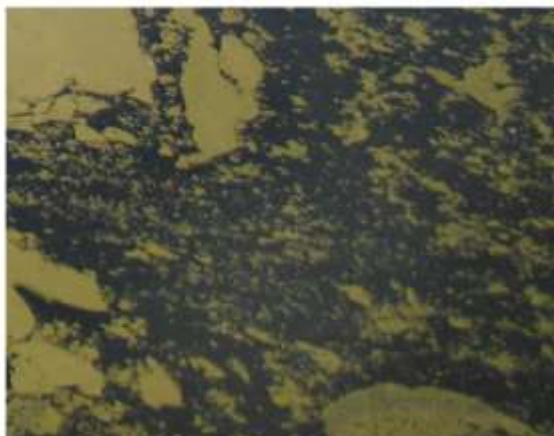


Figure 1 — Amas de surface de cyanobactéries

Les cyanobactéries peuvent parfois flotter dans l'échantillon, lorsque le processus de sédimentation n'est pas optimal, mais ne sont pas considérées comme des « amas flottants » au sens de la norme. Il est alors obligatoire de procéder à un traitement permettant leur sédimentation. La méthode de la seringue est généralement utilisée comme décrite dans la norme, au paragraphe 6.6. Après sa mise en œuvre, il est nécessaire de réaliser une vérification de l'efficacité du traitement en réalisant un nouveau contrôle de la présence de cyanobactéries flottantes sur une nouvelle prise d'essai. Le dénombrement est ensuite réalisé sur l'ensemble de la communauté phytoplanktonique avec prise en compte de ces cyanobactéries.

, mais caractérisées
par une capacité de
flottabilité

→ Réduction de la flottabilité des cyanobactéries par
augmentation de la pression hydrostatique, grâce
à l'utilisation d'une seringue

« L'éclatement des vésicules gazeuses peut être facilement réalisé en plaçant l'échantillon dans une grande seringue en plastique ... » / « l'augmentation soudaine de la pression dans la seringue fait éclater les vésicules gazeuses »



PE DE 50 À 60 ML DE L'ÉCHANTILLON
HOMOGÉNÉISÉ ET A L'ÉQUILIBRE THERMIQUE.

L'OPÉRATION EST RÉPÉTÉE AVEC LA MÊME
PRISE D'ESSAI JUSQU'À CE QU'IL N'Y AIT
PLUS DE GAZ QUI S'ÉCHAPPE LORSQUE
L'ORIFICE DE LA SERINGUE EST LIBÉRÉ

→ VÉRIFIER L'EFFICACITÉ du traitement,
recommencer l'opération si nécessaire.

2 - DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'HOMOGÉNÉISATION

5.1 Homogénéisation

Il est recommandé de procéder à une homogénéisation douce, mais efficace, de l'échantillon avant la prise du sous-échantillon à faire sédimenter : douce, pour ne pas fractionner des colonies, et efficace pour permettre une bonne séparation des individus et faciliter la sédimentation aléatoire ultérieure.

Pour ce faire il est recommandé de procéder à une agitation de l'échantillon en le tenant d'une main et en réalisant doucement 20 mouvements en huit (principe de Paul Schatz - Figure 2) immédiatement avant la prise d'essai à sédimenter.

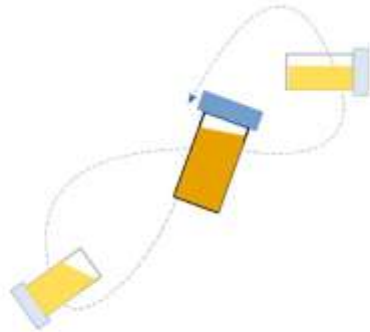


Figure 2 — Schéma du principe de l'agitation avec des mouvements de huit

La méthode d'agitation doit être clairement définie au sein du laboratoire pour qu'elle soit reproductible d'un opérateur à un autre

FLACON REMPLI À ENVIRON 80%
de sa capacité max



MOUVEMENT EN 8 – agitation modérée

Veiller à limiter le risque de
fractionnement des colonies



IMMÉDIATEMENT AVANT LA PRISE D'ESSAI
pour éviter les risques de pertes d'homogénéité
par stratification

3a - MÉTROLOGIE ET CALIBRATION DES CHAMBRES DE SÉDIMENTATION ET COLONNE



Figure 4 — Chambre tubulaire de sédimentation fixe. 1: chambre avec colonne fixe de 10 mL, 2 : chambre avec colonne fixe de 25 mL, 3 : lamelles épaisses

- Calibration avant 1^{ère} utilisation par GRAVIMÉTRIE de CHAQUE COUPLE
- Principe basé sur des PESÉES À VIDE (n=10) et des PESÉES REMPLIES avec de l'eau (n=10).
- Soient 20 mesures pour un même couple colonne + platine, à fermer par une lamelle épaisse.
- EAU DISTILLÉE / correction en fonction de
 - o la température et
 - o la pression atmosphérique

Annexe A (normative)

Tableau des valeurs du facteur de correction Z pour de l'eau distillée en fonction de la température de l'eau et de la pression barométrique absolue (tableau issu de la norme NF EN ISO 8655-6)

Valeurs Z en microlitres par milligramme

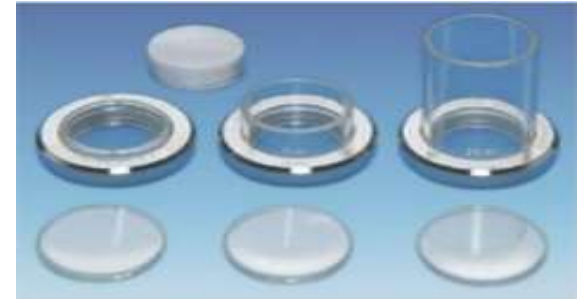
Température °C	Pression barométrique kPa						
	100	85	90	95	100	101,3	105
15,0	1,051 7	1,051 8	1,051 9	1,051 9	1,052 0	1,052 0	1,052 0
15,5	1,051 8	1,051 9	1,051 9	1,052 0	1,052 0	1,052 0	1,052 1

Le volume exact des chambres de sédimentation doit être précisément connu car il est pris en compte dans les calculs des concentrations. Les caractéristiques de chaque colonne ont été définies en usine, mais sans certificat de calibration. Une étape de calibration est alors nécessaire avant sa première utilisation pour les observations au microscope. Cette calibration consiste, pour chacune des chambres de sédimentations, à définir le volume exact pour chaque couple (colonne + platine), fermée par une lamelle épaisse avec une tolérance de 1 % sur la mesure du volume.

3b - MÉTROLOGIE ET CALIBRATION DES CHAMBRES DE SÉDIMENTATION ET COLONNE

CHAMBRES ET COLONNES DE SEDIMENTATION :

- ENREGISTREMENT DU VOLUME MOYEN en millilitres (ml) de chacune des chambres de sédimentation
- ENREGISTREMENT DU VOLUME MOYEN en millilitre (ml) de chaque colonne de sédimentation amovible
- IDENTIFICATION INALTÉRABLE des chambres et colonnes. Les colonnes (mobile et fixe) doivent en plus porter l'**indication** de leur volume de calibration (gravage, étiquette plastifiée) ou à défaut une indication renvoyant à une table de correspondance « numéro-volume ».
- AIRE MOYENNE de chacune des chambres de sédimentation.



VOLUME À CONSIDÉRER POUR LA
SÉDIMENTATION : DE 1 À 50 ML EN
FONCTION DE L'ABONDANCE

3 C - MÉTROLOGIE ET CALIBRATION DES CELLULES DE COMPTAGES

- Utilisable dans le cas D'OBSERVATION EN DIRECT ou pour le DÉNOMBREMENT À PARTIR DE L'ÉLUAT issu de la filtration* d'un échantillon (cas des EDCH dans la XP T90-330).

* Modalités de filtration : membrane en polycarbonate blanche porosité max de 3 μm , diamètre de membrane de 47 mm ou 25 mm. Dépression max de - 700 mbar.

Remarque : Possibilité de réaliser une observation microscopique de la membrane (notamment si diamètre de 25 mm) pour éviter l'étape d'éluat.



REPRÉSENTATIVITÉ SR (PE 1 mL)
>> NAGEOTTE (PE 50 mL)

CELLULE DE COMPTAGE :

L'utilisateur doit identifier les caractéristiques métrologiques des cellules de comptage qu'il utilise (HABITUELLEMENT LES DONNÉES DES FABRICANTS SONT SUFFISANTES) et doit utiliser des lamelles planées adaptées aux cellules de numération qu'il utilise.



3d - MÉTROLOGIE ET CALIBRATION DU MATÉRIEL D'OBSERVATION

MATERIELS D'OBSERVATION :

- Détermination de L'AIRE ASSOCIÉE À UN CHAMP D'OBSERVATION DONNÉ POUR CHAQUE GROSSISSEMENT (couple oculaire/objectif).
 - Utiliser les oculaires gradués et la lame étalon (ou un logiciel d'acquisition d'images).
- LOGICIEL D'ACQUISITION D'IMAGES ET DE MESURES : vérification de la justesse des outils de mesure intégrés au logiciel pour chaque niveau de grossissement en suivant les instructions données dans le mode d'emploi du logiciel.
 - Il est possible d'utiliser une lame étalon.
- L'OCULAIRE MICROMÉTRIQUE et LA GRILLE DE COMPTAGE doivent être étalonnés pour chaque grossissement utilisé et pour chaque microscope.
 - Pour ce faire une lame étalon est utilisée pour mesurer l'échelle du micromètre oculaire et les dimensions (pour le calcul de surface) du champ de comptage. Se référer à la norme NF EN 16 695 pour les modalités d'étalonnage.



4 - MÉTROLOGIE : DIAMÈTRE D'OUVERTURE DES INSTRUMENTS DE PIPETAGE DANS LE CADRE DES FAIBLES VOLUMES DE PRISES D'ESSAIS

Larges colonies

Faisceaux de filaments



Risques d'aspiration ou
d'écoulement entravés



Utilisation de pipettes graduées au
 $1/10^{\text{ème}}$ **A LARGE OUVERTURE**
(au moins 3 mm)



- Exemple de référence de pipettes graduées à large ouverture adaptée : Fisher Scientific réf. 11833133 ou matériel équivalent
- Des pipettes en verre peuvent être préférables pour faciliter le nettoyage et limiter l'adhérence des individus planctoniques.
- FD T90-779 autorise également sous certaines conditions l'utilisation de pipettes plastiques tronquées à leur extrémité.

5 - RÈGLES DE DÉNOMBREMENT

Objet algal = INDIVIDU =
« Entité de vie naturelle d'un individu »
(cellule, colonie ou filament)

EFFORT DE COMPTAGE ATTENDU
exprimé en individus
= 100 INDIVIDUS DE CYANOBACTÉRIES

DÉSTRUCTURATION de taxon coloniaux (vieillessement, agitation, action du Lugol, ...)

=> risque de cellules isolées qui ne doivent pas être comptabilisées comme des individus unicellulaires participant à l'effort de comptage :

- Si faible occurrence => rattachement du nombre de cellules correspondant aux individus du taxon déjà dénombrés,
- Si forte occurrence => regroupement au sein d'individus virtuels en définissant un nombre moyen de cellules par individus. Les individus virtuels sont intégrés à l'effort de comptage.

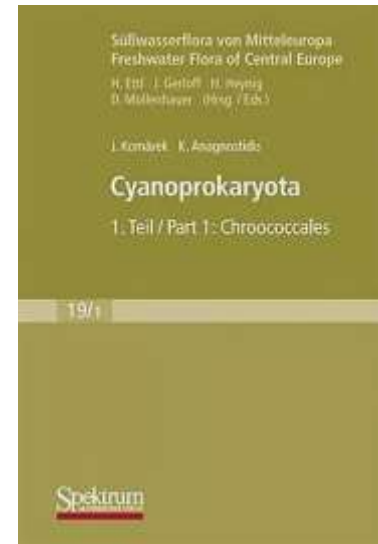
6 a - DÉTERMINATION DES GENRES EN PRÉSENCE – ÉLÉMENTS GÉNÉRAUX

- Une détermination valide à un niveau taxonomique moindre est préférable à une détermination erronée à un niveau taxonomique supérieur.
- ouvrages de détermination de référence récents et adaptés (zone géographique).
- Mise en place **d'une** veille documentaire active concernant la taxonomie du domaine.
- En cas de doute :
 - o observation parallèle entre lame et lamelle (entre x400 et x1 000).
 - o Recours possible à **l'échantillon** non fixé pour vérifier certains critères **d'identification** *
 - o Prise de vue et archivage pour sollicitation **d'un** référent interne ou externe à la structure concernant la détermination
 - Identifier en amont **d'un** expert reconnu qui pourra être sollicité si nécessaire

* Introduction dans la norme **d'une** tolérance pour fixer les échantillons dans les 4 à 6 heures consécutives à **l'échantillonnage**

6b - DÉTERMINATION DES GENRES EN PRÉSENCE – OUVRAGES DE RÉFÉRENCE

- Joosten A.M.T., 2006. Flora of the blue-green algae of the Netherlands, I – The non-filamentous species of inland waters. KNNV, Utrecht, 239 pp.
- Komárek J. et Anagnostidis K., 1999. Cyanoprokaryota, 1. Teil/ 1st Part: Chroococcales. In: Ettl H, Gärtner G, Heynig H and Mollenhauer D (Eds) Süßwasserflora von Mitteleuropa, 19/1, Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548 pp.
- Komárek J. et Anagnostidis K., 2005. Cyanoprokaryota -2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. – In: Büdel B., Krienitz L., Gärtner G. & Schagerl M. (Eds), Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2, Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 759 pp.
- Komárek J., 2013. Cyanoprokaryota - 3. Teil/ 3rd part: Heterocytous Genera. – In: Büdel B., Gärtner G., Krienitz L. & Schagerl M. (Eds.), Süßwasserflora von Mitteleuropa (Freshwater Flora of Central Europe), Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, 1130 pp.
- Wehr, J.D., Sheath, R.G., Kociolek, P., 2015. Freshwater algae of North America: ecology and classification, 2^eed. Academic press, Amsterdam, NLD



6 C - DÉTERMINATION DES GENRES EN PRÉSENCE – PHOTOTHÈQUE

- Base de données numériques taxonomiquement classifiée,
- Clichés de référence **d'origine** interne et éventuellement externe au laboratoire,
- A minima les principaux taxons rencontrés dans le cadre de l'**activité** analytique habituelle du laboratoire
- mise à jour en continu
- fiabilité assurée.
- Mise à disposition
 - du personnel qui réalise les déterminations,
 - Consultables par des intervenants extérieurs notamment dans le cadre **d'audits**

Agence européenne de l'environnement



4	Health impacts of changed water temperature, chemistry and ecology	62
4.1	Increased temperatures of drinking water supply	62
4.2	Saline intrusions	63
4.3	Harmful cyanobacterial and algal blooms	64
4.2	Legionella	67
4.3	Vibrio	67
4.6	Emerging risks	70



“The technical guidance is primarily addressed at environmental agencies of the European countries, professionals and other authorities responsible for monitoring and management of blooms in waterbodies.”



https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC133331/JRC133331_01.pdf

Paramètres de gestion identifiés :

- Chlorophylle-A
- Biovolume

Méthode analytique de mesure des concentration en cyanotoxines :

- Elisa, ...

Contents	
Abstract	1
Acknowledgements	2
Introduction	3
PART I	4
1. Protocols for monitoring cyanobacterial blooms	5
1.1. Secchi DEPTH	7
1.2. Chlorophyll a	9
1.3 PHYTOPLANKTON ABUNDANCE AND CYANOBACTERIAL BIOVOLUME	10
1.3.1 Analysis of phytoplankton abundance	11
1.3.2 Calculation of biovolume	15
1.4 CYANOTOXINS	16
1.4.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	17
1.4.2 Liquid chromatography and ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry	20

Globalement en accord avec les orientations
prises au niveau français.

3 — Méthode CYAMF (Analyse), Dénombrement en cellule de comptage sans ou avec concentration préalable par filtration membranaire et élution.

DÉNOMBREMENT EN CELLULE DE COMPTAGE SANS OU AVEC CONCENTRATION PRÉALABLE PAR FILTRATION MEMBRANAIRE ET ÉLUTION

- ❑ Souhait que les laboratoires puissent disposer d'un RÉFÉRENTIEL dédié à cette méthode qui sera FOCALISÉ SUR LE CONTRÔLE SANITAIRE (contrairement au projet de norme XP T90-330),
- ❑ Intégration dans le référentiel CYAMF des éléments techniques issus de la norme XP T90-330 (métrologie, calibration, photothèque, ...),
- ❑ Mise en consultation parallèlement à la mise en consultation de la XP T90-330,

DÉNOMBREMENT EN CELLULE DE COMPTAGE SANS OU AVEC CONCENTRATION PRÉALABLE PAR FILTRATION MEMBRANAIRE ET ÉLUTION

PRINCIPAL INTÉRÊT DE LA MÉTHODE :

- rapidité de mise en œuvre (pas de délai de préparation de l'échantillon contrairement à la sédimentation qui nécessite un délai d'équilibrage de la température de l'échantillon et des temps de sédimentation).

INCONVÉNIENT DE LA MÉTHODE :

- représentativité questionnable pour les prises d'essais les plus faibles, notamment pour l'utilisation de la cellule de Nageotte (50 µl soumis à observation pour un éluat de 1 ml)



Version	Nature des modifications (majoration/minoration)	Date	Principales modifications
v1	Version initiale	Novembre 2018	
v2	majure	2022	Mise en cohérence avec le contenu de la XP T90-330
v3			

DÉNOMBREMENT EN CELLULE DE COMPTAGE SANS OU AVEC CONCENTRATION PRÉALABLE PAR FILTRATION MEMBRANAIRE ET ÉLUTION

□ PERSPECTIVES :

- Ouverture à **d'autres** cellules de dénombrement,
 - Cellule de Sedgewick-Rafter (1 ml)
- EIL 2025 / rapprochement des OCIL suite parution des méthodes de référence,
 - Suivi des méthodes et du détail des modalités mises en **œuvre**
- Synthèse des données à l'**horizon** de 2 à 3 ans au moment du passage de la XP T90-330 en NF T90-330.



EIL / ACCRÉDITATION / AGRÉMENT

2025	EAUX DE LOISIRS AGRÉMENT I-1	EDCH AGRÉMENT E-1
Phytoplancton et macro-algues	Oui © EIL 2025	Non
Cyanobactéries	Oui © EIL 2025	Oui © EIL 2025
Cyanotoxines	Oui © EIL 2025	Oui © EIL 2025

Méthodes d'analyses identifiées

XP T90-719 ou NF EN 15 204

XP T90-330 ou méthode interne (CYAMF)

Méthode (Chromato, ELISA)

4 - Perspectives :

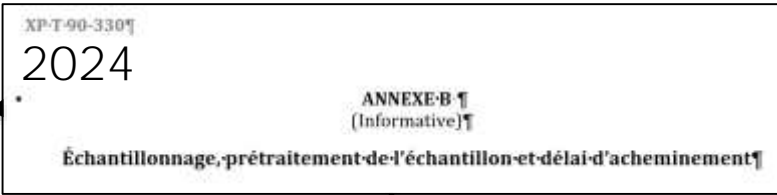
Projet de norme « Echantillonnage »



ANNEXE INFORMATIVE du projet de norme XP T 90-330, en attendant une norme de prélèvement dédiée



Très majoritairement orienté prélèvement



OBSERVATION DE LA ZONE D'ÉCHANTILLONNAGE :

- EFFLORESCENCE, ÉCUME, DÉPÔTS COLORÉS SUR TOUT OU PARTIE DE LA ZONE ?
 - ATTENTION À PRENDRE EN COMPTE DES VENTS DOMINANTS
- CHANGEMENT DE COULEUR, POISSONS MORTS, MAUVAISES ODEURS ?
- RELEVER DES COORDONNÉES GÉOGRAPHIQUES ET PRISE DE VUE CONSEILLÉES,

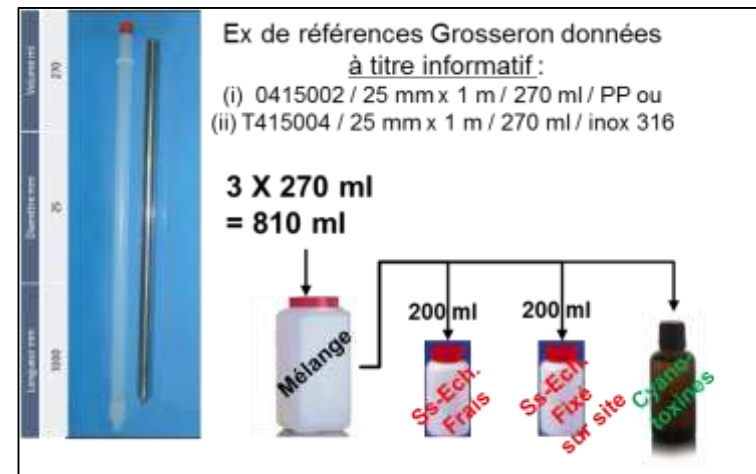
PRISE EN COMPTE DES BESOINS POUR LES PARAMÈTRES COMPLÉMENTAIRES :

- CHLOROPHYLLE-A
- CYANOTOXINES

ECHANTILLONNAGE EN ZONE DE BAINNADE :

- PRÉLÈVEMENT INTÉGRÉ,
- 3 PRÉLÈVEMENTS DANS LA COLONNE D'EAU, REPARTIS SUR LA ZONE, À UNE PROFONDEUR SIMILAIRE ET MÉLANGÉS DANS UN RÉCIPIENT COLLECTEUR AVANT D'ÊTRE RAPIDEMENT DISTRIBUÉ DANS LES FLACONS DE PRÉLÈVEMENT
- TUBES ÉCHANTILLONNEURS (TUBE PLONGEANT) MANIPULABLE D'UNE SEULE MAIN (1 MÈTRE, 250 ML),
- DANS LA ZONE DE PROFONDEUR REPRÉSENTATIVE DES BAINNADES : 1 À 1,5 M,
- LE PRÉLÈVEUR VEILLE A LA REPRÉSENTATIVITÉ DE L'ÉCHANTILLONNAGE EN FONCTION DES SPÉCIFICITÉS DU SITE, DE SITUATION OBSERVÉE LE JOUR DE PRÉLÈVEMENT, ET DE LA STRATÉGIE ÉVENTUELLEMENT MISE EN PLACE AVEC LE DONNEUR D'ORDRE OU LE GESTIONNAIRE,

Exemple de stratégie d'échantillonnage



Flacon « cyanobactéries » : PP de 200 ml min.



Validation de la stratégie d'échantillonnage en amont de la saison avec le donneur d'ordre et/ou le gestionnaire.

PRELEVEMENT COMPLEMENTAIRE

EXEMPLE 1 : DANS UNE ZONE DE PROLIFERATION VOISINE DE LA ZONE DE BAINNADE

Un prélèvement complémentaire peut être réalisé dans la colonne d'eau en dehors de la zone de baignade selon les mêmes modalités dans une zone de prolifération qui serait voisine de la zone de baignade.

EXEMPLE 2 : DANS UNE ACCUMULATION DE SURFACE AU NIVEAU DE LA ZONE DE BAINNADE OU A PROXIMITÉ

PRÉCONISATION INITIALE	EVOLUTION	COMMENTAIRE
ANALYSE <u>QUALITATIVE</u>	/	L'objectif est de VERIFIER que l'accumulation en surface est imputable à des cyanobactéries et d'IDENTIFIER les genres en présence.
Petit flacon à col large Verre ou plastique		Recueil avec un mouvement circulaire initié depuis les 1 ^{er} cm d'eau vers la surface - env.
Remise en suspension dans un faible vol. d'eau filtrée sur 0,45 µm		L'ajout d'eau filtrée permet de réduire le risque de dégradation pendant le transport.

FLACONS DE PRÉLÈVEMENT :

- Flacon « cyanobactéries » : PP DE 200 ML MINIMUM,
- Chlorophylle-a : POLYÉTHYLÈNE OPAQUE OU EN VERRE BRUN DE 1 L (À REMPLIR COMPLÈTEMENT),
- Cyanotoxines : DES FLACONS EN VERRE BRUN AMBRÉ D'UNE CONTENANCE MINIMALE DE 200 ML.

PRETRAITEMENT (FIXATION-STABILISATION), POUR LE DÉNOMBREMENT DES CYANOBACTÉRIES

- LUGOL ALCALIN : fixation conseillée directement sur site (flacon compte goutte par exemple, mais possiblement réalisable au laboratoire dans les 4 à 6h consécutives au prélèvement. Attention à la composition du Lugol alcalin utilisé qui doit être suffisamment concentré / Cf. annexe D de la XP T90-719.

Note : *L'ajout de tout fixateur est à proscrire pour les échantillons destinés à la quantification des cyanotoxines.*

XP T90-719.

- Solution iodo-iodurée de Lugol alcalin	
■ - Iode en paillette	- - 10 g/l
■ - Iodure de potassium	- - 20 g/l
■ - Acétate de sodium	- - 20 g/l
■ - Eau distillée	- - 200 ml/l

Concentration finale
de 0,5%, soit 8 à 10
gouttes pour 100 ml
(0,5 ml pour 100 ml)



CERTIFICAT D'ANALYSE

NUMÉRO DE LAB. : 23000

Prélevé par : []
Date : []

PRODIGE

Qualification : []

Etat : []
Prélevé par : []
Date : []

CONFORME

Date : []

Disponibilité de solution commerciale, pour info

MODALITÉS ET DÉLAIS D'ACHEMINEMENT

- ENCEINTE ISOTHERME : **obscurité + maîtrise** de l'exposition à des températures excessives,
- Idéalement acheminement dans un **DÉLAI COMPATIBLE AVEC UNE ANALYSE LE JOUR MÊME DU PRÉLÈVEMENT**,
- **En cas d'impossibilité**, transport à 5+/-3°C.
- **DÉLAI MAXIMAL DE MISE EN ANALYSE RECOMMANDÉ : 48 H**



MODALITÉS DE CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS FIXÉS

5+/-3°C + obscurité

Conservation à temp. amb et à l'**obscurité** si la mise en analyse dans la continuité de la réception

Reliquat : 30 jours

Reliquat : 1 mois (à l'obscurité)

Reliquat : Réutilisation possible pour levée de doute

« Après l'analyse initiale, le reliquat des échantillons fixés au Lugol alcalin doit être conservé pendant un délai d'un mois (à l'**obscurité**) et peut être utilisé pour une ré-analyse notamment dans le cadre d'une levée de doute qui concernerait le premier résultat de dénombrement et/ou d'**identification**. Passé ce délai, le laboratoire peut décider de jeter les échantillons lugolés.

Ils devront être éliminés en respectant les bonnes pratiques de laboratoire en ce qui concerne l'**élimination** de produits chimiques dangereux pour l'**environnement** (retraitement). »

1

- **OBSERVATION VISUELLE** essentielle pour détecter le début des épisodes de prolifération.
- **FORMATION ADÉQUATE** pour les préleveurs et gestionnaires.

2

- **FICHE TERRAIN** nécessaire pour chaque prélèvement :
 - prioriser les échantillons au laboratoire,
 - apporter des informations complémentaires notamment en cas de prolifération.

3

- Modalités de prélèvement :
 - **PRÉLÈVEMENT MOYENNÉ EN 3 POINTS**,
 - **sauf exception une colonne d'eau d'1 m (TUBE PRÉLEVEUR)**,
 - **Sous échantillonnage sur site : 200 ml frais + 200 ML FIXÉS + volumes pour autres paramètres.**

4

- Acheminement vers le laboratoire à **L'OBSCURITÉ EN ENCEINTE ISOTHERME** pour éviter une exposition des échantillons à des températures excessives.

5

- Débuter une **ANALYSE IDÉALEMENT LE JOUR DU PRÉLÈVEMENT** voire dans les 24 H,
- Analyse après 24h, uniquement si échantillon fixé au **LUGOL ALCALIN**,
- Si impossibilité analyse dans les 48H max

6

- Concernant les échantillons FIXES
- Si absent, sous-échantillon fixés à préparer dès réception au labo,
- Possibilité de conserver les échantillons fixés en attente de première analyse à température ambiante (+ obscurité).
- Conservation des reliquats d'échantillons fixés 1 mois à l'obscurité (réfrigération facultative).

ars **ARS Auvergne-Rhône-Alpes** **ARS Bourgogne-Franche-Comté** **ARS Île-de-France** **ARS Normandie** **ARS Occitanie** **ARS Pays de la Loire** **ARS Provence-Alpes-Côte d'Azur**

Cyanobactéries des rivières, Apprendre à les reconnaître.

Couleurs

Les biofilms à cyanobactéries peuvent prendre des teintes allant du noir au vert - boueille

ASPECT

Elles sont parfois marbrées de gris et ont un aspect visqueux, plus ou moins bulleux que l'on sent au toucher

Evolution

Lorsqu'elles se détachent de leur support, elles forment des flocons qui flottent à la surface de l'eau.

- Contacts et Informations -

- Direction Départementale des territoires : dir@leves.gouv.fr
- Agence Régionale de Santé Centre-Val de Loire : 02 38 42 42 42



1. Objectif de l'échantillonnage :

- CONFIRMER que le biofilm est totalement composé (ou dominé) par des cyanobactéries benthiques.
- IDENTIFIER LES GENRES de cyanobactéries benthiques qui constituent le biofilm et **s'attacher** à définir la présence de genres potentiellement toxinogènes,
- SI DOMINANCE DE CYANOBACTÉRIES BENTHIQUES, RECHERCHER la présence **d'anatoxine** afin de déterminer un éventuellement dépassement du seuil de détection.

NOTE : La quantification de l'anatoxine n'est pas à réaliser systématiquement. Si la quantification d'anatoxine 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 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

2. Sites, périodes et fréquences d'échantillonnage :

- L'**observation** visuelle permettra la DÉFINITION DES ZONES ET PÉRIODES DE DÉVELOPPEMENTS DES BIOFILMS mais aussi celle des périodes favorables aux DÉCROCHEMENTS des biofilms puis des ZONES D'ACCUMULATION après leur transport par la rivière.
- Les modalités de prélèvements doivent être adaptées en fonction des caractéristiques locales et de leurs éventuelles modifications, par exemple
 - pendant des périodes de SÉCHERESSE favorables à l'**implantation** et au développement des biofilms du fait :
 - d'**une** diminution des vitesses de courant,
 - d'**une** diminution des hauteurs d'**eau** conduisant à une plus grande exposition des substrats aux rayonnements,
 - à la suite D'ÉVÉNEMENTS PLUVIEUX susceptibles de décrocher du biofilm et/ou de conduire à des transports vers l'**aval**. Dans ce cas de figure, les paramètres suivants doivent être pris en compte :
 - augmentation de la profondeur,
 - augmentation du débit,
 - augmentation de la vitesse du courant.

3. Modalités **d'échantillonnage** et **d'acheminement** des échantillons de biofilms.

- Dans les zones où des développements (ou accumulations) de biofilms à cyanobactéries sont visibles, prélever :
 - 3 échantillons de biofilms au minimum
 - répartis sur la zone de développement (ou **d'accumulation**).
 - Prélèvement représentatif de la diversité des substrats en présence

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. Lors de l'**échantillonnage** sur différents substrats, la démarche visera à collecter une surface similaire sur chacun des substrats.

- L'ÉCHANTILLONNAGE S'EFFECTUE AVEC DES GANTS, SUR LES SUPPORTS (BLOCS, GALETS, VÉGÉTAUX) À L'AIDE DE PINCES FINES À BOUT PLAT.
- 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**.
- Des fragments de taille équivalente de chaque biofilm prélevé seront regroupés dans UN PREMIER TUBE EN VUE DE L'IDENTIFICATION EN MICROSCOPIE ET DANS UN DEUXIÈME TUBE EN VUE DE LA RECHERCHE ÉVENTUELLE DE TOXINES.

3. Modalités d'échantillonnage et d'acheminement des échantillons de biofilms.

Les échantillons de biofilms destinés à **L'IDENTIFICATION DES CYANOBACTÉRIES BENTHIQUES ET À LA DÉTERMINATION DE LEUR DOMINANCE** au sein du biofilm doivent être placés dans des **TUBES EN POLYPROPYLENE-PP DE 5 ML OU PLUS**. Le volume des tubes sera **COMPLÉTÉ AVEC DE L'EAU** afin que les fragments de biofilms soient totalement immergés. Lors du prélèvement, **CES ÉCHANTILLONS DOIVENT ÊTRE FIXÉS AU LUGOL ALCALIN**, en ajoutant un volume variable de lugol (selon la densité des biofilms) permettant **l'obtention d'une** couleur orangée.

Les échantillons de biofilm destinés à la **RECHERCHE DE TOXINES** seront placés dans des **TUBES OU FLACONS EN VERRE AMBRÉ DE 50 ML**. **L'addition** de tout fixateur est à proscrire pour les échantillons destinés à la quantification de toxines.

Tous les échantillons doivent être transportés dans une **ENCEINTE RÉFRIGÉRÉE MAINTENANT UNE TEMPÉRATURE DE 5 +/- 3 °C, ET À L'OBSCURITÉ** jusqu'au laboratoire. Au laboratoire, les échantillons de biofilms destinées à **l'identification** et fixés au Lugol peuvent être conservés à température ambiante à **l'abri** de la lumière. **SI LES TOXINES NE SONT PAS ANALYSÉES IMMÉDIATEMENT, LES ÉCHANTILLONS DESTINÉS À LA RECHERCHE DE TOXINES PEUVENT ÊTRE CONSERVÉS EN ENCEINTE RÉFRIGÉRÉE JUSQU'À 36 H MAXIMUM APRÈS LE PRÉLÈVEMENT.**

4. Préparation et observation des biofilms.

- Les biofilms doivent être observés sous un MICROSCOPE OPTIQUE DROIT ET ENTRE LAME ET LAMELLE.
- L'observation doit dans un premier temps permettre de CONFIRMER LA NATURE DU BIOFILM et la DOMINANCE DE CYANOBACTÉRIES BENTHIQUES.
- L'analyse sera réalisée selon des ASPECTS QUALITATIFS VISANT À IDENTIFIER LES GENRES en présence et à statuer sur la présence de GENRES POTENTIELLEMENT TOXINOGENES.
- Mesure de L'ANATOXINE après homogénéisation de 3 biofilms (ÉCHANTILLON COMPOSITE HOMOGENEISE).

Avant toute mesure de toxines, il est nécessaire d'homogénéiser complètement l'échantillon résultant du mélange des différents fragments de biofilms. Ainsi, la recherche d'anatoxines susceptibles d'être produites par les cyanobactéries toxigènes identifiées, sera effectuée sur un échantillon composite de 3 biofilms préalablement mélangés et homogénéisés.

5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines » du 11 avril 2024

5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

- **107 participants** : laboratoires agréés du contrôle sanitaire des eaux, le COFRAC, des organisateurs de circuits inter laboratoires, et des experts ayant contribué au rapport cyanobactéries dans les eaux
- **Ordre du jour**
 - Contexte réglementaire (DGS) et normatif
 - **Etat de l'art** (agrément, accréditations COFRAC, données SISE-Eaux, équivalence entre méthodes)
 - Aspects techniques, hygiène et sécurité
 - Ponctué de temps d'échanges
- **Retour sur l'enquête sur les pratiques des laboratoires en matière d'analyse de cyanotoxines**
→ 15 répondants

5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

- **107 participants** : laboratoires agréés du contrôle sanitaire des eaux, le COFRAC, des organisateurs de circuits inter laboratoires, et des experts ayant contribué au rapport cyanobactéries dans les eaux
- Ordre du jour
 - Contexte réglementaire (DGS) et normatif
 - **Etat de l'art** (agrément, accréditations COFRAC, données SISE-Eaux, équivalence entre méthodes)
 - Aspects techniques, hygiène et sécurité
 - Ponctué de temps d'échanges
- Retour sur l'enquête sur les **pratiques des laboratoires en matière d'analyse de cyanotoxines**
→ 15 répondants

} FAQ

5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

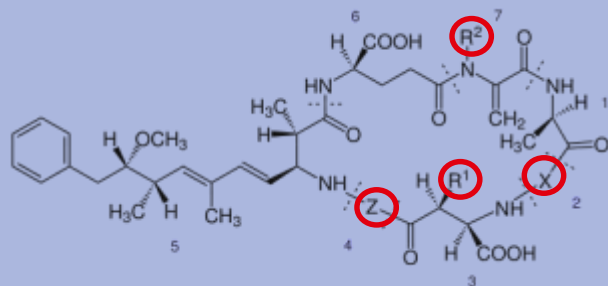
Foire aux questions cyanotoxines

- Gestion des sites de baignade (DGS)
- Méthodologiques
 - Echantillonnage (flaconnage et stabilisant en EDCH)
 - Prétraitement des échantillons (congélation/décongélation)
 - Méthode ELISA (critères de validation de résultats, couverture des variants/%réactions croisées...)
 - Méthode chromatographique (les variants de microcystines, d'anatoxines...)
 - Revue de demande & rendu des résultats (unité d'expression des résultats...)

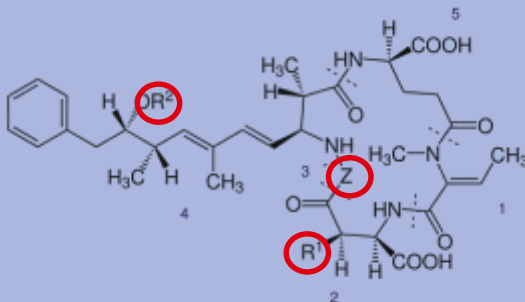
5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Les principales cyanotoxines en eau douce

Hépatotoxines
(Peptide cyclique)

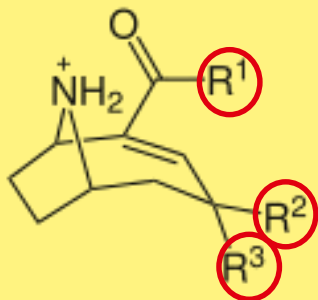


Microcystines
→ 246 variants

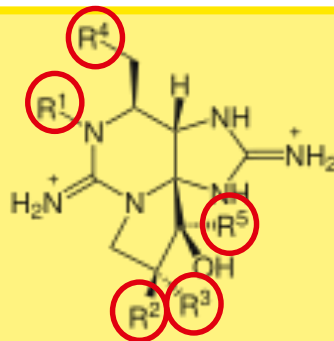


Nodularines
→ 8 variants

Neurotoxines
(Alcaloïdes)

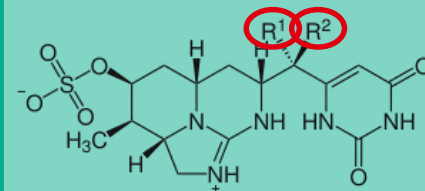


Anatoxines
→ 10 variants



Saxitoxines
→ 26 variants

Cyto- et
Hépatotoxines
(Alcaloïdes)



Cylindrospermopsines
→ 2 variants

5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Prélèvement des échantillons en EDCH

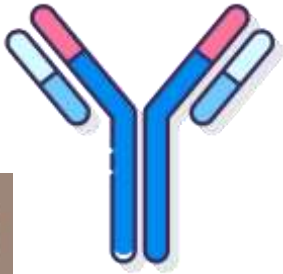


Certaines cyanotoxines sont affines pour le plastique
L'ATX-a est photosensible → dégradation → faux-négatifs

	Thiosulfate de sodium	Acide ascorbique	pH
Anatoxine-a	✘	✔	5-7
Cylindrospermopsine	✔	✔	4-7 4-11 (brute)
Microcystines	✔	✘	5-11
Saxitoxine	✔	✔	-

5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Dosage des cyanotoxines



ELISA



LC-MS/MS

Besoin de couverture
des variants

Enjeux de réactivité

Coûts

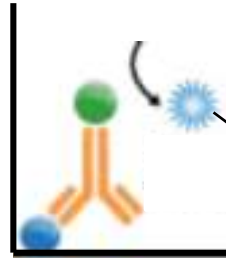


5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Dosage des cyanotoxines : ELISA



Cyanotoxine



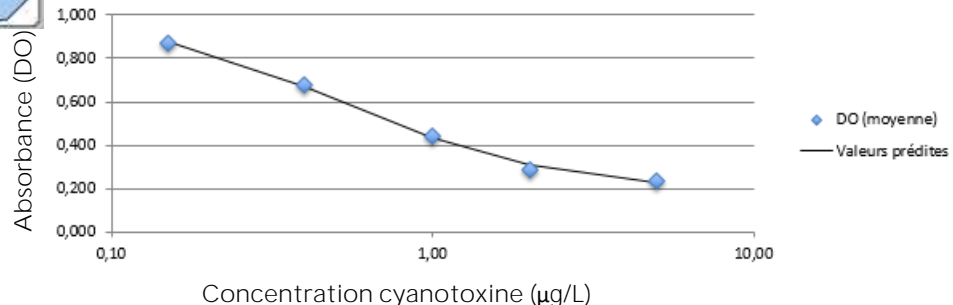
Substrat

Anticorps anti-cyanotoxine
couplé à une enzyme



5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

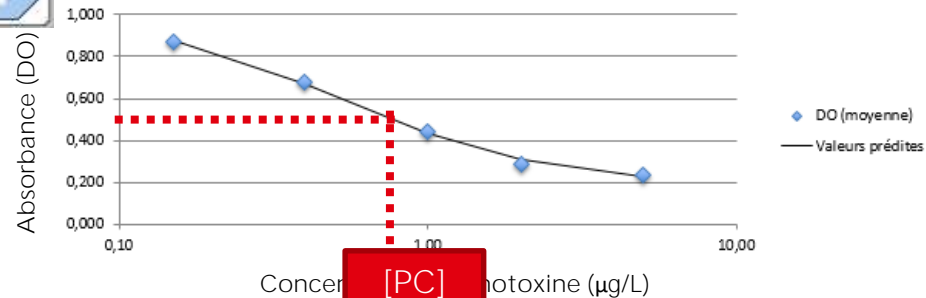
Dosage des cyanotoxines : ELISA



5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

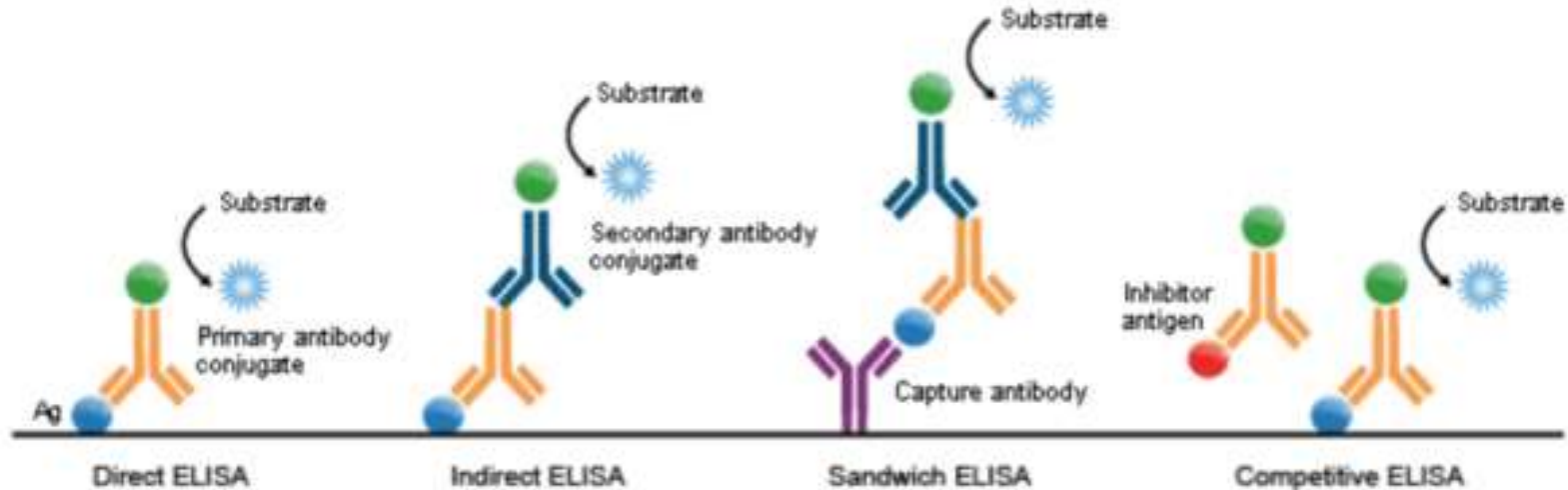
Dosage des cyanotoxines : ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RT1_1 12 1.116	RT1_4 12 0.464	SMT_1 12 1.000	SMT_4 12 0.572	SMT_3 12 0.573	SMT_11 12 0.550	SMT_14 12 1.000	SMT_17 12 1.012				
B	RT1_1 22 1.000	RT1_4 22 0.405	SMT_1 22 0.563	SMT_4 22 0.267	SMT_3 22 0.266	SMT_11 22 0.267	SMT_14 22 1.000	SMT_17 22 1.012				
C	RT1_2 12 0.960	RT1_4 12 0.278	SMT_2 12 0.752	SMT_3 12 0.245	SMT_8 12 0.260	SMT_12 12 0.322	SMT_16 12 0.900	SMT_19 12 0.652				
D	RT1_2 22 0.87	RT1_4 22 0.282	SMT_2 22 0.703	SMT_3 22 0.249	SMT_8 22 0.279	SMT_12 22 0.310	SMT_16 22 0.883	SMT_19 22 0.663				
E	RT1_3 12 0.990	RT1_4 12 0.245	SMT_3 12 0.532	SMT_8 12 0.24	SMT_8 12 0.266	SMT_13 12 0.341	SMT_18 12 0.911	SMT_19 12 1.178				
F	RT1_3 22 0.990	RT1_4 22 0.23	SMT_3 22 0.560	SMT_8 22 0.219	SMT_8 22 0.267	SMT_13 22 0.266	SMT_18 22 0.944	SMT_19 22 1.178				
G	PC1 10 0.004	BL1 30 0.63	PC1 30 0.088	BL1 144 1.144	SM1_9 12 0.320	PC1 50 0.028	BL1 50 1.240	SM1_20 12 0.878				
H	PC1 20 0.807	BL1 40 1.038	PC1 40 0.086	BL1 216 1.216	SM1_9 12 0.336	PC1 50 0.017	BL1 50 1.271	SM1_20 12 1.101				



5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Dosage des cyanotoxines : ELISA



5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Contexte normatif : analyse ELISA des cyanotoxines dans l'eau



afnor
NF U47-019

Méthodes d'analyses en santé animale - Guide de bonnes pratiques pour la mise en œuvre des techniques ELISA

afnor Qualité de l'eau — Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire
NF T-90-210

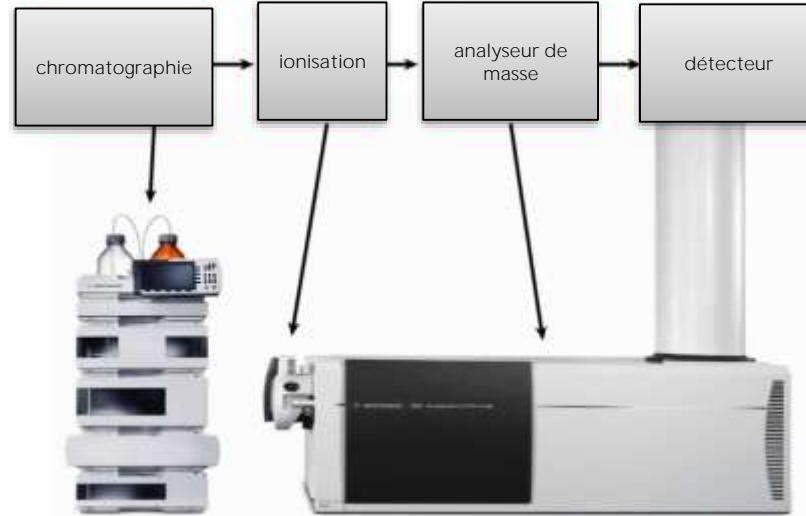
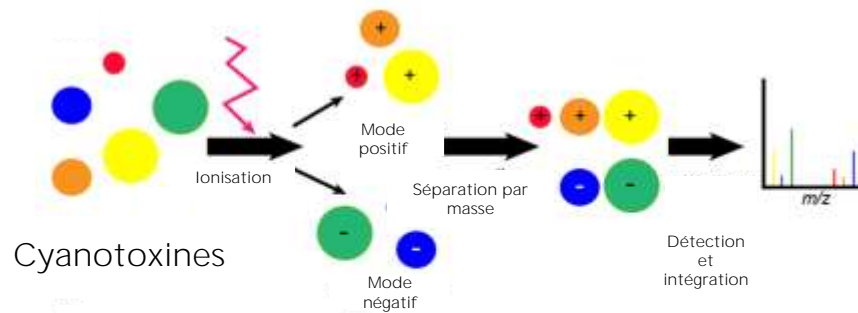


Method 546: Determination of Total Microcystins and Nodularins in Drinking Water and Ambient Water by Adda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Contexte d'accréditation

5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Dosage des cyanotoxines : LC-MS/MS



5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Contexte normatif : analyse chromatographique des cyanotoxines dans l'eau



afnor **ISO**
ISO 20179:2005

Qualité de l'eau - Dosage des microcystines - Méthode utilisant l'extraction en phase solide (SPE) et la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection dans l'ultraviolet (U.V.)

ISO TC 147-SC2

Qualité de l'eau - Dosage des toxines cyanobactériennes (anatoxine-a, cylindrospermopsine et microcystines) – Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) avec détection par masse spectrométrie (SM/SM)

afnor **ISO**
ISO 22104:2021

Qualité de l'eau - Dosage des microcystines - Méthode par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)

5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Contexte normatif : analyse chromatographique des cyanotoxines dans l'eau



METHOD 544. DETERMINATION OF MICROCYSTINS AND NODULARIN IN DRINKING WATER BY SOLID PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC/MS/MS)

Method 545: Determination of Cylindrospermopsin and Anatoxin-a in Drinking Water by Liquid Chromatography Electro spray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS)

Environ. Sci. Technol. 2010, 44, 7361–7368

Cyanotoxin Mixtures and Taste-and-Odor Compounds in Cyanobacterial Blooms from the Midwestern United States

JENNIFER L. GRAHAM,^a
KEITH A. LOFTIN,^a MICHAEL T. MEYER,
AND ANDREW C. ZIEGLER

anatoxine-a, cylindrospermopsine,
deoxycylindrospermopsine, lyngbyatoxine-a,
microcystine-LA, -LF, -LR, -LW,
-LY, -RR, -YR, et nodularine-R



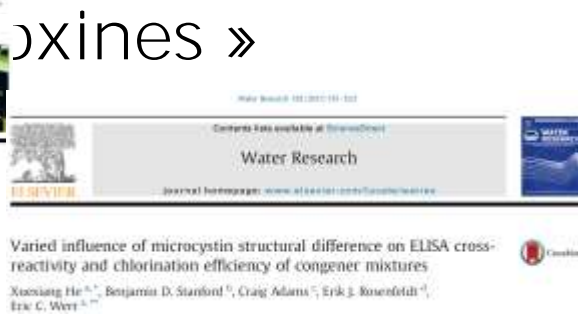
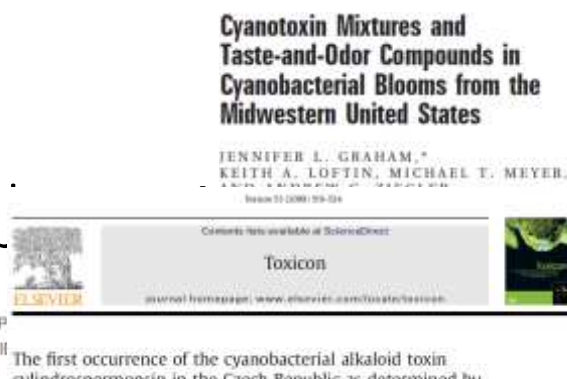
Cyanotoxins in inland lakes of the United States: Occurrence and potential recreational health risks in the EPA National Lakes Assessment 2007

Keith A. Loftin^{a,*}, Jennifer L. Graham^b, Elizabeth D. Hilborn^c, Sarah C. Lehmann^d,
Michael T. Meyer^e, Julie E. Dietze^e, Christopher B. Griffith^f

anatoxine-a, cylindrospermopsine, deoxycylindrospermopsine, acide domoïque, lyngbyatoxine-a, microcystine-LA, -LF, -LR, -LW, -LY, -RR, -YR, nodularine-R, et acide okadaïque

5 — Retour sur la 1/2

Equivalence ELISA et LC-MS/MS ?



Toxins (Basel), 2019, Jan, 11(1): 13
Published online 2019 Jan 1. doi: [10.3390/toxins11010013](https://doi.org/10.3390/toxins11010013)

Comparative Analysis of Microcystin Prevalence in Michigan Lakes by Online Concentration LC/MS/MS and ELISA
Johnna A. Birbeck,^{1*} Judy A. Westlock,^{1*} Grace M. O'Neill,¹ Brian Spies,² and David C. Szilag²

PMCID: P
PMID: [31111111](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods
Lucie Bláhová^{1,2}, Michal Oravec^{1,2}, Blahoslav Maršálek^{1,2}, Lenka Šejnotová¹, Zdeněk Šimek¹, Luděk Blüha^{1,2,3}

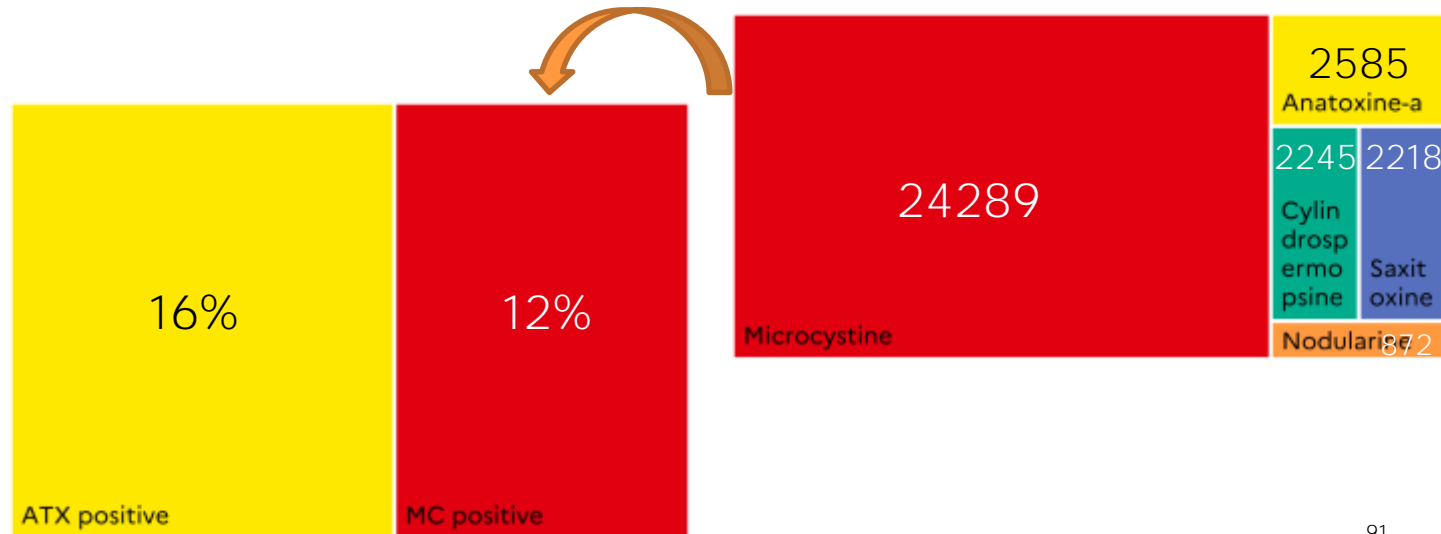
Varied influence of microcystin structural difference on ELISA cross-reactivity and chlorination efficiency of congener mixtures
Xueqiang He^{1,*}, Benjamin D. Stanford¹, Craig Adams¹, Erik J. Rosenfeldt¹, Erik C. West^{1,2,*}

- **Corrélation des résultats des 2 méthodes** en haute saison (juillet à août) mais une déviation des résultats en fin de saison (septembre-octobre). Les concentrations en microcystines sont retrouvées plus importantes par la méthode ELISA microcystine-ADDA.
- Causes de la **sous/surestimation des cyanotoxines** dans les échantillons analysés par ELISA
 - **Réactions croisées** sur les variants de cyanotoxines (ex. microcystines et nodularines), **fixations aspécifiques** ou des **interférences matricielles** (ex: la réaction croisée pour la MC-RR avec le kit ELISA MC-ADDA est de 50% de celle de la MC-LR)
 - **Sensibilité** : détection de **fragments de dégradation de cyanotoxines ou d'interférents**, **LQ plus haute** que la méthode chromatographique
 - **Spécificité** : détection de **variants de microcystines** non pris en compte dans la méthode LC-MS/MS ou pour lesquels des étalons ne sont pas disponibles

5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Fréquences d'analyses positives des cyanotoxines dans les eaux de baignade

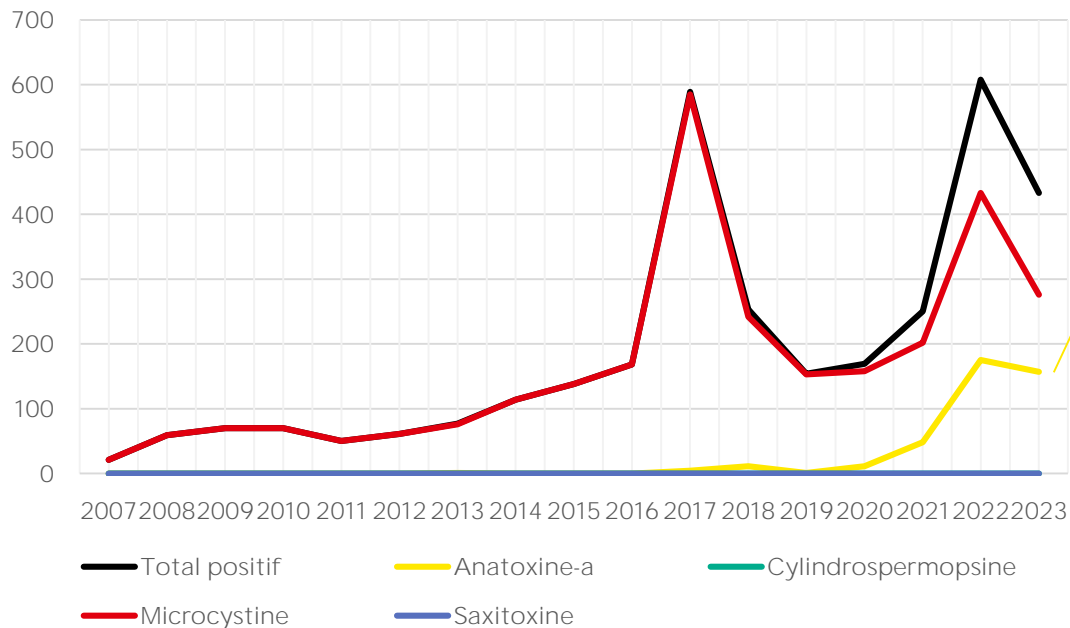
- Extraction de la base de données SISE-Eaux



5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Evolution annuelle du nombre de résultats positifs sur le dosage de cyanotoxines dans les eaux de baignade

- Extraction de la base de données SISE-Eaux



x14 en 3 ans

5 — Retour sur la ½ journée « cyanotoxines »

Equivalence ELISA et LC-MS/MS ?

- Extraction de la base de données SISE-Eaux → 5 échantillons positifs en microcystines dosés en ELISA et en LC-MS/MS (entre 2008-2009)
- Manque de confrontation des méthodes de dosages qualitatifs
- Perspective : **Screening pour connaître l'occurrence des cyanotoxines et de leurs variants**

Etude comparative des 2 méthodes d'analyse des cyanotoxines

6 — Échanges – points divers

6 — Échanges – points divers

- Mesure terrain de chlorophylle-A : intérêt et possibilité de l'utilisation de sonde,
- Données d'entrée pour la détermination du seuil de biovolume ($1 \text{ mm}^3/\text{l}$) : confirmation de la prise en compte des cyanobactéries toxigènes uniquement,
-

7 — Conclusion

