



**HAL**  
open science

## **CYANOSAFE : Etude des risques liés aux efflorescences de cyanobactéries potentiellement toxiques Cours d'eau du Boudigau : du Marais d'Orx à son exutoire**

Sylvia Moreira, Christophe Laplace-Treyture, Magali Costa, Mélissa Eon, Delphine Guillebault, Débora Millan-Navarro, Emilie Pasero, Lou Ritter

### ► To cite this version:

Sylvia Moreira, Christophe Laplace-Treyture, Magali Costa, Mélissa Eon, Delphine Guillebault, et al.. CYANOSAFE : Etude des risques liés aux efflorescences de cyanobactéries potentiellement toxiques Cours d'eau du Boudigau : du Marais d'Orx à son exutoire. [Rapport de recherche] Inrae Nouvelle Aquitaine Bordeaux. 2021, pp.69. hal-03331992

**HAL Id: hal-03331992**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03331992v1>**

Submitted on 2 Sep 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# **CYANOSAFE : Etude des risques liés aux efflorescences de cyanobactéries potentiellement toxiques**

**Cours d'eau du Boudigau : du Marais d'Orx à son exutoire**

**Juin 2021**

**Sylvia Moreira  
Christophe Laplace-Treytore  
Magali Costa  
Mélissa Eon  
Delphine Guillebault  
Débora Millan-Navarro  
Emilie Pasero  
Lou Ritter**



## Résumé

Depuis quelques années le cours d'eau du Boudigau dans les Landes (40), fait l'objet d'épisodes de prolifération de cyanobactéries, micro-organismes producteurs potentiels de toxines pouvant engendrer des risques sanitaires et environnementaux. Le suivi de la dynamique des populations des cyanobactéries et de ses toxines potentielles se révèle être un facteur clé conditionnant les usages le long du cours d'eau du Boudigau mais aussi les activités en aval dans le port de Capbreton et le lac d'Hossegor (ce dernier pouvant recevoir les eaux du Boudigau sous certaines conditions de marée). Le projet CYANOSAFE, développé par des ingénieurs-chercheurs d'INRAE en collaboration avec le Syndicat Mixte de Rivières Côte Sud (SMRCS) et la start-up Microbia Environnement, vise par l'adaptation et l'usage de différents outils et technologies innovants (fluorimètre AlgaeTorch, biocapteurs génétiques, kit ELISA, etc.) d'anticiper et de maîtriser le danger lié à la présence des cyanobactéries afin d'assurer une gestion optimisée des sites considérés comme à risque sur ce territoire. Des campagnes d'échantillonnage et de mesures ont été mises en œuvre au cours des années 2019 et 2020 sur différentes stations du Boudigau. Les protocoles de mesures ont pu être finalisés voire adaptés au contexte de ce cours d'eau. Les mesures réalisées avec les différents outils ont pu être comparées entre elles et avec les résultats de biovolumes obtenus par microscopie inversée. Cette étude montre que le Boudigau présente un risque sanitaire et environnemental important lié à la présence de cyanobactéries toxigènes venant du Marais d'Orx lors des phases de pompage : genres *Planktothrix* et *Dolichospermum*. Les résultats ont pu mettre en évidence la présence de microcystines en 2020. La sonde AlgaeTorch s'avère utile pour suivre à haute fréquence l'évolution des biomasses de cyanobactéries dans le cours d'eau. Cependant, elle nécessite d'être calibrée avec une souche de *Planktothrix* afin de fournir des mesures plus justes. Les biocapteurs génétiques ont pu être déployés sur l'ensemble du site pour parfaire leur développement. Le biocapteur *Planktothrix* a été validé et une valeur de 2 pM, équivalente au seuil de 1 mm<sup>3</sup>/l proposé par l'Anses a pu être définie. Le biocapteur *Anabaena-Dolichospermum-Aphanizomenon* est prometteur mais il doit encore être affiné pour améliorer les corrélations avec les dénombrements microscopiques. Ainsi grâce aux résultats de cette étude, le SMRCS disposera d'outils adaptés et fiables pour suivre la prolifération des cyanobactéries toxigènes sur son territoire.

**Mots clefs** : Cours d'eau, Boudigau, cyanobactéries, toxines, CYANOSAFE, surveillance, outils.

**Citation** : Moreira S., Laplace-Treytore C., Costa M., Eon M., Guillebault D., Millan-Navarro D., Pasero E., Ritter L., 2021. CYANOSAFE : Etude des risques liés aux efflorescences de cyanobactéries potentiellement toxiques. Cours d'eau du Boudigau : du Marais d'Orx à son exutoire. Rapport Inrae, Gazinet. 69p.

## Table des matières

<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES PHOTOS</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>6</b>
<b>1 INTRODUCTION</b>	<b>7</b>
<b>2 MATERIELS ET METHODES</b>	<b>8</b>
<b>2.1 LES STATIONS D’ETUDE</b>	<b>8</b>
<b>2.2 STRATEGIE D’ECHANTILLONNAGE</b>	<b>10</b>
2.2.1 ANALYSES REALISEES EN 2019 ET 2020	11
2.2.2 ANALYSES SUPPLEMENTAIRES EN 2020	12
<b>3 RESULTATS DES OUTILS ET ANALYSES MIS EN ŒUVRE</b>	<b>12</b>
<b>3.1 DOSAGES ET ANALYSES GENETIQUES DES CYANOTOXINES</b>	<b>12</b>
<b>3.2 OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES</b>	<b>14</b>
3.2.1 PRINCIPE	14
3.2.2 TAXONS CYANOBACTERIENS DENOMBRES	15
3.2.3 ÉVALUATION DES ALERTES	17
<b>3.3 BIOCAPTEURS</b>	<b>22</b>
3.3.1 PRINCIPE	22
3.3.2 RETOUR SUR L’OPERATIONNALITE DE L’OUTIL	23
3.3.3 TAXONS CYANOBACTERIENS QUANTIFIABLES PAR LES BIOCAPTEURS	24
3.3.4 ANALYSES DES DONNEES DE 2019	27
3.3.5 COMPARAISON DES BIOCAPTEURS AVEC LES OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES	30
3.3.5.1 COMPARAISON DES EVOLUTIONS TEMPORELLES	30
3.3.5.2 TESTS DE CORRELATION	33
<b>3.4 ALGAE TORCH</b>	<b>35</b>
3.4.1 PRINCIPE	35
3.4.2 VALIDATION DE L’ALGAE TORCH PAR LES METHODES DE LABORATOIRE	35
3.4.2.1 COMPARAISON DES EVOLUTIONS TEMPORELLES	36
3.4.2.1 TESTS DE CORRELATION	38
<b>4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>42</b>
<b>4.1 RISQUES LIES AUX CYANOBACTERIES</b>	<b>42</b>
<b>4.2 BIOCAPTEURS GENETIQUES</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>44</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>45</b>

## Table des figures

Figure 1 Localisation géographique des stations du cours d'eau du Boudigau ©IGN 2019 - www.geoportail.gouv.fr - Projet CYANOSAFE.....	9
Figure 2 Résultats des analyses génétiques par PCR pour le gène <i>mcy-A</i> de la microcystine issus des échantillons prélevés entre le 29 septembre et le 25 novembre 2020 sur la station 6 du Boudigau - Projet CYANOSAFE .....	14
Figure 3 Résultats des analyses génétiques par PCR pour les gènes <i>ana-C</i> et <i>ana-E</i> de l'anatoxine-a issus des échantillons prélevés entre le 29 septembre et le 25 novembre 2020 sur la station 6 du Boudigau - Projet CYANOSAFE .....	14
Figure 4 Évolution temporelle du biovolume en cyanobactéries totales en 2019 - Projet CYANOSAFE. Les astérisques indiquent des prélèvements réalisés durant des phases de pompages du Marais d'Orx. (Signification des codes six lettres : ANASPX : <i>Anabaena</i> sp, AHPSPX : <i>Aphanizomenon</i> sp, APAELA : <i>Aphanocapsa elachista</i> , APAHOL : <i>Aphanocapsa holsatica</i> , APAINC : <i>Aphanocapsa incerta</i> , CUSISS : <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> , DOLSPX : <i>Dolichospermum</i> sp, DOLCOM: <i>Dolichospermum compactum</i> , MERSPX : <i>Merismopedia</i> sp, MERPUN : <i>Merismopedia punctata</i> , MERTEN : <i>Merismopedia tenuissima</i> , MIOSPX : <i>Microcystis</i> sp, MIOAER : <i>Microcystis aeruginosa</i> , MIOFIR : <i>Microcystis firma</i> , MIOSMI : <i>Microcystis smithii</i> , MIOWES : <i>Microcystis wesenbergii</i> , PLAAGA : <i>Planktothrix agardhii</i> , PSESPX : <i>Pseudanabaena</i> sp, PSECAT : <i>Pseudanabaena catenata</i> , PSEMUC : <i>Pseudanabaena mucicola</i> , WORNAE : <i>Woronichinia naegeliana</i> ). .....	19
Figure 5 Évolution temporelle du biovolume en cyanobactéries totales sur la station 6 du Boudigau en 2020 - Projet CYANOSAE. Les astérisques indiquent des prélèvements réalisés durant des phases de pompages du Marais d'Orx. (Signification des codes six lettres : ANASPX : <i>Anabaena</i> sp, AHPSPX : <i>Aphanizomenon</i> sp, APAELA : <i>Aphanocapsa elachista</i> , APAHOL : <i>Aphanocapsa holsatica</i> , APAINC : <i>Aphanocapsa incerta</i> , CUSISS : <i>Cuspidothrix issatschenkoi</i> , DOLSPX : <i>Dolichospermum</i> sp, DOLCOM: <i>Dolichospermum compactum</i> , MERSPX : <i>Merismopedia</i> sp, MERPUN : <i>Merismopedia punctata</i> , MERTEN : <i>Merismopedia tenuissima</i> , MIOSPX : <i>Microcystis</i> sp, MIOAER : <i>Microcystis aeruginosa</i> , MIOFIR : <i>Microcystis firma</i> , MIOSMI : <i>Microcystis smithii</i> , MIOWES : <i>Microcystis wesenbergii</i> , PLAAGA : <i>Planktothrix agardhii</i> , PSESPX : <i>Pseudanabaena</i> sp, PSECAT : <i>Pseudanabaena catenata</i> , PSEMUC : <i>Pseudanabaena mucicola</i> , WORNAE : <i>Woronichinia naegeliana</i> ). .....	20
Figure 6 Schéma du principe de mesure des biocapteurs génétiques.....	23
Figure 7 Évolution temporelle de l'activité cyanobactérienne mesurée par les biocapteurs en 2019 - Projet CYANOSAFE. Les astérisques indiquent des prélèvements réalisés durant des phases de pompage du Marais d'Orx. ADA pour le biocapteur <i>-Anabaena - Dolichospermum— Aphanizomenon</i> ; PLASPX pour le biocapteur <i>Planktothrix</i> ; MIOSPX pour le biocapteur <i>Microcystis</i> .....	29
Figure 8 Évolution temporelle des cyanobactéries mesurée par les trois biocapteurs et par les observations microscopiques sur la station 6 du Boudigau en 2020 - Projet CYANOSAFE .....	32

Figure 9 Corrélation entre les activités des biocapteurs *Planktothrix* et ADA avec les biovolumes de cyanobactéries toxigènes correspondantes calculés à partir des observations microscopiques en 2019 et 2020 (p-value<0,001) - Projet CYANOSAFE. Le trait vert matérialise la valeur en biocapteur *Planktothrix* équivalente au biovolume de 1 mm<sup>3</sup>/L. Les ellipses indiquent des données particulières commentées dans le texte ..... 34

Figure 10 Évolution temporelle des quantités de cyanobactéries mesurés par l'AlgaeTorch et par la microscopie en 2019 et 2020 - Projet CYANOSAFE. En bleu : quantité de cyanobactéries mesurée par l'AlgaeTorch ; en rouge : quantité de cyanobactéries mesurée par microscopie ..... 37

Figure 11 Corrélation entre la chlorophylle-a totale mesurée par l'AlgaeTorch et celle mesurée par spectrophotométrie-UV visible (méthode de Lorenzen) en 2020 (p-value < 0,001) - Projet CYANOSAFE ... 39

Figure 12 Corrélation entre les mesures de chlorophylle-a attribuées aux cyanobactéries par l'AlgaeTorch et les biovolumes de cyanobactéries calculés à partir des observations microscopiques en 2019 et 2020 (p-value<0,001) - Projet CYANOSAFE. Le trait vert matérialise l'équivalence entre la valeur de chlorophylle-a cyanobactéries obtenue par la sonde et le biovolume de 1 mm<sup>3</sup>/L ..... 40

## Table des photos

Photo 1 Observation microscopique à x400 du genre <i>Aphanizomenon</i> sur la station 6 du Boudigau le 13 septembre 2019.....	25
Photo 2 Observation microscopique à x1000 de l'espèce <i>Dolichospermum compactum</i> sur la station 2 du Marais d'Orx le 17 juillet 2019 .....	25
Photo 3 Observation microscopique à x600 de l'espèce <i>Microcystis wesenbergii</i> sur la station 6 du Boudigau le 12 novembre 2020.....	25
Photo 4 Observation microscopique à x600 de l'espèce <i>Planktothrix agardhii</i> sur la station 18 le 27 juin 2019 .....	26

## Liste des tableaux

Tableau 1 Principales caractéristiques des stations d'étude - Projet CYANOSAFE.....	9
Tableau 2 Synthèse des campagnes de mesures par année et par type de campagne - Projet CYANOSAFE .....	11
Tableau 3 Synthèse du nombre d'échantillons par station- Projet CYANOSAFE .....	11
Tableau 4 Synthèse des dosages des toxines par station- Année 2020- Projet CYANOSAFE. Les valeurs en gras représentent les résultats supérieurs aux seuils d'alerte (20 000 cel/ml actuel seuil Agence Régionale de Santé, 1mm <sup>3</sup> /l et 0,3 µg/l eq. LR nouveaux seuils Anses) .....	13
Tableau 5 Synthèse par station des alertes selon les différents arbres décisionnels - Projet CYANOSAFE .	22
Tableau 6 Occurrence des taxons détectables par les biocapteurs sur les différents sites et stations de l'étude en 2019 et 2020 - Projet CYANOSAFE.....	27
Tableau 7 Synthèse des corrélations de Spearman obtenues entre les activités de cyanobactéries toxigènes mesurées par les biocapteurs et leurs biovolumes calculés à partir des observations microscopiques en 2019 et 2020 - Projet CYANOSAFE .....	33
Tableau 8 Synthèse des corrélations de Spearman obtenues entre les concentrations en chlorophylle-a mesurées par l'AlgaeTorch et les données obtenues par les méthodes de référence en laboratoire en 2020 - Projet CYANOSAFE .....	39

## Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

APL : Aplysiatoxine

ARN : Acide ribonucléique

ATX : Anatoxine-a

ATX(S) : Anatoxine-a(S)

BMAA : Bêta-méthylamino-L-alanine

CYN : Cylindrospermopsine

CCGL : Communauté de Communes des Grands Lacs

Labex COTE : Laboratoire d'Excellence « Evolution, adaptation et gouvernance des écosystèmes continentaux et côtiers »

ECOVEA : Equipe de recherche INRAE en Ecologie des Communautés Végétales Aquatiques et impact des pressions multiples

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay (« technique d'immunoabsorption par enzyme liée »)

FTU : Formazine turbidity unit

LQ : Limite de quantification

LYN : Lyngbyatoxine

ME : Microbia Environnement

MC : Microcystine

MC-LR : Microcystine de type LR

NOD : Nodularine

PAL : Palytoxine

PCR : Polymerase Chain Reaction (« réaction de polymérisation en chaîne »)

pM : Pico Molaire

SMRCS : Syndicat Mixte de Rivières Côte Sud

STX : Saxitoxine



## 1 Introduction

Le suivi sanitaire réglementaire actuel des cyanobactéries (organismes nuisibles pour la santé et l'environnement) repose sur des analyses de laboratoire effectuées par du personnel technique spécialisé (comptages au microscope et dosage de toxines). Lorsque les résultats dépassent les seuils d'alerte de l'arbre décisionnel (Afssa et Afsset 2006), des mesures de gestion sont mises en place pour limiter le risque sanitaire vis-à-vis des usagers. La mise à disposition des résultats d'analyses comporte un délai de réponse d'au moins 36 heures, dommageable à la sécurité sanitaire et entraînent dans certains cas des coûts financiers élevés, voire très importants pour certaines communes ayant à leur charge la surveillance de multiples zones. La gestion du suivi sanitaire des cyanobactéries est variable selon les départements et les gestionnaires sont souvent démunis face à la mise en place de cette surveillance devenue, depuis cette dernière décennie, un enjeu sanitaire, économique et environnemental important. Le développement d'outils simples, rapides et fiables pour surveiller à haute fréquence et à moindre coût la dynamique des populations de cyanobactéries dans les milieux aquatiques est devenu primordial en particulier pour les gestionnaires. Ainsi en 2013, le projet CYANALERT (LabEx COTE) a été développé par l'équipe ECOVEA d'INRAE Gazinet-Cestas en collaboration avec la Communauté de Communes des Grands Lacs (CCGL) pour élaborer un arbre décisionnel alternatif de surveillance et d'alerte des proliférations de cyanobactérie par l'utilisation *in-situ* d'une sonde fluorimétrique, l'AlgaeTorch (marque Bbe Moldaenke, Allemagne). Cette sonde permet de détecter et de quantifier rapidement la biomasse en cyanobactéries par la mesure de la chlorophylle-a. Le protocole CYANALERT, développé pour les sites de baignade des lacs et des étangs naturels du Born (40), présente cependant quelques limites : il ne permet pas de quantifier individuellement les genres de cyanobactéries présents et donc de discriminer ceux potentiellement toxiques des autres. A la suite du projet CYANALERT, deux perspectives ont été identifiées. Tout d'abord, compléter l'arbre décisionnel par l'utilisation d'un outil supplémentaire permettant de mesurer le risque de toxicité lié à la présence des cyanobactéries, puis, de l'appliquer sur des sites impactés par d'autres genres de cyanobactéries.

Ainsi, l'équipe ECOVEA s'est rapprochée depuis 2016 de la société Microbia Environnement (ME) spécialisée dans le développement d'une nouvelle technique analytique : des biocapteurs génétiques. Le partenariat avait pour but de finaliser leur développement pour les cyanobactéries en eau douce. ME avait déjà une solide expérience en biocapteurs pour les algues toxiques des milieux marins. Basés sur une approche moléculaire et génétique (détection de l'ARN), facile d'utilisation, rapide et à bas coût, les biocapteurs ont pour finalité d'anticiper les risques liés aux efflorescences de cyanobactéries en mesurant l'activité de certains genres de cyanobactéries potentiellement toxiques et vivants (actifs). Les premiers résultats sur certains sites naturels ont démontré une très bonne corrélation entre les dénombrements par microscopie (méthode réglementaire) et la mesure d'activité de certaines souches toxiques par les biocapteurs (travaux réalisés au cours de projets antérieurs). Cet outil de biocapteurs pourrait alors venir renforcer le protocole CYANALERT si ces résultats pouvaient être confirmés.

Des épisodes récurrents d'efflorescences de cyanobactéries potentiellement toxiques comprenant les genres *Plankthotrix*, *Microcystis* et *Dolichospermum* ont été identifiés dans la réserve du Marais d'Orx (département des Landes) et son exutoire, le courant du Boudigau, jusqu'au lac d'Hossegor situé en aval. Or

ces genres font partie de ceux visés par l’outil biocapteur en cours de développement avec ME. Le Boudigau constitue alors un site d’intérêt pour cet outil. Le Syndicat Mixte de Rivières Côte Sud (SMRCS) est notamment en charge du suivi et de la gestion de la qualité des eaux des milieux aquatiques du bassin versant du Boudigau. A ce titre il est un interlocuteur privilégié pour participer à la mise au point des biocapteurs et à l’analyse de leur possible prise en compte dans l’arbre décisionnel de CYANALERT. Ce dernier est par ailleurs mis en œuvre par le SMRCS depuis quelques années.

Le projet CYANOSAFE est une collaboration « gestionnaires-scientifiques » qui a pour volonté de renforcer les relations de travail entre une équipe scientifique du LabEx COTE 2<sup>1</sup> et le monde opérationnel comprenant :

- L’équipe ECOVEA d’INRAE Gazinet-Cestas (coordinateur du projet) ;
- Le Syndicat mixte de Rivières Côte Sud (gestionnaire du bassin du Boudigau) ;
- Microbia Environnement (société privée).

Le projet CYANOSAFE présente différents enjeux opérationnels :

- Caractériser la dynamique des populations de cyanobactéries sur le cours d’eau du Boudigau par la mise en œuvre de campagnes de mesure et de prélèvement d’échantillons afin d’évaluer le risque sanitaire présent ;
- Expérimenter les biocapteurs génétiques sur un cours d’eau et voir si cette technologie permet de mieux caractériser les cyanobactéries actives sur le bassin versant du Boudigau. Le SMRCS assure un rôle d’opérateur de terrain et apporte un regard critique sur l’opérationnalité de la méthode ;
- Participer à la réflexion d’un protocole spécifique de suivi et d’alerte des cyanobactéries à venir sur le cours d’eau du Boudigau par l’emploi de la sonde fluorimétrique AlgaeTorch et de différents outils disponibles dont les biocapteurs.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Les stations d’étude

Dans les années 60, le Marais d’Orx est complètement asséché pour des besoins agricoles avec la mise en place de différentes structures hydrauliques (canaux, digue et pompes de relevage). Les frais de gestion étant trop important, les cultures sont abandonnées au milieu des années 80 et les différents compartiments se remplissent naturellement d’eau. Le Marais d’Orx est converti en 1995 en Réserve Naturelle Nationale de plus de 774 ha, propriété du Conservatoire du Littoral, situé sur l’axe principal de migration Ouest européen des oiseaux. Il bénéficie des statuts ZNIEFF (1983), ZICO (1980), ZPS (2004), SIC (2007), RAMSAR (2011) et site Nature 2000. Depuis quelques années, le Marais d’Orx est sujet à des blooms récurrents de cyanobactéries, conséquence probable de son passé agricole, des apports en nutriments de son bassin

---

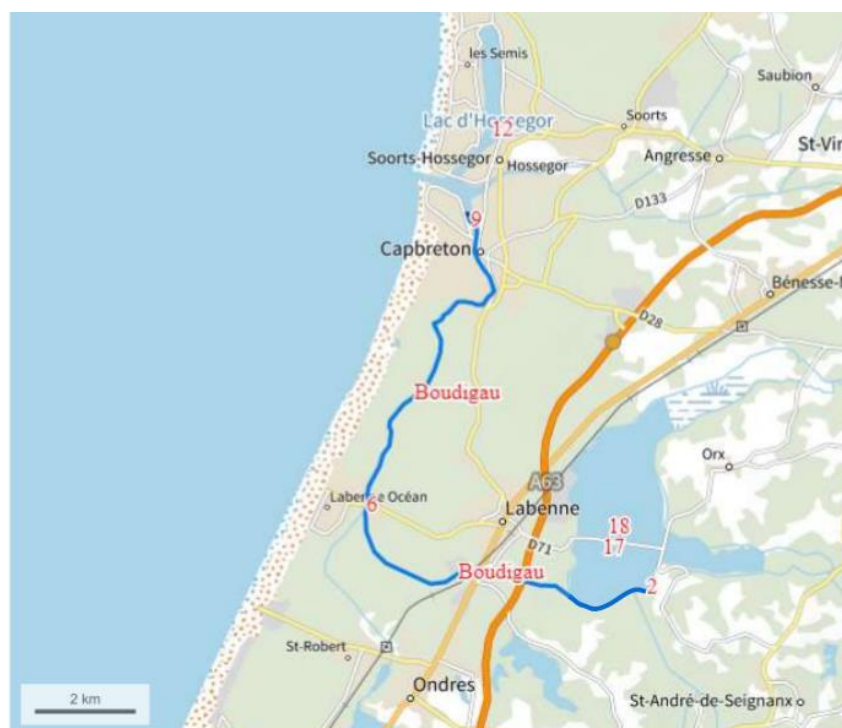
1 Le laboratoire d'excellence (programme d'investissement d'avenir de l'Etat pour améliorer la compétitivité des laboratoires) COTE a pour objectifs d'élaborer des outils permettant de comprendre et prédire l'évolution des écosystèmes et de développer des méthodes de gestion adaptative et de gouvernance pour assurer leur durabilité.

versant et de son usage actuel. Le Marais d'Orx semble être la source des cyanobactéries présentes sur le cours d'eau du Boudigau, et ce, jusqu'au port de Capbreton, son aval. En effet, pour des besoins naturalistes (protection des nids de l'inondation, conservation des habitats à secs, etc.) ou hydrauliques (éviter les inondations, création des surfaces de pâturage ou de jachère, protection des digues, etc.), les niveaux d'eau du Marais d'Orx sont régulés. Des pompages automatiques, par un système de pompes de relevage avec écoulement dans le courant du Boudigau, sont réalisés en différentes périodes de l'année. Ces apports d'eau, souvent chargés en cyanobactéries, impactent par conséquent la qualité sanitaire et écologique du Boudigau (site de pêche, promenade, etc.) ainsi que potentiellement les sites de baignade et d'ostréiculture situés en aval dans le lac d'Hossegor.

Pour le projet CYANOSAFE, cinq stations réparties sur deux sites du bassin versant du Boudigau ont été suivies entre 2019 et 2020 (cf. Tableau 1 et Figure 1).

*Tableau 1 Principales caractéristiques des stations d'étude - Projet CYANOSAFE.  
La numérotation des stations reprend celle employée par le SMRCS pour ces suivis de qualité d'eau*

SITE	STATION	NOM	ANNEE DE SUIVI	COORDONNEE X (Lambert 93, m)	COORDONNEE Y (Lambert 93, m)
Marais d'Orx	18	Casier central	2019	344663	6286607
	17	Casier barrage	2019	344651	6286562
	2	Canal pompage	2019	345482	6285680
Boudigau	6	Pont de Labenne océan	2019-2020	339897	6287595
	9	Cale Fany	2019	342299	6293192
Hossegor	12	Lac (amont canal d'Hossegor)	2019	1 prélèvement exceptionnel	



*Figure 1 Localisation géographique des stations du cours d'eau du Boudigau ©IGN 2019 -www.geoportail.gouv.fr -  
Projet CYANOSAFE*

## 2.2 Stratégie d'échantillonnage

En 2019, quarante échantillons ont été recueillis du 17 juillet au 23 octobre à raison d'une campagne par semaine sur les cinq stations et selon trois types de campagne :

- **Initiale** : Totalité des stations (n°18-17-2-6-9) ;
- **Intermédiaire** : Deux stations du Marais d'Orx (n°18 et 17) ;
- **Alerte** : Quatre stations sur l'ensemble des deux sites (n°18-2-6-9) avec
  - *Alerte 1* : En période de pompage du Marais d'Orx ;
  - *Alerte 2* : Mesure en chlorophylle-a attribuées aux cyanobactéries par l'AlgaeTorch supérieure à 17 µg/l (Laplace-Treuture, 2017).

En 2020, quatorze échantillons supplémentaires ont été réalisés sur la station 6 du Boudigau du 18 mai au 25 novembre. Le choix de ne retenir que cette station a été définie à partir des résultats d'analyses des données préalablement acquises en 2019 (partie 3.3.4). Les arguments concourants à cette décision sont les suivants : cette station est facile d'accès, cette station contient l'ensemble des espèces détectables par les trois types de biocapteurs avec des résultats variés (dénombrement cellulaire et biovolume) dans les gammes de mesures des outils. Deux types de campagnes ont ainsi été effectués :

- **Initiale** : Un prélèvement effectué avant le début des pompages pour caractériser le « bruit de fond » du cours d'eau ;
- **Pompage** : Prélèvement bihebdomadaire en période de pompage du Marais d'Orx soit treize échantillons au total.

Les relevés de terrain, les mesures *in situ* et les prélèvements d'eau ont été réalisés par le personnel technique du SMRCS selon le protocole d'échantillonnage, de préparation et de stockage des échantillons de cyanobactéries rédigé par ECOVEA et ME (Annexe 1). Au cours de chaque campagne de mesure, différentes caractéristiques physiques ont été décrites (surface de l'eau, présence de bloom, etc.) ainsi que les conditions météorologiques (intensité du vent, ensoleillement et précipitations, etc.). Le détail des relevés et des mesures a été consigné selon la fiche de prélèvement et filtration type rédigée par ECOVEA et ME en Annexe 2. La collecte et la préparation des échantillons ont été réalisées selon les modalités suivantes. Sur chaque station, un prélèvement d'eau a été effectué sous la surface avec un seau. L'échantillon a été ensuite homogénéisé avant la prise de mesures et de sous-échantillons. Une série de trente mesures moyennées sur trente secondes a été réalisée avec l'AlgaeTorch, le spectrofluorimètre de terrain, directement dans le seau. Ensuite, une partie du prélèvement a été transféré dans des flacons et conservé dans une glacière à l'obscurité sans choc thermique pour préserver l'ARN des cyanobactéries jusqu'au retour de la mission. Les échantillons ont été ensuite conditionnés au retour de mission, au maximum quatre heures après le prélèvement sur site, pour les analyses ultérieures en laboratoire selon les procédures détaillées en Annexe 1. Ainsi, quatorze campagnes de mesure avec prélèvements d'eau ont été réalisées en 2019, puis quatorze en 2020, permettant de récolter au total cinquante-quatre échantillons. L'échantillon de la station 18 du Marais d'Orx du 13 août 2019 n'a pas pu être analysé au microscope car le flacon s'est cassé pendant le transport. Un prélèvement exceptionnel a été réalisé sur le lac d'Hossegor le 21 août 2019. Le Tableau 2 décrit les campagnes de mesures réalisées et le Tableau 3 renseigne sur la répartition des échantillons selon les stations.

Tableau 2 Synthèse des campagnes de mesures par année et par type de campagne - Projet CYANOSAFE

ANNEE	TYPE	NOMBRE D'ECHANTILLONS	SITE	STATION	BIOCAPTEURS MESURÉS
2019	Initiale	1	Marais d'Orx Boudigau	2, 17 et 18 6 et 9	<i>Planktothrix</i>
	Intermédiaire	9	Marais d'Orx	18 et 17	<i>Planktothrix</i> <i>Anabaena/Aphanizomenon/</i> <i>Dolichospermum</i>
	Pompage	4	Marais d'Orx Boudigau	2 et 18 6 et 9	<i>Microcystis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Anabaena/Aphanizomenon/</i> <i>Dolichospermum</i>
2020	Initiale	1	Boudigau	6	<i>Microcystis</i> <i>Planktothrix</i> <i>Anabaena/Aphanizomenon/</i> <i>Dolichospermum</i>
	Pompage	13			

Tableau 3 Synthèse du nombre d'échantillons par station- Projet CYANOSAFE

SITES-STATION	2019	2020	TOTAL
<b>Marais d'Orx</b>	<b>29</b>	<b>0</b>	<b>29</b>
Station 18	14	0	14
Station 17	10	0	10
Station 2	5	0	5
<b>Boudigau</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>24</b>
Station 6	5	14	19
Station 9	5	0	5
<b>Hossegor</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
Lac	1	0	0
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>14</b>	<b>54</b>

### 2.2.1 Analyses réalisées en 2019 et 2020

Sur les échantillons prélevés lors des différentes campagnes de terrain de l'étude les mesures et les analyses suivantes ont été réalisées.

- **In situ :**
  - Les quantifications de la biomasse phytoplanctonique totale et celle associée aux cyanobactéries, en équivalent de chlorophylle-a, ont été mesurées avec l'AlgaeTorch par le SMRCS.
- **En laboratoire :**
  - La détection et la quantification de l'activité des genres potentiellement toxiques des trois biocapteurs génétiques ont été réalisées par ME ;
  - L'identification et le comptage (nombre de cellules et biovolumes) des cyanobactéries présentes ont été pratiqués par microscopie inversée par INRAE.

## 2.2.2 Analyses supplémentaires en 2020

En complément, d'autres analyses ont été réalisées en 2020 afin de disposer d'informations nouvelles sur les toxines, de tester un outil de mesure pour leur quantification rapide *in situ* et d'avoir des données de référence pour les mesures de chlorophylle-a afin de pouvoir évaluer les résultats de l'AlgaeTorch.

- **In situ :**
  - Le dosage des microcystines par test ELISA avec bandelettes par le SMRCS.
- **En laboratoire :**
  - La mesure de la chlorophylle-a par spectrométrie d'absorption moléculaire (norme NF T 90-117). Cette analyse permet de mesurer la part active (vivante) et la part dégradée, phéopigments de la chlorophylle-a (laboratoire Biomarqueurs d'INRAE). Cette mesure est aussi une bonne estimation de la biomasse phytoplanctonique totale présente ;
  - Les dosages des microcystines et des anatoxines par test ELISA (Limnologie SARL) ;
  - Les analyses génétiques pour la recherche des gènes codant pour les toxines microcystines et anatoxine-a (LMGE - UMR CNRS, équipe « Interactions dans les réseaux trophiques aquatiques »).

## 3 Résultats des outils et analyses mis en œuvre

### 3.1 Dosages et analyses génétiques des cyanotoxines

Les dosages et les analyses génétiques des cyanotoxines ont été réalisés sur les échantillons de la station 6 du Boudigau en 2020. La méthodologie immuno-enzymatique de laboratoire ELISA a été testée afin d'évaluer la présence de certaines familles de cyanotoxines sur le Boudigau et permettre au SMRCS d'apprécier cette technologie pour l'intégrer dans le protocole de surveillance et de gestion des cyanobactéries à venir. Deux outils ont été déployés et ont permis de quantifier les microcystines (MC) et les anatoxines (ATX), deux familles de cyanotoxines pouvant être secrétées par les taxons cyanobactériens observés sur le site (partie 3.2.2) :

- **Test bandelettes *in situ*** : outil capable de donner un résultat rapide semi-quantitatif exprimé en équivalent de microcystine-LR (LQ= 0,50 µg/l eq. MC-LR) ;
- **Test ELISA de laboratoire** : analyses de référence pour un dosage quantitatif exprimé en équivalent de microcystine-LR pour le dosage des microcystines et en équivalent d'anatoxine-a pour les anatoxines et homo-anatoxines (LQ = 0,15 µg/l eq. MC-LR et idem pour ATX-A).

Pour rappel, les seuils fixés dans l'arbre décisionnel de l'Anses (Anses 2020) sont de 0,3 µg/l pour les microcystines et supérieur à la limite de détection pour les anatoxines. Le Tableau 4 présente les résultats obtenus pour la campagne de 2020. Les conclusions suivantes peuvent être relevées :

- Il y a un risque sanitaire avéré car les microcystines ont été détectées par ELISA à trois dates avec une des valeurs supérieure au seuil proposé par l'Anses (25 novembre 2020) ;
- Dans le même temps, les tests bandelettes de terrain n'ont détecté la présence de microcystines qu'à une seule date. Ils ne sont alors pas vraiment adaptés sur ce territoire car pas assez sensibles ;

- Les anatoxines n'ont été détectées dans aucun des échantillons ;
- Le dosage des toxines par la méthode immuno-enzymatique ELISA de laboratoire serait à intégrer dans le protocole de surveillance et d'alerte à venir afin de bien prendre en compte le risque toxique.

Tableau 4 Synthèse des dosages des toxines par station- Année 2020- Projet CYANOSAFE. Les valeurs en gras représentent les résultats supérieurs aux seuils d'alerte (20 000 cel/ml actuel seuil Agence Régionale de Santé, 1mm3/l et 0,3 µg/l eq. LR nouveaux seuils Anses)

SITE	STATION	DATE	Abondance pot. toxiques (Cel/ml)	Biovolume pot. toxiques (mm <sup>3</sup> /l)	ELISA terrain MC (µg/l)	ELISA Labo MC (µg/l eq LR)	ELISA Labo ATX et hATX (µg/l eq ATX-A)
Boudigau	6	18/05/2020	359	0,02	0	0	0
		20/05/2020	9 377	0,08	0	0	0
		25/05/2020	<b>578 048</b>	<b>13,59</b>	0	0	0
		28/05/2020	<b>841 923</b>	<b>29,33</b>	0	0	0
		11/06/2020	<b>617 025</b>	<b>33,68</b>	0	0,16	0
		29/09/2020	11 562	0,02	NA	0	0
		01/10/2020	<b>760 016</b>	<b>2,38</b>	NA	0	0
		21/10/2020	<b>81 048</b>	<b>4,57</b>	NA	0	0
		09/11/2020	<b>103 706</b>	<b>5,49</b>	NA	0	0
		12/11/2020	<b>118 399</b>	<b>6,33</b>	2,5	0	0
		16/11/2020	<b>171 899</b>	<b>8,75</b>	0	0	0
		18/11/2020	<b>142 804</b>	<b>8,53</b>	0	0,17	0
		23/11/2020	<b>204 050</b>	<b>11,04</b>	0	0	0
		25/11/2020	<b>220 003</b>	<b>12,53</b>	0	<b>0,55</b>	0

Des analyses génétiques par analyse PCR de laboratoire (amplification enzymatique pour obtenir des quantités importantes d'un fragment spécifique d'ADN) ont été effectuées pour déterminer la présence des gènes codants pour les cyanotoxines identifiées précédemment :

- **Microcystine** : le gène mcy-A a été recherché ;
- **Anatoxine-a** : les huit gènes ana-A, ana-B, ana-C, ana-D, ana-Eks, ana-Fks2, ana-Gks, ana-Gmt ont été recherchés.

Les résultats de ces analyses illustrés dans les Figure 2 et Figure 3 et en annexe 3 pour l'ensemble des résultats mènent aux constats suivants :

- La majorité des échantillons (à l'exception des deux premiers du 29 septembre et du 1 octobre 2020) présente le gène mcy-A (Figure 2). La synthèse de microcystines par les cyanobactéries présentes sur le site d'étude est donc très probable. Ce fait est bien confirmé par les résultats des analyses de cyanotoxines ci-dessus ;
- La Figure 3 montre que le gène ana-C n'est pas présent alors que le gène ana-E est retrouvé dans quelques-uns des échantillons. D'un point de vue global, aucun échantillon ne possède l'ensemble des clusters de gènes de l'anatoxine-a, sa production n'est donc théoriquement pas possible (annexe 3) ;

- Néanmoins, les témoins positifs pour les gènes ana-A, ana-B et ana-D ne ressortent pas (annexe 3). Les couples d'amorces utilisés ne s'avèrent alors pas spécifiques de la souche témoin utilisée. Il est possible qu'elles ne soient pas non plus spécifiques des souches présentes sur le site d'étude. Le choix des amorces PCR pour ces gènes doit encore être optimisé pour améliorer la pertinence des résultats.

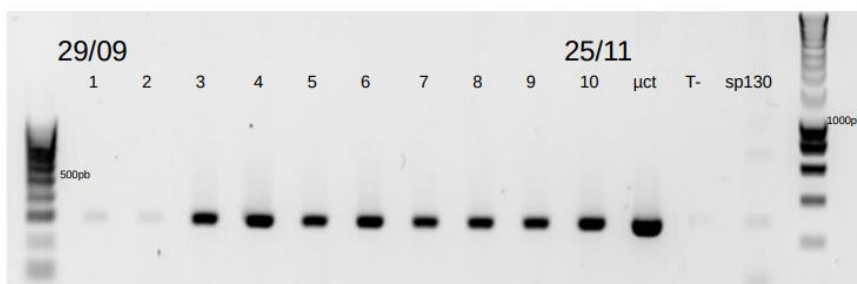


Figure 2 Résultats des analyses génétiques par PCR pour le gène *mcy-A* de la microcystine issus des échantillons prélevés entre le 29 septembre et le 25 novembre 2020 sur la station 6 du Boudigau - Projet CYANOSAFE

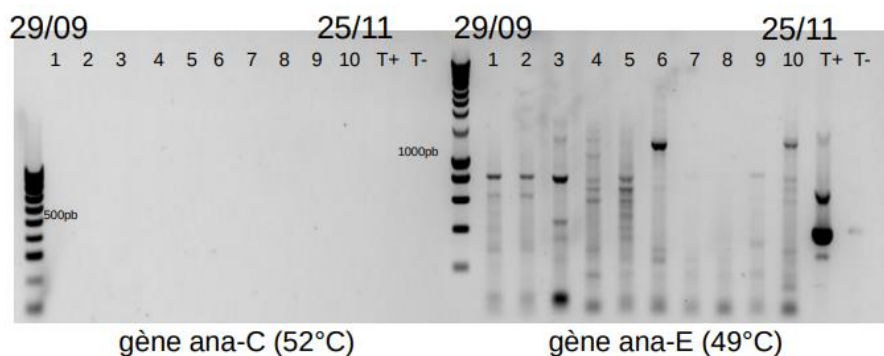


Figure 3 Résultats des analyses génétiques par PCR pour les gènes *ana-C* et *ana-E* de l'anatoxine-a issus des échantillons prélevés entre le 29 septembre et le 25 novembre 2020 sur la station 6 du Boudigau - Projet CYANOSAFE

## 3.2 Observations microscopiques

L'observation microscopique permet l'identification taxonomique et le comptage des cyanobactéries contenues dans les échantillons d'eau fixés au lugol (conservateur). Les observations ont été réalisées par l'équipe ECOVEA.

### 3.2.1 Principe

Le comptage microscopique est réalisé en suivant la norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscope inversé d'Utermöhl (NF EN 15204, 2006). Dans le cadre de ce projet, les déterminations sont effectuées seulement pour le groupe taxonomique des cyanobactéries, et dans la mesure du possible, au niveau spécifique (à l'aide des ouvrages de taxonomie disponibles). Les résultats sont exprimés en abondance (nombre de cellules par millilitre) et en biovolume (millimètre cube par litre). Cette méthode permet l'analyse qualitative (liste des espèces ou genres rencontrés) et quantitative des peuplements en



cyanobactéries. Le comptage consiste à enregistrer les taxons observés et le nombre d'unités d'algues (cellules, colonies ou filaments) de chaque taxon sur une surface connue de la chambre de sédimentation ou sur la chambre entière. Le microscope utilisé est un microscope inversé de marque Olympus, Modèle IX70, comprenant un système de contraste interférentiel (DIC) et couplé à une caméra permettant de réaliser des prises de vues et des mesures à l'aide du logiciel Archimed®. Les comptages ont été directement réalisés au grossissement x400 et/ou x600. *A minima* trente champs et cent individus ont été dénombrés. L'identification des individus de cyanobactéries s'est reposée sur l'observation visuelle des caractères généraux et des attributs morphologiques remarquables des cellules et individus définis dans les ouvrages de référence suivants (Komárek et Anagnostidis, 1999 ; 2005 ; John et al., 2011 ; Komárek, 2013 ; Wehr et al., 2015). L'outil informatique PHYTOBS (v3.1.3. - <https://hydrobio-dce.inrae.fr/phytobs/>), développé par l'équipe ECOVEA, a été utilisé pour élaborer les résultats de comptage.

### 3.2.2 Taxons cyanobactériens dénombrés

L'Annexe 4 illustre l'ensemble des taxons de cyanobactéries dénombrés lors des campagnes de 2019 et 2020 au cours du projet CYANOSAFE et indique pour chacun d'eux son potentiel toxique (positif : 1 et négatif : 0). Les familles de cyanotoxines potentiellement produites (Anses 2020, pp. 12–13) sont aussi indiquées. Au cours de la campagne 2019-2020, trente-cinq taxons de cyanobactéries ont été inventoriés dont vingt-et-un appartenant à des genres connus comme toxigènes. A noter que les stations étant très chargées en phytoplancton et en matière en suspension les volumes d'échantillons observés sont faibles (1,3 ou 10 ml et ponctuellement 25 ml pour la station 9 les 17 juillet et 21 août 2019) et ont nécessité pour certains d'entre eux une dilution au préalable. L'Annexe 5 synthétise, par station, le biovolume et le dénombrement cellulaire moyens obtenus pour chaque taxon de cyanobactéries identifié. Les taxons sont listés par ordre décroissant de biovolume moyen. L'analyse de cette Annexe 5 amène aux synthèses suivantes :

#### **Marais d'Orx**

Les espèces majoritaires des stations du Marais d'Orx présentent des biovolumes moyens plus élevés que celles des stations situées en aval. Les trois espèces *Planktothrix agardhii*, *Dolichospermum compactum* et *Microcystis aeruginosa* ont des valeurs considérablement supérieures au seuil d'alerte proposé par l'Anses dans son expertise collective de 1 mm<sup>3</sup>/L en cyanobactéries potentiellement toxiques (Anses 2020).

- **Station 18** : trois taxons potentiellement toxiques sont observés. *Planktothrix agardhii* domine avec un biovolume moyen bien supérieur au seuil d'alerte proposé par l'Anses et présente la valeur la plus élevée parmi tous les taxons recensés (61 mm<sup>3</sup>/L). *Aphanizomenon sp* et *Cuspidothrix issatschenkoi* ont un biovolume moyen inférieur au seuil d'alerte de l'Anses ;
- **Station 17** : dix-neuf taxons observés dont dix potentiellement toxiques. Trois de ces derniers ont un biovolume moyen bien supérieur au seuil d'alerte proposé par l'Anses. Les deux taxons majoritaires sont toxigènes : *Dolichospermum compactum* domine (19,55 mm<sup>3</sup>/L), suivi de *Planktothrix agardhii* (15,39 mm<sup>3</sup>/L). *Cuspidothrix issatschenkoi* montre un résultat inférieur à ce seuil d'alerte.

- **Station 2** : quatorze taxons observés dont dix potentiellement toxiques. Dans ces derniers, six ont un biovolume moyen bien supérieur au seuil d’alerte proposé par l’Anses. Les trois taxons majoritaires sont toxigènes. *Dolichospermum compactum* domine (47,05 mm<sup>3</sup>/L), suivi de *Planktothrix agardhii* (17,09 mm<sup>3</sup>/L) et de *Pseudanabaena mucicola* (14,03 mm<sup>3</sup>/L). Ils présentent chacun un biovolume moyen supérieur au seuil. *Microcystis aeruginosa*, bien que non dominant, montre un résultat supérieur au seuil de l’Anses (5,86 mm<sup>3</sup>/L) et enfin *Cuspidothrix issatschenkoi* un résultat inférieur.

### **Boudigau**

- **Station 6** : la station 6 du Boudigau recense le plus grand nombre de taxons dénombrés soit vingt-huit dont dix-neuf potentiellement toxiques. Cela peut s’expliquer par le nombre de campagnes plus élevées sur ce site puisqu’il a été suivi en 2019 et en 2020 (
- Tableau 3) et par le fait également, qu’il y ait un apport potentiel de cyanobactéries supplémentaires, provenant des deux plans d’eau situés en amont et au sud (Etang du Truc et Etang de Garros), par le cours d’eau de l’Anguillère. Les deux taxons majoritaires sont toxigènes et présentent un biovolume moyen supérieur au seuil proposé par l’Anses : *Planktothrix agardhii* domine (7,94 mm<sup>3</sup>/L) suivi de *Dolichospermum compactum* (2,03 mm<sup>3</sup>/L). Les dix-sept autres taxons présentent un résultat inférieur au seuil de l’Anses.
- **Station 9** : dix-sept taxons observés dont onze potentiellement toxiques. Deux de ces derniers taxons sont majoritaires et ont un biovolume moyen supérieur au seuil proposé par l’Anses. Il s’agit de *Dolichospermum compactum* qui domine (4,22 mm<sup>3</sup>/L), suivi de *Planktothrix agardhii* (3,94 mm<sup>3</sup>/L). *Cuspidothrix issatschenkoi* et *Aphanizomenon sp* ont un résultat inférieur au seuil de l’Anses.

### **Hossegor (prélèvement exceptionnel du 21 août 2019)**

- **Lac** : un seul taxon potentiellement toxique est observé pour l’unique campagne effectuée sur ce site. Il s’agit de *Planktothrix agardhii* qui présente un biovolume inférieur au seuil d’alerte mais indique, par sa présence, la possibilité de retrouver des cyanobactéries potentiellement productrices de toxines dans ce lac marin situé à l’aval du Boudigau.

Au sein des taxons toxigènes les plus abondants sur le site d’étude, *Planktothrix agardhii* est une espèce cyanobactérienne qui appartient à l’ordre des Oscillatoriales filamenteuses. Cette espèce est identifiée comme potentiellement productrice de microcystines. *Dolichospermum compactum* appartient à l’ordre des Nostocales filamenteuses et est productrice potentielle de trois familles de cyanotoxines : cylindrospermopsines, anatoxines et saxitoxines. *Pseudanabaena mucicola* est une espèce filamenteuse de l’ordre des Synechococcales sécrétrice potentielle de microcystines et d’anatoxines. Enfin, *Microcystis aeruginosa* est une espèce coloniale de l’ordre des Chroococcales pouvant produire des microcystines.

### 3.2.3 Évaluation des alertes

Les chroniques des biovolumes de cyanobactéries de 2019 (Figure 4) peuvent être étudiées au travers du seuil du protocole d’alerte de l’Anses d’1 mm<sup>3</sup>/L en cyanobactéries toxigènes (Anses 2020, p. 40). Pour rappel :

- Le comptage microscopique pour la station 18 du Marais d’Orx du 13 août 2019 n’a pas été réalisé (casse du flacon pendant le transport) ;
- La station 2 du Marais d’Orx correspond au canal de pompage ;
- La station 17 du Marais d’Orx n’a pas été suivie pendant les phases de pompage ;
- Quatre dates ont été échantillonnées en période de pompage en 2019 : 13 août, 21 août, 08 octobre et 23 octobre ;
- Un prélèvement exceptionnel a été réalisé sur le lac d’Hossegor le 21 août 2019 ;
- Le suivi des stations aval du Marais d’Orx a été réalisé pendant les phases de pompage (à l’exception du 17 juillet correspondant à la date de démarrage du suivi 2019).

#### Marais d’Orx

Pour la majorité des stations du Marais d’Orx les biovolumes totaux sont composés principalement par des cyanobactéries potentiellement toxiques avec des valeurs très élevées et bien supérieures au seuil d’alerte proposé par l’Anses. Par ailleurs, les échantillons de la station 18 sont essentiellement composés par le taxon *Planktothrix agardhii*. La station 17 est dominée principalement par *Dolichospermum compactum* et plus sporadiquement par *Planktothrix agardhii*. A partir du 10 août 2019, on note un déclin total des cyanobactéries sur la station 17 (Figure 4). Concernant la station 2, deux taxons se succèdent : *Dolichospermum compactum* du 17 juillet au 21 août 2019 (à cette date on observe un pic et la progression notable de *Pseudanabaena mucicola*) puis *Planktothrix agardhii* du 8 août au 23 octobre 2019.

Les gammes de valeurs observées sur l’ensemble des stations du Marais d’Orx sont les suivantes :

- **Biovolume total en cyanobactéries** : moyenne de 45,58 mm<sup>3</sup>/L (0,59 à 92,56) ;
- **Biovolume en cyanobactéries potentiellement toxiques** : moyenne de 44,12 mm<sup>3</sup>/L (0,06 à 90,00).

Ces moyennes illustrent la part très importante du biovolume de cyanobactéries occupée par les taxons toxigènes.

#### Stations en aval du Marais d’Orx

Les stations en aval du Marais d’Orx (Boudigau et Hossegor) ont une charge en cyanobactéries plus faible sur l’ensemble des stations mais en majorité supérieure au seuil proposé par l’Anses avec un pic observé le 8 novembre 2019. Sur l’ensemble des stations, la majorité du biovolume total est issue des cyanobactéries potentiellement toxiques. *Dolichospermum compactum* est le taxon dominant jusqu’à fin août puis *Planktothrix agardhii* prend le relai à partir d’octobre.

Les gammes de valeurs observées sur les stations en aval du Marais d'Orx sont les suivantes :

- **Biovolume total en cyanobactéries** : moyenne de 5,28 mm<sup>3</sup>/L (0,00 à 15,53);
- **Biovolume en cyanobactéries potentiellement toxiques** : moyenne de 5,01mm<sup>3</sup>/L (0,00 à 15,48).

A l'instar des échantillons du Marais d'Orx, ces résultats marquent la part très importante de biovolume de cyanobactéries occupée par des taxons toxigènes au sein des stations du Boudigau. A noter que les gammes de valeurs sont décroissantes le long du cours d'eau (celles de la station 9 sont inférieures à celles de la station 6).

#### **Effet du pompage en 2019 (dates marquées d'un astérisque sur la figure 4)**

- En l'absence de pompages le 17 juillet 2019, le biovolume en cyanobactéries potentiellement toxiques mesuré sur la station 2 du Marais d'Orx est d'environ 55 mm<sup>3</sup>/L alors que pour les stations situées en aval (Boudigau) le résultat est égal à zéro.
- Pour les quatre dates de prélèvements réalisés en période de pompages sur les stations situées en aval du Marais, il est observé un biovolume en cyanobactéries potentiellement toxiques important et bien supérieur au seuil d'alerte. L'évolution des biovolumes sur les stations aval du Boudigau (6 et 9) suit la tendance observée à l'exutoire du Marais sur la station 2. Cependant, la campagne du 21 août 2019 pose question car le pic observé à la station 2 du Marais n'est pas retrouvé sur les stations situées en aval. On observe une divergence similaire avec les données issues de l'AlgaeTorch et des biocapteurs (voir chapitres ultérieurs). En regardant les données en détail, on observe qu'à cette date il y a un écart inhabituel, de cinq heures, entre les heures d'échantillonnage des stations du Marais et celles de l'aval. Le Boudigau est une rivière, présentant un débit significatif quasi continu qui permet aux communautés cyanobactériennes issues du Marais de se déplacer le long du cours d'eau jusqu'à son exutoire en seulement quelques heures. Il est alors probable que cet écart de temps exceptionnel entre les prélèvements n'ait pas permis de suivre la même masse d'eau le long du cours d'eau.
- Le prélèvement exceptionnel réalisé sur le lac d'Hossegor à la date du 21 août correspond au pic observé en cyanobactéries sur les stations 18 et 2 du Marais en phase de pompage. La présence de *Planktothrix agardhii* dans cet échantillon confirme la possibilité de retrouver dans le lac marin des cyanobactéries toxigènes en provenance du Marais d'Orx. Actuellement, très peu d'informations sont disponibles dans la littérature scientifique sur le devenir de cette espèce en milieu saumâtre voire marin : réussit-elle juste à survivre ou bien est-elle capable de continuer sa croissance dans ces conditions de salinité ? Cette question d'intérêt scientifique serait probablement à étudier afin de mieux connaître les risques sanitaires encourus dans une telle situation.

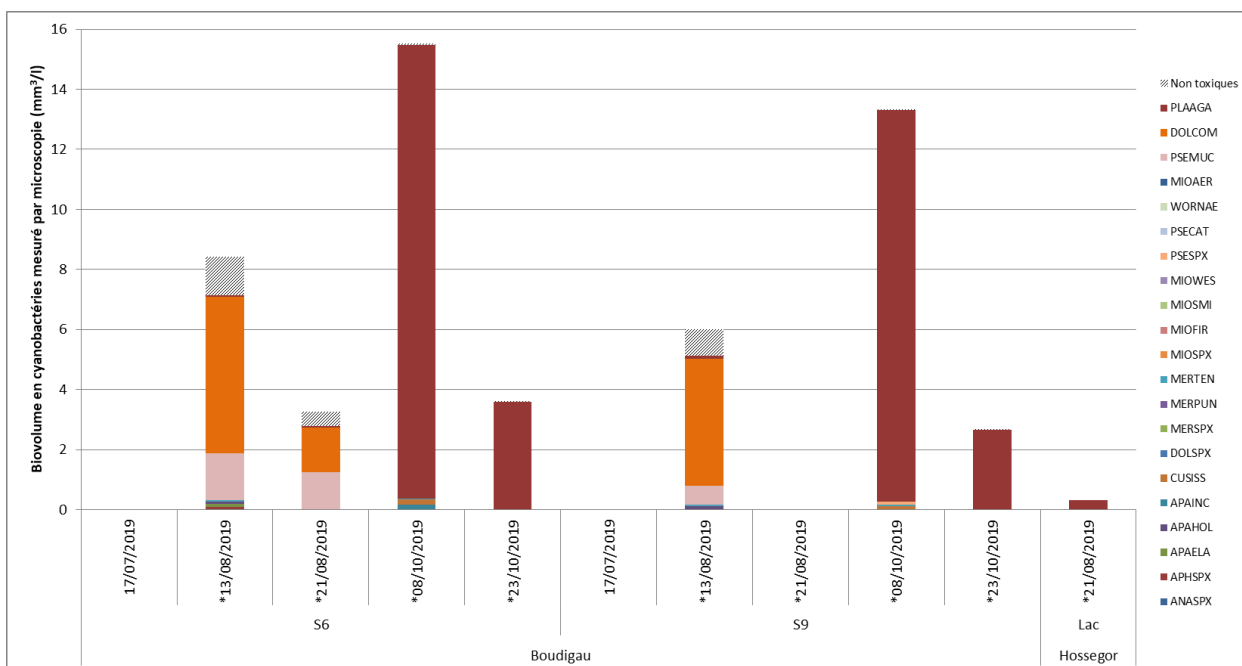
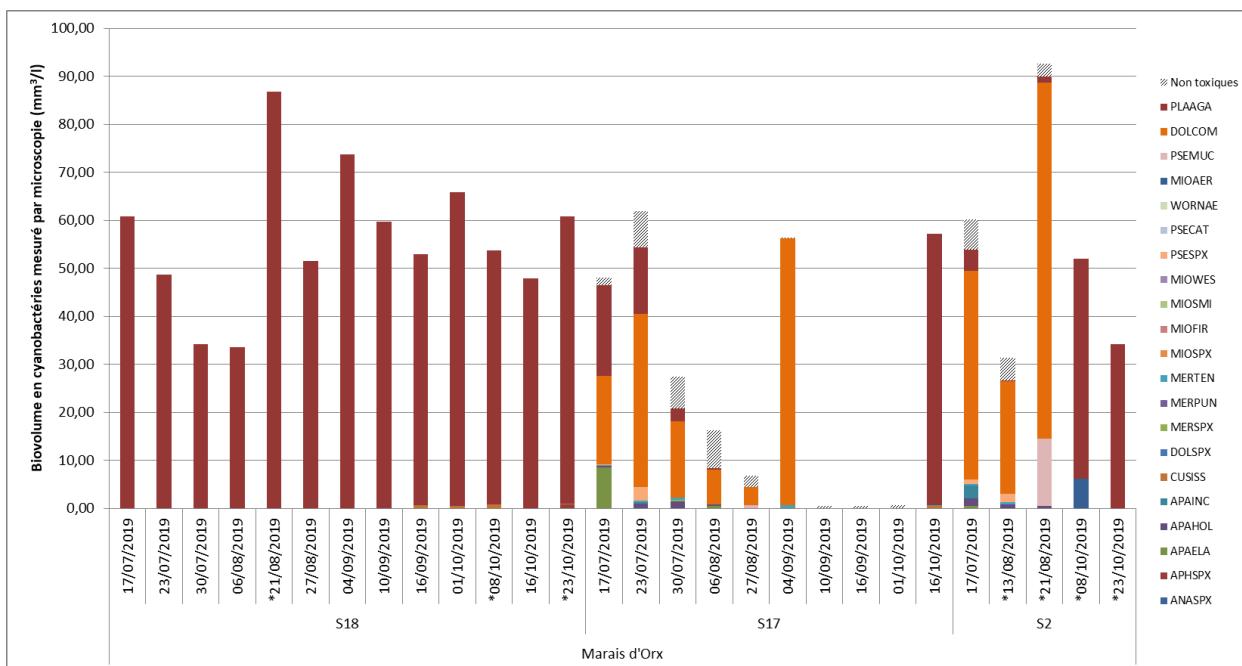


Figure 4 Évolution temporelle du biovolume en cyanobactéries totales en 2019 - Projet CYANOSAFE. Les astérisques indiquent des prélèvements réalisés durant des phases de pompages du Marais d'Orx. (Signification des codes six lettres : ANASPX : *Anabaena* sp, APHSPX : *Aphanizomenon* sp, APAELA : *Aphanocapsa elachista*, APAHOL : *Aphanocapsa holsatica*, APAINC : *Aphanocapsa incerta*, CUSISS : *Cuspidothrix issatschenkoi*, DOLSPX : *Dolichospermum* sp, DOLCOM : *Dolichospermum compactum*, MERSPX : *Merismopedia* sp, MERPUN : *Merismopedia punctata*, MERTEN : *Merismopedia tenuissima*, MIOSPX : *Microcystis* sp, MIOAER : *Microcystis aeruginosa*, MIOFIR : *Microcystis firma*, MIOSMI : *Microcystis smithii*, MIOWES : *Microcystis wesenbergii*, PLAAGA : *Planktothrix agardhii*, PSESPX : *Pseudanabaena* sp, PSECAT : *Pseudanabaena catenata*, PSEMUC : *Pseudanabaena mucicola*, WORNAE : *Woronichinia naegelianae*).

Les chroniques des biovolumes de cyanobactéries de 2020 (Figure 5) peuvent également être étudiées au travers du seuil du protocole d'alerte de l'Anses d'1 mm<sup>3</sup>/L en cyanobactéries toxigènes (Anses 2020, p. 40). Pour rappel, seule la station 6 du Boudigau a été suivie en 2020 et uniquement pendant les phases de pompage en dehors de la première campagne.

### Effet du pompage en 2020 (dates marquées d'un astérisque sur la figure 5)

Sur la station 6 du Boudigau, les biovolumes en cyanobactéries toxigènes sont, en grande majorité, très élevés et bien supérieurs au seuil proposé par l'Anses. Les biovolumes totaux sont quasi exclusivement composés de cyanobactéries potentiellement toxiques. *Planktothrix agardhii* est le taxon majoritaire sur l'ensemble de la période échantillonnée. On note néanmoins la présence de courte durée et de faibles abondances de *Dolichospermum compactum* du 25 mai au 11 juin 2020 (Figure 5).

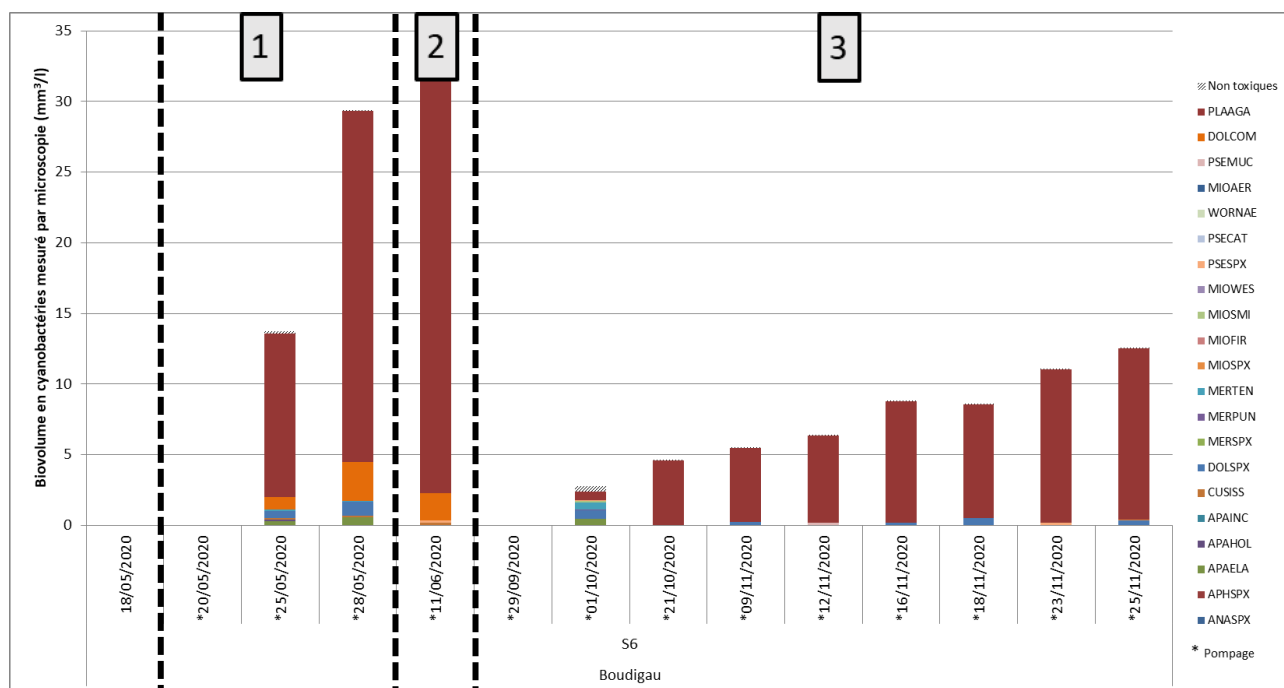


Figure 5 Évolution temporelle du biovolume en cyanobactéries totales sur la station 6 du Boudigau en 2020 - Projet CYANOSAE. Les astérisques indiquent des prélèvements réalisés durant des phases de pompages du Marais d'Orx.

(Signification des codes six lettres : ANASPX : *Anabaena* sp, APHSPX : *Aphanizomenon* sp, APAELA : *Aphanocapsa elachista*, APAHOL : *Aphanocapsa holsatica*, APAINC : *Aphanocapsa incerta*, CUSISS : *Cuspidothrix issatschenkoi*, DOLSPX : *Dolichospermum* sp, DOLCOM : *Dolichospermum compactum*, MERSPX : *Merismopedia* sp, MERPUN : *Merismopedia punctata*, MERTEN : *Merismopedia tenuissima*, MIOSPX : *Microcystis* sp, MIOAER : *Microcystis aeruginosa*, MIOFIR : *Microcystis firma*, MIOSMI : *Microcystis smithii*, MIOWES : *Microcystis wesenbergii*, PLAAGA : *Planktothrix agardhii*, PSESPX : *Pseudanabaena* sp, PSECAT : *Pseudanabaena catenata*, PSEMUC : *Pseudanabaena mucicola*, WORNAE : *Woronichinia naegeliana*).

Au cours des trois phases de pompage, les biovolumes, nuls en absence de pompage, augmentent régulièrement pour atteindre des valeurs très élevées : environ 30 et presque 34 mm<sup>3</sup>/L respectivement lors du premier et du deuxième pompage. Lors du troisième pompage, les biovolumes augmentent moins vite et atteignent une valeur plus basse de 12,5 mm<sup>3</sup>/L.

Les gammes de valeurs observées sur l'ensemble de la station 6 du Boudigau sont les suivantes :

- **Biovolume total en cyanobactéries** : moyenne de 9,79 mm<sup>3</sup>/L (0,02 à 33,74);
- **Biovolume en cyanobactéries potentiellement toxiques** : moyenne de 9,74 mm<sup>3</sup>/L (0,02 à 33,68).

Ces résultats confirment que la mise en route des pompages entraîne bien la présence en quantités souvent très importantes de cyanobactéries toxigènes dans le Boudigau.

Le Tableau 5 synthétise, à partir des données de 2019 et 2020, les niveaux d’alertes obtenus selon les différents arbres décisionnels existants de surveillance et de contrôle sanitaire des eaux de baignades vis-à-vis des cyanobactéries planctoniques. Le premier arbre est réglementaire et repose sur la méthode de référence basée sur les abondances cellulaires obtenues par observation microscopique (Afssa et Afsset, 2006). Le deuxième issu des travaux de l’expertise collective (Anses, 2020) repose sur des observations microscopiques exprimées en biovolume. Le troisième est alternatif et repose sur l’usage d’un instrument de mesure *in situ*, l’AlgaeTorch (Laplace-Treyture, 2017). Leurs seuils d’alertes respectifs sont mentionnés dans le Tableau 5. L’arbre décisionnel actuel est celui de l’Afssa & Afsset mais il sera à l’avenir remplacé par celui de l’Anses à compter du 15 avril 2022 (DGS 2021) avec un seuil d’alerte basé sur un biovolume de cyanobactéries toxigènes plus représentatif du danger. En effet, celui de l’Afssa & Afsset s’avère maintenant moins adapté pour les deux raisons suivantes : le seuil d’alerte est fixé sur une valeur d’abondance cellulaire et sur le dénombrement des cyanobactéries totales (toxiques et non toxiques) ne reflétant pas le risque sanitaire réel. Dans le tableau comparatif, les dosages des toxines n’ont pas été pris en compte dans les déclenchements d’alerte car les analyses n’ont pas été réalisées pour la campagne de 2019. Pour rappel, les seuils d’alertes du protocole CYANALERT ont été établis par équivalence du dénombrement cellulaire (Laplace-Treyture, 2017).

L’Annexe 6 illustre en détail les résultats d’alerte obtenus pour chaque échantillon par l’application de l’arbre décisionnel proposé par l’Anses (les résultats des dosages des toxines sont pris en compte pour les échantillons de la campagne 2020). Les résultats issus du Tableau 5 montrent que les niveaux d’alertes entre les arbres décisionnels diffèrent très légèrement et que le protocole CYANALERT est le plus sévère. Les résultats de ce dernier illustrent également que ce dispositif alternatif, basé sur l’usage de l’AlgaeTorch avec un seuil d’alerte fixé à quatre microgrammes par litre de chlorophylle-a associée aux cyanobactéries, peut être appliqué par le SMRCS sur son territoire. En appliquant l’arbre de l’Anses, on obtient les résultats synthétiques suivants :

### **Marais d’Orx**

- Pour les **stations 18 et 2**, à chaque campagne de mesures la totalité des stations est classée en alerte (S18 n=13, S2 n=5) ;
- Pour la **station 17**, 70 % des campagnes de mesures sont classées en alerte (n=10).

### **Boudigau**

- Pour la **station 6**, 79 % des campagnes de mesures sont classées en alerte (n=19);
- Pour la **station 9** avant l’arrivée au Port de Capbreton, 60 % des campagnes de mesures sont classées en alerte (n=5).

### **Hossegor**

- Pour le **lac d’Hossegor**, l’unique campagne de mesure réalisée n’est pas classée en alerte (n=1).

Tableau 5 Synthèse par station des alertes selon les différents arbres décisionnels - Projet CYANOSAFE

SITE	STATION	Afssa & Afsset, 2006		Anses, 2020		CYANALERT, 2017	
		PAS D'ALERTE	ALERTES	PAS D'ALERTE	ALERTES	PAS D'ALERTE	ALERTES
		cyanos totales <20 000 cel/ml	cyanos totales >20 000 cel/ml	cyanos toxiques <1 mm <sup>3</sup> /l	cyanos toxiques >1 mm <sup>3</sup> /l	chloro-a cyanos <4 µg/l	chloro-a cyanos >4 µg/l
Marais d'Orx	18	0	13	0	13	0	13
	17	0	10	3	7	0	10
	2	0	5	0	5	0	5
Boudigau	6	4	15	4	15	3	16
Port de Capbreton	9	2	3	2	3	2	3
Hossegor	Lac	1	0	1	0	0	1
TOTAL		7	46	10	43	5	48

### 3.3 Biocapteurs

Pour rappel, le projet CYANOSAFE visait également à finaliser le développement et à tester la mise en œuvre des biocapteurs génétiques pour la surveillance des cyanobactéries planctoniques sur un cours d'eau. Le Boudigau présentant des occurrences et des biovolumes de *Planktothrix* élevés ainsi que la présence parfois importante des genres *Dolichospermum*, *Aphanizomenon* et *Anabaena*, il s'avérait être un lieu adapté à la finalisation des biocapteurs correspondants.

#### 3.3.1 Principe

La technologie développée par ME repose sur l'utilisation de codes-barres génétiques ciblant spécifiquement un genre de cyanobactéries potentiellement toxique. Le biocapteur vise à quantifier l'activité cellulaire de chaque organisme cible grâce à la détection de l'ARN ribosomique, matériel génétique actif de la cellule. Sous la forme d'analyse colorimétrique (Figure 6), la technologie doit permettre une reconnaissance rapide des cyanobactéries cibles. Dans le projet CYANOSAFE trois biocapteurs ont été mis en œuvre. Ils ciblent les genres ou groupe de genres suivants :

- *Microcystis* ;
- *Planktothrix* ;
- et *Anabaena* / *Dolichospermum* / *Aphanizomenon* qui ne peuvent pas être individualisés avec les sondes génétiques retenues.

Au cours de cette phase de développement de l'outil, seule les phases de prélèvement et de filtration étaient réalisées sur le terrain par le SMRCS, le reste du process d'analyse était réalisé par ME en laboratoire afin d'en contrôler toutes les étapes et de pouvoir l'améliorer au fur et à mesure.

Ainsi, ME a envoyé un rapport des résultats sous format « PDF » le jour de réception de chaque série d'échantillons si reçus avant 13h00. Ce rapport a retranscrit les valeurs d'absorbance à 450 nm des trois biocapteurs et l'intensité de l'activité cellulaire associée. La tendance des évolutions des populations de cyanobactéries ciblées était incrémentée au fur et à mesure des échantillonnages (Annexe 7).



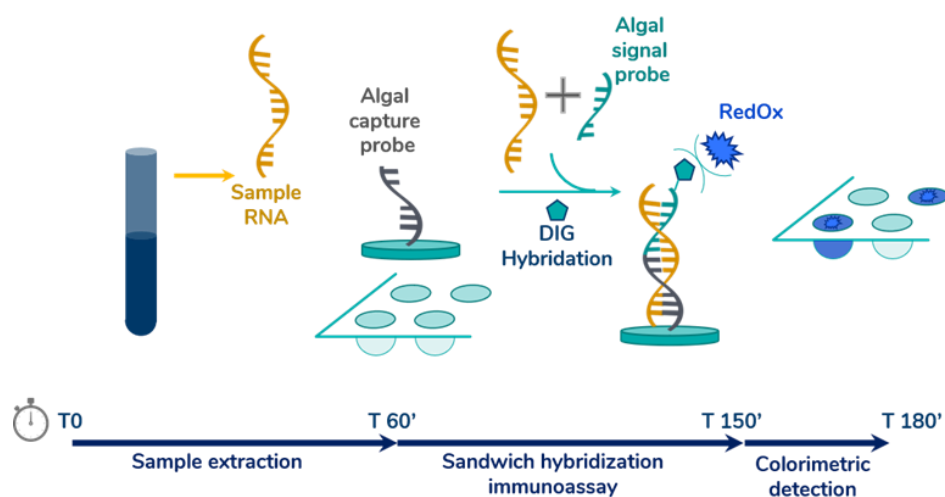


Figure 6 Schéma du principe de mesure des biocapteurs génétiques

### 3.3.2 Retour sur l'opérationnalité de l'outil

La réalisation des filtration *in situ* et des envois à ME par le SMRCS a permis de mettre au jour quelques difficultés, freins opérationnels à la mise en œuvre de ces outils biocapteurs.

Tout d'abord la phase de prélèvement de l'échantillon n'a posé aucune difficulté.

La deuxième phase de préparation de l'échantillon par filtration a engendré par contre, les quelques difficultés, remarques suivantes :

La mise en place des filtres sur la pompe SOFiA (Système Opérationnel de Filtration Autonome), fourni par ME, n'a pas présenté de difficulté en soi. Néanmoins si cela devait être utilisé en routine par une collectivité, des adaptations devraient être envisagées. Le système porte filtre devrait être amélioré afin de permettre lors de l'opération d'ouverture et de changement de filtre de pouvoir poser la partie supérieure et ainsi permettre la mise en place du filtre correctement sans avoir à la tenir.

La pompe SOFiA était fournie avec un long tube d'aspiration (d'échantillon) comportant un préfiltre. Pour permettre de verser l'échantillon, ce système n'était pas adapté. Il serait nécessaire, pour faciliter le versement, d'envisager un entonnoir avec un filtre intégré. Au cours des différentes campagnes, le système a dû être bricolé pour le rendre plus facilement manipulable dans cette configuration.

Ensuite, la durée de filtration, dans le contexte du Boudigau, a vraiment été très importante, trop pour une utilisation en routine par un gestionnaire devant prélever sur différents sites dans un temps contraint. Les eaux du Boudigau étaient, certes, assez chargées mais elles n'étaient pas très différentes d'autres cours d'eau français. La question de la puissance d'aspiration s'est alors posée notamment lorsque la comparaison a pu être faite avec un système de filtration manuelle prêtée au SMRCS par INRAE. La puissance de la SOFiA a été jugée comme plutôt insuffisante.

Enfin la troisième phase consistant en l'envoi des échantillons à ME, était dans ce contexte problématique. En effet les transporteurs donnaient une plage horaire de prise en charge des échantillons qui ne correspondait souvent pas bien aux heures de prélèvements. Cette problématique a été réglée par le dépôt en centre postal, mais cela a généré un temps agent dédié à cette phase bien plus long.

Par ailleurs, un nombre important d'échantillons a été réceptionné en retard et même certains échantillons ont été perdus.

En conclusion : la méthodologie qui fait intervenir un transporteur serait à bannir à l'avenir du fait de l'incertitude en termes de réception des échantillons et le traitement plus long des échantillons transmis. Cela nuit à la réactivité escomptée par ce nouvel outil. Il faut noter que cette méthodologie, avec seulement les phases de prélèvement et de filtration réalisées par le gestionnaire, était surtout indispensable pour finaliser le développement des outils biocapteurs. ME envisage pour les usages ultérieurs que l'ensemble du process du prélèvement à l'obtention du résultat d'analyse puisse être réalisé par le gestionnaire lui-même. Cela devrait permettre l'obtention de résultat dans un temps encore plus court concédant une meilleure réactivité au regard du risque sanitaire.

Une adaptation de la pompe SOFiA pour une meilleure adéquation avec ce type de prélèvement en cours d'eau voire en zone de baignade en plan d'eau serait un plus.

### 3.3.3 Taxons cyanobactériens quantifiables par les biocapteurs

Au total, onze taxons de cyanobactéries dénombrés sur les différentes stations du site d'étude sont détectables par les trois biocapteurs (Annexe 5).

Pour le biocapteur ***Anabaena-Dolichospermum-Aphanizomenon (ADA)***, cinq genres ou espèces rencontrés dans les dénombrements microscopiques sont quantifiables :

- *Anabeana sp* ;
- *Aphanizomenon sp* (Photo 1);
- *Cuspidothrix issatschenkoi*;
- *Dolichospermum sp* ;
- *Dolichospermum compactum* (Photo 2).

Ces quatre genres pris en compte par ce biocapteur sont très proches génétiquement, et ont subi de nombreuses reclassifications taxinomiques au cours de ces dernières années. Leur proximité génétique conduit à ce qu'ils ne soient pas individualisés par différents biocapteurs mais plutôt groupés dans un seul.

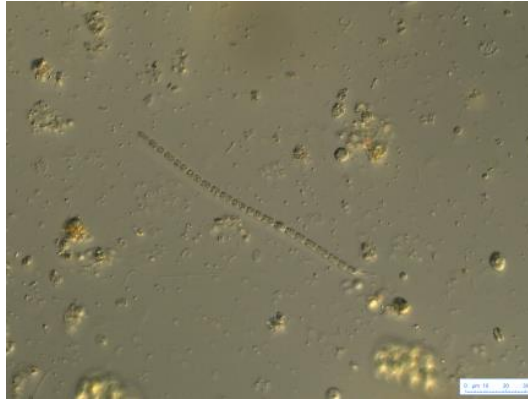


Photo 1 Observation microscopique à x400 du genre *Aphanizomenon* sur la station 6 du Boudigau le 13 septembre 2019

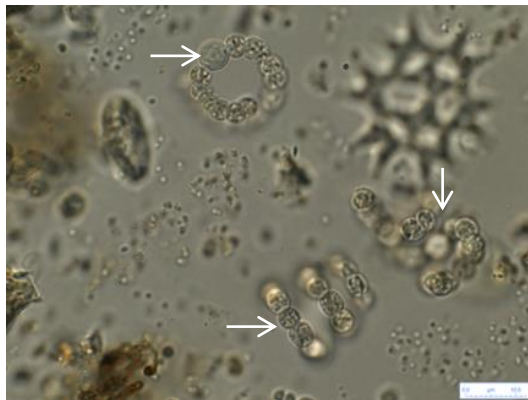


Photo 2 Observation microscopique à x1000 de l'espèce *Dolichospermum compactum* sur la station 2 du Marais d'Orx le 17 juillet 2019

Pour le biocapteur ***Microcystis*** cinq taxons ont été identifiés :

- *Microcystis* sp ;
- *Microcystis aeruginosa* ;
- *Microcystis firma* ;
- *Microcystis smithii* ;
- *Microcystis wesenbergii* (Photo 3).

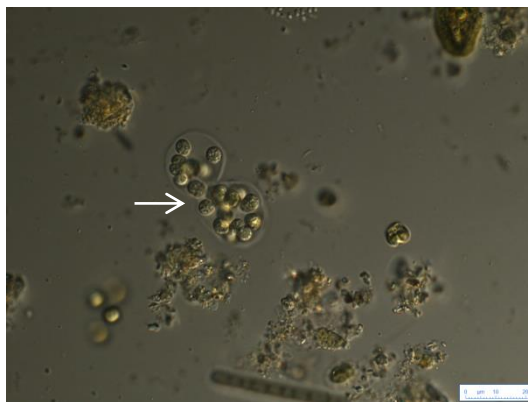


Photo 3 Observation microscopique à x600 de l'espèce *Microcystis wesenbergii* sur la station 6 du Boudigau le 12 novembre 2020

Pour le biocapteur *Planktothrix* une espèce a été identifiée :

- *Planktothrix agardhii* (Photo 4).

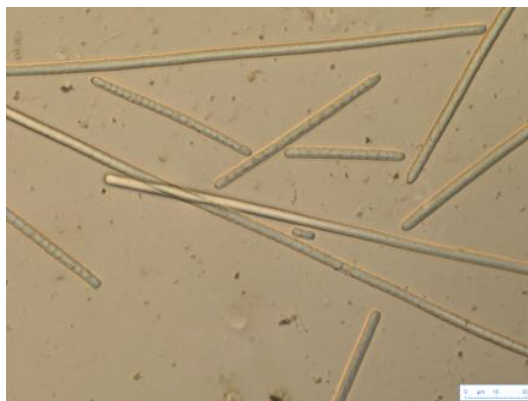


Photo 4 Observation microscopique à x600 de l'espèce *Planktothrix agardhii* sur la station 18 le 27 juin 2019

Le Tableau 6 synthétise l'occurrence des taxons détectables par les biocapteurs au cours de l'ensemble du projet CYANOSAFE. L'espèce *Planktothrix agardhii* est la plus fréquemment rencontrée (85% des échantillons). La présence de *Dolichospermum compactum* est aussi notable (33 % des échantillons) ainsi que celle de *Cuspidothrix issatschenkoi* (26%). Les taxons *Aphanizomenon sp* (8%), *Microcystis firma* (3%) et *Microcystis aeruginosa* (3%) sont peu observés.

### Marais d'Orx

Les sites du Marais d'Orx regroupent cinq taxons détectables par les biocapteurs.

- **Station 18** : Trois taxons dont deux analysables par le biocapteur ADA et un par le biocapteur *Planktothrix* ;
- **Station 17** : Trois taxons dont deux analysables par le biocapteur ADA et un par le biocapteur *Planktothrix* ;
- **Station 2** : Quatre taxons dont deux analysables par le biocapteur ADA, un par le biocapteur *Planktothrix* et un par le biocapteur *Microcystis*.

### Boudigau

- **Station 6** : La station 6 du Boudigau recense la plus grande richesse de taxons mesurables par les biocapteurs soit dix des 11 recensés. Cinq taxons analysables par le biocapteur ADA, un par le biocapteur *Planktothrix* et quatre par le biocapteur *Microcystis*.
- **Station 9** : Quatre taxons mesurables par les biocapteurs ont été observés dont trois analysables par le biocapteur ADA et un par le biocapteur *Planktothrix*.

### Hossegor

- Une espèce détectable par le biocapteur *Planktothrix*.

Tableau 6 Occurrence des taxons détectables par les biocapteurs sur les différents sites et stations de l'étude en 2019 et 2020 - Projet CYANOSAFE

		SITE et STATIONS						TOTAL
		Marais d'Orx			Boudigau		Hossegor	
GENRE	ESPECE	18	17	2	6	9	Lac	
<i>Anabaena</i>	<i>sp</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Aphanizomenon</i>	<i>sp</i>	1	0	0	3	1	0	5
<i>Cuspidothrix</i>	<i>issatschenkoi</i>	6	1	1	15	1	0	24
<i>Dolichospermum</i>	<i>sp</i>	0	0	0	10	0	0	10
	<i>compactum</i>	0	7	3	6	1	0	17
<b>Synthèse du nombre de taxons :</b> Biocapteur <i>Anabaena-Dolichospermum</i> <i>Aphanizomenon</i>		<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
<i>Microcystis</i>	<i>sp</i>	0	0	0	2	0	0	2
	<i>aeruginosa</i>	0	0	1	0	0	0	1
	<i>firma</i>	0	0	0	3	0	0	3
	<i>smithii</i>	0	0	0	1	0	0	1
	<i>wesenbergii</i>	0	0	0	1	0	0	1
<b>Synthèse du nombre de taxons :</b> Biocapteur <i>Microcystis</i>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
<i>Planktothrix</i>	<i>agardhii</i>	14	6	5	18	4	1	48
<b>Synthèse du nombre de taxons :</b> Biocapteur <i>Planktothrix</i>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

### 3.3.4 Analyses des données de 2019

Les analyses par biocapteur fournissent des résultats de quantités d'ARN exprimés sous la forme d'absorbances mesurées à 450 nm. Ces dernières sont normalisées à l'aide d'une courbe d'étalonnage élaborée à partir de standards analytiques et associées à une concentration équivalente en ARN synthétique en picoMolaire (pM). Ces quantités d'ARN mesurées sont une illustration de l'activité cellulaire des cyanobactéries. Une cellule morte (mais encore intacte) ne contiendra pas d'ARN quantifiable. La Figure 7 illustre l'évolution temporelle de l'activité cyanobactérienne exprimée en équivalent d'ARN synthétique (pM) mesurée pour les trois biocapteurs en 2019. Le biocapteur *Microcystis* a été mis en œuvre du 13 août au 21 août 2019 uniquement, période durant laquelle aucune activité n'a été mesurée. La limite maximale de quantification des biocapteurs est atteinte à 60 pM correspondant à la saturation du signal d'activité lorsque les échantillons sont très denses et riches en ARN. Les résultats de la Figure 7 mènent au bilan suivant :

#### Marais d'Orx

- ***Planktothrix*** : Activité la plus élevée. Moyenne de 20,90 pM (0,03 à 182,23 pM). Saturation du signal observée pour certaines dates sur les stations 18 et 2 (10 septembre, 8 et 23 novembre) ;
- ***Anabaena - Dolichospermum - Aphanizomenon*** : Activité élevée. Moyenne de 4,06 pM (0,00 à 17,33) ;
- ***Microcystis*** : Activité proche de zéro pour les dates où ce biocapteur a été mis en œuvre.

**Stations en aval du Marais d'Orx**

- ***Planktothrix*** : Activité la plus élevée. Moyenne de 9,59 pM (0,01 à 40,37 pM) ;
- ***Anabaena - Dolichospermum - Aphanizomenon*** : Activité élevée. Moyenne de 2,70 pM (0,00 à 8,90) ;
- ***Microcystis*** : Activité proche de zéro pour les dates où ce biocapteur a été mis en œuvre.

Sur les stations du Marais d'Orx, le suivi des cyanobactéries par la technologie en biocapteur s'avère au final peu adaptée. Tout d'abord, les échantillons sont en majorité trop concentrés en ARN, en particulier pour le biocapteur *Planktothrix*, engendrant une saturation du signal d'activité (Figure 7). Les signaux des biocapteurs sont également fortement perturbés par la charge importante en matières en suspension et en matières organiques présentes (turbidité >50 FTU). Les stations (6 et 9) du Boudigau en aval du Marais présentent des concentrations plus adaptées à la gamme de mesure des biocapteurs avec des turbidités moindres.

Initialement, les campagnes d'échantillonnage étaient planifiées sur une seule année de suivi. Cependant, le nombre d'échantillons prévus n'a pas pu être respecté (40 échantillons sur les 54 nécessaires) car la pluviométrie a été faible en 2019 et donc peu de pompage sur le Marais d'Orx ont été effectués. La comparaison des activités mesurées par les biocapteurs avec les observations microscopiques (méthode de référence) n'aurait pas été suffisamment robuste en reposant seulement sur les données de 2019. Des campagnes supplémentaires ont alors été mises en place en 2020 pour atteindre le nombre d'échantillons requis (54). Le suivi complémentaire de 2020 s'est porté sur la station 6 du Boudigau. Cette dernière avait été jugée comme la plus pertinente pour le déploiement du biocapteur selon les données de 2019 (facilité d'accès, directement en aval du marais d'Orx, concentration modérée en ARN, etc.).

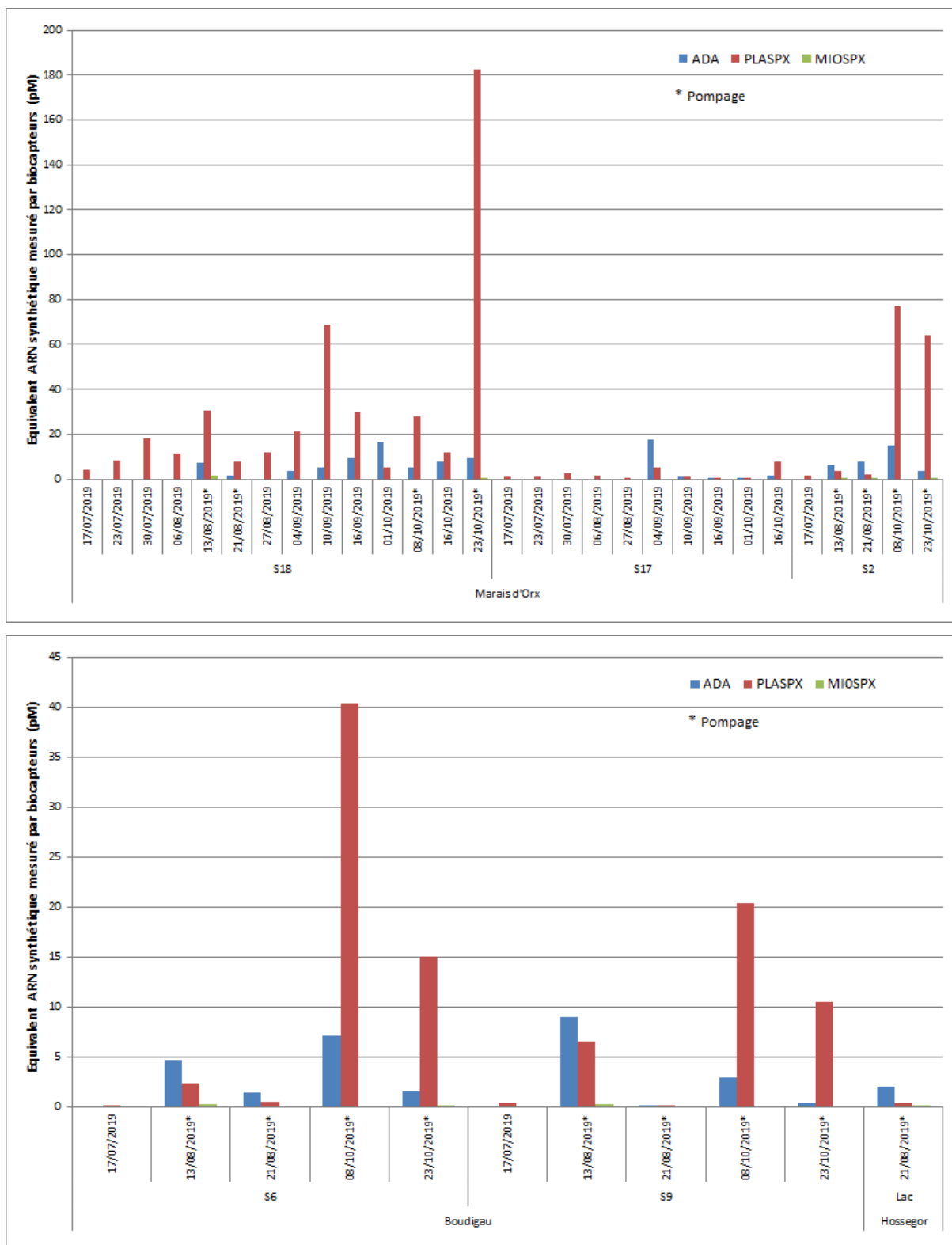


Figure 7 Évolution temporelle de l'activité cyanobactérienne mesurée par les biocapteurs en 2019 - Projet CYANOSAFE. Les astérisques indiquent des prélèvements réalisés durant des phases de pompage du Marais d'Orx. ADA pour le biocapteur -Anabaena - Dolichospermum— Aphanizomenon ; PLASPX pour le biocapteur Planktothrix ; MIOSPX pour le biocapteur Microcystis

### 3.3.5 Comparaison des biocapteurs avec les observations microscopiques

L'évaluation de la technologie des biocapteurs a été faite en comparant les résultats de chaque biocapteur avec les biovolumes obtenus par les observations microscopiques (paramètre de mesure de l'arbre décisionnel proposé par l'Anses) des taxons potentiellement détectables par l'outil (partie 3.3.3). Cette évaluation a été réalisée en deux temps, tout d'abord en comparant l'évolution temporelle des deux paramètres précédemment cités, puis en observant les résultats des tests de corrélations entre les deux. Pour le biocapteur *Microcystis*, la corrélation n'a pas été faite puisque les biomasses observées ont été trop faibles pour que le résultat soit pertinent. A noter qu'il y a des spécificités différentes aux deux méthodes :

- Le volume d'échantillon analysé est différent (100 à 180 ml pour le biocapteur contre 1 ou 10 ml pour la méthode microscopique) ;
- L'observation microscopique quantifie les espèces vivantes et mortes (mais avec un contenu cellulaire) alors que les biocapteurs déterminent l'activité ribosomique des espèces vivantes uniquement.

#### 3.3.5.1 Comparaison des évolutions temporelles

La Figure 8 présente l'évolution temporelle des résultats des biocapteurs et de comptages microscopiques en 2020 (l'illustration équivalente sur 2019 n'est pas commentée ici mais est donnée en Annexe 8). Ces résultats conduisent aux conclusions suivantes :

- ***Planktothrix*** : Biocapteur présentant la plus forte activité sur l'ensemble de l'année avec deux périodes de très forte activité en mai-juin et novembre. Quatre résultats (sur un total de 14) sont supérieurs à la valeur maximale de quantification du biocapteur établie à 60pM (25 mai, 28 mai, 11 juin et 25 novembre 2020). La moyenne est de 20,91 pM avec des valeurs variant de 0,00 à 60,00. On observe une certaine cohérence entre les résultats du biocapteur et les observations microscopiques (Figure 8). Les résultats de biovolumes sont majoritairement supérieurs au seuil proposé par l'Anses de 1 mm<sup>3</sup>/L en cyanobactéries potentiellement toxiques. Cependant, au-delà d'un biovolume de 11 mm<sup>3</sup>/L, la méthode biocapteur ne permet pas une quantification précise de l'activité du genre *Planktothrix*, le signal du biocapteur saturant au-delà. Dans ces conditions, une dilution des échantillons serait nécessaire pour permettre la quantification.
- ***Anabaena - Dolichospermum - Aphanizomenon (ADA)*** : L'activité du biocapteur est élevée avec une période de très forte activité en mai-juin. Trois résultats (sur un total de 14) sont supérieurs à la valeur maximale de quantification du biocapteur (25 mai, 28 mai et 11 juin 2020). La moyenne est de 14,67 pM (0,00 à 60,00). On observe également une certaine cohérence entre les résultats du biocapteur et les observations microscopiques. La majorité des résultats de biovolumes est inférieure au seuil de l'Anses. Cependant, au-delà d'un biovolume de 1,5 mm<sup>3</sup>/L, la méthode biocapteur ne permet plus une quantification précise de l'activité des genres *Anabaena*, *Dolichospermum* et *Aphanizomenon* puisque le biocapteur sature. Contrairement au biocapteur *Planktothrix* ce maximum de quantification est très proche du seuil proposé par l'Anses ce qui



pourrait être gênant pour une utilisation en système d'alerte si on tient compte des erreurs et incertitudes de mesure. Une modification du biocapteur permettant de quantifier jusqu'à deux ou trois fois le seuil pourrait améliorer cette situation.

- **Microcystis** : L'activité de ce biocapteur est proche de zéro. Les résultats semblent moins en cohérence avec les observations microscopiques cependant les concentrations mesurées sont très faibles. Les résultats sont majoritairement inférieurs au seuil d' $1 \text{ mm}^3/\text{L}$  et la moyenne est de  $0,54 \text{ pM}$  avec des valeurs variant de  $0,00$  à  $3,16$ . Une faible activité est mesurée par le biocapteur entre le 25 mai 2020 et le 11 juin 2020 alors que le genre *Microcystis* n'est pas retrouvé lors des comptages microscopiques. Cette différence peut s'expliquer par le fait que pour ces deux dates le volume observé au microscope était relativement faible ( $1 \text{ mL}$ ). Il est plus difficile d'observer une espèce lorsqu'elle est rare (très peu d'individus au sein d'un millilitre). A l'inverse sur quatre dates (01 octobre, 21 octobre, 12 novembre et 25 novembre) *Microcystis* a été retrouvé lors des comptages (bien que sur un faible volume d'échantillon) et aucune activité n'a été mesurée par le biocapteur. En dessous d'un biovolume de  $0,12 \text{ mm}^3/\text{L}$ , il semblerait que le biocapteur ne soit pas capable de mesurer (valeurs peut-être en dessous de sa limite de quantification) ou bien les individus dénombrés en microscopie étaient composés de cellules sénescents voire morte non quantifiable par le biocapteur.

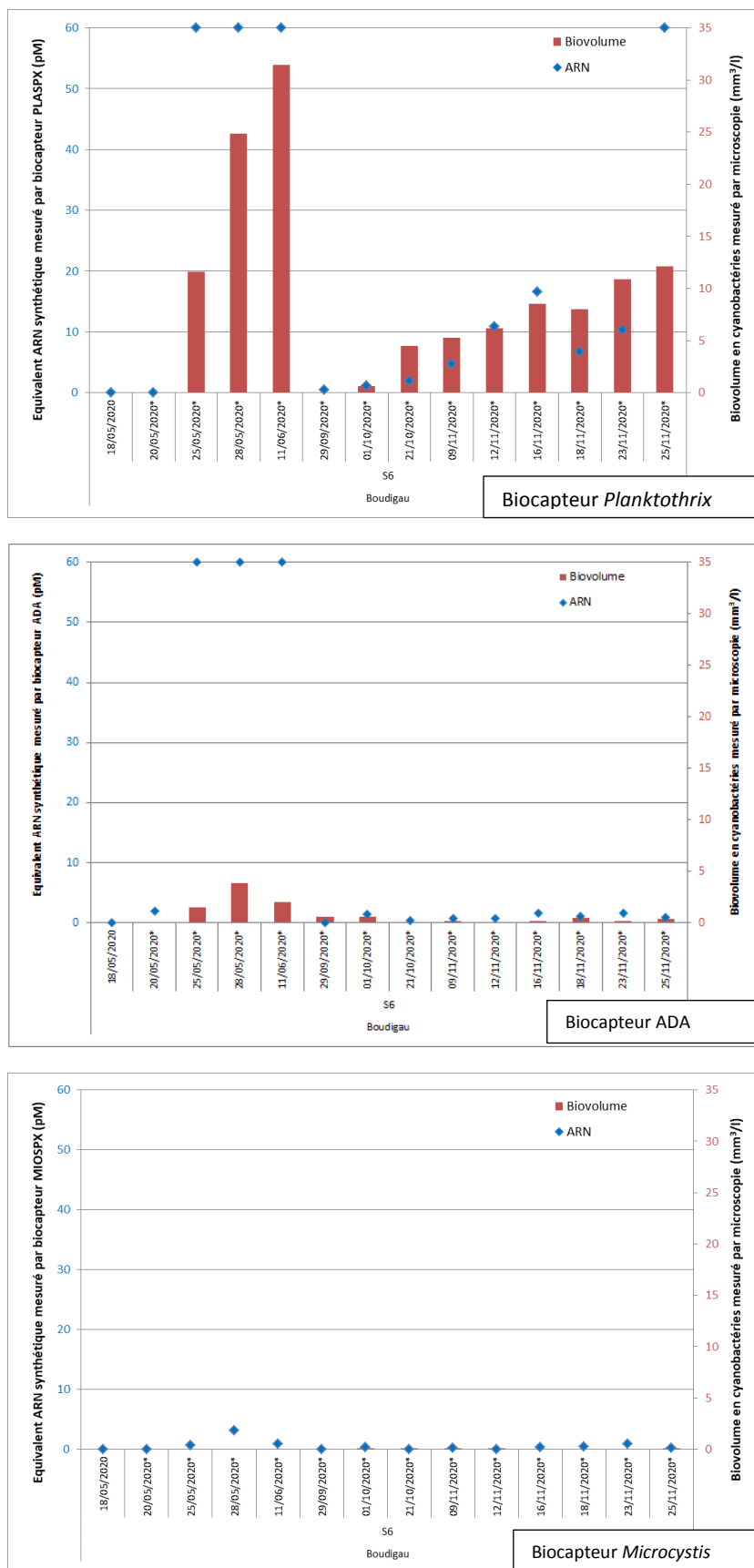


Figure 8 Évolution temporelle des cyanobactéries mesurée par les trois biocapteurs et par les observations microscopiques sur la station 6 du Boudigau en 2020 - Projet CYANOSAFE

### 3.3.5.2 Tests de corrélation

Le tableau 7 synthétise les résultats des corrélations de Spearman permettant d'évaluer la force de la relation linéaire entre les deux paramètres à savoir les activités de cyanobactéries toxigènes mesurées par les biocapteurs et leurs biovolumes calculés à partir des observations microscopiques (années 2019 et 2020). Ce tableau démontre qu'il existe une corrélation statistique valide pour les biocapteurs *Planktothrix* et *Anabaena - Dolichospermum - Aphanizomenon* ( $\rho > 0,5$  et  $p\text{-value} < 0,001$ ) avec la méthode de quantification de référence (NF EN 15204 2006).

Tableau 7 Synthèse des corrélations de Spearman obtenues entre les activités de cyanobactéries toxigènes mesurées par les biocapteurs et leurs biovolumes calculés à partir des observations microscopiques en 2019 et 2020 -  
Projet CYANOSAFE

CORRELATIONS	RHO DE SPEARMAN	P-VALUE
Biocapteur <i>Planktothrix</i> - biovolume de <i>Planktothrix</i>	0,73	$4,51.10^{-10}$
Biocapteur ADA - biovolume des taxons du groupe ADA	0,65	$7,92.10^{-06}$
Biocapteur <i>Microcystis</i> - biovolume de <i>Microcystis</i>	NA	

La Figure 9 caractérise les corrélations de régression linéaire obtenues entre les résultats des deux biocapteurs *Planktothrix* et ADA avec ceux issus de la microscopie exprimés en biovolume. Les corrélations obtenues avec les résultats de la microscopie exprimés en abondance sont montrées en Annexe 9. Les résultats de la Figure 9 mènent aux conclusions suivantes :

- ***Planktothrix***. Il existe une corrélation linéaire positive ( $r^2=0.54$ ) entre les résultats du biocapteur et ceux des biovolumes. Le biocapteur *Planktothrix* est donc valide car ses résultats sont corrélables aux biovolumes malgré une certaine dispersion des points. Il est alors envisageable de dériver une valeur seuil de biocapteur, avec l'équation de la corrélation, à partir de la valeur seuil proposée par l'Anses de  $1 \text{ mm}^3/\text{L}$ . La valeur seuil du biocapteur *Planktothrix* serait alors de 2 pM.
- ***Anabaena - Dolichospermum - Aphanizomenon***. La relation linéaire observée est faible ( $r^2 < 0.25$ ) entre les résultats du biocapteur et ceux des biovolumes correspondants (voir le chapitre 3.3.3. Le graphique illustre deux écarts conséquents. Tout d'abord, sur trois dates on observe des valeurs fortes en biovolumes (cercle rouge) :
  - **Station 2 du Marais d'Orx le 21 août 2019** :  $74,17 \text{ mm}^3/\text{L}$  (confirmée par la mesure de l'AlgaeTorch de  $234,6 \mu\text{g}/\text{L}$ ) ;
  - **Station 2 du Marais d'Orx le 13 août 2019** :  $23,52 \text{ mm}^3/\text{L}$  ( $240,06 \mu\text{g}/\text{L}$  mesurés avec l'AlgaeTorch) ;
  - **Station 17 du Marais d'Orx le 04 septembre 2020** :  $55,52 \text{ mm}^3/\text{L}$  ( $156,2 \mu\text{g}/\text{L}$  mesurés avec l'AlgaeTorch) alors que les valeurs de biocapteurs sont nettement plus faibles.

Pour ces trois dates, *Dolichospermum compactum* est le taxon dominant, contribuant à ces fortes valeurs. En comparant avec le même graphique mais basé sur l'abondance (Annexe 9) on observe que l'écart est estompé. Il est probable alors que le biovolume unitaire de  $65,2 \mu\text{m}$  attribué à *Dolichospermum compactum*

à partir de la littérature soit un peu trop élevé conduisant à une légère surestimation par la méthode microscopique (Komárek 2013). Ceci étant cela n'explique pas l'intégralité de l'écart observé entre biocapteur et microscopie. D'autres causes sont alors à rechercher comme par exemple le fait que les multiples sondes génétiques utilisées pour cibler le plus largement possible ADA diluent peut-être les signaux lorsqu'il n'y a qu'un genre majoritaire.

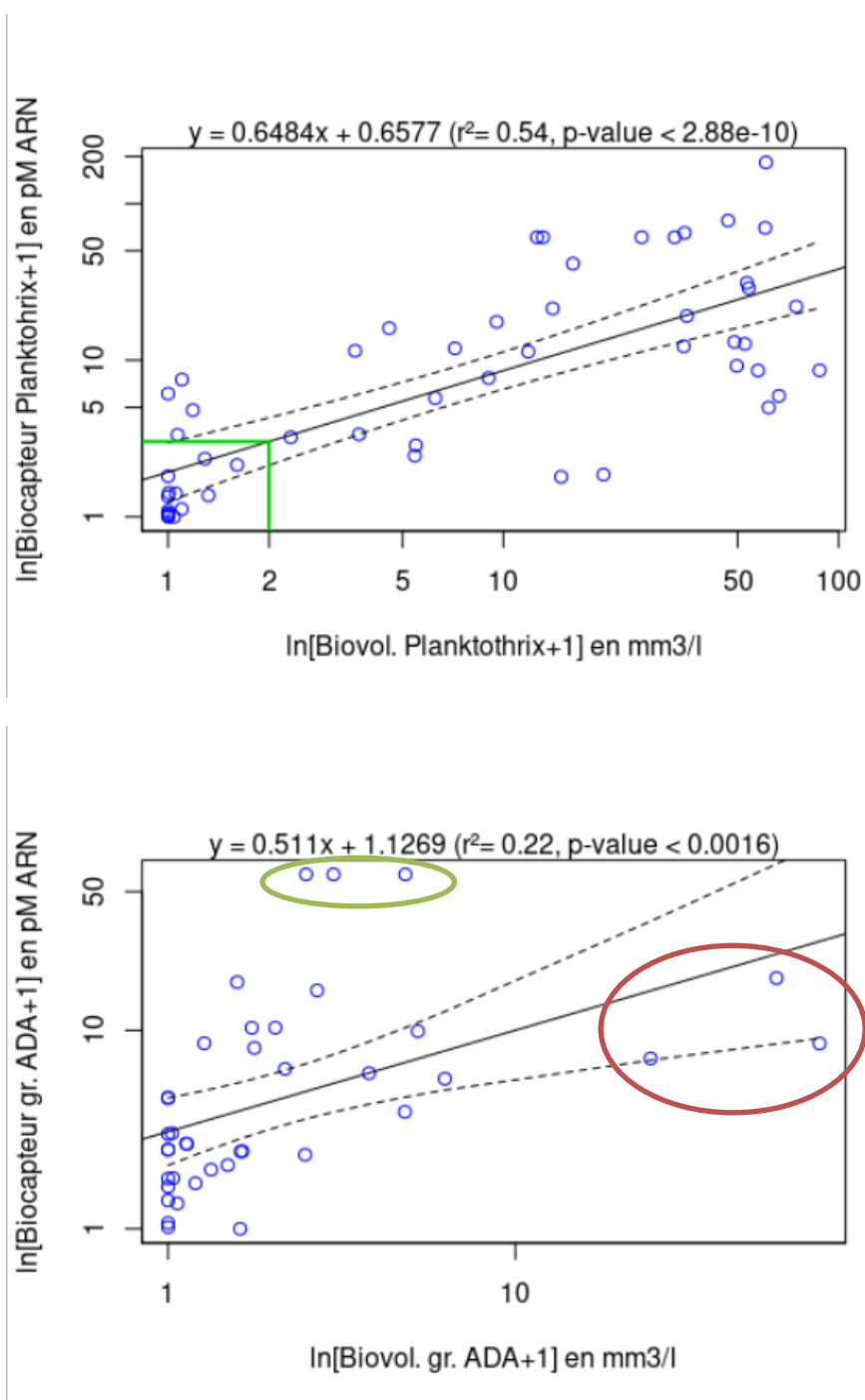


Figure 9 Corrélation entre les activités des biocapteurs Planktothrix et ADA avec les biovolumes de cyanobactéries toxigènes correspondantes calculés à partir des observations microscopiques en 2019 et 2020 ( $p\text{-value} < 0,001$ ) - Projet CYANOSAFE. Le trait vert matérialise la valeur en biocapteur Planktothrix équivalente au biovolume de 1 mm<sup>3</sup>/L. Les ellipses indiquent des données particulières commentées dans le texte

Ensuite, on observe sur trois autres échantillons des valeurs fortes en activité biocapteur (cercle vert de la Figure 9). En comparant avec le graphique de l'abondance (Annexe 9) on obtient le même constat. Il est alors probable que ce biocapteur ne soit pas seulement spécifique aux trois genres *Anabaena*, *Dolichospermum* et *Aphanizomenon*. En effet, il détecte ces trois genres de cyanobactéries avec des morphologies et biovolumes significativement différents mais une structure génétique très voisine. Il est possible que d'autres taxons soient détectés par ce biocapteur comme c'est le cas pour *Cuspidothrix issatschenkoi* (car génétiquement proche d'*Aphanizomenon*) qui ne soient pas associés aux genres du biocapteur ADA mais qu'il faudrait prendre en compte à l'avenir. Une base de données pour réaliser une évaluation des signaux standards des différents genres et espèces serait nécessaire pour cela. Des tests supplémentaires de cross-réactions sont à mener sur des cultures de cyanobactéries se rapprochant génétiquement du groupe ADA pour observer s'il y a une activité détectable par ce biocapteur. Une autre solution pourrait être la recherche d'un fragment de gène (barcode) plus spécifique aux genres visés initialement pour limiter les interférences. Mais ME souhaite avoir un outil simple et peu coûteux qui vise l'ensemble du groupe pour ne pas démultiplier les essais colorimétriques.

### 3.4 AlgaeTorch

#### 3.4.1 Principe

L'AlgaeTorch est un fluorimètre de terrain qui se présente sous la forme d'une sonde immergeable. Elle excite les pigments chlorophylliens contenus dans les cellules algales au moyen de rayonnements lumineux (trois longueurs d'onde, 470, 525 et 610 nm) et mesure l'émission de fluorescence (à 680 nm) qui en résulte. La fluorescence mesurée est alors comparée à des spectres enregistrés dans la sonde, nommés fingerprints (profil de fluorescence), puis convertie, par calculs, en équivalent de chlorophylle-a (en microgramme par litre). Elle donne ainsi une estimation *in situ* des quantités de biomasse phytoplanctonique totale et de biomasse attribuée aux cyanobactéries. Pour les cyanobactéries, la sonde utilise le profil de fluorescence d'une culture de *Microcystis aeruginosa* et celui d'une culture de *Chlorella vulgaris* (algue verte) pour la biomasse phytoplanctonique totale.

L'AlgaeTorch est un outil facile d'utilisation qui permet d'obtenir un résultat rapide et moyenné (élaboration d'une moyenne sur une durée donnée) et se révèle plus représentatif de la concentration en cyanobactéries présente que la simple abondance cellulaire car elle se base sur une quantité de biomasse et non pas sur un nombre de cellules. La plage de mesure de l'AlgaeTorch s'étend de 0 à 200 µg/L. Le protocole CYANALERT de surveillance et d'alerte des cyanobactéries basé sur l'usage de l'AlgaeTorch (Laplace-Tretyure et al. 2017) est appliqué en routine par le personnel technique du SMRCS depuis 2019.

#### 3.4.2 Validation de l'AlgaeTorch par les méthodes de laboratoire

La validation des mesures de l'AlgaeTorch est faite à trois niveaux. Tout d'abord, en comparant les évolutions temporelles des données de la sonde avec les biovolumes des cyanobactéries obtenus par observations microscopiques. Ensuite, en effectuant des tests de corrélations pour les deux paramètres

mesurés par l'AlgaeTorch (i) chlorophylle-a totale et (ii) chlorophylle-a associée aux cyanobactéries, avec les données des méthodes de référence de laboratoire (NF T 90117 1999, NF EN 15204 2006).

### 3.4.2.1 Comparaison des évolutions temporelles

La Figure 10 présente l'évolution temporelle des résultats de l'AlgaeTorch de 2019 et 2020 et ceux issus de la microscopie en biovolume. Les résultats de cette figure mènent aux constats suivants :

- Les valeurs d'AlgaeTorch sur les stations du Marais d'Orx sont les plus élevées avec des données supérieures à la gamme de mesure de l'appareil (200µg/L) ;
- Les valeurs moyennes et gammes de variation observées sur l'ensemble des stations pour la chlorophylle-a associée aux cyanobactéries sont :
  - **Marais d'Orx 2019** : 158,20 µg/L (8,9 à 240,0) ;
  - **Stations en aval du Marais d'Orx 2019** : 33,40 µg/L (0,0 à 84,7) ;
  - **Station 6 du Boudigau 2019** : 42,40 µg/L (0,9 à 84,7) ;
  - **Station 6 du Boudigau 2020** : 31,90 µg/L (0,0 à 74,2) ;
- Le résultat obtenu le 21 août 2019 sur le Lac d'Hossegor est peu fiable. En effet, ce modèle d'AlgaeTorch est adapté pour les milieux d'eau douce or le lac d'Hossegor est un milieu marin. Les réponses optiques obtenues par l'appareil sont dépendantes du milieu étudié et dans ce cas ont pu être modifiées par la salinité présente ;
- Les évolutions des mesures de l'AlgaeTorch et de microscopie sont plutôt similaires entre-elles sur les deux années. Cependant, on observe une forte sous-estimation des mesures de l'AlgaeTorch qui ne suivent pas l'augmentation des biovolumes cyanobactériens aux dates suivantes : 28 mai et 11 juin 2020. En comparaison, à ces deux dates, les activités des biocapteurs *Planktothrix* et *Aphanizomenon-Dolichospermum-Anabaena* présentent un pic où les valeurs sont supérieures à la limite maximale de quantification des deux biocapteurs (Figure 8).

Ces quatre genres de cyanobactéries sont filamenteux et s'agrègent lors des blooms sous forme de paquets, leur répartition n'est alors pas homogène dans la colonne d'eau. Cette caractéristique peut expliquer une partie de la différence de quantification qui n'a, de fait, pas reposée sur exactement le même sous-échantillon. De plus, l'AlgaeTorch semble ne pas être en mesure de les quantifier correctement car le signal d'excitation ne touche que les filaments positionnés sur l'extérieur des paquets qui émettent alors de la fluorescence. En effet, contrairement aux cyanobactéries unicellulaires, les espèces filamenteuses donnent des réponses non linéaires lorsqu'elles sont en blooms. Les filaments internes aux paquets n'émettent presque rien ou leur émission est réabsorbée, dispersée au sein des agrégats ce qui produit un signal d'émission sous-évalué (Silva 2014, Bertone et al. 2018). Une sous-estimation de la concentration en chlorophylle-a peut aussi apparaître lorsque la concentration des espèces coloniales est élevée (Chang et al. 2012).

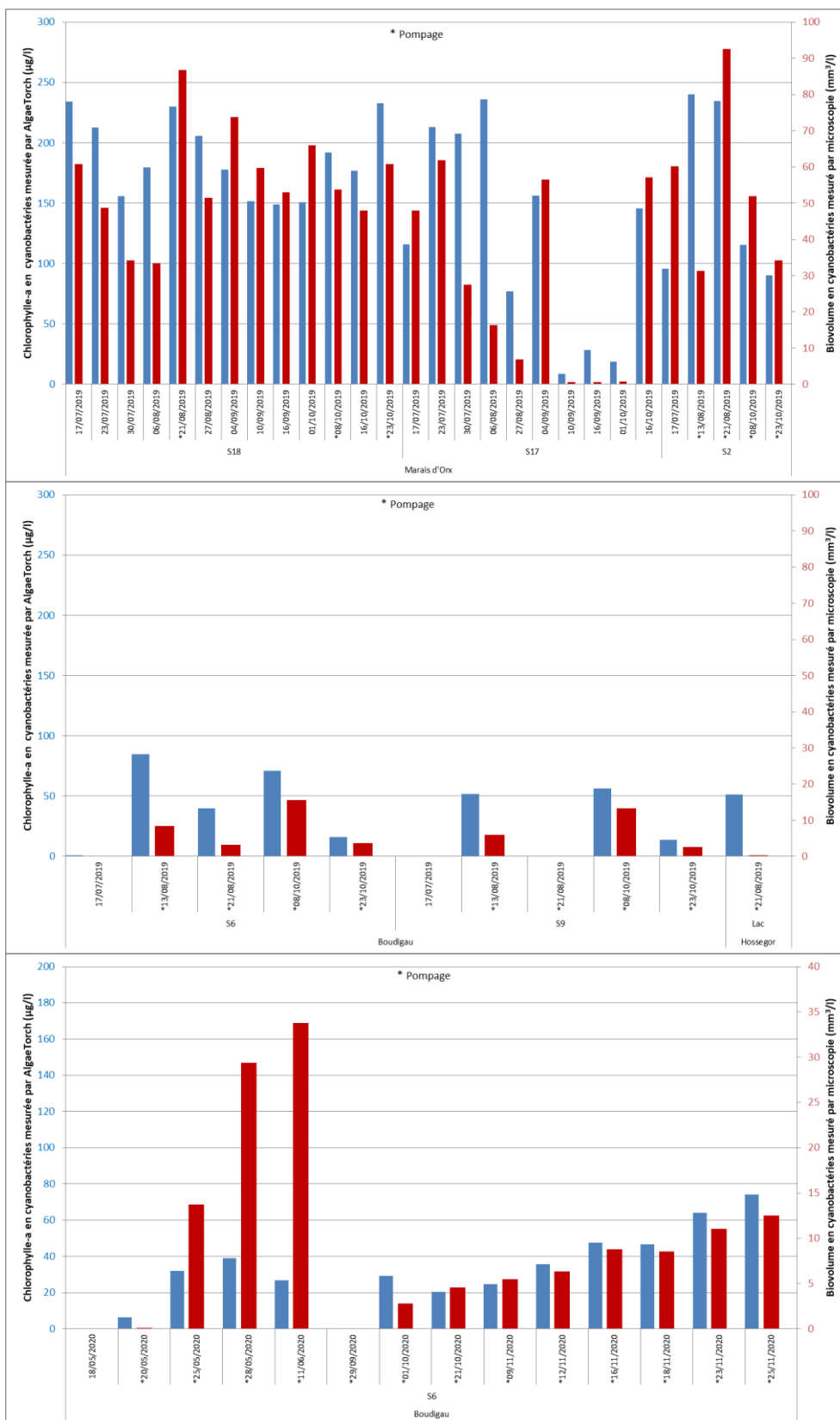


Figure 10 Évolution temporelle des quantités de cyanobactéries mesurées par l'AlgaeTorch et par la microscopie en 2019 et 2020 - Projet CYANOSAFE. En bleu : quantité de cyanobactéries mesurée par l'AlgaeTorch ; en rouge : quantité de cyanobactéries mesurée par microscopie

L'utilisation d'un fluorimètre comme outil de gestion des milieux aquatiques *in situ* établit comme prérequis que les empreintes spectrales de fluorescence déterminées en usine sont valables pour tous les genres et espèces d'un même groupe phytoplanctonique. Dans le cas des cyanobactéries, l'appareil est calibré sur une culture de *Microcystis aeruginosa* (cyanobactérie coloniale). Cependant, il est reconnu que les empreintes spectrales et l'intensité de la fluorescence peuvent varier en fonction des genres (Chang et al. 2012). Elles varient aussi, pour un genre ou une espèce donné, en fonction des conditions environnementales notamment de la densité optique de l'échantillon (matières en suspension et biomasse phytoplanctonique), de sa composition phytoplanctonique (dominance, biovolume, etc.) et de son état physiologique (âge, accès aux nutriments et à la lumière). Toutes les espèces de cyanobactéries ont une gamme spécifique de contenus en chlorophylle-a généralement proportionnelle au volume de leurs cellules. La sonde est calibrée en usine pour fonctionner de 0 à 200 µg/L, cependant les limites inférieure et supérieure de la gamme de mesure peuvent être modifiées et ainsi être différentes de la gamme de mesure annoncée par le fabricant pour par exemple couvrir de 50 µg/L à 400 µg/L et être spécifique au site étudié (Silva, 2014 ; Bertone et al., 2018).

Sur le site du Marais d'Orx et du Boudigau, certaines mesures dépassent la limite supérieure et les genres prédominants sont des cyanobactéries filamenteuses. Pour remédier à ces problèmes, les actions suivantes pourraient être mises en œuvre :

- Recalibrer l'AlgaeTorch pour obtenir une empreinte spectrale représentative des espèces cyanobactériennes dominantes sur le site d'étude (*Planktothrix agardhii* et *Dolichospermum compactum*) afin de mieux couvrir les valeurs hautes et de fiabiliser les mesures de taxons filamenteux (Chang et al., 2012) ;
- Prévoir une sonication des échantillons en amont des mesures pour séparer les filaments ou les colonies et ainsi faciliter l'excitation-émission de tous les individus et améliorer la justesse des mesures.

### 3.4.2.1 Tests de corrélation

Le Tableau 8 synthétise les résultats des corrélations de Spearman permettant d'évaluer la force de la relation linéaire entre l'AlgaeTorch et les méthodes de référence en laboratoire pour les deux paramètres mesurés par l'instrument (chlorophylle-a totale et chlorophylle-a cyanobactérie). Cette corrélation est calculée sur les données 2020. Ce tableau démontre qu'il existe une corrélation statistique valide entre les mesures de chlorophylle-a totale de l'AlgaeTorch ( $\rho > 0,7$  et  $p\text{-value} < 0,01$ ) avec la méthode de laboratoire. Il en est de même pour les mesures de chlorophylle-a venant des cyanobactéries qui sont statistiquement corrélées ( $\rho > 0,8$  et  $p\text{-value} < 0,001$ ) avec les mesures réglementaires de référence (observation microscopique).



Tableau 8 Synthèse des corrélations de Spearman obtenues entre les concentrations en chlorophylle-a mesurées par l'AlgaeTorch et les données obtenues par les méthodes de référence en laboratoire en 2020 - Projet CYANOSAFE

	RHO DE SPEARMAN	P-VALUE
<b>Chlorophylle-a totale :</b> AlgaeTorch - Spectrophotométrie-UV visible (méthode Lorenzen)	0,79	0.0012
<b>Chlorophylle-a cyanobactéries :</b> AlgaeTorch - Observation microscopique (biovolume)	0,83	4,95.10 <sup>-16</sup>

Les résultats de chlorophylle-a totale obtenus en 2020 par l'AlgaeTorch ont été comparés aux mesures obtenues par la méthode normalisée de spectrophotométrie-UV visible par la méthode de Lorenzen (cf. Figure 11). La Figure 11 montre que la chlorophylle-a totale fournie par la sonde est corrélée significativement ( $r^2=0,88$ ,  $p$ -value  $<0.001$ ,  $n=14$ ) à la concentration en chlorophylle-a totale déterminée par spectrophotométrie sur l'ensemble de la gamme de mesure de l'instrument (moyenne : 60,9  $\mu\text{g/L}$  de 7,7 à 220,8).

Néanmoins, les résultats de la sonde sont considérablement supérieurs à la méthode spectrophotométrique (facteur moyen : 2,7), l'AlgaeTorch surestime la concentration en chlorophylle-a contrairement aux conclusions faites dans la littérature (Silva, 2014). La justesse de l'AlgaeTorch du SMRCS a été vérifiée et validée avec deux autres sondes. Les écarts de mesures ne viennent donc pas spécifiquement de cette sonde. L'écart obtenu pourrait provenir de la calibration des sondes (réalisée sur *Microcystis* et non *Planktothrix*) ou bien alors d'un problème analytique de la méthode de laboratoire et/ou de conservations des échantillons avant les analyses (congélation supérieure à un mois couplé à un cycle de décongélation puis recongélation lors du transport). A noter que le jeu de données utilisé est assez faible ( $n<30$ ).

L'acquisition de données supplémentaires après recalibration avec une souche de *Planktothrix* serait nécessaire pour vérifier la justesse des mesures de l'AlgaeTorch.

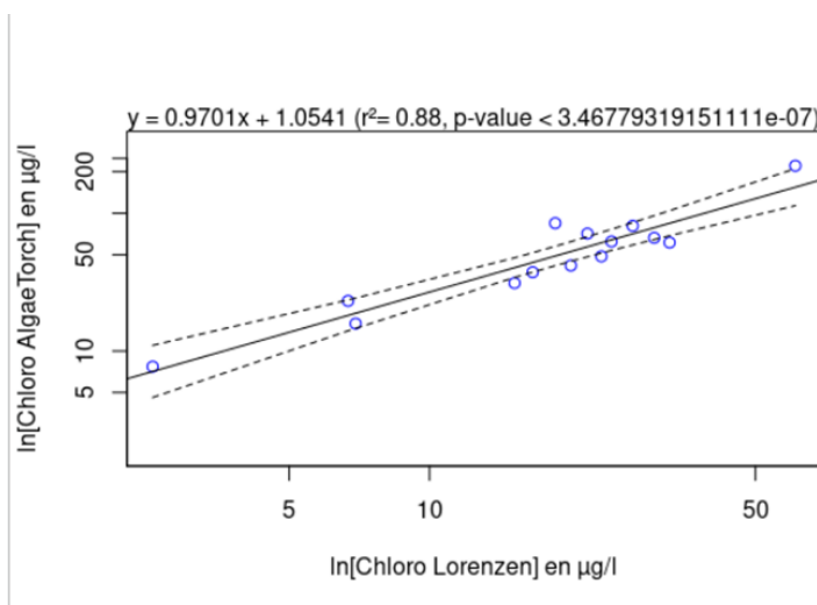


Figure 11 Corrélation entre la chlorophylle-a totale mesurée par l'AlgaeTorch et celle mesurée par spectrophotométrie-UV visible (méthode de Lorenzen) en 2020 ( $p$ -value  $< 0,001$ ) - Projet CYANOSAFE

Les résultats des biovolumes algaux, obtenus sur les données 2019 et 2020, par observations microscopiques au laboratoire, ont été comparés aux estimations de chlorophylle-a attribuées aux cyanobactéries par la sonde (cf. Figure 12). Ces dernières s'avèrent significativement corrélées aux résultats obtenus par la méthode normalisée ( $r^2 > 0,76$ ,  $p$ -value  $< 0,001$ ,  $n=53$ ) sur l'ensemble de la gamme de mesure de l'instrument (moyenne : 101,8  $\mu\text{g/L}$  de 0,0 à 240,0). La sonde AlgaeTorch fournit donc *in situ* des valeurs tout à fait comparables à celles obtenues par la méthode de référence de laboratoire (Anses 2020).

L'emploi de l'AlgaeTorch validé sur le territoire du Boudigau, pourrait être utilisé dans l'avenir comme outil de diagnostic et d'alerte pour le suivi à haute fréquence des cyanobactéries sur le Boudigau. L'équivalence du seuil proposé par l'Anses (1 $\text{mm}^3/\text{L}$  en cyanobactéries toxinogènes) en appliquant l'équation de la droite de régression linéaire obtenue (en vert sur la Figure 12) donne une correspondance pour l'AlgaeTorch de 8,3  $\mu\text{g/L}$  de chlorophylle-a attribuée aux cyanobactéries. A noter que cette valeur est deux fois supérieure à celle obtenue dans le dispositif alternatif CYANALERT (partie 3.2.3) et que les échantillons avec des résultats en dessous de cette valeur sont très dispersés et en dehors des limites du modèle de régression linéaire. Cette correspondance à une valeur supérieure peut tout à fait être attribuée à la différence de fluorescence observable entre une cellule de *Microcystis* (ayant servi à la calibration en usine) et une cellule de *Dolichospermum* ou *Planktothrix*. Ces dernières contiennent plus de phycocyanine, responsable de cette fluorescence, que *Microcystis* (Chang et al., 2012).

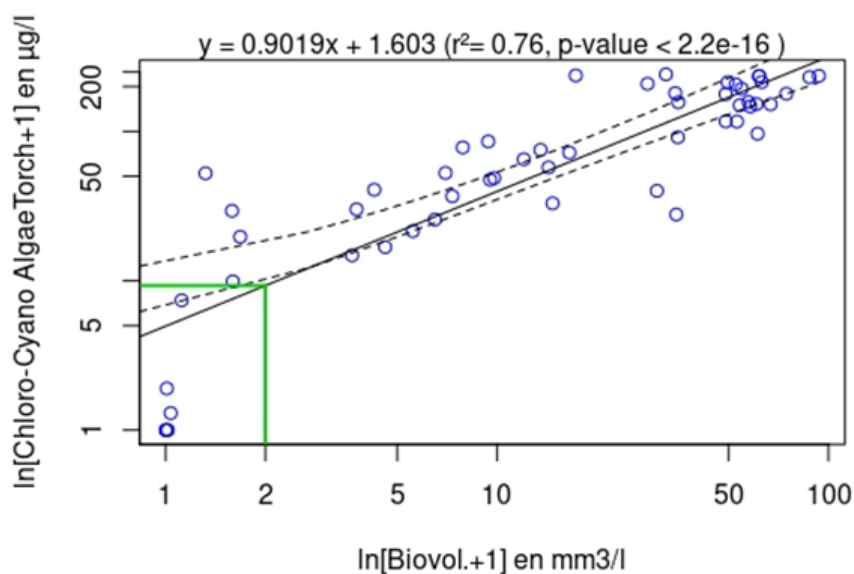


Figure 12 Corrélation entre les mesures de chlorophylle-a attribuées aux cyanobactéries par l'AlgaeTorch et les biovolumes de cyanobactéries calculés à partir des observations microscopiques en 2019 et 2020 ( $p$ -value  $< 0,001$ ) - Projet CYANOSAFE. Le trait vert matérialise l'équivalence entre la valeur de chlorophylle-a-cyanobactéries obtenue par la sonde et le biovolume de 1  $\text{mm}^3/\text{L}$

Suite aux observations décrites précédemment, l'acquisition de données supplémentaires par l'AlgaeTorch serait donc nécessaire pour améliorer le modèle obtenu. En effet, les cyanobactéries ont une gamme spécifique de contenus en chlorophylle-a et de phycocyanine généralement proportionnelle à leur biovolume et à la proportion des différents pigments. Certaines sondes sont, par ailleurs, incapables de détecter la fluorescence en dessous de certains seuils de chlorophylle-a (Bertone et al. 2018).

La gamme de mesure spécifique de l'AlgaeTorch pour le Boudigau devrait être réalisée en effectuant des mesures successives sur un échantillon naturel concentré (efflorescence phytoplanctonique visible à l'œil nu) puis en le diluant graduellement ou en effectuant une nouvelle calibration à partir d'une souche de *Planktothrix* qui est le taxon dominant sur ce site.

## 4 Conclusion et perspectives

### 4.1 Risques liés aux cyanobactéries

Les résultats du projet CYANOSAFE montre qu'il existe un risque sanitaire et environnemental important lié à la présence de cyanobactéries toxigènes sur le cours d'eau du Boudigau et les sites situés en aval (port de Capbreton et lac d'Hossegor) : Il faut en retenir les informations essentielles suivantes :

- Le relargage d'eau du Marais d'Orx (milieu riche en cyanobactéries toxigènes) vers le Boudigau par pompage génère un apport considérable de cyanobactéries dans le cours d'eau ;
- Lors des phases de pompage, le Boudigau a été en majorité classé en alerte selon l'arbre décisionnel de l'Anses (future référence) ;
- La station 6 du Boudigau a abrité la plus grande richesse en cyanobactéries. Vingt-huit espèces ont été observées dont dix-neuf toxiques dont deux majoritaires : *Planktothrix agardhii* et *Dolichospermum compactum* avec un biovolume moyen respectif de 7,94 mm<sup>3</sup>/L et 2,03 mm<sup>3</sup>/L supérieur au seuil d'alerte proposé par l'Anses de 1 mm<sup>3</sup>/L de cyanobactéries toxigènes ;
- Les analyses de laboratoire de 2020 ont mis en évidence la présence de cyanotoxines de type microcystines sur le Boudigau pour trois dates : 11 juin, 18 novembre et 25 novembre 2020 avec une mesure supérieure au seuil réglementaire de 0,3 µg/L le 25 novembre 2020 ;
- Les résultats mettent en évidence que la sonde AlgaeTorch est un outil de diagnostic et d'alerte simple d'usage pour suivre l'évolution à haute fréquence des cyanobactéries sur le Boudigau. Sa rapidité d'emploi est un atout incontestable pour le SMRCS qui a désormais la possibilité de réaliser des mesures peu coûteuses à une fréquence d'analyse supérieure à la réglementation. Pour améliorer la justesse des mesures de l'AlgaeTorch sur ce territoire, une recalibration de l'appareil est conseillée pour obtenir une signature spectrale représentative des espèces cyanobactériennes dominantes, notamment les espèces *Planktothrix agardhii* et *Dolichospermum compactum*. Des mesures supplémentaires sont à effectuer, pour déterminer la gamme de mesure spécifique au Boudigau et définir un seuil d'alerte alternatif (exprimé en chlorophylle-a de cyanobactéries) engendrant des niveaux d'alerte comparables à ceux obtenus par l'arbre décisionnel de l'Anses. Ces mesures complémentaires devront être couplées avec des analyses faites par les méthodes normalisées de laboratoire (spectrophotométrie-UV visible et observations microscopiques) afin de revoir les corrélations.

Une surveillance renforcée des cyanobactéries sur le Boudigau par le SMRCS est donc nécessaire pendant les phases de pompage du Marais d'Orx. Elle pourra reposer sur la mise en place d'un protocole spécifique s'appuyant sur l'usage de l'AlgaeTorch. Elle devra intégrer le dosage des toxines par la méthode ELISA de laboratoire. Une communication et une information est également recommandée pour sensibiliser le public, les élus, les acteurs locaux à la problématique des cyanobactéries sur ce territoire.

## 4.2 Biocapteurs génétiques

L'application des trois biocapteurs sur le territoire du Boudigau et les résultats des comparaisons avec la méthode de référence par observations microscopiques amènent aux conclusions suivantes :

- Le biocapteur du genre *Planktothrix* a pu être validé. Une valeur de 2 pM a pu être définie comme équivalente au seuil de 1 mm<sup>3</sup>/L proposé par l'Anses ;
- Les évolutions temporelles des activités mesurées par les trois biocapteurs ont été cohérentes avec celles observées avec les biovolumes. Néanmoins, le signal des biocapteurs est perturbé lorsque la charge en matière en suspension et en matière organique est élevée (>50 FTU);
- Il serait nécessaire de définir une gamme de mesure de chaque biocapteur intégrant le seuil d'alerte proposé par l'Anses pour être comparable avec la surveillance réglementaire. Sur le Boudigau la valeur maximale de mesures d'activités correspond à un biovolume de 11 mm<sup>3</sup>/L pour le biocapteur *Planktothrix*. Ce qui englobe bien la valeur seuil de l'Anses. Par contre pour le biocapteur *Anabaena-Dolichospermum-Aphanizomenon*, la valeur maximale est de seulement 1,5 mm<sup>3</sup>/L, ce qui est trop proche, en tenant compte des incertitudes de mesure du seuil Anses. Une extension de la gamme de mesures vers des valeurs plus élevées semble nécessaire. Le biocapteur *Microcystis* n'a pas pu être validé du fait des trop faibles biomasses de *Microcystis* rencontrées sur le Boudigau. Par contre, cela a permis de montrer qu'en dessous d'un biovolume de 0,12 mm<sup>3</sup>/L de *Microcystis*, le biocapteur mesure difficilement l'activité. Cette valeur est néanmoins bien éloignée et inférieure au seuil de l'Anses.
- Le développement du biocapteur du genre *Anabaena - Dolichospermum - Aphanizomenon* doit encore être poursuivi pour améliorer sa spécificité :
  - Notamment par une modification de l'outil pour permettre de quantifier jusqu'à deux ou trois fois le seuil proposé par l'Anses.
  - Des tests supplémentaires de réactions croisées sur des cultures de cyanobactéries se rapprochant de la signature génétique de ces genres sont nécessaires pour soit englober d'autres genres au biocapteur ADA soit définir une nouvelle amorce plus spécifique aux genres visés.

En conclusion, la méthodologie biocapteur a pu largement être testée sur site et l'étude a permis d'avancer dans le calage de la méthode tant sur le terrain qu'au laboratoire. Le biocapteur *Planktothrix* peut maintenant être utilisé en routine. Néanmoins, son utilisation sur le territoire du Boudigau n'est pas la plus adaptée du fait du manque de réactivité sur un cours d'eau où les activités génétiques et biomasses de cyanobactéries fluctuent beaucoup et en très peu de temps. En effet, le biocapteur évalue l'activité génétique à un instant précis sur un prélèvement ponctuel. Il faudrait fortement augmenter la fréquence des prélèvements pour être représentatif des écoulements. De plus, dans les cours d'eau fortement chargés en matières en suspension et matières organiques le signal d'activité semble perturbé et de ce fait peu représentatif. Une utilisation en plan d'eau semble plus adaptée à ce type d'outil génétique car les eaux y sont moins chargées en matières en suspension et les biomasses de cyanobactéries n'évoluent pas aussi vite.

## Bibliographie

- Afssa & Afsset 2006. Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives. 227 pp.
- Anses 2020. Evaluation des risques liés aux cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux douces. Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective. 438 pp.
- Bertone, E., Burford, M.A. & Hamilton, D.P. 2018. Fluorescence probes for real-time remote cyanobacteria monitoring: A review of challenges and opportunities. *Water Res.* 141:152–62.
- Chang, D.-W., Hobson, P., Burch, M. & Lin, T.-F. 2012. Measurement of cyanobacteria using in-vivo fluoroscopy – Effect of cyanobacterial species, pigments, and colonies. *Water Res.* 46:5037–48.
- DGS 2021. 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.
- John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. 2011. The Freshwater Algal Flora of the British Isles: an Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge. 878 pp.
- Komárek, J. 2013. Cyanoprokaryota: 3. Teil/Part 3: Heterocytous Genera. Springer Spektrum Verlag, Berlin, DEU. 1130 pp.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 1999. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. Gustav Fischer, Stuttgart. 548 pp.
- Komárek, J. & Anagnostidis, K. 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil: Oscillatoriales. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München. 759 pp.
- Laplace-Treytore, C., Moreira, S., Gogin, S., Pickhahn, L., Eon, M. & Jamoneau, A. 2017. Un système opérationnel de surveillance et d'alerte des proliférations de cyanobactéries : application aux plans d'eau landais. Sciences Eaux & Territoires. Hors-série n°37:6.
- NF EN 15204 2006. Qualité de l'eau - Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée (méthode Utermöhl). [Water quality. Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)].
- NF T 90117 1999. Qualité de l'eau - Dosage de la chlorophylle a et d'un indice phéopigments. Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire [Water quality - Determination of chlorophyll a and of a pheopigments index. Molecular absorption spectrometric method].
- Pickhahn, L., Moreira, S., Gogin, S. & Laplace-Treytore, C. 2016. Le dispositif CYANALERT : un système de surveillance et d'alerte opérationnel des proliférations de cyanobactéries : application aux zones de baignade des lacs du Born. *In Colloque Du GIS Cyano : Cyanobactéries et Zones Récréatives*. Biscarrosse, France, p. 16.
- Silva, T. 2014. Suivi et modélisation de la dynamique des cyanobactéries dans les lacs urbains au sein de leur bassin versant. 290.
- Wehr, J.D., Sheath, R.G. & Kociolek, P. 2015. Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. 2<sup>o</sup> ed. Academic press, Amsterdam, NLD. 1050 pp.

## Annexes

Annexe 1 Protocole d'échantillonnage, de préparation et de stockage des échantillons de cyanobactéries- Période estivale 2020 - Projet CYANOSAFE .....	46
Annexe 2 Fiche de prélèvement et de filtration – Période estivale 2020 - Projet CYANOSAFE .....	52
Annexe 3 Résultats des analyses de recherche des gènes de cyanotoxines réalisées sur les échantillons de 2020 - Projet CYANOSAFE .....	55
Annexe 4 Liste des cyanobactéries recensées et leurs toxines potentielles - Projet CYANOSAFE .....	59
Annexe 5 Synthèse par station des abondances cellulaires et biovolumes moyens des cyanobactéries - Projet CYANOSAFE .....	61
Annexe 6 Inventaire par échantillon des niveaux d'alertes selon les différents arbres décisionnels - Projet CYANOSAFE. (Les alertes de 2020 tiennent comptes des résultats des analyses de toxines (*)).....	63
Annexe 7 Rapport d'analyse biocapteurs du 25 novembre 2020 - Projet CYANOSAFE .....	65
Annexe 8 Évolution temporelle des biocapteurs et des biovolumes correspondants sur les différentes stations en 2019 - Projet CYANOSAFE .....	66
Annexe 9 Corrélation entre les activités de cyanobactéries toxigènes mesurées par les biocapteurs et leurs abondances calculées à partir des observations microscopiques (p-value<0,001) en 2019 et 2020- Projet CYANOSAFE .....	69

## *Annexe 1 Protocole d'échantillonnage, de préparation et de stockage des échantillons de cyanobactéries- Période estivale 2020 - Projet CYANOSAFE*

### **1. Objet**

Le présent mode opératoire a pour objectif de décrire la technique de prélèvement et de filtration des échantillons d'eau douce avec le Système Opérationnel de Filtration Autonome (SOFiA) pour extraction ARN et dosage de la chlorophylle-a au laboratoire.

### **2. Domaine d'application**

Ces échantillons contenant des cyanobactéries serviront pour le développement analytique du biocapteur génétique conçu par Microbia Environnement (ME) par la réalisation d'une analyse colorimétrique en microplaque et seront par la suite comptés au microscope par INRAE. Une mesure de la chlorophylle-a totale sera également réalisée selon la méthode de laboratoire normalisée : spectrophotométrie UV-visible-spectrométrie d'absorption moléculaire (NF T 90-117) par le laboratoire d'INRAE. Cette mesure est nécessaire pour quantifier et différencier la partie active (vivante) des cyanobactéries et les phéopigments partie dégradée (morte) plus facilement corrélables avec les données biocapteurs.

### **3. Matériels**

#### **Fourni par ME :**

Bouteilles 250mL

Système de filtration : 1 SOFiA

Pince

Filtres 1 (10µm) et 2 (1µm) en PCMB

Tube de 5 ml avec 2 mL tampon de conservation

« Parafilm » (film protecteur transparent extensible) x100

Alcool (env 200mL)

Gants (1 boîte)

Matériel d'envoi (carton, étiquettes, pochettes, bulles, ziplo

#### **Fourni par INRAE :**

- 20 Flacons en polypropylène (PP) de 180ml pour comptage au microscope répartis dans 1 boîte grise de 10L (conservation phytoplancton)
- 1 Compte-goutte de 60 mL Lugol Alcalin (conservateur phytoplancton)
- Bidon 5L avec eau déminée
- Pissette avec eau déminée
- Eprouvette 50ml
- Eprouvette 500ml en verre
- 2 Entonnoirs : petits et moyens
- Gants taille M
- Boîte de 100 filtres fibre de verre GF/C diam 47 mm (filtres 3)
- Boîte de 100 filtres fibre de verre GF/F diam 47 mm (filtres 4)
- 50 tubes coniques 15 ml
- 4 Flacons 1L HDPE
- Glacière camping-gaz INRAE
- Pochette zippée pour congélation des filtres
- 100 filtres polycarbonate GTTP 0.2 µm diam 25 mm (analyses génétiques université)
- 3 seringues de 60ml (analyses génétiques université)
- 1 support de filtre diam 25 mm (analyses génétiques université)
- Système filtration avec pompe et tuyau (éprouvette 100ml plastique+ joint+pince+2eme support+2 couvercle)

#### **Fourni par SMRCS :**

- Feutres indélébiles
- Eau du robinet
- Glacière
- Crayon papier



#### 4. Station et fréquence

1 seule station sera suivie en 2020 au cours de la période allant de mai à octobre à une fréquence bihebdomadaire et uniquement pendant la période de pompage du marais d'Orx. 14 échantillons au total seront prélevés.

- **SITE 6** : Boudigau au niveau du pont de Labenne Océan

2 types de campagnes :

- **Campagne initiale** : 1 prélèvement sera effectué avant le début des pompages pour caractériser le « bruit de fond » (biocapteur) du cours d'eau ;
- **Campagne pompage** : prélèvement bihebdomadaire en période de pompage du Marais d'Orx soit 13 échantillons au total

#### 5. Procédure

##### a. Prélèvement d'eau

A chaque campagne :

- Remplir la fiche de prélèvement et filtration
- Le seau doit être rincé 2 fois entre chaque campagne avec de l'eau de la nouvelle station.
- Faire un prélèvement d'eau juste sous la surface à l'aide du seau de 10 L environ.
- 1) Homogénéiser l'eau dans le seau en remuant avec l'[AlgaeTorch](#) et faire la mesure avec son embout car <25 cm de prof (**1 mesure intégrée** pendant 30s.), de préférence à l'ombre. Retranscrire les taux de chlorophylle a totale, de chlorophylle a associée aux cyanobactéries et la turbidité sur la fiche de prélèvement et filtration. **L'AlgaeTorch doit être rincée avec de l'eau déminéralisée entre chaque campagne de mesure.**
- 2) Homogénéiser l'eau dans le seau et mesurer la température de l'eau avec le [thermomètre](#). Retranscrire le résultat sur la fiche de prélèvement et filtration.
- 3) Homogénéiser l'eau dans le seau et remplir [le vial pour le test terrain microscystine avec 1 à 2ml d'eau homogénéisée](#) du seau. Réaliser le test en retour de mission (environ 1h).
- 4) Remplir [le flacon de 250mL pour biocapteur et analyses génétiques](#) avec l'eau homogénéisée du seau. Inscrive sur le flacon : *CYANOSAFE + point de prélèvement + date*.
- 5) Toujours avec de l'eau homogénéisée du seau, remplir [les 2 flacons de 250mL pour les analyses toxines labo](#) avec l'eau homogénéisée du seau. Inscrive sur le flacon : *CYANOSAFE + point de prélèvement + date*.
- 6) Toujours avec de l'eau homogénéisée du seau, remplir ensuite à environ 80 % du volume (soit 1 à 2 cm sous le rebord au niveau du trait) [1 flacon en PP de 180 ml](#). Inscrive sur le flacon : *CYANOSAFE + point de prélèvement + date*.
- 7) Toujours avec de l'eau homogénéisée du seau, [remplir ensuite à ras-bord le flacon d'1L](#). Inscrive sur le flacon : *CYANOSAFE + point de prélèvement + date*.
- Remplir la fiche de prélèvement et filtration.
- Les flacons sont à ramener dans une glacière (à l'obscurité et sans choc thermique pour préserver l'ARN des cyanos, pas de bloc de glace) ainsi que la fiche de prélèvement et filtration.

##### b. Préparation et stockage des échantillons pour l'analyse biocapteur génétique pour ME

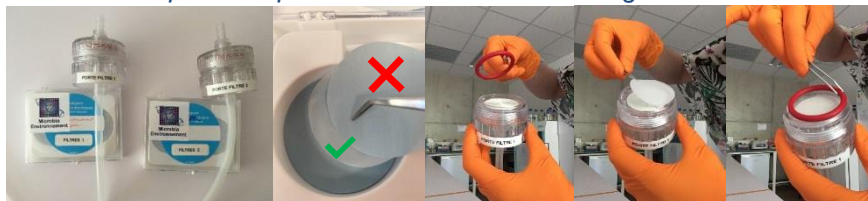
#### NOTES IMPORTANTES :

La filtration doit être réalisée maximum 4h00 après le prélèvement sur site  
Penser à bien **mélanger le bidon** avant de commencer la filtration

##### Installation des filtres et tuyaux

- Installer le filtre n°1 (10µm) dans le porte-filtre n°1 ; visser ; et le filtre n°2 (1µm) dans le porte-filtre n°2 ; visser.

*Attention : les filtres ne doivent pas se « plisser » au moment du vissage.*



- Vérifier que les tuyaux soient correctement connectés :
  1. le tuyau d'entrée avec l'entonnoir,
  2. le tuyau entre les deux portes-filtres

3. le tuyau entre le porte-filtre 2 et le côté « IN » de SOFiA
4. le tuyau de sortie du côté « OUT » de SOFiA

Placer les portes-filtres dans les emplacements prévus sur SOFiA.

Filtration

- Allumer SOFiA, procéder à la filtration jusqu'à ce le volume d'eau soit passé entièrement.
- Volume de filtration pour l'analyse de 3 groups :

Volume minimum (en condition de forte saturation des filtres)	<u>75 mL</u>
Volume idéal (pour avoir un backup-procédure qualité)	<u>150 mL</u>
Volume optimal (pour réaliser des tests supplémentaires)	<u>225 mL</u>

*Attention : vérifier que les filtres restent bien en place et qu'ils ne se déchirent pas.*

- Arrêter la pompe lorsque tout le volume est passé à travers les 2 filtres.

*Si un des filtres se colmate, stopper la filtration. Récupérer le filtre comme indiqué ci-dessous et le remplacer par un nouveau. Continuer l'opération jusqu'à avoir filtré le volume nécessaire.*

*ATTENTION : à partir de 3 filtres colmatés, stopper la filtration, noter le volume filtré et appeler le Service Technique Microbia au 07 68 97 41 54.*

*ATTENTION : ne pas mettre plus de 2 filtres dans un même tube ! Utiliser le nombre de tube nécessaire pour conserver correctement les filtres utilisés.*

- L'un après l'autre récupérer les filtres :
  - Dévisser le porte-filtre avec la partie « IN » placée en haut.
  - Avec la pince, retirer le joint rouge délicatement et plier le filtre sur lui-même 2 fois.
  - Avec la pince placer le filtre dans le tube correspondant au site et à la date de prélèvement et contenant le tampon de conservation.



*Attention : Veiller à ce que les filtres soient **totalemtent immergés** dans le liquide. Insérer **maximum 2 filtres** par tube. Si besoin utiliser un tube supplémentaire.*

- Recouvrir le tube de « Parafilm » pour éviter les fuites pendant le transport. Enlever le papier du film transparent afin de pouvoir enrouler le film autour du bouchon en tirant doucement.
- Remplir la fiche de prélèvement et filtration. La fiche doit être conservée pour transmission ultérieure



cf. partie g.

**Réactifs utilisés et précautions à prendre**

Tampon de conservation. Ce tampon est un mélange de sels, il n'est pas toxique et ne nécessite pas de prendre de précautions particulières.

### c. Préparation et stockage des échantillons pour l'analyse de chlorophylle-a pour INRAE

#### NOTES IMPORTANTES :

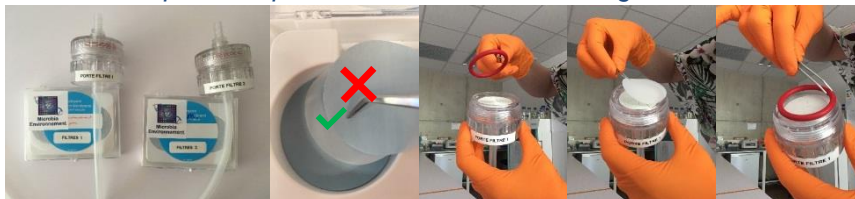
Cette filtration doit être réalisée à la suite de celle réalisée pour l'analyse biocapteur.

Penser à bien **mélanger le flacon** d'1L avant de commencer la filtration par des mouvements de retournement du flacon, plusieurs fois avant d'être utilisé.

#### Installation des filtres et tuyaux

- Au préalable rincer le matériel. Cf. partie e.
- Transférer une partie du prélèvement dans l'éprouvette graduée de 500 mL. Filtrer si possible 1l d'eau au final, ce volume est variable et peut être réduit lorsque la charge de l'échantillon est importante (matières en suspension, teneur en chlorophylle-a importante).
- Installer le filtre n°3 GF/C (préfiltre) dans le porte-filtre n°1 ; visser ; et le filtre n°4 (GF/F) dans le porte-filtre n°2 ; visser.

*Attention : les filtres ne doivent pas se « plisser » au moment du vissage.*



- Vérifier que les tuyaux soient correctement connectés :
  5. le tuyau d'entrée avec l'entonnoir,
  6. le tuyau entre les deux portes-filtres
  7. le tuyau entre le porte-filtre 2 et le côté « IN » de SOFiA
  8. le tuyau de sortie du côté « OUT » de SOFiA

Placer les portes-filtres dans les emplacements prévus sur SOFiA.

#### Filtration

- Allumer SOFiA, procéder à la filtration. Au maximum passé 1L d'eau.

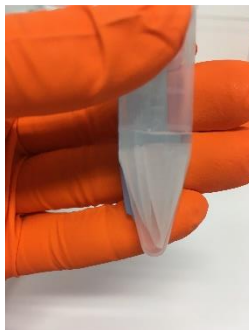
*Attention : vérifier que les filtres restent bien en place et qu'ils ne se déchirent pas.*

- Arrêter la pompe lorsque tout le volume est passé à travers les 2 filtres.

*Si un des filtres se colmate GF/C ou GF/F, stopper la filtration. Récupérer le filtre comme indiqué ci-dessous et le replacer par un nouveau. Continuer l'opération jusqu'à avoir filtré le volume maximal possible dans la limite des 1 litre.*

**ATTENTION : à partir de 3 filtres colmatés, stopper la filtration.**

- L'un après l'autre récupérer les filtres :
  - Dévisser le porte-filtre avec la partie « IN » placée en haut
  - Avec la pince, retirer le joint rouge délicatement et enrouler le filtre sur lui-même et le plier
  - Toujours avec la pince placer, le filtre au fond d'un tube de 15 ml
  - Au crayon à papier, inscrire sur le tube : *CYANOSAFE + point de prélèvement + date + Volume filtré + Nombre et type de filtre*. Le crayon à papier à l'avantage de ne pas s'effacer à l'acétone qui est utilisée dans la suite du dosage.
  - Insérer maximum 3 filtres par tube



*Attention : Veiller à ce que les filtres soient bien placés au fond du tube c'est-à-dire vers la partie conique sans les coincer au fond pour ne pas gêner l'extraction à l'acétone qui se fera ultérieurement.*

- Remplir la fiche de prélèvement et filtration. La fiche doit être conservée pour transmission ultérieure cf. partie g.
- Placer le tube au congélateur ou freezer dans la pochette zippée dédiée (qui regroupera tous les échantillons de la campagne) jusqu'à l'envoi à INRAE cf. partie g.

**d. Préparation et stockage des échantillons pour comptage microscopique par INRAE****En même temps que la filtration pour Microbia est faite :**

- Dans le flacon de 180ml, ajouter environ 15 gouttes de lugol pour obtenir une coloration jaune/orangé (couleur whisky). Retourner le flacon plusieurs fois doucement pour homogénéiser la fixation.
- Placer l'échantillon de 180 ml dans un endroit à l'abri de la chaleur (un placard pas au soleil direct) et surtout à l'obscurité jusqu'à l'envoi à INRAE cf. partie g.

**Réactifs utilisés et précautions à prendre**

Lugol (mélange iodo-ioduré de potassium). Ce réactif n'est pas toxique et ne nécessite pas de prendre de précautions particulières.

**e. Préparation et stockage des échantillons pour l'analyse biocapteur génétique pour l'université Clermont Auvergne**

- Remplir la seringue avec un volume de 10 mL d'eau du prélèvement biocapteur avec le volume restant du flacon de 250ml pour Biocapteur.
- Installer un filtre de 2 cm (avec le joint) sur le petit porte filtre.
- Placer la seringue au bout en position verticale et presser jusqu'à ce que la seringue soit vide.
- La retirer la remplir d'un peu d'air et la replacer pour finir de pousser le liquide à travers le filtre (jusqu'à ce qu'il n'y ai plus de liquide au-dessus du filtre).
- Si les 10 mL sont passés très vite et que le filtre n'est qu'à peine coloré en vert (mais je pense que ce ne sera pas le cas). Reprendre une à plusieurs fois 10 autres mL pour les filtrer aussi. L'idée et d'avoir suffisamment de matériel sur le filtre pour les analyses. Lors des prochaines campagnes tu pourras directement filtrer en un seul coup le même volume final pour aller plus vite.
- Une fois la filtration terminer, étirer la seringue et dévisser le porte filtre
- Retirer le filtre avec des pinces pour le placer au fond du petit tube de 15ml.
- Au crayon à papier, inscrire sur le tube : *CYANOSAFE + point de prélèvement + date + Volume filtré* +. Le crayon à papier à l'avantage de ne pas s'effacer à l'acétone qui est utilisée dans la suite du dosage.
- Remplir la fiche de prélèvement et filtration. La fiche doit être conservée pour transmission ultérieure cf. partie g.
- Placer le tube au congélateur ou freezer dans la pochette zippée dédiée (qui regroupera tous les échantillons de la campagne) jusqu'à l'envoi à INRAE cf. partie g.
- Tous les tubes seront récupérés en fin des campagnes par l'INRAE pour être envoyés à l'université de Clermont-Ferrand.

**f. Maintenance de l'équipement de filtration**

**Après chaque filtration**, rincer à l'eau du robinet en pompant l'eau claire pendant 1 à 2 minutes. Puis retirer le tuyau du bidon d'eau du robinet pour vider complètement tous les tuyaux.

A la fin de toutes les filtrations :

- Rincer 1 fois à l'eau claire
- 1 fois à l'alcool (faire passer tout le volume de la bouteille éthanol remplie dans la bouteille vide)
- Et enfin 1 dernière fois à l'eau claire, vider les tuyaux.
- Ouvrir les porte-filtres et bien les rincer. Laisser le matériel à sécher.  
Recharger la batterie de SOFiA (autonomie 2h30).

**g. Test bandelettes terrain toxines**

Suivre la procédure et retranscrire les résultats sur la fiche de prélèvement et filtration.

**h. Envoi des échantillons****Pour Microbia Environnement :**

Insérer les tubes 5 ml dans la pochette à bulles, la fermer.

Mettre en forme le colis fournit.

Insérer les échantillons dans le colis avec une copie de la fiche de terrain.

Coller l'étiquette France Express correspondant à la date d'envoi de manière à sceller le colis.  
Un transporteur France Express viendra retirer le colis sur site.

**Adresse :**

**MICROBIA ENVIRONNEMENT**

Delphine GUILLEBAULT  
Obs. Océanologique avenue Pierre Fabre  
66650 Banyuls sur mer  
04 30 19 24 35  
07 68 97 41 54

**Pour INRAE :**

Envoi à définir en fonction de la date prévue des analyses de la chlorophylle-a par le laboratoire INRAE. A la fin de la campagne, il conviendra d'avertir rapidement INRAE afin que les agents puissent programmer leurs analyses et l'envoi des échantillons.

Envoi des flacons en PP + tubes de 15 ml avec les fiches de prélèvement et filtration de la période concernée.

**Adresse :**

**INRAE**, Unité EABX,  
50 avenue de verdun 33612 Gazinet Cestas  
Sylvia Moreira : 05 57 89 27 24  
Christophe Laplace-Treyture : 05 57 89 08 53

**Pour Limnologie sarl:**

Envoi individuel (pas de congélation), flacons protégés dans du papier bulle et envoyés dans petits contenant en carton.

**Adresse :**

Frederic Pitois, Limnologie sarl  
19 rue Le Guen de Kérangal 35200 Rennes - France  
tel: 330299321794 – 0683029181

## Annexe 2 Fiche de prélèvement et de filtration – Période estivale 2020 - Projet CYANOSAFE



<b>FICHE PRELEVEMENT ET FILTRATION</b>	
Campagne : <input type="checkbox"/> Initiale <input type="checkbox"/> Pompage n°.....	
Référence Client_Projet	CYANOSAFE20
Référence méthode	MO 7-3-1

### 1- DONNEES GENERALES CAMPAGNE

<b>Date</b>	
<b>Organisme</b>	Syndicat Mixte de Rivières Côte Sud
<b>Opérateur</b>	
<b>Météo</b>	<b>Vent</b> : <input type="checkbox"/> Nul <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Fort <b>Précipitation</b> : <input type="checkbox"/> Nul <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Fort <b>Ensoleillement</b> : <input type="checkbox"/> Faible <input type="checkbox"/> Moyen <input type="checkbox"/> Fort <input type="checkbox"/> Orage
<b>Remarques</b>	N°Pompage : ..... Date début Pompage : ..... Date fin pompage : ..... Autres :

### 2- DESCRIPTIF

**SITE 6** : Boudigau au niveau du pont de Labenne Océan

### 3- PRÉLÈVEMENT

Attention ! Mélanger avant prélèvement



Site	Prélevements	Heure (hh-mm)	Temp (°C)	Surface Eau	Photos	Notes/Remarques
6	<p><b>Microbia + Université Clermont-Auvergne:</b></p> <p><input type="checkbox"/> Flacon 250ml</p> <p><b>INRAE :</b></p> <p><input type="checkbox"/> Flacon 180ml</p> <p><input type="checkbox"/> Flacon 1L</p> <p><b>Toxines Terrain :</b></p> <p><input type="checkbox"/> Kit</p> <p><b>Toxines Flacon :</b></p> <p><input type="checkbox"/> 2 Flacons 250ml</p>			<p><input type="checkbox"/> Lisse</p> <p><input type="checkbox"/> Faiblement agitée</p> <p><input type="checkbox"/> Agitée</p> <p><input type="checkbox"/> Très agitée</p>		

**4- MESURE ALGAE TORCH**

**Attention ! Mélanger avant mesure et agitation pendant mesure !**

Site	Chloro-a Total (µg/L)	Chloro-a Cyano (µg/L)	Turbidité (FTU)	Présence Bloom	Notes/Remarques
6					

**5- DOSAGE TOXINES : TEST TERRAIN EAU DE SURFACE**

Site	Microcystines (µg/L)	Anatoxine-a (µg/L)	Mode de lecture	Notes/Remarques
6			<p><input type="checkbox"/> Visuelle</p> <p><input type="checkbox"/> Lecteur</p>	

**6- FILTRATIONS : Biocepteur puis Chlorophylle-a**

- **ATTENTION ! Maximum 4h00 entre le prélèvement et la filtration**
- **ATTENTION ! Bidon/bouteille mélangé avant filtration**

**BIOCAPTEUR : 75-150-225 mL par site avec 2 filtres maximum dans le tube**

Volume minimum (en condition de forte saturation des filtres)	<u>75 mL</u>
Volume idéal (pour avoir un backup-procédure qualité)	<u>150 mL</u>
Volume optimal (pour réaliser des tests supplémentaires)	<u>225 mL</u>

**CHLOROPHYLLE-A : 1 Litre maximum filtré par site avec 3 filtres maximum dans le tube conique**

Date / Heure					
Organisme / Opérateur					
Nom échantillon*	V filtré	Durée filtration (min)	Nb filtres	Nb tubes	Notes/Remarques
<b>BIOCAPTEUR (ARN)</b> CYANOSAFE_S6_N...	<input type="checkbox"/> 75 ml <input type="checkbox"/> 150 ml <input type="checkbox"/> 225 ml		PCMB 1 (10µm) PCMB 2 (1µm)		
<b>CHLOROPHYLLE-A</b> CYANOSAFE_S6_N...	.....		GF/C : ... GF/F : ...	1	
<b>ANALYSES GENETIQUES (ADN)</b> CYANOSAFE_S6_N...	.....		Polycarbonate GTTP 0.2 µm		

\* NE PAS REMPLIR, nom donné par ME et INRAE après réception des échantillons.

## 7. CONTACT

**Megali :** 05 58 77 19 82 / 06 89 09 30 26

**Christophe:** 05 57 89 08 53/06 31 56 64 87 (perso)

**Sylvia Moreira :** 05 57 89 27 24 / 06 46 78 81 41 (perso)

**Bureau Technique Microbia :** 04 30 19 24 35 / 07 68 97 41 54



## Annexe 3 Résultats des analyses de recherche des gènes de cyanotoxines réalisées sur les échantillons de 2020 - Projet CYANOSAFE

L'ADN des échantillons a été extraits selon le protocole « **Extraction d'ADNg d'échantillon aquatique** ».

### Concentration des extraits (dosage au QUBIT)

Liste des échantillons et leur concentration :

1 : Cyanosafe S6 29/09/20 10mL	3,9 ng/μL
2 : Cyanosafe S6 29/09/20 14mL	8,3 ng/μL
3 : Cyanosafe S6 01/10/20 10mL	41,8 ng/μL
4 : Cyanosafe S6 21/10/20 10mL	12,5 ng/μL
5 : Cyanosafe S6 09/11/20 20mL	12,2 ng/μL
6 : Cyanosafe S6 12/11/20	14,9 ng/μL
7 : Cyanosafe S6 16/11/20	15,5 ng/μL
8 : Cyanosafe S6 18/01/20	40,6 ng/μL
9 : Cyanosafe S6 23/11/20	18,3 ng/μL
10 : Cyanosafe S6 25/11/20	26,4 ng/μL

### 1- La recherche des gènes de l'anatoxine a été faite par PCR avec les amorces listées ci-dessous

(tirées de la publi : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.6b00189>)

Liste des amorces	Tm (°C)	Taille attendue
anaA-for AAAACAGAAATACCTAATCTTTGG	54,2	758pb
anaA-rev TTATAAATAGTCTTTTAGCGTTTC	52,5	
anaB-for GATTTTGCCTGGAACAGTC	54,5	1130pb
anaB-rv TTACAATCCCAAGAATTTA	45,9	
anaC-for TCATATCTACTGCAACATC	50,2	1102pb
anaC-rev ACGCAAAGCTCACCCACCTCTAACT	69,5	
anaD-for ATGACAGAAGAAAAAGTCGAAC	54,7	285pb
anaD-rev TCATACCTGTGACACCAATTTAC	57,1	
anaEks-for GAGGAGAGGGTTGTGGCGTTGTTAT	64,6	400pb
anaEks-rev GGGGGATCTGGTTATGCTGAAGT	62,4	
anaFks2-for CGCAAATCGATGCTCACTTA	55,3	412pb
anaFks2-rev CCACTGGCTCCATCTTGATT	57,3	
anaGks-for AAGGTTGCGGCATAGTCGTTCTCA	62,7	468pb
anaGks-rev TCTGTTGCTTGCCACTTTTATTG	59,3	
anaGmt-for AGTACGATCCGCTCCAGTTG	59,4	793pb
anaGmt-rev TCGTTTGGAAAAACGACTGT	53,2	

### Conditions de PCR

	Vol. (μL)	[finale]
Mix PCR pour 1 réaction (25μL)		
Tampon 5X	5	1X
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,5	2,5mM
dNTP (10mM each)	0,5	0,2mM each
Amorce F (10μM)	1	0,4μM
Amorce R (10μM)	1	0,4μM
GoTaq G2 Hot Start Polymerase (5u/μL)	0.125	0,025u
H <sub>2</sub> O up	13,875	

95°C 2min

35 fois le cycle :  
 \* 95°C 30s  
 \* x°C 1min  
 \* 72°C 1min30

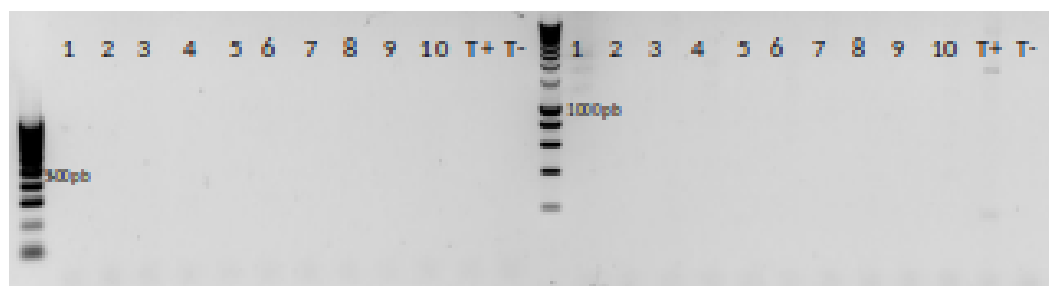
72°C 5min

Certains couples d'amorces ont été testés à 2 températures d'hybridation différentes

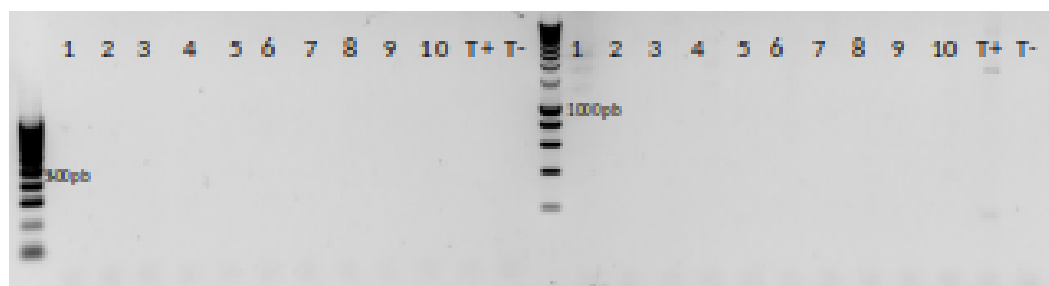
Gène	A	B	C	D	E	Fks	Gks	Gmt
X : t° hyb	48	48	48, 52	49	49, 52	51	51	51

## Résultats

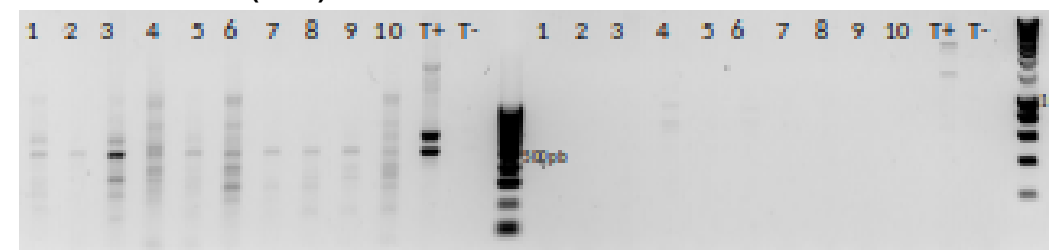
**Gène anaA**



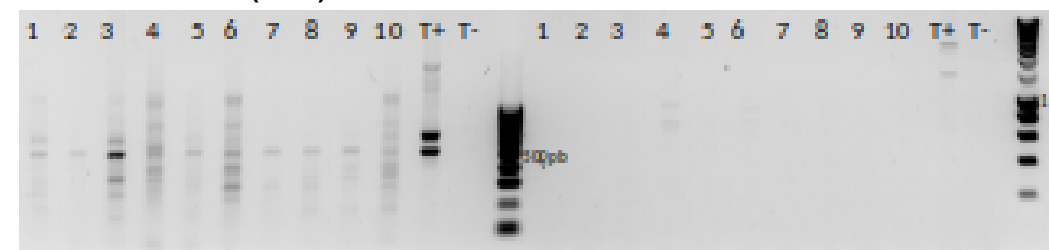
**Gène anaB**



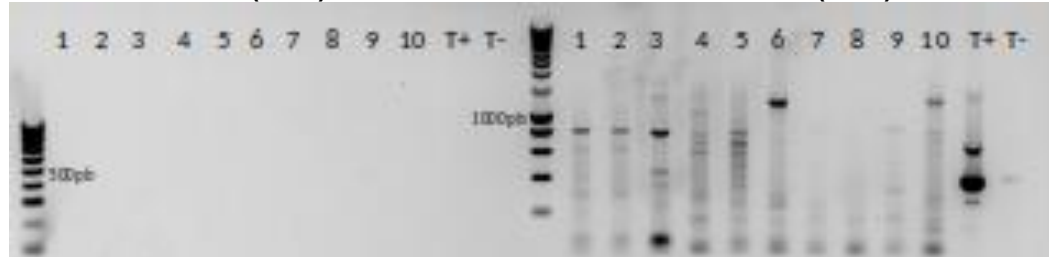
**Gène anaC (48°C)**



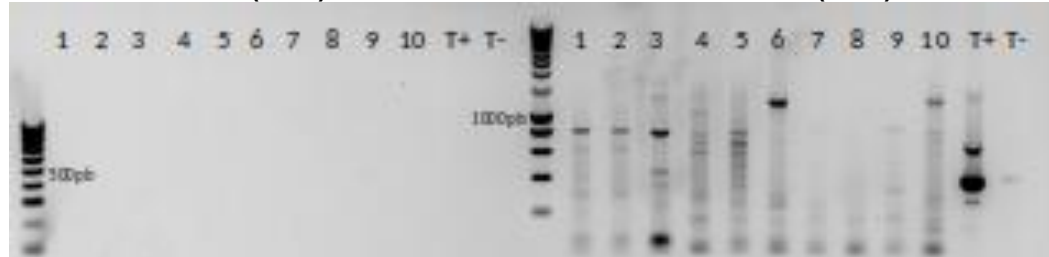
**Gène anaD**



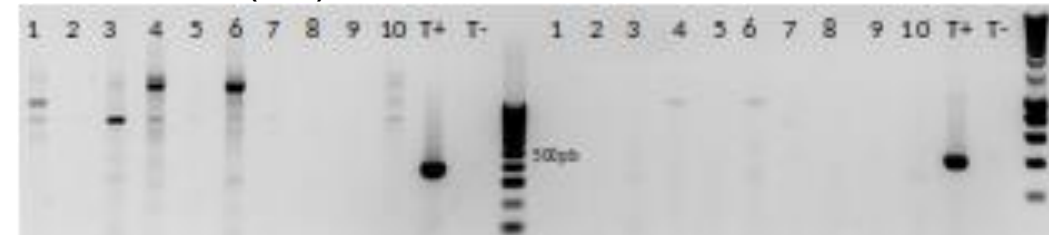
**Gène anaC (52°C)**



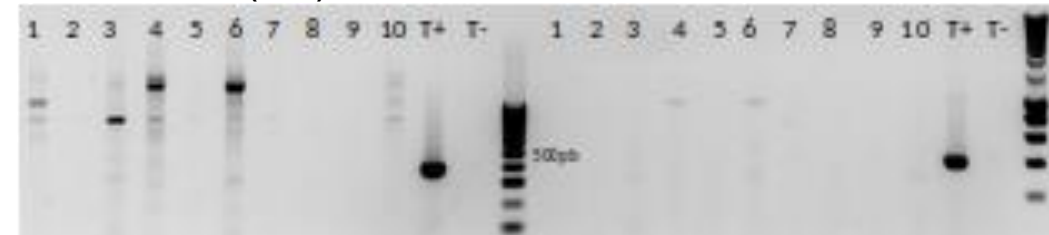
**Gène anaE (49°C)**

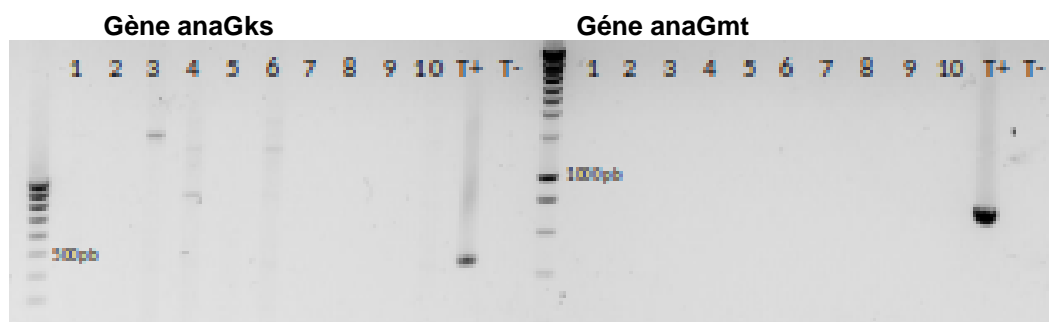


**Gène anaE (52°C)**



**Gène anaF**





## 2- Vérification de la présence de cyanobactéries dans les échantillons par amplification du 16S et du gène de la microcystine (mcy)

Liste des amorces	Tm (°C)	Taille attendue
mcyA-Cd 1FAAAATTTAAAAGCCGTATCAAA	48,1	295pb
mcyA-Cd 1RAAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT	55,9	
CYA359FGGGGAATYTTCCGCAATGGG	60,4	422pb
CYA781RGACTIONACTGGGGTATCTAATCCCATT	61,3	

### Conditions de PCR

Mix PCR pour 1 réaction (25µL)	Vol. (µL) (mcyA)	[finale]
Tampon 5X	5	1X
MgCl2 (25mM)	2,5 (4,5)	2,5mM(4,5mM)
dNTP (10mM each)	0,5	0,2mM each
Amorce F (10µM)	1	0,4µM
Amorce R (10µM)	1	0,4µM
GoTaq G2 Hot Start Polymerase (5u/µL)	0.125	0,025u
H2O up	13,875 (11,875)	

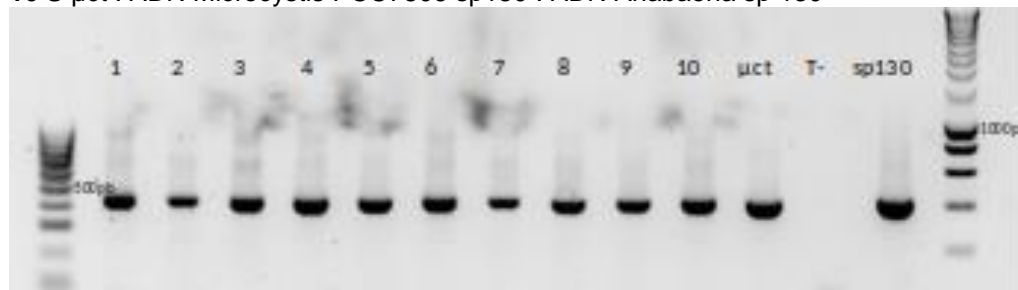
95°C 2min

35 fois le cycle :  
 \* 95°C 30s  
 \* 56°C 1min  
 \* 72°C 1min

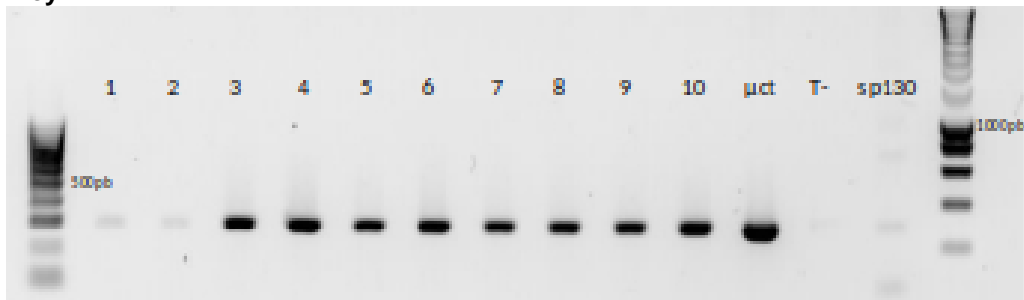
72°C 5mn

## Résultats

16 S µct : ADN Microcystis PCC7806 sp130 : ADN Anabaena sp 130



**mcy**



## **CONCLUSION:**

Aucun échantillon ne possède tout le cluster de gènes d'anatoxine-a, donc à priori pas de synthèse possible. En revanche, tous (sauf les échantillons 1 et 2) ont le gène mcy-A donc synthèse de microcystine très probable.

### **Quelques remarques :**

- Pour les gènes anaA, anaB et D, les témoins positifs ne ressortent pas car ces couples d'amorces ne sont pas spécifiques de la souche témoin utilisée (sp130). Ce qui montre qu'il y a encore du travail de design sur cette toxine.
- 2 températures d'hybridation ont été testées sur 2 gènes car ce sont les seuls qui présentaient une spécificité à ces températures.



<i>Microcystis sp</i>	Chroococcales	Microcystaceae	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Chroococcales	Microcystaceae	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microcystis firma</i>	Chroococcales	Microcystaceae	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microcystis smithii</i>	Chroococcales	Microcystaceae	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microcystis wesenbergii</i>	Chroococcales	Microcystaceae	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Planktothrix agardhii</i>	Oscillatoriales	Microcoleaceae	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudanabaena sp</i>	Synechococcales	Pseudanabaenaceae	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudanabaena catenata</i>	Synechococcales	Pseudanabaenaceae	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudanabaena mucicola</i>	Synechococcales	Pseudanabaenaceae	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Woronichinia naegeliana</i>	Synechococcales	Coelosphaeriaceae	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Légende : 0 = pas de toxicité ; 1 = toxicité potentielle. Les couleurs séparent les taxons par biocapteurs génétiques : **Bleu** = biocapteur ADA ; **vert** = biocapteur *Microcystis* ; **rouge** = biocapteur *Planktothrix*.

### Annexe 5 Synthèse par station des abondances cellulaires et biovolumes moyens des cyanobactéries - Projet CYANOSAFE

SITE	STATION	TAXON	TOXICITE	Biovolume moyen (mm <sup>3</sup> /l)	Nb moyen (cel/ml)
Marais d'Orx	18	<i>Planktothrix agardhii</i>	1	61,15	1 019 224
		<i>Aphanizomenon sp</i>	1	0,87	12 140
		<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	1	0,44	11 074
	17	<i>Dolichospermum compactum</i>	1	19,55	299 855
		<i>Planktothrix agardhii</i>	1	15,39	256 503
		<i>Aphanocapsa elachista</i>	1	2,34	1 171 508
		<i>Anathece minutissima</i>	0	1,73	1 730 952
		<i>Chroococcus sp</i>	0	1,37	11 221
		<i>Pseudanabaena sp</i>	1	0,97	22 522
		<i>Romeria elegans</i>	0	0,83	138 402
		<i>Anathece smithii</i>	0	0,65	324 291
		<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	1	0,60	14 884
		<i>Pseudanabaena mucicola</i>	1	0,56	7 902
		<i>Aphanocapsa holsatica</i>	1	0,46	460 043
		<i>Merismopedia sp</i>	1	0,37	28 222
		<i>Jaaginema sp</i>	0	0,30	15 722
		<i>Aphanocapsa incerta</i>	1	0,17	24 433
		<i>Rhabdoderma sp</i>	0	0,16	10 211
		<i>Merismopedia tenuissima</i>	1	0,16	158 331
		<i>Coelosphaerium sp</i>	0	0,08	20 579
	<i>Anathece clathrata</i>	0	0,08	38 991	
	<i>Planktolyngbya limnetica</i>	0	0,05	16 116	
	2	<i>Dolichospermum compactum</i>	1	47,05	721 688
		<i>Planktothrix agardhii</i>	1	17,09	284 853
		<i>Pseudanabaena mucicola</i>	1	14,03	197 555
		<i>Microcystis aeruginosa</i>	1	5,86	60 364
		<i>Chroococcus sp</i>	0	3,01	24 694
		<i>Anathece minutissima</i>	0	2,14	2 139 093
		<i>Aphanocapsa incerta</i>	1	1,53	219 029
		<i>Pseudanabaena sp</i>	1	1,32	30 765
		<i>Romeria elegans</i>	0	1,18	197 346
		<i>Aphanocapsa holsatica</i>	1	0,68	681 829
		<i>Anathece clathrata</i>	0	0,48	238 713
<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>		1	0,26	6 588	
<i>Aphanocapsa elachista</i>		1	0,24	120 136	
<i>Merismopedia tenuissima</i>	1	0,18	181 551		
Boudigau	6	<i>Planktothrix agardhii</i>	1	7,94	132 257
		<i>Dolichospermum compactum</i>	1	2,03	31 184
		<i>Pseudanabaena mucicola</i>	1	0,41	5 728
		<i>Dolichospermum sp</i>	1	0,32	1 118

		<i>Romeria elegans</i>	0	0,12	20 831
		<i>Aphanocapsa elachista</i>	1	0,11	57 426
		<i>Microcystis smithii</i>	1	0,09	1 686
		<i>Chroococcus sp</i>	0	0,08	640
		<i>Microcystis wesenbergii</i>	1	0,07	1 112
		<i>Aphanizomenon sp</i>	1	0,06	899
		<i>Anathece minutissima</i>	0	0,06	59 900
		<i>Merismopedia tenuissima</i>	1	0,05	51 818
		<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	1	0,04	1 022
		<i>Aphanocapsa incerta</i>	1	0,03	4 871
		<i>Pseudanabaena sp</i>	1	0,03	767
		<i>Microcystis sp</i>	1	0,03	633
		<i>Merismopedia tranquilla</i>	1	0,02	1 568
		<i>Aphanocapsa holsatica</i>	1	0,02	19 094
		<i>Anathece smithii</i>	0	0,01	7 341
		<i>Anabaena sp</i>	1	0,01	68
		<i>Pannus sp</i>	0	0,01	1 804
		<i>Microcystis firma</i>	1	0,00	4 731
		<i>Anathece clathrata</i>	0	0,00	1 684
		<i>Woronichinia naegeliana</i>	1	0,00	144
		<i>Synechococcus nidulans</i>	0	0,00	400
		<i>Jaaginema sp</i>	0	0,00	48
		<i>Cyanodictyon sp</i>	0	0,00	449
		<i>Pseudanabaena catenata</i>	1	0,00	91
		<i>Dolichospermum compactum</i>	1	4,22	64 748
		<i>Planktothrix agardhii</i>	1	3,94	65 598
		<i>Pseudanabaena mucicola</i>	1	0,63	8 890
		<i>Anathece minutissima</i>	0	0,26	258 262
		<i>Romeria elegans</i>	0	0,12	20 670
		<i>Pseudanabaena sp</i>	1	0,12	2 840
		<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	1	0,08	1 951
		<i>Chroococcus sp</i>	0	0,06	510
	9	<i>Aphanocapsa holsatica</i>	1	0,06	59 267
		<i>Aphanocapsa incerta</i>	1	0,03	4 109
		<i>Aphanocapsa elachista</i>	1	0,02	10 042
		<i>Aphanizomenon sp</i>	1	0,02	270
		<i>Merismopedia tenuissima</i>	1	0,02	17 089
		<i>Synechococcus nidulans</i>	0	0,00	836
		<i>Pseudanabaena catenata</i>	1	0,00	344
		<i>Synechocystis aquatilis</i>	0	0,00	22
		<i>Cyanodictyon planctonicum</i>	0	0,00	984
Hossegor	Lac	<i>Planktothrix agardhii</i>	1	0,32	5 326

Légende : 0 = pas de toxicité ; 1 = toxicité potentielle. Les couleurs séparent les taxons par biocapteurs génétiques : Bleu = biocapteur ADA ; vert = biocapteur *Microcystis* ; rouge = biocapteur *Planktothrix*



*Annexe 6 Inventaire par échantillon des niveaux d'alertes selon les différents arbres décisionnels - Projet CYANOSAFE. (Les alertes de 2020 tiennent comptes des résultats des analyses de toxines (\*))*

SITE	STATION	CAMPAGNE	DATE	Cyanos totales (cel/ml)	Cyanos totales (mm <sup>3</sup> /l)	ELISA* MCS (µg/l)	ELISA* ATX et hATX (µg/l)	Alerte Afssa & Afsset, (2006)	Cyanos toxiques (cel/ml)	Cyanos toxiques (mm <sup>3</sup> /l)	Alerte Anses (2020)	Chl-a cyano AlgaeTorch (µg/L)	Alerte CYANALERT (2017)	
Marais d'Orx	18	Initiale	17/07/2019	1 014 117	60,85	NA	NA	Alerte 2	1 014 117	60,85	Alerte 1	234,15	Alerte 2	
		Intermédiaire	23/07/2019	811 221	48,67	NA	NA	Alerte 2	811 221	48,67	Alerte 1	212,50	Alerte 2	
		Intermédiaire	30/07/2019	570 963	34,26	NA	NA	Alerte 2	570 963	34,26	Alerte 1	155,65	Alerte 2	
		Intermédiaire	06/08/2019	558 390	33,50	NA	NA	Alerte 2	558 390	33,50	Alerte 1	179,60	Alerte 2	
		Pompage 1	13/08/2019	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	232,20	Alerte 2
		Pompage 2	21/08/2019	1 445 090	86,71	NA	NA	Alerte 2	1 445 090	86,71	Alerte 1	229,85	Alerte 2	
		Intermédiaire	27/08/2019	858 396	51,50	NA	NA	Alerte 2	858 396	51,50	Alerte 1	205,80	Alerte 2	
		Intermédiaire	04/09/2019	1 227 971	73,68	NA	NA	Alerte 2	1 227 971	73,68	Alerte 1	177,85	Alerte 2	
		Intermédiaire	10/09/2019	997 261	59,69	NA	NA	Alerte 2	997 261	59,69	Alerte 1	151,50	Alerte 2	
		Intermédiaire	16/09/2019	889 679	53,01	NA	NA	Alerte 2	889 679	53,01	Alerte 1	148,70	Alerte 2	
		Intermédiaire	01/10/2019	1 103 248	65,92	NA	NA	Alerte 2	1 103 248	65,92	Alerte 1	150,85	Alerte 2	
		Pompage 3	08/10/2019	902 657	53,75	NA	NA	Alerte 2	902 657	53,75	Alerte 1	191,85	Alerte 2	
		Intermédiaire	16/10/2019	800 188	47,97	NA	NA	Alerte 2	800 188	47,97	Alerte 1	176,65	Alerte 2	
	Pompage 4	23/10/2019	1 011 411	60,75	NA	NA	Alerte 2	1 011 411	60,75	Alerte 1	232,85	Alerte 2		
	17	Initiale	17/07/2019	6 163 315	48,01	NA	NA	Alerte 2	5 372 322	46,48	Alerte 1	115,70	Alerte 2	
		Intermédiaire	23/07/2019	6 153 849	61,91	NA	NA	Alerte 2	2 241 265	54,38	Alerte 1	212,85	Alerte 2	
		Intermédiaire	30/07/2019	4 242 664	27,45	NA	NA	Alerte 2	2 020 167	20,88	Alerte 1	207,45	Alerte 2	
		Intermédiaire	06/08/2019	3 248 005	16,28	NA	NA	Alerte 2	740 699	8,34	Alerte 1	236,10	Alerte 2	
		Intermédiaire	27/08/2019	1 017 935	6,88	NA	NA	Alerte 2	170 917	4,50	Alerte 1	77,10	Alerte 2	
		Intermédiaire	04/09/2019	1 658 187	56,47	NA	NA	Alerte 2	1 510 021	56,18	Alerte 1	156,20	Alerte 2	
		Intermédiaire	10/09/2019	266 570	0,60	NA	NA	Alerte 2	46 270	0,26	Pas d'alerte	8,85	Alerte 1	
		Intermédiaire	16/09/2019	58 948	0,59	NA	NA	Alerte 1	41 423	0,14	Pas d'alerte	28,35	Alerte 2	
		Intermédiaire	01/10/2019	68 845	0,68	NA	NA	Alerte 1	59 865	0,06	Pas d'alerte	18,70	Alerte 2	
		Intermédiaire	16/10/2019	982 670	57,11	NA	NA	Alerte 2	982 670	57,11	Alerte 1	145,75	Alerte 2	
	2	Initiale	17/07/2019	5 720 050	60,11	NA	NA	Alerte 2	3 208 628	53,88	Alerte 1	95,50	Alerte 2	
		Pompage 1	13/08/2019	5 080 453	31,34	NA	NA	Alerte 2	1 654 103	26,68	Alerte 1	239,95	Alerte 2	

		Pompage 2	21/08/2019	3 053 818	92,56	NA	NA	Alerte 2	1 718 867	90,00	Alerte 1	234,55	Alerte 2
		Pompage 3	08/10/2019	852 243	51,96	NA	NA	Alerte 2	852 243	51,96	Alerte 1	115,40	Alerte 2
		Pompage 4	23/10/2019	733 516	34,13	NA	NA	Alerte 2	733 516	34,13	Alerte 1	90,35	Alerte 2
Boudigau	6	Initiale	17/07/2019	4 009	0,01	NA	NA	Pas d'alerte	1 656	0,00	Pas d'alerte	0,90	pas d'alerte
		Pompage 1	13/08/2019	846 696	8,41	NA	NA	Alerte 2	283 005	7,14	Alerte 1	84,65	Alerte 2
		Pompage 2	21/08/2019	147 985	3,26	NA	NA	Alerte 2	72 585	2,78	Alerte 1	39,65	Alerte 2
		Pompage 3	08/10/2019	319 645	15,53	NA	NA	Alerte 2	319 196	15,48	Alerte 1	71,05	Alerte 2
		Pompage 4	23/10/2019	66 670	3,60	NA	NA	Alerte 1	65 819	3,59	Alerte 1	15,80	Alerte 1
		T0	18/05/2020	359	0,02	0	0	Pas d'alerte*	359	0,02	Pas d'alerte*	0,00	pas d'alerte*
		Pompage 1	20/05/2020	11 425	0,12	0	0	Pas d'alerte*	9 377	0,08	Pas d'alerte*	6,40	Alerte 1*
		Pompage 1	25/05/2020	643 900	13,71	0	0	Alerte 2*	578 048	13,59	Alerte 1*	32,00	Alerte 2*
		Pompage 1	28/05/2020	861 534	29,38	0	0	Alerte 2*	841 923	29,33	Alerte 1*	39,00	Alerte 2*
		Pompage 2	11/06/2020	636 893	33,74	0,16	0	Alerte 2*	617 025	33,68	Alerte 1*	26,80	Alerte 2*
		Pompage 3	29/09/2020	14 465	0,04	0	0	Pas d'alerte*	11 562	0,02	Pas d'alerte*	0,30	pas d'alerte*
		Pompage 3	01/10/2020	878 549	2,77	0	0	Alerte 2*	760 016	2,38	Alerte 1*	29,10	Alerte 2*
		Pompage 3	21/10/2020	81 089	4,57	0	0	Alerte 1*	81 048	4,57	Alerte 1*	20,50	Alerte 2*
		Pompage 3	09/11/2020	105 315	5,50	0	0	Alerte 2*	103 706	5,49	Alerte 1*	24,73	Alerte 2*
		Pompage 3	12/11/2020	118 444	6,33	0	0	Alerte 2*	118 399	6,33	Alerte 1*	35,77	Alerte 2*
		Pompage 3	16/11/2020	172 679	8,80	0	0	Alerte 2*	171 899	8,75	Alerte 1*	47,67	Alerte 2*
		Pompage 3	18/11/2020	144 372	8,54	0,17	0	Alerte 2*	142 804	8,53	Alerte 1*	46,53	Alerte 2*
		Pompage 3	23/11/2020	214 601	11,05	0	0	Alerte 2*	204 050	11,04	Alerte 1*	64,13	Alerte 2*
		Pompage 3	25/11/2020	222 809	12,53	0,55	0	Alerte 2*	220 003	12,53	Alerte 2*	74,17	Alerte 2*
		9	Initiale	17/07/2019	46	0,00	NA	NA	Pas d'alerte	25	0,00	Pas d'alerte	0,00
	Pompage 1		13/08/2019	748 412	5,99	NA	NA	Alerte 2	200 689	5,12	Alerte 1	51,70	Alerte 2
	Pompage 2		21/08/2019	275	0,00	NA	NA	Pas d'alerte	257	0,00	Pas d'alerte	0,00	pas d'alerte
	Pompage 3		08/10/2019	271 580	13,31	NA	NA	Alerte 2	260 467	13,30	Alerte 1	56,40	Alerte 2
	Pompage 4		23/10/2019	54 866	2,65	NA	NA	Alerte 1	53 013	2,64	Alerte 1	13,75	Alerte 1
Hossegor	Lac	Pompage 2	21/08/2019	5 326	0,32	NA	NA	Pas d'alerte	5 326	0,32	Pas d'alerte	51,37	Alerte 2

## Annexe 7 Rapport d'analyse biocapteurs du 25 novembre 2020 - Projet CYANOSAFE



Rapport N.	14
Date d'émission	27/11/2020
Version	01
Page 1 sur 3	

Syndicat Mixte de Rivières Côte Sud  
Allée des Camélias  
40230 St Vincent de Tyrosse

### RAPPORT D'ANALYSE

Suivi de l'activité des cyanobactéries potentiellement toxiques vivantes dans l'eau par reconnaissance génétique des genres *Microcystis* sp., *Planktothrix* sp., *Anabaena/Aphanizomenon/Dolichospermum* sp.

#### Résultats d'analyses

	Microcystis sp. (ABS 450)	Planktothrix sp. (ABS 450)	Anabaena/Aphanizomenon/ Dolichospermum (ABS 450)
SITE 1 « S6 »	0.005 +/- 0.000	Supérieur à 1 > Limite de quantification	0.020 +/- 0.000

Date analyse : 27/11/2020

Méthode : Détection génétique par test colorimétrique

Opérateur(s) : Emilie PASERO (Microbia Environnement)

Détection du matériel génétique (ARN) des genres *Microcystis* sp., *Planktothrix* sp. et *Anabaena/Aphanizomenon* sp., *Dolichospermum* sp. par biocapteur génétique, sous format de test colorimétrique.

Les analyses colorimétriques sont réalisées au moins en dupliquas. Les résultats sont rapportés à la courbe des standards et normalisés à 25 ml d'eau filtrée par genre.

La technologie inventive et innovante a été déposée sous le numéro de brevet N°19/03904 « Utilisation de sondes pour la détection de cyanobactéries toxigènes, procédé de détection et kits correspondants ».

Prélèvement et préparation échantillons : 25/11/2020

Opérateur(s) : Loup Ritter

Méthode : Filtration par « S.O.F.A – Microbia Environnement

Prélèvement et filtration de 100 ml d'eau à 1 micron par « S.O.F.A – Microbia Environnement » Système de Filtration Autonome.

Conditionnement des échantillons dans du tampon de conservation.

#### MICROBIA ENVIRONNEMENT

Siège social

4, rue Etienne Terrus

66300 SAINT JEAN LASSEILLE

Tél. : +33 (0)4 68 88 73 25 – Mail : [contact@microbiaenvironnement.com](mailto:contact@microbiaenvironnement.com)

#### Site d'activité

Observatoire Océanologique

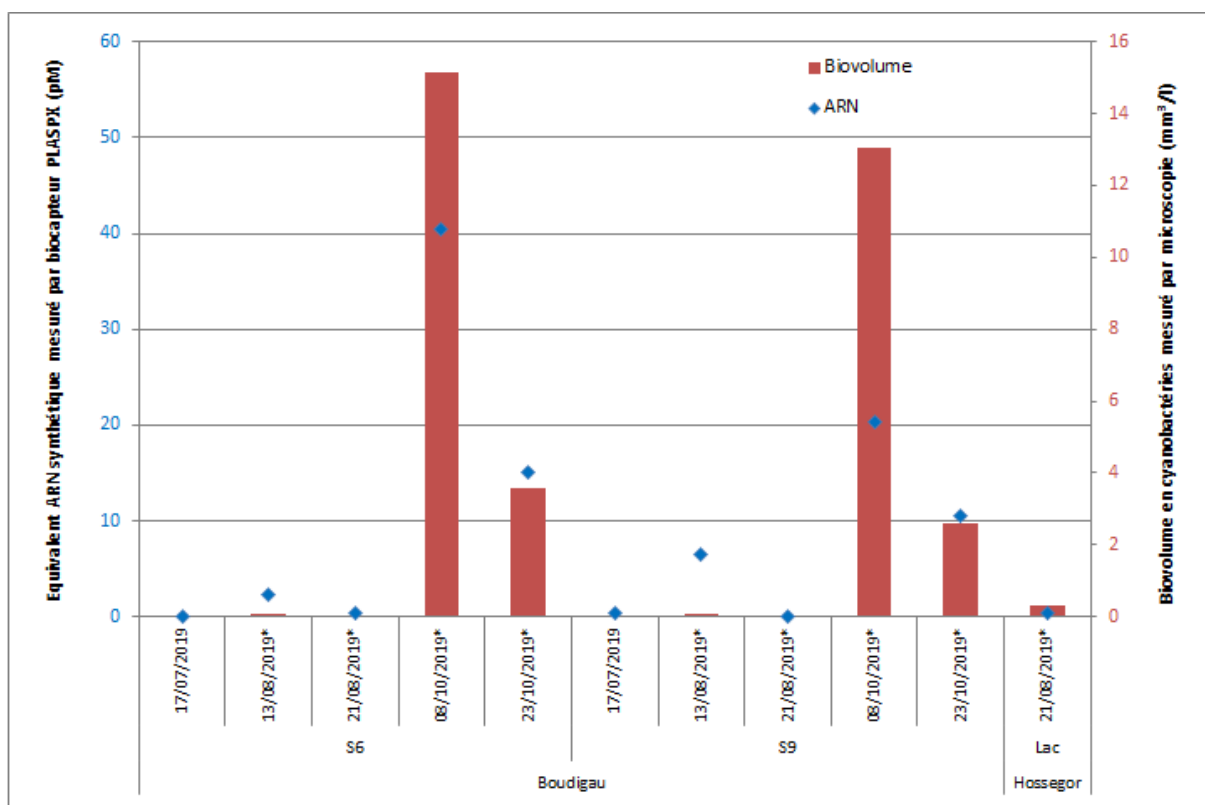
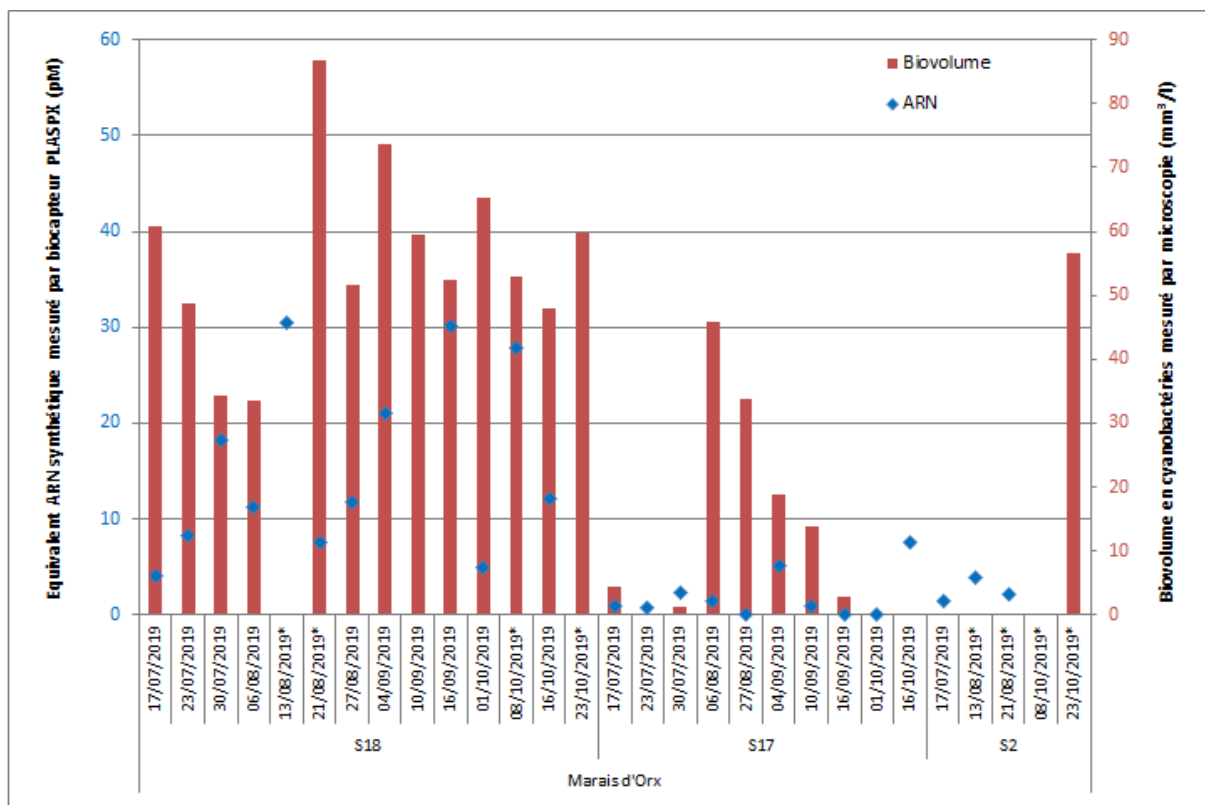
Av Pierre Fabre

66650 BANYULS S/MER

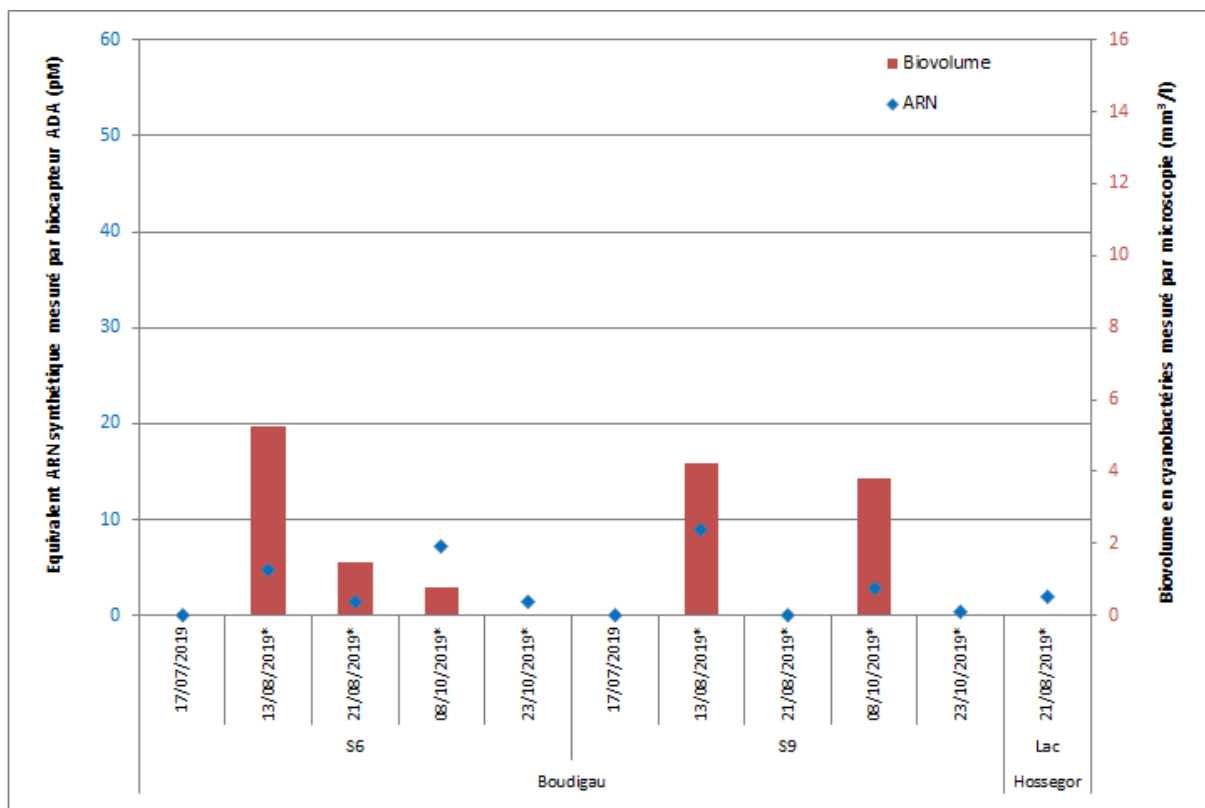
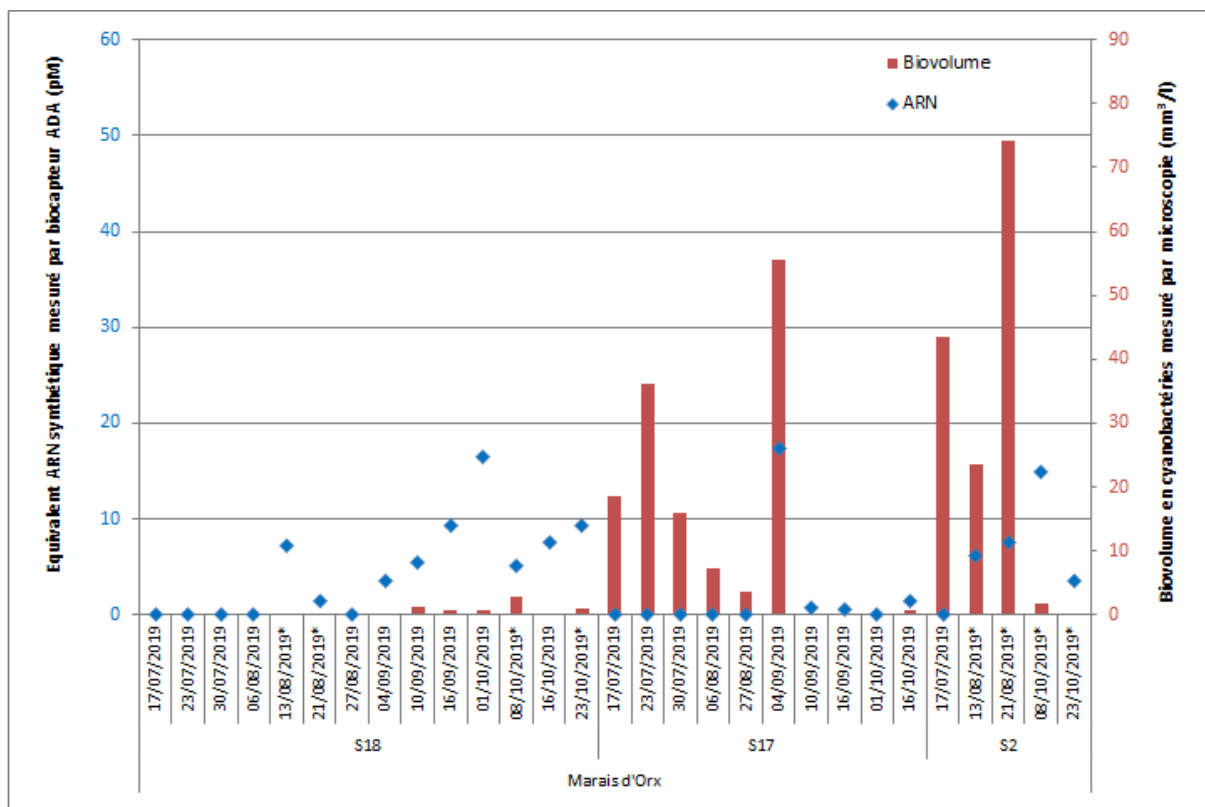
Tél. : +33 (0)4 68 88 73 25 – Mail : [contact@microbiaenvironnement.com](mailto:contact@microbiaenvironnement.com)

## Annexe 8 Évolution temporelle des biocapteurs et des biovolumes correspondants sur les différentes stations en 2019 - Projet CYANOSAFE

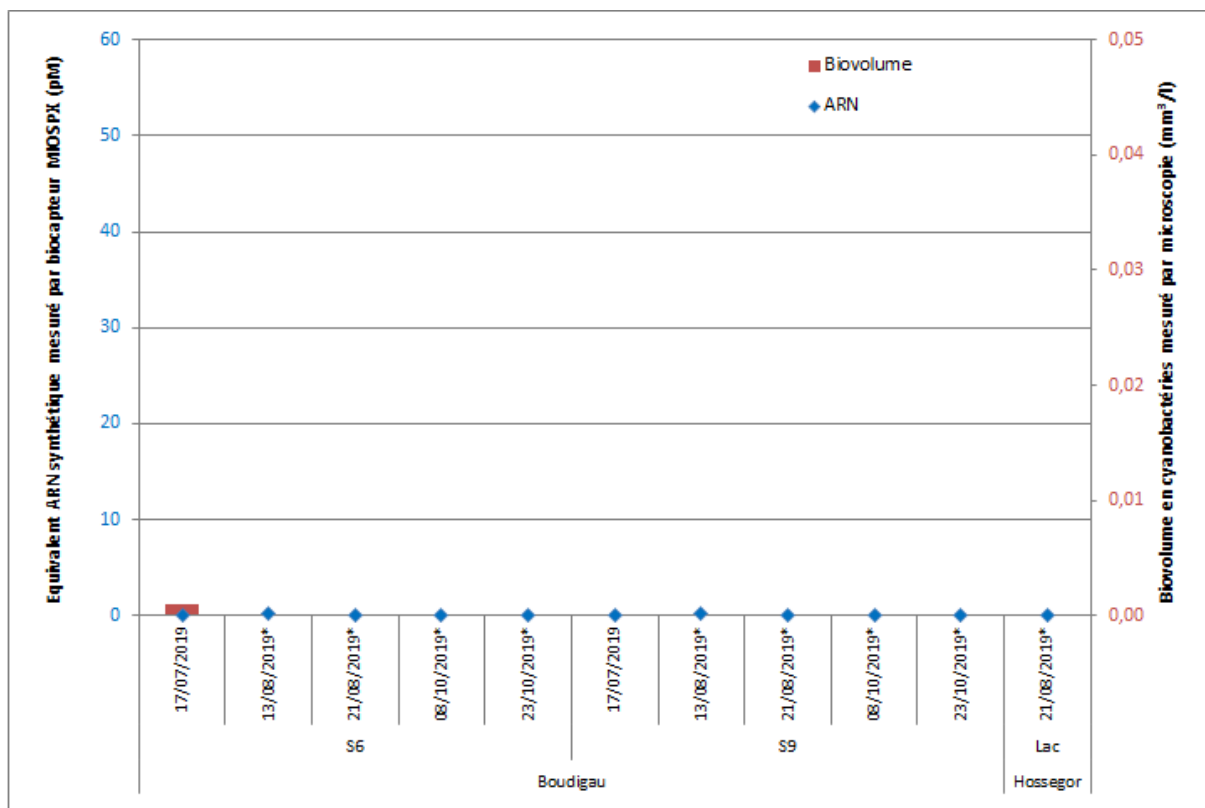
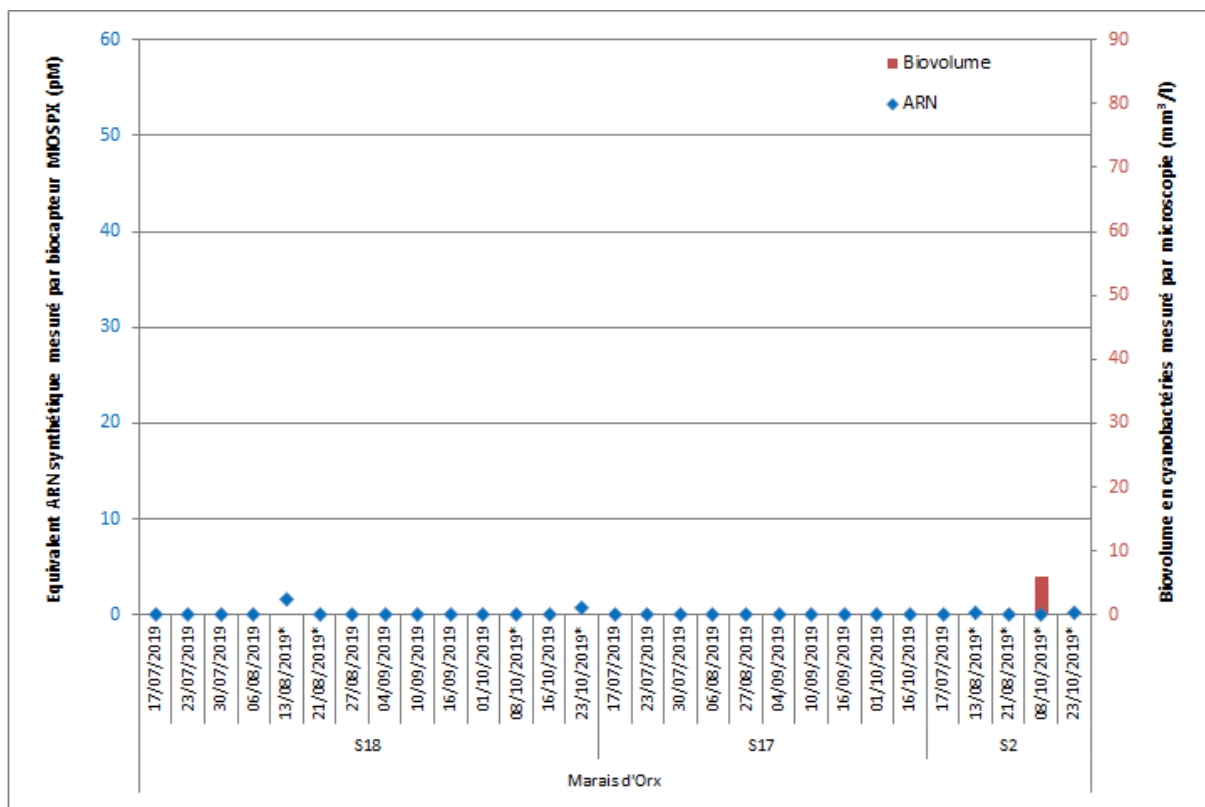
### BIOCAPTEUR PLANKTOTHRIX



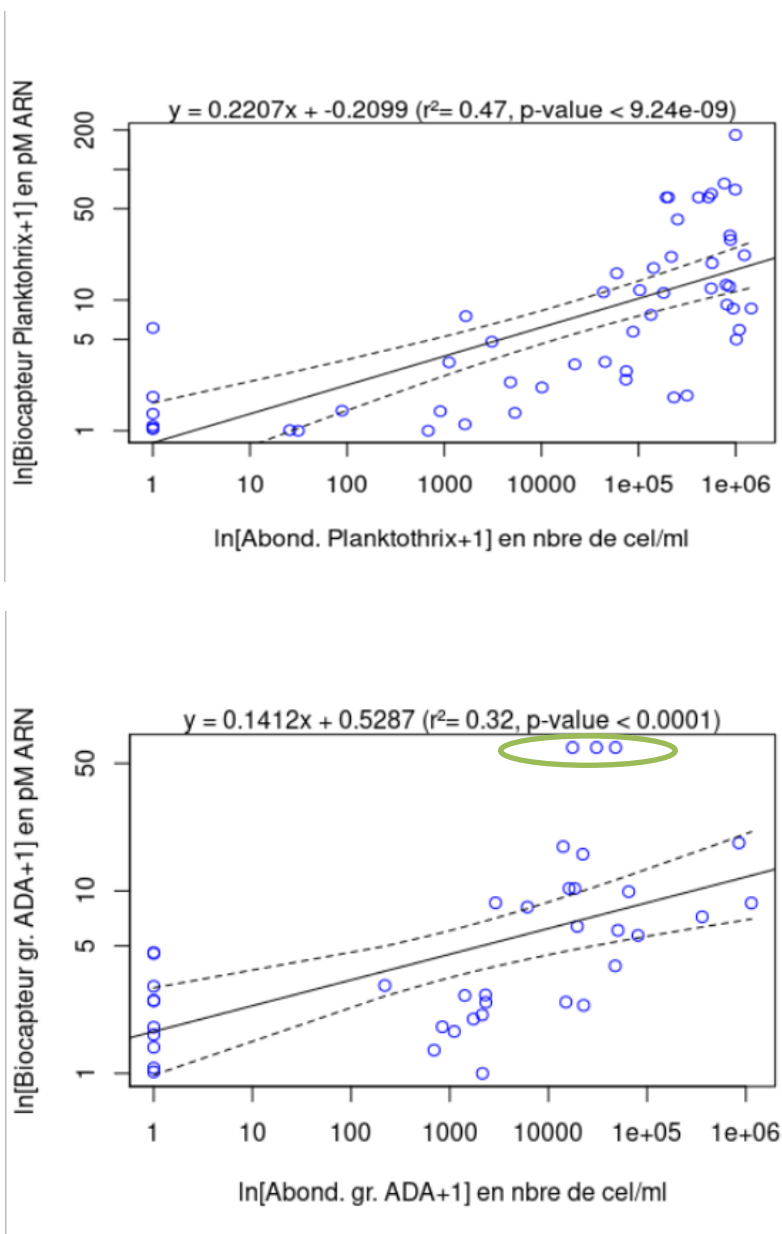
**BIOCAPTEUR ADA**



### BIOCAPTEUR MICROCYSTIS



*Annexe 9 Corrélation entre les activités de cyanobactéries toxinogènes mesurées par les biocapteurs et leurs abondances calculées à partir des observations microscopiques (p-value<0,001) en 2019 et 2020- Projet CYANOSAFE*





**Centre Nouvelle Aquitaine Bordeaux, Cestas**  
50 avenue de Verdun  
33612 CESTAS Cedex  
Tél. : +33 (0)5 57.89.08.00

Rejoignez-nous sur :



<https://www.inrae.fr/centres/nouvelle-aquitaine-bordeaux>