



INSTITUT LOUIS MALARDE

Laboratoire des Biotoxines Marin

BP30 Papeete Tahiti

98713 French Polynesia

STANDARD OPERATIONAL PROCEDURES (SOPS)

SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE DE LA CIGUATERA

Echantillonnage *in situ*

et Traitements des échantillons

TABLE DES MATIERES

1. SOP – Assemblage des window screens	Page 3
2. SOP – Déploiement et collecte des window screens	Page 4-5
3. SOP – Méthode de collecte des macroalgues	Page 6-8
4. SOP – Traitement des échantillons de window screens	Page 9-11
5. SOP – Traitement des échantillons de macroalques	Page 12-13



INSTITUT LOUIS MALARDE
Laboratoire des Biotoxines Marines
BP30 Papeete Tahiti
98713 French Polynesia

STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) - 1

ASSEMBLAGE DES WINDOW SCREENS

Version : 2.0

Date de revue: 11.07.2022

Auteurs: Dr Mireille CHINAIN & Dr Clémence GATTI

Page(s) : 1

Date Validation: 22.07.2022

Vidéo tutorielle accessible via la e-plateforme CIGUAWATCH :

<https://ciguawatch.ilm.pf/ciguatera-environmental-monitoring-methodology-2/>

1/ Liste des matériels requis

- un poids en plomb de 0,5 kg servant à lester le dispositif
- environ 1m de fil de pêche ou de corde de qualité marine
- un flacon en plastique (250 mL) muni d'un couvercle à vis faisant office de flotteur
- un émerillon en inox (de taille n° 2/0)
- un morceau d'écran de moustiquaire en fibre de verre, de 15 x 10 cm (un par échantillon, *non réutilisable*)

2/ Assemblage du dispositif :

- Relier le poids, l'écran de moustiquaire et le flotteur au moyen de la corde, comme suit
- Attacher la corde au poids en plomb
- Attacher le flotteur à l'autre extrémité de la corde au moyen d'un nœud coulant
- Visser le couvercle sur son flacon
- Fixer l'émerillon à environ 35 cm au-dessus du poids en plomb et à 20 cm du flotteur
- Fixer l'émerillon à l'une des extrémités de l'écran de moustiquaire
- Voici comment se présente le dispositif complètement assemblé

3/ Recommandations

- Le poids en plomb peut être remplacé par une bouteille remplie de sable, ou une pierre.
- La bouteille en plastique de 250 ml peut être remplacée par un flotteur classique.
- Le flotteur doit être positionné sous la surface de l'eau.
- Le flotteur peut être peint d'une couleur vive pour faciliter le repérage des sites de déploiement lors de la collecte des dispositifs
- Ne pas accrocher l'émerillon trop au bord du morceau de moustiquaire pour éviter tout risque de déchirure.
- Attention aux fluctuations de la marée : le dispositif doit rester immergé à tout moment



INSTITUT LOUIS MALARDE
Laboratory of Marine Biotoxins
BP30 Papeete Tahiti
98713 French Polynesia

STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) - 2

DEPLOIEMENT ET COLLECTE DES WINDOW SCREENS

Version : 2.0

Date de revue: 11.07.2022

Auteurs: Dr Mireille CHINAIN & Dr Clémence GATTI

Page(s) : 1

Date Validation: 22.07.2022

Vidéo tutorielle accessible via la e-plateforme CIGUAWATCH :

<https://ciguawatch.ilm.pf/ciguatera-environmental-monitoring-methodology-2/>

1/ Liste des Matériels nécessaires

- Un bateau avec l'ensemble des équipements de sécurité règlementaires
- Equipements de plongée en apnée et combinaison de plongée
- x5 dispositifs de window-screen prêts à l'emploi par site d'échantillonnage
- x5 flacons en plastique vissés de 500mL qui serviront de contenants après collecte des WS
- Un appareil GPS pour une localisation précise des sites d'échantillonnage
- Un thermomètre étanche
- Un profondimètre
- Une ardoise de plongée et un crayon
- Un marqueur indélébile
- Une glacière

2/ Déploiement des dispositifs de type WS

- Identifier chacun des dispositifs au moyen d'un marqueur indélébile (n° échantillon, date de déploiement)
- Relever les coordonnées GPS, la température de surface et la profondeur de déploiement
- Consigner l'ensemble de ces informations ainsi que le nom du site, le numéro d'échantillon, la date et l'heure de déploiement sur l'ardoise de plongée.
- Déployer les dispositifs, préférentiellement entre 1,5 et 3 m de profondeur
- Pour une bonne représentativité statistique, au moins 5 WS doivent être déployés par site d'échantillonnage
- Le temps de déploiement ne doit pas excéder 24h pour limiter le biofouling et le broutage des écrans

3/ Collecte des dispositifs après 24h

- Annoter chacun des flacons plastique de 500mL avec le numéro de l'échantillon, la date de déploiement et l'heure de collecte.
- Dévisser le couvercle et remplir le flacon de 500 ml d'eau de mer

- Décrocher délicatement l'émérillon de la corde, en veillant à toucher/secouer le moins possible l'écran de moustiquaire
- Enrouler délicatement l'écran avant de l'insérer dans le flacon de collecte
- Refermer le flacon sous l'eau et le remonter à la surface
- Récupérer le reste du dispositif

4/ Recommandations

- Privilégier les sites à l'abri du courant et des vagues, à proximité de pâtés coralliens colonisés par des tapis de macro-algues
- L'extrémité de l'écran ne doit pas frotter contre le poids
- Les écrans doivent rester immergés en permanence
- Eviter de toucher ou secouer le tapis cellulaire déposé sur l'écran
- Conserver les prélèvements à une température proche de celle de l'eau, et à l'abri du soleil en les plaçant dans une glacière jusqu'au moment de leur traitement
- Si vous ne disposez pas de profondimètres, vous pouvez en fabriquer un à l'aide d'une corde reliée à un plomb et marquée de 50 cm en 50 cm.

5/ Liste des Equipements de Protection Individuels requis

- Il est recommandé de porter des gants de plongée lors des déploiements de WS



INSTITUT LOUIS MALARDE
Laboratoire des Biotoxines Marines
BP30 Papeete Tahiti
98713 French Polynesia

STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) - 3

METHODE DE COLLECTE DES MACROALGUES

Version : 2.0

Date de revue: 11.07.2022

Auteurs: Dr Mireille CHINAIN & Dr Clémence GATTI

Page(s) : 3

Date de validation : 22.07.2022

Vidéo tutorielle accessible via la e-plateforme CIGUAWATCH :

<https://ciguawatch.ilm.pf/ciguatera-environmental-monitoring-methodology-2/>

1 Liste des matériels requis

- Une éprouvette graduée de 1 L
- Un tamis de porosité 200-300 μm
- Un entonnoir adapté à la taille du tamis de 200-300 μm
- Des petits carrés de fibre de nylon de porosité 20 μm , de 4 sur 4 cm
- Une unité de filtration composée d'un entonnoir de 200mL à 500mL, d'une base pour filtres de 25 mm de diamètre, un bouchon, et une fiole de filtration à tubulure latérale de 500ml à 1L
- 1 pompe à vide manuelle
- 2 paires de pinces à embout plat
- Une pissette d'eau de mer filtrée
- Des tubes coniques à bouchon vissé de 15 ml et leur portoir
- Une solution de formol commercial
- Une bouteille d'éthanol absolu
- Des pipettes plastiques de 10 mL conditionnées en emballage individuel
- Une micropipette (P1000) avec embouts jetables
- Des pasteurettes
- Un marqueur indélébile fin
- Un carnet + un stylo
- Un rouleau de parafilm

2/ Traitement des Window Screen

2.1. Filtration des échantillons

- Placer l'entonnoir et le tamis de porosité 200-300 μm au-dessus de l'éprouvette graduée de 1L
- Renverser une partie de l'échantillon sur le tamis pour créer un volume mort dans le flacon de vissé de 500mL contenant le window-screen
- Retourner le flacon plusieurs fois puis l'agiter vigoureusement durant 5-10 secondes pour décrocher les cellules du WS et disperser les amas cellulaires
- Retirer le window-screen du flacon et le jeter.

- ❑ Filtrer la totalité de l'échantillon à travers le tamis de 200-300 µm pour enlever les sédiments et débris de grande taille.
- ❑ Rincer le flacon avec la pissette d'eau de mer filtrée, puis filtrer l'eau de rinçage.
- ❑ Noter le « Volume Total de l'échantillon » indiqué sur l'éprouvette et consigner l'information dans un carnet.
- ❑ Préparer l'unité de filtration en plaçant sur la base de filtration un carré de filtre de nylon de 20 µm de porosité, puis le maintenir en place à l'aide de l'entonnoir de filtration de 200mL à 500mL.
- ❑ Brancher la pompe à main sur la fiole de filtration.
- ❑ Placer un morceau de parafilm sur l'éprouvette graduée et la retourner 2-3 fois afin de remettre les cellules en suspension, puis filtrer immédiatement la totalité de l'échantillon, en procédant par petits volumes. Appliquer une faible pression de temps en temps à l'aide de la pompe manuelle pour accélérer la filtration.
- ❑ Si seule une partie de l'échantillon est filtrée en raison d'un colmatage progressif du filtre de nylon, noter le « Volume Résiduel » indiqué sur l'éprouvette
- ❑ Noter le « Volume Filtré » qui correspond au « Volume Total de l'échantillon - Volume Résiduel » dans le carnet.
- ❑ Pour compléter la filtration, rincer les parois de l'entonnoir de filtration à l'aide d'une pissette d'eau de mer filtrée pour récupérer le matériel cellulaire résiduel sur le filtre de nylon, puis laisser l'eau de rinçage s'écouler par gravité.
- ❑ Avant de traiter l'échantillon suivant, éliminer les débris du tamis de 200-300 µm, et laver soigneusement le tamis, l'entonnoir, l'éprouvette et l'ensemble de l'unité de filtration à l'eau du robinet, puis rincer le tout à l'eau déminéralisée. Sécher à l'aide de papier absorbant.

2.2. Fixation des échantillons

- ❑ Remplir les tubes à bouchon vissé coniques avec 15mL d'eau de mer filtrée
- ❑ Retirer l'entonnoir de l'unité de filtration et saisir délicatement les bords du filtre de nylon à l'aide des pinces à bout plat, puis le plier soigneusement, cellules orientées vers l'intérieur du filtre
- ❑ Transférer immédiatement le filtre de nylon de 20 µm dans un tube vissé conique préalablement rempli d'eau de mer filtrée.
- ❑ Fermer le tube, le retourner puis le tapoter légèrement sur le dessus de la paillasse de manière à immerger complètement le filtre de nylon dans l'eau de mer.
- ❑ Secouer énergiquement le tube pour décrocher les cellules déposées sur le filtre de nylon.
- ❑ Fixer les échantillons dans du formol sous une sorbonne ou dans un espace aéré en ajoutant 600 µl d'une solution de formol dans chaque tube (soit environ 15 gouttes à l'aide d'une pasteurette).
- ❑ Annoter le tube (date, nom du site, n° échantillon, volume total de l'échantillon et volume filtré) à l'aide d'un marqueur indélébile. Prendre soin de reporter ces informations dans le carnet.
- ❑ Sceller hermétiquement les tubes avec du parafilm.
- ❑ Conserver les échantillons à température ambiante jusqu'au moment des numérations de cellules de microalgues au microscope optique.

3/ Recommandations

- ❑ Si les échantillons sont destinés à des analyses moléculaires (PCR en temps réel), fixer les échantillons dans de l'éthanol absolu au lieu du formol. Dans ce cas, remplir directement les tubes à bouchon vissé avec 15mL d'éthanol absolu (au lieu d'eau de mer) avant d'y transférer le filtre de nylon de 20 µm.
- ❑ Si les échantillons sont destinés à des analyses moléculaires, désinfecter l'ensemble du matériel (tamis, entonnoir, verrerie, pinces, etc) en les trempant dans de l'eau de javel à 10% pendant 10

mn pour éliminer tout risque de transfert d'ADN. Puis rincer le tout à l'eau déminéralisée et laisser sécher.

- ❑ L'échantillon est maintenant prêt pour le dénombrement cellulaire au microscope ou en utilisant la technique de qPCR

4/ Liste des Equipements de Protection Individuels requis

- ❑ le bateau devra être équipé de l'ensemble des équipements de sécurité règlementaires
- ❑ Il est recommandé de porter des gants de plongée lors des échantillonnages en milieu marin pour limiter les risques de piqûres ou de morsures par la faune marine



INSTITUT LOUIS MALARDE
Laboratoire des Biotoxines Marines
BP30 Papeete Tahiti
98713 French Polynesia

STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) - 4

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE WINDOW SCREENS

Version : 2.0

Date de revue : 11.07.2022

Auteurs: Dr Mireille CHINAIN & Dr Clémence GATTI

Page(s) : 3

Date de validation : 22.07.2022

Vidéo tutorielle accessible via la e-plateforme CIGUAWATCH :

<https://ciguawatch.ilm.pf/ciguatera-environmental-monitoring-methodology-2/>

1 Liste des matériels nécessaires

- Une éprouvette graduée de 1 L
- Un tamis de porosité 200-300 µm
- Un entonnoir adapté à la taille du tamis de 200-300 µm
- Des petits carrés de fibre de nylon de porosité 20 µm, de 4 sur 4 cm
- Une unité de filtration composée d'un entonnoir de 200mL à 500mL, d'une base pour filtres de 25 mm de diamètre, un bouchon, et une fiole de filtration à tubulure latérale de 500ml à 1L
- 1 pompe à vide manuelle
- 2 paires de pinces à embout plat
- Une pissette d'eau de mer filtrée
- Des tubes coniques à bouchon vissé de 15 ml et leur portoir
- Une solution de formol commercial
- Une bouteille d'éthanol absolu
- Des pipettes plastiques de 10 mL conditionnées en emballage individuel
- Une micropipette (P1000) avec embouts jetables
- Des pasteurettes
- Un marqueur indélébile fin
- Un carnet + un stylo
- Un rouleau de parafilm

2/ Traitement des Window Screen

2.1. Filtration des échantillons

- Placer l'entonnoir et le tamis de porosité 200-300 µm au-dessus de l'éprouvette graduée de 1L
- Renverser une partie de l'échantillon sur le tamis pour créer un volume mort dans le flacon de vissé de 500mL contenant le window-screen
- Retourner le flacon plusieurs fois puis l'agiter vigoureusement durant 5-10 secondes pour décrocher les cellules du WS et disperser les amas cellulaires
- Retirer le window-screen du flacon et le jeter.
- Filtrer la totalité de l'échantillon à travers le tamis de 200-300 µm pour enlever les sédiments et débris de grande taille.
- Rincer le flacon avec la pissette d'eau de mer filtrée, puis filtrer l'eau de rinçage.

- ❑ Noter le « Volume Total de l'échantillon » indiqué sur l'éprouvette et consigner l'information dans un carnet.
- ❑ Préparer l'unité de filtration en plaçant sur la base de filtration un carré de filtre de nylon de 20 µm de porosité, puis le maintenir en place à l'aide de l'entonnoir de filtration de 200mL à 500mL.
- ❑ Brancher la pompe à main sur la fiole de filtration.
- ❑ Placer un morceau de parafilm sur l'éprouvette graduée et la retourner 2-3 fois afin de remettre les cellules en suspension, puis filtrer immédiatement la totalité de l'échantillon, en procédant par petits volumes. Appliquer une faible pression de temps en temps à l'aide de la pompe manuelle pour accélérer la filtration.
- ❑ Si seule une partie de l'échantillon est filtrée en raison d'un colmatage progressif du filtre de nylon, noter le « Volume Résiduel » indiqué sur l'éprouvette
- ❑ Noter le « Volume Filtré » qui correspond au « Volume Total de l'échantillon - Volume Résiduel » dans le carnet.
- ❑ Pour compléter la filtration, rincer les parois de l'entonnoir de filtration à l'aide d'une pissette d'eau de mer filtrée pour récupérer le matériel cellulaire résiduel sur le filtre de nylon, puis laisser l'eau de rinçage s'écouler par gravité.
- ❑ Avant de traiter l'échantillon suivant, éliminer les débris du tamis de 200-300 µm, et laver soigneusement le tamis, l'entonnoir, l'éprouvette et l'ensemble de l'unité de filtration à l'eau du robinet, puis rincer le tout à l'eau déminéralisée. Sécher à l'aide de papier absorbant.

2.2. Fixation des échantillons

- ❑ Remplir les tubes à bouchon vissé coniques avec 15mL d'eau de mer filtrée
- ❑ Retirer l'entonnoir de l'unité de filtration et saisir délicatement les bords du filtre de nylon à l'aide des pinces à bout plat, puis le plier soigneusement, cellules orientées vers l'intérieur du filtre
- ❑ Transférer immédiatement le filtre de nylon de 20 µm dans un tube vissé conique préalablement rempli d'eau de mer filtrée.
- ❑ Fermer le tube, le retourner puis le tapoter légèrement sur le dessus de la paillasse de manière à immerger complètement le filtre de nylon dans l'eau de mer.
- ❑ Secouer énergiquement le tube pour décrocher les cellules déposées sur le filtre de nylon.
- ❑ Fixer les échantillons dans du formol sous une sorbonne ou dans un espace aéré en ajoutant 600 µl d'une solution de formol dans chaque tube (soit environ 15 gouttes à l'aide d'une pasteurette).
- ❑ Annoter le tube (date, nom du site, n° échantillon, volume total de l'échantillon et volume filtré) à l'aide d'un marqueur indélébile. Prendre soin de reporter ces informations dans le carnet.
- ❑ Sceller hermétiquement les tubes avec du parafilm.
- ❑ Conserver les échantillons à température ambiante jusqu'au moment des numérations de cellules de microalgues au microscope optique.

3/ Recommandations

- ❑ Si les échantillons sont destinés à des analyses moléculaires (PCR en temps réel), fixer les échantillons dans de l'éthanol absolu au lieu du formol. Dans ce cas, remplir directement les tubes à bouchon vissé avec 15mL d'éthanol absolu (au lieu d'eau de mer) avant d'y transférer le filtre de nylon de 20 µm.
- ❑ Si les échantillons sont destinés à des analyses moléculaires, désinfecter l'ensemble du matériel (tamis, entonnoir, verrerie, pinces, etc) en les trempant dans de l'eau de javel à 10% pendant 10 mn pour éliminer tout risque de transfert d'ADN. Puis rincer le tout à l'eau déminéralisée et laisser sécher.

- L'échantillon est maintenant prêt pour le dénombrement cellulaire au microscope ou en utilisant la technique de qPCR

4/ Liste des Equipements de Protection Individuels requis

- Porter des lunettes de laboratoire
- Fixation des échantillons: si le fixateur privilégié est le formol, travailler impérativement , sous une hotte chimique ou dans un milieu bien ventilé
- Fixation des échantillons: porter des gants de laboratoire lors de la manipulation du formol et des tubes contenant les échantillons fixés



INSTITUT LOUIS MALARDE
Laboratoire des BiotoxinesMarine
BP30 Papeete Tahiti
98713 French Polynesia

STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP) - 5

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS DE MACROALGUES

Version : 2.0

Date de revue : 11.07.2022

Aueurs: Dr Mireille CHINAIN & Dr Clémence GATTI

Page(s) : 3

Date de vlication : 22.07.2022

Vidéo tutorielle accessible via la e-plateforme CIGUAWATCH :

<https://ciguawatch.ilm.pf/ciguatera-environmental-monitoring-methodology-2/>

1/ Liste des matériels nécessaires (liste à droite + image matériel à gauche)

- Trois tamis de porosité décroissante : 125 μm , 40 μm et 20 μm
- Des tubes coniques à bouchon vissé de 50 mL et leur portoir
- Un marqueur indélébile fin
- Un réservoir d'eau de mer prélevée provenant des sites d'échantillonnage
- Une pissette remplie d'eau de mer filtrée
- Un petit entonnoir
- Deux éprouvettes graduées de 100 mL
- Un rouleau de parafilm
- Des pipettes plastique de 5 ml et système d'aspiration
- Un carnet de note et un stylo
- Une bouteille de formol commercial (37%)
- Une micropipette (P1000) avec embouts jetables
- Des pasteurettes
- Une balance portable
- Un pinceau d'environ 3 cm de large

2/ Traitement des prélèvements de macroalgues

2.1 Filtration des échantillons de macroalgues

- Empiler les 3 tamis par ordre décroissant de porosité (de 125 μm à 20 μm).
- Identifier les tubes de 50 mL (nom du site, n° d'échantillon, date d'échantillonnage et taille de la fraction, i.e. « F.40 μm » ou « F.20 μm » à l'aide d'un marqueur indélébile, et les replacer sur leur portoir.
- Après avoir ménagé un peu d'air dans la partie supérieure du sac plastique, secouer vigoureusement puis malaxer délicatement l'échantillon de macroalgue pendant environ 30s pour décrocher les cellules de microalgues de leur substrat macroalgal.
- Verser progressivement toute l'eau contenue dans le sac plastique à travers les trois tamis empilés
- Pour résoudre les problèmes de colmatage des tamis, saisir successivement les tamis et les tapoter délicatement jusqu'à filtration complète de l'eau de mer.

- Remplir à nouveau le sac plastique d'eau de mer jusqu'à recouvrir complètement l'échantillon de macroalgues, puis le secouer et le traiter comme décrit plus haut.
- Retirer le tamis de 125 μm (*zoomer sur les débris retenus sur le filtre*)
- Recueillir le résidu cellulaire retenu sur le tamis de 40 μm en penchant le tamis d'une main puis rassembler la totalité du rétentat cellulaire dans la partie inférieure du tamis à l'aide d'une pissette remplie d'eau de mer filtrée.
- Transférer la totalité de la fraction 40 μm dans une éprouvette graduée à l'aide d'un petit entonnoir, et ramener l'échantillon jusqu'à un volume total de 40 ml.
- Placer un morceau de parafilm sur l'éprouvette graduée et la retourner 2-3 fois afin de remettre les cellules en suspension puis transférer immédiatement la totalité de la fraction 40 μm dans le tube de 50 mL étiqueté « F.40 μm ».
- Procéder de même avec le tamis de 20 μm en prenant soin d'utiliser une nouvelle éprouvette graduée, puis transférer le résidu cellulaire correspondant à la fraction 20 μm dans le tube de 50 mL étiqueté « F.20 μm ».
- Egoutter l'échantillon de macro-algue à l'aide de papier absorbant et les peser à l'aide de la balance portable
- Noter l'espèce et le poids de chaque échantillon de macro-algue (cette valeur sera nécessaire pour déterminer le nombre de cellules de microalgues/g de poids sec d'algue).
- Avant de traiter l'échantillon suivant, éliminer les débris retenus sur le tamis de porosité 125 μm à l'aide d'un pinceau, et laver soigneusement les tamis, l'entonnoir et les éprouvettes graduées à l'eau du robinet, puis rincer le tout à l'eau déminéralisée et laisser sécher.

2.2 Fixation des échantillons de macroalgues

- Fixer les échantillons dans du formol sous une sorbonne ou dans un espace aéré en ajoutant 1,6 mL d'une solution de formol dans chaque tube (soit environ 38 gouttes à l'aide d'une pasteurette)
- Sceller hermétiquement les tubes avec du parafilm
- Conserver les échantillons à température ambiante jusqu'au moment des numérations de cellules de microalgues au microscope optique.

3/ Recommandations

- Ne pas malaxer les échantillons de macro-algues trop énergiquement pour éviter de lyser les cellules de microalgues.
- Lors de l'étape de filtration, procéder de manière progressive, en veillant à ce que les fractions 40 μm et 20 μm ne débordent pas des tamis.
- Si des essais d'isolement de cellules sont prévus en vue de l'établissement de cultures *in vitro*, il est impératif de prélever un petit aliquot (environ 5 mL) de la fraction 40 μm à l'aide d'une pipette et pompe, **avant** l'étape de fixation des échantillons. Dans ce cas, prendre soin de relever et noter le volume final résiduel indiqué sur l'éprouvette graduée.

4/ Liste des Equipements de Protection Individuels requis

- Porter une paire de lunettes de labotatoire
- Fixation des échantillons: si le fixateur privilégié est le formol, travailler impérativement sous une hotte chimique ou dans un milieu bien ventilé
- Fixation des échantillons: porter des gants de laboratoire lors de la manipulation du formol et des tubes contenant les échantillons fixés