



# CYANOTOXINES : enjeux analytiques et défis scientifiques

Ronel BIRE : ANSES – Laboratoire de Sécurité des Aliments  
Christophe ROSIN : Anses – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy

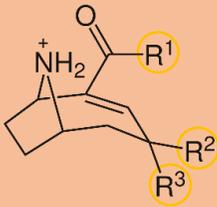
© Lydie Riéra - EPIDOR

Journée scientifique : *où en sommes-nous sur les cyanobactéries benthiques ?*  
20 mai 2025 - Cestas

# Les cyanotoxines

**Neurotoxines (Alcaloïdes)**

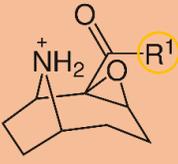




Groupe 1

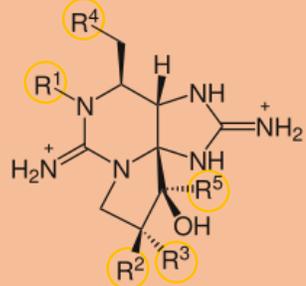


Groupe 2



Groupe 3

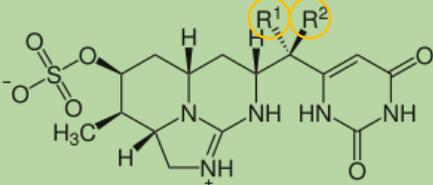
**Anatoxines → 20 variants**



**Saxitoxines → 26 variants**

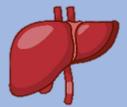
**Cyto- et hépatotoxines (Alcaloïdes)**

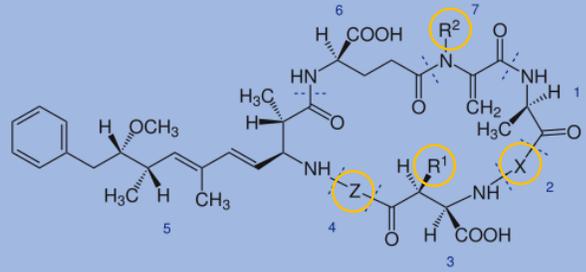




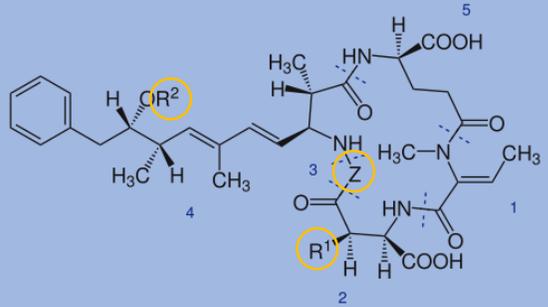
**Cylindrospermopsines → 2 variants**

**Repro et hépatotoxines (Peptide cyclique)**





**Microcystines → 279 variants**

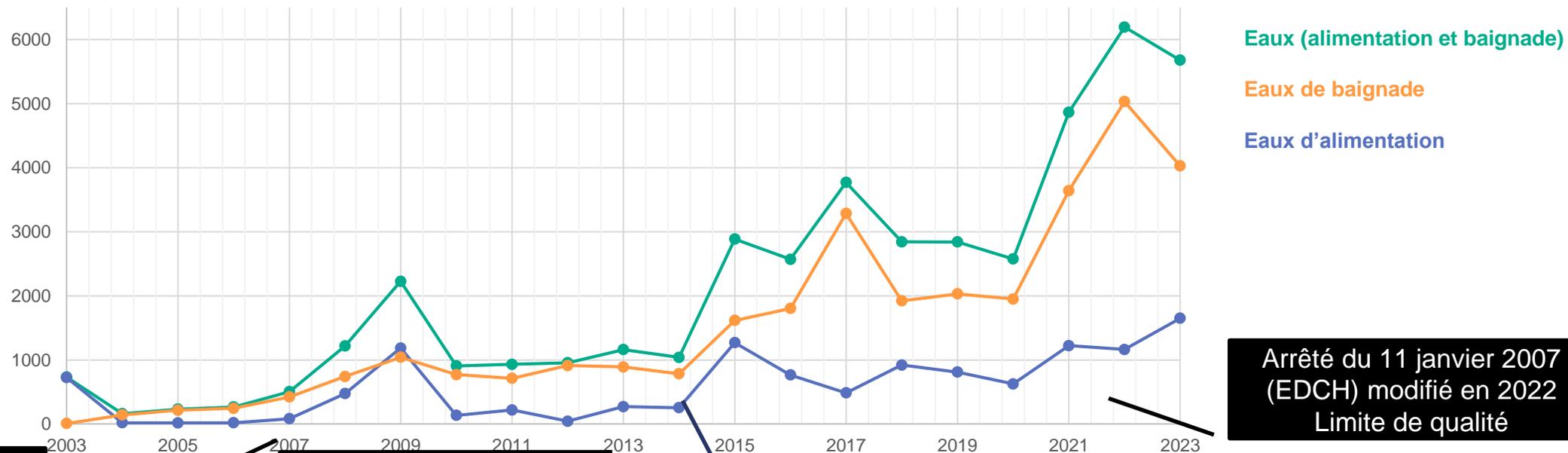


**Nodularines → 8 variants**

# Contexte : contrôle réglementaire des eaux de baignade

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

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



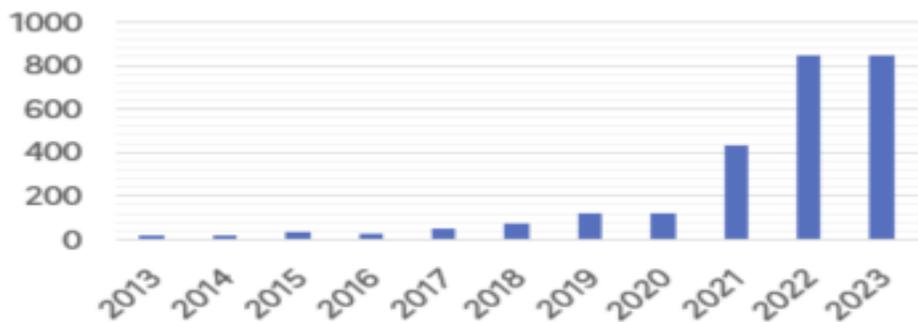
Arrêté 2007  
Limite de qualité

CIRCULAIRE  
N°DGS/EA4/2009/389

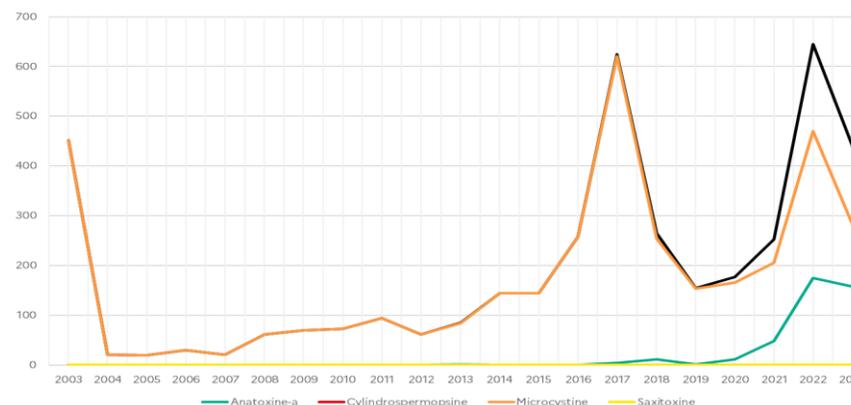
Instruction  
baignade 2014

Instruction DGS  
Cyanobactéries 2021

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



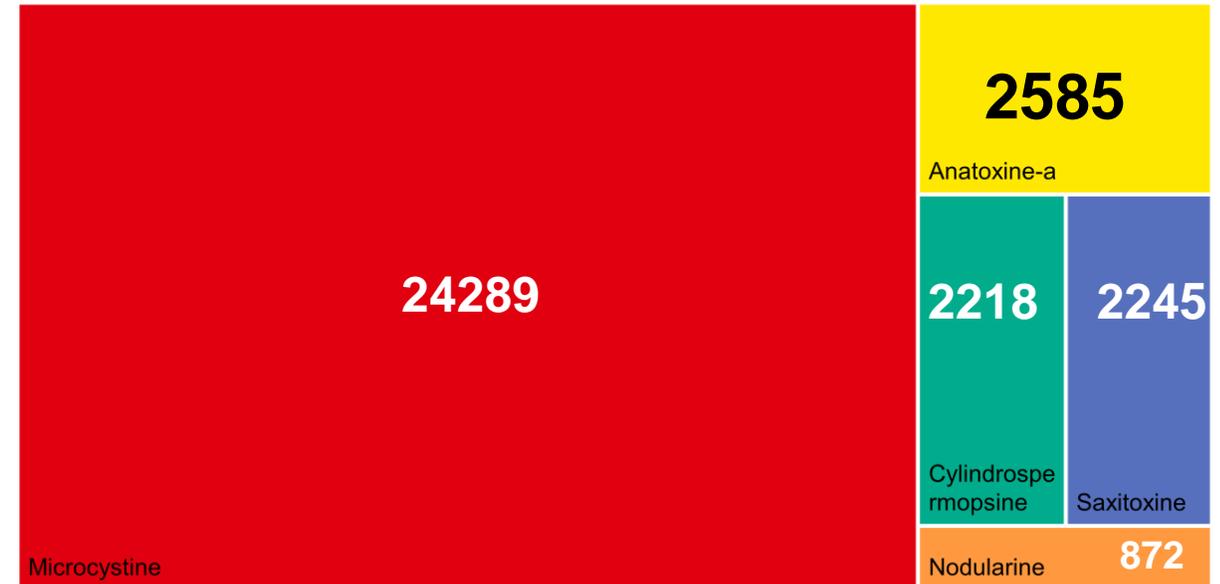
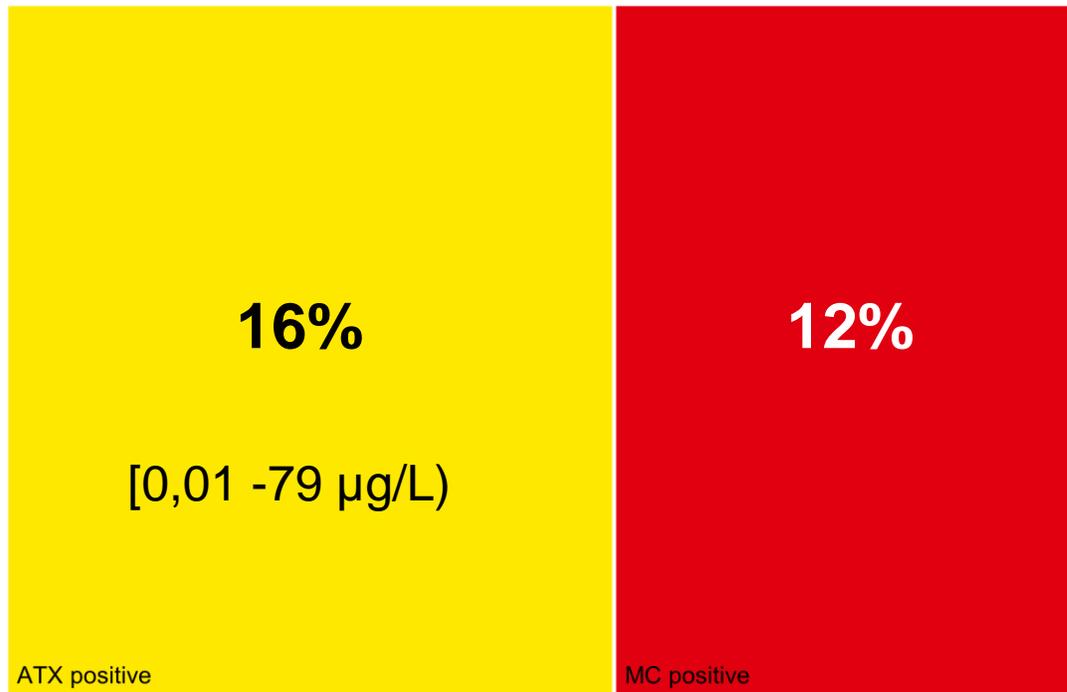
Anatoxines A :



x14 en 3 ans

# Contexte : bilan du contrôle réglementaire des eaux de baignade

60000 résultats bancarisés dont plus de la moitié en eaux de baignade



58 résultats sur matrice biofilm (2 %)  
60 % > LoQ

# Exigences de performances :

A l'heure actuelle, **absence de caractéristiques de performances analytiques**

- [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 :

Paramètres	Limite de quantification	Incertitude en % exprimée à la valeur guide
Microcystines	0,1 µg/L lorsque l'analyse est réalisée par LC/MS-MS (par variant) 0,2 µg/L par méthode ELISA	50
Cylindrospermopsines		
Saxitoxines		
Anatoxines-A		

# État de l'art (Au 1<sup>er</sup> mai 2025)



- Réseau de laboratoires agréés EDCH & EDL : 125
  - Agréés baignades : 70 / Agréés cyanotoxines : 10 / 3 laboratoires agréés ELISA



	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>

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



11 laboratoires accrédités ID LC-MS/MS (3/4) SPE LC-MS/MS (1/4) – méthodes internes  
 ELISA : 4 laboratoires accrédités. Demandes en cours

# Echantillonnage et prélèvements



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 Douchée et à la Consommation  
Humaine, Eau Minérale Naturelle et Eau de Loire

- 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 échantillons de biofilms, le cas échéant sur des substrats différents**

# Echantillonnage et prélèvements

## Importance du choix du fixateur

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

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 Douchée et à la Consommation Humaine, Eau Minérale Naturelle et Eau de Lait



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

# Préparation de l'échantillon (eau, biomasse, biofilm)



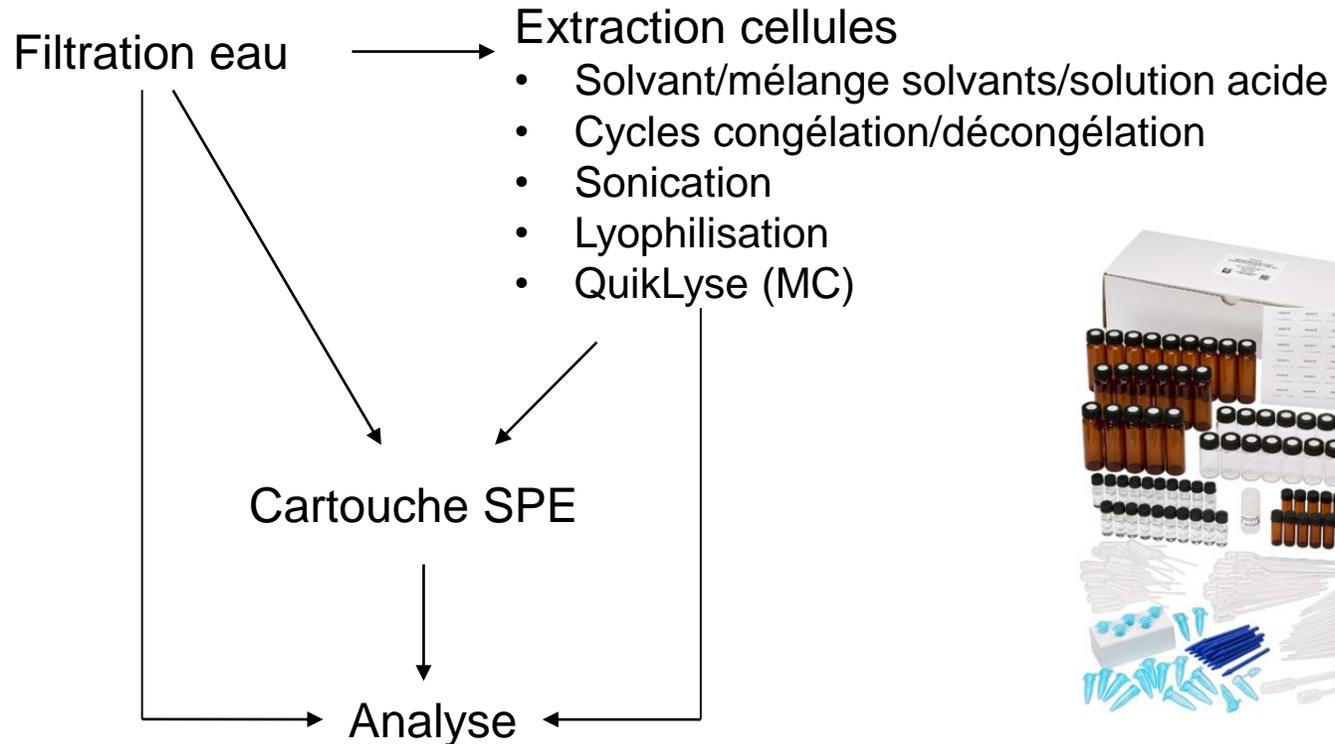
**Eau**  
(fraction liquide)



**Biomasse**  
(fraction solide)



**Biofilm**  
(fraction solide)



Extraction cellules

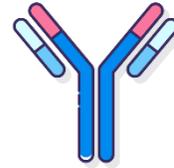
- mécanique (billes, sonication)



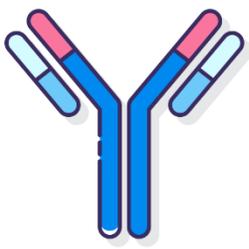
↓  
Centrifugation

↓  
Analyse

# ENJEUX TECHNIQUES ELISA ou LC-MS/MS ?



Critère	ELISA	LC-MS/MS
<b>Principe</b>	Méthode immunologique basée sur la reconnaissance antigène-anticorps	Méthode physico-chimique permettant la séparation des composés d'un mélange et leur identification/quantification
<b>Spécificité</b>	Bonne - Assurée par la reconnaissance antigénique (fonction du niveau de réaction croisée des différents variants)	Excellente - Assurée par les transitions suivies (ion parent → ion fils)
<b>Niveau de couverture/détection des variants</b>	Bon	Moyen à bon (LC-HRMS en mode suspect screening)
<b>Sensibilité</b>	Bonne à très bonne (fonction du type d'échantillons et des cyanotoxines recherchées)	
<b>Temps d'analyse</b>	Rapide	Plus long
<b>Equipement requis</b>	Simple (incubateur, lecteur de plaques)	Complexe et coûteux (chaîne HPLC, spectromètre de masse)
<b>Coût par analyse</b>	Faible à modéré	Élevé (réactifs + maintenance de l'instrumentation)
<b>Niveau de formation requis</b>	Faible	Elevé

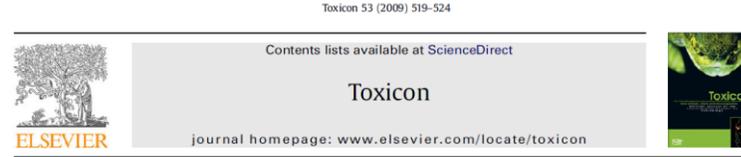


# ENJEUX TECHNIQUES ELISA ou LC-MS/MS ?



## 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



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>

PMID: [30609666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30609666/)



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>



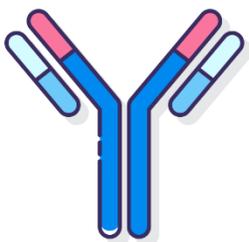
[Toxins \(Basel\)](https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.01.001), 2019 Jan; 11(1): 13.

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](#),<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>

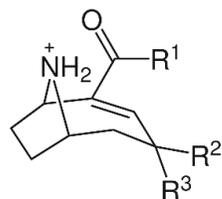
- **Corrélation des résultats des 2 méthodes** en haute saison (juillet à août) mais une déviation des résultats en fin de saison (septembre-octobre). Concentrations en microcystines retrouvées plus importantes par la méthode ELISA microcystine-ADDA.
- Causes de la **sous/surestimation des cyanotoxines** dans les échantillons analysés par ELISA
  - **Réactions croisées** sur les variants de cyanotoxines (ex. microcystines et nodularines ; la réaction croisée pour la MC-RR avec le kit ELISA MC-ADDA est 50% de celle de la MC-LR), **fixations aspécifiques** ou des **interférences matricielles**
  - **Sensibilité** : **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
  - détection de **produits de dégradation** de MC en ELISA mais pas en LC-MS/MS.



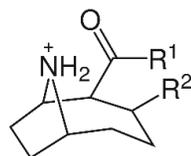
# ENJEUX TECHNIQUES ELISA ou LC-MS/MS ?



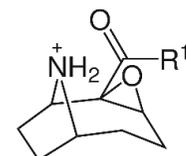
## Défis liés à l'analyse des anatoxines



Groupe 1

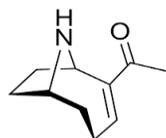


Groupe 2



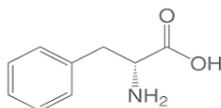
Groupe 3

- **Petites molécules polaires** → séparation par chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC), plus complexe à mettre en œuvre que la phase inverse (→ microcystines)
- **Bruit de fond plus important** en spectrométrie de masse pour les faibles masses
- **Interférences potentielles** avec la phénylalanine (composé isobare)



Anatoxine-a

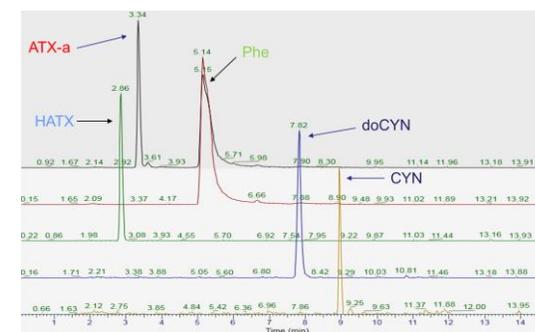
C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO – 165,23 g/mol



Phénylalanine

C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> – 165,19 g/mol

Besoin de pouvoir les séparer en LC-MS/MS basse résolution



- **Faible stabilité** environnementale (photosensible, instable à pH élevé...)

# Contexte normatif

## Analyse chromatographique des cyanotoxines dans l'eau



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)**

Method 544: Determination of microcystins and nodularin in drinking water by solid-phase extraction and liquid chromatography / tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)



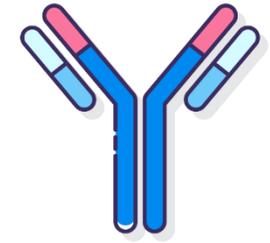
ISO 22104:2021

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

Method 545: Determination of cylindrospermopsin and anatoxin-a in drinking water by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)

# Contexte normatif

Analyse ELISA des cyanotoxines dans l'eau



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



Qualité de l'eau — Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire



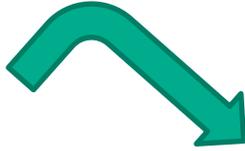
Method 546: Determination of total microcystins and nodularins in drinking water and ambient water by Adda Enzyme-linked immunosorbent assay

Contexte d'accréditation

LAB GTA 27 Essais en immuno-sérologie animale



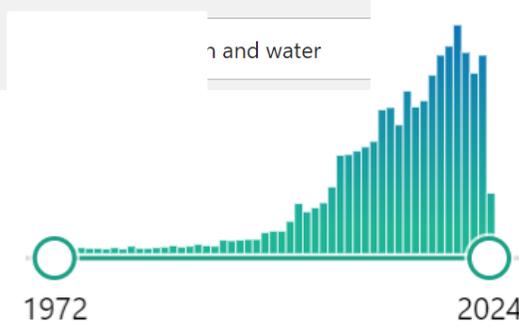
# Prescriptions techniques



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** : généralement 1 kit par famille de cyanotoxines disponible sur le marché (sauf MC → préférer les kits ELISA Adda)
  - **Méthode plus intégrative** permettant de prendre en compte les différents variants (contrairement aux méthodes chromatographiques qui en plus nécessitent la disponibilité d'étalons de toxines)
  - **Méthode plus rapide et coût généralement plus avantageux** (mais variable en fonction de l'organisation du laboratoire)
- **Positionnement laboratoires variable** : équipements LC-MS/MS / service immuno-sérologie

# Conclusions et perspectives



- 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
- Besoin de CIL
- Equivalence des méthodes ??
- Enjeux de renforcement des compétences
- Protocole harmonisé sur biofilm (et expression des résultats)
- Renforcement des accréditations/agrément sur les eaux

