



**MINISTÈRE  
DU TRAVAIL  
DE LA SANTÉ  
ET DES SOLIDARITÉS**

*Liberté  
Égalité  
Fraternité*



**anses**

# **RÉUNION TECHNIQUE SUR LES CYANOTOXINES**



**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 dans le cas échéant*
  - *Si Pb : contact mail [christophe.rosin@anses.fr](mailto:christophe.rosin@anses.fr) / [sarah.halvick@anses.fr](mailto:sarah.halvick@anses.fr) ou portable (06 80 59 30 48)*
  
  - *Réunion TEAMS enregistrée*
-

## 1- Contexte réglementaire

## 2- Contexte normatif

## 3- Etat de l'art

## 4 - Aspects techniques

Échantillonnage & Prélèvement

Protocoles analytiques  
(prétraitement des échantillons,  
ELISA, chromatographique)

Revue de la demande et rendu des  
résultats

## 5- Aspects hygiène et sécurité

## 6- Echanges – points divers

## 7- Conclusion

# 1 — Contexte réglementaire

# 1 — Contexte réglementaire

## Eaux destinées à la consommation humaine (EDCH)

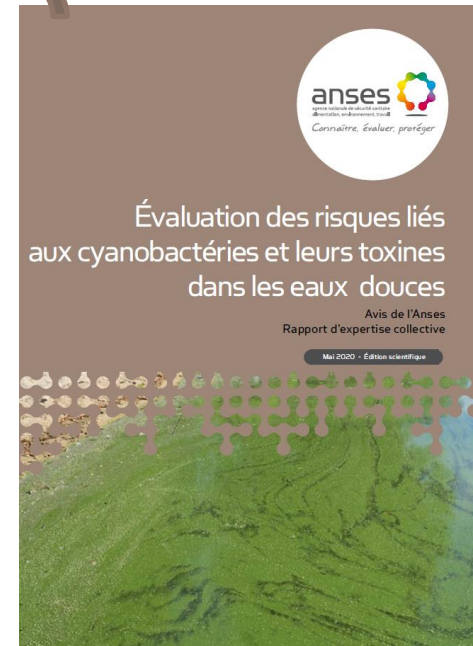
- [Arrêté du 11 janvier 2007 modifié](#) relatif au programme de prélèvements et d'analyses du contrôle sanitaire pour les eaux fournies par un réseau de distribution, pris en application des articles R. 1321-10, R. 1321-15 et R. 1321-16 du code de la santé publique
  - Analyse du paramètre « microcystines » à réaliser à la ressource (**eaux brutes superficielles**) et au point de mise en distribution (**type d'analyse P2**) lorsque les observations visuelles et/ou analytiques mettent en évidence un risque de prolifération de cyanobactéries
- [Arrêté du 11 janvier 2007 modifié](#) relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique
  - Limite de qualité réglementaire **pour les eaux distribuées à partir d'eaux brutes d'origine superficielle** = 1 µg/l pour le total microcystines (somme de toutes les microcystines quantifiées, en considérant l'ensemble des variants, intra et extracellulaires)

Total microcystines	1,0	µg/ L	Par total microcystines, on entend la somme de toutes les microcystines quantifiées, en considérant l'ensemble des variants, intra et extracellulaires. La limite de qualité s'applique uniquement pour les eaux d'origine superficielle.
---------------------	-----	-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

# 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 µg .L <sup>-1</sup> )	Cylindrospermopsines* ( en µg .L <sup>-1</sup> )	Saxitoxines* ( en µg .L <sup>-1</sup> )	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)

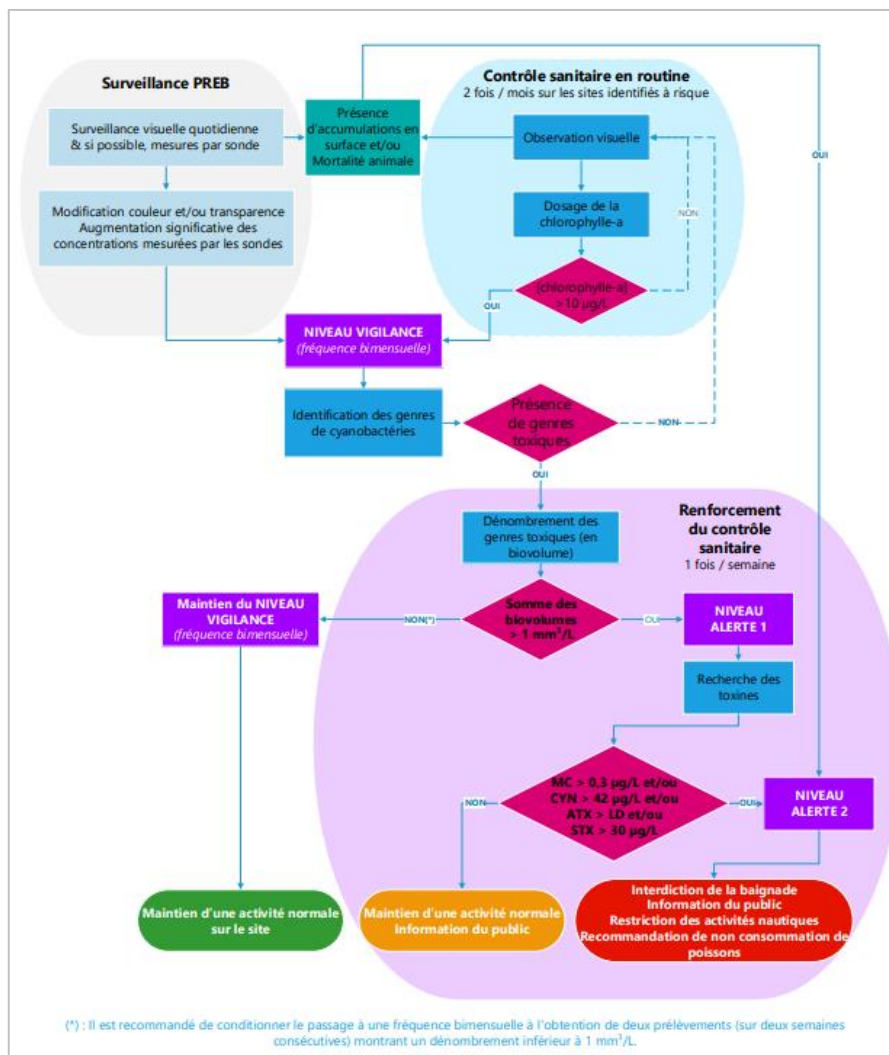
	Cyanobactéries planctoniques	Cyanobactéries benthiques
	<i>Sur sites à risque de prolifération de cyanobactéries</i>	<i>Situés dans les zones de rivières ou plans d'eau, fréquentés par le public et/ou ayant déjà présenté des proliférations de cyanobactéries benthiques, et en cas de sollicitation du gestionnaire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



# 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 sur le paramètre « recherche des genres de cyanobactéries potentiellement toxigènes » / [fréquence hebdomadaire](#)
    - **Retour à la normale** : absence de genres de cyanobactéries potentiellement toxigènes
  - **Niveau Alerte 1**
    - si somme des biovolumes des genres toxigènes > 1 mm<sup>3</sup>/L → recherche des toxines susceptibles d'être produites + information du public (affichage)
  - **Niveau Alerte 2**
    - si somme des biovolumes des genres toxigènes > 1 mm<sup>3</sup>/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 mm<sup>3</sup>/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 mm<sup>3</sup>/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 mm<sup>3</sup>/L)



Logigramme 1 : cyanobactéries planctoniques

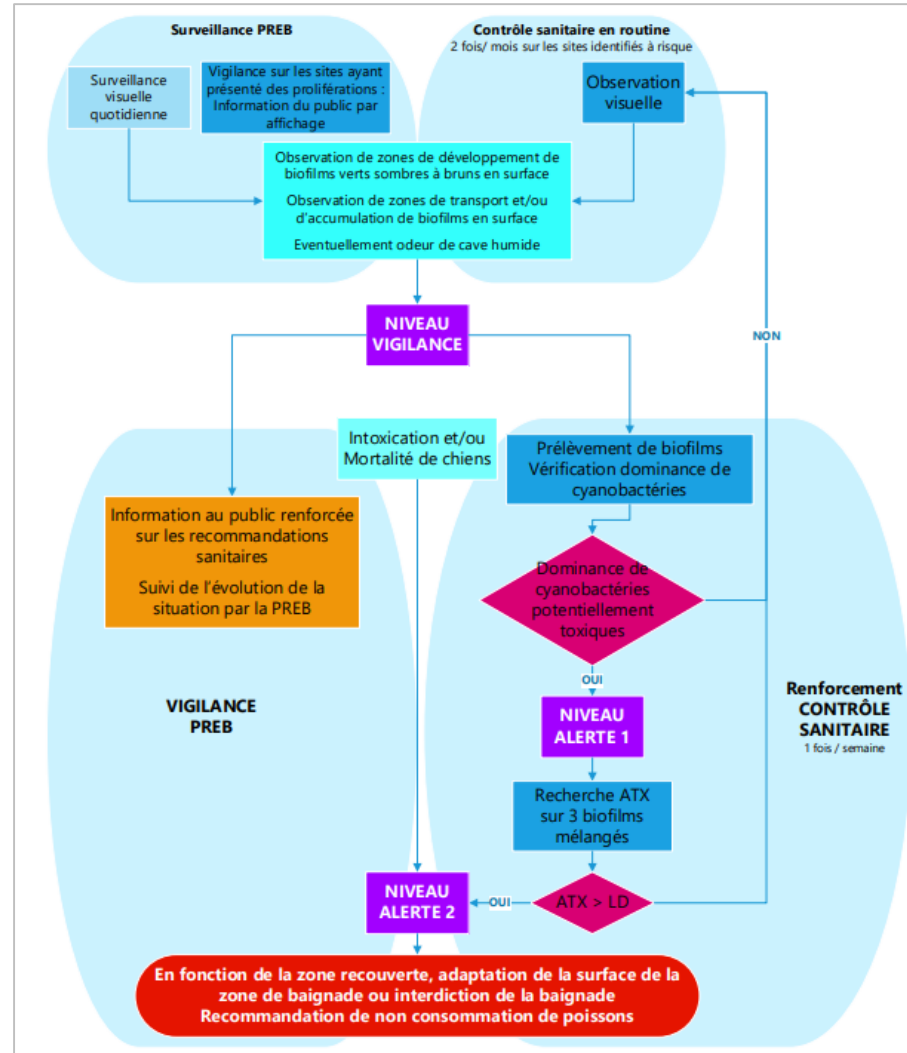
(\*) : Il est recommandé de conditionner le passage à une fréquence bimensuelle à l'obtention de deux prélèvements (sur deux semaines consécutives) montrant un dénombrement inférieur à 1 mm<sup>3</sup>/L.

# 1 — Contexte réglementaire

## Modalités de gestion pour les 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 détection d'anatoxines, absence de cyanobactéries potentiellement toxigènes et absence de biofilms

**Logigramme 2 :**  
cyanobactéries benthiques



# 1 — Contexte réglementaire

## Liste des paramètres relatifs aux cyanobactéries et cyanotoxines du référentiel SISE-Eaux

- 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 <sup>3</sup> /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 <sup>3</sup> /L	99	Microcystines, Anatoxine-a, Cylindrospermopsines, Saxitoxines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB02	ANABAENOPSIS SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	125	Microcystines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB03	APHANIZOMENON SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	72	Microcystines, Cylindrospermopsines, Saxitoxines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB04	APHANOCAPSA SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	2	Microcystines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB06	CALOTHRIX SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	215	Microcystines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB63	CHRYSOSPORUM SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	133	Cylindrospermopsines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB61	CUSPIDOTHRIX SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	95	Anatoxine-a, Saxitoxines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYATOXB	CYANOBACTÉRIES TOXINOGENES	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	/	/
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB10	CYLINDROSPERMOPSIS SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	70,2	Anatoxine-a, Cylindrospermopsines, Saxitoxines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB11	CYLINDROSPERMUM SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	65,7	Anatoxine-a
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB60	DOLICHOSPERMUM SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	290	Anatoxine-a, Anatoxine-a(S), Cylindrospermopsines, Saxitoxines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB12	FISCHERELLA SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	261,3	Microcystines
Baignades naturelles	Cyanobactéries planctoniques	CYANB51	GEITLERINEMA SP (BIOVOLUME)	Actif	Quantitatif	CT - PHYTOPLANCTONS CYANOBACTERIES TOXINOGENES	mm <sup>3</sup> /L	19,7	Microcystines

# 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 → remplacement par une référence de qualité pour la somme des biovolumes standards des cyanobactéries toxigènes de 1 mm<sup>3</sup>/L avec mise en œuvre des analyses de cyanotoxines dès dépassement de la référence de qualité réglementaire
  - Modification de la fréquence d'analyse pour ce paramètre → fréquence d'analyses bimensuelle (mensuelle actuellement) pour les sites à risque de prolifération
- **Actualisation de l'instruction « cyanobactéries »** avant la saison balnéaire 2025

# 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, cylindrospermopsine, anatoxine-A et saxitoxine)
      - 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
      - Suppression du paramètre « Phytoplancton (hors cyanobactéries) » de la liste I-1 de l'annexe IV car accréditation et EIL désormais disponibles (qui figure déjà sur la liste I-1 de l'annexe II).



# 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
  - **Annexe VI** (Méthodes d'échantillonnage et d'analyse des eaux de baignade) : pour le paramètre « cyanobactéries » : **ajout de la norme expérimentale XP T90-330** associée et du **mode opératoire Anses « CYAMF »** pour les baignades naturelles et artificielles
  - **Ajout d'une annexe VII** sur les caractéristiques de performance des méthodes de mesure pour les analyses de cyanotoxines (total microcystines, cylindrospermopsine, anatoxine-A et saxitoxine) des eaux de baignade → **LoQ (méthode ELISA) retenues** avec une incertitude de 50% + cas particulier pour le paramètre « total microcystines » reprenant la LoQ définie pour l'EDCH (harmonisation)

Paramètres	Limite de quantification	Incertitude en % exprimée à la valeur guide
<b>Total microcystines</b>	0,1 µg/L lorsque l'analyse est réalisée par LC/MS-MS (par variant)	50
	0,2 µg/L par méthode ELISA	
<b>Cylindrospermopsine</b>	0,05 µg/L par méthode ELISA	50
<b>Saxitoxine</b>	0,02 µg/L par méthode ELISA	50
<b>Anatoxine-A</b>	0,15 µg/L par méthode ELISA	50

## 2 — Contexte normatif

## 2 — Contexte normatif

### Analyse chromatographique des cyanotoxines dans l'eau



**afnor**   
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 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)

# 2 — Contexte bibliographique

## 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,<sup>\*</sup>  
KEITH A. LOFTIN, 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<sup>a\*</sup>, Jennifer L. Graham<sup>b</sup>, Elizabeth D. Hilborn<sup>c</sup>, Sarah C. Lehmann<sup>d</sup>, Michael T. Meyer<sup>a</sup>, Julie E. Dietze<sup>a</sup>, Christopher B. Griffith<sup>a</sup>

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

## 2 — 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

# 3 — Etat de l'art



## 3 — État de l'art (Au 1<sup>er</sup> mars 2024)

### Agréments

	Desméthyl -MC-LR	Desméthyl -MC-RR	MC-LA	-LF	-LR	-LW	-LY	-RR	-YR
Labo agréé	1	1	1	0	<b>10</b>	0	1	<b>9</b>	<b>10</b>
Médiane LQ	0,1	0,1	0,1	-	<b>0,1</b>	-	0,1	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
Médiane incertitude	35	55	35	-	<b>40</b>	-	40	<b>40</b>	<b>40</b>

MC : microcystine

## 3 — État de l'art (Au 1<sup>er</sup> mars 2024)

### Agréments

	ATX	CYN	NOD	STX
Labo agréé	3	3	5	1
Médiane LQ	0,1	0,1	0,1	1
Médiane incertitude	36	35	33	35

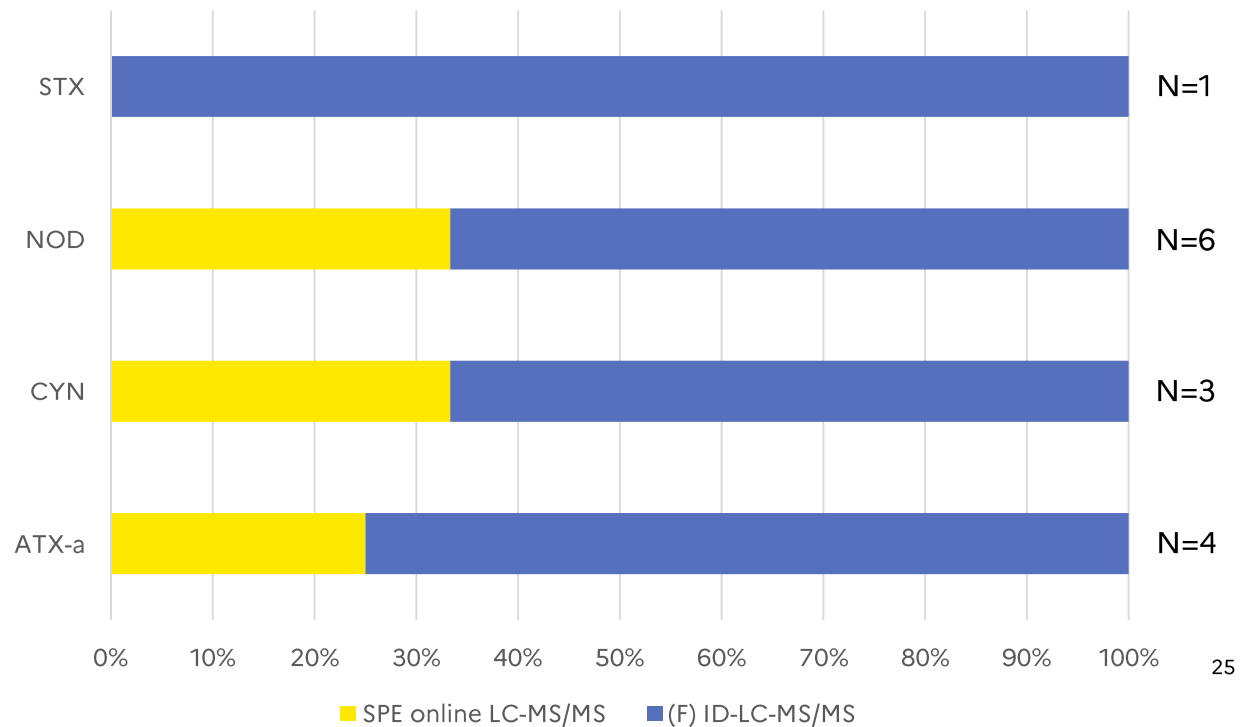
ATX : Anatoxine-a  
CYN : *Cylindrospermopsine*

NOD : *Nodularine*  
STX : *Saxitoxine*



# 3 — État de l'art (au 1<sup>er</sup> mars 2024)

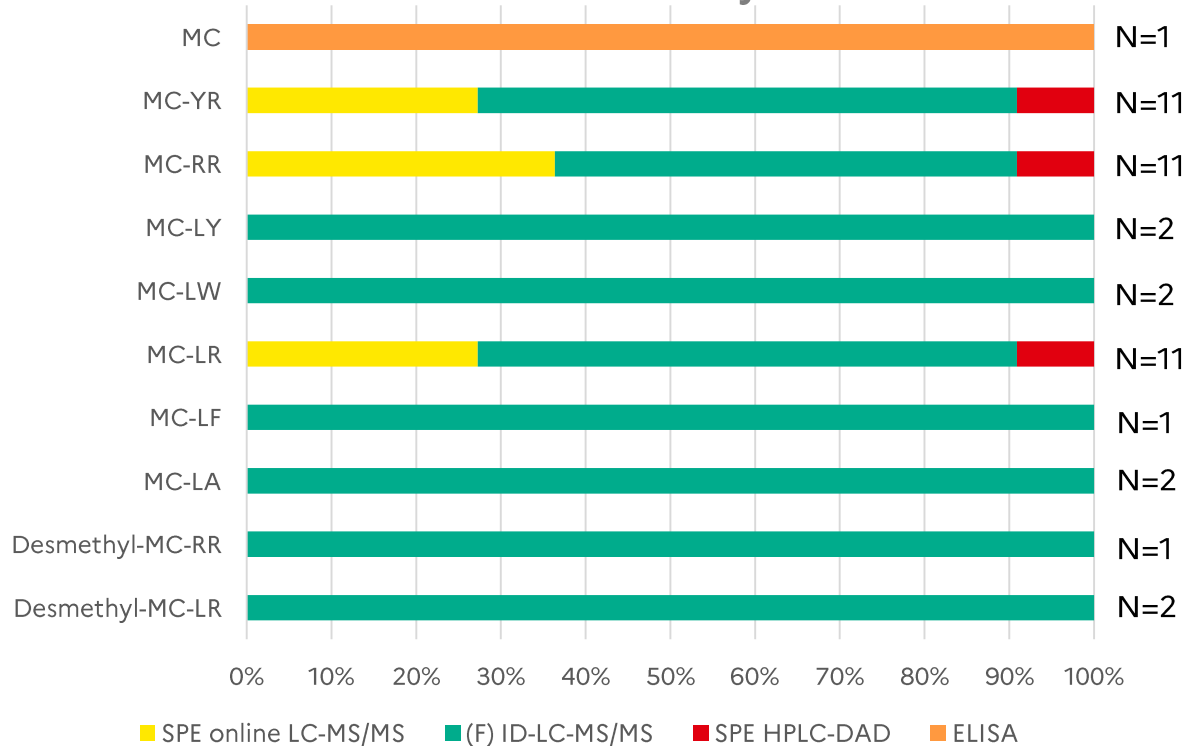
## Accréditations COFRAC sur les cyanotoxines dans les eaux douces



*F: filtration*

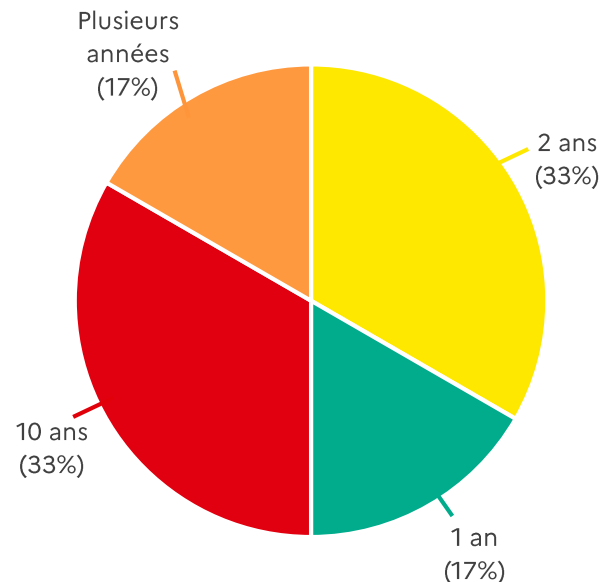
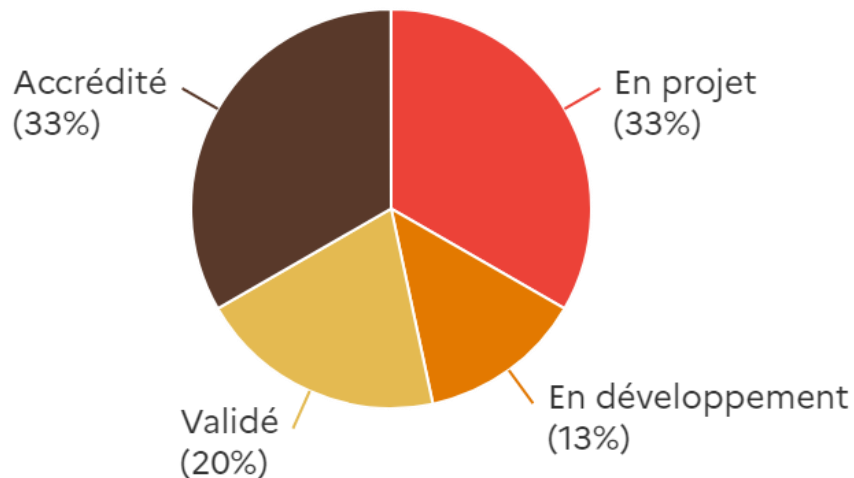
### 3 — État de l'art (au 1<sup>er</sup> mars 2024)

#### Accréditations COFRAC sur les variants de microcystines dans les eaux douces



## 3 — État de l'art

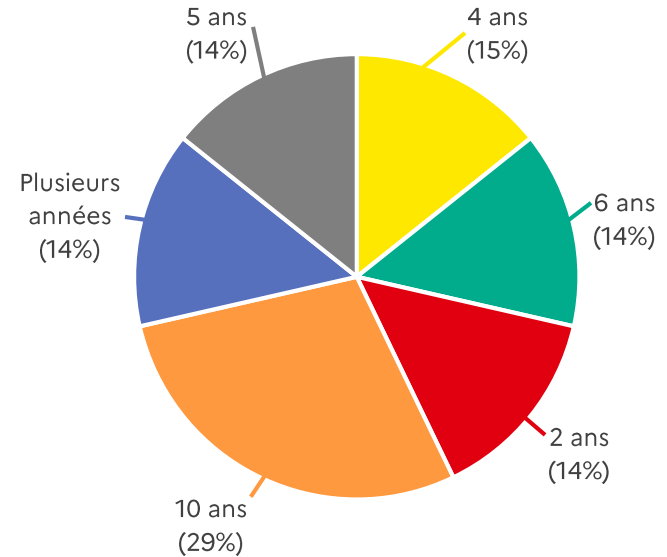
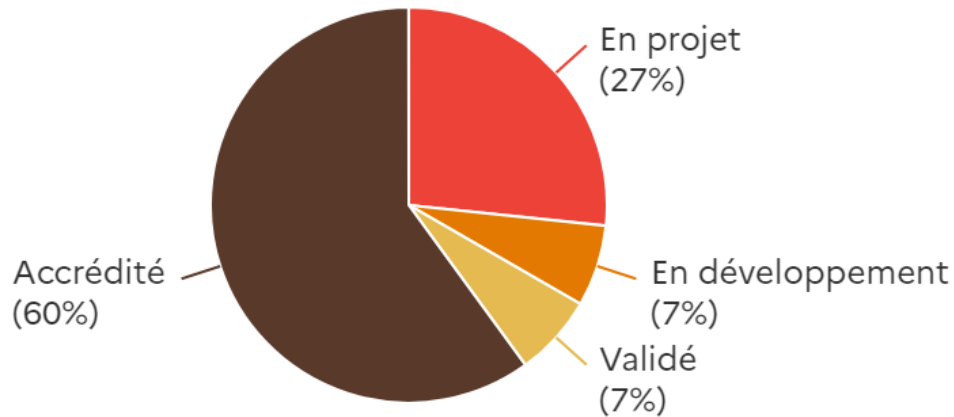
Retour sur l'enquête : Quel est votre niveau d'avancement de la mise en œuvre de la méthode ELISA?



*Questionnaire auprès des laboratoires agréés : 15 réponses*

### 3 — État de l'art

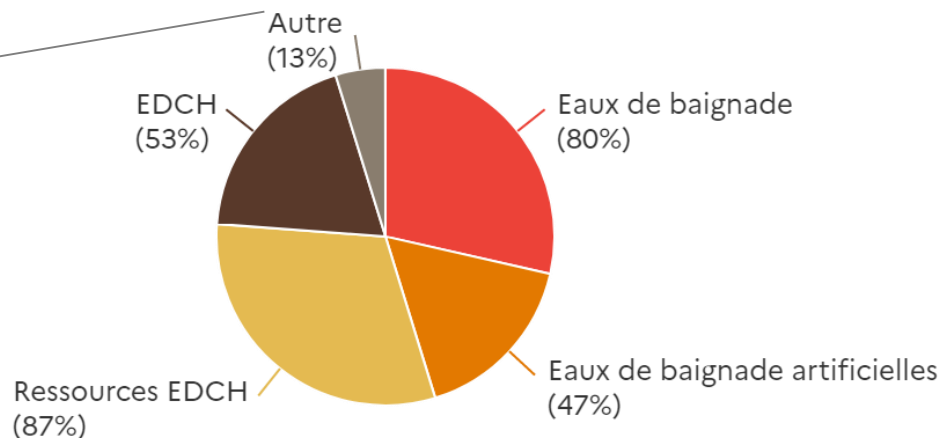
Retour sur l'enquête : Quel est votre niveau d'avancement de la mise en œuvre de la méthode chromatographique ?



## 3 — État de l'art

Retour sur l'enquête : Sur quels types d'eaux réalisez-vous l'analyse de cyanotoxines ?

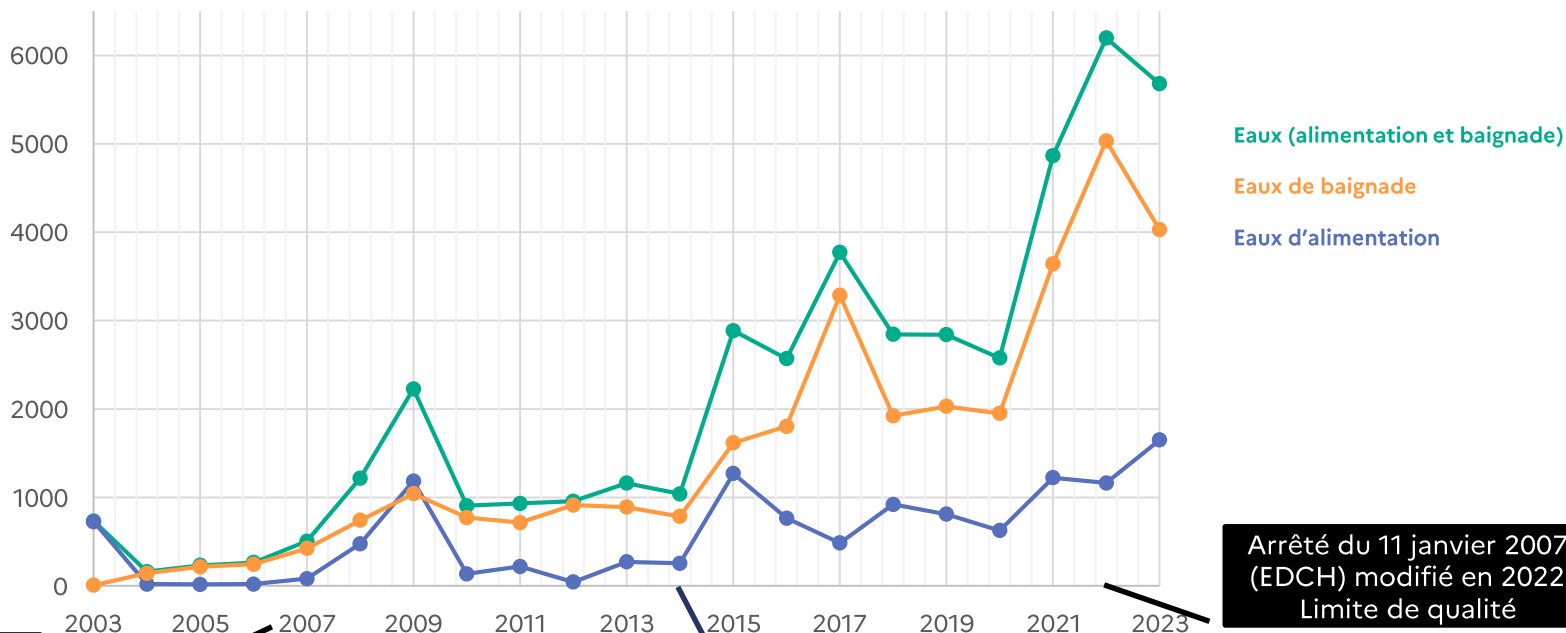
1 Eau de mer



# 3 — État de l'art

Requête SISE EAUX (mars 2024) : toutes matrices toutes périodes

Évolution annuelle du nombre de résultats de dosage des cyanotoxines dans les eaux



Arrêté 2007  
Limite de qualité

CIRCULAIRE  
N°DGS/EA4/2009/389

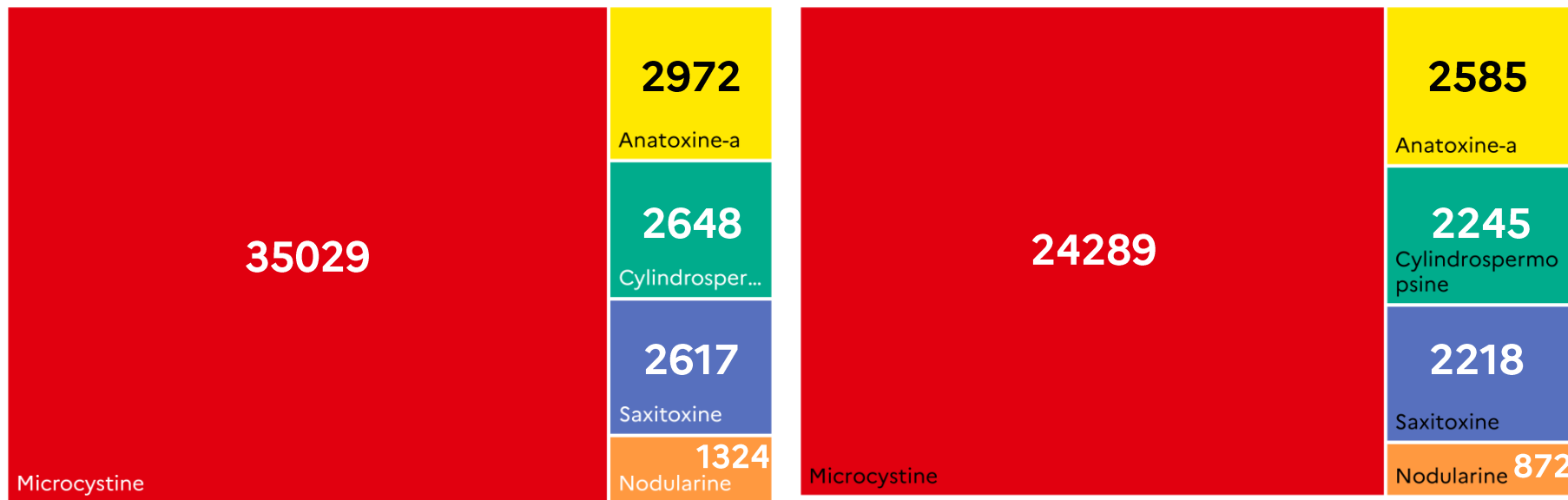
Instruction  
baignade 2014

Instruction DGS  
Cyanobactéries 2021

Arrêté du 11 janvier 2007  
(EDCH) modifié en 2022  
Limite de qualité

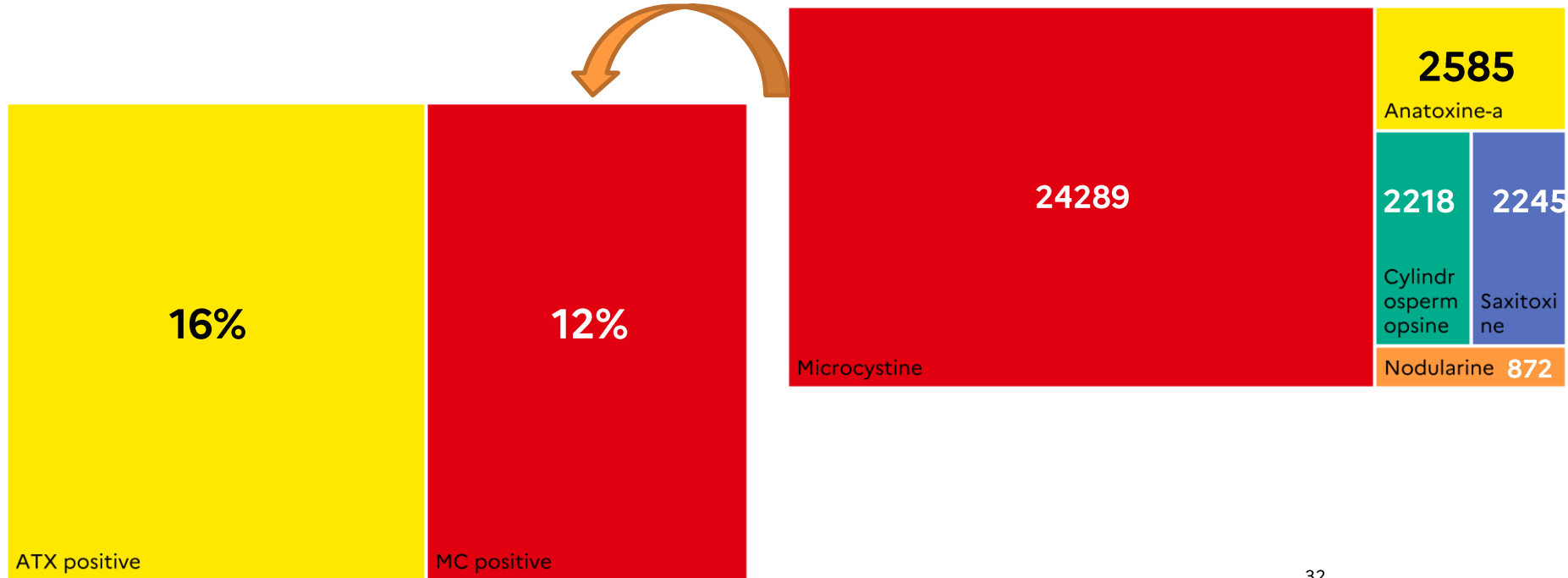
## 3 — État de l'art

Nombre d'analyses de cyanotoxines dans les eaux (EDCH + baignades) et les eaux de baignade



# 3 — État de l'art

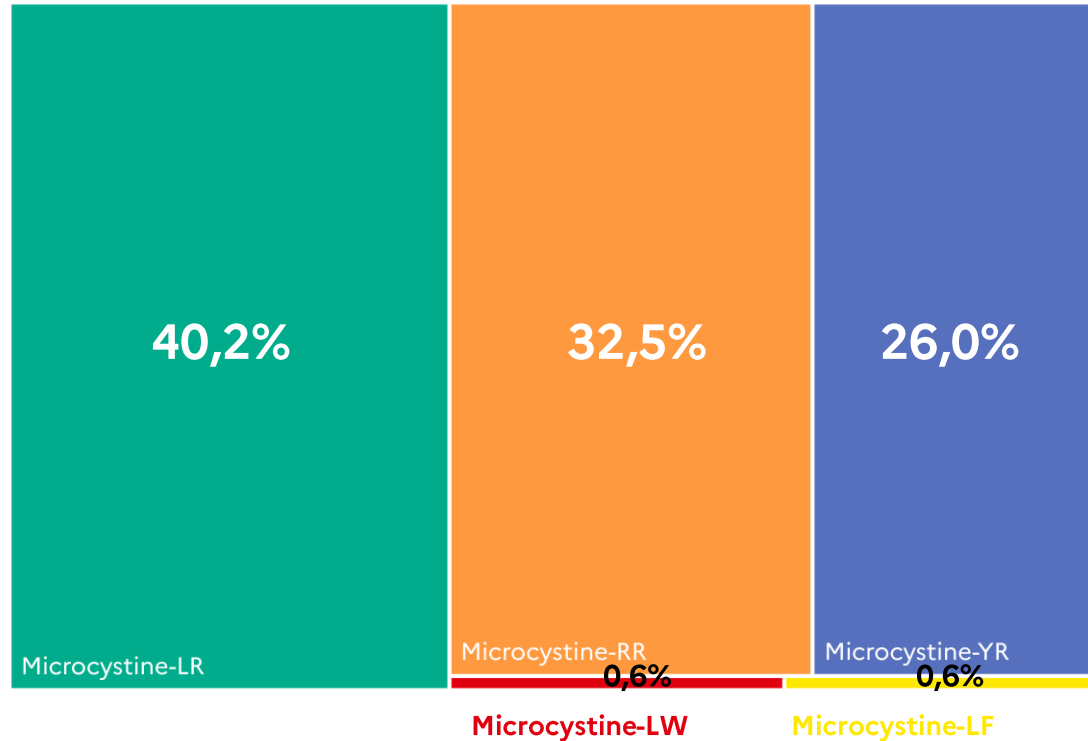
Fréquences d'analyses positives des cyanotoxines dans les eaux de baignade





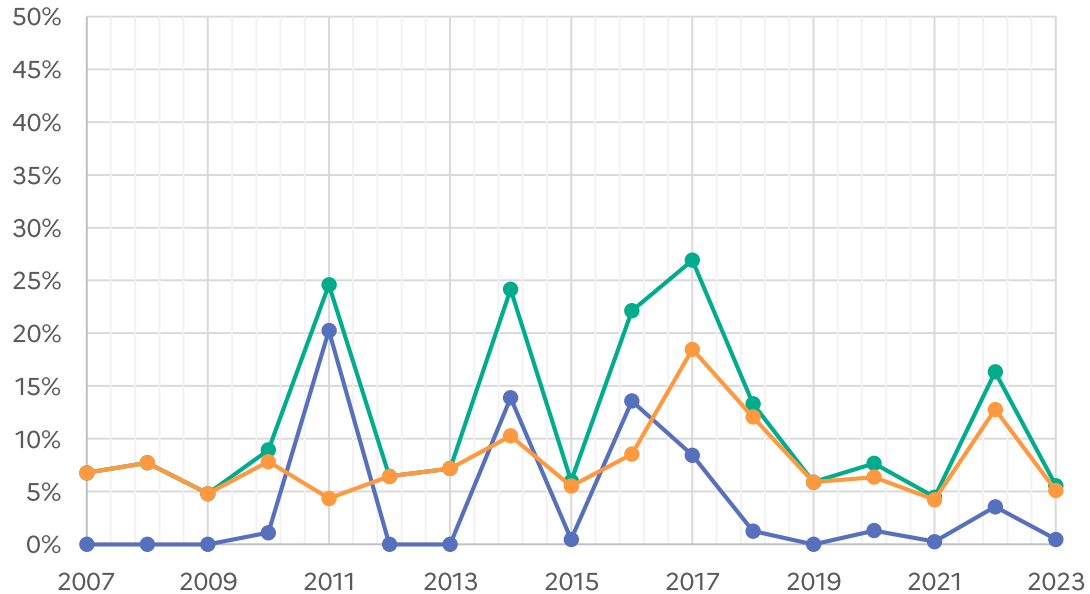
# 3 — État de l'art

Nombre d'analyses par variants de microcystines toutes eaux confondues



# 3 — État de l'art

Évolution annuelle de la fréquence de résultats positifs de dosage des variants de microcystines dans les eaux



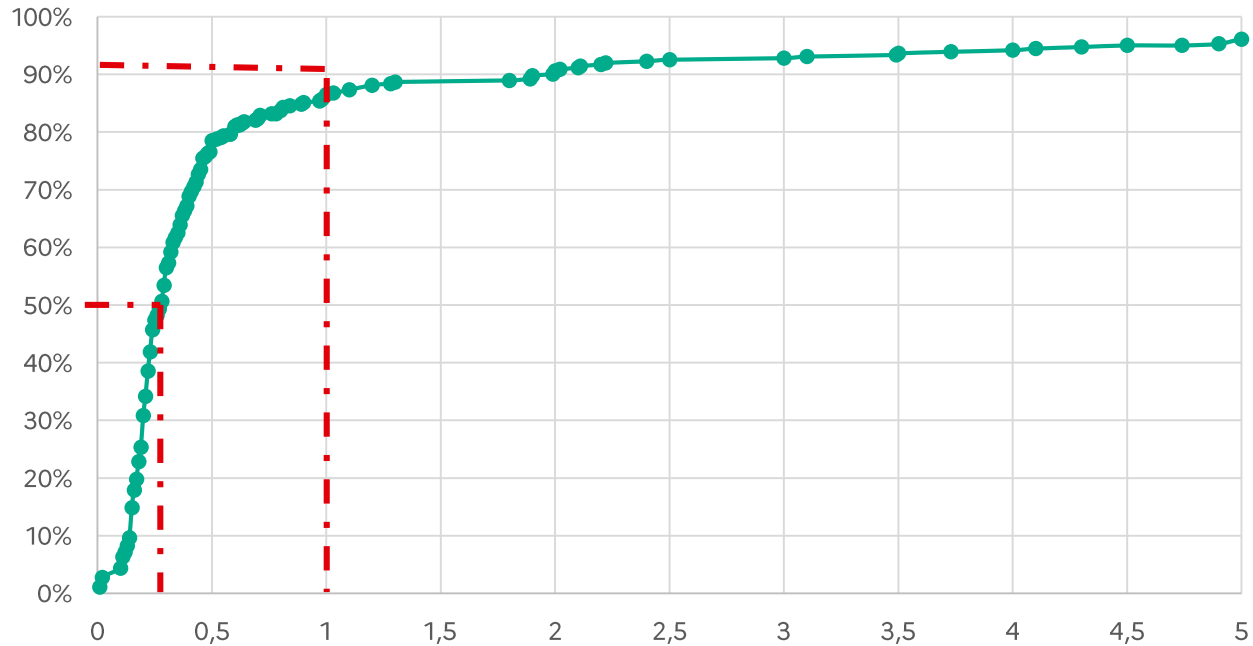
Eaux (alimentation et baignade)

Eaux de baignade

Eaux d'alimentation

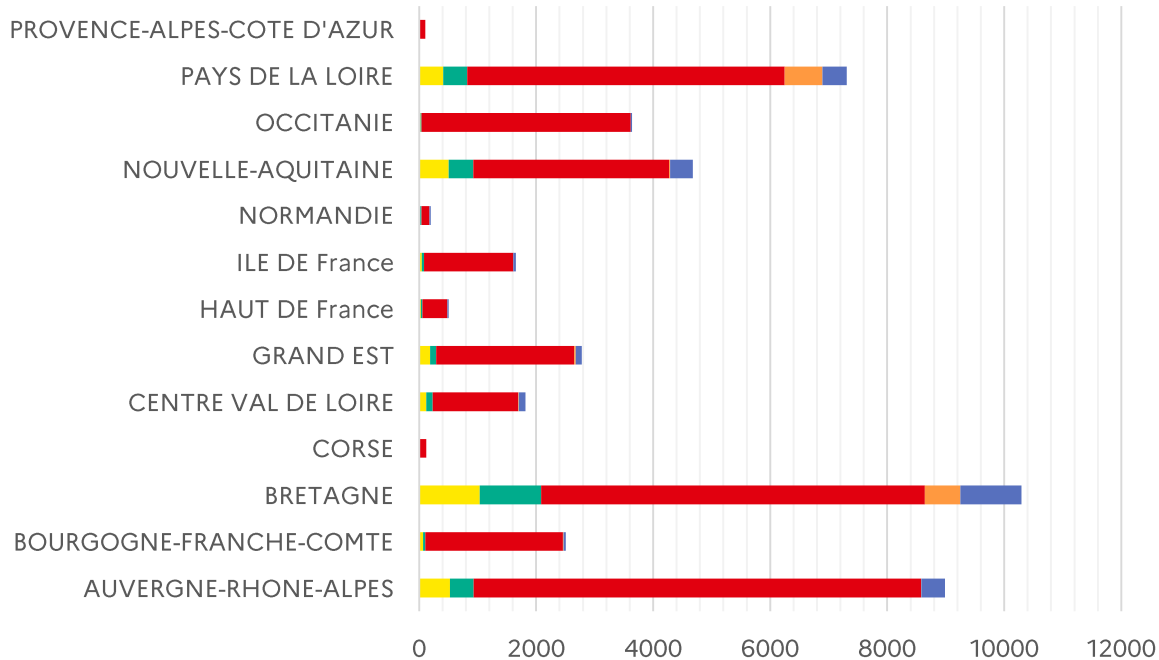
# 3 — État de l'art (toute période confondue)

Fréquence des limites de quantification pour l'anatoxine-a dans les eaux de baignade



# 3 — État de l'art

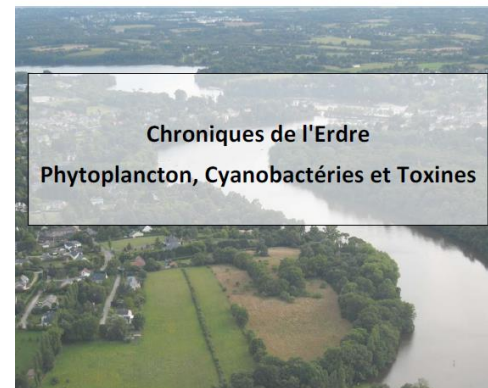
## Nombre d'analyses de cyanotoxines tous types d'eaux par région



# 3 — État de l'art

## Equivalence ELISA et LC-MS/MS ?

- 81 échantillons d'eau de baignade et prises d'eau pour analyser les microcystines (2017-2019)
  - ELISA (LQ 0,15 µg/L) : EDENN
  - LC-MS/MS (variants, LQ 0,2 µg/L) : prestataires

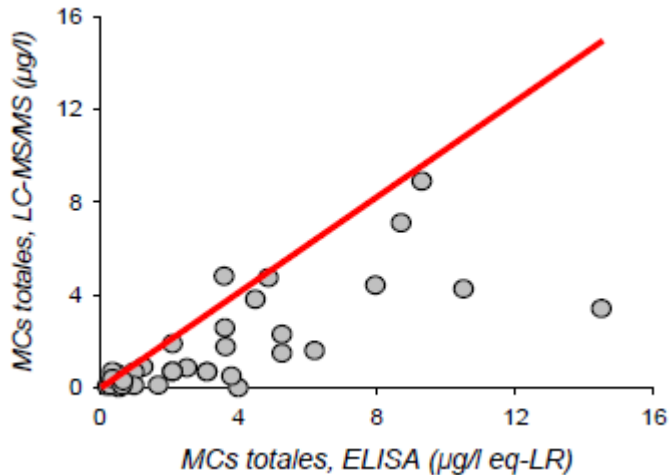


24/12/2020

→ 48% de résultats positifs aux MCs en analyse LC-MS/MS  
contre 98% en ELISA

# 3 — État de l'art

Equivalence ELISA et LC-MS/MS ?



→ 99 % des points ELISA > ou = LC-MS/MS

→ Plus la biomasse de cyanobactéries et/ou plus les concentrations en MCs augmentent, moins il y a d'écart entre les résultats des 2 méthodes

# 3 — État de l'art

## Equivalence ELISA et LC-MS/MS ?

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

JENNIFER L. GRAHAM,\*  
KEITH A. LOFTIN, MICHAEL T. MEYER,  
AND ANDREW C. ZIEGLER

Toxicon 53 (2009) 519-524



PMCID: P

PMID

The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods

Lucie Bláhová<sup>a,b</sup>, Michal Oravec<sup>b</sup>, Blahoslav Maršálek<sup>a,b</sup>, Lenka Šejnohová<sup>a</sup>, Zdeněk Šimek<sup>b</sup>, Luděk Bláha<sup>a,b,\*</sup>



Varied influence of microcystin structural difference on ELISA cross-reactivity and chlorination efficiency of congener mixtures

Xuexiang He<sup>a,\*</sup>, Benjamin D. Stanford<sup>b</sup>, Craig Adams<sup>c</sup>, Erik J. Rosenfeldt<sup>d</sup>, Eric C. Wert<sup>a,\*</sup>

[Toxins \(Basel\)](#), 2019 Jan; 11(1): 13.

Published online 2019 Jan 1. doi: [10.3390/toxins11010013](#)

Comparative Analysis of Microcystin Prevalence in Michigan Lakes by Online Concentration LC/MS/MS and ELISA

[Johanna A. Birbeck](#)<sup>1,\*</sup>, [Judy A. Westrick](#)<sup>1,\*</sup>, [Grace M. O'Neill](#)<sup>1</sup>, [Brian Spies](#)<sup>2</sup> and [David C. Szlag](#)<sup>2</sup>

- **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



### 3 — État de l'art

Equivalence ELISA et LC-MS/MS ?

- Exemple 1 avec des données de la base de données SISE-Eaux (2008)

	MC ELISA	MC-LR	MC-RR	MC-YR
Valeurs (µg/L)	31	6,4	28,2	8,5

Somme : 43,1 µg/L

➔ Différence de 39% entre le résultat en ELISA et celui de la quantification des 3 variants majoritaires de la microcystine



### 3 — État de l'art

Equivalence ELISA et LC-MS/MS ?

- Exemple 2 (2009)

	MC ELISA	MC-LR
Valeurs ( $\mu\text{g/L}$ )	26,6	45,5

- Exemple 3 (2009)

	MC ELISA	MC-LR
Valeurs ( $\mu\text{g/L}$ )	500	1084,61

	MC ELISA	MC-LR
Valeurs ( $\mu\text{g/L}$ )	1,85	0,41

### 3 — État de l'art

Equivalence ELISA et LC-MS/MS ?



- Exemple 5 (2009)

	MC ELISA	$\Sigma$ MC	MC-LR	MC-RR
Valeurs ( $\mu\text{g/L}$ )	1,14	1,3	0,95	0,3

Somme : 1,25  $\mu\text{g/L}$

→ Différence de 14,4% entre le résultat en ELISA et celui de la somme des microcystines

# 4 — Aspects techniques

# 4 — Aspects techniques

## Echantillonnage et Prélèvement

Prélèvement, dénombrement et  
identification des Cyanobactéries dans  
les eaux douces accueillant des  
activités de baignade et de loisirs  
nautiques.

Laboratoire d'Hydrologie de Nancy,  
Laboratoire National de Référence Eau Baignade et Contamination  
Microbienne, Eau Minérale, Nautisme et Eau de Laitue

- Modalités d'échantillonnage préconisées pour les eaux de baignade
  - L'échantillonnage des cyanotoxines est à prévoir systématiquement **en parallèle** de l'échantillonnage des cyanobactéries
  - **À partir du même échantillon** de sorte à pouvoir plus facilement relier les deux mesures
  - Pour les cyanobactéries et donc les cyanotoxines, un **échantillonnage composite** (moyen) est attendu à partir de **3 points répartis dans la zone de baignade**
  - L'échantillonnage se réalisant par défaut dans un **flacon en verre ambré**

## 4 — Aspects techniques

### Echantillonnage et Prélèvement



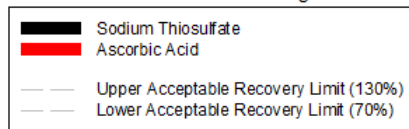
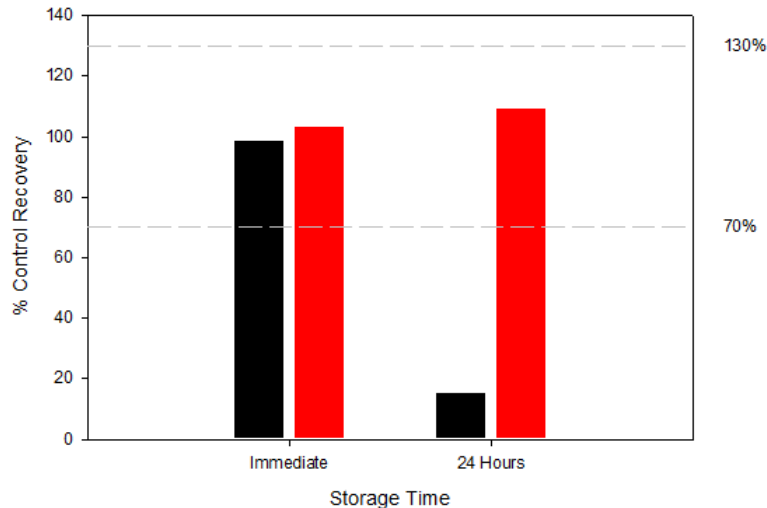
Certaines cyanotoxines sont affines pour le plastique  
L'ATX-a est photosensible → dégradation → faux-négatifs

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

# 4 — Aspects techniques

## Echantillonnage et Prélèvement

Tap Water Quenched with 10 mg/100mL  
Sodium Thiosulfate or Ascorbic Acid



- Anatoxine-a **dégradée en présence de thiosulfate de sodium**
- Importance de neutraliser le chlore avec le produit **adapté au moment de l'échantillonnage** (concentration recommandée de 0,1 mg/mL)
- **Faux-négatifs**

# 4 — Aspects techniques

## Echantillonnage et Prélèvement

### STABILITY STUDIES ON THE CYANOBACTERIAL NICOTINIC ALKALOID ANATOXIN-A\*

D. K. STEVENS<sup>1</sup> and R. I. KRIEGER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pharmacology/Toxicology Program, College of Pharmacy, Washington State University, Pullman,  
WA 99164, and <sup>2</sup>Department of Food and Agriculture, Worker Health and Safety Branch, 1220 N Street,  
Sacramento, CA 95814, U.S.A.

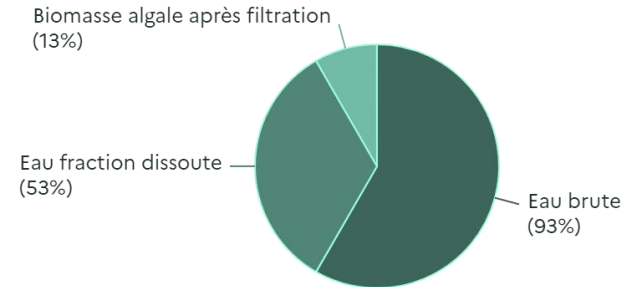
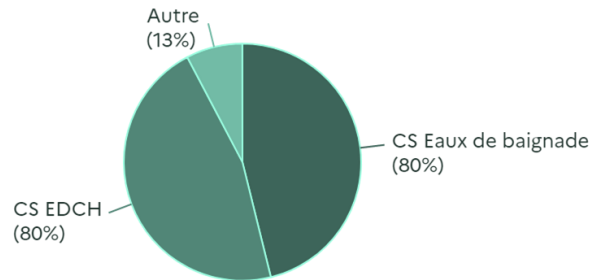
*(Received 8 May 1990; Accepted 18 July 1990)*

- L'anatoxine-a est sensible au **pH** et à **l'exposition lumineuse**

## 4 — Aspects techniques

### Retour sur l'enquête : Contexte Prélèvements

- La plupart des laboratoires réalisent les analyses des cyanotoxines dans le contexte du **contrôle sanitaire**



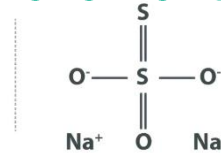
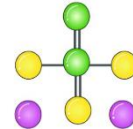
- Davantage sur les **eaux brutes** et la **fraction dissoute**
- La majorité des laboratoires utilisent des **flacons en verre ambré** pour le prélèvement de toutes les cyanotoxines



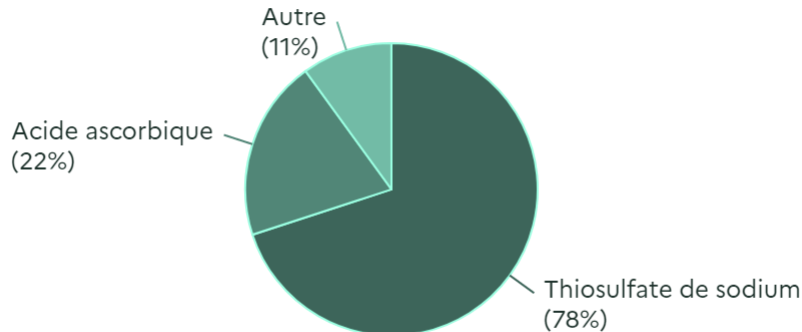
## 4 — Aspects techniques

### Retour sur l'enquête : Contexte Prélèvements

- Dans lesquels ils ajoutent un **stabilisant avant prélèvement** dans le cas d'échantillons d'**eaux chlorées**



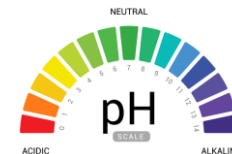
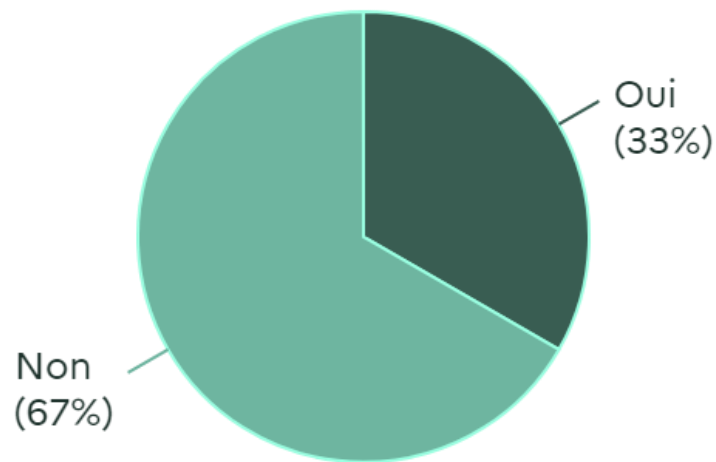
- Le stabilisant majoritairement utilisé est le **thiosulfate de sodium** quelque soit la cyanotoxine à analyser



## 4 — Aspects techniques

### Retour sur l'enquête : Contexte Prélèvements

- La majorité des laboratoires ne **vérifient pas** le **pH** de l'échantillon



## 4 — Aspects techniques

### Retour sur l'enquête : Contexte Prélèvements

- La majorité des laboratoires conservent les échantillons pendant **24-48h** avant analyse
- Et les gardent au **réfrigérateur après prélèvement**
- Et les échantillons sont conservés **3-15 jours au maximum**
- Ces délais de conservation maximums proviennent majoritairement de **données validées par le fournisseur de kit ELISA ou la norme ISO 20179/2005**



# 4 — Aspects techniques

## Echantillonnage et Prélèvement

- Recherche **ciblée** des cyanotoxines susceptibles d'être présentes

Instruction 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

Date d'application : 15 avril 2022

- **Pas d'exigences particulières sur la mise en analyse du prélèvement** → respect du délai de 72H pour le rendu des résultats à fixer dans le cadre du marché

INTERNATIONAL  
STANDARD

ISO  
19458

First edition  
2006-08-01

Water quality — Sampling  
for microbiological analysis

Qualité de l'eau — Échantillonnage pour analyse microbiologique




## 4 — Aspects techniques

### Retour sur l'enquête : Contexte Prélèvements

- La majorité des laboratoires **utilisent le même échantillon composite pour analyser les cyanotoxines et les cyanobactéries** dans les eaux de baignade
- Mais en cas de dépassement du critère de biovolume, la moitié des laboratoires **mesure systématiquement l'ensemble des cyanotoxines**
- Alors que l'autre moitié, fait une **mesure ciblée** des cyanotoxines en fonction du genre majoritaire de cyanobactéries toxinogènes

## 4 — Aspects techniques

Protocole analytique : Prétraitement des échantillons

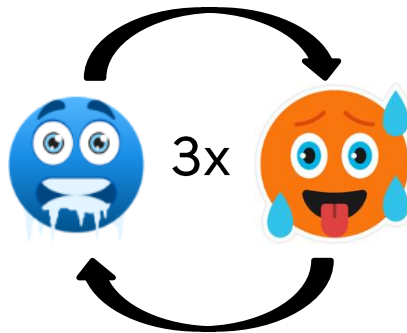
	EDCH	Baignade	Alternative	Source
Anatoxine-a	3 C/D	3 C/D (+ F si trouble)	-	 GOLD STANDARD DIAGNOSTICS
Cylindrospermopsine	3 C/D	3 C/D (+F sur filtre GF 0,45-1,2 µm)	Kit commercial de lyse chimique	 GOLD STANDARD DIAGNOSTICS
Microcystines	3 C/D	3 C/D (+F sur filtre GF 0,45-1,2 µm)	Kit commercial de lyse chimique	 EPA United States Environmental Protection Agency
Saxitoxine	3 C/D	3 C/D (+F sur filtre GF 0,45 µm)	-	Ohio EPA DES 702.0 Version 2.0 November 2016 Ohio EPA Total Saxitoxin by ELISA Analytical Methodology

C/D : Congélation/Décongélation F : Filtration

## 4 — Aspects techniques

Retour sur l'enquête : Prétraitement des échantillons

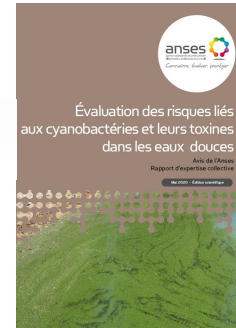
- Pour les analyses, la forme **totale** est la plus analysée par les laboratoires
- Afin de mesurer cette forme intracellulaire des cyanotoxines, une lyse par **3 cycles de congélation/décongélation** est majoritairement employée
- Un kit de lyse rapide chimique commercial pour les microcystines et la cylindrospermopsine



## 4 — Aspects techniques

### Protocole analytique : ELISA

Instruction 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



- **Privilégier l'utilisation de la méthode ELISA** par rapport aux méthodes chromatographiques :
  - **Méthode commercialisée** : 1 seul kit par cyanotoxine disponible sur le marché (sauf MC 2 fournisseurs présents) avec des performances analytiques et une bonne répétabilité (mais variable selon les laboratoires agréés) → 1 laboratoire accrédité à ce jour
  - **Méthode plus intégrative** permettant de détecter les saxitoxines éventuellement produites (contrairement aux méthodes chromatographiques) et de détecter un plus grand nombre de variants
  - **Méthode plus rapide et coût généralement plus avantageux** (mais variable en fonction de l'organisation du laboratoire)
- A l'heure actuelle, **absence de caractéristiques de performance (limite de quantification / limite de détection) définies** → besoin de révision arrêté méthodes

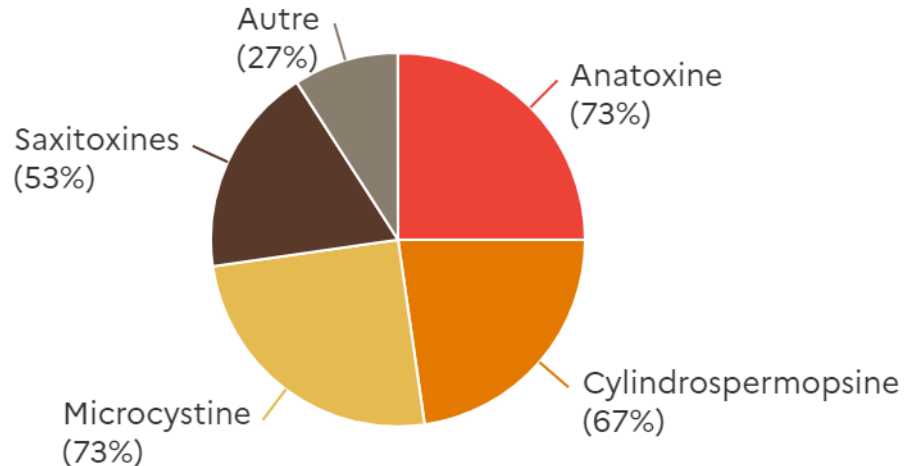


## 4 — Aspects techniques

Retour sur l'enquête : ELISA



- La plupart sont en mesure d'analyser à minima **l'anatoxine-a, la cylindrospermopsine et les microcystines totales**
- Et la **saxitoxine** dans une moindre mesure



# 4 — Aspects techniques

## Protocole analytique : ELISA

*Journal of Applied Microbiology* 2000, **89**, 532–538



Kits ELISA : SDI et EnviroLogix

### Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits

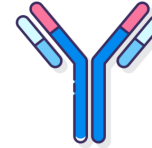
J.S. Metcalf, P. Hyenstrand, K.A. Beattie and G.A. Codd  
*Department of Biological Sciences, University of Dundee, UK*

- **Interférences** à la technique **ELISA**

- **Méthanol** (0-10% (v/v)) → **faux positifs** pour le dosage de la microcystine-LR ou solution non dopée en microcystines
- **Méthanol** (10-30% (v/v)) → **diminution** de la concentration en MC-LR
- **Salinité** (0-100%) → **faux positifs** (taille de l'effet est kit dépendant)
- **pH** (6,25-10) et les **consommables en plastique** (1h d'incubation) → **diminution** de l'équivalent MC-LR (taille de l'effet est kit dépendant)

# 4 — Aspects techniques

Protocole analytique : ELISA Anatoxine-a



Water Treatment Chemical	Tolerance
Aluminum Sulfate	≤ 10 gpg
Ascorbic Acid	≤ 1 mg/mL
Calcium Oxide (Lime)	≤ 80 gpg with filtration and pH adjustment with ascorbic acid to pH 5-7 at time of sampling <sup>1</sup>
Carbon <sup>3</sup>	≤ 40 ppm with filtering at the time of sampling <sup>3</sup>
Potassium Permanganate	≤ 10 ppm with quenching using 0.1 mg ascorbic acid per 1 mL sample <sup>2</sup>
Sodium Bisulfate	≤ 1 g/L or ≤ 10 g/L with pH adjustment to pH 5-7 at time of sampling
Sodium Carbonate (Soda Ash)	≤ 10 gpg or ≤ 25 gpg with pH adjustment to pH 5-7 at time of sampling
Sodium Chlorite	≤ 1 ppm or ≤ 10 ppm with quenching using 0.1 mg ascorbic acid per 1 mL sample <sup>2</sup>
Sodium Hexametaphosphate	≤ 250 ppm
Sodium Silicofluoride	≤ 10 ppm
Sodium Thiosulfate <sup>4</sup>	Do Not Use



One grain per gallon (gpg) is equivalent to 17.14 parts per million (ppm).

# 4 — Aspects techniques

Protocole analytique : ELISA



- **Interférences** à la technique **ELISA**

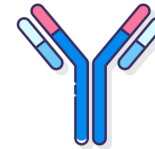
- pH ; lumière ; neutralisant du chlore ; flaconnage
- Produits chimiques (**méthanol**, **chlorure de sodium** ou de calcium ou de magnésium ou de cuivre, sulfate de calcium ou de magnésium ou de manganèse ou de fer ou de zinc, phosphate de potassium, nitrate de sodium)
- Agent de conservation : **solution de Lugol** (>0,01%)



- L'un des **points critiques** de la méthode ELISA sont les **étapes de lavages**
- Une analyse en **triplicat** ou **duplicat** est recommandée par les fournisseurs de kits ELISA.
- La moyenne des duplicats est utilisée pour tout les calculs lors de l'analyse.

## 4 — Aspects techniques

Retour sur l'enquête : ELISA



- La grande moitié des laboratoires utilisent **un kit commercial Novakits** pour analyser les cyanotoxines
- La majorité des laboratoires utilisent une **pipette multicanaux** pour effectuer les **étapes de lavages**
- Pas d'**interférences ont été rencontrées** lors du développement ou de la mise en œuvre de la technique

# 4 — Aspects techniques

Protocole analytique : ELISA



Ramón 2022

Novakits

Cayman  
chemicals

Liu 2021

	ATX	ATX	CYN	MC	STX	MC	MC
LQ (µg/L)	0,5	0,15	0,05	0,15	0,02	0,027	0,16
LD (µg/L)	0,1	0,1	0,04	0,1	0,015	0,021	0,16
γ (µg/L)	0,2-5	0,15-5	0,05-2	0,15-5	0,02-0,4	0,027-8	0,16-1,42

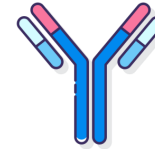
**Tableau V : Concentrations maximales tolérables en cyanotoxines proposées pour l'EDCH et les eaux récréatives**

	Microcystines* ( en µg .L <sup>-1</sup> )	Cylindrospermopsines* ( en µg .L <sup>-1</sup> )	Saxitoxines* ( en µg .L <sup>-1</sup> )	Anatoxines * ( en µg .L <sup>-1</sup> )
EDCH	0,2	1	0,8	< LD
Eaux récréatives	0,3	42	30	< LD

\* Somme des variants recherchés et quantifiés

## 4 — Aspects techniques

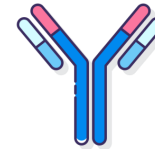
Retour sur l'enquête : ELISA



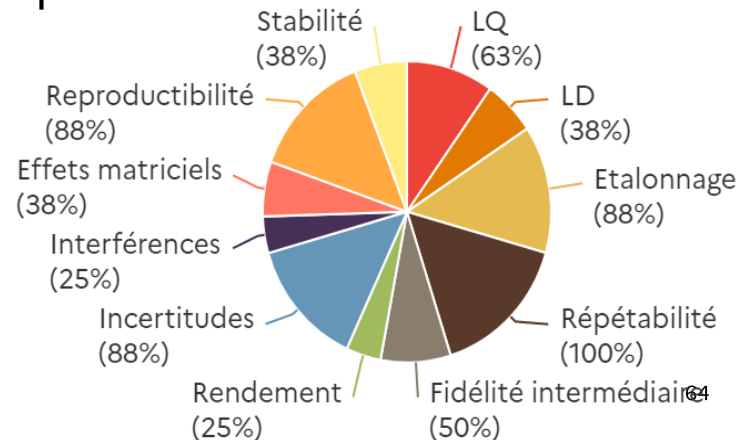
- Pour les cyanotoxines en ELISA, la moitié des laboratoires réalisent des analyses en **duplicats sur la gamme, les CQ et les échantillons**
- Les **limites de quantification** en fonction des cyanotoxines sont identiques à celle du fournisseur :
  - Anatoxine-a : 0,15-0,165 µg/L (avec ou sans diluant)
  - Cylindrospermopsine : 0,05 µg/L
  - Microcystines totales : 0,15 µg/L
  - Saxitoxine : 0,02-0,022 µg/L (avec ou sans diluant)

## 4 — Aspects techniques

Retour sur l'enquête : ELISA



- La moitié des laboratoires a validé la méthode soit selon le référentiel **NF T90-210** ou **NF U47-019**
- Les **paramètres** de la méthode les plus évalués lors de sa **validation** sont :
  - La répétabilité
  - L'étalonnage
  - Les incertitudes
  - La reproductibilité interne
  - La limite de quantification





# 4 — Aspects techniques

Protocole analytique : ELISA



- **CQI** : LRB (blanc réactif), étalon préparé à la LQ, étalon préparé milieu de gamme

	Abs Std0	B/B0	%CV $\gamma$	% var Abs $\gamma$	$r^2$	%CV	% var Abs	CQI
Critères	0,8	<0,35	<10- 15%	<10%	>0,98	<15%	<10%	+/- 20%

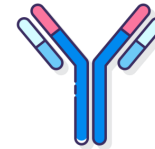
Ohio EPA DES 702.0  
Version 2.0  
November 2016

Ohio EPA Total Saxitoxin by ELISA  
Analytical Methodology



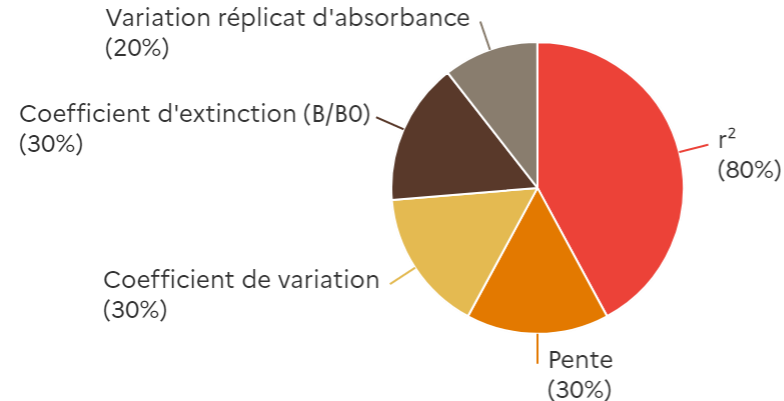
## 4 — Aspects techniques

### Retour sur l'enquête : ELISA



Le rendu de ces résultats se base sur des **critères de validation sur différents paramètres** comme :

- Gamme d'étalonnage :  $r^2$  (0,95-1), la pente et la **coefficient d'extinction ( $B/B_0 < 0,3$ )**
- Solutions (gamme, CQ, échantillon) : **%CV (<10% étalons)**
- Blanc : **inférieur à la LQ ou LD ; DO >0,80**
- CQ : kit selon intervalle du fournisseur ;
- CQI à la LQ et milieu de gamme
- Réplicats : **variation d'absorbance, %CV (<10-20%)**



# 4 — Aspects techniques

Protocole analytique : ELISA



## ESSAIS INTER-LABORATOIRES CYANOTOXINES 2024

Matrice	Cyanotoxine	Nombre échantillons
Eau potable	MC	4
	ATX CYN	2
	STX	2
Eau de surface	MC	4
	ATX CYN	2
	STX	2



### PROGRAMME 54 : TOXINES DE CYANOBACTERIES SUR EAUX DOUCES



18 participants en 2023 - EXPERIENCE > 15 ANS



Besoin de tester une autre méthode, d'évaluer votre personnel ?  
Commandez des **échantillons supplémentaires** (colis dans son intégralité) : 420 € HT  
(frais de transport non inclus)

Paramètres à analyser
<b>24M54.1 - Eau naturelle - envoi en mars 2024 - Colis réfrigéré</b>
microcystine-LR, microcystine-RR, microcystine-YR microcystines par test ELISA <sup>[1]</sup>
<b>24M54.2 - Eau naturelle - envoi en août 2024 - Colis réfrigéré</b>
microcystine-LR, microcystine-RR, microcystine-YR microcystines par test ELISA <sup>[1]</sup>

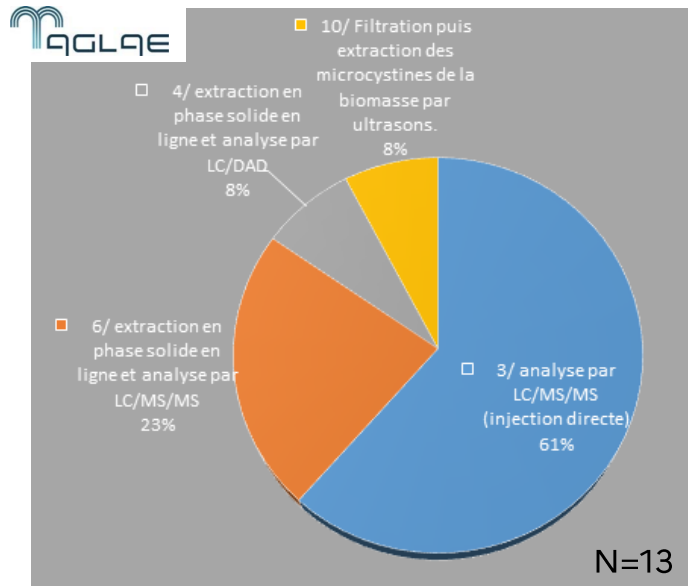
<sup>[1]</sup> paramètre non couvert par l'accréditation (voir conditions générales d'inscription)

## 4 — Aspects techniques

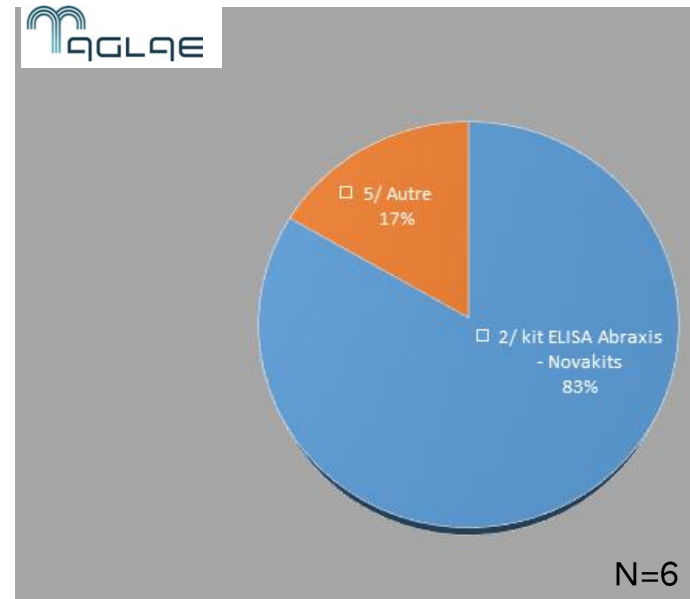
Protocole analytique : chromatographique



Répartition des méthodes utilisées pour l'analyse de la microcystine-LR (essai 2023)

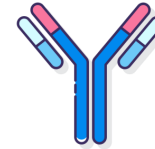


Augmentation du rendu de résultats d'analyse en méthode ELISA (essai 2023)

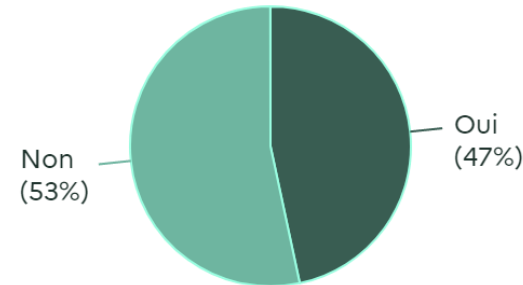


## 4 — Aspects techniques

Retour sur l'enquête : ELISA



- Afin de vérifier ces performances de méthode analytique, une petite moitié des laboratoires participent à des **comparaisons inter laboratoires ciblées sur la méthode ELISA**
  - **EIL Novakits**
  - **EIL AGLAE**
- Aucun laboratoire ne compare sa méthode ELISA en réalisant des **essais croisés** entre laboratoires



## 4 — Aspects techniques

Protocole analytique : chromatographique



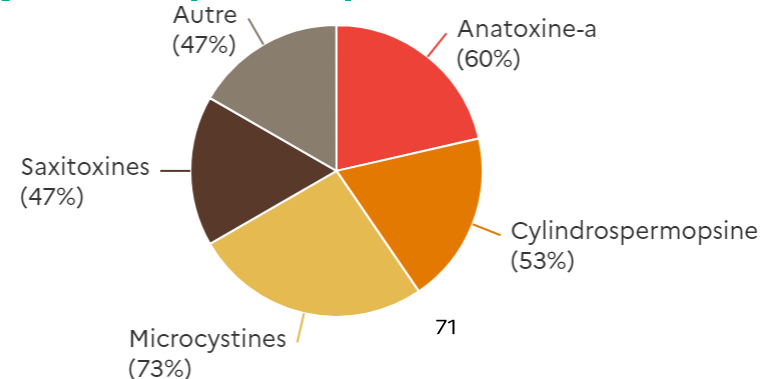
- La disponibilité des étalons
  - **Anatoxine-a** → 3 fournisseurs (variants d'anatoxine → 1 fournisseur)
  - **Cylindropermopsine** → 4 fournisseurs (variants → 1 fournisseur)
  - **Microcystines** : **microcystine-LR** ; **microcystine-RR** et **microcystine-YR** → 5 fournisseurs
  - **Microcystines** : **desmétyl-microcystine-LR** ; **desmétyl-microcystine-RR** ; **microcystine-LA** ; **-LF** ; **-LW** ; **-LY** ; **-WR** ; **HilR** → 5 fournisseurs
  - **Nodularine** → 3 fournisseurs
  - **Saxitoxine** → 3 fournisseurs (variants de saxitoxine → 3 fournisseurs)

## 4 — Aspects techniques

Retour sur l'enquête : analyse chromatographique



- Tous les laboratoires ont une méthode **développée en interne** pour l'analyse des cyanotoxines en **LC-MS/MS précédée d'une lyse**
- La plupart sont en mesure d'analyser les **microcystines (variants -LR, -RR et YR majoritairement)**, l'**anatoxine-a** et la **cylindrospermopsine**
- Et dans une moindre mesure **les saxitoxines**



## 4 — Aspects techniques

Protocole analytique : chromatographique



- **Interférences** en méthode **chromatographique**
  - Des **matières humiques** et/ou **fulviques** peuvent être co-extraites pendant la SPE et des niveaux élevés peuvent provoquer une augmentation et/ou une suppression du signal dans la source d'ionisation par électrospray.
  - En outre, des niveaux élevés de matières humiques et/ou fulviques peuvent entraîner de **faibles rendements de récupération** sur le sorbant de la SPE. Le carbone organique total (COT) est un bon indicateur de la teneur en humique de l'échantillon.



# 4 — Aspects techniques

Protocole analytique : chromatographique



## ESSAIS INTER-LABORATOIRES CYANOTOXINES 2024

Matrice	Cyanotoxine	Nombre échantillons
Eau potable	MC	4
	ATX CYN	2
Eau de surface	MC	4
	ATX CYN	2

18/04/2024

### PROGRAMME 54: TOXINS OF CYANOBACTERIA IN FRESH WATERS



1700 € excl. VAT – total amount for 2 tests (excluding transport costs)

Price unchanged for 5 years

15 participants in 2021 – EXPERIENCE > 15 YEARS



Need to test another method, evaluate your staff?

Order **additional test samples** (parcel in its entirety): 425 € excl. VAT (excluding transport costs)

Parameters to analyse <i>(implemented in each proficiency test)</i>	Bottle		Number of measurements per parameter and per bottle
	Volume	Number	
<b>22M54.1 - Natural water - sent in April 2022 - Refrigerated parcel</b>			
microcystin-LR, microcystin-RR, microcystin-YR	1000 mL	2	2
<b>22M54.2 - Natural water - sent in August 2022 - Refrigerated parcel</b>			
microcystin-LR, microcystin-RR, microcystin-YR	1000 mL	2	2

#### PARTICULARITIES

Microcystins' analyses can be carried out by ELISA test on these samples. However, the observed results are not going to be statistically processed; only an overview will be presented in the test report (no z-scores calculation for the analyses by ELISA test).

#### Recommended period to start the sample treatment (PRDT):

time interval during which the quality of test materials is optimal (in number of days)

microcystin-LR, microcystin-RR, microcystin-YR

D<sub>0</sub>+6

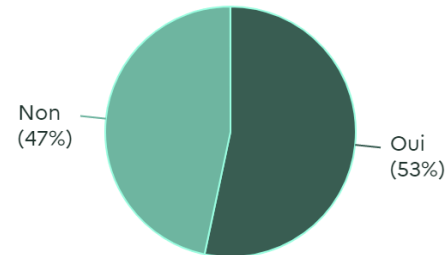
D<sub>0</sub>: Day the samples are sent to all the participants (for most proficiency tests, Tuesday)

## 4 — Aspects techniques

Retour sur l'enquête : analyse chromatographique



- Aucune interférence n'a été rencontrée lors du développement ou de la mise en œuvre de la technique
- Afin de vérifier ces performances de méthodes analytiques, la moitié des laboratoires participent à des comparaisons inter laboratoires ciblées sur la méthode chromatographique
  - EIL AGLAE (M54)
  - EIL Novakits
- Et les laboratoires ne comparent pas leur méthode en réalisant des essais croisés entre



# 4 — Aspects techniques

## Revue de demande et rendu des résultats



SISE-EAUX



Veillez entrer votre nom d'utilisateur et votre mot de passe pour vous connecter.

Nom d'utilisateur:

Mot de passe:

Connexion

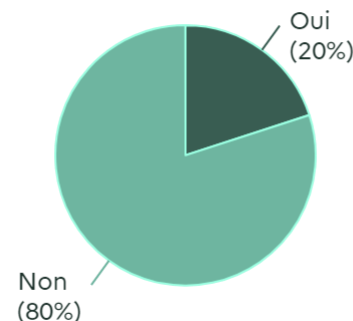
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y			
1	Résultats d'analyses en cyanotoxines, toutes périodes, France entière																											
2																												
3	SIT - contexte ART - BAI																											
4																												
5	SIT - Contexte région dpt SIT - Code na SIT - Nature de SIT - Suivi UE SIT - Type de SIT - Type d'PSV - Code na PSV - Nom PSV - Commu. bassin PSV - Lieu PLV - Code na PLV - Date PLV - Motif PLV - Représ ANA - Code na ANA - Labo - ANA - Labo - PARAM - Cod PARAM - Nom PARAM - Unité RESULT - Vale RESULT - Volet																											
6	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300029124	13/06/2005	CS	O	030300029744	0301	IPL-LABORAT MCLR	Microcystine µg/L								
7	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300029140	06/07/2005	CS	O	030300029766	0301	IPL-LABORAT MCLR	Microcystine µg/L	0,22	0,22						
8	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300029141	03/08/2005	CS	O	030300029761	0301	IPL-LABORAT MCLR	Microcystine µg/L	0,24	0,24						
9	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300029144	19/07/2005	CS	O	030300029764	0301	IPL-LABORAT MCLR	Microcystine µg/L	0,23	0,23						
10	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300029145	17/08/2005	CS	O	030300029765	0301	IPL-LABORAT MCLR	Microcystine µg/L	0,19	0,19						
11	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300029429	11/07/2005	CS	O	030300030051	0301	IPL-LABORAT MCLR	Microcystine µg/L	0,76	0,76						
12	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300031503	12/06/2006	CS	O	030300032120	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,19	0,19						
13	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300031504	04/07/2006	CS	O	030300032121	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
14	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300031505	01/08/2006	CS	O	030300032122	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,19	0,19						
15	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300031506	17/07/2006	CS	O	030300032123	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
16	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300031507	21/08/2006	CS	O	030300032124	0301	IPL-LABORAT MCLR	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
17	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300032229	26/07/2006	CD	O	030300032853	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
18	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300032248	08/08/2006	CS	O	030300032876	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
19	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300032265	16/08/2006	CS	O	030300032911	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
20	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300034406	12/06/2007	CS	O	030300035067	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
21	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300034407	04/07/2007	CS	O	030300035068	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
22	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300034409	01/08/2007	CS	O	030300035070	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
23	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300034410	13/08/2007	CS	O	030300035071	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
24	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300034620	25/06/2007	CS	O	030300035281	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
25	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300034690	11/07/2007	CS	O	030300035355	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
26	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300034757	11/07/2007	CS	O	030300035423	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
27	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300037756	02/07/2008	CS	O	030300038412	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,26	0,26						
28	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300038116	05/08/2008	CS	O	030300038766	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,18	0,18						
29	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300038202	18/08/2008	CS	O	030300038853	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
30	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300041337	05/08/2009	CS	O	030300042089	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,52	0,52						
31	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300041505	18/08/2009	CS	O	030300042156	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
32	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300041537	10/08/2009	CS	O	030300042195	0301	IPL-LABORAT MCTOT	Somme des µg/L	0,44	0,44						
33	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300046640	02/08/2011	CS	O	030300047881	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						
34	BAIGNADE	Auvergne-003	0303000725	ESU	N	Supprimée	ETANG	030300000012	ETANG DE P	03130	LOIRE-BRETA	En face du p	030300046650	18/08/2011	CS	O	030300047878	0301	IPL-LABORAT MCTOAE	Microcystine µg/L	0,16	0,16						

## 4 — Aspects techniques

Retour sur l'enquête : Revue de demande et rendu des résultats



- **Peu de laboratoires** rencontrent des difficultés quant à l'interprétation de l'**instruction DGS/EA4/EA3/2021/76** du 6 avril 2021
  - Actions à engager en cas de mortalité de chiens
  - Compréhension et mise en place des logigrammes
  - Utilité de la mesure de chlorophylle
- En moyenne, les laboratoires rendent le résultat d'analyse sur les cyanotoxines entre **2 et 6 jours**



## 4 — Aspects techniques

Retour sur l'enquête : Revue de demande et rendu des résultats



- La **moitié** des laboratoires exportent leurs résultats dans la base de données **SISE-Eaux** en utilisant les fichiers SIAPLAB
- **Aucun laboratoire** ne rencontre de difficultés de bancarisation (codes SISE-Eaux, SANDRE, support, fraction analysée...)
- Pour la bancarisation des mesures de cyanotoxines, **tous** les laboratoires utilisent les **codes définis dans le fichier Excel de référence** transmis en 2023 par la DGS et le LHN
- **Aucune difficulté technique** n'est rencontrée par rapport à certaines demandes

# 5 — Aspects hygiène et sécurité

# 5 — Aspects hygiène et sécurité

FDS

## CRM-MCLR

Fiche de données de sécurité

## CRM-ATX

Fiche de données de sécurité

au frais. **Garder sous clef**. Eliminer le contenu/le récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/ internationale.



GHS02



GHS06



GHS07



GHS08

# 5 — Aspects hygiène et sécurité

## Arrêtés MOT

Arrêté du 26 avril 2023 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du code de la santé publique

- les toxines de la famille des saxitoxine et ses variants, sous forme carbamate et décarbamoyle 1 ;

Arrêté du 26 avril 2023 fixant les doses et concentrations maximales des micro-organismes et des toxines figurant sur la liste prévue à l'article L. 5139-1 et pris en application de l'article R. 5139-20 du code de la santé publique

- Pour tout ou partie des saxitoxines le seuil par contenant est fixé à 30 microgrammes ;



# 5 — Aspects hygiène et sécurité

## EPI et EPC



# 5 — Aspects hygiène et sécurité

## Cas d'un déversement accidentel



# 5 — Aspects hygiène et sécurité

## Décontamination et gestion des déchets

Procedures for the Inactivation and Safe Containment of Toxins

adapted from a presentation by:

Robert W. Wannemacher, Ph.D.  
Assistant Chief Toxinology Division  
US Army Medical Research Institute of Infectious Disease



**Table 1. Inactivation complète de** différentes toxines avec une exposition de **30 minutes** à différentes concentrations d'**hypochlorite de sodium (NaOCl) avec ou sans** hydroxide de sodium (NaOH).

Toxines	2.5% NaOCl + 0.25 N NaOH	2.5% NaOCl	1% NaOCl	0,1% NaOCl
Microcystine	Oui	Oui	Oui	Non
Saxitoxine	Oui	Oui	Oui	Oui

# 5 — Aspects hygiène et sécurité

## Décontamination et gestion des déchets

### Procedures for the Inactivation and Safe Containment of Toxins

adapted from a presentation by:

Robert W. Wannemacher, Ph.D.  
Assistant Chief Toxinology Division  
US Army Medical Research Institute of Infectious Disease



**Table 2. Inactivation complète de** différentes toxines par **autoclavage ou 10 min** d'exposition à différentes **températures de chaleur sèche**.

Toxines	Autoclavage	Chaleur sèche 200°F (93°C)	Chaleur sèche 500°F (260°C)	Chaleur sèche 1000°F (537°C)	Chaleur sèche 5000°F (2760°C)
Microcystine	Non	Non	Oui	Oui	Oui
Saxitoxine	Non	Non	Oui	Oui	Oui

# 5 — Aspects hygiène et sécurité

Décontamination et gestion des déchets



Bonne pratique classique de laboratoire

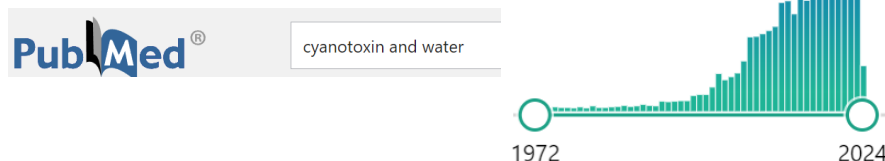
# 6 — Échanges – points divers



# 7 — Conclusion



# 7 — Conclusion



**Des besoins croissants dans un contexte de dérèglement climatique**

**Besoin de réactivité +++ (aide à la gestion)**

**Un cadre analytique à renforcer (méthodes ELISA)**

**Toxines, variants et métabolites d'intérêt**

**Besoins de performances analytiques en lien avec ERS**

**Equivalence des méthodes ??**

**Evolution du cadre européen possible (révision de la directive « baignades »)**

