UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE AGRICULTURE, ALIMENTATION, BIOLOGIE, ENVIRONNEMENT, SANTE (ABIES)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Discipline : ***PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS***

Spécialité :Ecotoxicologie

Présentée et soutenue publiquement par **Pierre BOUTEILLER VAN HORRICK**

Le 14 septembre 2023

Méthodes d'analyse des microcystines totales par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem dans des matrices poisson

---

Thèse co-dirigée par **THIERRY GUERIN & STEPHANE BETOULLE**
et co-encadrée par **RONEL BIRE & EMILIE LANCE**

JURY

M. Vitor Vasconcelos,	Professeur,	Faculdade de Ciências, Universidade do Porto,	**Président du jury**
Mme Linda Lawton,	Professeure,	Robert Gordon University Aberdeen,	**Rapporteure**
Mme. Elisabeth J Faassen,	Chargé de Recherche HDR,	Wageningen Food Safety Research,	**Examinatrice**
M. Damien Réveillon,	Directeur de Recherche,	Ifremer Nantes,	**Examinateur**
M. Thierry Guérin,	Directeur de Recherche,	Anses, DRP Maisons-Alfort	**Directeur de thèse**
Mme Emilie Lance,	Maître de Conférences,	UMR I-02 SEBIO, URCA,	**Co-encadrante**
M. Ronel Biré	Chargé de Recherche,	Anses, LSAL Maisons-Alfort	**Co-encadrant**

Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments,
Unité Pesticides et Biotoxines Marines (PBM)
14 rue Pierre et Marie Curie - 94701 Maisons-Alfort Cedex

Remerciements

J’aimerais tout d’abord remercier mon directeur de thèse, Thierry Guérin, pour ses conseils prodigués tout au long de ma thèse ainsi que sa relecture méticuleuse de chacun des chapitres m’ayant sans aucun doute permis de préciser mon propos. Je remercie par ailleurs mon co-directeur de thèse Stéphane Betoulle qui a pu me conseiller lors de la préparation de certaines expérimentations réalisées pendant mon doctorat.

Un énorme merci à Emilie Lance et Ronel Biré, mes encadrants de thèse. Votre bonne humeur, votre positivité et vos précieux conseils ont été un moteur pendant ma thèse. Je vous remercie de m’avoir laissé de l’autonomie pendant ces 3 ans, autant sur l’organisation et la réalisation de cette thèse que sur les choix scientifiques (tout en étant toujours disponible pour en discuter !).

Je tiens également à remercier l’ensemble des personnes de l’ANSES avec qui j’ai partagé du temps et encore plus particulièrement les membres des unités Pesticides et Biotoxines Marines et ET2M que j’ai cotoyé au quotidien pendant mon doctorat. Merci à Gwenaëlle, Marina et Dary, promis je ne vous embetterai plus pour des problèmes de spectro … Merci à Antoine et Vincent pour les parties de fléchettes le midi. Caroline, Marion et Fiona, vous avez été toujours été là pour me donner un coup de main et me donner le sourire et pour cela je vous en remercie !! Merci à Chimène et Hanène avec qui j’ai partagé le bureau et qui m’ont donc supporté tout ce temps ainsi qu’a Karel, Kam-Eng, Sophie, Jacques, Patricia, Jeannette et Sophie. Merci également l’ensemble des doctorants et des stagiaires de l’ANSES : Marianna, Yassine, Yoann, Tierno, Isabelle, Jaber, Siham, Justine, Léa, Maëlis avec qui j’ai partagé des bons moments !

First of all, I'd like to thank Pierce McCarron for agreeing to welcome me to his laboratory in Halifax. I would also like to thank Chris Miles for helping me to set up this PhD mobility project, for welcoming me to the laboratory and for his 5 months in Canada, during which you were able to give me all this advice and during which I learnt an enormous amount about spectrometry (and how to make a decent cup of coffee ;)). Thanks also to all the members of the NRC Halifax BTM unit, Callie, Lydia, Cheryl, Krista, Elliot, Beth, Sabrina and Ruth.

I have some incredible memories of these months in Canada, including all the people I met, especially the Wednesday night Trivia team.

Pour finir je voudrais faire un petit clin d'œil à ma famille et à mes amis. A ma mère et mon père toujours à l'écoute et qui m'ont donné la motivation, ma sœur Zoé et mes frères Thomas, Simon et Joachim (et bon courage Tom pour la tienne). Et surtout merci au Gangzi, Bougo et Yves qui ont dû me supporter pendant l'écriture de ma thèse, Ju et Taz pour vos passages le soir au 85, FJ et Andrea, la team tennis (0 défaites au compteurs) : Léo, Eliot, Manu, Ribz et Hélo, la barigoule : Moby, CDC, Almab, Olive. Et merci aux petits potes Débo, Cam, Greg, Dla, Luig, Rémus, Hubz, TT, Fargui !

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide de différents financeurs qui, au travers de leur soutien matériel, ont reconnu mon travail et m'ont fait confiance : la DRP de l'ANSES Maisons-Alfort, l'unité PBM de l'ANSES, l'UMR SEBIO de l'URCA, ainsi que l'école doctorale ABIES.

A Claire Bouteiller,
j'aurais été si fier que tu puisses voir l'aboutissement de ce travail

Liste des abréviations

4-PB	Acide 4-phenylbutyrique
Adda	3-amino-9-méthyoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényl-4,6-décadiénoïque
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Arg	Arginine
ATP	Adénosine triphosphate
CaMKII	Ca2+/calmoduline-protéine kinase II
Chl-a	Chlorophylle a
CYS	L-Cystéine
CYS-GLY	Cystéineglycine
Cyt	Cytochrome
Dhb	Déhydrobutyrine
DW	Dry weight
EDCH	Eaux destinées à la consommation humaine
EI-GC/MS	Chromatographie gazeuse à ionisation électronique/spectrométrie de masse
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Ionisation par électronébulisation
FA	Formic acid
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplé à un spectromètre de masse
GSH	Glutathion
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance
HPCE	Electrophorèse capillaire à haute performance
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
HPLC-DAD	Chromatographie liquide à haute pression couplé à un détecteur diode array
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
IAC	Colonne d'immuno-affinité
ICNB	Code internationale de nomenclature botanique
ICNP	Code international de nomenclature des procaryotes
IP	Injection intra-péritonéale
LC-MS	Chromatographie liquide couplé à un spectromètre de masse
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LID	Désorption par irradiation Laser
LLE	Extraction liquide-liquide
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MAPK	Mutagen-activated protein kinases
MC/MCs	Microcystine(s)
Mdha	N-méthyl-déhydroalanine
ACN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
MIP	Polymères à empreintes moléculaires
MMPB	Acide 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyrique
N-AcCys	N-acetylcysteine

NaOH	Hydroxyde de sodium
NOAEL	No observable adverse effect level
NOD	Nodularine
OATP	Polypeptides transporteurs d'anions organiques
PBS	Phycobilisomes
PP/PPs	Proteine(s) phosphatase(s)
PPIA	Test d'inhibition de la protéine phosphatase
PS	Photosystème
RGE	Rabbit gastric extract
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SLE	Solid-liquid extraction
SPE	Extraction sur phase-solide
TFA	Acide trifluoroacetique
TSP-LC/MS	Chromatographie liquide thermospray/spectrométrie de masse
Tyr	Tyrosine
γ-Glu-Cys	γ-L-glutamyl-L-cysteine

Table des matières

Table des matières ix
Liste des figures xiii
Liste des tableaux xvi
Publications et communications xviii

Introduction Générale 1

Chapitre I Synthèse Bibliographique 9
1. Les cyanobactéries 11
1.1. Aspects taxonomiques et organisation interne 11
1.2. Diversité morphologique et écologique 12
1.3. Capacités de proliférations des cyanobactéries 14
1.4. Impacts des cyanobactéries 15
1.5. Les métabolites secondaires des cyanobactéries 16
2. Les cyanotoxines MC 19
2.1. Généralités 19
2.2. Formes libres et formes liées 20
2.3. Toxicité des MC 20
3. Accumulation des MC dans les organismes aquatiques 23
4. Méthodes d'analyses des MC libres 32
4.1. Méthodes d'extraction des MC libres 32
4.2. Méthodes de purifications 33
4.3. Méthodes d'analyses 39
5. Méthodes d'analyses des MC totales 44
5.1. Synthèses des travaux 44
5.2. Analysis of total-forms of cyanotoxins microcystins in biological matrices: a methodological review 49

Chapitre 2 Comparaison et validation des protocoles d'extraction pour l'analyse des microcystines libres dans les matrices de poisson par LC-MS/MS 79

1. Synthèse des travaux 81

2. Comparison and validation of extraction protocols for the analysis of free microcystins in fish matrices by LC-MS/MS 83

2.1. Abstract 83

2.2. Introduction 83

2.3. Experimental 91

2.4. Results & discussion 94

2.5. Conclusion 98

2.6. Acknowledgements 99

2.7. References 99

Chapitre 3 Analyse par oxydation de Lemieux et LC-MS/MS des MC totales dans des échantillons de poissons et des moules aquatiques : optimisation et comparaison de deux protocoles 107

1. Synthèses des travaux 109

2. Analysis of total microcystins by Lemieux oxidation and LC-MS/MS of aquatic fish and mussels: optimization and comparison of protocol 112

2.1. Abstract 112

2.2. Introduction 112

2.3. Experimental 114

2.4. Results 119

2.5. Discussion 125

2.6. Conclusion 130

2.7. Aknowledgements 130

2.8. References 131

Chapitre 4 Cinétique d'accumulation et d'élimination des MC-LR libres et liées aux protéines chez les carpes exposées lors d'épisodes de prolifération cyanobactérienne et lors d'expositions contrôlées aux MC 135

1. Synthèse des travaux 137

2. Kinetics of accumulation and elimination of free and protein-bound MC-LR in carp exposed during cyanobacterial bloom episodes and during controlled exposures to microcystins 141

2.1. Abstract 141

2.2. Introduction 142

2.3. Experimental 143

2.4. Results & discussions 147

2.5. Conclusion 154

2.6. Acknowledgements 156

2.7. References 156

Chapitre 5 Application de la déconjugaison à pH basique suivie d'une réduction comme alternative qualitative à l'oxydation de Lemieux pour l'analyse de conjugués microcystines-peptides 158

1. Synthèses des travaux 160

2. Application of base-catalyzed deconjugation followed by a reduction as a qualitative alternative to Lemieux oxidation for analysis of microcystin–peptide thiol-conjugates 162

2.1. Abstract 162

2.2. Introduction 163

2.3. Experimental 165

2.4. Results & discussion 169

2.5. Conclusion 175

2.6. Acknowledgements 175

2.7. References 175

Discussion Générale 178

Conclusion Générale 194

Réfèrences bibliographiques 198

Annexes 216

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation d'une cellule végétative de cyanobactéries, modifié d'après (9). 11

Figure 2 : Diversité morphologique des cyanobactéries d'après (10). 12

Figure 3 : Différentes localisation des efflorescences de cyanobactéries dans un écosystème d'eau douce, d'après (74). 14

Figure 4 : Représentation topologique d'une MC. 19

Figure 5 : Vue d'ensemble du complexe de la structure cristalline de la microcystine-LR et de la PP-1c d'après (90). 20

Figure 6 : Mécanismes de toxicité de la MC-LR dans les tissus des mammifères, modifié d'après (20). 23

Figure 7 : Biocapteurs pour la détection des MC. Modifié d'après (15). 44

Figure 8 : Topological representation of a MC. 51

Figure 9 : Structure of microcystin-LR (MC-LR) with its specific Adda moiety subject to Lemieux oxidation resulting in MMPB production (modified after Suchy and Berry [61]). .. 53

Figure 10 : The different stages of MMPB method. 53

Figure 11 : A schematic representation of (1) the mechanism of conjugation of the $Mdha^7$/Dha^7 moiety of MCs with different thiols to create MCs-thiols derivatives as model compound for (2) deconjugation reaction with base (modified after [114]). 69

Figure 12 : Comparison of the step of three extraction protocols (here referred to as "FreeMC1" adapted from [42], "Free MC2" adapted from [16] and "Free MC3" adapted from [43] for the extraction of free MCs selected from the scientific literature and compared on fresh fish matrices spiked with MC-LR and -RR. 92

Figure 13: Recovery test results for the three free MCs extraction protocols. Average recovery yield of salmon or trout fillet samples spiked at 30 and 100 ng/g (n=6) with A) MC-RR and B) MC-LR, as a function of extraction protocol and matrix. Average recovery yield of salmon or trout fillet samples (n=6) spiked with C) MC-RR and D) MC-LR, as a function of extraction protocol and spiking concentration. 95

Figure 14: Matrix effect induced by salmon and trout matrices when using A) the "FreeMC1" protocol to extract MC-RR (n=3), B) the "FreeMC1" protocol to extract MC-LR (n=3). C) the

"FreeMC3" protocol to extract MC-RR (n=3), and D) the "FreeMC3" protocol to extract MC-LR (n=3). 97

Figure 15: Graphical representation of the protocol followed to evaluate the performance of the SPE and evaporation steps. 116

Figure 16: Comparison of two methods of quantification of blank salmon filet spiked with MC-LR [0.5 and 2.3 µg/g] during Lemieux oxidation (n=3). 118

Figure 17: Comparison of the percentage of MMPB recovery from three SPE cartridges (Oasis HLB with 2 elution volumes 1 and 2 mL, SampliQ and Strata SDB-L) as a function of the volume of oxidant solution add to the sample (20 or 35 mL) and as a function of the sample composition (H2O; oxidant solution (0.1 M KMnO4 and 0.1 M INaO4); H2O and 1 g of fresh salmon fillet; oxidant solution (0.1 M KMnO4 and 0.1 M INaO4) and 1 g of fresh salmon fillet) (n=3). Error bars corresponds to SD. 120

Figure 18: Graphical abstract 142

Figure 19: “Red" fish food on the left, "Brown" on the right. 144

Figure 20 : qualitative test concerning the behavior of fish food "Red" on the left, and "Brown" on the right after immersion in water for 1, 3 and 60 min. 148

Figure 21: extraction yields of free MC-LR and -RR (A) and matrix effects in LC-MS/MS assay (B) for two types of fish feed..... 148

Figure 22 : evolution of the percentage of the initial dose of spiked MC-LR in A: "Red" fish food and B: “Brown” fish food as a function of immersion time in water and spiking method with or without drying. 149

Figure 23: Graphical abstract 163

Figure 24. Structures of MCs used in the study (1 - 5). 165

Figure 25. Thiols (A) and amines (B) (a – j) conjugated to the MCs 1- 5 **Figure 24**) to create model MCs-proteins compound (**Figure 26**). 166

Figure 26. LC–HRMS chromatograms of conjugation reactions of toxins (1–5, **Figure 24** with GSH and CYS (a and b). 167

Figure 27. Reduction of the MC mix of standards $NaBH_4$. 168

Figure 28: Schematic representation of the reactions involved in deconjugation experiments. Peptide-conjugated MCs first underwent a catalyzed base deconjugation followed by a reduction reaction to obtain a deconjugated, non-reactive MC. 170

Figure 29. Deconjugations experiment on MC-LR-proteins conjugates with basic treatment (NaOH) and reduction of the deconjugated forms with $NaBH_4$. 172

Figure 30. Results of deconjugation experiment 4 with all tested conjugates, (toxins 1-5, **Figure 24**, each conjugated with a and b, **Figure 25**)..... 174

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux genres de cyanobactéries productrices de cyanotoxines en fonction de la catégorie de cyanotoxines, la structure chimique ainsi que leurs modes d'actions (11, 85). 18

Tableau 2 : Synthèse bibliographique des études de bioaccumulation de MC dans les tissus de poissons en fonction de la méthode d'exposition (gavage, injection IP, alimentation volontaire et balnéation) avec des MC ou des cyanobactéries productrices de MC. PS : poids sec. 25

Tableau 3 : Quelques exemples de protocoles d'extraction/purification (SPE / IAC / LLE) pour l'analyse des MC en fonction de la matrice étudiée. 36

Table 4 : A comparison of the various conditions of the MMPB method protocols in scientific publications (modified after Anaraki et al. [87])). (n.s.: not specified; dw: dry weight). 62

Table 5: Some examples of extraction/purification and analysis protocols for MCs according to the investigated matrix. 85

Table 6 : Results of the validation performed using the criteria approach of the NF V03-110 standard [44]. 98

Table 7: Comparison of the yield of Lemieux oxidation method on MMPB spiked salmon matrices (n=2, for fresh salmon samples and n=3, for freeze-dried salmon samples). 122

Table 8: Comparison of the yields of the MMPB method according to the nature of the matrix: fresh or freeze-dried during the different steps of the Lemieux1 protocol (n=3). 122

Table 9: Quantification of salmon fillet samples spiked with MC-LR at two concentration levels (477.8 ng/g and 2.3 µg/g, equivalent to 100 ng/g and 500 ng/g of MMPB, respectively) and extracted with the "Lemieux 1" protocol. 123

Table 10: Comparison of two MMPB protocols ("Lemieux1" and "Lemieux2" tested on three types of matrices (salmon filet spiked with MC-LR, filet and liver of naturally contaminated carp, digestive gland or whole body of freshwater mussels *A. anatina*) (n=3, for each types of matrices). 127

Table 11: Sampling plan for the experiment indicating the number of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) used during the MC-LR exposure ("Expo") and depuration ("Dep") phases. 145

Table 12: Quantity of free MC-LR found in the various tissues of carp exposed to two different doses of MC-LR through voluntary daily feeding. 150

Table 13: Results of Lemieux oxidation on carp tissues (fillet and liver) after the kinetic study. 152

Table 14: Results of Lemieux oxidation on carp tissues (fillet, kidney, liver) collected in Pannecière (France) or Qaraoun (Lebanon) lakes during periods of cyanobacterial proliferation 155

Table 15: Exact masses used for MCs on the MC mix, and their GSH and CYS conjugates. 169

Publications et communications

Publications

Bouteiller P, Lance E, Guérin T, Biré R, Analysis of Total-Forms of Cyanotoxins Microcystins in Biological Matrices: A Methodological Review. Toxins 2022, 14, 550.

- En cours :

Bouteiller P, Biré R, Foss A, J, Guérin T, Lance E, Analysis of total forms of the cyanotoxins microcystins by LC-MS/MS in aquatics organisms with Lemieux oxidation: optimization and comparison of protocols

Bouteiller P, Lance E, Guérin T, Biré R, Miles C, Base catalyzed deconjugation as a qualitative alternative to Lemieux oxidation: application of a basic deconjugation followed by a reduction on microcystin-proteins compounds

Miles C, Beach D, Giddings S, Bouteiller P, Foss, Identification of [Bama^{7}]MC-LA, and reactivity of microcystins with ammonia, methylamine, and L-lysine, raise the prospect of N-linked microcystin–protein conjugates

Communications orales

Bouteiller P, Biré R, Betoulle S, Guérin T, Lance E, Analyse des microcystines totales dans la matrice poisson, bioaccessibilité et biodisponibilité pour le consommateur (BioADMic). Cyanodays 2021, GIS Cyanobactéries (en ligne), 28 janvier 2021.

Bouteiller P, Biré R, Betoulle S, Guérin T, Lance E, Kinetics of accumulation and elimination of free and protein-bound forms of cyanotoxin microcystin-LR in carp (BioADMic)
Cyanodays 2022, GIS Cyanobactéries, ISARA Lyon, 18 et 19 mai 2022.

Bouteiller P, Lance E, Betoulle S, Guérin T, Biré R, Kinetics of accumulation and elimination of free and protein-bound forms of cyanotoxin microcystin-LR in carp (BioADMic). 12th International Conference on Toxic Cyanobacteria, ICTC 2022, University of Toledo, Toledo, OH, USA, 22 au 27 mai 2022.

Bouteiller P, Biré R, Betoulle S, Guérin T, Lance E, Methods of Analysis of total microcystins in fish matrices, Bioaccessibility for the consumer (BioADMic). Metrology Student Research Seminar, NRC-CNRC (en ligne), 22 août 2022.

Communications orales (sans comité de lecture)

Bouteiller P, Lance E, Betoulle S, Guérin T, Biré R, Cinétique d'accumulation et d'élimination des formes libres et liées aux protéines de la cyanotoxine microcystine-LR chez la carpe *(*BioADMic*).* Atelier LNR Biotoxines Marines, Anses Maisons-Alfort, 9 et 10 novembre 2021.

Bouteiller P, Lance E, Betoulle S, Guérin T, Biré R, Analysis of total microcystins in fish. Accumulation/elimination kinetics and bioaccessibility to the consumer. Journées scientifiques et doctorales de l'Anses, ANSES Maisons-Alfort, 19 octobre 2022

Bouteiller P, Biré R, Betoulle S, Guérin T, Lance E, La déconjugaison à pH basique comme alternative à « l'oxydation de Lemieux » pour l'analyse des formes totales de microcystines dans différentes matrices. Atelier LNR Biotoxines Marines 2022, Anses Maisons-Alfort, 12 et 13 décembre 2022.

Poster

Bouteiller P, Biré R, Betoulle S, Guérin T, Lance E, Comparison and validation of extraction protocols for the analysis of free microcystins in fish matrices by LC-MS/MS. Blue-green and benthic: a workshop on monitoring, mitigation and management of cyanobacteria in Atlantic Canada. Halifax, NS, Canada. 2 juin 2022.

Introduction Générale

L'eutrophisation des écosystèmes aquatiques est définie « comme une succession de processus biologiques enclenchés en réponse à un apport excessif de nutriments » (1). Il s'agit d'un phénomène naturel lent, accéléré par l'influence humaine par le biais d'un apport supplémentaire de nutriments (essentiellement de l'azote et du phosphore) dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce, saumâtre ou salée. Cet apport anthropique a des origines diverses notamment lors des rejets industriels, urbains ou agricoles vers les milieux aquatiques (2). Ce déséquilibre dans le milieu a pour conséquence la croissance excessive des producteurs primaires, les macrophytes, micro-algues et cyanobactéries, dont la forte biomasse créée requiert en sédimentant une consommation importante d'oxygène pour son recyclage par les communautés bactériennes et réduit la disponibilité en oxygène dans le milieu. Ces anoxies peuvent provoquer des pertes de biodiversité (3, 4).

Les cyanobactéries sont des micro-organismes photosynthétiques apparus sur Terre il y a 3,5 milliards d'années et observés dans divers écosystèmes d'eau douce, saumâtre, marine mais aussi terrestre (5). Aussi appelées algues bleues en raison d'un pigment bleu qui leur est spécifique, la phycocyanine, les cyanobactéries ne sont pas des algues eucaryotes, mais des procaryotes photosynthétiques ayant des capacités prolifératives importantes (3, 6). Appelés efflorescence ou bloom (en anglais) de cyanobactéries, ces épisodes de proliférations correspondent au dépassement du seuil de densité cellulaires de 20 000 cell/mL (cellules par mL d'eau) (6) et sont favorisés non seulement par des facteurs naturels (par exemple une température de l'eau supérieure à 25°C) (4) mais aussi des facteurs anthropiques liés à l'eutrophisation des milieux (7). Bien qu'une prédominance d'une ou plusieurs espèces de cyanobactéries soient observée lors d'un épisode de prolifération, il existe une grande diversité de cyanobactéries (8). Cette diversité est à la fois morphologique, allant de micro-organismes unicellulaires de petites tailles à des formes plus grandes de types coloniales, filamenteuses ou ramifiées (9, 10). Elles possèdent des propriétés communes aux microalgues comme le fait de détenir de la chlorophylle a et deux photosystèmes, mais également des propriétés communes aux bactéries tels que l'absence de membrane nucléaire ou la présence d'une paroi cellulaire comprenant de la muréine, caractéristiques typiques des bactéries Gram - (9) . Les cyanobactéries ont la capacité de produire différents types de métabolites secondaires parmi lesquels des toxines, appelées cyanotoxines, pouvant avoir des conséquences sur la santé humaine et animale.

Les cyanotoxines présentent une grande variabilité moléculaire, comprenant notamment des alcaloïdes, des peptides cycliques ou des acides aminés non-protéinogènes. Les cyanotoxines sont le plus souvent classées en cinq catégories en fonction des effets qu'elles induisent chez les organismes : les neurotoxines, les cytotoxines, les dermatotoxines, les toxines irritantes (lipopolysaccharides) et les hépatotoxines (11). On retrouve dans cette dernière catégorie, les microcystines (MC), la famille de cyanotoxines la plus fréquemment retrouvée dans les blooms de cyanobactéries à travers le monde (12-14).

Les MC sont des heptapeptides monocycliques partageant une structure commune : cyclo-(D-Ala^{1}-X^{2}-D-MeAsp^{3}-Z^{4}-Adda^{5}-D-Glu^{6}-Mdha^{7}) avec deux acides aminés atypiques appelés groupes Adda (3-amino-9-méthyoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényl-4,6-décadiénoïque) et Mdha (N-méthyl-déhydroalanine) et deux acides aminés variables (désignés par X et Z dans la

formule précédente) caractéristiques de l'identité du variant de la MC (3, 9). Par exemple, la MC-LR, le premier variant de MC identifié chimiquement, est un variant où L et R représentent respectivement les acides aminés leucine et arginine (15). Ainsi, à ce jour, 279 congénères de MC ont été identifiées (16).

Les MC restent majoritairement intracellulaires et sont libérées dans le milieu au moment de la senescence des cyanobactéries productrices de MC. On les retrouve alors sous formes dissoutes ou adsorbées aux particules en suspension ou sur les sédiments. Lorsqu'un organisme vivant est exposé à ces toxines par voie orale (ingestion d'eau, de cyanobactéries productrices de MC ou d'organismes contaminés par les MC), cutanée ou branchiale (MC dissoutes), les MC pénètrent dans les cellules grâce à des transporteurs actifs auxquelles elle se lient, les polypeptides transporteurs d'anions organiques (OATP) (17). Dans les tissus, deux formes d'accumulation des MC peuvent être retrouvées : une fraction libre et disponible dans les cellules et une forme liée de manière covalente aux protéines, en particulier aux résidus sérine/thréonine des enzymes phosphatases 1 (PP1) et 2A (PP2A) (18).

La fixation des MC sur les protéines entraîne une dérégulation du mécanisme de phosphorylation médié par les phosphatases (19, 20). Cette dérégulation par les MC peut induire une cascade d'effets négatifs, en particulier la déstructuration du cytosquelette cellulaire, la promotion de tumeurs et l'apoptose, mais aussi la création d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraînant un stress oxydatif (20-25). La toxicité des MC peut se manifester dans différents organes, mais elle a d'abord été découverte dans le foie en raison d'un fort tropisme pour cet organe accumulateur et exprimant de nombreux récepteurs OATP, ce qui a conduit à classer les MC dans la catégorie des hépatotoxines (20). D'autres organes exprimant des OATP peuvent être ciblés par les MC, avec des effets toxiques reportés, notamment sur les organes reproducteurs (26), les reins (27-29), le cerveau (30), le cœur (31), le tractus gastro-intestinal (20) ou les poumons (32, 33).

L'impact sanitaire de ces toxines est donc une préoccupation majeure et des cas d'intoxication humaine et animale sont régulièrement rapportés (34). Ces cas d'intoxications aiguës ou chroniques peuvent se produire lors des activités de baignades dans des environnements contaminés ou après ingestion d'eau ou d'organismes aquatiques contaminés et provoquer des symptômes d'intensité variables pouvant aller de la gastro-entérite à l'insuffisance rénal ou hépatique, parfois même la mort (35).

Deux approches sont couramment adoptées lors du suivi du risque sanitaire ou environnemental : la surveillance des cyanobactéries et le suivi des cyanotoxines. Le contrôle visuel des masses d'eau peut permettre de limiter l'exposition de la population aux cyanotoxines particulièrement durant les activités de baignades récréatives. Lors de la surveillance des cyanobactéries, il est généralement recommandé d'effectuer deux prélèvements par mois (et davantage dans le cas d'une suspicion visuelle d'efflorescence sur une masse d'eau). Malgré cela, la capacité des cyanobactéries à proliférer rapidement et massivement dans un laps de temps de quelques heures ainsi que leur possibilité de se déplacer dans la colonne d'eau entraine une forte variabilité spatio-temporelle des blooms de cyanobactéries. Par ailleurs, lors des proliférations de cyanobactéries, la consommation d'espèces contaminées par des cyanotoxines

notamment les poissons peut induire un risque sanitaire. C'est pourquoi, le suivi des cyanotoxines et notamment des MC dans d'autres matrices que l'eau, comme la chair de poisson ou d'autres espèces consommées, peut permettre de mieux appréhender le risque sanitaire. Les MC couramment quantifiées dans les matrices animales sont les MC libres, et très peu d'études ont porté sur la quantification des MC totales (*i.e.* libres et liées) alors qu'elles peuvent être la forme majoritaire d'accumulation (52-54). La bioaccessibilité des formes totales de MC, c'est-à-dire la fraction libérée dans les sucs gastro-intestinaux humains et donc disponible pour absorption et éventuelle accumulation et effets toxiques n'a pas encore été déterminée (36). Il est cependant important de disposer de méthodes efficaces de quantification de ces formes d'accumulation des MC dans les matrices animales.

Il existe pour cela un panel de techniques disponibles pour l'analyses des cyanotoxines dans de nombreuses matrices (eau, cyanobactéries, sédiments, matrices animales). Ces techniques, peuvent concerner soit les MC libres ou soit les MC totales. Les méthodes d'analyses des MC libres sont le plus communes et les plus simples à réaliser (37), elles consistent généralement en une étape d'extraction à l'aide de solvants organiques, purs ou dilués selon les protocoles d'extractions. A l'étape d'extraction, succède généralement une étape de purification que ce soit une extraction liquide-liquide (LLE), une extraction sur phase-solide (SPE) ou l'utilisation de colonne d'immuno-affinité (IAC) (38-43). A l'issue de l'extraction et de la purification de l'échantillon, différents moyens d'analyses sont envisageables, notamment immunologique (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), biosenseurs), chimique (chromatographie liquide à haute pression (HPLC) couplé à un détecteur à barette de diode (HPLC-UV-DAD), électrophorèse capillaire et chromatographie liquide ou gazeuse couplée à un spectromètre de masse (LC-MS ou GC-MS) (44-48). La dernière catégorie d'analyses correspond aux approches biologiques incluant notamment les bioessais (sur rongeurs, poissons, amphibiens ou invertébrés), ainsi que le test d'inhibition de la protéine phosphatase (PPIA) se basant sur la mesure de l'effet inhibiteur des MC sur l'activité des PP (49-52).

Les méthodes d'analyses des MC totales (MC libres et liées aux protéines) sont à la fois plus complexes et moins répandues. Quatre méthodes ont été développées pour l'analyses des formes totales de MC (53) :

- L'oxydation de Lemieux, basée sur la libération d'une portion du fragment Adda commun à l'ensemble des variants de MC, permettant ainsi de quantifier l'ensemble des variants des MC libres et liées grâce au fragment libéré, le MMPB (acide 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyrique) (54, 55).

- L'ozonolyse qui utilise la même stratégie que l'oxydation de Lemieux (*i.e.* analyser le fragment commun Adda via le groupement MMPB) mais en utilisant l'ozone comme réactif (56).

- La déconjugaison à pH basique où une attaque avec une base (hydroxyde de potassium [KOH], tampon carbonate) va rompre la liaison toxine-protéine au niveau du fragment Mdha permettant de retrouver des toxines déconjuguées (57,

58). Cette technique contrairement aux deux méthodes précédentes permet de garder une information importante pour l'évaluation de la toxicité : l'identité des variants de MC.

- La désorption par irradiation laser (59) qui, comme la déconjugaison à pH basique cherche à rompre la liaison covalente entre MC et protéines mais en utilisant l'énergie d'un laser. Il s'agit d'une méthode plus récente et dont l'efficacité doit encore être prouvée.

Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse a été d'améliorer les méthodes d'extraction et d'analyse par LC-MS/MS des formes libres et des formes totales de MC dans des matrices fraiches de poissons. Ainsi, plusieurs protocoles d'extractions des formes libres de MC dans la chair de diverses espèces de poissons (saumon, truite et carpe) ont d'abord été comparés en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). La méthode de dosage des MC libres (MC-LR, MC-RR) donnant les meilleurs taux de récupération, des effets matrice les plus faibles possibles (sur les espèces de poissons et les variants de MC testés), et qui soit rapide et facile à utiliser, a ensuite été optimisée et validée selon l'approche décrite dans la norme NF V03-110.

En ce qui concerne les formes totales de MC, la méthode d'oxydation de Lemieux, qui est la plus répandue dans la littérature, a été choisie comme méthode de référence. Un protocole d'oxydation de Lemieux a été d'abord optimisé sur matrices fraiches de poissons puis comparé à un second protocole en utilisant différentes matrices fraîches et lyophilisées (poissons et moules d'eau douce). Différentes méthodes de quantification externe et interne (gamme solvant, gamme matrice, utilisation ou non de standard interne) ont également été comparées pour chaque protocole.

En raison du manque de connaissances sur la cinétique d'accumulation et de dépuration des MC totales chez les poissons, il a été choisi d'évaluer la cinétique d'accumulation des MC libres et liés aux protéines dans la chair et les organes de poissons d'eau douce. L'oxydation de Lemieux a pu être appliquée à différents échantillons de poissons de carpes juvéniles, volontairement nourries avec des aliments pour poissons enrichis en MC-LR, pendant 7 j suivis d'une période de dépuration de 21 j. La même technique de dosage a également été appliquée à différents organes de poissons contaminés *in situ* au MC provenant de deux lacs, le lac Pannecière (France) dans le cadre d'un épisode de proliférations de cyanobactéries et le lac Qaraoun (Liban) à la suite d'un important épisode de mortalités de poissons.

Les inconvénients inhérents à la méthode d'oxydation du MMPB tels que le temps de traitement de chaque échantillon, les taux de récupération modérés de la méthode ainsi que la perte d'information sur l'identité des MC ont motivé la recherche d'une méthode alternative pour l'analyse des formes totales de MC par LC-MS/MS. La déconjugaison à pH basique a été choisie, non seulement pour sa nouveauté mais aussi parce que cette technique permet, contrairement à l'oxydation de Lemieux, de conserver l'information sur l'identité des variants de MC présents dans la matrice biologique. La déconjugaison a été appliquée à des conjugués MC-protéines (MC-L-cystéine (CYS) et MC-glutathion (GSH)). Pour éviter la reconjugaison

des MC avec les protéines, du borohydrure de sodium a été utilisé pour réduire et obtenir des MC déconjuguées non réactives.

Ce manuscrit de thèse a été structuré en cinq chapitres :

Le chapitre I est consacré à une synthèse bibliographique sur les cyanobactéries et leurs impacts avant d'aborder la problématique des cyanotoxines MC. Divers aspects relatifs aux MC notamment sur leurs formes d'accumulation, leurs toxicités ou les méthodes d'analyses des MC seront traités. Ce chapitre se terminera par une revue bibliographique qui concerne les différentes méthodes d'analyses des formes liées de MC publiée dans la revue *toxins* : Bouteiller et al. 2022 (53).

Le chapitre II est dédié aux méthodes d'analyses des MC libres dans des matrices fraiches de poissons et comprend une comparaison de plusieurs protocoles d'extraction des MC libres ainsi qu'une validation de la méthode choisie.

Le chapitre III présente une étude sur l'oxydation de Lemieux, méthode de référence pour l'analyse des formes totales de MC dans un échantillon. Cette étude comprend l'optimisation du protocole initiallement développé par Lance & Neffling pour des matrices mollusques (39, 48) sur des matrices fraiches de poissons. Les taux de récupération modérés de ce protocole, nous ont conduits à le comparer à un autre protocole d'oxydation de Lemieux. Une formation à la réalisation de ce second protocole d'oxydation de Lemieux a été dispensée par Amanda Foss, chimiste au Greenwater laboratories, Palatka, FL, USA. Lors de cet exercice de comparaison, un soin particulier a été consacré à l'importance des méthodes de quantification et à l'utilisation d'un standard interne dans le cadre de l'oxydation de Lemieux.

Le chapitre IV a été réalisé dans le cadre d'une mobilité doctorale internationale au sein de l'unité *Biotoxin metrology* du Conseil national de recherches Canada / *National Research Council Canada* (NRC-CRNC). Le travail réalisé au sein de cette unité dirigée par le Dr. Pearse McCarron a été encadré par le Dr. Christopher O. Miles. Il est consacré au développement d'une méthode alternative à l'oxydation de Lemieux pour l'analyses des formes totales de MC : la déconjugaison à pH basique. Le développement de cette méthode comprend la semi-synthèse de conjugués MC-protéines dans l'objectif de tester par la suite la déconjugaison de ces composés par une attaque basique suivie d'une réduction des toxines déconjuguées afin de pallier des phénomènes de reconjugaison potentiels.

Le chapitre V concerne une étude sur l'accumulation des MC libres et liées chez la carpe, en laboratoire et *in situ*. Cette partie comprend en premier lieu une étude sur la préparation d'aliments contaminés à la MC-LR dans l'objectif d'utiliser l'alimentation volontaire, mode d'intoxication non invasif pour les poissons et permettant une exposition sub-chronique similaire à l'exposition d'organismes aquatiques lors d'épisodes de proliférations de cyanobactéries productrices de MC. En second lieu est présenté une étude en deux parties réalisées au sein de la Plateforme expérimentale nationale en écologie aquatique (Planaqua) du CEREEP-Ecotron Ile de France. La première partie consiste en une pré-étude permettant d'ajuster la cinétique d'exposition ainsi que la détermination d'une concentration de MC-LR

sub-léthale pour les poissons mais permettant une accumulation suffisante de MC dans leurs organes (foies, intestins et muscles). La seconde partie est une étude cinétique comprenant une période d'exposition des carpes juvéniles pendant 7 j suivie d'une période de dépuration de 21 j. La quantification de MC libres et liées dans les échantillons produits lors de ces différentes expérimentations a été réalisée à l'aide des méthodes d'analyses développées dans les chapitres I et II. En troisième lieu est présentée une étude de l'accumulation des MC libres et totales dans des carpes prélevées dans un lac français, le lac Pannecière et dans un lac libanais, le lac Qaraoun lors d'épisodes de proliférations de cyanobactéries en septembre 2020 et en mai 2021, respectivement.

Ce manuscrit se termine par une discussion, une conclusion générale et des perspectives de futures recherches.

Chapitre I
Synthèse Bibliographique

1. Les cyanobactéries

1.1. Aspects taxonomiques et organisation interne

Les cyanobactéries sont des micro-organismes procaryotes photosynthétiques retrouvés dans divers écosystèmes dont ceux où sont retrouvés habituellement les micro-algues eucaryotes (60) mais aussi dans des habitats extrêmes (61). Des études sur des fossiles ont montré que les cyanobactéries seraient apparues il y a 3,5 milliards d'années (5). Il s'agirait du plus ancien micro-organisme réalisant la photosynthèse oxygénique, ayant entrainé une hausse de l'oxygène dans l'atmosphère il y a 2,45 à 2,32 milliards d'années (60, 62). Elles seraient donc à l'origine de la source principale de la production primaire planétaire (63). La coloration des cyanobactéries peut varier du bleu-vert au rouge, en fonction des pigments qu'elles possèdent, comme la chlorophylle a, les phycocyanines ou les phycobiliprotéines (13). D'un point de vue taxonomique, leur propriété photosynthétique a d'abord entrainé le classement des cyanobactéries dans le taxon des algues bleues (aussi appelées algues bleues-vertes). Mais les cyanobactéries ne possèdent pas de vrai noyau, et cette classification a été mises à mal au cours du XX^{e} siècle. Malgré tout, le passage du terme algues bleu-vert à cyanobactéries ne s'est pas fait directement et il a fallu attendre plusieurs évolutions de la nomenclature avant que les cyanobactéries soient désormais régies à la fois par le code international de nomenclature des procaryotes (ICNP) et le code internationale de nomenclature botanique (ICNB) (64). Encore récemment, des propositions d'amendement de l'ICNP concernant le statut et la nomenclature des cyanobactéries, ont d'ailleurs fait l'objet de publications (65).

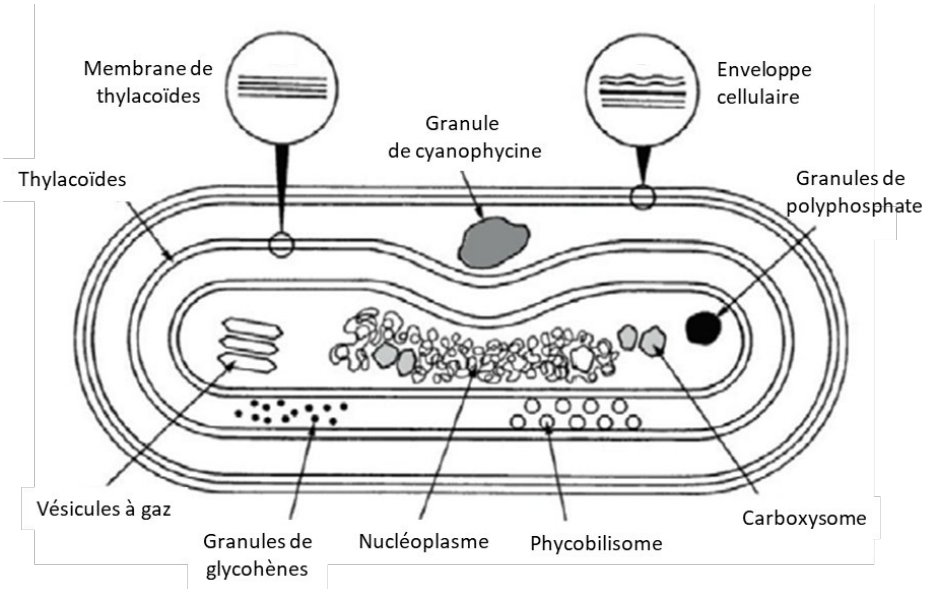


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation d'une cellule végétative de cyanobactéries, modifié d'après (9).

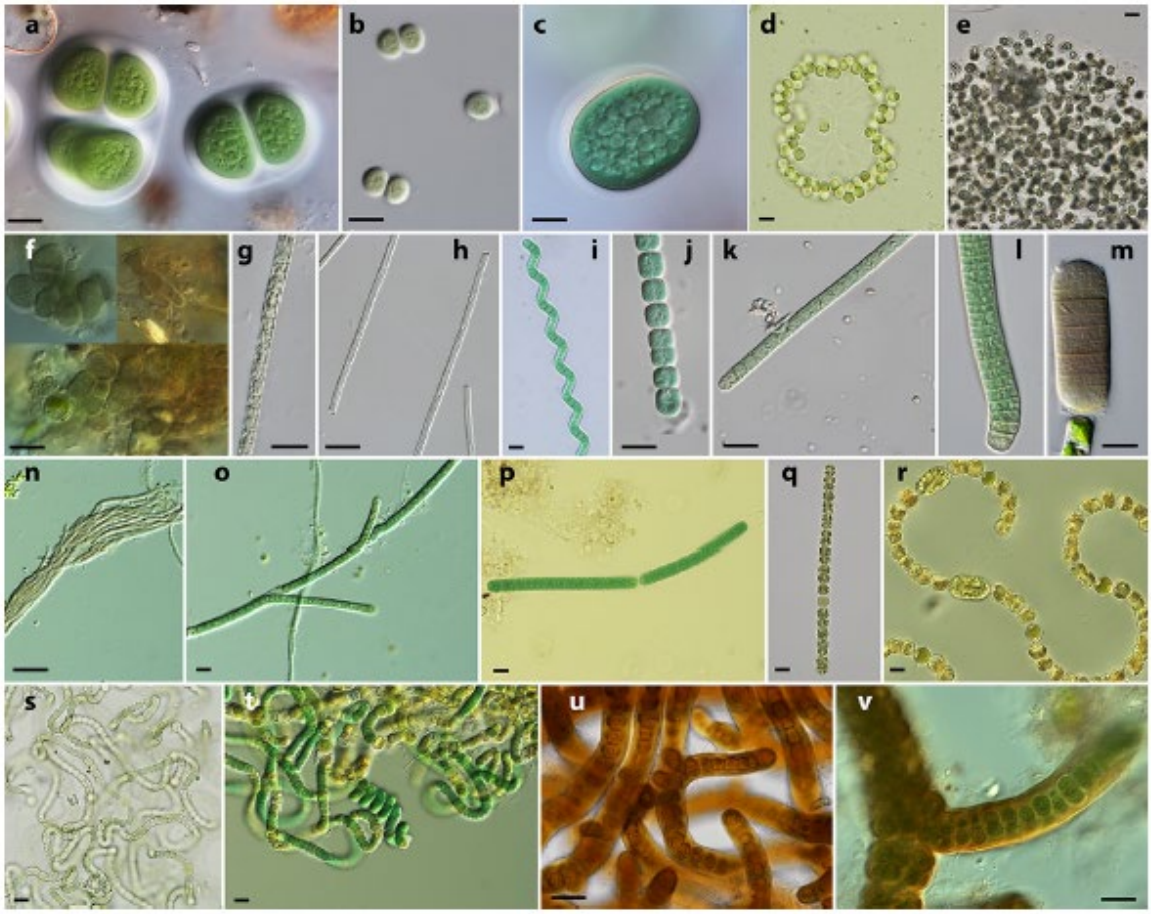
Comme les procaryotes, les cyanobactéries possédent une paroi mais pas de membrane cellule. Par ailleurs leur matériel génétique se trouve libre dans la cellule (**Figure 1**). A l'inverse, des caractéristiques de certains eucaryotes sont également retrouvées comme la présence de chlorophylle (66). L'enveloppe cellulaire des cyanobactéries est composée d'une membrane externe, d'une couche de peptidoglycane et d'une membrane plasmique. Elles

possèdent également une membrane interne : les thylakoïdes qui permettent de séparer le cytoplasme du *lumen* et qui permettent à la fois des mécanismes photosynthétiques et des mécanismes respiratoires. L'appareil photosynthétique des cyanobactéries se compose de phycobilisomes (PBS) qui permettent de récupérer la lumière et de différents complexes protéiques membranaires : le photosystème II (PSII), le cytochrome b6f (Cyt b6f), le photosystème I (PSI) et l'adénosine triphosphate (ATP) synthase (66).

1.2. Diversité morphologique et écologique

D'un point de vue morphologique, les cyanobactéries comptent 8 ordres, 56 familles, 374 genres et 1468 espèces décrites. Parmi ces huit ordres de cyanobactéries, 5 sections sont définies sur des critères morphologiques (**Figure 2**). Parmi les genres décrits, 232 ont été confirmés par des outils moléculaires et l'utilisation de l'ADNr 16S a permis de confirmer leurs positions phylogénétiques (67).

Figure 2 : Diversité morphologique des cyanobactéries d'après (10).



a Chroococcus subnudus, b Ch. limneticus, c Cyanothece aeruginosa, d Snowella litoralis, e Microcystis aeruginosa, f Pleurocapsa minor, g Planktothrix agardhii, h Limnothrix redekei, i Arthrospira jenneri, j Johanseninema constricum, k Phormidium sp., l, m Oscillatoria sp., n Schizothrix sp., o Tolypothrix sp., p Katagnymene accurata, q Dolichospermum planctonicum, r Dolichospermum sp., s Nostoc sp., t Nodularia moravica, u, v Stigonema sp. Echelle : a–u = 10 µm, v = 20 µm.

Les coccoïdes unicellulaires constituent les sections I (*Chroococcales,* **Figure 2** *: a, b, c, d, e*) et II (*Pleurocapsales,* **Figure 2** *: f*), qui se distinguent par leur mode de division (les cyanobactéries de la section I se divisent par fission binaire tandis que celles de la section II peuvent également subir une fission multiple). Les sections III (*Oscillatoriales,* **Figure 2** *: g, h, i, j, k, l, m, n, p*), IV (*Nostocales,* **Figure 2** *: o, q, r, s, t*) et V (*Stigonematales,* **Figure 2** *: v*) sont des cyanobactéries filamenteuses (13). Ces 3 sections peuvent être distinguées par la possibilité des cyanobactéries des sections IV et V de différencier certaines cellules en hétérocytes ou en akinètes. Les hétérocystes et les akinètes correspondent respectivement à des cellules à paroi épaisse permettant la fixation d'azote en conditions limitantes d'azote et à des spores immobiles de grande taille conférant une résistance des cyanobactéries lors de conditions climatiques extrêmes.

Les cyanobactéries peuvent vivre libres ou en symbiose avec d'autres organismes (13). Leurs caractéristiques physico-chimiques leur permettent de coloniser de nombreux écosystèmes que ce soit aquatiques ou terrestres (68). Ainsi certains ordres de cyanobactéries occuperont préférentiellement un type d'habitat. Par exemple 78 des 129 genres de *Nostocales* sont décrits comme terrestres tandis que pour l'ordre *Oscillatoriales*, 41 des 65 genres occupent davantage des écosystèmes d'eau douce. De plus, certaines espèces de cyanobactéries sont même capables de s'adapter à des environnements extrêmes. Ces cyanobactéries ubiquitaires peuvent être retrouvées par exemple dans des régions arides ou désertiques (69), dans des sources thermales où elles peuvent même se multiplier à des températures supérieures à 70°C (70), ou à l'inverse dans des environnements froids comme des glaciers (71). En plus de pouvoir proliférer à des températures chaudes et froides, certaines cyanobactéries peuvent également s'adapter à des environnements acides (avec un pH autour de 4) ou des environnements hypersalins (72). Par ailleurs, il est possible de trouver au sein d'un même habitat des cyanobactéries occupant des niches écologiques différentes (**Figure 3**). Au sein par exemple d'un écosystème d'eau douce, certaines cyanobactéries prolifèreront en suspension dans la colonne d'eau et seront qualifiées de cyanobactéries planctoniques. D'autres à l'inverse, préféreront d'autres niches écologiques comme la surface du sédiment, de support rocheux ou macrophytiques et seront qualifiées de cyanobactéries benthiques (73). De même, certaines cyanobactéries seront capables de proliférer dans les écosystèmes d'eau douce comme les lacs ou les rivières comme les genres *Microcystis, Planktothrix, Anabaena, Phormidium*, tandis que d'autres seront présentes dans les récifs coralliens (*Lyngbya, Leptolyngbya, Hydrocoleum, Symploca*) ou à la surface des mers et océans (*Nodularia, Trichodesmium*).

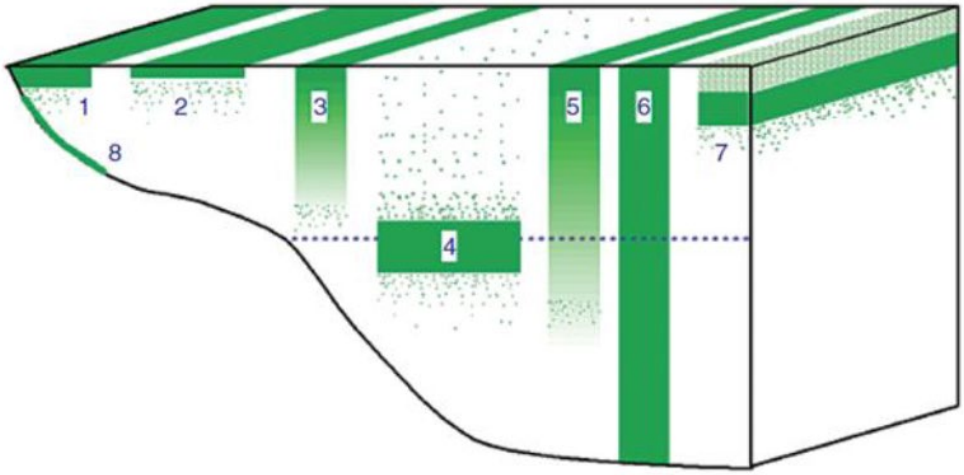


Figure 3 : Différentes localisation des efflorescences de cyanobactéries dans un écosystème d'eau douce, d'après (74).

En allant du moins profond au plus profond de la colonne d'eau, sont représentés : les efflorescences au niveau de la surface de la colonne d'eau (1) et (2), le long de la colonne d'eau (3), des blooms en dessous de la glace (7), des cyanobactéries benthiques (8) et des efflorescences metalimnetiques (4) (i.e. des cyanobactéries comme *Planktothrix rubescens* occupant une couche intermédiaire de la colonne d'eau entre les eaux superficielles et les eaux profondes). (5) et (6) représentent des cyanobactéries se développant dans la colonne d'eau mais dépassant la profondeur euphotique[1] (en pointillé) et des cyanobactéries pendant le brassage hivernal, respectivement.

1.3. Capacités de proliférations des cyanobactéries

Les cyanobactéries ont des caractéristiques leur conférant des avantages compétitifs par rapport aux autres espèces présentes dans le milieu. Elles possèdent par exemple des caractéristiques physico-chimiques avec un optimum de température (> 25°C) qui leur permet, lors d'épisodes de chaleur, d'atteindre leur optima de croissance alors que d'autres espèces présentes dans le milieu, notamment phytoplanctoniques, vont décliner (74, 75). Par ailleurs, d'autres facteurs pouvant être influencés par les activités anthropiques comme un pH légèrement alcalin ou la présence de nutriments et notamment de phosphore favorisent les efflorescences de cyanobactéries (4, 76). Ainsi l'augmentation des rejets d'origines anthropiques couplés aux phénomènes du réchauffement climatique expliquent en partie l'augmentation de la fréquence et de la sévérité des efflorescences de cyanobactéries ces dernières années (76). D'autres facteurs peuvent influencer également la croissance de cyanobactéries comme une eau stagnante ou une faible vitesse du courant de l'eau favorisant la stratification verticale de la masse d'eau. Cette stratification permet à certaines cyanobactéries d'occuper des zones spécifiques à ces masses d'eau tels que l'épilimnion en surface (riche en oxygène mais possédant des ressources limitées en nutriments), le métalimnion (qui correspond

[1] La zone euphotique est la zone superficielle des océans et des lacs, qui reçoit suffisamment de lumière solaire pour que la production végétale y excède les pertes ce qui permet l'alimentation des zones aphotiques plus profondes.

à la zone euphotique), et l'hypolimnion en profondeur (possédant une faible luminosité mais des ressources importantes en nutriments) (**Figure 3**). Les cyanobactéries peuvent adapter leur position dans la colonne d'eau grâce à des vésicules gazeuses leur permettant une flottabilité et la présence de polysaccharides leur servant de ballast (6). Il existe également des espèces cyanobactériennes dont la composition pigmentaire (dotées de pigments comme les phycocyanines et les phycoérythrines) leur permettant de proliférer plus en profondeur en exploitant une gamme plus large de rayonnements lumineux et des ressources en nutriments (75). D'autres espèces possèdent des cellules spécialisées comme des hétérocystes ou des akinètes leur permettant respectivement de survivre dans un milieu pauvre en azote par une fixation aérobique de l'azote et dans des conditions climatiques extrêmes (77, 78).

Les cyanobactéries planctoniques prolifèrent dans la colonne d'eau ou en surface où leur biomasse importante forme des agrégats flottants (13). Des seuils de densité cellulaire ont ainsi été mis en place pour permettre de caractériser une apparition d'efflorescence de cyanobactéries et pendant longtemps, le seuil de 20 000 cell/mL a été utilisé pour définir l'apparition d'un bloom de cyanobactérie (6). Mais plus récemment, d'autres indicateurs du seuil de biomasse ont été utilisés à la fois pour leur praticité et leur meilleure représentation des efflorescences. C'est le cas du biovolume des cyanobactéries, plus représentatif en raison de différences importantes de tailles de cellules selon les genres de cyanobactéries considérés, et de la concentration la chlorophylle a (chl-a). Un seuil de 30 à 50 µg/L de chl-a est par exemple utilisé en France dans les milieux oligo-mésotrophes mais ce seuil manque de spécificité car la chl-a n'est pas exclusivement produite par les cyanobactéries, mais aussi par les autres producteurs primaires phytoplanctoniques (13). C'est pourquoi, le seuil de 20 000 cell/mL ou de 0,65 mm^3/L de cyanobactéries de genres toxinogènes sont également utilisés.

En ce qui concerne les cyanobactéries benthiques, il est difficile d'utiliser des seuils de biomasse comme pour les cyanobactéries planctoniques. Le développement des cyanobactéries benthiques va se faire sous la forme de biofilms sur le substrat du milieu avec une dominance d'une ou de plusieurs espèces ou souches de cyanobactéries. C'est l'évolution temporelle de ce biofilm qui est à prendre en compte pour évaluer l'apparition d'un bloom de cyanobactéries benthiques (79).

1.4. Impacts des cyanobactéries

Divers impacts peuvent être engendrés par les cyanobactéries aussi bien économiques et sanitaires.

Lors d'une prolifération de cyanobactéries la masse d'eau va tout d'abord pouvoir subir une modification de son aspect et surtout de sa couleur (verte, bleue ou rouge) et dans certains cas, la production de métabolites secondaires comme la géosmine ou le 2-méthylsobornéol pouvant altérer l'odeur ou le goût de l'eau (80).

En ce qui concerne les impacts des cyanobactéries sur l'économie ou les usages anthropiques de l'eau, il peut y avoir un impact sur les activités de baignade du fait de la

modification de l'aspect ou de l'odeur de l'eau décourageant ces activités. De même la modification de l'aspect esthétique de l'eau peut avoir un impact sur la valeur des propriétés. Lors d'efflorescences de cyanobactéries, la production de biomasse peut entrainer la perturbation des traitements des eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) par colmatage des filtres ou des membranes, par dérèglement des réactions de floculation du fait de changement rapide de pH des eaux ou encore par la consommation accrue en réactifs de traitement et par la génération de sous-produits issus de la désinfection (13). La production de métabolites secondaires et notamment de cyanotoxines peut entrainer des perturbations des activités de pêche et d'aquaculture (81). L'impact des cyanobactéries sur ces activités avait été estimé au Royaume-Uni à une perte de 29 000 à 118 000 £ par an (81). De même, les coûts associés aux traitements de l'eau à la suite des efflorescences de cyanobactéries avaient été estimés en 2000 entre 180 et 240 millions de dollars par an en Australie (82).

D'autres impacts sur les usages anthropiques de l'eau peuvent se produire notamment l'affaiblissement des qualités organoleptiques des eaux destinées à la consommation humaine ou des impacts sur la santé humaine lors du contact cutané avec des cyanobactéries ou lors de l'ingestion ou de l'inhalation de cyanobactéries ou de métabolites secondaires produits par les cyanobactéries et pouvant induire des risques sanitaires.

L'apparition d'une efflorescence de cyanobactéries peut avoir un impact sur la faune et la flore du milieu, en perturbant, par exemple la biodiversité de l'écosystème aquatique du fait de la compétition pour les nutriments entre les cyanobactéries et d'autres organismes photosynthétiques (micro-algues ou macrophytes). Le développement de cyanobactéries au sein ou à la surface de la colonne d'eau peut entrainer une diminution de la transparence de l'eau entrainant une diminution de l'énergie lumineuse incidente pour les autres organismes photosynthétiques du milieu. Des impacts sur les poissons peuvent se produire de par la diminution de la teneur en oxygène de l'eau, entrainée par la consommation accrue de dioxygène par les communautés bactériennes pour la dégradation de l'importante biomasse générée lors des blooms, ou par la modification du pH et de la transparence de l'eau. De plus lors de la sénescence du bloom, des phénomènes d'hypoxie voire d'anoxie, ainsi que le relargage massif des métabolites secondaires bioactifs ou toxiques produits par les cyanobactéries dans le milieu peuvent avoir des effets toxiques sur le biote. Des épisodes de mortalités d'oiseaux ou d'animaux terrestres domestiques ou sauvages peuvent également se produire par ingestion d'eau contenant des cyanobactéries ou leurs métabolites ou l'ingestion d'organismes ayant bioaccumulé certains métabolites de cyanobactéries (13).

1.5. Les métabolites secondaires des cyanobactéries

Les cyanobactéries sont capables de produire une grande diversité de métabolites secondaires. Il a été recensé plus de 1000 types de métabolites regroupant des cyanotoxines, mais également des métabolites présentant des activités antimicrobiennes, antifongiques ou antivirales (83). Les métabolites des cyanobactéries sont synthétisées au sein de la cellule et peuvent êtres soit libérées pendant la croissance de la cellule (par exemple les

cylindrospermopsines ou anatoxines) ou le plus souvent lors de la lyse de la cellule à l'issue de laquelle les métabolites vont être libérés dans le milieu (13). La diversité des cyanotoxines produites par les cyanobactéries est représentée dans le **Tableau 1** ainsi que les principaux genres de cyanobactéries producteurs de toxines. Une même toxine (*i.e.* **Tableau 1** : Microcystines) peut ainsi être produite par différents genres de cyanobactéries et un même genre peut produire plusieurs cyanotoxines comme *Oscillatoria* pouvant produire des MC, des cylindrospermopsines et des dermatotoxines (**Tableau 1**). La capacité de production de ces toxines dépend de la présence de gènes de biosynthèse qui peuvent être présents ou absents chez une même espèce de cyanobactérie, en fonction des souches (ou génotypes) considérées (84) . De même, au sein même d'une souche productrice de toxines, la quantité de toxine produite par les cellules de cyanobactéries est variable au cours d'un même épisode d'efflorescence en fonction de la phase de croissance des cellules ou en fonction des conditions environnementales.

Tableau 1 : Les principaux genres de cyanobactéries productrices de cyanotoxines en fonction de la catégorie de cyanotoxines, la structure chimique ainsi que leurs modes d'actions (11, 85).

Catégories de cyanotoxines	Cyanotoxines	Structure chimique	Principaux genres de cyanobactéries productrices	Modes d'actions
Hépatotoxines	Microcystines	Heptapeptides cycliques	*Microcystis, Anabaena, Nostoc, Planktothrix, Phormidium, Oscillatoria, Radiocystis, Gloeotrichia, Anabaenopsis, Rivularia, Tolypothrix, Hapalosiphon, Plectonema*	Promoteurs de tumeurs, inhibition des phosphatases de protéines eucaryotes PP1, PP2A et phosphatases des protéines PPP4, PPP5
	Nodularines	Pentapeptides cycliques	*Nodularia spumigena, Nostoc(symbiotique)*	Comme les MC mais avec une cancérogénicité plus faible
Cytotoxines	Cylindrospermopsines	Alcaloïdes guanidine tricycliques	*Cylindrospermopsis, Umezakia, Anabaena, Oscillatoria, Raphidiopsis, Aphanizomenon*	Neurotoxique, génotoxique, inhibiteur de la synthèse des protéines
Neurotoxines	Anatoxine-a	Alcaloïde bicyclique	*Anabaena, Phormidium, Aphanizomenon*	Neurotoxique, se lie de manière compétitive aux récepteurs de l'acétylcholine
	Guanitoxine anciennement anatoxine-a(s)	N-hydroxyguanine cyclique phosphorylée	*Anabaena*	Neurotoxique, inhibe l'acétylcholine estérase
	Saxitoxines	Alcaloïdes	*Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya, Cylindrospermopsis, Planktothrix*	Neurotoxique, bloque les canaux sodiques sodiques voltage-dépendants
	β-N-Méthylamino-L-alanine (BMAA)	Diaminoacides	Beaucoup de genres	Neurotoxique, toxine du développement, insertion erronée dans les protéines
Dermatotoxines	Lyngbyatoxines, Aplysiatoxines	Alcaloïdes indoliques	*Lyngbya, Oscillatoria, Schizothrix*	Favorise les tumeurs, se lie à la protéine C
Toxines irritantes	LPS	Lipopolysaccharides	Tous les genres	Inflammatoire, promotion de la sécrétion de cytokines

Parmi les cyanotoxines, les MC représentent les toxines les plus étudiées et les plus fréquemment retrouvées dans les efflorescences de cyanobactéries, avec une occurrence estimée à 50 à 75 % des blooms de cyanobactéries (14, 25). Cette famille est au cœur des travaux de cette thèse.

2. Les cyanotoxines MC

2.1. Généralités

Les MC sont des heptapeptides monocycliques ayant une structure commune : cyclo-(D-Ala[1]-X[2]-D-MeAsp[3]-Z[4]-Adda[5]-D-Glu[6]-Mdha[7]) avec deux acides aminés atypiques appelés groupes Adda (3-amino-9-méthyoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényl-4,6-décadiénoïque) et Mdha (N-méthyl-déhydroalanine) et deux acides aminés variables (désigné par X et Z dans la formule précédente) caractéristiques de l'identité du variant de la MC (3, 9) (**Figure 4**). Par exemple, la MC-LR, la première MC identifiée chimiquement, est un variant où L et R représentent respectivement les acides aminés leucine et arginine (15). Des modifications structurelles peuvent avoir lieu au niveau des sept acides aminés, mais les variations les plus fréquentes sont la substitution des acides aminés L en positions 2 et 4, la substitution de Mdha par Dhb (déhydrobutyrine) ou par la sérine en position 7, et l'absence de méthylation des acides aminés en positions 3 et/ou 7 (**Figure 4**) (3). Ainsi à ce jour, 279 congénères de MC ont été identifiées dont le poids moléculaire est compris entre 800 et 1100 Da (16).

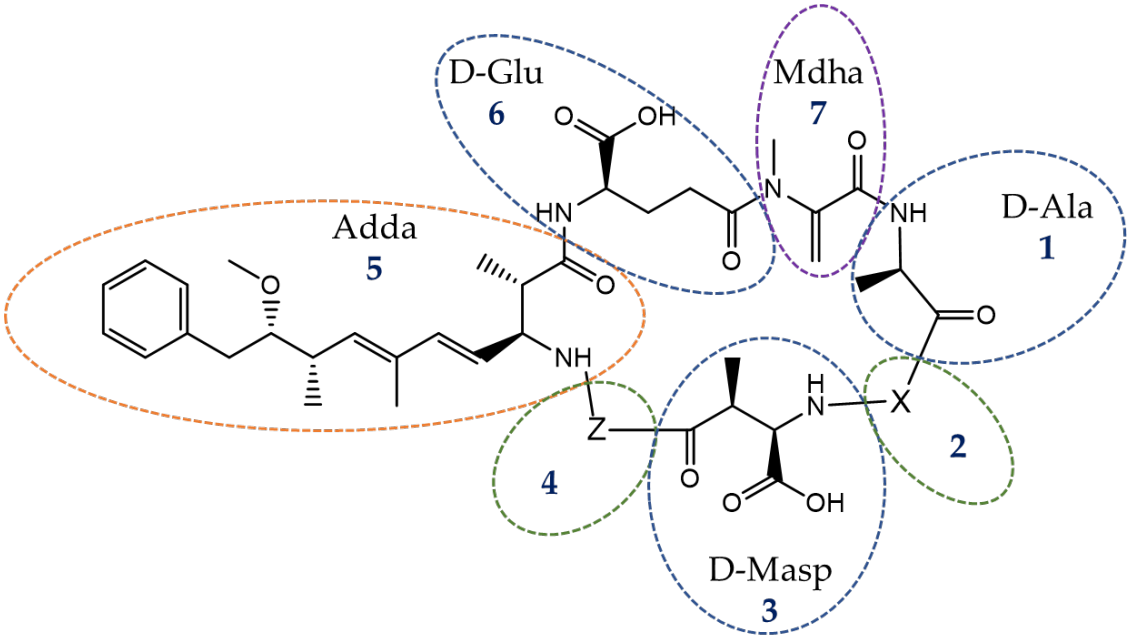


Figure 4 : Représentation topologique d'une MC.
Avec 1 : D-Alanine, 2 : X (variable), 3 : acide D-erythro-b-méthyl-D-aspartique, 4 : Z (variable), 5 : Adda, 6 : D-Glutamate, 7 : Mdha. Le fragment Adda est un élément commun à tous les variants de MC et aux nodularines, une autre famille de cyanotoxines. Le fragment Mdha joue un rôle dans la liaison des MC aux protéines. Les acides aminés variables (ici X et Z) ainsi que la possibilité de substitution sur 1,3,5,6,7 définissent l'identité du variant de MC et participent à la diversité des MC.

Les MC restent majoritairement intracellulaires et sont libérées dans le milieu au moment de la senescence des cyanobactéries productrices (**Tableau 1**). Les MC sont alors sous formes dissoutes ou adsorbées aux particules organiques ou inorganiques en suspensions ou sur les sédiments. La présence des MC dans l'ECDH est soumise à un seuil réglementaire de l'OMS de 1 µg/L d'équivalent MC-LR dans les eaux traitées datant de 2007. L'Anses (2020) a fixé des concentrations maximales tolérables en MC dans les EDCH et les eaux récréatives à 0,2 µg/L et 0,3 µg/L, respectivement. Ces valeurs réglementaires sont basées sur une nouvelle VTR (valeur toxicologique de référence) pour la MC-LR (13) de 1 $ng.kg.pc^{-1}.j^{-1}$, basée sur une étude sur modèle murin reportant des effets reprotoxiques, notamment l'altération de la qualité spermatique (13, 86).

2.2. Formes libres et formes liées

Lorsqu'un organisme vivant est exposé à ces toxines, deux formes d'accumulation des MC sont possibles : une fraction libre et disponible dans les cellules et une forme liée de manière covalente aux protéines, en particulier aux résidus sérine/thréonine des enzymes phosphatases 1 (PP1) et 2A (PP2A) (18) (**Figure 5**). Le mécanisme de liaison des MC aux PP est un mécanisme en deux étapes avec tout d'abord la formation d'une liaison à faible interaction de nature hydrophobe et réversible entre le groupe Mdha des MC et les protéines et, après quelques heures, le groupe Adda peut former une liaison thioéther covalente avec les résidues cystéine présents dans les sous-unités catalytiques de la PP (87-89).

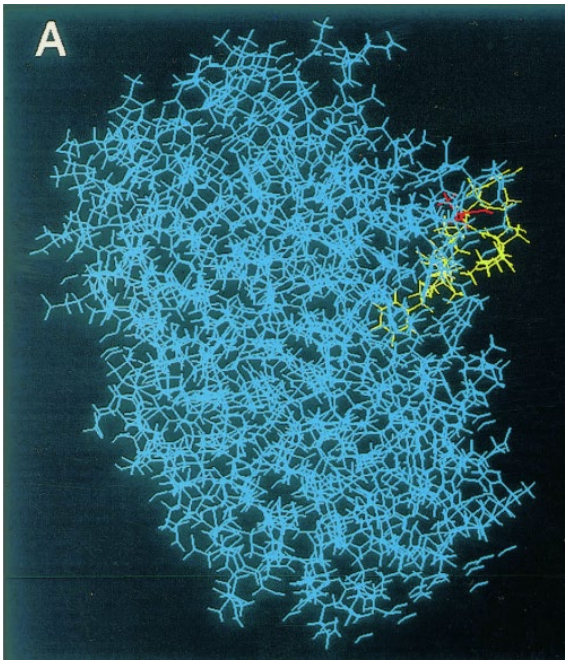


Figure 5 : Vue d'ensemble du complexe de la structure cristalline de la microcystine-LR et de la PP-1c d'après (90).
Les atomes de la PP-1c sont en bleu et les atomes de microcystine-LR sont en jaune, à l'exception du résidu Mdha, qui est en rouge.

2.3. Toxicité des MC

Les MC ne traversent pas passivement les membranes cellulaires et pénètrent dans les cellules via un type de transporteurs membranaires, les OATP, qui sont exprimés en particulier dans les tissus épithéliaux (épithéliums de revêtement ou glandulaires). La toxicité des MC nécessite un transport actif par les OATP1B1 et OATP1B3, membres de la famille des transporteurs OATP, pour leur absorption dans les cellules, et la forte expression de ces

transporteurs dans le foie explique leur hépatotoxicité sélective. Les organes riches en OATP et donc cibles des MC sont le foie et le tractus intestinal, mais aussi les reins, les poumons, et la barrière hémato-encéphalique. Des expériences ont montré que lorsque l'OATP est inhibé ou absent, les dommages au foie sont réduits. Le rôle essentiel de l'OATP explique pourquoi la plupart des MC ingérées sont absorbées par le foie. Alors que la détoxification se produit dans le foie, la clairance des MC semble prendre beaucoup de temps, jusqu'à des semaines. Une fois dans les cellules, les MC provoquent l'inhibition des PP (PP1, PP2A, PP4 et PP5).

L'inhibition de l'activité des PP par les MC se déroule en grande partie au niveau du fragment $Adda^5$ (**Figure 4** - 5) et de l'acide aminé Glu^6 (**Figure 4** - 6) par des interactions non covalentes (89). Le potentiel de liaison de la toxine repose sur la capacité du fragment Adda à interagir au niveau du sillon hydrophobe de la sous-unité catalytique de l'enzyme (16). Une seconde interaction importante correspond à celle de l'acide carboxylique du résidu Glu^6 et de son groupe carbonyle adjacent (Adda-amide). Lors de cette interaction, il y a liaison entre un hydrogène du groupement Adda et les atomes de métal présents dans le site actif des sous-unités catalytiques des PP. Ces fragments Adda et Glu^6 jouent donc un rôle important dans le mécanisme d'inhibition des PP et des modifications de ces fragments dans certains variants de MC peuvent entrainer une modification de potentiel toxique. Une troisième interaction se produit également entre les MC et les sous-unités catalytiques des PP par l'intermédiaire d'une liaison covalente entre le carbonyle électrophile α, β-insaturé du fragment $Mdha^7$ et le thiol du résidu cystéine des sous-unités catalytiques de six phosphatases spécifiques à serine/threonine (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5 et PP6) (91). Deux autres interactions ont un rôle important dans l'inactivation des PP. La première consiste en une interaction de liaison hydrogène entre le groupe carboxyle du résidu $Masp^3$ (**Figure 4**) et les résidus Arg et Tyr conservés dans les unités sous-catalytiques du PP (Arg96 et Tyr134 du PP1 ; et Arg89 et Tyr127 du PP2). La seconde consiste en une interaction hydrophobe entre le cycle aromatique d'une tyrosine de la boucle β12-β13 du PP et le résidu $L\text{-}Leu^2$ des congénères MC-LZ (16, 91). La présence de L-leucine en position 2 peut donc expliquer le potentiel d'inhibition des PP plus élevé du variant MC-LR et de ses analogues avec des acides aminés hydrophobes dans la même position. La plupart des différences de toxicité observées *in vivo* entre les congénères de MC peuvent être ainsi attribuées à une combinaison des différences dans leur absorption par le foie *via* les OATP ainsi qu'à leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des PP hépatiques qui sont largement reconnues comme étant les principales cibles des MC.

A la suite de l'inhibition des PP, P53 qui est un substrat du PP2A, n'a plus la possibilité d'interagir avec la PP2A, ce qui peut entrainer une hyperphosphorylation de P53 (**Figure 6**). P53 est une phosphoprotéine nucléaire impliquée dans la régulation de l'apoptose, les voies de suppression des tumeurs, ainsi que la transactivation transcriptionnelle de la réparation de l'ADN. Ainsi une exposition à la MC entraine une augmentation significative de l'expression des protéines d'apoptose P53 et Bax et une diminution de l'expression de Bcl-2 (92). Ces deux dernières protéines sont impliquées dans la perméabilité de la membrane mitochondriale et l'homéostasie.

Il a également été constaté que l'exposition à la MC-LR affecte la régulation des phosphoprotéines MAPK (Mutagen-activated protein kinases), l'expression des proto-

oncogènes et perturbe la réparation de l'ADN (par exemple à la suite d'un stress oxydatif). L'inhibition de la PP2A par les MC-LR peut entraîner l'activation des MAPK, activant ainsi les proto-oncogènes, tels que c-Jun, c-Fos et c-Myc, qui sont responsables de l'initiation de la transcription des gènes de différenciation et de croissance (**Figure 6**) (22).

Suite à l'exposition à des MC, sont également observées des modifications du cytosquelette en particulier en affectant l'homéostasie de plusieurs gènes cytosquelettiques dans le foie, le rein et la rate (**Figure 6**). Ces actions touchent notamment plusieurs protéines cytosquelettiques parmi lesquels : la β-Actine et β-tubuline, la radixine, la stathmine ainsi que l'ezrine et la moésine. Les changements observés dans la transcription de l'ezrine, de la moésine et de la stathmine (gènes squelettiques associés aux tumeurs) suggèrent que les MC peuvent également être impliquées dans des activités de promotion des tumeurs dans ces organes. Il a été démontré que les modifications cytosquelettiques par les voies du réticulum mitochondrial et endoplasmique, associé au stress oxydatif, entraînent une apoptose cellulaire en réponse à l'exposition aux MC (93).

Le stress oxydatif a été couramment observé au cours des études d'exposition aux MC-LR. Le stress oxydatif résulte de deux voies : le développement de ROS et une perturbation de l'homéostasie du GSH suite à l'interaction avec les MC (**Figure 6**) (93). Les réponses toxiques résultant d'une augmentation des ROS comprennent des modifications cytosquelettiques, des dommages oxydatifs généraux ainsi que des dommages de l'ADN (pouvant conduire à la formation de tumeurs) et l'apoptose.

L'apoptose cellulaire est le résultat de plusieurs événements résultant de l'inhibition initiale de la PP2A par exposition aux MC et de l'hyperphosphorylation de protéines telles que la P53 (**Figure 6**). Une hyperphosphorylation de P53 peut induire l'apoptose via la perturbation mitochondriale, la phosphorylation des MAPK entraînant des modifications cytosquelettiques et la production d'espèces ROS suite à la phosphorylation de CaMKII (Ca2+/calmoduline-protéine kinase II). En outre, l'apoptose résultant de l'exposition à la MC-LR est assistée par la sérine/thréonine protéine kinase CaMKII, ce qui entraîne une augmentation de la formation de ROS (14). Il existe donc de multiples voies par lesquelles les MC induisent la toxicité cellulaire. En outre, les voies de réponse cellulaire peuvent différer en raison d'une exposition chronique ou aiguë aux MC (20).

L'impact sanitaire de ces toxines est donc une préoccupation majeure et des cas d'intoxication humaine et animale sont régulièrement rapportés (34). Ces cas d'intoxications aiguës ou chroniques peuvent se produire lors des activités de baignades dans des environnements contaminés ou après ingestion d'eau ou d'organismes aquatiques contaminés et provoquer des symptômes d'intensité variable pouvant aller de la gastro-entérite à l'insuffisance rénal ou hépatique, parfois même la mort (35). L'évènement de contamination humaine ayant eu les retombées les plus graves a eu lieu en 1996 au Brésil où des patients ont été dyalisés avec de l'eau contaminée par des MC entrainant la mort de plus de 60 personnes (94). Par ailleurs, des lésions hépatiques observées sur des enfants en Chine pourraient avoir été provoquées par une contamination chronique de l'eau de boisson par des MC (95).

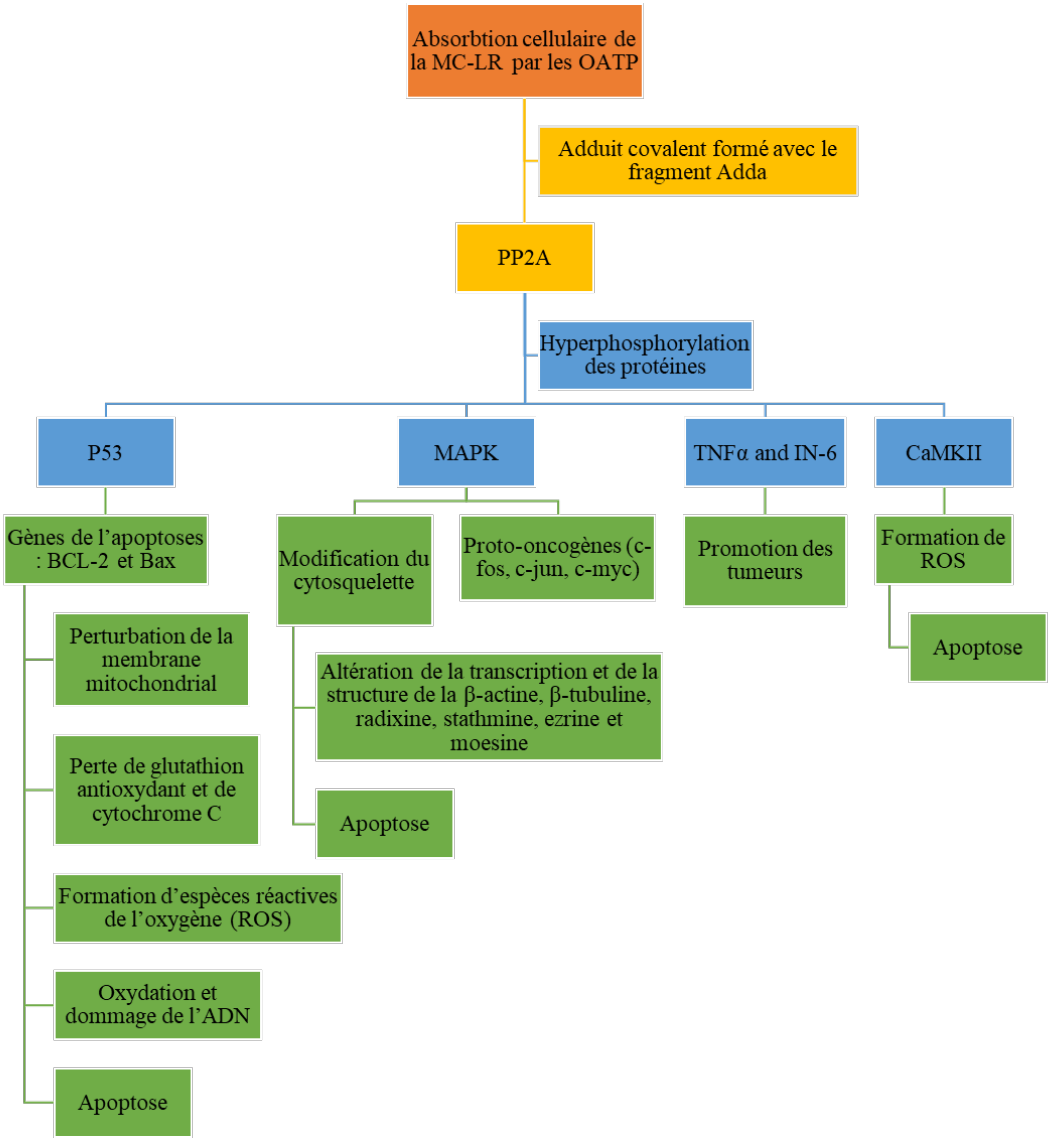


Figure 6 : Mécanismes de toxicité de la MC-LR dans les tissus des mammifères, modifié d'après (20).

3. Accumulation des MC dans les organismes aquatiques

En raison de la capacité des cyanobactéries à produire des toxines, leurs proliférations massives en milieu dulcicole sont souvent associées à des mortalités de poissons. Les MC ont été détectées dans des organismes de tous les niveaux trophiques des écosystèmes aquatiques. Mais les MC sont des molécules ayant un faible coefficient de partage octanol-eau, soumises à des phénomènes de dégradation et d'excrétion dans l'ensemble de la chaine trophique. C'est pourquoi, il semble que les MC subissent au sein de la chaine trophique, des phénomènes de biodilution plutôt que des phénomènes de biomagnification (concentration de la toxine en suivant les maillons du réseau trophique) (96, 97). La capacité d'accumulation des communautés zooplanctoniques vont ainsi agir comme des vecteurs pour des espèces carnivores mais également omnivores (98). Ces communautés représentent ainsi un lien

important entre les producteurs primaires de MC et les consommateurs secondaires comme les poissons (99). En fonction du régime alimentaire, les poissons peuvent être intoxiqués par les MC par différentes voies d'exposition : ingestion directe de cyanobactéries toxiques pour les poissons phytoplanctonophages ou omnivores ou par la consommation de proies intoxiquées pour les poissons carnivores. La contamination peut également avoir lieu pour l'ensemble des espèces de poissons quel que soit leur régime alimentaire *via* l'épithélium branchial ou l'absorption d'eau contenant des cyanobactéries ou des cyanotoxines dissoutes (100). Ces différences dans les modes d'expositions des poissons aux MC peut entrainer des différences dans l'accumulation et la distribution des MC (101). Les concentrations en MC dans le muscle auront tendance à être plus élevées chez les poissons omnivores que chez les carnivores tandis que les concentrations en MC dans le foie ou l'appareil digestif auront tendance à être plus élevées chez les poissons phytoplanctonophages (101).

Chez les poissons, des études de terrain ont montré qu'après ingestion, les MC sont d'abord détectées dans le contenu intestinal et s'accumulent ensuite principalement dans le foie, mais aussi dans les muscles et les viscères (102-105). Dans le muscle, il a été observé une valeur maximale de 39,6 mg MC/kg dans des poissons capturés dans la baie de Sepetiba (Rio de Janeiro, Brésil). Dans cette étude, 19 % des échantillons animaux étaient supérieurs à la limite recommandée par l'OMS pour la consommation humaine (0,04 mg/kg/j si une personne de 60 kg de poids corporel ingère 100 g de muscle de poisson par jour) (104) .

Certaines études visent à reproduire en laboratoire des contaminations de poissons aux MC afin d'étudier la bioaccumulation des toxines chez ces organismes. Pour cela, différentes méthodes d'expositions peuvent être mises en œuvre : des méthodes d'exposition par voie orale comme le gavage ou l'alimentation volontaire qui permettent de mimer une contamination d'un poisson phytoplanctonophages lors d'un bloom de cyanobactéries ou d'un poisson carnivore consommant une proie intoxiquée aux MC, l'injection intra-péritonéale (IP) ou la balnéation dans de l'eau contenant soit des cyanobactéries productrices de MC soit des MC dissoutes. Certaines de ces méthodes sont invasives pour l'animal comme le gavage ou l'injection IP et ne permettent qu'une exposition aiguë tandis que d'autres comme l'alimentation volontaire ou la balnéation sont non-invasives, plus représentatives d'un scénario environnemental, et permettent de reproduire une exposition sub-chronique, voire chronique comme lors d'un épisode de prolifération de cyanobactéries. Une synthèse bibliographique regroupant des études utilisant ces différentes modes d'exposition et mettant en relation des concentrations en MC et des accumulations dans différents tissus de poissons a été réalisée (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Synthèse bibliographique des études de bioaccumulation de MC dans les tissus de poissons en fonction de la méthode d'exposition (gavage, injection IP, alimentation volontaire et balnéation) avec des MC ou des cyanobactéries productrices de MC. PS : poids sec.

Référence	Méthodes d'exposition	Espèces	Exposition	Bioaccumulation
(40)	Gavage avec des MC dissoutes	Truites juvéniles (*Oncorhynchus mykiss*) (4-5 mois ; 5-6 cm ; ≈6 g)	5 µL de solution de MC-LR (0,8 µg/µL) **⇒ 0,66 µg/g de poisson**	Cinétique : 3 à 4 h après gavage. Organes analysés : intestins, branchies, muscles, foie Accumulation : MC libres / MC totales (oxydation de Lemieux) (ng/g PS) Intestins : 1,8 / 124 Branchies : 74,2 / 3,8 Muscles : 44,8 / 7,1 Foie : 90,7 / 69,6
(106)	Gavage avec des MC dissoutes	Medaka (*Oryzias latipes*) adultes (1 g)	10 µl de MC-LR tritiée (Mdha7) **⇒ 2,863 µg Eq/MC-LR/ poisson**	Cinétique : 3 h, 24 h et 72 h après gavage Organes analysés : foie, vésicule biliaire, tube digestif abdominal avec rate, gonades, reins, queue et reste de la carcasse. Accumulation (radiotraçage de MC-LR (compteur à scintillation liquide)) : - 3 après le gavage, les poissons contenaient 0,25 % du niveau radioactif du gavage ; - Après 24 h, 0,13 % ; - Après 72 h, le niveau était tombé à 0,06 % (seul le foie présentait un niveau de marquage détectable et statistiquement significatif)
(107)	Gavage avec des cyanobactéries productrices de MC	Carpes d'un an (*Cyprinus carpio*), n = 30 ; poids moyen = 21 ± 6 g,	0,5 ml de suspension de *M. aeruginosa* lyophilisée dans l'eau, équivalent à 400 µg de MC-LR par kg **⇒ 0,4 µg équivalent de MC-LR par g**	Cinétique : 1, 3, 12, 24, 48 et 72 h après gavage. Organes analysés : hépatopancréas, rein, muscle, tractus gastro-intestinal, cerveau, cœur, rate et branchies. Accumulation (analyse par Western blot) : L'immunoblotage d'homogénats tissulaires avec l'anticorps (Ac) anti-MC-LR a révélé trois bandes protéiques dans le rein et l'hépatopancréas. Deux bandes sont communes à tous les tissus étudiés (hépatopancréas, rein, tractus gastro-intestinal, muscle et cerveau). Les homogénats de rein et d'hépatopancréas ont montré l'intensité de signal la plus élevée par rapport aux autres tissus.
(108)	Gavage avec des cyanobactéries productrices de MC	Truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) âgées de 1 an, poids moyen 30-60 g	Gavées avec 1,22 g de biomasse/kg de poids corporel de *Microcystis aeruginosa* (PCC 7806). **⇒ 5,6 mg de MC-LR/g PS**	Cinétique : 1, 3, 12, 24, 48 et 72 h après le gavage (n=3) Organe analysé : vésicule biliaire Accumulation (analyses par test d'inhibition de la phosphatase) : - Premiers signes d'empoisonnement 12-24 h après le gavage et réponse toxique dans les 96 h suivant le traitement.

Référence	Méthodes d'exposition	Espèces	Exposition	Bioaccumulation
				- La même biomasse d'algues s'est révélée extrêmement toxique par injection intrapéritonéale à une dose environ 10 fois inférieure, ce qui indique que la biodisponibilité orale de la toxine est d'environ 10 % - Les concentrations les plus élevées ont été trouvées à 3 et 48 h après le gavage : 3 h après le gavage : 3,5 mg MC /ml et 48 h après le gavage : 475 ng MC/ml
(109)	Gavage avec des cyanobactéries productrices de MC	Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (n = 18), poids moyen 60 g	Cyanobactérie (*M. aeruginosa*) avec 5700 µg de MC-LR/kg de poids corporel ⇒ **5,7 µg/g**	Cinétique : 1, 3, 12, 24, 48 et 72 h après le gavage. Organes analysés : foie, plasma. Accumulation (analyses par test d'inhibition de la phosphatase) : - L'activité des PP dans le foie des poissons a commencé à diminuer presque immédiatement après le gavage, après 1 h, l'activité représentait environ 60 % des valeurs de contrôle et après 3 h, un pic d'inhibition a été atteint et pratiquement aucune activité n'a pu être détectée. Les valeurs ont commencé à se rétablir progressivement après ce point dans le temps et ont atteint plus de 50 % de celles des animaux témoins après 72 h. - Concentration maximale dans le plasma = 517 ± 38 ng/ml à 3 h. Les valeurs ont ensuite diminué progressivement jusqu'à un niveau inférieur à la limite de détection après 48 h. Dans les foies des poissons traités au cours de la période expérimentale de 72 h = 1,5 % de la dose appliquée (530 ng de MC-LR/g de tissu hépatique).
(55)	Injection IP	Saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) (25-50 g)	La MC-LR a été purifiée à partir de *Microcystis aeruginosa*. Dix-neuf saumons de l'Atlantique ont reçu une injection IP de 0,5 ml/100 g de solution de toxine ⇒ **0,20 mg de toxine/100 g**	Cinétique : 7 h (n=8), 25 h (n=3) et 28,5 h (n=8) après l'injection. Organe analysé : foie - 7 h après l'injection, la méthode GC/MS d'oxydation Lemieux détecte beaucoup plus de MC-LR que le test PPIA : 31-34 % ont été détectés par GC/MS alors que seulement 1-8 % ont été détectés par le test PPIA. Accumulation dans le foie (MC totales, oxydation de Lemieux) : - 7h après IP : 93,6 µg MC-LR/ g foie (32 % de la dose injectée) - 25h après IP : 21 µg MC-LR / g foie (6,6 % de la dose injectée)
(110)	Injection IP	Poisson-chat (*Ictalurus punctatus*)	Une seule IP de **0,25 mg/kg pc**	Cinétique : exposition de 24 h (n=7) Organes analysés : sérum et de foie Accumulation (MC totales par oxydation de Lemieux) :

Référence	Méthodes d'exposition	Espèces	Exposition	Bioaccumulation
				- Les échantillons de foie de poissons exposés au MC-LR contenaient 566-1030 ng/g de MC-LR avec une valeur moyenne de 779 ng/g ; - Le plasma contenait 370-670 ng/g avec une moyenne de 518 ng/g
(101)	Injection IP	Carpes à grosse tête (*Aristichthys mobilis*), d'un poids moyen de 500 ± 10 g	Les poissons ont reçu une seule injection IP de MC à des doses de **400** (RR : LR = 10 : 1) ou **580** (RR : LR = 1 : 1) **µg MC-LR eq/kg PS**	Cinétique : 3 et 6 h après l'injection (n=2) Organes analysés : muscles (soit lyophilisée, soit bouillie pendant 5 min) Accumulation : - Une différence significative a été trouvée dans la concentration de MC entre le muscle lyophilisé et le muscle bouilli par exemple - Dans le groupe exposé à 400 µg de MC-LR eq/kg de poids corporel, la concentration de MC dans le muscle bouilli (0,11 et 0,18 µg/g de poids corporel pour 3 et 6 h après l'injection, respectivement) était plus élevée que dans le muscle lyophilisé (0,038 et 0,057 µg/g de poids corporel pour 3 et 6 h après l'injection, respectivement). - Dans le groupe exposé à 580 (RR : LR = 1 : 1) µg MC-LR eq/kg pc (DW) : 0,052 et 0,0079 µg/g DW pour 3 et 6 h après l'injection, respectivement ; bouilli : 0,132 et 0,048 µg/g DW pour 3 et 6 h après l'injection, respectivement).
(111)	Alimentation volontaire	Carpe argentée (*Hypophthalmichthys molitrix*) 10 g ± 6 g	2 traitements : - alimentation pendant 80 jours avec des cellules de *Microcystis viridis* (teneur en MC-LR comprise entre **110 et 292 µg/g poids** et en MC-RR entre **268 et 580 µg/g PS**. - même exposition avec 40 jours de dépuration avec des aliments pour carpes artificielles.	Cinétique : 40 j d'exposition suivis de 40 j de dépuration. Organes analysés : l'intestin, le sang, le foie et le tissu musculaire Accumulation : Le maximum de MC-RR dans le sang, le foie et le muscle des poissons était respectivement de 49,7, 17,8 et 1,77 µg/g PS. Pas de MC-LR détectable dans les échantillons de muscle et de sang de la carpe argentée malgré la présence abondante de cette toxine dans les intestins (pour le foie, il n'y a eu qu'un seul cas où une quantité relativement mineure a été détectée).
(112)	Alimentation volontaire	*Tilapia rendalli* juvéniles	Exp1 : exposition pendant 15 jours de la nourriture gélifiée contenant de la nourriture commerciale pour poissons plus des cellules de *M. aeruginosa productrice de MC*	Cinétique : 2 poissons prélevés tous les 3j. Organes analysés : muscles, foie, fèces Accumulation : - La concentration de MC dans le muscle était beaucoup plus faible que dans le foie, certainement parce que le foie est l'organe cible de ces toxines. La concentration la plus élevée dans le muscle pendant

Référence	Méthodes d'exposition	Espèces	Exposition	Bioaccumulation
			⇒ **20,4 µg MC/poisson/jour** puis dépuration pendant 15j.	la période d'accumulation (0,03 µg MC/g) a été observée le 9e jour et la concentration moyenne était de 0,007 µg MC/g (±0,01S.D.). - Dans la période de dépuration, la concentration la plus élevée (0,05 µg MC/g) a été observée le 24e jour et la concentration moyenne de 0,012 µg MC/g (±0,02) était plus élevée que dans la période d'accumulation. - La concentration de MC dans les fèces a augmenté de façon linéaire jusqu'à la fin de la période de dépuration. La concentration la plus élevée observée le dernier jour était de 0,07 µg MC/g de fèces par poisson et la concentration moyenne au cours de cette période était de 0,03 µg MC/g de fèces par poisson. La somme des concentrations de MC détectées dans les fèces était de 0,16 µg MC/g de fèces par poisson.
			Exp2, exposition avec de la nourriture gélifiée contenant uniquement des cellules toxiques de *M. aeruginosa* ⇒ **14,6 µg MC/poisson/jour** pendant 28 jours.	Cinétique : 3 poissons de chaque aquarium ont été prélevés tous les 7 jours. Organes analysés : foie et muscles Accumulation : La concentration la plus élevée de MC dans le foie (2,8 µg/g) se produisait à la première date d'échantillonnage. Dans le muscle, la plus forte concentration de MC (0,08 µg/g) a été observée au cours de la troisième semaine. La concentration moyenne dans le muscle était de 0,06 µg/g (±0,018).
			Exp3, exposition avec de la nourriture gélifiée contenant de la nourriture commerciale pour poissons et des cellules toxiques de *M. aeruginosa* préalablement lysées ⇒ **29,2 µg MC/poisson/jour**, pendant 42 jours.	Cinétique : 3 poissons de chaque aquarium ont été prélevés tous les 7 jours. Organes analysés : foie et muscles Accumulation : Dans la troisième expérience, contrairement aux autres, la concentration la plus élevée de MC dans le foie (1,7 µg/g) a été observée au cours de la sixième semaine et dans le muscle, la concentration la plus élevée (0,1 µg/g) a été observée au cours de la deuxième semaine. La moyenne dans le muscle était de 0,05 µg/g (±0,028).
(113)	Alimentation volontaire	Carpe commune (*Cyprinus carpio*), poids corporel moyen 322 ±36 g	Les poissons ont été exposés oralement à *Microcystis.* Les cyanobactéries ont été mélangées à de la	Cinétique : 4 semaines d'exposition Organes analysés : muscles et hépatopancréas Accumulation : L'essai d'inhibition de la protéine phosphatase a montré que les concentrations de MC dans l'hépatopancréas et le muscle de la carpe étaient respectivement

Référence	Méthodes d'exposition	Espèces	Exposition	Bioaccumulation
			nourriture commerciale pour carpes en poudre et transformée en petites boulettes collantes. Une dose de **0,05 µg MC-LR eq/g pc** (1/10 de la DL50 orale de MC chez la carpe, a été adoptée pour l'exposition subchronique.	de 261,0 ±108,3 ng d'équivalent MC-LR/g de poids frais et de 38,3 ± 12,3 ng d'équivalent MC-LR/g de poids frais.
(114)	Alimentation volontaire	*Odontesthes hatcheri*, n = 120, poids moyen 13.5±3.5g	Exposition aiguë à une dose sublétale de MC-LR par le biais d'une administration unique de cellules cyanobactériennes ajoutées à la nourriture (soit des cellules intactes, soit des cellules lysées par 3 cycles de congélation/décongélation). ⇒ **1,3 µg de MC-LR/g pc**	Cinétique : 12 h après l'ingestion des aliments contaminés Organes analysés : foie et intestins. Accumulation : - L'oxydation de Lemieux-GC/MS a montré que les surnageants d'homogénats de foie de poissons nourris avec des cellules de cyanobactéries intactes avaient une quantité de MC-LR (334 ± 134 ng MC/g) très similaire à celle trouvée chez les poissons nourris avec des cellules de cyanobactéries lysées (349 ± 139 ng MC/g). Ceci suggère qu'*O. hatcheri* est capable de digérer les cellules de cyanobactéries. - La MC-LR totale détectée par oxydation Lemieux-GC/MS représentait 1 à 31,7 % et 0,1 à 11,11 % de la dose administrée, dans l'intestin et le foie, respectivement.
(115)	Alimentation volontaire	Yellow perch (*Perca flavescens,* 9-14 cm	Chaque poisson a été nourri avec une boulette par voie orale, ce qui a permis d'administrer une dose de MC-LR. Les poissons ont été observés pendant 30 min pour s'assurer que l'aliment n'était pas régurgité. La dose administrée était de **5 et 20 µg de MC-LR**.	Cinétique : 24 h Organes analysés : muscles et foie Accumulation (ELISA) : - L'expérience préliminaire qui a été utilisée pour sélectionner les points de temps appropriés pour l'échantillonnage des poissons après l'exposition au MC-LR a montré qu'après une dose de 5 µg/poisson, la concentration de MC dans le foie et le muscle a atteint un pic entre 8 et 10 h et est revenue à des concentrations inférieures à 4 ng/g MC dans les 24 h, restant faible jusqu'à la fin de l'expérience à 240 h (données non publiées). - Les concentrations de MC dans le tissu musculaire du poisson ont atteint leur maximum 12 h après que le poisson ait été exposé, à la fois dans l'expérience de 5 µg et dans celle de 20 µg. Les concentrations étaient plus faibles dans le muscle que dans le foie,

Référence	Méthodes d'exposition	Espèces	Exposition	Bioaccumulation
				avec des concentrations maximales de 41,38 ± 51,49 ng MC/g PS dans l'expérience de 5 µg et de 30,35 ± 25,75 ng MC/g PS dans l'expérience de 20 µg. - 24 h après le dosage, les concentrations moyennes de MC dans l'expérience de 5 µg étaient de 8,54 ± 2,58 ng MC/g PS et de 2,74 ± 2,14 ng MC/g PS pour l'expérience de 20 µg.
(100)	Balnéation MC dissoutes	*C. paleatus* 1,91 ± 0,34 g (n = 20) et *J. multi- dentata* ,53 ± 0,32 g (n = 20)	Exposition à la MC-RR à une concentration de **50 µg/L**	Cinétique : exposition pendant 24h. Organes analysés : le foie, les branchies, l'intestin, la vésicule biliaire, le cerveau et les muscles Accumulation : - Foie : Concentration la plus élevée de MC-RR dans le foie des poissons exposés expérimentalement (70 et 84,4 % de la quantité totale de MC analysée). *C. paleatus* a accumulé des quantités totales de MC-RR beaucoup plus élevées dans les branchies (1,4±0,5 µg MC-RR/g p.c.), le foie (19,63 ±10 µg MC-RR/g p.c.) et les tissus intestinaux (2,09 ± 0,4 µg MC-RR/g p.c.), par rapport à *J. multidentata* (0,56 ; 1,62 et <LOD, respectivement). - Intestin : Présence de MC-RR dans l'intestin de *C. paleatus* (2,09 ±0,4 µg MC-RR/g p.c.) mais pas dans sa vésicule biliaire ni dans les intestins de *J. multidentata*. - Muscle : La MC-RR peuvent être présents dans le muscle des poissons après 24 h d'exposition. Malgré la prédominance des MC-RR dans le foie, les MC-RR représentent 0,2 à 5 % de la quantité totale de MC détectées dans les muscles des poissons exposés pendant 24 h
(116)	Balnéation MC dissoutes	Poisson zèbre (*Danio rerio*) âgé de cinq mois	Les poissons ont été exposés pendant 21 jours à la MC-LR seul, au n-TiO_2 seul ou au deux. Les œufs ont été prélevés chaque jour sur les poissons mâles. Les poissons ont été exposés à la MC-LR a 0, 0.5, 4 et 32 µg/L, en n-TiO2 a 100 µg/L	Cinétique : 21 jours à la MC-LR seule, n-TiO_2 ou les deux (n=10 femelles et 10 mâles), prélèvements à 0, 2, 4, 8, 12, 20 and 24 h Organes analysés : Foie, cerveaux et gonades Accumulation : - Chez le poisson zèbre femelle, une augmentation dose-dépendante de MC-LR a été observée dans les tissus, les niveaux les plus élevés étant détectés dans le foie. De même, une augmentation dose-dépendante de MC-LR a été mesurée dans les groupes co-exposés. La teneur en MC-LR était manifestement plus élevée dans les groupes co-exposés que dans les groupes exposés au MC-LR seul.

Référence	Méthodes d'exposition	Espèces	Exposition	Bioaccumulation
				Chez les mâles, une augmentation similaire du MC-LR en fonction de la concentration a également été détectée dans le foie, le cerveau et les testicules après une exposition à 0,5, 4 et 32 µg/L de MC-LR, respectivement, et la concentration de MC-LR a encore augmenté en cas de co-exposition avec le n-TiO2. - Cette étude a démontré une bioconcentration accrue de MC-LR chez le poisson zèbre en présence de n-TiO2.
(117)	Balnéation cyanobactéries productrices de MC	*H. molitrix* (longueur, 76,3 ± 9,3 mm ; poids, 3,3 ± 1,2 g) et *C. gibelio langsdofi* (longueur 76,3 ± 9,3 mm ; poids, 3,3 ± 1,2 g)	Trois souches monoclonales de *Microcystis aeruginosa* (NIES 44, 88 et 99).	Cinétique : 6 jours (n=56) Organes analysés : muscles et fèces. Accumulation (HPLC-UV) : - La MC totale (MC-LR+MC-RR) de NIES 44 a été augmentée par l'exposition à *H. molitrix* et était 54 fois plus élevée que celle des témoins (valeur moyenne ± E.S. de 12,2 ± 3,6 avant l'exposition au poisson ; 16,2±4,3 dans les témoins contre 878,6±57,0 µg/g cellule sèche dans les traitements au jour 6). - La souche NIES 99 exposée à *H. molitrix* a vu sa teneur en MC doubler (25,8±3,9 µg/g cellule sèche avant l'exposition des poissons ; 24,1 ± 2,1 dans les témoins contre 51,0±4,7 µg/g cellule sèche dans les traitements le 6e jour). - Les niveaux de MC dans les tissus corporels de *H. molitrix* étaient relativement faibles (<5µg/g PS) et étaient les plus élevés chez les poissons exposés au NIES 99. Les niveaux de MC dans les tissus corporels de *C. gibelio langsdorfi* omnivore (<0,8 µg/g PS) étaient inférieurs à ceux de *H. molitrix*. Les teneurs en MC-RR étaient plus élevées que celles de la MC-LR dans tous les tissus corporels des poissons nourris avec chaque souche de *M. aeruginosa*. Les niveaux de MC étaient plus élevés dans les fèces de *H. molitrix* (11,1-45,9 µg/g PS) que dans celles de *C. gibelio langsdorfi* (niveau maximum de 21 µg/g PS), bien qu'il s'agisse de valeurs conservatrices car certains composants hydrosolubles peuvent avoir été perdus dans les fèces.

4. Méthodes d'analyses des MC libres

L'analyse des MC libres est la plus couramment utilisée, quelle que soit la matrice étudiée. Ces toxines libres, bien qu'elles ne représentent pas toutes les toxines présentes dans un échantillon, donnent une idée générale de la contamination d'un échantillon et sont donc particulièrement utilisées en première intention dans le cadre de la biosurveillance d'un environnement suite à un épisode de prolifération de cyanobactéries ou suite à une intoxication suspecte d'animaux.

4.1. Méthodes d'extraction des MC libres

Les méthodes d'analyse des formes libres de MC reposent principalement sur l'extraction des analytes cibles de la matrice, qu'elle soit abiotique (eau, sédiments, sols, air) ou biotique (tissus ou fluides d'animaux, plantes). L'étape d'extraction est réalisée à l'aide de solvants organiques (55, 118) ou de liquides ioniques (119). Comme le montre le **Tableau 3**, il existe une grande variété de protocoles pour extraire les toxines libres de diverses matrices en utilisant différents solvants seuls ou en mélange. L'efficacité de ces différents protocoles a été testée dans plusieurs publications. Quatre méthodes d'extraction ont été comparées sur des tissus musculaires de poissons (poisson-chat, swai et basa) : une méthode QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) sans tampon (100 % acétonitrile (ACN) ; sulfate de magnésium anhydride ($MgSO_4$) et chlorure de sodium (NaCl) ; extraction dispersive en phase solide avec C18), une méthode initialement utilisée pour les médicaments vétérinaires (ACN:H_2O (80:20) ; extraction dispersive en phase solide avec C18), un protocole d'extraction avec du méthanol (MeOH): H_2O (75:25) avec 1 % d'acide formique suivi d'une extraction liquide-liquide (LLE) avec de l'hexane et un protocole d'extraction avec de l'ACN acidifié:H_2O (75:25) suivi d'une LLE avec de l'hexane (120). Cette dernière méthode s'est avérée la plus efficace, avec des taux de récupération de 90 à 115 % pour tous les analytes, à l'exception de la MC-RR, qui a donné un taux de récupération moyen de 130 %. Dans une autre étude, différentes méthodes d'extraction des MC-LR et -RR dans trois matrices différentes (muscles de poisson, laitue et échantillons de sol) ont été comparées (41). Dans un premier temps, trois protocoles d'extraction des MC des muscles de poisson (*Sander vitreus*) ont été confrontés : MeOH:H_2O (80:20) ; MeOH:H2O:BuOH (butanol) (75:20:5) ; acide acétique à 5 % et acide éthylènediaminetétraacétique [EDTA 0,01 M]. Le taux de récupération le plus élevé a été obtenu avec le mélange de solvants MeOH:H2O:BuOH (75:20:5) (41). Une comparaison similaire a été faite pour la matrice de laitue en comparant MeOH:H_2O (50:50), MeOH:H_2O:TFA (acide trifluoroacétique) (80:19:1) ; 5 % d'acide acétique et EDTA (0,01M) et a identifié le mélange MeOH:H_2O (50:50) comme étant le plus efficace (41). Enfin, deux protocoles ont été évalués sur des échantillons de sol : $Na_4P_2O_7$ (pyrophosphate de sodium) et EDTA (0,1M) ou acide acétique à 5 % et EDTA (0,01M) et le premier s'est avéré le plus efficace (41). Des comparaisons similaires ont été effectuées sur l'efficacité de l'extraction de trois variants de MC à partir de légumes (**Tableau 3**) avec différents rapports MeOH:H_2O et ont conclu que le rapport MeOH:H_2O (80:20) est le plus efficace pour l'ensemble des huit matrices végétales testées (121). L'utilisation d'un mélange MeOH:H_2O (80:20) pour l'extraction des MC libres a également été choisie sur une matrice poisson dans une autre étude (41). D'autre part, d'autres protocoles ont ajouté une étape d'acidification de la solution d'extraction avec du

TFA (1 % ou 0,1 % selon les matrices testées) qui permet d'augmenter encore le taux de récupération (> 67,6 % pour toutes les matrices testées) (121). Afin d'améliorer la méthode LLE pour l'extraction des MC, de nouvelles applications ont été développées, telles que la microextraction liquide-liquide dispersive *in situ* à base de liquide ionique (119) ou l'extraction liquide-liquide assistée par salting-out (SALLE) (122). Dans le premier cas, on utilise un liquide ionique, [BeEOHIM][Br] (1-benzyl-3-(2-hydroxyethyl)imidazolium bromide), qui contient à la fois une partie aromatique et un groupe hydroxyle dans sa structure chimique et dans l'autre cas, on utilise deux solvants non miscibles et l'ajout de sel dans le solvant le plus polaire permet de pousser les analytes d'intérêt vers le solvant plus apolaire. Dans certaines études, une alternative à la méthode LLE est utilisée : l'extraction en phase solide (SPE) (38, 42, 43, 123-127). Cette méthode est généralement utilisée après l'étape LLE comme méthode de purification (ou directement comme méthode d'extraction de MC à partir d'échantillons d'eau).

4.2. Méthodes de purifications

Dans certains cas, une étape de purification supplémentaire est ajoutée après l'extraction pour permettre l'élimination des composés susceptibles d'interférer avec l'analyse, mais aussi pour permettre la concentration de l'analyte cible afin de faciliter sa détection. Différentes méthodes sont couramment utilisées, notamment la SPE, les colonnes d'immunoaffinité (IAC) ou la LLE.

4.2.1. Extraction sur phase-solide (SPE)

La méthode de purification la plus couramment utilisée pour les échantillons contenant des MC est la SPE (44). La SPE consiste en un processus de séparation basé sur la différence d'affinité entre l'analyte extrait par solvant, une phase solide souvent contenue dans une cartouche et une phase liquide stationnaire (128). En fonction de la nature de l'analyte cible, différents types de cartouches présentant différents phénomènes de rétention (phase normale, phase inverse, phase d'échange d'ions, phase d'adsorption) ont été mis au point. Dans le cas des MC, il existe des différences de polarité entre les variants (129).

Ces différences peuvent expliquer l'utilisation d'un panel de méthodes de purification (**Tableau 3**). Le choix du matériau (sorbant) et du solvant sera alors décisif pour la réussite de l'analyse (130). Ainsi, pour les composés légèrement hydrophiles tels que MC-RR ou -LR dans une matrice aqueuse (129), l'utilisation de cartouches C18 en phase inverse peut être envisagée, alors que pour d'autres toxines à caractère lipophile telles que les variants -LW ou -LF (131), il sera plus recommandé d'utiliser par exemple des cartouches de carbone graphite poreux (PGC) (132). Une solution intermédiaire lors d'une analyse simultanée de plusieurs variants à caractère hydrophile pour certains et plutôt lipophile pour d'autres sera l'utilisation de cartouches "tout usage" de type HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) ; c'est cette approche qui est utilisée dans la plupart des publications rapportées ici (**Tableau 3**). Les performances de différents protocoles SPE ont été comparées pour la récupération des MC-LR et -RR dans les trois matrices susmentionnées (c'est-à-dire les échantillons de poisson, de laitue et de sol) (41). En

comparant trois cartouches SPE : HLB Oasis (Waters), Sep-pak C18 (Waters), colonnes SPE à charbon actif (Agilent) parmi les plus utilisées dans la littérature (**Tableau 3**), les auteurs ont conclu que dans les trois matrices testées, la cartouche HLB était la plus efficace. Néanmoins, l'influence de la méthode de purification sur la récupération des toxines était de 1,3 fois (MC-RR dans les échantillons de sol) à 3,2 fois (MC-LR dans les échantillons de laitue) moins importante que le choix de la méthode d'extraction (en moyenne 2,2 fois moins importante). Dans ces différents exemples, la combinaison des méthodes d'extraction et de purification les plus efficaces a permis d'obtenir des taux de récupération très élevés (≥ 94 % de récupération pour les échantillons de muscle de poisson, ≥ 93 % pour les échantillons de laitue et ≥ 95 % pour les échantillons de sol). Dans une autre étude comparant l'efficacité du HLB par rapport au C18 sur la matrice de laitue, l'utilisation du C18 n'a été préférée que par la prise en compte de l'aspect financier dans la mesure où les deux cartouches testées donnent des résultats similaires sur le taux de récupération des toxines. En outre, les auteurs ont conclu que le taux de récupération des deux cartouches était similaire et satisfaisant sur sept autres variétés de légumes différentes (épinard d'eau, chou, choy-sum, carotte, navet, pomme de terre et citrouille), tandis que pour les matrices concombre et aubergine, l'efficacité des cartouches C18 (< 60 %) était inférieure à celle des HLB (> 70 %) (121).

4.2.2. Colonnes d'immuno-affinité (IAC)

Bien que la SPE semble être la méthode de purification la plus largement utilisée pour l'analyse des MC, l'utilisation des IAC est considérée comme une bonne technique de remplacement. En particulier dans les échantillons de cyanbactéries, où les solutions SPE n'étaient pas toujours adaptées aux déterminations quantitatives de faibles niveaux de MC (1 µg/g ou moins) (133). Les IAC correspondent à une méthode semblable à la chromatographie liquide dans laquelle la phase stationnaire contient des Ac ou des agents apparentés aux anticorps (Ac) (134). Dans la pratique, des Ac monoclonaux (42, 43, 123, 135-137) ou polyclonaux (124, 133) anti-MC spécifiques ont été produits à partir de lapins (124, 133, 138) ou de souris en utilisant différentes méthodes telles que des hybridomes produisant des Ac anti-MC-LR (135), des Ac à chaîne unique contre MC-LR (139) ou, plus fréquemment, l'inoculation d'un immunogène spécifique et l'isolement d'antisérums (133, 138). Ensuite, les Ac sont immobilisés de manière covalente sur un support ou adsorbés sur le support. De nombreux types de supports peuvent être utilisés pour l'IAC (134), mais pour la purification d'échantillons contenant des MC, les colonnes à base de sépharose (124, 133, 136, 138, 139), à base de silice (124, 133, 138, 140), Affi-Gel 10 (Bio-Rad) (43, 123), ou Formyl-Cellulofine (Seikagaku Co.) (42) sont les plus couramment utilisées. L'élution est finalement simplement réalisée en changeant le pH de la phase mobile de l'IAC. Dans la plupart des applications IAC, les Ac et les sorbants sont contenus dans une cartouche (42, 43, 133, 141), bien qu'il existe des exemples d'applications d'immunoaffinité en suspension (137). La réutilisation des IAC est considérée comme avantageuse et une IAC réutilisable trois fois pour des échantillons d'eau après un simple processus de régénération consistant en un lavage avec un tampon Tris-HCl contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA) a été développé (42). Malgré cela, la cartouche a montré une perte progressive de l'activité de l'Ac avec une utilisation répétée et il a été observé une

diminution de la capacité de 50 % pour la cartouche à base de sépharose après 28 utilisations et de 44 % pour la cartouche à base de silice après trois à quatre utilisations (133). L'utilisation de l'IAC s'est avérée adéquate pour la purification de différentes variants de MC (par exemple 15 MC différentes) (124), dans diverses matrices telles que des échantillons d'eau (42, 43, 123, 124, 140, 141), des algues (138), des échantillons végétaux (136) ou des échantillons d'animaux (142). Certaines études se sont intéressées à la comparaison de l'influence des colonnes IAC sur l'extraction et la purification des MC. Par exemple, l'extraction de six variants de MC (MC-RR, -YR, -LR, -LA, -LW et -LF) a été évaluée dans des échantillons d'eau en utilisant deux IAC différentes (colonne IAC à base de sépharose et colonne à base de silice) (124). Les résultats ont montré des taux de récupération élevés (> 70 %) avec néanmoins de meilleurs résultats pour l'IAC à base de sépharose (> 80 % pour les six variants) que pour l'IAC à base de silice (70 % et 71 % pour MC-LW et -LF, respectivement) et un champ d'application légèrement plus large pour l'IAC à base de sépharose (limite de détection de 14 ng et limite supérieure de 1,2 µg) par rapport à l'IAC à base de silice (limite de détection de 14 ng et limite supérieure de 420 ng). Ces résultats sont cohérents avec une autre étude menée sur des échantillons d'eau et d'algues bleues (138). Dans la même étude, une comparaison entre les deux IAC et une SPE (Oasis HLB, Waters) a été effectuée et les résultats de récupération étaient similaires pour la SPE et l'IAC à base de sépharose, mais particulièrement inférieurs pour l'IAC à base de silice pour les MC les moins polaires. Dans certaines études comparant SPE et IAC, la récupération était meilleure avec IAC qu'avec SPE. C'est le cas du Microcystin ImmunoSepTM (ImmunoKem) comparé au C18, 500 mg ODS (Bakerbond) dans les échantillons d'algues et d'eau (141). Des résultats similaires ont également été réalisés sur des échantillons d'eau du robinet (123). Dans quelques études, la SPE et l'IAC sont combinées, la SPE est utilisée pour la préconcentration de l'échantillon d'eau ou comme méthode d'extraction et l'IAC permet la purification de l'échantillon (43, 136, 140).

4.2.3. Extraction liquide-liquide (LLE)

Bien qu'utilisé principalement comme méthode d'extraction, la LLE peut également être utilisé comme méthode de purification. En ce qui concerne le domaine des MC, la LLE avec de l'hexane est particulièrement utilisée dans le cas de matrices contenant des lipides comme le foie de souris (143) ou de poissons (38, 104, 144-148) pour éliminer les interférences lipophiles. En pratique, les échantillons contenus dans un solvant (tel que le méthanol ou l'acétonitrile) seront mélangés avec de l'hexane, ce qui permettra de diminuer la partie lipidique de l'échantillon. Cette étape selon les protocoles peut être réalisée avant (38, 145, 148) ou après (104, 144, 146, 147) l'étape d'extraction (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Quelques exemples de protocoles d'extraction/purification (SPE / IAC / LLE) pour l'analyse des MC en fonction de la matrice étudiée.

Références	Extraction / étape de préconcentration (échantillon d'eau)	Etape de purification (SPE / IAC / *LLE*)	Matrices *(espèces)*
(118)	Méthanol (100 %)	/	Moule (*Mytilus edulis)*
(55)		/	Saumon *(Salmo salar)*
(55)		/	Crabe *(Cancer magister)*
(149)		/	Gastéropode *(Lymnaea Stagnalis)*
(150)			
(44)		Isolute C18 1g (Int. Sorbent Technology)	Eau brute et traitée du réservoir
(140)		C18 cartridges Bakerbond 500 mg (J.T. Baker®) + **Ac anti-MC-LR liés à des particules de silice activées par le glutardialdéhyde d'une taille de pores de 27,5 nm (Mallinckrodt Baker)**	Eaux de surface
(144)		*Hexane* + C18 reverse phase silica (Bound-Elut)	Poisson *(Tilapia rendalli)*
(104)			Poissons et crustacés
(148)		*Hexane*	Poissons : *(Perca fluviatilis ; Sander lucioperca ; Aspius aspius ; Esox Lucius ; Cyprinus carpio ; Ctenopharyngodon idella ; Anguilla anguilla)*
(145)			*Cyprinus carpio ; Hypophthalmichthys molitrix*
(146)			Carpe *(Cyprinus carpio)*
(143)		*n-hexane* + Oasis HLB 200 mg (Waters)	Souris (foie et sang)
(151)	Méthanol : acide acétique (95 :5)	ODS / silica gel column	Compléments alimentaires à base d'algues (*Chlorella or Spirulina*)
(152)	Méthanol : acide acétique : TFA (94,8 : 5: 0,2)	ODS cartridge Supelclean LC18 (Supelco)	Échantillons de sédiments
(153)	Méthanol : eau (90 :10) + 0.1 % acide formique (FA)	Sep-Pak C18 Plus Light SPE (Waters)	Souris (urine)
			Souris (plasma)
			Échantillons de sang humain
(130)		Au-PPy nanocomposite-coated silica sorbent	Eau de qualité HPLC, eau de lac et eau du robinet
(154)	Méthanol : eau (85 :15)	Oasis HLB (Waters)	Carpe herbivore, carpe noire, carpe à grosse tête et crevette d'eau douce
(155)	Méthanol : eau (80 :20)	/	Moules (*Anodonta anatina)*
		/	Moules (*Dreissena polymorpha)*
(156)		Oasis MCX (Waters)	Carpe *(Aristichthys mobilis)* (bile/sérum)

(132)		Assembly C18 Bakerbond 500 mg (Dicsa) and BOND ELUT® Carbon cartridge (Agilent)	Laitue
(157)		Oasis HLB 200 mg (Waters)	Sang humain
(121)	Méthanol : eau (80 :20) + 0,1 % TFA pour la laitue, le chou, la carotte, le navet, l'aubergine Méthanol : eau (80 :20) + 1 % TFA pour MC-LR dans la pomme de terre et le choi sum, MC-RR dans le concombre et le potiron, et MC-YR dans l'épinard à l'eau et le chou	Oasis HLB (Waters) pour les concombres et les aubergines Sep-pak C18 (Waters) pour la laitue, les épinards, le chou, le choi sum, la carotte, le navet, la pomme de terre, la citrouille	Laitue, épinard d'eau, chou, choi sum, carotte, navet, pomme de terre, citrouille, concombre et aubergine
(158)	Méthanol : eau (75 :25) + 0.1 M acide acétique	Oasis HLB 200 mg (Waters) ou STRATA-X (Phenomenex)	Chien *(Canines)*
(159)		SPE STRATA-X (Phenomenex)	Canard (*Anas platyrhynchos)*
(160)			Périphyton
(160)			Achigan à petite bouche *(Micropterus dolomieu)*
(161)			Dauphin *(Tursiops truncatus)*
(138)	Méthanol : eau (75 :25)	**2 mg d'Ac (IgG) immobilisés sur une IAC à base de sépharose**	Algues bleues
(136)		RIDA C18 (Biopharm) + **MAb anti MC-LR immobilisé sur du sépharose 4B activé au CNBr**	Châtaigne d'eau
(133)		**100-200 mg d'Ac polyclonaux anti-MC-LR immobilisés sur des supports en sépharose CL-4B ou en gel de silice activé**	Algues
			Saumon, truite arc-en-ciel et brochet
(141)		**Microcystin ImmunoSepTM, (ImmunoKem)**	Échantillons d'eau
		C18 cartridges Bakerbond 500 mg (J.T. Baker®)	
(41)	Méthanol : eau : butanol (75 : 20 : 5)	Oasis HLB (Waters)	Doré jaune *(Sander vitreus)*
(39)	Eau : méthanol : butanol (75 : 20 : 5)	SPE Oasis HLB 30 mg (Waters)	Gastéropode *(Lymnaea stagnalis)*
(40)		SPE STRATA-X (Phenomenex)	Truite arc-en-ciel *(Oncorhynchus mykiss)*
(120)	ACN : eau (75 : 25)	*Liquid liquid partition avec de l'hexane*	Poisson-chat, swai et basa
(41)	Méthanol : eau 50 : 50	Oasis HLB (Waters)	Laitue
(38)	Isolute C18 3 ml (Biotage)	*LLE Hexane, puis ethanol (10 %)*	Oiseau d'eau *(Podiceps nigricollis)*
(162, 163)	Centrifugation, acétone	Évaporation à l'azote, reconstitution dans l'eau	Sang humain
(164)	Acide éthylène-diamine-tétraacétique-pyrophosphate de sodium (EDTA-$Na_4P_2O_7$, 0.1 M)	Oasis HLB (Waters)	Résidus de traitement des eaux
(41)			Sol

(124)	Oasis HLB 60 mg (Waters)	**Ac polyclonaux anti-MC-LR sur colonne à base de sépharose 0,5 ml de gel d'immunoaffinité (couplage de l'AcM M8H5 à Affi-Gel 10) transféré sur une colonne jetable en polypropylène Muromac (Muromachi Kagaku Kogyo Kaisha Ltd)**	Eaux de surface
(43)	Sep-Pak PS-2 500 mg (Millipore)		Eau du lac
	Excelpak SPE-GLF 500 mg (Yokagawa Analytical Systems Co.)		
(123)	Water Sep-Pak Plus C18 (Millipore)		Eau du robinet
(42)	Sep-Pak PS2	**Gel d'immunoaffinité (M8H5 anti-MC-LR Mab + formyl-cellulofine)**	Eau du lac
(165)	KOH à 65°C pendant 48 h, puis HCl	/	Saumon *(Salmo salar)*
(38)	Phénol et chloroforme saturés d'eau	/	Phytoplancton
(162, 163)	Solution saline tamponnée au phosphate	/	Air
(166)	1 ml de tampon salin	/	Mucus nasal humain
(125)	Electrospun polystyrene (PS) nanofibers		Eau du robinet et eau environnementale
(127)	Dual SPE (Oasis HLB, 200 mg (Waters) and HyperSep Hypercarb PGC,200 mg, (Thermo Scientific))		Eau
(126)	Sep-Pak C18 Plus Light 130 mg (Waters)		Eau du robinet et eau du lac
(133)	**100-200 mg d'Ac polyclonaux anti-MC-LR immobilisés sur des supports en sépharose CL-4B ou en gel de silice activé**		Eau de rivière et eau du robinet
(137)	**Ac anti MC-LR recombinant dérivé de plantes immobilisé sur une colonne d'extraction d'immunoaffinité en verre sol-gel**		Eaux de surface de deux lacs et d'une rivière
(138)	**2 mg d'Ac (IgG) immobilisés sur une IAC à base de sépharose**		Eaux fluviales et souterraines

4.3. Méthodes d'analyses

Les extraits obtenus lors des étapes d'extraction et de purification peuvent être analysés par différentes méthodes, notamment immunologiques, chimiques ou biologiques. Les tests ELISA sont les méthodes immunologiques les plus courantes (47, 167). Les approches chimiques sont également largement utilisées à l'aide d'équipements tels que l'HPLC couplée à un détecteur à barrettes de diodes (HPLC-UV-DAD) (44, 45, 85) ou l'électrophorèse capillaire (46, 168-171). Cependant, la méthode chimique la plus utilisée et la plus sensible reste la chromatographie liquide (LC-MS) ou gazeuse (GC-MS) couplée à la spectrométrie de masse (40, 48). L'approche biologique comprenant des essais biologiques sur des rongeurs (49), des plantes et des algues (172-174), des invertébrés (51, 175), des poissons et des amphibiens (50) ou *in vitro* (176) est de moins en moins utilisée pour des raisons éthiques. L'essai d'inhibition de la phosphatase protéique (PPIA), qui mesure l'effet inhibiteur des MC sur l'activité de la PP, est encore très répandu et peut être très utile pour le criblage des MC (52), en particulier lorsqu'il est utilisé en complément d'une méthode chimique telle que la LC-MS. D'autres approches existent également, comme les aptamères (177-180) ou les biocapteurs (15). Ces dernières sont un peu moins répandues et sont à la croisée des méthodes immunologiques, chimiques et biologiques.

4.3.1. Méthodes immunologiques

La méthode ELISA est la principale méthode immunologique pour l'analyses des MC. Cette méthode permet de détecter différents variants de MC ce qui en fait une bonne méthode de criblage sur le terrain (181). L'ELISA appliquée aux méthodes d'analyses des MC repose sur des Ac monoclonaux ou polyclonaux anti Adda. La première utilisation d'un Ac monoclonal anti-MC remonte à 1986 (182). La première utilisation d'un Ac polyclonal dirigé contre une MC a été réalisée à partir d'Ac de lapin (183) à partir d'un essai immunologique de type sandwich pour la détermination de l'hépatotoxine dans les cyanobactéries (184).

Parmi les tests ELISA actuels permettant la détection de MC, certains sont basés sur des Ac extraits d'œufs de poulets immunisés, d'autres sur des Ac de lapins et comprennent des tests ELISA indirects[2] compétitifs[3] (CI-ELISA) ou directs-compétitifs (CD-ELISA) (44, 185, 186). Un autre test CI-ELISA a permis d'augmenter la sensitivité de l'ELISA en créant un test spécifique pour les MC possédant un acide aminé (AA) arginine en position 4 (187, 188). Un test ELISA non compétitif par fluorométrie a été basé sur l'Ac synthétique anti-immunocomplexe large-spécifique SA51D1 qui permet de détecter différents variants de MC en dessous de la valeur de référence de l'OMS de 1 µg/L (189, 190). Par ailleurs, d'autres

[2] Dans un dosage ELISA direct, l'antigène est lié par un Ac qui lui est spécifique conjugué à une enzyme ou à une autre molécule qui permet la détection Dans un ELISA indirect, un Ac secondaire vient se lier à l'Ac spécifique de l'Ag et c'est cet Ac secondaire qui est conjugué à une enzyme ou à une autre molécule de détection.

[3] Le terme compétitif fait référence à la présence d'un antigène de référence au fond des puits du test ELISA. Lorsque l'échantillon et l'Ac sont ajoutés et si un antigène est présent dans l'échantillon, il va entrer en compétition avec l'antigène de référence pour se lier à l'Ac. Plus la quantité d'antigène est importante dans l'échantillon, plus la quantité d'Ac liée par l'antigène de référence au fond des puits sera faible, et plus le signal sera lui aussi faible.

applications de la méthodes ELISA ont été développées pour l'analyse des MC, que ce soit variant spécifique comme anti MC-LR (183, 191), MC-RR (192), ou MC-LA (182) ou non-variants dépendants (185).

Des kits peuvent également faciliter l'analyse des MC *in situ* notamment des immunostrip (47, 167) ou des dipstick (193). Ces kits ELISA commercialisés ont été développé sur un domaine de linéarité précis. Par exemple, des kits pour le dosage de MC dans l'eau permettent de doser la MC-LR entre 0,05 et 5 µg eq MC-LR/L. Une procédure standardisée a également été développés par l'US-EPA pour la détermination par des MC dans l'EDCH et les eaux de loisirs avec une limite de détection de 0,26 µg MC-LR/L (USA EPA, Method n°546 *(194)*).

En plus d'être appliqué en tant que test de première intention pour détecter la présence de MC dans l'eau, l'ELISA peut également être appliquée à de nombreuses matrices notamment les fruits de mers, des poissons ou des animaux sauvages dans le cadre d'épisodes de mortalité suspectés d'être causés par les MC (120, 159, 195, 196). En général, la méthode ELISA est capable de donner des résultats répétables et reproductibles par rapport aux autres méthodes (120, 189, 196-198), même si les réponses de détection avec les tests ELISA peuvent varier de manière significative en fonction des variants de MC (192).

4.3.2. Méthodes chimiques

4.3.2.1. HPLC couplé à un détecteur ultraviolet (UV) ou fluorescence (FLD)

La méthode de séparation chromatographique par HPLC couplée à un détecteur adapté est désormais bien établie pour l'analyse en routine des polluants de l'environnement. Les systèmes HPLC se composent d'une colonne de chromatographie en phase solide à travers laquelle les analytes dissous dans des solvants liquides sont injectés et séparés en raison des différences d'interaction des analytes individuels avec la phase solide (3). Le flux passe ensuite par un détecteur, par exemple des détecteurs d'absorbance UV ou de fluorescence (FLD), l'absorption étant proportionnelle à la quantité d'analyte. Pour séparer des analytes, l'élution peut être isocratique (*i.e.* même débit et même composition de solvant tout au long de l'analyse) dans le cas d'une analyse ne comprenant que quelques analytes avec peu d'interférences liées à la matrice. Dans d'autres cas plus complexe (*i.e.* interférences plus importantes dans l'échantillon ou davantage d'analytes à analyser), un gradient d'élution sera utilisé, ce qui signifie que les compositions des phases mobiles vont varier au cours de l'analyse avec souvent une étape de lavage avec un solvant organique à 100 % au cours du cycle d'analyse (3). Le détecteur le plus couramment utilisé sur les systèmes HPLC pour doser les MC est la barrette de diode (DAD), qui fournira un spectre d'adsorption (200-600 nm) pour les composés analysés. Ceci est utile pour l'analyse des cyanotoxines car beaucoup d'entre elles ont des spectres d'absorption UV caractéristiques (199).

L'HPLC couplé à un détecteur peut également être utilisée pour générer des données à la fois quantitatives et qualitatives pour l'analyse des MC (200). Par ailleurs, cette méthode permet d'identifier et de quantifier les variants de MC dans un échantillon si des normes analytiques appropriées sont présentes. Pour les détecteurs UV, la limite de détection des MC

est inférieure à 1 µg/L, ce qui permet de détecter des quantités infimes de MC dans les échantillons d'eau ou de nombreuses matrices (100, 201-203). Cette technique nécessite néanmoins un personnel formé dans le domaine. Avant de pouvoir réaliser l'analyse d'un échantillon, il reste nécessaire d'effectuer des étapes d'extraction et de purification. L'existence de nombreux variants peut également rendre difficile l'analyse de certains variants de MC dont il n'existe pas de standard disponible commercialement ou dont la séparation avec cette méthode ne peut être réalisée du fait des faibles différences pouvant exister entre deux variants (37).

4.3.2.2. LC- et GC-MS/MS

Il est possible d'ajouter un détecteur de masse aux systèmes de chromatographie ce qui constitue un outil très puissant pour l'analyse des MC. Les spectres obtenus par ces systèmes permettent de fournir une indication sur la composition élémentaire et la structure d'un analyte mais aussi de déterminer la quantité d'analytes pour lesquels des matériaux de référence sont disponibles (3). De nombreux systèmes existent avec différentes sources d'ionisations (notamment l'ionisation par électronébulisation (ESI) qui est souvent utilisée pour l'analyse des MC), différents types d'analyseur de masse (quadripôle, temps de vol (TOF), piège a ions ou orbitrap). Ces analyseurs sont souvent couplés entre eux pour réaliser des expériences en tandem (MS/MS) avec un analyseur permettant la séparations des ions, une cellule de collision intercalée permettant alors de fragmenter les ions avant qu'un second analyseur sépare les fragments (85).

Des protocoles robustes sont nécessaires pour la LC-MS/MS car le signal de la MS peut être soit augmenté soit atténué par les interférences de la matrice (sels, produits organiques, etc.). En outre, la réponse (*i.e.* l'intensité du signal par rapport à la quantité d'analyte) peut dériver sur une période relativement courte, ce qui nécessite un étalonnage régulier et fréquent (3).

À l'heure actuelle, il existe un certain nombre de méthodes LC-MS pour la détermination des MC que ce soit dans l'eau, les sédiments, ou encore des cellules ou tissus animaux (37). Il s'agit donc d'une méthode très précise mais nécessitant l'intervention d'un personnel hautement qualifié et dont l'interprétation des résultats reste complexe et chronophage.

Une alternative à la LC-MS est la GC où le système de chromatographie liquide est remplacé par la chromatographie gazeuse. Dans ce cas, l'échantillon à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne qui contient une phase stationnaire (liquide ou solide). Les analytes vont alors être transportés à travers la colonne par un gaz vecteur. Les analytes de l'échantillon vont alors être séparés et sortir plus ou moins rapidement de la colonne en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. Cette technique est la plus souvent utilisée dans le cadre des analyses de MC totales suivant une ozonolyse ou une oxydation de Lemieux (53).

4.3.2.3. L'électrophorèse capillaire (CE)

La CE permet de séparer et quantifier des variants de MC en fonction de leurs tailles mais aussi de leur charge moléculaire. Cette technique permet une analyse rapide permettant une grande efficacité de séparation, une utilisation d'un petit volume d'échantillon et de solvant. Il s'agit d'une méthode d'analyse des MC relativement verte ne générant que peu de déchets (46). Depuis sa mise au point, la CE a été appliquée à l'analyse des MC dans des algues brutes (141, 204, 205). Différentes variantes de CE ont été développées comprenant par exemple : des solvants modificateurs organiques à base de dodécyl sulfate de sodium (SDS), l'électro-chromatographie capillaire (CEC) dans un capillaire à phase inversée formé par des monolithes de polymères inorganiques ou organiques, des colonnes monolithiques artisanales en CEC-UV à haute pression (pCEC-UV), l'électrophorèse de zone capillaire (CZE) et la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) couplée à l'UV, et la CZE couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray (ESI-MS) (171, 206-209).

Des méthodes récentes comme la CE couplée à la TOF-MS ou à l'ESI-MS ont pu permettre la séparation et l'identification de différents variants de MC avec des LD comprises entre 0,92 et 2,3 g/L et 0,2 et 1 g/L, respectivement (204, 205).

Les avantages de la CE sont sa rapidité et sa facilité d'exécution comparé à d'autres méthodes chimiques. De plus, elle permet de séparer efficacement des variants de MC ayant des rapports masse/charge proches de par l'utilisation du SDS. La CE peut ainsi séparer des isomères de MC ne différant que par la position d'un groupement méthyle (46, 205). Malgré tout, pour le même type de détecteur, la principale limitation de la CE réside dans le faible volume d'échantillon injecté dans le système qui va influer négativement sur la sensibilité et sa précision plus faible en matière de détermination quantitative comparée à une injectiondans un système HPLC.

4.3.3. Méthodes biologiques

4.3.3.1. Le test d'inhibition de la phosphatase protéique (PPIA)

Les MC sont des inhibiteurs spécifiques de PP1 et PP2A (20, 210), ce qui rend le PPIA adapté à la détection des MC. Des premières versions du PPIA utilisaient des méthodes colorimétriques avec des substrats tels que le phosphate de p-nitrophényle (211). Par la suite d'autres versions du PPIA ont été élaborées pour la détection des MC. Par exemple un immuno-PPIA colorimétrique (CI-PPIA) qui se base à la fois sur la détection immunitaire et l'inhibition des PP (212). Il existe également un PPIA qui associe détection fluorimétrique et colorimétrique permettant de détecter les MC dans l'eau à des niveaux compatibles avec le seuil réglementaire de l'OMS (213) ou des méthodes dérivées de biocapteurs (214) ou de l'immunocapture (215). De nombreux protocoles ont été utilisé pour la détection des MC dans l'eau et ont montré des niveaux de détection en dessous du seuil réglementaire de l'OMS sans nécessiter de pré-concentration de l'échantillon et peuvent être utilisé pour la surveillance de MC dans les masses d'eau (216, 217).

Il y a des limites à l'utilisation du PPIA notamment le fait que ce test ne fournisse pas de données sur le variants de MC présents et donc la toxicité potentielle. De plus, il est souvent

nécessaire d'utiliser une méthode supplémentaire pour confirmer l'analyse par PPIA du fait du manque de spécificité de ce test pour les MC (218). Enfin, il est nécessaire d'utiliser une méthode d'extraction et de purification adaptée pour isoler les MC d'autres contaminants (comme l'acide okadaïque, la calyculine A et le tautomycine) pouvant également être détectés par le PPIA (52, 212).

4.3.3.2. Bioessais

Un bioessai est un test impliquant l'utilisation de plantes ou d'animaux vivants (*in vivo*) ou de cellules ou de tissus (*in vitro*) pour déterminer l'effet biologique ou la toxicité d'une substance. Dans le cas des bioessais pour l'analyse des MC, ils peuvent être réalisés sur des rongeurs (37), des plantes et des algues (172-174), des invertébrés (51, 175), des poissons et des amphibiens (50) ou *in vitro* (176). L'avantage principal du bioessai *in vivo* réside dans le fait d'utiliser un organisme entier permettant d'évaluer de façon plus réaliste la toxicité des MC.

Dans le cas du bioessai sur souris, les extraits de toxines sont administrés par injection intrapéritonéale à des souris. La dose létale LD50 par voie intrapéritonéale varie de 50 (MC-LR) à 600 (MC-RR) µg/kg, tandis que la LD50 par voie orale est de 5000 µg/kg (37).

Les limites du bioessais sont principalement éthiques car ils nécessitent un nombre d'animaux trop important, c'est pourquoi de nombreux pays n'autorisent plus leur utilisation.

4.3.4. Biocapteurs

Les biocapteurs (**FigFigure 7**) sont une famille de dispositifs analytiques capables de détecter la présence d'une gamme diversifiée de molécules cibles, en particulier dans le contexte de la surveillance de l'environnement, y compris l'analyse des toxines. Un biocapteur est composé d'un biorécepteur associé à une méthode de transduction, qui produit un signal après interaction avec la molécule cible (219). Ce qui rend le biocapteur à la fois très spécifique et sensible, c'est la présence d'un élément biologique qui lui confère un avantage sur les méthodes conventionnelles et les essais biologiques dans la détection et la surveillance de l'environnement.

Au fil des ans, un certain nombre d'éléments biologiques naturels et artificiels ont été utilisés dans les biocapteurs (**Figure 7)**, les plus importants étant les enzymes, les Ac, les acides nucléiques, les cellules entières et les polymères à empreintes moléculaires (MIP). Sur la base de ces éléments biologiques, les biocapteurs sont soit catalytiques (enzymes et cellules entières), soit des biocapteurs d'affinité (Ac et acides nucléiques) (15). Néanmoins, peu d'applications commerciales de ces biocapteurs sont encore aujourd'hui disponibles et ils nécessitent des équipements spécifiques pour leur utilisation ce qui explique la préférence de nombreux laboratoires sur des techniques classiques (chimiques, immunologiques ou biologiques ; **Tableau 3**).

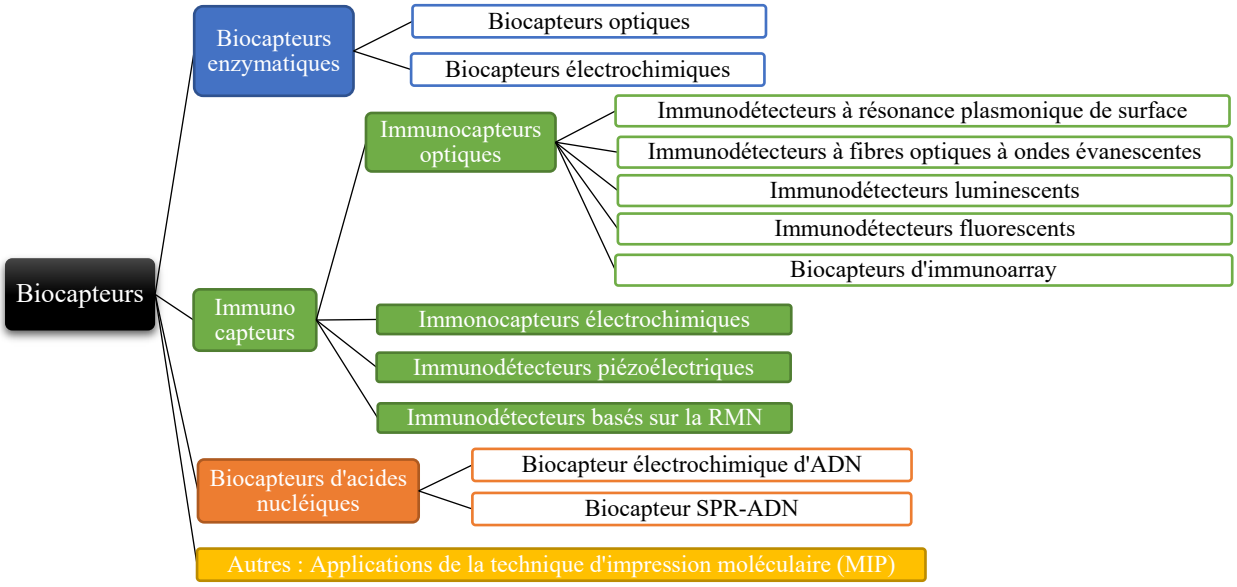


Figure 7 : Biocapteurs pour la détection des MC. Modifié d'après (15).

5. Méthodes d'analyses des MC totales

5.1. Synthèses des travaux

En plus des formes libres, les MC peuvent s'accumuler dans les organismes sous formes liées aux protéines notamment aux PP (18). Cette forme d'accumulation n'est pas secondaire et peux être, selon certaines études, la forme majoritaire d'accumulation des MC chez certains organismes (55, 159, 220). Différentes méthodes permettent l'extraction et l'analyse des MC totales dans la littérature. Les premières méthodes décrites pour l'analyse des MC totales sont l'oxydation de Lemieux et l'ozonolyse. Plus récemment deux autres méthodes ont été développées, la déconjugaison à pH basique (57, 58) et la désorption par irradiation Laser (LID)(59). Ce chapitre a pour objectif de recenser, décrire et discuter de ces méthodes, et est constitué d'une revue de la bibliographie publiée dans le journal Toxins (53).

5.1.1. Oxydation de Lemieux

L'oxydation de Lemieux se base sur la caractéristique commune des MC à savoir le fragment commun Adda. La stratégie développée consiste à oxyder ce fragment avec du permanganate de potassium ($KMnO_4$) et de l'iodate de sodium ($NaIO_3$) ou du périodate de sodium ($NaIO_4$) pour libérer une portion du fragment Adda qui prend alors le nom de MMPB. Ce fragment libéré est ensuite analysé par différentes techniques.

Depuis les années 1990, de nombreux protocoles d'oxydation de Lemieux ont été développés et appliqués à des matrices telles que l'eau (ou des échantillons de cyanobactéries), des sédiments ou des matrices animales. Ces protocoles regroupent néanmoins des étapes communes : un pré-traitement, une étape d'oxydation, une ou plusieurs étapes de purification

et une étape d'analyse. Le type de pré-traitement diffère selon la matrice envisagée : pour l'eau ou les cyanobactéries, il s'agit principalement de cycle de congélation/décongélation, de filtration ou de pré-concentration par SPE. Pour des tissus, il s'agit plutôt d'un traitement enzymatique avec de la trypsine ou d'une digestion dans la soude dans le but d'agir sur l'intégrité des protéines de la matrice et faciliter l'oxydation. Suite au pré-traitement de l'échantillon, l'étape d'oxydation est commune à tous les protocoles mais certains paramètres de l'oxydation peuvent varier selon les protocoles ou les matrices extraites notamment la concentration des réactifs (de 1 mM à 0.1 M pour chacun des réactifs), le temps d'oxydation (de 0,5 h à 4 h) et le pH utilisé (entre 8 et 9). L'oxydation de l'échantillon est stoppée par ajout de sodium bisulfite et par l'acidification de l'échantillon suite à quoi, des étapes de purification sont utilisées dans l'objectif de concentrer l'échantillon mais également de se débarrasser des éléments pouvant interférer avec l'analyte (protéines/lipides de la matrice, sels utilisés pendant le pré-traitement et l'oxydation). La majorité des études utilisent des cartouches de SPE différentes par le sorbent utilisé (par exemple du C18) ou sa quantité (de 30 à 500 mg). Dans la plupart des études sont comparées plusieurs méthodes de SPE afin de trouver la plus efficace en fonction de la matrice utilisée. D'autres protocoles vont préférer à la SPE, la LLE avec par exemple de l'éthyle acétate. Par ailleurs, certains protocoles associeront les deux méthodes : SPE et LLE successivement (159). Une fois la purification de l'échantillon réalisée, différentes techniques permettent d'analyser le fragment MMPB dont la LC couplée à différents types de détecteurs DAD (221), UV (222), FLD (223), MS/MS (48) ou encore la GC-MS/MS (55, 118).

Bien que l'oxydation de Lemieux soit la méthode la plus couramment utilisée pour analyser les formes totales de MC, cette méthode comporte plusieurs limites. En premier lieu, il s'agit d'une méthode chronophage, demandant de nombreuses manipulations et limitant le nombre d'échantillons traités simultanément. Certains protocoles par exemple demandent des étapes de pré-traitement durant plusieurs heures suivies d'une oxydation durant en général une à trois heures mais également des étapes de purification elles aussi chronophages. Une autre limite de cette méthode correspond à la variabilité des taux de récupération de l'oxydation de Lemieux. Bien que cette méthode offre généralement des taux de récupération corrects pour les matrices de cyanobactéries et pour les sédiments avec des taux de récupération autour de 80 % (**Table 4**), les taux de récupération rencontrés sur matrices animales sont beaucoup plus variables. L'étude de la bibliographie a montré des taux de récupération pouvant aller de 4 % à 114 % selon les études, les protocoles et les matrices testées (**Table 4**). Une des raisons avancées pour expliquer les taux de récupération modérés de la méthode d'oxydation de Lemieux est l'effet matrice. Ils sont souvent causés par des composants de matrice co-élués qui peuvent entraîner des phénomènes de diminution ou d'augmentation des ions au niveau de la source d'ionisation (224). Ces effets matrices sont particulièrement significatifs dans l'oxydation de Lemieux avec par exemple des diminutions du signal de -59 à 75 % sur des échantillons d'eau (224), ou des augmentations du signal pouvant aller jusqu'à 300 % pour des échantillons de moules (225). Différentes méthodes de quantification internes et externes ont été développées pour l'oxydation de Lemieux : des quantifications externes réalisées à partir de d'étalon de MMPB ou de MC oxydées comme les échantillons. Ces gammes de calibrations externes peuvent êtres alors préparées dans du solvant ou directement dans la matrice d'intérêt permettant de limiter l'influence des effets matrices sur l'analyse. Par ailleurs, des

quantifications internes peuvent également être réalisées dans le cadre de l'oxydation de Lemieux en utilisant l'acide 4-phénylbutyrique (4-PB) ou du MMPB marqué (d_3-MMPB). L'utilisation d'un standard interne est vivement recommandée pour éviter tout biais dans les résultats d'analyses et beaucoup d'études utilisent la combinaison d'une méthode de quantification externe et d'un standard interne.

5.1.2. Ozonolyse

L'ozonolyse a été décrite à la fin des années 1990 et est souvent associée à l'oxydation de Lemieux (56). En effet, elle utilise la même stratégie en produisant le même fragment MMPB mais en utilisant l'ozone comme réactif. La réaction d'ozonolyse d'un échantillon de cyanobactéries a par exemple été achevée en 30 min, et les produits formés ont été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation par thermospray (TSP-LC/MS) ou par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation électronique (EI-GC/MS) (226). L'ozonolyse a par la suite été appliquée aux sédiments sur lesquelles peuvent s'adsorber des MC. Á notre connaissance, l'ozonolyse n'a jamais été appliquée à des matrices plus complexes, telles que les matrices animales. Or le passage à des matrices animales peut, à l'image de l'oxydation de Lemieux, conduire à une diminution significative des rendements d'extraction des MC totales en raison d'effets matrices plus importants. Un autre point de vigilance concerne le terme de forme "totale". En effet, ce terme, selon la matrice à laquelle il se réfère, ne renvoie pas nécessairement au même type de liaison entre les MC et la matrice. Par exemple, l'utilisation de l'ozonolyse sur les blooms ne fait référence qu'aux MC intra/extracellulaires (56), et dans le cas des MC adsorbées sur les sédiments, la liaison ne correspond pas à des MC liées de manière covalente comme dans les matrices animales (226). Tout en étant une méthode intéressante et rapide pour obtenir de bons taux de récupération des MC totales sur les matrices de type cyanobactéries et sédiments, plus d'expérience est nécessaire dans l'application de l'ozonolyse sur les matrices animales pour mieux apprécier les performances de cette méthode, qui nécessite en outre un équipement adapté en laboratoire.

5.1.3. Déconjugaison à pH basique

L'un des inconvénients de l'analyse des MC totales par les deux méthodes précédentes est la perte d'information sur les variants des MC. En effet, le clivage oxydatif au niveau du fragment Adda ne préserve que le fragment MMPB, commun à toutes les MC et à la nodularine. Différentes études se sont intéressées au phénomène de déconjugaison des MC. Bien que cette déconjugaison puisse se produire à pH neutre, des études ont montré que la déconjugaison à pH basique augmente le taux et l'efficacité. Dans la littérature, trois stratégies de déconjugaison à pH basique ont été mises en œuvre (57, 58, 227).

La première méthode a été réalisée sur des conjugués GSH/MC-LF (227). Ce composé a été en premier lieu traité avec 20 équivalents de K_3PO_4 à 90°C avec une irradiation par micro-ondes. Le clivage entre le GSH et la MC-LF a été observé par LC-MS avec un taux de récupération de 77 % mais des analyses NMR ont montré que le produit obtenu était cyclique. Pour éviter cela, de la propargylamine a été ajoutée aux conjugués GSH/MC-LF dans l'objectif

de piéger l'accepteur de Michael et ainsi éviter la formation d'un produit déconjugué mais cyclique. La déconjugaison a été ensuite démarrée avec l'ajout de KOH (0,09 M) et deux diastéréoisomères ont été observés au travers de l'analyse LC-MS confirmant la déconjugaison des conjugués GSH/MC-LF.

La deuxième stratégie de déconjugaison à pH basique a utilisé différents variants de MC (MC-LR, -YR, -RR, -LA, -LF, -LY, -LW, -RY, [Asp^3]MC-RY, et [Dha^7]MC-LR) conjugués avec différentes protéines comme le mercaptoethanol, le méthanethiol, de la Cys et du GSH (58). Des essais de déconjugaison ont été réalisés sur des conjugués MC/mercaptoéthanol à pH 10,7 avec un tampon MeOH-carbonate. Cela a permis de déconjuguer la plupart des conjugués avec des demi-vies comprises entre 30 et 50 h. Cette étude (58) met alors trois pistes en avant pour permettre d'accélérer cette réaction :

- Augmenter le pH afin d'accroître le taux de déconjugaison tout en minimisant l'apparition de réactions secondaires.
- Eliminer le thiol libre formé au cours de la réaction afin d'orienter l'équilibre réactionnel vers la déconjugaison.
- Convertir les MC libres en dérivés non réactifs aux thiols afin d'éviter les phénomènes de reconjugaison.

La troisième étude cherche quant à elle à convertir le groupe sulfide des MC en un groupe sulfoxyde ou sulfone qui serait plus facile à déconjuguer via une réaction d'élimination des sulfones catalysée par une base (57). La stratégie de conversion en sulfone a été testée sur des conjugués mercaptoéthanol/MC-RY avec de l'oxone dans du tampon carbonate/MeOH. La déconjugaison du composé via sa forme sulfone a été réalisée en 26 min. Mais après une nuit, l'intensité du pic de MC-RY a diminué de moitié potentiellement du fait de l'instabilité de l'oxone. L'autre stratégie de l'étude utilisant la déconjugaison par conversion du groupe sulfide de la MC en groupe sulfoxyde a été testée sur huit conjugués MC/mercaptoéthanol en utilisant de Me_2SO puis de l'oxone. Selon les variants de MC, la déconjugaison fut complète autour de 5 h après le début de la réaction.

La déconjugaison a été appliquée une fois à des échantillons naturellement contaminés par des MC (159). Dans cette étude, deux échantillons de cyanobactéries (10 mg chacun) et deux échantillons de foie de canard (50 mg chacun) ont été extraits avec 1 ml de MeOH, 500 µl de Na_2CO_3 (0,2 M) et 50 µl de DMSO. Les flacons ont ensuite été placés sur un mélangeur rotatif à environ 20 rpm pendant 10 j avant analyse par ELISA multi-hapten. Les MC libres dans les foies (63-112 ng/g) représentaient seulement 33 à 41% des MC totales détectées par les techniques de déconjugaison et d'oxydation de Lemieux.

5.1.4. Désorption par irradiation Laser (LID)

Une méthode récente mise au point utilise la LID comme moyen de rompre la liaison covalente entre les MC et les protéines, y compris PP1 et PP2A (59). Les tests ont été menés pendant le développement du protocole LID pour étudier la relation entre la puissance du laser et l'efficacité de l'extraction. Parmi les critères étudiés, le temps d'exposition de l'échantillon au

laser entre 1 et 9 min a été comparé, et les résultats indiquent que le meilleur temps d'exposition est de 5 min. Le deuxième critère étudié est le volume de l'échantillon. Un volume trop important conduirait à une dilution de l'énergie laser, tandis qu'un volume trop faible conduirait à une énergie trop élevée. Cependant, cette étude ne contient aucune information sur les MC totales naturellement présentes dans les échantillons, déterminées à l'aide d'une méthode différente (par exemple, l'oxydation de Lemieux) pour prouver l'efficacité d'extraction de la méthode LID en ce qui concerne les MC libres et liées. En outre, il est possible qu'au cours du développement de la méthode, les échantillons soient dopés avec des MC et que les taux de récupération rapportés ne concernent alors uniquement les formes libres des toxines et non ceux des MCs liées. Cette méthode devrait être comparée à une autre méthode de "référence" pour l'extraction des toxines totales afin de démontrer sa capacité à extraire à la fois les formes libres et liées des MC.

5.1.5. Conclusion

Comme les MC liées peuvent représenter une part importante des MC totales bioaccumulées dans un organisme, il est nécessaire de développer et d'optimiser les méthodes d'extraction et d'analyse des MC totales. Parmi les différentes méthodes passées en revue dans l'article qui suit [Bouteiller *et al.* (53)], la méthode d'oxydation de Lemieux semble être la méthode de référence malgré des taux de récupération d'extraction dépendant de la matrice et du protocole et des effets matrices importants. A l'inverse, les autres méthodes passées en revue ici (déconjugaison, ozonolyse et LID) pourraient être des alternatives intéressantes à la méthode d'oxydation de Lemieux mais nécessitent plus de recul et de développements méthodologiques pour leur utilisation et l'évaluation de leurs performances. D'un point de vue analytique, la déconjugaison et la LID pourraient être des alternatives particulièrement intéressantes d'un point de vue qualitatif car celles-ci permettent de garder l'identité des variants de MC lors de l'analyse (contrairement à l'oxydation de Lemieux et l'ozonolyse). Cette information supplémentaire est particulièrement importante pour dresser le profil toxinique d'un échantillon et estimer sa toxicité.

L'article ci-après est un travail de revue bibliographique réalisé sur les différentes méthodes d'extractions et d'analyses des MC totales. Cet article a été publié dans la revue *Toxins en 2022*.

5.2. Analysis of total-forms of cyanotoxins microcystins in biological matrices: a methodological review

Pierre Bouteiller [1,2], Emilie Lance [1,3,*], Thierry Guérin [4] and Ronel Biré [2]

1 Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO, Unité Stress Environnementaux et BIOsurveillance des Milieux Aquatiques (SEBIO), BP 1039, CEDEX 2, F-51687 Reims, France
2 Laboratory for Food Safety, ANSES, F-94701 Maisons-Alfort, France
3 UMR MNHN/CNRS MCAM, Muséum National d'Histoire Naturelle, F-75005 Paris, France
4 Strategy and Programs Department, ANSES, F-94701 Maisons-Alfort, France
* Correspondence: emilie.lance@univ-reims.fr

5.2.1 Abstract

Microcystins (MCs) are cyclic heptapeptidic toxins produced by many cyanobacteria. MCs can be accumulated in various matrices in two forms: a free cellular fraction and a covalently proteins bound form. To detect and quantify MCs concentration a panel of techniques on various matrices (water, sediments, and animal tissues) is available. The analysis of MCs can concern free or the total (free plus covalently bound) fractions. Free-form analyses of MCs are the most common and easiest to detect, whereas total-form analyses are much less frequent and more complex to achieve. The objective of this review is to summarize the different methods of extraction and analysis that have been developed for total forms. Four extraction methods were identified: MMPB (2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid) method, deconjugation at basic pH, ozonolysis and laser irradiation desorption. The study of bibliography on the methods of extraction and analysis of the total forms of MCs showed that the reference method on the subject remains the MMPB method even if alternative methods and in particular the deconjugation at basic pH showed results encouraging the continuation of the methodological development on different matrices and on naturally contaminated samples.

KEYWORDS: cyanotoxins; microcystins; total toxins content; method of analysis; MMPB method; ozonolysis; deconjugation at basic pH; laser irradiation desorption.

KEY CONTRIBUTION: This review provides an overview of the existing knowledge on total MCs, in particular on the methods of extraction and analysis of total MCs in biological matrices.

5.2.2. Introduction

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms that appeared on Earth 3.5 billion years ago and can be observed in various freshwater, brackish and marine ecosystems [1]. In freshwater ecosystems, cyanobacteria have significant proliferative capacities [2] favored by different natural factors (e.g., temperature above 25 °C, alkaline pH) but also anthropogenic factors (e.g., high nitrate and phosphorus inputs) [3–5]. Many toxins can be produced by cyanobacteria during blooms, such as neurotoxic anatoxins and hepatotoxic microcystins (MCs). The hepatotoxin MCs are the most frequently detected cyanotoxins in cyanobacterial

blooms [2]. There is a great diversity of MCs-producing strains of cyanobacteria. MC producers can be found in several different orders, including *Chroococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales*, and *Stigonematales*. Within these orders, it is important to note that not all genera of an order produce MCs (for example, in the order *Nostocales*, some species of the genus *Anabaena* are producers while other genera of this order, such as *Aphanizomenon*, have never been described as MC-producers). Moreover, a species can be both producing and non-producing depending on the strain, and a producing strain depends on environmental factors [6]. Among the genera known to include MC-producing (and non-producing) species: *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, and *Hapalosiphon* are the main ones. However, there are many other producing species (Annexe 1, Table S1, [6,7]).

MCs are monocyclic heptapeptides containing two atypical amino acids called Adda (3-amino-9-methyoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadienoic acid), which is a fragment common to all MCs variant and nodularins and Mdha (N-methyl-dehydroalanine) groups, which plays a role in the binding of MCs to proteins. MCs present with two variable amino acids, characteristic of the identity of the MC variant (**Figure 8**). For example, MC-LR, the first chemically-identified MC, is a variant where L and R represent the amino-acid leucine and arginine, respectively [8]. Thus, the identification of the MCs is mainly due to the variations in the AAs in positions X and Z (**Figure 8**) but also due to the variations of the other sites of the MCs, which can also be subject to substitutions. To date, up to 279 MCs congeners have been described [9]. MCs are mainly intracellular during cyanobacteria proliferation and are released in media, becoming extracellular (dissolved in water or adsorbed on particles) once cell death occurs after bloom collapse. After the ingestion of cyanobacterial cells or the ingestion of contaminated water, MCs can accumulate in various organisms, such as zooplankton, zoobenthos, or fish, with a possible transfer between trophic levels [10–13]. MCs can accumulate in two forms in organisms: a free, available cellular fraction and a bound form (*id.* intracellular for the cyanobacterial matrices or covalently bound to proteins in biota tissues). These covalently-bound forms are particularly bound to the serine/threonine residues of enzyme protein phosphatases 1 (PP1) and 2A (PP2A) [14]. The mechanism of the binding of MCs to PP is a two-step mechanism, first with the formation of a weakly-interacting bond of a hydrophobic and reversible nature between the Mdha group of MCs and the proteins and, after a few hours, the Adda group can form a strong covalent thioether bond with the cysteine residues present at the catalytic subunits of PP [15–18]. The binding of MCs to proteins results in the deregulation of the PP by disrupting the phosphorylation mechanisms [19,20]. This deregulation by MCs may induce a cascade of negative side effects, in particular, tumor promotion and apoptosis, but also the production of reactive oxygen species, resulting in oxidative stress (reviewed in [20,21]). MC toxicity can occur in different organs but was initially discovered in the liver, resulting in the classification of MCs as hepatotoxins. Other organs may be targeted by MCs, including the reproductive organs, kidneys, brain, heart, gastrointestinal tract, or lungs (reviewed in [22]). This specific organo-toxicity can be explained by the tropism of MC towards organs containing organic-anion-transporting polypeptides (OATPs) [23]. The health impact of these toxins is therefore not marginal, and cases of human and animal poisoning are regularly reported (reviewed in [24]). These acute or chronic intoxications can occur after swimming in contaminated environments or after the ingestion of

contaminated drinking water or aquatic organisms and cause symptoms of varying intensity ranging from gastroenteritis to kidney and liver failure, sometimes even death (reviewed in [25]).

For human and environmental health risk assessments, either cyanobacteria or intracellular and extracellular cyanotoxins can be monitored from water samples. The monitoring of cyanobacterial density or cyanotoxin concentration limits the exposure of the population to cyanotoxins, particularly during swimming activities, but also in the case of the consumption of species that may bioaccumulate these toxins. For this purpose, a panel of techniques is available for the analysis of cyanotoxins in various matrices (water, sediments, and animal tissues). More specifically, the analysis of MCs can concern the free or the total (free plus covalently bound) fraction. The analyses of free forms of MCs are the most widespread and the simplest to perform (reviewed in [26]). These analyses generally consist of an extraction step with different mixtures of organic solvents (methanol, acetonitrile, butanol, acetone, water, chloroform, hexane, and ethanol) that are either pure or diluted according to the protocols. These extraction steps are sometimes followed by a purification step. Three main methods are described in the literature: liquid–liquid extraction (LLE) [27], solid-phase-extraction (SPE) [28–30], or the use of immunoaffinity columns (IAC) [31–34].

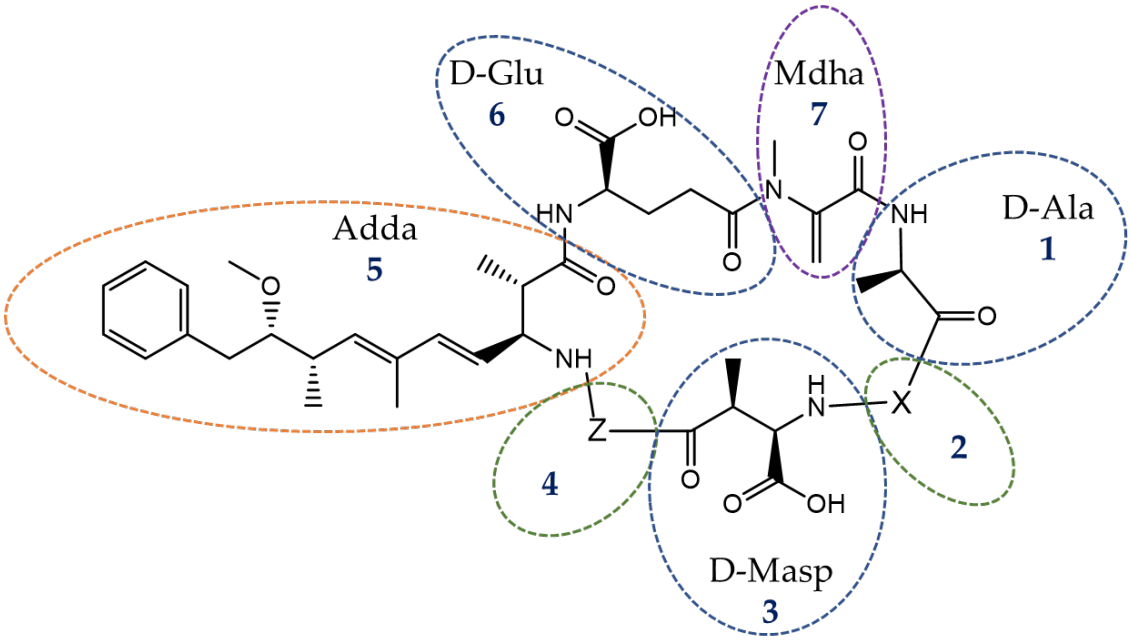


Figure 8 : Topological representation of a MC.
With 1: D-Alanine, 2: X (variable), 3: D-erythro-b-methyl-D-aspartic acid, 4: Z (variable), 5: Adda, 6: D-Glutamate, 7: Mdha. The Adda fragment is a common part of all MC variants and nodularins, another cyanotoxins. The Mdha fragment plays a role in the binding of MCs to proteins. The variable amino acids (X and Z) as well as the possibility of substitution on 1,3,5,6,7 will define the identity of the MCs variant and participates in the diversity of the MCs. 279 MCs congeners have been listed in Bouaïcha *et al.* (16).

The extracts obtained from the extraction and purification steps can be analyzed by various methods, including immunological, chemical, or biological methods. ELISA (enzyme-

linked immunosorbent assay) tests are the most common immunological methods [35,36], although other approaches exist, such as aptamers [37–40] or biosensors (reviewed in [8]). Chemical approaches are also widely used by using equipment including high-pressure liquid chromatography (HPLC) coupled with a diode array detector (HPLC-UV-DAD) [41–43] or capillary electrophoresis [44–48]. However, the most used and sensitive chemical method remains liquid (LC-MS) or gas (GC-MS) chromatography coupled with mass spectrometry [29,49]. The biological approach, including bioassays on rodents [50], plants and algae [51–53], invertebrates [54,55], fish and amphibians [56], or in vitro bioassays [57] seems to be less and less used. The protein phosphatase inhibition assay (PPIA), which measures the inhibitory effect of MCs on the activity of PP, is still quite widespread and can be very useful for screening MCs, particularly when coupled with a chemical method such as LC-MS [58]. Complementary to these methods of analysis of free toxins, methods are available to analyze both free and bound (i.e., total) MCs in biological matrices (cyanobacteria or animal tissues). These methods of analysis of the total forms of MCs are still rarely applied as they are more complex to use than the methods of analysis of the free forms of MCs. However, the bound forms can account for the majority of the MCs in a given sample [59,60]. The aim of this literature review is, therefore, to give an overview of existing techniques for the analysis of total forms of MCs. Sample preparation methods (extraction and purification), analysis methods, and potential matrix effects will be reported.

5.2.3. Quantification of Total MC by the MMPB Method

Since the 1990s and the development of the first ELISA methods for the analysis of MCs, the need to have a specific antibody for each MC variant caused the analysis to be restricted to a small number of MCs or even only to MC-LR [59,60]. The methodological challenge was thus to develop a method that would be independent of the structural diversity of MC variants. The existence of a unique part common to all MC variants and nodularins, Adda moiety, was the basis of the strategy first developed by Sano et al. [61] for use on cyanobacteria samples (**Figure 8**). It consists of the oxidation of the Adda part of MCs with potassium permanganate ($KMnO_4$) and either sodium-iodate ($NaIO_3$) or sodium-periodate ($NaIO_4$) to form the corresponding carboxylic acid derivative: the 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB; **Figure 9**). The oxidation product (MMPB) was analyzed by GC coupled to a flame-ionization detector (FID) or by HPLC coupled to a spectro-fluorimeter. Concerns related to MC accumulation in animal tissues, in particular in aquatic species potentially exposed to cyanobacteria, have led to the identification of a protein-bound fraction of MCs in these biological matrices [16]. The use of the term “bound” toxin usually remains ambivalent as it can sometimes be applied to matrices such as sediments in which MCs are adsorbed on inorganic or organic particles, but also to MCs covalently bound to proteins, in particular PP1 and PP2, in animal matrices [62,63]. However, these covalently-bound forms are not extractable as easily as free (i.e., not protein-bound) MCs in water, in bloom, or in the tissues of an organism. The use of the MMPB method (also called Lemieux oxidation) allows for the extraction of the total (i.e., protein-bound plus free) fraction of MCs. This method was first applied to mussels (*Mytilus edulis*), salmon *(Salmo salar*) (liver tissue), and Dungeness crab larvae (*Cancer magister*) [58,64]. There is a strong disparity in the MMPB method

protocols used, as shown in **Table 4.** Many different matrices were analyzed with a high proportion of matrices of aquatic origin. Other studies have used the MMPB method following animal mortalities in an effort to determine the cause of mortality [57,65,66]. Many steps of the protocol used can possibly influence the final performance of the method, beginning with the pre-treatment of the matrix (**Figure 10**).

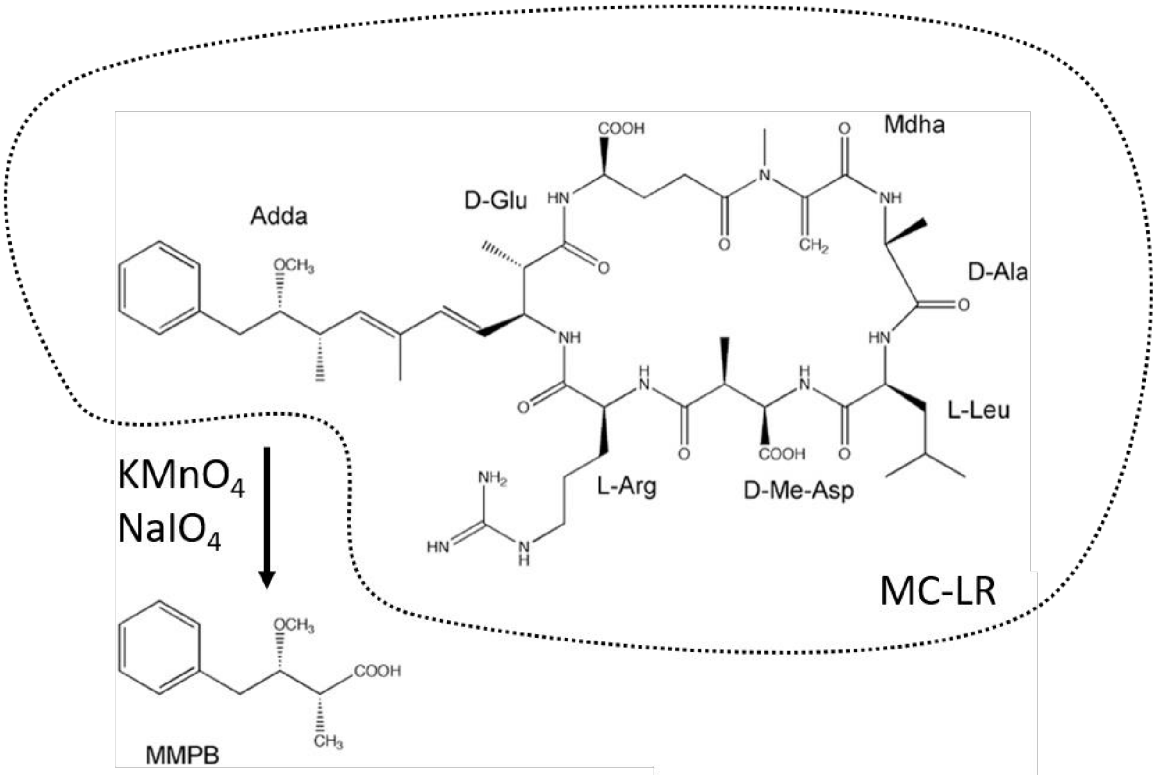


Figure 9 : Structure of microcystin-LR (MC-LR) with its specific Adda moiety subject to Lemieux oxidation resulting in MMPB production (modified after Suchy and Berry [61]).

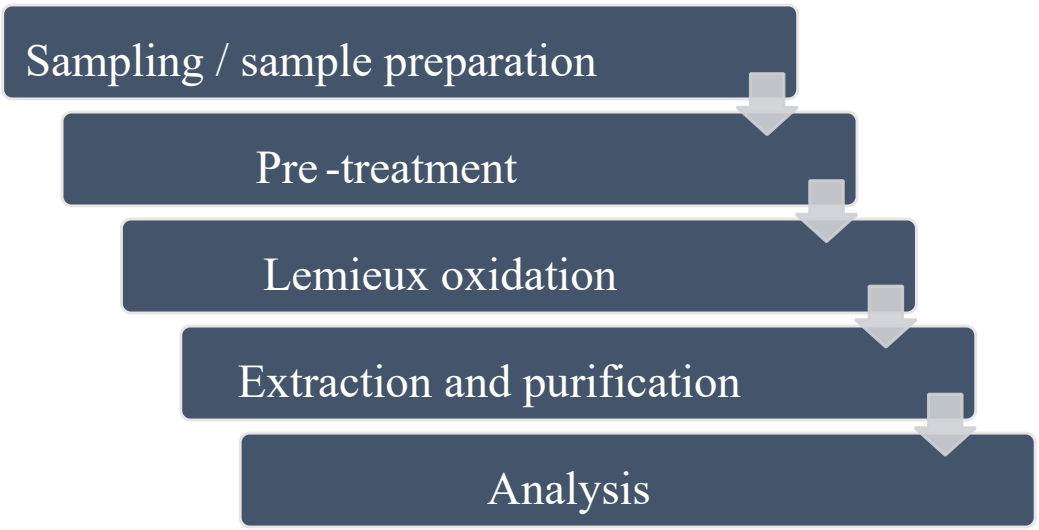


Figure 10 : The different stages of MMPB method.
These steps have been the subject of optimization work described in the following sections.

5.2.3.1. Pre-Treatment of Matrices

In terms of pre-treatment, two approaches can be distinguished depending on the desired purpose: for tissues, enzymatic or chemical treatments are used to begin the digestion of the tissue and facilitate the oxidation of MCs, whereas, for cyanobacterial matrices, the objective will be to break the cells to release the toxins before filtering or pre-concentrating the sample. Concerning the enzymatic/chemical treatments, the first option consists of enzymatic digestion with trypsin, the objective of which is to affect the protein integrity of the matrix in order to facilitate the subsequent oxidation. The duration of the trypsin treatment can vary; early studies involving a trypsinization pre-treatment prior to Lemieux oxidation on freeze-dried *Lymnaea stagnalis* tissues and serum suggested the addition of trypsin at a concentration of 0.5 mg/mL in a phosphate buffer for 2 h at 37 °C [28,49]. Subsequently, a study on juvenile trout (*Oncorhynchus mykiss*) force-fed with MC-LR compared two trypsin contact times (2 and 18 h) and concluded that an 18-h trypsinization time yielded a quantity of MMPB around 20% higher than 2 h [29]. The other option is to use freeze/thaw cycles on the matrix in order to break the remaining cells and liberate the toxins before the addition of NaOH for tissue digestion (50 mM for 2 h; RoyLachapelle [62]). For the cyanobacterial matrix, an enzymatic or chemical pre-treatment is not useful; freeze/thaw steps or sonication can be used to release the toxins from the cells [63]. Other protocols involve preliminary steps to prepare the water or cyanobacterial samples, such as filtration (0.22 µM nylon filters) or pre-concentration by SPE [63,64].

5.2.3.2. Lemieux Oxidation Step

The oxidation step, the key step in the extraction of the total forms of MCs, is the one that has been optimized the most. Although the reagents used in the different studies are the same ($KMnO_4$ and $NaIO_3$ or $NaIO_4$), the yield of the oxidation differs according to several criteria, among which are the concentration, pH, the volume of reagents, and the time of oxidation. Several studies have compared these different criteria in order to identify what could improve the yields obtained following oxidation, taking into account that this yield varies according to the matrix (water, cyanobacteria blooms, sediments, or animal matrices such as tissues or biological fluids).

5.2.3.2.1. Cyanobacterial Matrices

Regarding Lemieux oxidation applied to water or cyanobacteria cells, the oxidation was originally performed by Sano et al. [65] for 4 h at 0.024 M $KMnO_4$ and 0.02 M $NaIO_4$. Later on, other concentrations were adopted: 0.05 M $KMnO_4$/$NaIO_4$ [66], 0.35 M $KMnO_4$/0.4 M $NaIO_4$ [64], or 0.5 M $KMnO_4$/0.015 M $NaIO_4$ [63,66], with oxidation times of 1 h [64,66] or 30 min [63]. Two studies were interested in the impact of varying the oxidant concentration on the yield of Lemieux oxidation. Wu et al. [67] varied the $KMnO_4$ concentration from 6.33 to 63.29 mM in saturated $NaIO_4$ solution (200 mM) and observed that the yield of MMPB increased by increasing the $KMnO_4$ concentration, with the best yields obtained for the initial $KMnO_4$ concentrations of 50 mM. These observations are supported by Roy-Lachapelle et al. [66], who tested $KMnO_4$ and $NaIO_4$ concentrations between 10 and 100 mM, with an optimum

concentration of 50 mM. Both studies reported that a concentration of oxidants above 50 mM could cause the degradation of the compounds and significant signal variability. Regarding the pH, both studies have concluded, after testing different pH values from 2 to 10.5, that MMPB yields are better with a low alkaline pH value (pH~9) [66,67]. Concerning temperature, Wu et al. [67] concluded that the temperature did not influence the reaction, which can be held at room temperature after comparing temperatures between 0 and 35 °C at pH 9 and with oxidant concentrations of $KMnO_4$ (50 mM) and $NaIO_4$ (200 mM). Finally, the reaction time has also been optimized. Reaction times between 0.5 and 5 h were compared for oxidant concentrations between10 and 100 mM at room temperature and alkaline pH. While after 3 h, a degradation of the Lemieux oxidation product was observed, between 1 and 3 h no significant difference was observed, and the shortest reaction time (1 h) was chosen [66]. The optimization of these parameters resulted in average yields of 86.7% (50 mM $KMnO_4$ in saturated 200 mM $NaIO_4$ solution at ambient temperature, and at pH~9, with a time reaction between 1 and 4 h) [67] and 103% (50 mM $KMnO_4$, $NaIO_4$ at ambient temperature, at pH~9, with a time reaction between 1 and 3 h) [66]. The optimized methods have shown higher yields than previous studies, with average yields of 65% (0.35 M $KMnO_4$ in saturated 0.4 M $NaIO_4$ solution at ambient temperature at pH~9 with a time reaction of 1 h) [64] but close to those obtained by Sano et al. [65] (84–98% yield with 24 mM $KMnO_4$ and 20 mM $NaIO_4$ at room temperature for 4 h).

5.2.3.2.2. Sediment Matrices

For sediments, three studies have focused on improving the oxidation conditions. First, Wang et al. [68] reported that the best oxidation conditions were 0.025 M of $KMnO_4$ and 0.093 M of $NaIO_4$ for one hour, which yielded 35% of the MMPB. Wu et al. [69] tested a range of $KMNO_4$ between 12.5 and 100 mM and concluded that the optimal concentration was 50 mM or more of $KMNO_4$. Another study by Bolotaolo et al. [70] demonstrated optimal yield conditions with a reaction time of 3 h with a 0.1 M saturated solution of both $KMnO_4$ and $NaIO_4$, giving an 89% oxidation yield, which is much better than those obtained earlier (33 to 45%) [68,69].

5.2.3.2.3. Animal Matrices

The oxidation of animal matrices contaminated with MCs is a more complex task, as shown by the lower and more variable yields (from 6 to 114% yield, **Table 4**) and the very different concentrations of oxidants according to the studies ($KMnO_4$: from 334 µM to 0.1 M [28,71]; $NaIO_4$: from 1.4 mM to 0.1 M [28,60]. Matrix effects can strongly influence the oxidation and extraction efficiencies, and it would be difficult to propose a harmonized protocol suitable for all animal matrices. However, a few protocols have been applied to very different matrices and could therefore serve as a good reference protocol for the analysis of the total forms in animal samples. For example, the protocol proposed by Ott and Carmichael [72] has been applied to fresh human sera, fresh human liver, fresh human blood, and lyophilized terrapin tissue (*Emys orbicularis* and *Mauremys leprosa*) [73–76]. In this protocol, 1 g of fresh rat or chicken liver was oxidized with 0.02 M of oxidants for 3 h at pH 9. Then in the 2010s, two other protocols seemed to be reused in several studies. The first one is the Neffling and Lance protocol [28,49] on freeze-dried gastropods (*L. stagnalis*) using 0.1 M of both oxidation

reagents, which was reused by Cadel-Six et al. [29] on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (lyophilized muscles, liver, intestines, and gills), by Greer et al. [77] on tilapia fishes (*Oreochromis niloticus*) (lyophilized muscles, liver, and eggs), by Brown et al. [78] on a lyophilized sample of coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), by Foss et al. [59] on lyophilized samples of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*), by Mohamed et al. [5] on fresh samples of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish muscles, and by Bolotaolo et al. [70] on lyophilized clams, with varying degrees of extraction efficiency (from 5 to 55%). The second protocol that stands out was proposed by RoyLachapelle et al. [66], using 0.05 M of the two oxidant reagents. Although this protocol has not been applied to as many matrices as the previous one, it has been developed on river water and then used on frozen homogenized fish tissues (*Osmerus mordax*; *Mugil cephalus*; *Salvelinus fontinalis*; *Perca flavescens*; *Sander vitreus*; *Ameiurus nebulosus*; *Coregonus clupeaformis*) [79] and algal dietary supplements [80] with satisfactory extraction yields (91%, 54–72%, and 67–74%, respectively). There seems to be disagreement on the concentration of oxidants (0.1 M versus 0.05 M for both reagents for Neffling and Lance's and Roy's protocols, respectively) to be used, which depends on both the matrix and the number of toxins to be oxidized. The reaction time for cyanobacterial matrices has to be under 3 h, but Neffling and Lance recommend a time reaction of 3 h in animal matrices against 2 h for Roy-Lachapelle. Both protocols indicate that an alkaline pH between 8 and 9 allows for better results.

5.2.3.3. Extraction and Purification of the MMPB Product

Purification is another essential part of the MMPB method, allowing the samples to be both cleaned from impurities coming from the matrix and to also be concentrated. Indeed, the use of a large number of salts ($KMNO_4$, $NaIO_4$, Na_2HPO_4, or NaH_2PO_4) during this method can negatively affect the performance of the analysis [79]. Furthermore, the volume of the extract (which can be more than 20 mL depending on the protocol) may necessitate a sample concentration. Two different purification methods are mainly used: liquid–liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE). Although the majority of the studies reviewed here use SPE, LLE has been tested on various matrices such as water samples [65,66] but also animal matrices (Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*); tilipa fish; salmon Liver and Dungeness Crab Larvae; saltwater mussels (*Mytilus edulis*)) [5,60,71,81]. Several organic solvents can be used during LLE, notably diethyl ether [60,71,81] and n-hexane [5], but ethyl acetate seems to be the most optimal [65,66]. Indeed, a study has investigated different solvents according to their non-miscibility with water and their influence on the MMPB yield. Ethyl acetate was selected, and the yield was further improved by the addition of a solution of saturated NaCl in the aqueous phase allowing for a reduction in the solubility of the neutral compounds and consequently improving the extraction (salting-out effect) [66]. SPE, the main method for the purification of extracts after the oxidation phase, allows, similar to LLE, cleaning but also the concentration of the samples (with a lower elution volume than the loading one). Among the protocols gathered in **Table 4**, 16 different types of SPE cartridges were identified. These differences concern the sorbent used (for example, C18, Styrene–divinylbenzene (SDB)), its quantity (from 30 to 500 mg), or the volume of the cartridge. Each type of sorbent used in the cartridge phase has its own properties; the wash and elution parameters are generally optimized

and may differ between different SPE protocols. Some studies compared SPE cartridges based on their recovery for a given matrix. Ott and Carmichael [72], for example, compared three SPE cartridges (3M C8-SD®, 3M SDB-XC®, and Waters Oasis HLB®) on chicken and rat liver matrices. Blank liver samples were extracted with each cartridge with the following procedure: conditioning with 1 mL of methanol (MeOH), 1 mL of double distilled water, loading the sample, washing with 0.5 mL of MeOH, and elution with 1 mL of MeOH. The highest signal strength of the Oasis extract indicated that the cartridge did not effectively clean the sample and was subsequently dismissed. To decide between the two remaining cartridges, the MMPB recovery rate was tested, and the SDB-XC cartridge showed a higher recovery (82.2%) compared to the C8 (62.5%) SPE cartridge. Cadel-Six et al. [29] compared the use of two other cartridges, Oasis HLB® (200 mg) from Waters and Agilent SampliQ OPT® (150 mg, Interchim, Montlucon, France) on MMPB standard solutions by varying the elution conditions (MeOH 80%, MeOH 100%, and MeOH 80%, with 0.05% acetic acid (AcOH), 100% AcOH). Whatever the elution conditions tested, the recovery rates obtained were better with the SampliQ OPT® cartridges than with the Oasis HLB®. The highest yields among the SampliQ OPT® cartridge tests were obtained by eluting with 80% MeOH (average recovery rate: 80.9%) or with 100% MeOH (average recovery rate: 81.6%). The addition of 0.05% AcOH to 80% MeOH did not increase the recovery rate (average of 78.5%). These conditions were then applied to rainbow trout matrices spiked with 100 ng of MC-LR (equivalent (eq.) to 20.9 ng of MMPB) and 50 ng of MC-LR (eq. to 10.5 ng of MMPB) overnight at 4 °C. The SPE extraction efficiency was 25% for the intestines, 19% for the muscles, 28% for the liver, and 18% for the gills. An important fraction of MMPB is either not extracted, degraded, or not retained by the cartridge used. Another possibility is the application of an on-line SPE method for the purification of the sample after Lemieux oxidation. Unlike the classical SPE methods for cartridges (off-line SPE), the on-line-SPE is directly coupled with HPLC, saving time on the analysis compared to the off-line methods. Munoz et al. [64] compared three on-line SPE columns (C18®, BetaBasic-18®, and Hyper-Sep Retain PEP®) on environmental surface water samples. Some peak-tailing was observed with the Hyper-Sep®, while the C18® could not efficiently withstand a large number of consecutive injections. Due to the difference in pH between the samples (pH around 2 after the oxidation step) and the solution used during the washing step, 0.5% *v*/*v* formic acid was added to the mobile phases of the on-line SPE. According to the authors, this washing step is the most critical as it allows the desalting and removal of interfering matrix components. Therefore, the optimized method corresponds to a sample loading of 5 mL and a wash with 3 mL, both at a flow rate of 2500 µL/min. By using this on-line SPE on water samples, MMPB was analyzed in just 8 min with a limit of quantification (LOQ) of 0.5 ng/L. Another derivative of the SPE method that could be applied to total MCs is solid phase micro-extraction (SPME). This method uses a fused polymer-based fiber as an adsorption medium for the analyte [82]. SPME was first developed with fish tissues (*Goodea* sp.; *Oncorhynchus nerka*; *Perca flavescens*) spiked with MCs and then applied to environmental fish samples [61]. Due to the detection mode used (GC-MS), the purified extracts had to be derivatized to form meMMPB. Three fiber types (Supelco, Inc., Belfort, PA, USA) were compared: polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS-DVB), divinylbenzene/Carboxen™/polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS) and polyacrylamide

(PA). Among these three types of fiber, the best linearity between the peak area and concentration of MMPB was obtained with PDMS-DVB, and an LOQ of 0.14 µg/g was calculated. Following purification, it is possible to add an intermediate step before analysis and to concentrate the extracts by evaporating under nitrogen [29,70] or argon flow [28] at different temperatures from 25 to 40 °C [29,49,70,83].

5.2.3.4. Analysis of the MMPB Product

The majority of the studies concerning the MMPB method use mass spectrometry (MS) as a detector coupled with either liquid or gas chromatography as the method of analysis. Regarding the conditions under which the chromatography is performed, whether liquid or gas, different chromatographic columns are used in the studies that are listed in **Table 4**. Nevertheless, the parameters used during the MS analysis can be listed. The positive ionization mode of MS is used in many studies [28,29,49,77]. The most commonly searched fragments in this ionization mode, after electron ionization in GC MS, is m/z 176 [60,71,75]. In some studies, the fragment analyzed by GC-MS is not MMPB but methyl-MMPB [76]. In this case, the MMPB is methyl-esterified before the analysis in order to volatilize the MMPB for the analysis. This step is performed by using, for example, 1 mL of hydrochloric MeOH (5%) and silver carbonate followed by a heating step at 70 °C for 1 h [61,70] or by using 12% trifluoroborate in MeOH [84]. In LC-ESI/MS, the parent ion [M + H] + *m*/*z* 209 is monitored along with its three specific fragments at *m*/*z* 91; 131 and 191 [28,49]. However, several studies report better results using the negative ionization mode for MS/MS (207 → 131 transitions) [59,63,64,72,85–87]. Some alternatives to the classical LC-MS/MS methods exist, namely laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization coupled to tandem mass spectrometry (LDTD-APCI-MS/MS) [66,79] and condensed phase membrane introduction mass spectrometry (CP/MIMS) [88]; both methods were applied to aqueous samples with a detection limit of 10 µg/L and 1 mg/L, respectively. Less commonly, other detection systems can be coupled to HPLC for the analysis of the MMPB product generated during Lemieux oxidation, HPLC with photodiode array detection (PDA) [89], HPLC with ultra-violet detection (UV) [63,67,69,90], or HPLC with fluorescence detection (FLD) [68]. Inversely, the use of the Adda ELISA kit on oxidized drinking water samples did not enable the detection of the MMPB fragment following the MMPB method [63].

5.2.3.5. Limitations and Difficulties Faced during the MMPB Method

5.2.3.5.1. Sample Turnaround Time

One of the first obstacles to the MMPB method concerns the processing time of a sample. Steps such as an enzymatic pre-treatment with trypsin can range from 2 to 18 h. Moreover, the work by Cadel-Six et al. [29] showed that the most efficient trypsin pretreatment lasted 18 h. This step is followed by the oxidation step, which can last several hours (1 to 3 h). Then, depending on the strategy chosen, other time-consuming steps are to be undertaken: filtration (sometimes with important volumes), LLE or SPE purification, and the concentration of the samples. The realization of the oxidation proves to be both time-consuming and fastidious

due to the number of steps to realize it, which increase the sample turnaround time and can limit the simultaneous processing of a large number of samples.

5.2.3.5.2. Variability of the Overall Conversion Process

The review of the literature on the MMPB method has shown that the conversion yields strongly differ among matrices (i.e., cyanobacterial matrices, sediments, and animal matrices). The yields for cyanobacterial matrices and sediments are around 80%, and those for animal matrices range from 4% for dog hair to 114 % for a golden retriever (*Canis lupus familiaris*) vomit sample [86]. Even for the same protocol, significant variability can be observed depending on the matrices and for the same animal species depending on the organs, probably in relation to the levels of lipids and proteins in the tissues and the associated efficiency of MMPB extraction. Three times higher yields were thus observed on trout liver compared to trout muscle [29], while in the study by Foss et al. [86], the oxidation yield for dog hair was only 4%, while this yield was 114% for dog vomit samples. When considering the performance of the different steps taken one by one, a strong disparity can be observed. The study by Cadel-Six et al. [29] thus proposes the yield of the method for the intestinal tissue of rainbow trout but also the yield of the various stages of the method: 25% for the oxidation step, 93% for filtration, and 27% for the SPE + evaporation step. Globally, the MMPB protocol provides an overall yield of 6%. Switching to another type of tissue, gills provide better yields in terms of oxidation (67%) but much lower yields for SPE and evaporation (18%), giving a final overall yield of the method of 12% (it is to be specified that for the gill matrix, the filtration yields have not been specified). Even with an optimized protocol, switching from one animal matrix to another can have an impact on the yield and shows how important the matrix effect can be. These results can be compared to the study by Bolotaolo et al. [70], also providing the yields of their step-by-step MMPB method on two matrices: sediments and clams at two spike levels of MC-LR (100 and 500 µg/L). The protocol begins with a lipid extraction step with average yields of 96% for sediments and clams. The main losses estimated in this method occurred during the conversion step of MC-LR to MMPB, with average conversion rates of 75% for sediments and 64% for clams. It should be noted that this study distinguishes between conversion and oxidation yields without making this distinction explicit, which could lead to confusion when comparing the yields of this method to another. Much higher yields than the method used by Cadel-Six et al. [29] were observed in the method used by Bolotaolo et al. [70] during the oxidation and SPE steps, with average yields for sediments of 91% and 91%, respectively, and for clams of 91% and 91%, respectively. Thus, the step that seems to generate the most loss is oxidation, with yields ranging from 25% to 60% for intestinal tissue and gills, respectively, in Cadel-Six et al. [29], and a yield of about 91% for sediments and clams in Bolotaolo et al. [70].

5.2.3.5.3. Matrix Effects

One reason that can be advanced to explain this loss of MMPB could be the matrix effect. In their study, Munoz et al. [64] distinguished between instrumental matrix effects and matrix effects that can occur during sample preparation. Instrumental matrix effects are often caused by co-eluting matrix components that can lead to ion suppression or enhancement phenomena at the ionization source [91], while sample preparation matrix effects can occur

when an incomplete extraction recovery is achieved from the test samples [64,92]. Regarding the matrix effects related to water samples when using the MMPB method, Munoz et al. [64] determined instrumental matrix effects ranging from −59% to −75% and minimal matrix effects during the oxidation step. In addition, the analysis of environmental water samples by LDTD-APCI-MS/MS allowed for oxidation yields of 103% with a recovery signal of MMPB at 91%, showing the absence of a significant instrumental matrix effect during the analysis [66]. In another method developed by Roy-Lachapelle et al. (2015) using LDTD-APCI-HRMS on fish tissues, quite low instrumental matrix effects were observed (between 7 and 10%). Of the few studies analyzing the total forms of MCs in sediments, little information is reported on the matrix effects. The only information available indicates that there is "an adverse impact of the sediment matrix on Lemieux oxidation yields" without quantifying this impact [69]. In the animal matrix studies, instrumental matrix effects leading to either signal gain or loss were both observed. The study by Ott and Carmichael [72] showed a signal suppression of 41.8% in rat and chicken liver, and Neffling et al. [49] observed a signal loss in the serum and tissue of aquatic snail samples spiked at the final step of sample preparation (after oxidation and extraction) ranging from 63 to 84%. On the contrary, other studies report a signal enhancement effect on rainbow trout samples extracted and spiked just before injection, where the recovered signal was 122% for the intestines and 142% for the muscles [29]. Similarly, a study conducted on *Dreissena polymorpha* tissues estimated the signal enhancement to be 300% [93]. Although two types of matrix effects (instrumental and sample preparation) have been distinguished, most of the data collected on the MMPB method's protocols seem to focus only on instrumental matrix effects.

5.2.3.5.4. Quantification Strategy (Internal vs. External Calibration)

Different quantification strategies have been set up for the analysis of total MCs after Lemieux oxidation, attempting to compensate for the matrix effects that can be more or less impactful depending on the type of matrix or the analytical instrument used. Anaraki et al. [87] already listed some of the studies on the MMPB method, including the quantification strategy and the use of an internal standard. This inventory was extended with the objective of gathering studies using the same strategy (or a similar one). The first quantification strategy adopted in MMPB method studies corresponds to an external calibration. The quantification of the MMPB in samples can be performed using an MMPB calibration curve made of an MMPB standard [5,29,67]. Another possibility is using an MMPB calibration curve generated by the oxidation of an MC-LR standard [81]. The disadvantage of these first two strategies is that they do not take into account the presence of the matrix in the samples and, therefore, the matrix effects. Moreover, generating an MMPB standard curve after the oxidation of the different MC-LR concentrations adds an additional bias related to the oxidation efficiency. More common in the studies reviewed is the use of an external matrix-matched calibration. Greer et al. [77], for example, chose to spike the matrix with MMPB after the pH adjustment step, while other studies preferred to use an in situ (here in the sense of calibration curve prepared in the matrix) matrix-matched calibration curve of MC-LR-fortified samples that subsequently went through the oxidation process to generate an MMPB matrix-matched calibration curve [60,71,86,93,94]. Finally, one study used the standard addition approach, consisting of spiking the analyzed

samples at three MC-LR levels prior to oxidation, to quantify the MMPB in the liver samples [78]. Another strategy is to use an internal calibration via an internal standard (IS). For MMPB analysis, two IS can be used, 4-phenylbutyric acid (4-PB) [66,79,90] and isotopically-labeled MMPB (d_3-MMPB) [84,88]. The first factor of choice between the two IS is the availability of the product; indeed, while 4-PB is easily available, d_3-MMPB is more expensive and more difficult to obtain. On the water matrix, Munoz et al. [64] provided a second factor of choice by comparing the deviation between surface water samples and reference HPLC water samples, both oxidized and spiked with either 4-PB or d_3-MMPB. They observed a deviation of 14% for 4-PB and of around 5% for d_3-MMPB, concluding that these IS allow a sufficient correction of the matrix effect whatever the IS used. A different quantification comparison was performed by Anaraki et al. [87] on a fish matrix between a calibration curve using an MMPB standard (not generated from MCs) and an in situ MMPB generated matrix-matched standard curve, both using d_3-MMPB as IS. After 2 h of oxidation, the recovery of d_3-MMPB was much higher when calculated using the standard curve prepared with the MMPB standard (78.9%) rather than with the generated MMPB (30%), resulting in a lower relative response (MMPB/d_3-MMPB) than with a calibration curve using MMPB standard. Thus, according to the tests performed in this study, the MMPB calibration curve generated in situ was three times lower than the one using the MMPB standard. The consequence is an underestimation of the amount of MMPB present in a sample when the curve that is generated in situ is used. It is therefore strongly recommended to use an IS to avoid any bias in the results of the analysis. Some studies also use a dual approach with external and internal quantification [63,70,72]. In Foss and Aubel [63], for example, the combination of a standard curve of oxidized MC-LR and 4-PB as IS was used for quantification.

Table 4 : A comparison of the various conditions of the MMPB method protocols in scientific publications (modified after Anaraki et al. [87])). (n.s.: not specified; dw: dry weight).

References	Matrix	Quantity of matrices	Pre-treatment step	Oxidation length (hour)	[$KMnO_4$]	[$NaIO_3$] or [$NaIO_4$]	pH	End of reaction	Purification method	detection limits	Instrumental analysis	Yield
Sano et al. [65]	MC fraction from waterblooms (*Microcystis viridis*)	0.2 - 1 mg (dw)	/	4	0.024 M	0.02 M	n.s.	0.04 mL of 20% $NaHSO_3$+ 0.01 mL of 1OM H_2SO_4	5 mL of ethyl acetate	pmol	GC-FID / HPLC	84-98%
Williams et al. [60]	Salmon Liver (*Salmo salar*)	220 - 1366 mg	/	overnight	36.1 µM	1,3852 mM	9 (120.8 µM of K2CO3)	$NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ~2)	Diethyl ether	15 µg/g	GC/MS	85-95%
	Dungeness Crab Larvae (*Cancer magister*)	5.2 - 5.4 g										n.s.
Williams et al. [71]	Salt water mussels, (*Mytilus edulis*)	5.5 - 8.3 g	/	n.s.	334.2 µM	12,3 mM	9	$NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ≈1-2	Diethyl ether	15 µg/g	GC/MS	n.s.
Pires et al. [93]	Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*)	Pooled mussel material	/	overnight	0.1 M	0.4 M	9	H_2SO_4 (1M), pH < 3	C18 (Supelco)	n.s.	LC/MS	n.s.
Ott and Carmichael [72]	Rat or chicken livers (*species n.s.)*	0.5 - 1g	/	3	0.02 M	0.02 M	9 (KHCO3)	0.5 - 1.5 g of $NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ≈ 2)	3M Empore SDB-XC 7 mm/3mL (Fischer Scientific)	5 µg/g	LC/MS	33.5%
Soares et al. [74]	Human sera	0.4 - 1 mL	/	3	0.02 M	0.02 M	9 (KHCO3)	0.5 - 1.5 g of $NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ≈ 2)	3M Empore SDB-XC 7 mm/3mL (Fischer Scientific)	n.s	LC/MS	n.s.
Yuan et al. [75]	Human Liver / sera	n.s.	/	3	0.02 M	0.02 M	9 (KHCO3)	0.5 - 1.5 g of $NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ≈ 2)	3M Empore SDB-XC 7 mm/3mL (Fischer Scientific)	n.s.	GC/MS	n.s.
Hilborn et al. [73]	Human blood	n.s.	/	3	0.02 M	0.02 M	9 (KHCO3)	0.5 - 1.5 g of $NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ≈ 2)	3M Empore SDB-XC 7 mm/3mL (Fischer Scientific)	n.s	LC/MS	n.s.

Nasri et al. [76]	Terrapin (*E. orbicularis; M. leprosa*)	100 mg (dw)	/	3	0.02 M	0.02 M	9 (KHCO3)	0.5 - 1.5 g of $NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ≈ 2)	Conversion of MMPB to methyl ester using 12% trifluoroborate in MeOH	n.s.	GC/MS	n.s.
Wu et al. [90]	Aqueous solution spiked with MC-LR	/	/	hours	50 mg/L	20 mg/L	1.6	$NaHSO_3$	/	n.s.	HPLC/DAD	~ 90%
Wu et al. [67]	Cyanobacterial samples (*Microcystis* spp.)	10 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100 mg (dw)	/	1 - 4	≥ 0.05 M	0.2 M	9 (KHCO3)	Saturated $NaHSO_3$ sol.	/	n.s	LC/DAD	86.7%
Lance et al. [28], Neffling et al. [49]	Tissues of snails (*Lymnaea stagnalis*)	10 mg (freeze-dried)	Trypsin in Sörensen's phosphate buffer (0.5 mg/mL, pH 7,5, 37°C)	3	0,1 M	0,1 M	9	40% NaHSO + 10% H_2SO_4	Oasis HLB 30 mg	n.s.	LC/MS	16 - 37%
Suchy and Berry [61]	Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver slurry (7 g in 5 mL of deionized water)	1 mL of liver slurry	/	3	0.0035 M	0.09 M	9	0.5 - 1.5 g of $NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ≈ 2)	Solid phase microextraction (PDMS-DVB fibre)	0.04 µg/g	GC/MS	n.s.
Wu et al. [69]	Lake sediment	2 g (freeze dried)	/	1 - 4	0.05 M	0.1 M	9	Saturated $NaHSO_3$ sol.	Sep-pak C18 500 mg (Waters)	n.s.	HPLC/DAD	33-45%
Bieczynski et al. [81]	Supernatants of liver and intestines from fish (*Odontesthes hatcheri*)	1 g	/	overnight	0.002 M	0.007M	9	20% $NaHSO_3$ + drops of 10% H_2SO_4	Diethyl ether	0.2 ng	GC/MS	67.25 ± 26%
Cadel-Six et al. [29]	Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Liver Intestines Gill Filet	60 mg 100 mg 100 mg 100 mg (dw)	Trypsin in Sörensen's phosphate buffer (0.5 mg/mL, pH 7,5, 37°C)	4	0.1 M	0.1 M	9	40% $NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ≈ 1,5)	SampliQ OPT 150 mg (Agilent)	2.59 ng/g 4.76 ng/g 2.86 ng/g 2.88 ng/g	LC/MS	17% 6% 12% 5%
Roy-Lachapelle et al. [66]	River water	n.s.	/	1	0.05 M	0.05 M	9 (K2CO3)	40% $NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ≈ 2)	Ethyl acetate	0.2 µg/L	LDTD/APCI/MS	91%
Roy-Lachapelle	Frozen homogenized fish tissue ((*Osmerus mordax*);	1 g	3 freeze-thaw lysis cycles +	2	0.05 M	0.05 M	9 (HCl, 50 mM)	Saturated $NaHSO_3$ sol.	Filter the supernatants	2.7 ng/g	LDTD/APCI/HRMS	54-72 %

et al. [79]	(*Mugil cephalus*); (*Salvelinus fontinalis*); (*Perca flavescens*); (*Sander vitreus*); (*Ameiurus nebulosus*); (*Coregonus clupeaformis*))		2h in NaOH (50 mM)					+ 10% H_2SO_4 (pH ≈ 2)	with 0,2 µM nylon filter (Whatman) + Strata SDB-L 500 mg (Phenomenex)			
Foss and Aubel [63]	Raw and trated water from Ohio water sources	n.s.	3 freeze-thaw cycles + 10/100x concentration (SPE)	0.5	0.015 M	0.015 M	n.s.	40% $NaHSO_3$ + phosphate buffer to raise pH < 5	Strata X 100 mg (Phenomenex)	0.05 µg/L	LC/MS	n.s.
Wang et al. [68]	Water Sediment	0,1 mL 1g	/	1	4 g/L	20 mg/L	n.s.	40% $NaHSO_3$ (50 µL : water / 0,5 mL: sediment)	Sep-Pak cartridge (500 mg, 6 cm3)	125 ng/L 100 ng/g	HPLC/FLD	98-109%
Greer et al. [77]	Tilapia (*O. niloticus*) filets, livers and eggs	50 mg (d.w.)	/	2	0.1 M	0.1 M	n.s.	40% $NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH ≈ 2)	Oasis PRiME 60 mg (Waters)	n.s.	UPLC/MS	55%
Munoz et al. [64]	Surface Water	10 mL	3 freeze-thaw cycles + filtration (0,22 µM nylon filters)	1	0.35 M	0.4 M	9 (K2CO3, 1 M)	$NaHSO_3$ (4M)	Filtration (0,22 µM nylon filters) + online SPE	0.5 ng/L	LC/MS	65%
Roy-Lachapelle et al. [80]	Algary dietary supplements	0.3 g	/	2	0.05 M	0.05 M	9 (K2CO3)	Saturated $NaHSO_3$ sol. + 10% H_2SO_4 (pH ≈ 2)	Filtration (0,2 µM nylon filter, Whatman) + Strata SDB-L 500 mg (Phenomenex)	0.2 µg/g	LDTD/APCI/HRMS	67-74%
Vudathala et al. [94]	Liver and plasma from channel catfish (*Ictalurus punctatus*)	< 0.5 g / 0.08 - 0.18 g	/	3	0.002 M	0.002 M	9 (Na2CO3, 1 M)	$NaHSO_3$ + 0.5 mL of concentrated H_2SO_4 (pH ≤ 2)	Filtration (0,2 µM nylon filter, Whatman) + Oasis HLB 60 mg (Waters)	5.2 - 6.2 ng/g	LC/MS	31% / 21%
Brown et al. [78]	Bottlenose dolphins liver (*T. truncatus*)	n.s.	/	2.5	0.1 M	0.1 M	n.s. (K2CO3, 0.2 M)	40% $NaHSO_3$	Strata-X 200 mg (Phenomenex)	1.3 µg/g (d.w.)	LC/MS	39%

Duncan et al. [88]	Aqueous samples / Algal reference material suspensions	n.s. / 25 mg (d.w.) in 200 mL of water	/	1.5	0.025 M	0.009 M	9 (KHCO3, 0,5 M)	40% $NaHSO_3$ + HCl (6 M, pH ≈ 3)	Semi-permeable hydrophobic membrane (PDMS)	1 µg/L	CP/MIMS	n.s.
Foss et al. [59]	Mallard duck (*Anas platyrhynchos*) liver	100 mg (d.w.)	/	2	0.25 M	0.25 M	KHCO3 (1M)	40% $NaHSO_3$ + 50% H_2SO_4 (pH < 2)	Ethyl acetate + Strata-X 200 mg (Phenomenex)	n.s.	LC/MS	n.s.
Greer et al. [95]	Porcine tissue	50 mg (d.w.)	/	2	0.1 M	0.2 M	n.s.	40% $NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4	Oasis PRiME HLB (Waters)	n.s.	UPLC/MS	83%
Foss et al. [86]	Dogs (*Canis lupus familiaris*)	Liver Kidney Hair Blood Bile Urine Vomit	100 mg 100 mg 50 mg (d.w.) 0.5-1.5 mL 0.2 - 500 µL 0.2 - 500 µL 10 mg	/	2	0.1 M	0.1 M	(K2CO3, 0.2 M)	40% $NaHSO_3$	Strata-X 200 mg (Phenomenex) + filtration (PVDF ; 0,2 µM ; Sigma)	4 ng/g 4 ng/g 20 ng/g 0.2 ng/mL 50 ng/mL 0.2 ng/mL n.s.	LC/MS	21% 12% 4% 28% 72% 42% 114%
Mohamed et al. [5]	Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) filet	n.s.	As described in Neffling *et al.* (48)						n-hexane	n.s.	LC/DAD	n.s.
Anaraki et al. [87]	Rainbow Trout (*O. mykiss*) liver and filet	100 mg (d.w.)	/	2	0.3 mM	0.02 M	8.5	$NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH = 3)	Oasis HLB 400 mg (Waters) + Pall GHP filters	7.28 ng/g	LC/MS	30%
Bolotaolo et al. [70]	Sediments / clams	1 / 0,1 g (d.w.)	/	3	0.1 M	0.1 M	9	$NaHSO_3$ (1 – 1,5g) + 10% H_2SO_4 (pH = 2)	ENV-Bond Elut 100 mg (Agilent) + esterification	10 / 15 ng/g (d.w.)	GC/MS	50 / 46%
Lepoutre et al. [83]	Mussels (*A. anantina and D. polymorpha*)	Freeze-dried tissues	Trypsin in Sörensen's phosphate buffer (pH 7,5, 37°C)	3	0.025 M	0.025 M	9	$NaHSO_3$ + 10% H_2SO_4 (pH < 3)	SPE 60 mg (Waters)	n.s.	LC-MS/MS	32.9-58.8 / 36.5-57%

5.2.4. Quantitation of Total MC after Ozonolysis

First described by Harada et al. [96], ozonolysis has historically been the second method for screening total MCs in cyanobacteria. Ozonolysis results can be associated with MMPB method products as ozonolysis produces the same fragment. The reaction of MC oxidation by ozone in a bloom sample from a Japanese lake was completed within 30 min, and the products were analyzed by thermospray-liquid chromatography/mass spectrometry (TSP-LC/MS) or electron ionization-gas chromatography/mass spectrometry (EI-GC/MS). The ozonolysis method has also been applied to sediments [97]. On this matrix, MCs tend to be adsorbed [98], causing the analysis to be more complex than in water samples; a liquid–liquid extraction step (three successive partitions with n-hexane) was added. A methylation step (with 14% boron trifluoride-methanol (BF3-MeOH) at 70 °C for one hour) that made the MMPB volatile for GC-MS analysis was also added. The detection limit of this method was evaluated at the pmol levels with yields of 90.5% for MCLR and -RR and 91.7% for MC-YR. In the most recent application of ozonolysis on MCs, lake water samples spiked with MCs were used to test a slightly different analytical method [99]. After ozonolysis with an ozone concentration of 2.8 mg/L at a flow rate of 100 mL/min for 1 to 20 min, the excess ozone was removed with a nitrogen stream for 5 min. As in the method of Tsuji et al. [97], LLE steps were used. Unlike the sediment ozonolysis method, methyl esterification was performed with MeOH, pyridine, and methylchloroformate (MCF), while the LLE was performed with chloroform in a saturated sodium chloride solution followed by GC/MS analysis. When compared to the previous method using 14% BF_3-MeOH at a high temperature for at least an hour, the Zhang et al. [99] method showed yields between 77.7 and 80.2%, depending on the spike level (300 and 100 µg/L, respectively). The LOD of this method was 0.34 µg/L for a shorter reaction time (10 min), at room temperature and under mild conditions. Although this method can be performed at room temperature, Zhang et al. [99] showed that the most optimal conditions for this ozonolysis protocol were a reaction with an ozone concentration of 2.8 mg/L for 10 min at an acidic pH (pH ≤ 3) and with a temperature of 35 °C. To our knowledge, these are the only publications using ozone for an analysis of the total forms of MCs. Subsequently, the use of ozone on water containing MCs was performed in the context of treating micropollutants in water by ozonation reaction for remediation purposes [100–105]. Although this method yielded good results for blooms (77.7–80.2%) [99] and sediments (between 90.5 and 91.7 depending on the MCs variants) [97], to our knowledge, it has never been applied to more complex matrices, such as animal matrices. As mentioned previously regarding the MMPB method, the transition to such matrices can lead to a significant decrease in the yields of total MCs due to more significant matrix effects. Another point of vigilance concerns the term “total” form. Indeed, this term, depending on the matrix to which it refers, does not necessarily refer to the same type of binding between the MCs and the matrix. In the study by Harada et al. [96], using ozonolysis on cyanobacterial blooms only refers to intra/extracellular MCs, whereas in the other case, dealing with MCs adsorbed to sediment, the binding does not correspond to MCs covalently bound as in animal matrices. While being an interesting and fast method to obtain good recoveries of the total MCs on bloom and sediment matrices, more experience is needed in the application of

ozonolysis on animal matrices to better appreciate the performances of this method, which nevertheless requires adapted equipment in the laboratory.

5.2.5. Quantification of Total MC after Base-Catalyzed Deconjugation

Conjugated forms of MCs are often present in natural samples, sometimes at much higher concentrations than free MCs [59,106–109]. One of the drawbacks of the analysis of total MCs when using the MMPB method is the loss of information on the MC variants. Indeed, the oxidative cleavage at the Adda fragment only preserves the MMPB fragment, common to all MCs and nodularin. It has been observed in the past that the Michael addition of thiols to MCs was reversible [110–112]. Different studies have then focused on the phenomenon of the deconjugation of MCs. The first studies on the subject focused on MCs that are synthetically conjugated in a laboratory [113–115] and then on tissues naturally contaminated with cyanotoxins and containing free and bound MCs [59]. Although this deconjugation can occur at neutral pH, studies have shown that deconjugation at basic pH increases the rate and efficiency. Two research teams are interested in deconjugation at basic pH as an alternative to the MMPB method.

5.2.5.1. Zemskov's Approach of Based-Catalyzed Deconjugation

This protocol was inspired by a mild method for the cleavage of the thioether bond of an S-ethylcysteine residue contained in a modified serine protease mutant by using O-mesitylenesulfonylhydroxylamine (MSH) [116]. This protocol was adapted to MCs by focusing on a laboratory-conjugated MC model. The model system was prepared by adding a glutathione (GSH) fragment as a model of a protein phosphatase to an MC-LF fragment. The addition of GSH to the Mdha residue of MC was performed smoothly by adding 25 equivalents of K_3PO_4 at 40 °C. The model compound thus corresponds to an asymmetric thioether derivative that can be considered to be an N-Me-lanthionine-linked peptide. First, the model compound was subjected to electrophilic activation with excess MSH and potassium carbonate in dimethylformamide/water. However, the need for excess MSH caused the purification of the deconjugated MC fragment to be difficult, and an alternative method of cleaving the thioether bond was sought. After observing a partial cleavage of the thioether bond upon the treatment of the model compound with a base under harsher conditions, as well as the formation of a product whose mass corresponded to the deconjugated MC from the model compound, Zemskov et al. [115] wanted to investigate the possibility of a deconjugation of MC following a basic treatment. The model compound was treated with 20 equivalents of K_3PO_4 at 90 °C under microwave irradiation, and the cleavage of the model compound was observed by LC-MS analyses and isolated by HPLC with a yield of 77%, but further NMR analyses showed that the product obtained was a cyclic product. This cyclization is explained by the intramolecular attack of the N-terminus on Mdha. To overcome this, the addition of propargylamine allows for the trapping of the Michael acceptor and avoids the formation of the cyclic product obtained in the previous reaction. To confirm that the developed method could be applied to adducts on natural MCs, an MC-LF/GSH was synthesized and dissolved in a mixture of propargylamine/MeOH (1:1) before the addition of KOH (final concentration = 0.09 M) in order to initiate the cleavage of the MC-LF/GSH. Two diasteromeric forms of propargylamine

conjugated to MC-LF were identified in the LC-MS analysis, confirming the deconjugation of MC-LF to GSH.

5.2.5.2. Miles' Approach of Based-Catalyzed Deconjugation

5.2.5.2.1. Based-Catalyzed Deconjugation of Thiol-Conjugated MCs

Miles et al. [114] studied the deconjugation kinetics of some thiol-conjugated MCs (**Figure 11**). Different variants of MCs (MC-LR, -YR, -RR, -LA, -LF, -LY, -LW, -RY, [Asp^3]MC-RY, and [Dha^7]MC-LR) were conjugated to different nucleophilic compounds, such as mercaptoethanol, methanethiol, MeOH, and cysteine or glutathione. A base-catalyzed conjugation was performed to obtain the different thiol-conjugated MCs. Once synthesized, the stability of these MC-thiol conjugates was studied under basic conditions, e.g., the MC-RY conjugate with mercaptoethanol was deconjugated under weakly basic conditions, and the half-life of the conjugate decreased when the pH increased or when DMSO or iodoacetamide was added. Subsequently, further kinetic studies on eight MC conjugated with mercaptoethanol were performed using smooth deconjugation using a MeOH-carbonate buffer. At pH 10.7, most of the thiol derivatives had half-lives ranging from 30 to 50 h. This shows the possibility of deconjugating conjugated MCs, and further experiments were subsequently performed to accelerate the process. Three possibilities have been put forward to try to speed up MC deconjugation, firstly by increasing the pH in order to increase the rate of deconjugation while minimizing the occurrence of side reactions. The second possibility put forward by Miles et al. [114] is to remove the free thiol formed during the reaction in order to drive the reaction equilibrium towards deconjugation. Finally, the last possibility is in accordance with the authors who converted the free MCs into non-thiol-reactive derivatives in order to avoid the reconjugation phenomena. To do this, one solution is to carry out the reaction in the presence of an excess of non-natural thiols, such as mercaptoethanol. These hypotheses have been considered and were successfully demonstrated on thiol-conjugated MCs [114,115]. However, it has been observed that the use of high pH can lead to artifact formation [114] and that the use of derivatization reagents can lead to the formation of isomers, complicating the subsequent chemical analysis [114,115].

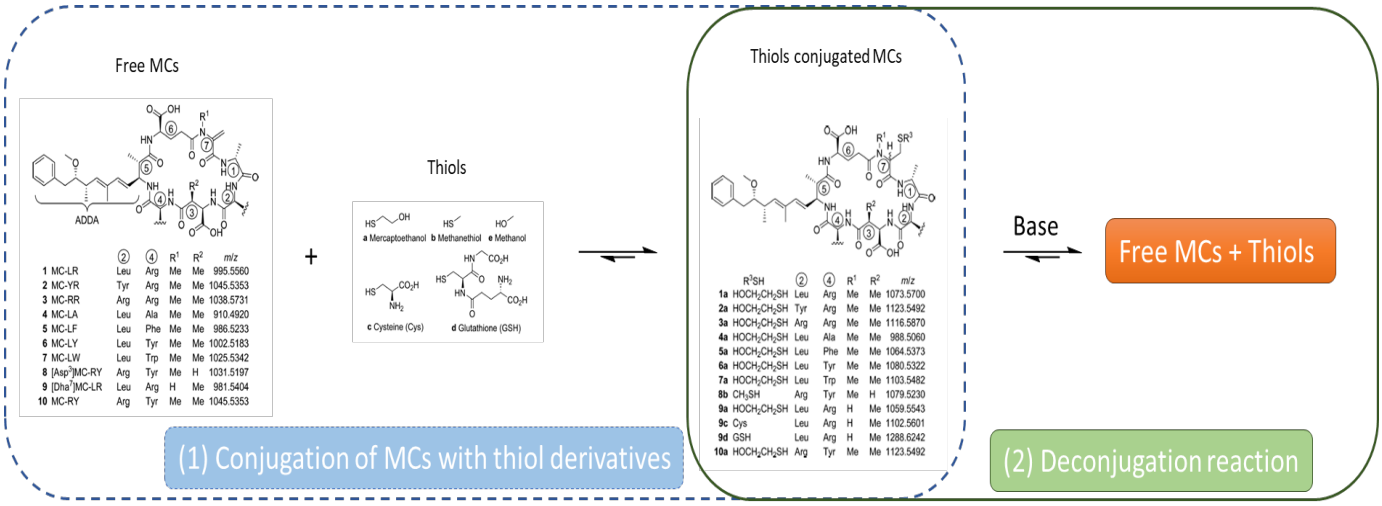


Figure 11 : A schematic representation of (1) the mechanism of conjugation of the Mdha[7]/Dha[7] moiety of MCs with different thiols to create MCs-thiols derivatives as model compound for (2) deconjugation reaction with base (modified after [114]).

5.2.5.2.2. Sulfone/Sulfoxide Mediated Deconjugation

Another hypothesis considered was that the deconjugation reaction could be improved by first converting the sulfide group of the MC to a more easily-leaving group, such as sulfoxide or sulfone [113]. This strategy allows closeness to a more-known reaction: the base-catalyzed β-sulfone elimination reaction [117,118]. As in the previous study, MCs conjugated to thiol derivatives (e.g., mercaptoethanol) were used as a model compound. These compounds with a dialkyl sulfide linkage were oxidized to either sulfoxide or sulfone, which upon basic treatment removed the thiol adduct to its sulfenate or sulfinate to recover a deconjugated MC upon β-elimination with the α, β-unsaturated carbonyl group intact. Sulfone-mediated deconjugation was performed on the mercaptoethanol conjugate of MCRY with oxone in a methanolic carbonate buffer. The rapid and complete conversion of this conjugate to its free form MC-RY via the sulfone form was achieved, and after 26 min of reaction, the conjugate form was no longer detachable. On the other hand, after one night, a drop by half in the intensity of the MC-RY peak was observed and attributed to the instability of MC with oxone. The possibilities put forward to remedy this would be either to quench the reaction after the formation of the sulfones or to extract the products by SPE to remove excess oxidant, for example, by adding a sacrificial sulfoxide such as Me_2SO [119]. In this study, the other hypothesis tested was sulfoxide-mediated deconjugation. H_2O_2, which is known to oxidize the Met (methionine) residue of MCs to their sulfoxide, was used to oxidize the methanethiol conjugate of [Asp[3]]MC-RY and the mercaptoethanol conjugate of eight other MC variants. All of these conjugates were oxidized and then separated by SPE from the excess oxidant before being deconjugated in a carbonate buffer at pH 10.7. Between these two mediated deconjugations, the study of the reaction kinetics between sulfones and sulfoxide-mediated deconjugation showed that the sulfones were thus deconjugated twice as fast as their corresponding sulfoxide. Thus, an optimized sulfoxide-mediated deconjugation procedure using Me_2SO was developed and applied to a mixture of eight MCs conjugated to a mercaptoethanol residue. This experiment was performed as a one-pot reaction in an LC vial, first by adding Me_2SO and then oxone, and one to two hours later, a

carbonate buffer was added to start the deconjugation. The deconjugation process was almost complete after 2 h and totally finished after 5 h. Further studies showed that MCs containing both Arg^2 and Arg^4 residues underwent a faster deconjugation process than MCs with only one Arg residue, which in turn underwent a faster deconjugation process than MCs with no Arg residue. Similarly, this method was tested on various other MC conjugates: cys-conjugate of [Dha^7]MC-LR, MeSH conjugate of [Asp^3]MC-RY, GSH-conjugate of [Dha^7]MC-LR, and [Asp3]MC-RY yielded a complete reaction within min at pH 10.7 and within a few hours at pH 9.2 [113].

5.2.5.3. Application to Natural Samples

To our knowledge, Foss et al. [59] reported the only application of basic pH deconjugation to natural samples, namely, cyanobacterial bloom samples and mallard duck (*Anas platyrhynchos*) liver. Two samples of lyophilized bloom material (10 mg each) and two samples of duck liver (50 mg each) were extracted directly into vials with 1 mL of MeOH, 500 µL of Na_2CO_3 (0.2 M), and 50 µL of DMSO. The vials were then placed on a rotary mixer at around 20 rpm for 10 days. After a centrifugation step at 14,800 rpm for 5 min, the supernatants were centrifugally filtered (0.45 µm) for 20 min before analysis via multi-hapten ELISA. The total MCs analyzed in this study by oxidation and deconjugation counted three times the free MCs analyzed by Adda ELISA in the same samples. Moreover, the analysis following deconjugation at basic pH allowed the detection of 2.5 times more MCs than an extraction performed by deconjugation at neutral pH. When comparing the results between the two methods for the extraction and analysis of the total MCs, depending on the matrix, one or the other method can detect more MCs. For the samples of lyophilized bloom material, the MMPB LC-MS/MS method yielded almost twice as many total MCs (840 vs. 430 µg/g) than the deconjugation/ELISA multi-hapten method. Conversely, in the two samples of mallard duck liver, the deconjugation/ELISA multi-hapten method detected 26% more MCs than the MMPB LC-MS/MS method.

5.2.5.4. Discussion on the Deconjugation at Basic pH

Deconjugation at basic pH through the two approaches proposed by Zemskov et al. [115] and Miles [113,114] seems to be a promising method for the analysis of the total forms of MCs. Unlike the MMPB method, this method has the advantage of keeping the identity of the variant intact after the extraction and thus provides a better idea of the distribution of the variants when analyzing natural samples using LC-MS/MS but also avoids the inclusion of nodularins in the analysis as in the MMPB method. Although there is limited experience with this method, its recent application to lyophilized bloom material and duck liver [59] has shown encouraging results and, in some cases, even higher extraction yields than the MMPB method. More knowledge of this method is, of course, necessary to characterize the parameters of this method but also its application to other matrices in order to better understand the potential matrix effects related to this method.

5.2.6. Quantification of Total MC after Laser Irradiation Desorption

A recent method developed by Shen et al. [120] used laser irradiation desorption (LID) as a means to break the covalent bond between MCs and proteins, including PP1 and PP2A. The tests were conducted during the development of the LID protocol to study the relationship between extraction efficiency and laser power density. Among the criteria studied, the time of exposure of the sample to the laser between 1 to 9 min was compared, and the results indicate that the best exposure time is 5 min. The second criterion studied was the sample volume. An excessive volume would lead to the dilution of the laser energy, while a volume that is too low would lead to an energy that is too high. Five extraction volumes were tested (1, 2, 3, 5, and 8 mL). Similar extraction yields were obtained with volumes of 1, 2, 3, and 5 mL, while a decrease in the yield of 15 to 20% was found with volumes exceeding 8 mL. The volume selected after these tests was 5 mL. The method was validated by studying different parameters such as selectivity, linearity, sensitivity (LOD and LOQ of the method were lower than 0.16 and 0.52 µg/kg, respectively), accuracy, stability, and recovery (relative recoveries of MC ranging from 83.4 to 95.2%). Thus, the optimized protocol corresponds to a 2 g portion of fresh fish tissue (here surimi) crushed and then spiked with 10 µL of a mixture of MCs (MC-RR, -YR, and -LR). The tissues were extracted with 10 mL of MeOH:water:trifluoroacetic acid (TFA) (90:19.9:0.1) and then exposed to visible beam laser irradiation at 450 nm and 8 W for 5 min. After centrifugation at 10,000× g for 10 min, the extract was evaporated to 1 mL and analyzed by LC-MS/MS. Once optimized, this method was compared to two other methods: one method in which the tissues were extracted by 4 mL of acidified water at pH = 2 and heated to 80 °C before LC-MS/MS analysis, and another method in which 50–100 ng of MC standard were analyzed by LC-UV after extraction with 75% MeOH and a clean-up of the sample using an immune-affinity column. The LID method (whose recoveries of -RR, -YR, -LR were 90.9%, 88.5%, and 86.3%, respectively) showed better yields than the method using acidified water (whose recoveries of -RR, -YR, -LR were 62%, 76%, and 71%, respectively) but slightly lower yields than the third method on MC standards (whose recoveries of -RR, -YR, -LR were 94%, 92%, and 95%, respectively). However, it should be noted that the third method does not seem to be really comparable to the other two because of the absence of a matrix and, therefore, no possibility of binding of MCs to proteins, which could complicate the analysis. The development of the method having been carried out on samples of fish tissues spiked with MCs, it was necessary to test the LID method on tissues naturally contaminated with cyanobacteria which can contain both free and bound forms of MCs. The LID method was finally tested on 18 fishes from five different species (*Carassius auratus*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Aristichthys nobilis*, *Mylopharyngodon piceus*, and *Hypophthalmichthys molitrix*). Almost all of the fish species were MC positive, except *Aristichtys nobilis* and MCs were detected in six different fish and quantified in four with MC values between 1.36 and 6.78 µg/kg in *Ctenopharyngodon idellus* I and *Mylopharyngodon piceus* II, respectively. Yet, there is no information in this study about the total MCs naturally present in the samples, determined using a different method (e.g., Lemieux oxidation) to prove the extraction efficiency of the LID method regarding free and bound MCs. Furthermore, it is possible that during the methodological development, the samples are spiked with MCs but that the reported extraction

yields are only related to the free forms of toxins. This method should be compared to another "reference" method for the extraction of the total toxins to demonstrate its ability to extract both free and bound forms of MCs.

5.2.7. Conclusions

As bound MCs can account for a significant part of the total MCs bioaccumulated in an organism, it is thus necessary to develop and optimize the methods for the extraction and analysis of total MCs. Among the four methods presented in this review (MMPB method, deconjugation at basic pH, ozonolysis, and LID), the MMPB method seems to be the one that has been applied the most for a variety of matrices and for which there have been the most attempts of improvement. Attempts to optimize each step of the MMPB method have been made, for example, during the pre-treatment of the sample, whether chemical or enzymatic, or whether it aims to lyse the cells and concentrate the sample. In the same way, different steps of Lemieux oxidation, extraction/purification, and analysis have evolved, as shown in **Table 4**, which summarizes the different protocols for the MMPB method implemented in the literature. However, the performances of this method remain very variable, and it is necessary to continue improving key steps, in particular, the purification step, the critical phase of the MMPB method. More recently, deconjugation at basic pH has shown comparable extraction yields to the MMPB method in its first application to cyanobacterial and animal matrices. It would be relevant to compare the different protocols but also to extend the tests to different matrices. The third method reviewed here, ozonolysis, presents good extraction yields for cyanobacteria and sediments but has never been applied to animal matrices where MCs could be bound to proteins. It would therefore be necessary to extend this method to these kinds of matrices. Few studies used ozonolysis, probably due to the specific equipment required to carry out this method. Finally, the LID method is the most recently developed method for the extraction of the total forms of MCs and presents yields higher than 85% on free forms without really demonstrating its efficiency on bound forms. Moreover, it would be necessary to extend it to other matrices, and unlike the MMPB and deconjugation approaches, this method requires specific equipment. Among the different methods reviewed in this article, the MMPB method seems to be the reference despite matrix- and protocol-dependent extraction yields and important matrix effects. Conversely, the other methods reviewed here (deconjugation, ozonolysis, and LID) could be interesting alternatives to the MMPB method but require more hindsight on their use and performance. Although these tests are not yet routinely applied to samples, they would allow a better understanding of the distribution of free/bound toxins, for example, during the accidental intoxication of animals with cyanobacteria, but it would also be a first step towards estimating the sanitary risk during the consumption of species contaminated by MCs.

5.2.8. References

1. Schopf, J.W. The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage. In *The Ecology of Cyanobacteria*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2000.
2. Chorus, I.; Welker, M. Cyanobacterial toxins. In *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, 2nd ed.; CRC Press: London, UK, 2021; p. 150.
3. Smith, V.H. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: A global problem. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2003**, *10*, 126–139. [CrossRef] [PubMed]

4. Paerl, H.W.; Fulton, R.S.; Moisander, P.H.; Dyble, J. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *Sci. World J.* **2001**, *1*, 76–113. [CrossRef] [PubMed]
5. Mohamed, Z.; Ahmed, Z.; Bakr, A.; Hashem, M.; Alamri, S. Detection of free and bound microcystins in tilapia fish from Egyptian fishpond farms and its related public health risk assessment. *J. Consum. Prot. Food Saf.* **2019**, *15*, 37–47. [CrossRef]
6. Chorus, I.; Welker, M. (Eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water—A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, 2nd ed.; World Health Organization: London, UK, 2021; 859p.
7. ANSES. *Évaluation des Risques Liés Aux Cyanobactéries et Leurs Toxines Dans les Eaux Douces*; ANSES: Maisons-Alfort, France, 2020; 495p.
8. Singh, S.; Srivastava, A.; Oh, H.M.; Ahn, C.Y.; Choi, G.G.; Asthana, R.K. Recent trends in development of biosensors for detection of microcystin. *Toxicon* **2012**, *60*, 878–894. [CrossRef] [PubMed]
9. Bouaïcha, N.; Miles, C.O.; Beach, D.G.; Labidi, Z.; Djabri, A.; Benayache, N.Y.; Nguyen-Quang, T. Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. *Toxins* **2019**, *11*, 714. [CrossRef]
10. Zhang, D.; Xie, P.; Liu, Y.; Qiu, T. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 2191–2199. [CrossRef]
11. Lance, E.; Brient, L.; Carpentier, A.; Acou, A.; Marion, L.; Bormans, M.; Gerard, C. Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to Physa (=Physella) acuta. *Sci. Total Environ.* **2010**, *408*, 3560–3568. [CrossRef]
12. Lance, E.; Petit, A.; Sanchez, W.; Paty, C.; Gerard, C.; Bormans, M. Evidence of trophic transfer of microcystins from the gastropod Lymnaea stagnalis to the fish Gasterosteus aculeatus. *Harmful Algae* **2014**, *31*, 9–17. [CrossRef]
13. Rezaitabar, S.; Sari, A.E.; Bahramifar, N.; Ramezanpour, Z. Transfer, tissue distribution and bioaccumulation of microcystin LR in the phytoplanktivorous and carnivorous fish in Anzali wetland, with potential health risks to humans. *Sci. Total Environ.* **2017**,
575, 1130–1138. [CrossRef]
14. Kondo, F.; Ikai, Y.; Oka, H.; Okumura, M.; Ishikawa, N.; Harada, K.; Matsuura, K.; Murata, H.; Suzuki, M. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 591–596. [CrossRef]
15. Hastie, C.J.; Borthwick, E.B.; Morrison, L.F.; Codd, G.A.; Cohen, P.T. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1726*, 187–193. [CrossRef] [PubMed]
16. Maynes, J.T.; Luu, H.A.; Cherney, M.M.; Andersen, R.J.; Williams, D.; Holmes, C.F.; James, M.N. Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: Elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins. *J. Mol. Biol.* **2006**, *356*, 111–120. [CrossRef] [PubMed]
17. Campos, A.; Vasconcelos, V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 268–287. [CrossRef] [PubMed]
18. Craig, M.; Luu, H.A.; McCready, T.L.; Williams, D.; Andersen, R.J.; Holmes, C.F. Molecular mechanisms underlying he interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochem. Cell Biol.* **1996**, *74*, 569–578. [CrossRef]
19. Liu, J.; Sun, Y. The role of PP2A-associated proteins and signal pathways in microcystin-LR toxicity. *Toxicol. Lett.* **2015**, *236*, 1–7. [CrossRef]
20. McLellan, N.L.; Manderville, R.A. Toxic mechanisms of microcystins in mammals. *Toxicol. Res.* **2017**, *6*, 391–405. [CrossRef]
21. Vichi, S.; Buratti, F.M.; Testai, E. Microcystins: Toxicological Profile. In *Marine and Freshwater Toxins*; Gopalakrishnakone, P., Haddad, V., Jr., Tubaro, A., Kim, E., Kem, W.R., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2016; pp. 219–238.
22. Buratti, F.M.; Manganelli, M.; Vichi, S.; Stefanelli, M.; Scardala, S.; Testai, E.; Funari, E. Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 1049–1130. [CrossRef]
23. Kim, R.B. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. *Eur. J. Clin. Investig.* **2003**, *33* (Suppl. 2), 1–5. [CrossRef]
24. Wood, R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure—A review of the literature. *Environ. Int.* **2016**, *91*, 276–282. [CrossRef]
25. Svirc˘ev, Z.; Lalic´, D.; Savic´, G.B.; Tokodi, N.; Backovic´, D.D.; Chen, L.; Meriluoto, J.; Codd, G.A. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. *Arch. Toxicol.* **2019**, *93*, 2429–2481. [CrossRef]

26. Massey, I.Y.; Wu, P.; Wei, J.; Luo, J.; Ding, P.; Wei, H.; Yang, F. A Mini-Review on Detection Methods of Microcystins. *Toxins* **2020**, *12*, 641. [CrossRef] [PubMed]
27. Carmichael, W.W.; Li, R. Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. *Saline Syst.* **2006**, *2*, 5. [CrossRef] [PubMed]
28. Lance, E.; Neffling, M.R.; Gerard, C.; Meriluoto, J.; Bormans, M. Accumulation of free and covalently bound microcystins in tissues of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure. *Environ. Pollut.* **2010**, *158*, 674–680. [CrossRef] [PubMed]
29. Cadel-Six, S.; Moyenga, D.; Magny, S.; Trotereau, S.; Edery, M.; Krys, S. Detection of free and covalently bound microcystins in different tissues (liver, intestines, gills, and muscles) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Method characterization. *Environ. Pollut.* **2014**, *185*, 333–339. [CrossRef] [PubMed]
30. Manubolu, M.; Lee, J.; Riedl, K.M.; Kua, Z.X.; Collart, L.P.; Ludsin, S.A. Optimization of extraction methods for quantification of microcystin-LR and microcystin-RR in fish, vegetable, and soil matrices using UPLC-MS/MS. *Harmful Algae* **2018**, *76*, 47–57. [CrossRef]
31. Kondo, F.; Matsumoto, H.; Yamada, S.; Tsuji, K.; Ueno, Y.; Harada, K. Immunoaffinity purification method for detection and quantification of microcystins in lake water. *Toxicon* **2000**, *38*, 813–823. [CrossRef]
32. Kondo, F.; Ito, Y.; Oka, H.; Yamada, S.; Tsuji, K.; Imokawa, M.; Niimi, Y.; Harada, K.-I.; Ueno, Y.; Miyazaki, Y. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. *Toxicon* **2002**, *40*, 893–899. [CrossRef]
33. Lawrence, J.F.; Menard, C. Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr. A* **2001**, *922*, 111–117. [CrossRef]
34. Neumann, A.C.; Melnik, S.; Niessner, R.; Stoeger, E.; Knopp, D. Microcystin-LR Enrichment from Freshwater by a Recombinant Plant-derived Antibody Using Sol-Gel-Glass Immunoextraction. *Anal. Sci.* **2019**, *35*, 207–214. [CrossRef]
35. Lawton, L.A.; Chambers, H.; Edwards, C.; Nwaopara, A.A.; Healy, M. Rapid detection of microcystins in cells and water. *Toxicon* **2010**, *55*, 973–978. [CrossRef]
36. Ai, Y.; Lee, S.; Lee, J. Drinking water treatment residuals from cyanobacteria bloom-affected areas: Investigation of potential impact on agricultural land application. *Sci. Total Environ.* **2020**, *706*, 135756. [CrossRef] [PubMed]
37. Bostan, H.B.; Taghdisi, S.M.; Bowen, J.L.; Demertzis, N.; Rezaee, R.; Panahi, Y.; Tsatsakis, A.M.; Karimi, G. Determination of microcystin-LR, employing aptasensors. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *119*, 110–118. [CrossRef] [PubMed]
38. Cunha, I.; Biltes, R.; Sales, M.; Vasconcelos, V. Aptamer-Based Biosensors to Detect Aquatic Phycotoxins and Cyanotoxins. *Sensors* **2018**, *18*, 2367. [CrossRef]
39. Lin, Z.; Huang, H.; Xu, Y.; Gao, X.; Qiu, B.; Chen, X.; Chen, G. Determination of microcystin-LR in water by a label-free aptamer based electrochemical impedance biosensor. *Talanta* **2013**, *103*, 371–374. [CrossRef]
40. Liu, M.; Sun, C.; Wang, G.; Wang, Y.; Lu, H.; Shi, H.; Zhao, G. A simple, supersensitive and highly selective electrochemical aptasensor for Microcystin-LR based on synergistic signal amplification strategy with graphene, DNase I enzyme and Au nanoparticles. *Electrochim. Acta* **2019**, *293*, 220–229. [CrossRef]
41. Lawton, L.A.; Edwards, C.; Codd, G.A. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* **1994**, *119*, 1525–1530. [CrossRef] [PubMed]
42. *ISO 20179:2005*; Water Quality–Determination of Microcystins–Method Using Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) Detection. ISO: Geneva, Switzerland, 2005.
43. Meriluoto, J.; Spoof, L.; Codd, G.A. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, 1st ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2017.
44. Bateman, K.P.; Thibault, P.; Douglas, D.J.; White, R.L. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. *J. Chromatogr. A* **1995**, *712*, 253–268. [CrossRef]
45. Li, P.C.H.; Hu, S.; Lam, P.K.S. Development of a Capillary Zone Electrophoretic Method for the Rapid Separation and Detection of Hepatotoxic Microcystins. *Mar. Pollut. Bull.* **1999**, *39*, 250–254. [CrossRef]
46. Vasas, G.; Gaspar, A.; Pager, C.; Suranyi, G.; Mathe, C.; Hamvas, M.M.; Borbely, G. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 108–115. [CrossRef]
47. Vasas, G.; Szydlowska, D.; Gaspar, A.; Welker, M.; Trojanowicz, M.; Borbely, G. Determination of microcystins in environmental samples using capillary electrophoresis. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2006**, *66*, 87–97. [CrossRef]
48. Birungi, G.; Li, S.F. Determination of cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins in drinking water using CE. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 2737–2742. [CrossRef] [PubMed]
49. Neffling, M.R.; Lance, E.; Meriluoto, J. Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Pollut* **2010**, *158*, 948–952. [CrossRef]

50. Falconer, I.R.; Smith, J.V.; Jackson, A.R.; Jones, A.; Runnegar, M.T. Oral toxicity of a bloom of the Cyanobacterium microcystis Aeruginosa administered to mice over periods up to 1 year. *J. Toxicol. Environ. Health* **1988**, *24*, 291–305. [CrossRef] [PubMed]
51. Babica, P.; Blaha, L.; Marsalek, B. Exploring the Natural Role of Microcystins-a Review of Effects on Photoautotrophic Organisms1.
J. Phycol. **2006**, *42*, 9–20. [CrossRef]
52. Vasas, G.; Gaspar, A.; Suranyi, G.; Batta, G.; Gyemant, G.; Márta, M.H.; Mathe, C.; Grigorszky, I.; Molnar, E.; Borbely, G. Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from Aphanizomenon ovalisporum, by plant test (blue-green Sinapis test). *Anal. Biochem.* **2002**, *302*, 95–103. [CrossRef] [PubMed]
53. Perron, M.C.; Qiu, B.; Boucher, N.; Bellemare, F.; Juneau, P. Use of chlorophyll a fluorescence to detect the effect of microcystins on photosynthesis and photosystem II energy fluxes of green algae. *Toxicon* **2012**, *59*, 567–577. [CrossRef]
54. Metcalf, J.S.; Lindsay, J.; Beattie, K.A.; Birmingham, S.; Saker, M.L.; Torokne, A.K.; Codd, G.A. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp Artemia salina: Comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon* **2002**, *40*, 1115–1120. [CrossRef]
55. Torokne, A.; Vasdinnyei, R.; Asztalos, B.M. A rapid microbiotest for the detection of cyanobacterial toxins. *Environ. Toxicol.* **2007**, *22*, 64–68. [CrossRef]
56. Buryskova, B.; Hilscherova, K.; Babica, P.; Vrskova, D.; Marsalek, B.; Blaha, L. Toxicity of complex cyanobacterial samples and their fractions in Xenopus laevis embryos and the role of microcystins. *Aquat. Toxicol.* **2006**, *80*, 346–354. [CrossRef]
57. Campbell, D.L.; Lawton, L.A.; Beattie, K.A.; Codd, G.A. Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **1994**, *9*, 71–77. [CrossRef]
58. Moore, C.E.; Juan, J.; Lin, Y.; Gaskill, C.L.; Puschner, B. Comparison of Protein Phosphatase Inhibition Assay with LC-MS/MS for Diagnosis of Microcystin Toxicosis in Veterinary Cases. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 54. [CrossRef] [PubMed]
59. Foss, A.J.; Miles, C.O.; Samdal, I.A.; Lovberg, K.E.; Wilkins, A.L.; Rise, F.; Jaabaek, J.A.H.; McGowan, P.C.; Aubel, M.T. Analysis of free and metabolized microcystins in samples following a bird mortality event. *Harmful Algae* **2018**, *80*, 117–129. [CrossRef]
[PubMed]
60. Williams, D.E.; Craig, M.; McCready, T.L.; Dawe, S.C.; Kent, M.L.; Holmes, C.F.; Andersen, R.J. Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and Dungeness crab larvae. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 463–469. [CrossRef]
61. Suchy, P.; Berry, J. Detection of total microcystin in fish tissues based on lemieux oxidation, and recovery of 2-methyl-3-methoxy4-phenylbutanoic acid (MMPB) by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC/MS). *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2012**, *92*, 1443–1456. [CrossRef] [PubMed]
62. Roy-Lachapelle, A. Nouvelles Stratégies Pour L'analyse des Cyanotoxines par Spectrométrie de Masse. Ph.D. Thesis, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada, 2015.
63. Foss, A.J.; Aubel, M.T. Using the MMPB technique to confirm microcystin concentrations in water measured by ELISA and HPLC (UV, MS, MS/MS). *Toxicon* **2015**, *104*, 91–101. [CrossRef]
64. Munoz, G.; Vo Duy, S.; Roy-Lachapelle, A.; Husk, B.; Sauve, S. Analysis of individual and total microcystins in surface water by on-line preconcentration and desalting coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1516*, 9–20. [CrossRef]
65. Sano, T.; Nohara, K.; Shiraishi, F.; Kaya, K. A method for micro-determination of total microcystin content in waterblooms of cyanobacteria (blue-green algea). *Intern. J. Environ. Anal. Chem* **1992**, *49*, 163–170. [CrossRef]
66. Roy-Lachapelle, A.; Fayad, P.B.; Sinotte, M.; Deblois, C.; Sauve, S. Total microcystins analysis in water using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *820*, 76–83. [CrossRef]
67. Wu, X.; Xiao, B.; Li, R.; Wang, Z.; Chen, X.; Chen, X. Rapid quantification of total microcystins in cyanobacterial samples by periodate-permanganate oxidation and reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *651*, 241–247. [CrossRef]
68. Wang, C.; Tian, C.; Tian, Y.; Feng, B.; We, S.; Li, Y.; Wu, X.; Xiao, B. A sensitive method for the determination of total microcystins in water and sediment samples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 759–765. [CrossRef]
69. Wu, X.; Wang, C.; Xiao, B.; Wang, Y.; Zheng, N.; Liu, J. Optimal strategies for determination of free/extractable and total microcystins in lake sediment. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *709*, 66–72. [CrossRef] [PubMed]
70. Bolotaolo, M.; Kurobe, T.; Puschner, B.; Hammock, B.G.; Hengel, M.J.; Lesmeister, S.; Teh, S.J. Analysis of Covalently Bound Microcystins in Sediments and Clam Tissue in the Sacramento–San Joaquin River Delta, California, USA. *Toxins* **2020**, *12*, 178. [CrossRef] [PubMed]

71. Williams, D.E.; Dawe, S.C.; Kent, M.L.; Andersen, R.J.; Craig, M.; Holmes, C.F. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, Mytilus edulis, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon* **1997**, *35*, 1617–1625. [CrossRef]
72. Ott, J.L.; Carmichael, W.W. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues. *Toxicon* **2006**, *47*, 734–741. [CrossRef]
73. Hilborn, E.D.; Carmichael, W.W.; Soares, R.M.; Yuan, M.; Servaites, J.C.; Barton, H.A.; Azevedo, S.M. Serologic evaluation of human microcystin exposure. *Environ. Toxicol.* **2007**, *22*, 459–463. [CrossRef]
74. Soares, R.M.; Yuan, M.; Servaites, J.C.; Delgado, A.; Magalhaes, V.F.; Hilborn, E.D.; Carmichael, W.W.; Azevedo, S.M. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ. Toxicol.* **2006**, *21*, 95–103. [CrossRef]
75. Yuan, M.; Carmichael, W.W.; Hilborn, E.D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. *Toxicon* **2006**, *48*, 627–640. [CrossRef]
76. Nasri, H.; El Herry, S.; Bouaicha, N. First reported case of turtle deaths during a toxic *Microcystis* spp. bloom in Lake Oubeira, Algeria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2008**, *71*, 535–544. [CrossRef]
77. Greer, B.; Maul, R.; Campbell, K.; Elliott, C.T. Detection of freshwater cyanotoxins and measurement of masked microcystins in tilapia from Southeast Asian aquaculture farms. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 4057–4069. [CrossRef]
78. Brown, A.; Foss, A.; Miller, M.A.; Gibson, Q. Detection of cyanotoxins (microcystins/nodularins) in livers from estuarine and coastal bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from Northeast Florida. *Harmful Algae* **2018**, *76*, 22–34. [CrossRef]
79. Roy-Lachapelle, A.; Solliec, M.; Sinotte, M.; Deblois, C.; Sauve, S. Total Analysis of Microcystins in Fish Tissue Using Laser Thermal Desorption-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-High-Resolution Mass Spectrometry (LDTD-APCI-HRMS). *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7440–7449. [CrossRef]
80. Roy-Lachapelle, A.; Solliec, M.; Bouchard, M.F.; Sauve, S. Detection of Cyanotoxins in Algae Dietary Supplements. *Toxins* **2017**, *9*, 76. [CrossRef]
81. Bieczynski, F.; Bianchi, V.A.; Luquet, C.M. Accumulation and biochemical effects of microcystin-LR on the Patagonian pejerrey (*Odontesthes hatcheri*) fed with the toxic cyanobacteria Microcystis aeruginosa. *Fish Physiol. Biochem.* **2013**, *39*, 1309–1321. [CrossRef] [PubMed]
82. Risticevic, S.; Niri, V.H.; Vuckovic, D.; Pawliszyn, J. Recent developments in solid-phase microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 781–795. [CrossRef] [PubMed]
83. Lepoutre, A.; Grilot, T.; Jean, S.; Geffard, A.; Lance, E. Free or Protein-Bound Microcystin Accumulation by Freshwater Bivalves as a Tool to Evaluate Water Contamination by Microcystin-Producing Cyanobacteria? *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 3426. [CrossRef]
84. Kaya, K.; Sano, T. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *386*, 107–112. [CrossRef]
85. Foss, A.J.; Butt, J.; Fuller, S.; Cieslik, K.; Aubel, M.T.; Wertz, T. Nodularin from benthic freshwater periphyton and implications for trophic transfer. *Toxicon* **2017**, *140*, 45–59. [CrossRef] [PubMed]
86. Foss, A.J.; Aubel, M.T.; Gallagher, B.; Mettee, N.; Miller, A.; Fogelson, S.B. Diagnosing Microcystin Intoxication of Canines:
Clinicopathological Indications, Pathological Characteristics, and Analytical Detection in Postmortem and Antemortem Samples. *Toxins* **2019**, *11*, 456. [CrossRef]
87. Anaraki, M.T.; Shahmohamadloo, R.S.; Sibley, P.K.; MacPherson, K.; Bhavsar, S.P.; Simpson, A.J.; Almirall, X.O. Optimization of an MMPB Lemieux Oxidation method for the quantitative analysis of microcystins in fish tissue by LC-QTOF MS. *Sci. Total Environ.* **2020**, *737*, 140209. [CrossRef]
88. Duncan, K.D.; Beach, D.G.; Wright, E.J.; Barsby, T.; Gill, C.G.; Krogh, E.T. Direct online quantitation of 2-methyl-3-methoxy-4phenyl butanoic acid for total microcystin analysis by condensed phase membrane introduction tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* **2018**, *10*, 3310–3316. [CrossRef]
89. Rodriguez, E.; Majado, M.E.; Meriluoto, J.; Acero, J.L. Oxidation of microcystins by permanganate: Reaction kinetics and implications for water treatment. *Water Res.* **2007**, *41*, 102–110. [CrossRef] [PubMed]
90. Wu, X.; Xiao, B.; Gong, Y.; Wang, Z.; Chen, X.; Li, R. Kinetic study of the 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutanoic acid produced by oxidation of microcystin in aqueous solutions. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27*, 2019–2026. [CrossRef] [PubMed]
91. González, O.; Blanco, M.E.; Iriarte, G.; Bartolomé, L.; Maguregui, M.I.; Alonso, R.M. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1353*, 10–27. [CrossRef] [PubMed]
92. Mejia-Avendaño, S.; Munoz, G.; Sauvé, S.; Liu, J. Assessment of the Influence of Soil Characteristics and Hydrocarbon Fuel Cocontamination on the Solvent Extraction of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 2539–2546. [CrossRef]

93. Pires, L.M.; Karlsson, K.M.; Meriluoto, J.A.; Kardinaal, E.; Visser, P.M.; Siewertsen, K.; Donk, E.V.; Ibelings, B.W. Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, Dreissena polymorpha. *Aquat. Toxicol.* **2004**, *69*, 385–396. [CrossRef] [PubMed]
94. Vudathala, D.; Smith, S.; Khoo, L.; Kuhn, D.D.; Mainous, M.E.; Steadman, J.; Murphy, L. Analysis of microcystin-LR and nodularin using triple quad liquid chromatography-tandem mass spectrometry and histopathology in experimental fish. *Toxicon* **2017**, *138*, 82–88. [CrossRef] [PubMed]
95. Greer, B.; Meneely, J.P.; Elliott, C.T. Uptake and accumulation of Microcystin-LR based on exposure through drinking water: An animal model assessing the human health risk. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4913. [CrossRef]
96. Harada, K.; Murata, H.; Qiang, Z.; Suzuki, M.; Kondo, F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon* **1996**, *34*, 701–710. [CrossRef]
97. Tsuji, K.; Masui, H.; Uemura, H.; Mori, Y.; Harada, K.-I. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. *Toxicon* **2001**, *39*, 687–692. [CrossRef]
98. Rapala, J.; Lahti, K.; Sivonen, K.; Niemela, S.I. Biodegradability and adsorption on lake sediments of cyanobacterial hepatotoxins and anatoxin-a. *Lett. Appl. Microbiol.* **1994**, *19*, 423–428. [CrossRef]
99. Zhang, L.L.; Yu, R.P.; Wang, L.P.; Wu, S.F.; Song, Q.J. Transformation of microcystins to 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid by room temperature ozone oxidation for rapid quantification of total microcystins. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2016**, *18*, 493–499. [CrossRef] [PubMed]
100. Rositano, J.; Nicholson, B.C.; Pieronne, P. Destruction of Cyanobacterial Toxins by Ozone. *Ozone Sci. Eng.* **1998**, *20*, 223–238. [CrossRef]
101. Lawton, L.A.; Robertson, P.K.J. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 217–224. [CrossRef]
102. Schmidt, W.; Willmitzer, H.; Bornmann, K.; Pietsch, J. Production of drinking water from raw water containing cyanobacteria?pilot plant studies for assessing the risk of microcystin breakthrough. *Environ. Toxicol.* **2002**, *17*, 375–385. [CrossRef]
103. Hoeger, S.J.; Dietrich, D.R.; Hitzfeld, B.C. Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110*, 1127–1132. [CrossRef]
104. Hoeger, S.J.; Hitzfeld, B.C.; Dietrich, D.R. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicol. Appl Pharmacol.* **2005**, *203*, 231–242. [CrossRef]
105. Onstad, G.D.; Strauch, S.; Meriluoto, J.; Codd, G.A.; Von Gunten, U. Selective oxidation of key functional groups in cyanotoxins during drinking water ozonation. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 4397–4404. [CrossRef]
106. Kondo, F.; Matsumoto, H.; Yamada, S.; Ishikawa, N.; Ito, E.; Nagata, S.; Ueno, Y.; Suzuki, M.; Harada, K.-i. Detection and Identification of Metabolites of Microcystins Formed in Vivo in Mouse and Rat Livers. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1355–1359. [CrossRef]
107. Williams, D.E.; Craig, M.; Dawe, S.C.; Kent, M.L.; Andersen, R.J.; Holmes, C.F.B. 14C-labelled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicon* **1997**, *35*, 985–989. [CrossRef]
108. Pflugmacher, S.; Wiegand, C.; Oberemm, A.; Beattie, K.A.; Krause, E.; Codd, G.A.; Steinberg, C.E.W. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: The first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Gen. Subj.* **1998**, *1425*, 527–533. [CrossRef]
109. Meissner, S.; Fastner, J.; Dittmann, E. Microcystin production revisited: Conjugate formation makes a major contribution. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 1810–1820. [CrossRef] [PubMed]
110. Miles, C.O.; Sandvik, M.; Nonga, H.E.; Rundberget, T.; Wilkins, A.L.; Rise, F.; Ballot, A. Thiol Derivatization for LC-MS Identification of Microcystins in Complex Matrices. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 8937–8944. [CrossRef] [PubMed]
111. Miles, C.O.; Sandvik, M.; Haande, S.; Nonga, H.; Ballot, A. LC-MS Analysis with Thiol Derivatization to Differentiate [Dhb7]- from
[Mdha7]-Microcystins: Analysis of Cyanobacterial Blooms, Planktothrix Cultures and European Crayfish from Lake Steinsfjorden, Norway. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 4080–4087. [CrossRef] [PubMed]
112. Li, W.; Chen, J.; Xie, P.; He, J.; Guo, X.; Tuo, X.; Zhang, W.; Wu, L. Rapid conversion and reversible conjugation of glutathione detoxification of microcystins in bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Aquat. Toxicol.* **2014**, *147*, 18–25. [CrossRef]
113. Miles, C.O. Rapid and Convenient Oxidative Release of Thiol-Conjugated Forms of Microcystins for Chemical Analysis. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30*, 1599–1608. [CrossRef]
114. Miles, C.O.; Sandvik, M.; Nonga, H.E.; Ballot, A.; Wilkins, A.L.; Rise, F.; Jaabaek, J.A.H.; Loader, J.I. Conjugation of Microcystins with Thiols Is Reversible: Base-Catalyzed Deconjugation for Chemical Analysis. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29*, 860–870. [CrossRef]

115. Zemskov, I.; Kropp, H.M.; Wittmann, V. Regioselective Cleavage of Thioether Linkages in Microcystin Conjugates. *Chem.—Eur. J.* **2016**, *22*, 10990–10997. [CrossRef]
116. Bernardes, G.J.L.; Chalker, J.M.; Errey, J.C.; Davis, B.G. Facile Conversion of Cysteine and Alkyl Cysteines to Dehydroalanine on Protein Surfaces: Versatile and Switchable Access to Functionalized Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052–5053. [CrossRef]
117. Whitham, G.H. *Organosulfur Chemistry*; Oxford University Press: Oxford, UK; New York, NY, USA, 1995.
118. Zoller, U. Syntheses of sulfinic esters. In *Sulphinic Acids, Esters and Derivatives (1990)*; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, UK, 1990; pp. 217–237.
119. Miles, C.O.; Melanson, J.E.; Ballot, A. Sulfide Oxidations for LC-MS Analysis of Methionine-Containing Microcystins in Dolichospermum flos-aquae NIVA-CYA 656. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 13307–13315. [CrossRef]
120. Shen, Q.; Feng, J.; Wang, J.; Li, S.; Wang, Y.; Ma, J.; Wang, H. Laser irradiation desorption of microcystins from protein complex in fish tissue and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Electrophoresis* **2019**, *40*, 1805–1811. [CrossRef]

CHAPITRE 2
COMPARAISON ET VALIDATION DES PROTOCOLES D'EXTRACTION POUR L'ANALYSE DES MICROCYSTINES LIBRES DANS LES MATRICES DE POISSON PAR LC-MS/MS

1. Synthèse des travaux

Les cyanobactéries sont des micro-organismes photosynthétiques apparus sur Terre il y a 3,5 milliards d'années et retrouvées dans divers écosystèmes d'eau douce, saumâtre et marine (228). Lors d'une prolifération des cyanobactéries, des métabolites peuvent être produites y compris des toxines telles que les microcystines (MC), un heptapeptide monocyclique. L'ingestion de cellules cyanobactériennes ou l'ingestion/filtration d'eau contaminée, peut entrainer une accumulation de MC dans divers organismes tels que le zooplancton, le zoobenthos ou les poissons, avec un transfert possible entre les niveaux trophiques (101, 150, 202, 229). Il existe alors deux formes d'accumulation des MC dans les organismes : une fraction cellulaire libre et disponible et une forme liée de manière covalente aux protéines (18). Un panel de techniques est disponible pour l'analyse des cyanotoxines dans différentes matrices (eau, sédiments et tissus animaux). Plus spécifiquement, l'analyse des MC peut concerner la fraction libre ou la fraction totale (libre + liée de manière covalente). Les analyses des MC libres sont les plus répandues et les plus simples à réaliser (37). Elles consistent généralement en une étape d'extraction avec différents mélanges de solvants organiques (méthanol, acétonitrile, butanol...) purs ou dilués selon des protocoles. Ces étapes d'extraction sont parfois suivies d'une étape de purification (LLE, SPE ou IAC). Les extraits obtenus lors des étapes d'extraction et de purification peuvent être analysés par différentes méthodes notamment immunologiques, chimiques ou biologiques.

L'objectif ici était de développer une méthode d'extraction et d'analyse LC-MS/MS des MC libres dans les filets de poisson frais. Pour ce faire, trois méthodes d'extraction des MC libres (appelées ici "freeMC1", "freeMC2" et "freeMC3") ont été sélectionnées dans la littérature et comparées sur des matrices de poisson frais avec deux variants de MC (MC-LR & MC-RR) (40, 120, 230) quant à leurs taux de récupération et effets matrice. La méthode la plus performante a ensuite été sélectionnée et validée avec une approche par critères selon la norme NF V03-110 sur des filets de trois espèces de poissons (saumon, truite et carpe) de poissons frais.

Chacun des trois protocoles a d'abord été comparé sur deux matrices fraiches de poisson : des filets de truite et de saumon. Pour cela, deux variants de MC (MC-LR et MC-RR) ont fait l'objet d'ajouts dosés dans les filets de poisson non contaminés à deux niveaux de concentration : 30 et 100 µg/kg pendant 15 min avant de tester les protocoles. Le protocole "FreeMC1" comprend une prise d'essai de 2,5 g de filet frais de poisson, une étape d'extraction avec 15 mL d'un mélange ACN/H_2O/FA (75:24:1) et une méthode de purification liquide-liquide réalisée sur 2 mL d'extrait avec 2 mL d'hexane saturé en ACN. Le protocole "FreeMC2", comprend une prise d'essai de 0,5 g de filet de poisson avec une étape d'extraction avec 10 mL de H_2O/MeOH/BuOH (75:20:5) et une étape de purification SPE avec des cartouches Oasis HLB 30 mg 6cc. Le protocole "FreeMC3" comprend une prise d'essai de 2 g de filets de poisson et deux extractions successives avec 10 mL de MeOH, sans étape de purification. Dans cette étude, les meilleurs taux de récupération ont été obtenus avec le protocole "FreeMC3", que ce soit pour la MC-RR ou -LR et quelle que soit la matrice (truite ou saumon). A l'inverse, le protocole "FreeMC2" a montré à la fois les taux de récupération les plus faibles et la plus grande

variabilité en comparant les matrices ou les concentrations. Ce protocole a donc été écarté pour les étapes suivantes.

Les effets matrice ont ensuite été évalués pour les deux protocoles sélectionnés à l'étape précédente, les protocoles "FreeMC1" et "FreeMC3. Des extraits non contaminés ont été préparés à partir de poissons non contaminés et en utilisant les deux protocoles retenus. Ces extraits ont été dopés avec de la MC-RR et de la MC-LR pour atteindre des concentrations finales de 15, 30, 60, 150 et 300 µg/kg (n=3). Une gamme étalon en solvant (MeOH) a été réalisée en utilisant les mêmes concentrations de toxines que pour les gammes matrice et les deux types de gammes ont été analysés par LC-MS/MS. La différence d'intensité entre les gammes des deux protocoles d'extraction utilisés sur les deux matrices a ensuite été comparée à l'intensité de la gamme dans le solvant pour déterminer s'il y a un effet matrice ou non. Sur la base de ces résultats, l'effet matrice induit par les matrices de filet de truite et de saumon lors de l'utilisation de l'un des protocoles "FreeMC" a été calculé. Il a été observé que pour la MC-RR, il n'y a eu que des augmentations du signal sauf pour le protocole "FreeMC1" sur la matrice truite, alors que pour la MC-LR, il y a eu à la fois une diminution du signal pour le protocole "FreeMC1" et une augmentation du signal pour le protocole "FreeMC3". En outre, un examen plus approfondi de l'effet matrice par protocole révèle que pour le protocole "FreeMC1", il y a à la fois des cas de diminution du signal et des cas d'augmentation du signal, alors que pour le protocole "FreeMC3", il n'y a que des cas d'augmentation du signal. Ainsi, le protocole "FreeMC3" a été retenu, combinant les meilleurs rendements et la faible variabilité des résultats, des effets matrices de type augmentation du signal uniquement quelle que soit la matrice de poisson ou le variant de MC testé, et une facilité d'exécution en laboratoire puisque le protocole "FreeMC3" ne nécessite pas d'étape de purification.

Après des tests de comparaison de taux de récupération et d'effet matrice, la méthode "FreeMC3" a été sélectionnée. Une validation selon l'approche par critères de la norme NF V03-110 a été réalisée, chaque série a été réalisée sur trois espèces de poissons différentes (truite, saumon et carpe) afin d'inclure de la variabilité. Chaque série a été réalisée sur trois niveaux de concentration de MC-LR (1,5 ; 15 et 500 µg/kg) et MC-RR (7,5 ; 75 et 500 µg/kg) et en duplicat. Les taux de récupération obtenus se situent entre 91 et 100 % pour le MC-RR et entre 94 et 106 %. La répétabilité des données a été estimée entre 5 et 10 % pour le MC-RR et entre 4 et 7 % pour le MC-LR, et la fidélité entre 10 et 15 % pour le MC-RR et entre 11 et 18 % pour le MC-LR.

L'article non soumis ci-dessous détaille le travail réalisé pour la comparaison et la validation de trois protocoles d'extractions des MC libres. Les données de cet chapitre ont notamment fait l'objet d'un poster présenté dans le cadre du workshop "Blue-green and benthic: a workshop on monitoring, mitigation and management of cyanobacteria in Atlantic Canada", le 2 juin 2022 à Halifax au Canada. Les données de ce chapitre ont été présentées sous le format publication par souci d'homogénéité du manuscrit.

2. Comparison and validation of extraction protocols for the analysis of free microcystins in fish matrices by LC-MS/MS

Pierre Bouteiller [1,2], Ronel Biré [2], Thierry Guérin [3], Emilie Lance [1,4,*]

1 Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO, Unité Stress Environnementaux et BIOsurveillance des Milieux Aquatiques (SEBIO), BP 1039 F, 51687, Reims, Cedex, France
2 ANSES, Laboratory for Food Safety, F-94701 Maisons-Alfort, France; ronel.bire@anses.fr
3 ANSES, Strategy and Programs Department, F-94701 Maisons-Alfort, France; thierry.guerin@anses.fr
4 UMR MNHN/CNRS MCAM, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75005 Paris, France
* Correspondence: emilie.lance@univ-reims.fr

2.1. Abstract

Microcystins (MCs) are cyclic heptapeptidic toxins produced by many cyanobacteria. They can be accumulated in various matrices in two fractions: a free cellular and a covalently protein-bound. To detect and quantify the concentration of MCs on various matrices (water, sediments, and animal tissues), a panel of techniques is available. Numerous extraction and analysis protocols for free MCs have been described in the literature, including for fish matrices. Three different protocols (here referred to as "FreeMC1", "FreeMC2" and "FreeMC3") from the literature were selected as they included extraction steps involving different mixtures of organic solvents as well as different sample preparation strategies (solid-phase extraction (SPE); liquid-liquid extraction (LLE); no purification). These three protocols were assessed on fresh fish fillets (trout and salmon) spiked with two MCs variants (MC-RR and MC-LR) at two concentration levels (30 and 100 µg/kg), after liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry analysis. The protocol "FreeMC3" gave the highest toxin recoveries (87% to 127%), comparable matrix effects for both fishes (+23% on average) as well as a rapid and easy execution process. This protocol was then successfully validated according to the criteria approach inspired from the NF V03-110 standard on three fish species (trout, salmon and carp).

KEYWORDS: Microcystin; extraction; analysis; LC-MS/MS; validation; fish matrices

2.2. Introduction

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms that appeared on Earth 3.5 billion years ago and can be observed in various freshwater, brackish and marine ecosystems [1]. In freshwater ecosystems, cyanobacteria have significant proliferative capacities [2] favored by different natural factors (*e.g.* temperature above 25°C, alkaline pH) [3, 4] but also anthropogenic factors (*e.g.* high nitrate and phosphorus inputs) [5]. Secondary metabolites can be produced by the cyanobacteria during a bloom including toxins, such as the neurotoxins anatoxins and the hepatotoxins microcystins. The hepatotoxin microcystins (MCs) are the most studied and the most commonly found cyanotoxins in blooms [2]. These are monocyclic heptapeptides containing two characteristics amino acids (AA) called the Adda (3-amino-9-methyoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadienoic acid) and Mdha (N-methyl-dehydroalanine) groups and two amino acids that are variable and define the identity of the MC

variant. MC-LR, for example, is a very common variant of MC, where L stands for AA leucine and R for AA arginine [6]. To date, up to 279 MCs congeners have been described [7]. MCs are mainly intracellular (in the cyanobacteria cells) during the proliferation and are release in the medium becoming extracellular (dissolved in water or adsorbed on particles) after cyanobacterial cell death occurring when bloom collapse.

After ingestion of cyanobacterial cells or ingestion/filtration of contaminated water, MCs can be accumulated in various organisms such as zooplankton, zoobenthos, or fish, with a possible transfer between trophic levels [8-11]. MCs can be accumulated in two forms in organisms: a free, available cellular fraction and a form covalently bound to proteins, in particular to the serine/threonine residues of enzyme protein phosphatases 1 (PP1) and 2A (PP2A) [12].

The analysis of MCs can concern the free fraction or the total (free plus covalently bound) fraction. Analysis of free forms of MCs are the most widespread and the simplest to perform [reviewed in 13]. They generally consist in an extraction step with different mixtures of organic solvents (methanol, acetonitrile, butanol …) pure or diluted according to protocols (**Table 5**). These extraction steps are sometimes followed by an enrichment step. Three main methods are described in the literature: liquid-liquid extraction (LLE) ([14], solid-phase-extraction (SPE) ([15-17] or the use of immunoaffinity columns IAC ([18-21]. Extracts obtained from extraction and enrichment steps can be analyzed by various methods including immunological, chemical or biological methods. The ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) test is the most common immunological method [22, 23], although other approaches exist, such as biosensors [reviewed in 6]. Chemical approaches are also widely used with equipment including high pressure liquid chromatography (HPLC) used in parallel with a diode array detector (HPLC-DAD, [24-26]) or capillary electrophoresis [27-31]. However, the most used and sensitive chemical method remains liquid (LC-MS) or gas (GC-MS) chromatography coupled with mass spectrometry [16, 32]. The biological approach including bioassays on rodents [33], plants and algae [34-36], invertebrates [37, 38], fish and amphibians [39] or *in vitro* assays [40] seems to be less and less used, for ethical and practical reasons notably. Protein phosphatase inhibition assay (PPIA) which measures the inhibitory effect of MCs on the activity of PP is still quite widespread and can be very useful for screening MCs [41], particularly when coupled with a chemical method such as LC-MS.

Here, the objective was to optimize a method including an extraction of free MCs in fresh fish fillets and an LC-MS/MS analysis. For this purpose, three free MC extraction methods (here referred to as “freeMC1” [42], “freeMC2” [16] and “freeMC3” [43] were selected in the literature and assessed on fresh fish matrices on two MC variants (MC-LR & MC-RR). This comparison was made in terms of extraction yields and matrix effects. The most efficient method was then selected and validated by criteria approach according to NF V03-110 [44] on fresh fish fillets from three fish species (salmon, trout and carp).

Table 5: Some examples of extraction/purification and analysis protocols for MCs according to the investigated matrix.

References	Extraction / Pre-concentration step (water samples)	Enrichment step (SPE / **IAC** / *LLE*)	Analysis	Matrices *(Species)*
[45]	Methanol (100%)	/	PPIA	Mussel (*Mytilus edulis)*
[46]		/		Salmon *(Salmo salar)*
[46]		/		Crab *(Cancer magister)*
[47]		/	ELISA & LC-MS/MS	Gasteropod *(Lymnaea Stagnalis)*
[9]			ELISA	
[24]		Isolute C18 1g (Int. Sorbent Technology)	HPLC-PDA	Raw and treated reservoir water
[48]		C18 cartridges Bakerbond 500 mg (J.T. Baker®) + **anti-microcystin-LR antibodies bonded onto glutardialdehyde-activated silica particles of 27.5nm pore size (Mallinckrodt Baker)**	ELISA, PPIA, LC-MS	Surface water
[49]		*Hexane* + C18 reverse phase silica (Bound-Elut)	ELISA	Fish *(Tilapia rendalli)*
[50]				Fish and crustaceans
[51]		*Hexane*	LC-MS/MS	Fishes : *(Perca fluviatilis ; Sander lucioperca ; Aspius aspius ; Esox Lucius ; Cyprinus carpio ; Ctenopharyngodon idella ; Anguilla anguilla)*

References	Extraction / Pre-concentration step (water samples)	Enrichment step (SPE / **IAC** / *LLE*)	Analysis	Matrices *(Species)*
[52]			*ELISA*	*Cyprinus carpio ; Hypophthalmichthys molitrix*
[53]			LC-MS/MS	Carp *(Cyprinus carpio)*
[54]		*n-hexane* + Oasis HLB 200 mg (Waters)	UPLC- ESI-MS/MS	Mice (Liver and blood)
[55]	Methanol:acetic acid aqueous (95:5)	ODS / silica gel column	HPLC-UV, PPIA, Mouse bioassay	Algal dietary supplements (Chlorella or Spirulina)
[56]	Methanol:acetic acid:TFA (trifluoroacetic acid) (94,8:5:0,2)	ODS cartridge Supelclean LC18 (Supelco)	ELISA & HPLC-DAD	Sediments samples
[57]	Methanol:water (90:10) + 0.1% formic acid (FA)	Sep-Pak C18 Plus Light SPE (Waters)	(UHPLC-QqQ-MS/MS	Mouse (urine)
				Mouse (plasma)
				Human blood samples
[58]		Au-PPy nanocomposite-coated silica sorbent	LC-MS/MS	HPLC-grade, lake, and tap water
[59]	Methanol:water (85:15)	Oasis HLB (Waters)		Grass carp, black carp, bighead carp and fresh water shrimp
[60, 61]	Methanol:water (80:20)	/	ELISA	Mussel (*Anodonta anatina)*
		/		Mussel (*Dreissena polymorpha)*

References	Extraction / Pre-concentration step (water samples)	Enrichment step (SPE / **IAC** / *LLE*)	Analysis	Matrices *(Species)*
[62]		Oasis MCX (Waters)	LC-MS/MS	Carp *(Aristichthys mobilis)* (bile/serum)
[63]		Assembly C18 Bakerbond 500 mg (Dicsa) and BOND ELUT® Carbon cartridge (Agilent)	UPLC-MS/MS	Lettuce
[64]		Oasis HLB 200 mg (Waters)	ELISA	Human blood
[65]	Methanol:water (80:20) + 0.1% TFA for lettuce, cabbage, carrot, turnip, eggplant Methanol:water (80:20) + 1% TFA for MC-LR in potato and choi sum, MC-RR in cucumber and pumpkin, and MC-YR in water spinach and cabbage	Oasis HLB (Waters) for cucumber and eggplant Sep-pak C18 (Waters) for lettuce, water spinach, cabbage, choi sum, carrot, turnip, potato, pumpkin	LC-MS/MS	Lettuce, water spinach, cabbage, choi sum, carrot, turnip, potato, pumpkin, cucumber, and eggplant
[66]	Methanol:water (75:25) + 0.1 M acetic acid	Oasis HLB 200 mg (Waters) or STRATA-X (Phenomenex)	ELISA	Dog *(Canines)*
[67]		SPE STRATA-X (Phenomenex)		Duck (*Anas platyrhynchos)*
[68]			LC-MS/MS	Periphyton
[68]				Smallmouth bass *(Micropterus dolomieu)*
[69]			ELISA & LC-MS/MS	Dolphin *(Tursiops truncatus)*

References	Extraction / Pre-concentration step (water samples)	Enrichment step (SPE / **IAC** / *LLE*)	Analysis	Matrices *(Species)*
[70]	Methanol: water (75:25)	**2 mg of antibodies (IgG) immobilized on a Sepharose-based immunoaffinity cartridge**	LC-MS/MS	Blue-green algae
[71]		RIDA C18 (Biopharm) + **MAb against MC-LR immobilized on CNBr-activated Sepharose 4B**	LC-MS	Water chestnut
[20]		**100-200 mg of anti-microcystin LR polyclonal antibodies immobilized on Sepharose CL-4B or activated silica gel supports**	LC-UV	Algae
				Salmon, rainbow trout and pickerel
[72]		**Microcystin ImmunoSepTM, (ImmunoKem)**	HPCE & HPLC-DAD	Water samples
		C18 cartridges Bakerbond 500 mg (J.T. Baker®)		
[17]	Methanol:water:butanol (75:20:5)	Oasis HLB (Waters)	UPLC–MS/MS	Walleye *(Sander vitreus)*
[15]	Water:methanol:butanol (75:20:5)	SPE Oasis HLB 30 mg (Waters)	LC-MS/MS	Gasteropod *(Lymnaea stagnalis)*
[16]		SPE STRATA-X (Phenomenex)		Rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*
[42]	Acetonitrile: water (75:25)	*Liquid liquid partition with hexane*	LC-MS/MS	Catfish, swai and basa
[17]	Methanol:water 50:50	Oasis HLB (Waters)	UPLC–MS/MS	Lettuce

References	Extraction / Pre-concentration step (water samples)	Enrichment step (SPE / **IAC** / *LLE*)	Analysis	Matrices *(Species)*
[14]	Isolute C18 3 ml (Biotage)	*Hexane, then ethanol (10%)*	ELISA & PPIA	Water bird *(Podiceps nigricollis)*
[73,74]	Centrifugation, acetone	Nitrogen gas evaporation, reconstitution in water	ELISA & LC-MS/MS	Human blood
[75]	Ethylene-diaminetetraacetic acid-Sodium pyrophosphate (EDTA-$Na_4P_2O_7$, 0.1 M)	Oasis HLB (Waters)	ELISA	Water treatment residuals
[17]	Ethylene-diaminetetraacetic acid-Sodium pyrophosphate (EDTA-$Na_4P_2O_7$, 0.1 M)	Oasis HLB (Waters)	UPLC–MS/MS	Soil
[76]	Oasis HLB 60 mg (Waters)	**Anti-microcystin LR polyclonal antibodies on Sepharose-based column**	HPLC-PDA	Surface water
[18]	Sep-Pak PS-2 500 mg (Millipore) Excelpak SPE-GLF 500 mg (Yokagawa Analytical Systems Co.)	**0.5 mL of immunoaffinity gel (coupling of M8H5 MAb to Affi-Gel 10) transferred to Muromac disposable polypropylene column (Muromachi Kagaku Kogyo Kaisha Ltd)**	HPLC-UV	Lake water
[77]	Water Sep-Pak Plus C18 (Millipore)			Tap water
[19]	Sep-Pak PS2 cartridge	**Immonoaffinity gel (M8H5 anti-MC-LR Mab + formyl-cellulofine)**	HPLC-PDA	Lake water
[78]	KOH at 65°C for 48 h then HCl	/	PPIA	Salmon *(Salmo salar)*
[14]	Water-saturated phenol and chloroform	/	ELISA & PPIA	Phytoplankton
[73, 74]	Phosphate-buffered saline, and slow vortex	/	ELISA & LC-MS/MS	Air
[79]	1 mL of buffered saline	/	ELISA	Human nasal mucus

References	Extraction / Pre-concentration step (water samples)	Enrichment step (SPE / **IAC** / *LLE*)	Analysis	Matrices *(Species)*
[80]	Electrospun polystyrene (PS) nanofibers		HPLC-DAD	Tap and environmental water
[81]	Dual SPE (Oasis HLB, 200 mg (Waters) and HyperSep Hypercarb PGC, 200 mg, (Thermo Scientific))		LC-MS/MS	Water
[82]	Sep-Pak C18 Plus Light 130 mg (Waters)		HPLC-MS/MS	Tap and lake water
[20]	**100-200 mg of anti-microcystin LR polyclonal antibodies immobilized on Sepharose CL-4B or activated silica gel supports**		LC-UV	River and tap water
[21]	**Recombinant plant-derived anti MC-LR antibody immobilized on a sol-gel glass immunoaffinity extraction columns**		ELISA & LC-MS/MS	Surface-water from two lakes and one river
[70]	**2 mg of antibodies (IgG) immobilized on a Sepharose-based immunoaffinity cartridge**		LC-MS/MS	River and ground water

2.3. Experimental

2.3.1. Standards and reagents

MC standards: the same MC mix has been used all along the study, it contains MC-RR and MC-LR [4 µg/mL] in MeOH and has been prepared from individual MC-RR and MC-LR standards purchased from NRC-CNRC, Canada, both at 10 µg/mL.

Acid/base reagents: formic acid (FA), trifluoroacetic acid (TFA) and acetic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Oasis HLB 30 mg 6cc cartridges were purchased from Waters (Guyancourt, France).

Solvents: methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) were of LC-MS grade, hexane >95% was of HPLC grade and all three solvents were purchased from Thermo Fischer (Illkirch-Graffenstaden, France). 1-Butanol (BuOH) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Filter nylon 0.45 µm were purchased from Macherey-Magel (Hoerdt, France).

2.3.2. Comparison of three extraction protocols of free MCs

Of all the methods listed in **Table 5**, three were selected for comparison on matrices of fresh fish fillets. These methods are referred in this study as "FreeMC1" adapted from [42], "Free MC2" adapted from [16] and "Free MC3" adapted from [43]. These methods were chosen to have extraction methods using different solvent mixtures (ACN/H_2O/FA (75:24:1); H_2O/MeOH/BuOH (75:20:5) and MeOH) but also different sample preparation methods (LLE, SPE or no purification).

2.3.2.1. Comparison of the yields of three protocols of extraction of free MCs

Each of the three protocols were firstly compared on two fresh fish matrices: trout and salmon fillets (purchased from a local fishmonger). For that, two MC variants (MC-LR and MC-RR) were spiked on blank fish matrices at two concentration levels: 30 and 100 µg/kg with a contact time of 15 min before testing the protocols (**Figure 12**). For the protocol "FreeMC1", a test portion of 2.5 g of fish fillet was taken before extraction with 15 mL of a ACN/H2O/FA mixture (75:24:1). The mixture was then ground at 10,000 rpm for 60 s with a PT 3100D Polytron and vortexed for 15 min. The samples were then centrifuged at 15,000g for 10 min and filtered at 0.45 µm with nylon filter. A liquid-liquid partition was then performed on 2 mL extract with 2 mL ACN-saturated hexane prior to LC-MS/MS analysis (see 2.4). For the "FreeMC2" protocol, a test portion of 0.5 g of fish fillet was taken. Extraction was performed with 10 mL H_2O/MeOH/BuOH (75:20:5) and the mixture was ground at 10,000 rpm for 60 s with a PT 3100D Polytron, then vortexed for 15 min. Following this, the samples were centrifuged at 15,000 × g for 10 min then filtered at 0.45 µm with nylon filter before diluting the samples with 10 mL of H_2O. Enrichment for this protocol was carried out by SPE using Oasis HLB 30 mg 6cc cartridges. The cartridges were conditioned with 5 mL H_2O and 5 mL MeOH, then 20 mL of diluted extract was loaded. A wash step with 5 mL H_2O followed by 5 mL MeOH 20% was performed before eluting the extracts with 2 mL MeOH 90% containing

0.01% TFA. The eluates were then analyzed by LC-MS/MS. Finally, the "FreeMC3" protocol included a 2 g test portion of fish fillets extracted with 10 mL MeOH. The mixture was ground at 10,000 rpm for 60 s with a PT 3100D Polytron, then vortexed for 15 min before centrifuging the samples at 15,000 × g for 10 min. The supernatant was retained and the pellet was re-extracted with 10 mL MeOH and vortexed again for 15 min and centrifuged at 15,000 × g for 10 min. The two extracts were then pooled and filtered at 0.45 µm on nylon filters prior to LC-MS/MS analysis.

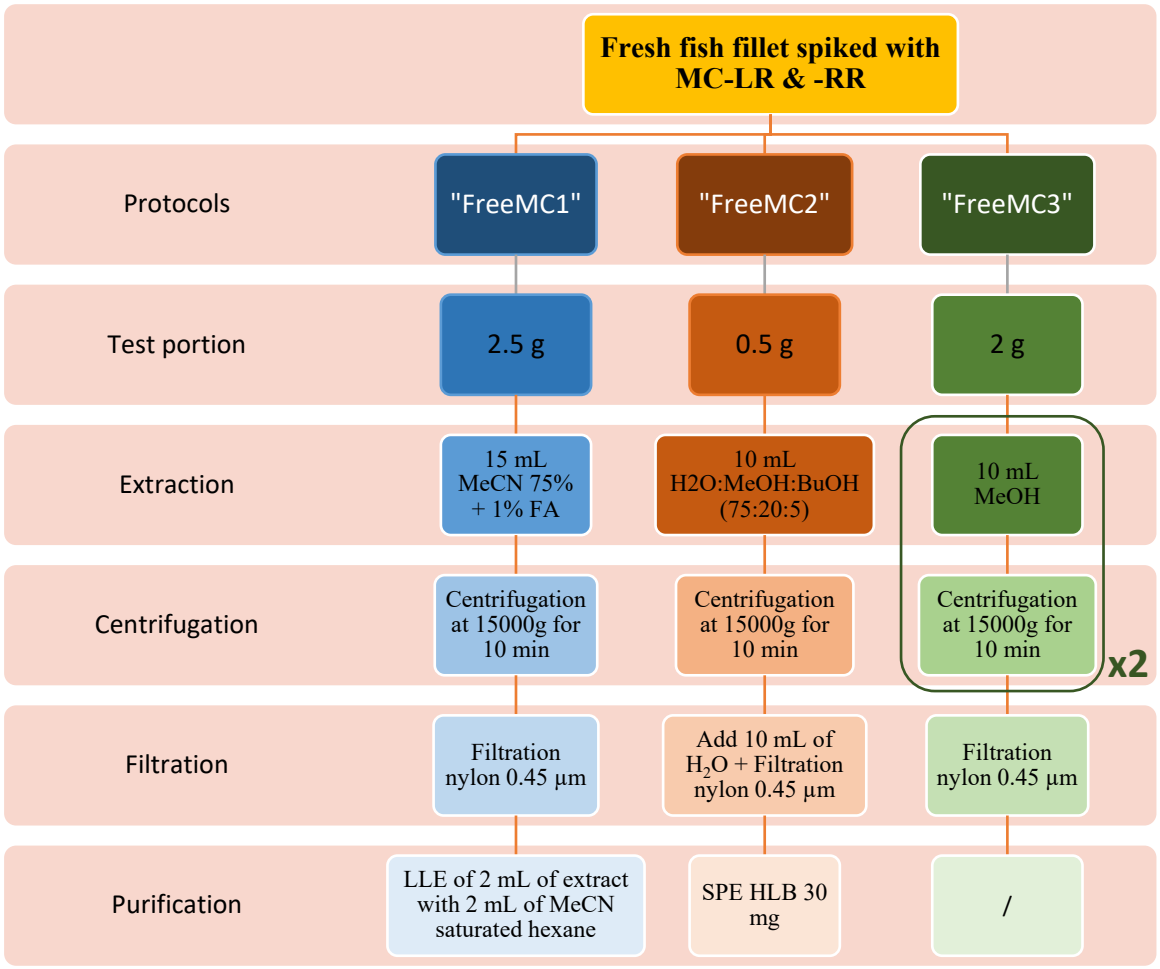


Figure 12 : Comparison of the step of three extraction protocols (here referred to as "FreeMC1" adapted from [42], "Free MC2" adapted from [16] and "Free MC3" adapted from [43] for the extraction of free MCs selected from the scientific literature and compared on fresh fish matrices spiked with MC-LR and -RR.

2.3.2.2. Comparison of the matrix effects tests

Following the tests to compare the yields of the three protocols, the "FreeMC2" protocol was discarded because of its lower yields (see section 3.1.), whatever the matrix, than the other two protocols.

To assess the matrix effects encountered with the other two protocols, "FreeMC1" and "FreeMC3", tests were carried out. Blank extracts were prepared from uncontaminated fish fillets using both protocols. The corresponding extracts were spiked with MC-RR and MC-LR

to achieve final toxin concentrations of 15, 30, 60, 150 and 300 ng/g (n=3). A calibration curve in solvent (MeOH) was performed using the same toxin concentrations as for the matrix-matched calibration curve. For each "toxin/matrix/protocol" combination, the slopes of the calibration curves (in MeOH or matrix-matched) were compared to identify any signal enhancement or suppression. Based on these results, the matrix effect induced by the trout and salmon fillet matrices during the utilization of one of the "FreeMC" protocols was calculated using the formula: matrix effects (%) = $\left(\frac{mB}{mA} - 1\right) \times 100$ where m_A= slope of the straight line for the solvent-based calibration curve and m_B = slope of the straight line for the matrix-matched calibration curve (**Figure 14**).

2.3.2.3. Validation of protocol "FreeMC3"

Following yield comparison and matrix effect tests, the "FreeMC3" method was selected and was validated according to the criteria approach of the NF V03-110 standard [44]; this involved different analytical series to account for the variability related to the three different fish species (trout, salmon and carp). Each series was performed on three concentration levels of MC-LR (1.5; 15 and 500 µg/kg) and MC-RR (7.5; 75 and 500 µg/kg) and in duplicate. Limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) were estimated using a linearity approach. 4 independent 7-point calibration curves were performed and LOD and LOQ were determined using the following formulas: $LOD = \frac{3 \times Sa}{b}$ and $LOQ = \frac{10 \times Sa}{b}$, where Sa is the standard deviation of the y-intercept and b the slope of the calibration line.

2.3.3. LC-MS/MS analysis

For the chromatographic separation, an UltiMate 3000 HPLC system (Thermo Fischer) was used. Mobile phases were 0.1% FA in H_2O (mobile phase A) and 0.1% in ACN (mobile phase B). A constant flow of 300 µL/min was used with an initial hold of 2 min with 20% of phase B. The proportion of phase B was then gradually increased to 50% at 6 min and to 70% at 8 min. After this, the proportion of mobile phase B was rapidly increased to 100% between 8 and 8.2 min. This composition was maintained until the 11_{th} min of run time before decreasing to 20% B between 11 and 11.2 min. Finally, 20% of B phase was kept until the end of the method at 16 min run time. The chromatographic column used was a Kinetex® 2.6 µm XB C18 100 Å (100 x 2.1 mm) by Phenomenex (Le Pecq, France) which was heated at +40°C during the LC run. The injection volume was 2 µL.

A triple quadrupole (4000 QTRAP, AB Sciex, Villebon-sur-Yvette, France) was used for the detection of analytes. Preliminary experiments have been realized to optimize MS/MS parameters. The transitions monitored in multiple reaction monitoring (MRM) mode were 519.9 →103.1 (with a collision energy (CE) of 45 V, and a collision cell exit potential (CXP) of 9 V) and 519.9 →135.1 (CE = 45 V; CXP = 13 V) for the MC-RR. The dwell time for these transitions was 150 ms, the declustering potential (DP) was 120 volts. The transitions monitored for MC-LR were 995.50 →135.1 (CE = 108 V; CXP = 7 V) and 995.5 →213.1 (CE = 86 V; CXP = 13 V). The dwell time for these transitions was 150 ms, the DP was 210 volts. The

source temperature was set at 500 °C with IonSpray Voltage of 5000 V. GS1/GS2 were set at 40/60 psi, curtain gas at 25 psi and CAD to “High”.

2.4. Results & discussion

2.4.1. Comparison of the extraction protocol based on yields

A comparison of the yields obtained was carried out on the three extraction protocols for free MCs on salmon and trout fillets spiked with two concentrations of MC-RR and two concentrations of MC-LR (n=6). The results of these first tests show yields obtained on MC-RR of 67 ± 7% (trout) and 92 ± 22% (salmon) for "FreeMC1", 46 ± 21% (trout) and 51 ± 4% (salmon) for the "FreeMC2" protocol and 96 ± 15% (trout) and 110 ± 7% (salmon) for the "Free MC3" protocol (**Figure 13 -** A). For MC-LR, the test results obtained were of 59 ± 11% (trout) and 63 ± 8% (salmon) for "FreeMC1", 40 ± 31% (trout) and 41 ± 2% (salmon) for the "FreeMC2" protocol and 125 ± 9% (trout) and 113 ± 3% (salmon) for "FreeMC3" (**Figure 13 -** B).

In the case of MC-RR, the method with the best yields is "FreeMC3", followed by "FreeMC1", on which more variability is observed, while "FreeMC2" returns the lowest yields. The same tendency has been observed for MC-LR, with yields > 100% for FreeMC3, probably reflecting an enhancement signal due to the matrix. When the two matrices are compared, little difference in yield is observed between "FreeMC3" and "FreeMC2", whatever the MC-RR or -LR variant. However, yields are systematically lower for the trout matrix than for the salmon matrix for the "FreeMC1" protocol in the case of MC-RR-spiked samples (**Figure 13 -** A).

If we compare these results as a function of spiking concentration (**Figure 13** - C & D), for MC-RR we see yields of 73 ± 4% (30 ng/g) and 86 ± 26% (100 ng/g) for the "FreeMC1" protocol, 37 ± 2% (30 ng/g) and 60 ± 23% (100 ng/g) for the "FreeMC2" protocol, and 94 ± 6% (30 ng/g) and 112 ±16% (100 ng/g) for the "FreeMC3" protocol (**Figure 13** - C). For the other studied variant, MC-LR, the results of this comparison as a function of spiking concentration were: 62 ± 5% (30 ng/g) and 61% ± 15% (100 ng/g) for the "FreeMC1" protocol, 27 ± 2% (30 ng/g) and 55 ± 31% (100 ng/g) for the "FreeMC2" protocol, and 119 ± 2% (30 ng/g) and 120 ± 5% (100 ng/g) for the "FreeMC3" protocol (**Figure 13** - D).

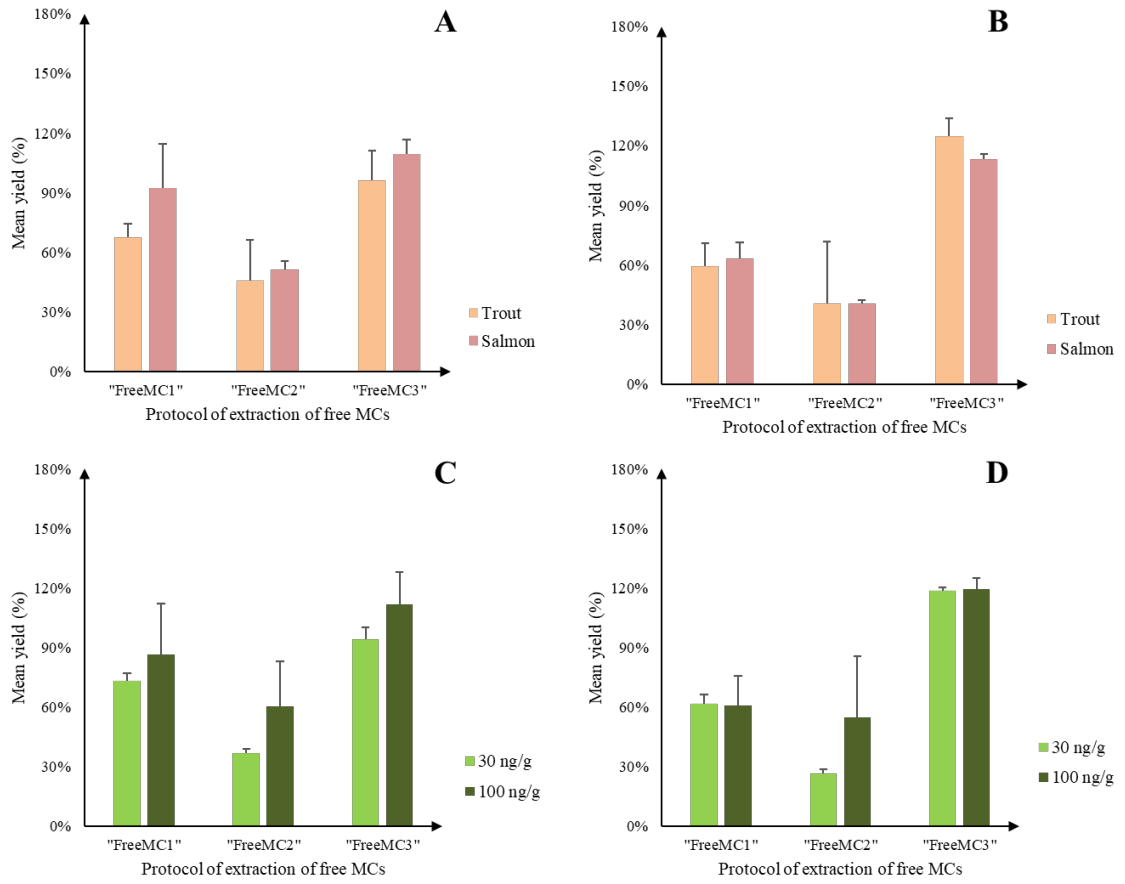


Figure 13: Recovery test results for the three free MCs extraction protocols. Average recovery yield of salmon or trout fillet samples spiked at 30 and 100 ng/g (n=6) with A) MC-RR and B) MC-LR, as a function of extraction protocol and matrix. Average recovery yield of salmon or trout fillet samples (n=6) spiked with C) MC-RR and D) MC-LR, as a function of extraction protocol and spiking concentration.

More variability was observed, regardless of protocol or extracted MCs variant, on samples at the highest concentration of 100 ng/g than on those at the lowest concentration. The "FreeMC1" and "FreeMC3" protocols have very similar recovery efficiencies between the two concentrations for MC-LR and much more between-concentration variability for MC-RR tests. The "FreeMC2" protocol showed the highest variability between results obtained at 30 ng/g and those obtained at 100 ng/g, whatever the MCs variant studied.

A previous study applied the same "FreeMC1" protocol to catfish fillet samples spiked with 8 MCs variants including MC-RR and -LR. Extraction yields of 130% and 107% were obtained, on MC-RR and -LR, respectively [42]. These yields are higher than those obtained in our study on spiked salmon samples (92% for MC-RR and 63% for MC-LR). These differences could be explained by the choice of mode during LC-MS/MS analysis, negative mode in [42] and positive mode in this study.

Another study applied the "FreeMC2 " protocol to trout fillets spiked with MC-LR and achieved extraction yields of 80% [16]. Here, the same method applied to trout samples spiked with MC-LR gave extraction yields of 45%. These differences in results could be explained by

the condition of the matrix: freeze-dried in [16] and fresh in our case, which may influence the matrix effects encountered during LC-MS/MS analysis.

In this study, the best yields were obtained using the "FreeMC3" protocol, whether for MC-RR or -LR and regardless of the matrix (trout or salmon). Conversely, the "FreeMC2" protocol showed both the lowest yields and the highest variability when comparing matrices or concentrations. This protocol was therefore discarded for the following steps, and the two remaining protocols "FreeMC1" and "FreeMC3" were compared on the basis of the matrix effects encountered during their application.

2.4.2. Comparison of the matrix effects observed with FreeMC1 and FreeMC3 protocols for trout and salmon

The signal intensity produced by a range of concentrations of MC-RR and -LR spiked after extraction using the "FreeMC1" and "FreeMC3" protocols on the two fish fillet matrices (trout and salmon) were compared with a range of the same concentrations prepared in solvent (**Figure 14**). For MC-RR, the use of the "Free MC1" protocol on the trout matrix led to an 19% signal suppression and conversely a 21% signal enhancement on the salmon matrix compared to solvent (**Figure 14** - A). The same toxin spiked onto extracts from the "Free MC3" protocol resulted in signal enhancement of 31 and 34% for salmon and trout matrices, respectively (**Figure 14** - C). For MC-LR, the "FreeMC1" protocol produced signal suppressions of the order of 12% and 30% for salmon and trout respectively (**Figure 14** - B). Conversely, for the same toxin, the "FreeMC3" protocol showed signal enhancement of 16 and 31%, for trout and salmon respectively (**Figure 14** - D).

For MC-RR, only signal enhancement was observed except for the "FreeMC1" protocol on trout, whereas for MC-LR, both signal suppression for the "FreeMC1" protocol and signal enhancement for the "FreeMC3" protocol were noticed. Furthermore, a closer look at the matrix effect by protocol reveals that for the "FreeMC1" protocol, both signal suppression (MC-RR/trout; MC-LR/trout&salmon) and enhancement (MC-RR/salmon) were observed, whereas for "FreeMC3", there was only signal enhancement.

A previous studies involving the "FreeMC1" protocol, applied to 8 MCs variants including MC-RR and -LR spiked into catfish fillets, have assessed matrix effects at -5% and 2%, on MC-RR and -LR, respectively [42]. In our study, application of the "FreeMC1" protocol to salmon samples resulted in matrix effects of +21% for MC-RR and -12% for MC-LR in salmon fillets and of -19% and -30% for trout fillets spiked with MC-RR and -LR, respectively. The differences between our study and the original study [42] in terms of matrix effect can be explained by the difference between the matrices tested (catfish in [42] and salmon or trout in our study), but also by differences in the LC-MS/MS analysis carried out, and in particular the choice of mode (negative mode in [42], positive mode in our study).

Thus, the "FreeMC3" protocol was chosen, combining the best yields and low variability in previous tests (3.1), signal enhancement-only matrix effects whatever the fish matrix or MC variant tested, and ease of laboratory execution since the "FreeMC3" protocol

does not require an enrichment step. This chosen protocol was subsequently validated in accordance with the NF V03-110 standard [44].

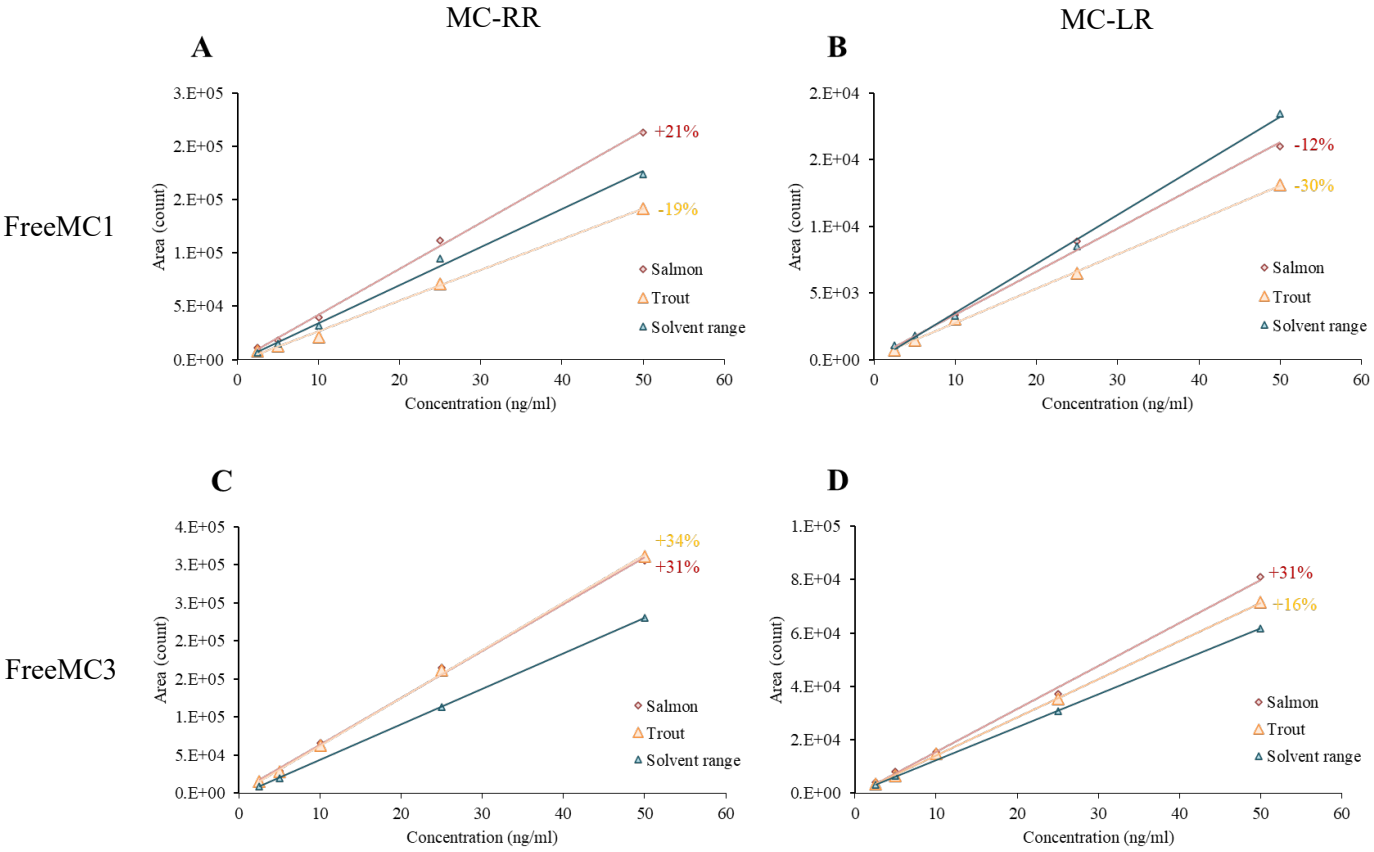


Figure 14: Matrix effect induced by salmon and trout matrices when using A) the "FreeMC1" protocol to extract MC-RR (n=3), B) the "FreeMC1" protocol to extract MC-LR (n=3). C) the "FreeMC3" protocol to extract MC-RR (n=3), and D) the "FreeMC3" protocol to extract MC-LR (n=3).

2.4.3. Validation of the protocol “FreeMC3”

The "FreeMC3" protocol chosen in the previous tests (2.4.1 & 2.4.2) was subsequently validated using the criteria approach of the NF V03-110 standard [44]. Each series was performed on three different fish species (trout, salmon and carp) to introduce matrix variability at three concentration levels of MC-LR (7.5, 75 and 500 µg/kg) and MC-RR (1.5, 15 and 500 µg/kg) and in duplicate (

Table 6). Accuracy values obtained were between 91 and 100% for MC-LR and between 94 and 106% for MC-RR. Data repeatability ranged from 5 to 10% for MC-LR and from 4 to 7% for MC-RR, and precision was comprised between 10 and 15% for MC-LR and between 11 and 18% for MC-RR. The LOD and LOQ for MC-LR were estimated at 1.4 and 4.7 µg/kg, respectively, and for MC-RR at 0.2 and 0.5 µg/kg, respectively.

Table 6 : Results of the validation performed using the criteria approach of the NF V03-110 standard [44].

Each series was performed on three different fish species (trout, salmon and carp) to introduce matrix variability. Each series was performed on three concentration levels of MC-LR and MC-RR and in duplicate.

	MC-LR			MC-RR		
Concentration level (µg/kg)	7.5	75	500	1.5	15	500
Recovery (%)	91	93	100	94	95	106
RSD% repeatability	6	5	10	7	4	7
RSD% fidelity	11	15	10	11	18	15
LOD/ LOQ (µg/kg)	1.4 / 4.7			0.2 / 0.5		

2.5. Conclusion

Of all the analytical methods applied to free MCs, three extraction protocols "FreeMC1", "FreeMC2" and "FreeMC3" were compared. These methods were chosen to compare methods using different solvent mixtures (ACN/H_2O/FA (75:24:1); H_2O/MeOH/BuOH (75:20:5) and MeOH) but also different enrichment methods (LLE, SPE or no purification).

A comparison of the recovery yields of the methods was carried out and showed lower yields for the "FreeMC2" for the recovery of MC-RR and -LR from trout and salmon. Better results were obtained by the other two protocols, and particularly by the "FreeMC3" protocol, which achieved the best results with MC-RR recovery yields of 96 and 110% for trout and salmon, respectively. This protocol also achieved the best MC-LR recovery efficiencies, with values of 125 and 113% for trout and salmon respectively. In view of the results, the "FreeMC2" protocol was excluded from the study and the other two protocols were compared on the basis of estimated matrix effects. The "FreeMC3" protocol showed matrix effects of the same order (from 16 to 34%) whatever the MC variant (MC-RR or -LR) or matrix (trout or salmon), whereas the "FreeMC1" protocol had more variable matrix effects (positive and negative depending on the variant or matrix). In view of these tests, the "FreeMC3" protocol was selected and successfully validated on fresh fish matrices by criteria approach in accordance with the NF V03-110 standard.

As free MCs are only a part of the MCs accumulated in organisms, along with MCs bound to protein (phosphatases for example), it would be relevant to develop extraction and analysis methods that would then make it possible to analyze the total toxins in a sample. Furthermore, by working successively with a free MCs and total MCs analysis method, it would be possible to gain a better understanding of the distribution of free/bound forms of MCs in organisms, particularly aquatic organisms.

2.6. Acknowledgements

The author would like to thank the University of Reims Champagne Ardennes and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) for co-funding this study. The author would like to thank colleagues from the PBM unit at ANSES Maisons-Alfort for their help with the experiments carried out in this study.

2.7. References

1. Schopf, J.W., The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage., in The Ecology of Cyanobacteria, Springer, Editor. 2000: Dordrecht.

2. Chorus, I. and M. Welker, Cyanobacterial toxins, in Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. 2021: London. p. 150.

3. Paerl, H.W., et al., Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. ScientificWorldJournal, 2001. 1: p. 76-113.

4. Mohamed, Z., et al., Detection of free and bound microcystins in tilapia fish from Egyptian fishpond farms and its related public health risk assessment. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 2019. 15(1): p. 37-47.

5. Smith, V.H., Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. Environ Sci Pollut Res Int, 2003. 10(2): p. 126-39.

6. Singh, S., et al., Recent trends in development of biosensors for detection of microcystin. Toxicon, 2012. 60(5): p. 878-94.

7. Bouaïcha, N., et al., Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. Toxins, 2019. 11(12): p. 714.

8. Zhang, D., et al., Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. Sci Total Environ, 2009. 407(7): p. 2191-9.

9. Lance, E., et al., Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to Physa (= Physella) acuta. Sci Total Environ, 2010. 408(17): p. 3560-8.

10. Lance, E., et al., Evidence of trophic transfer of microcystins from the gastropod Lymnaea stagnalis to the fish Gasterosteus aculeatus. Harmful Algae, 2014. 31: p. 9-17.

11. Rezaitabar, S., et al., Transfer, tissue distribution and bioaccumulation of microcystin LR in the phytoplanktivorous and carnivorous fish in Anzali wetland, with potential health risks to humans. Sci Total Environ, 2017. 575: p. 1130-1138.

12. Kondo, F., et al., Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. Chem Res Toxicol, 1992. 5(5): p. 591-6.

13. Massey, I.Y., et al., A Mini-Review on Detection Methods of Microcystins. Toxins (Basel), 2020. 12(10): p. 641.

14. Carmichael, W.W. and R. Li, Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. Saline Syst, 2006. 2(1): p. 5.

15. Lance, E., et al., Accumulation of free and covalently bound microcystins in tissues of Lymnaea stagnalis (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure. Environ Pollut, 2010. 158(3): p. 674-80.

16. Cadel-Six, S., et al., Detection of free and covalently bound microcystins in different tissues (liver, intestines, gills, and muscles) of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: method characterization. Environ Pollut, 2014. 185: p. 333-9.

17. Manubolu, M., et al., Optimization of extraction methods for quantification of microcystin-LR and microcystin-RR in fish, vegetable, and soil matrices using UPLC-MS/MS. Harmful Algae, 2018. 76: p. 47-57.

18. Kondo, F., et al., Immunoaffinity purification method for detection and quantification of microcystins in lake water. Toxicon, 2000. 38(6): p. 813-23.

19. Kondo, F., et al., Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. Toxicon, 2002. 40(7): p. 893-9.

20. Lawrence, J.F. and C. Menard, Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. J Chromatogr A, 2001. 922(1-2): p. 111-7.

21. Neumann, A.C., et al., Microcystin-LR Enrichment from Freshwater by a Recombinant Plant-derived Antibody Using Sol-Gel-Glass Immunoextraction. Anal Sci, 2019. 35(2): p. 207-214.

22. Lawton, L.A., et al., Rapid detection of microcystins in cells and water. Toxicon, 2010. 55(5): p. 973-8.

23. Ai, Y., S. Lee, and J. Lee, Drinking water treatment residuals from cyanobacteria bloom-affected areas: Investigation of potential impact on agricultural land application. Science of The Total Environment, 2020. 706.

24. Lawton, L.A., C. Edwards, and G.A. Codd, Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. Analyst, 1994. 119(7): p. 1525-30.

25. ISO, Water quality - Determination of microcystins - Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. 2005.

26. Meriluoto, J., L. Spoof, and G.A. Codd, Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. 1 ed. 2017: John Wiley & Sons.

27. Bateman, K.P., et al., Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. J Chromatogr A, 1995. 712(1): p. 253-68.

28. Li, P.C.H., S. Hu, and P.K.S. Lam, Development of a Capillary Zone Electrophoretic Method for the Rapid Separation and Detection of Hepatotoxic Microcystins. Marine Pollution Bulletin, 1999. 39(1-12): p. 250-254.

29. Vasas, G., et al., Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. Electrophoresis, 2004. 25(1): p. 108-15.

30. Vasas, G., et al., Determination of microcystins in environmental samples using capillary electrophoresis. J Biochem Biophys Methods, 2006. 66(1-3): p. 87-97.

31. Birungi, G. and S.F. Li, Determination of cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins in drinking water using CE. Electrophoresis, 2009. 30(15): p. 2737-42.

32. Neffling, M.R., E. Lance, and J. Meriluoto, Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Environ Pollut, 2010. 158(3): p. 948-52.

33. Falconer, I.R., et al., Oral toxicity of a bloom of the Cyanobacterium microcystis Aeruginosa administered to mice over periods up to 1 year. J Toxicol Environ Health, 1988. 24(3): p. 291-305.

34. Babica, P., L. Blaha, and B. Marsalek, Exploring the Natural Role of Microcystins-a Review of Effects on Photoautotrophic Organisms1. Journal of Phycology, 2006. 42(1): p. 9-20.

35. Vasas, G., et al., Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from Aphanizomenon ovalisporum, by plant test (blue-green Sinapis test). Anal Biochem, 2002. 302(1): p. 95-103.

36. Perron, M.C., et al., Use of chlorophyll a fluorescence to detect the effect of microcystins on photosynthesis and photosystem II energy fluxes of green algae. Toxicon, 2012. 59(5): p. 567-77.

37. Metcalf, J.S., et al., Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp Artemia salina: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. Toxicon, 2002. 40(8): p. 1115-120.

38. Torokne, A., R. Vasdinnyei, and B.M. Asztalos, A rapid microbiotest for the detection of cyanobacterial toxins. Environ Toxicol, 2007. 22(1): p. 64-8.

39. Buryskova, B., et al., Toxicity of complex cyanobacterial samples and their fractions in Xenopus laevis embryos and the role of microcystins. Aquat Toxicol, 2006. 80(4): p. 346-54.

40. Campbell, D.L., et al., Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria. Environmental Toxicology & Water Quality, 1994. 9(1): p. 71-77.

41. Moore, C.E., et al., Comparison of Protein Phosphatase Inhibition Assay with LC-MS/MS for Diagnosis of Microcystin Toxicosis in Veterinary Cases. Mar Drugs, 2016. 14(3): p. 54.

42. Geis-Asteggiante, L., et al., Development and validation of a rapid method for microcystins in fish and comparing LC-MS/MS results with ELISA. Anal Bioanal Chem, 2011. 401(8): p. 2617-30.

43. Derrien, A., et al., From development to implementation of a new LC-MS/MS approach to quantify 43 lipophilic toxins within the French monitoring program, in International Conference on Harmful Algae. 2018: Nantes, France.

44. AFNOR, NF V03-110 - Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude. 2010.

45. Williams, D.E., et al., Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, Mytilus edulis, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. Toxicon, 1997. 35(11): p. 1617-25.

46. Williams, D.E., et al., Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and Dungeness crab larvae. Chem Res Toxicol, 1997. 10(4): p. 463-9.

47. Lance, E., et al., Interactions between cyanobacteria and gastropods Ingestion of toxic Planktothrix agardhii by Lymnaea stagnalis and the kinetics of microcystin bioaccumulation and detoxification. Aquat Toxicol, 2006. 79(2): p. 140-8.

48. Rivasseau, C. and M.-C. Hennion, Potential of immunoextraction coupled to analytical and bioanalytical methods (liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of cyanobacterial toxins. Analytica Chimica Acta, 1999. 399(1-2): p. 75-87.

49. Magalhães, V.F., R. Moraes Soares, and S.M.F.O. Azevedo, Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. Toxicon, 2001. 39(7): p. 1077-1085.

50. Magalhaes, V.F., et al., Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). Toxicon, 2003. 42(3): p. 289-95.

51. Kopp, R., et al., Concentrations of microcystins in tissues of several fish species from freshwater reservoirs and ponds. Environ Monit Assess, 2013. 185(12): p. 9717-27.

52. Adamovsky, O., et al., Microcystin kinetics (bioaccumulation and elimination) and biochemical responses in common carp (Cyprinus carpio) and silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) exposed to toxic cyanobacterial blooms. Environ Toxicol Chem, 2007. 26(12): p. 2687-93.

53. Kohoutek, J., et al., LC-MS analyses of microcystins in fish tissues overestimate toxin levels-critical comparison with LC-MS/MS. Anal Bioanal Chem, 2010. 398(3): p. 1231-7.

54. Altaner, S., et al., Simultaneous Detection of 14 Microcystin Congeners from Tissue Samples Using UPLC- ESI-MS/MS and Two Different Deuterated Synthetic Microcystins as Internal Standards. Toxins (Basel), 2019. 11(7).

55. Chen, Y.M., et al., Potential of a simple solid-phase extraction method coupled to analytical and bioanalytical methods for an improved determination of microcystins in algal samples. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006. 844(1): p. 134-41.

56. Babica, P., et al., Evaluation of extraction approaches linked to ELISA and HPLC for analyses of microcystin-LR, -RR and -YR in freshwater sediments with different organic material contents. Anal Bioanal Chem, 2006. 385(8): p. 1545-51.

57. Palagama, D.S.W., et al., Development and applications of solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry methods for quantification of microcystins in urine, plasma, and serum. J Chromatogr A, 2018. 1573: p. 66-77.

58. Devasurendra, A.M., et al., Solid-phase extraction, quantification, and selective determination of microcystins in water with a gold-polypyrrole nanocomposite sorbent material. J Chromatogr A, 2018. 1560: p. 1-9.

59. Hu, X., et al., Detection of free microcystins in the liver and muscle of freshwater fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Environ Sci Health B, 2017. 52(10): p. 770-776.

60. Lepoutre, A., Etude de la pertinence de Bivalves en tant qu'organismes bioindicateurs de la présence de cyanobactéries et de cyanotoxines dans les écosytèmes aquatiques. 2019, Université de Reims Champagne-Ardenne: France. p. 269.

61. Lepoutre, A., et al., Free or Protein-Bound Microcystin Accumulation by Freshwater Bivalves as a Tool to Evaluate Water Contamination by Microcystin-Producing Cyanobacteria? Applied Sciences, 2020. 10(10): p. 3426.

62. Li, W., et al., Quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystin-RR and its glutathione and cysteine conjugates in fish plasma and bile. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014. 963: p. 113-8.

63. Diez-Quijada, L., et al., New Method for Simultaneous Determination of Microcystins and Cylindrospermopsin in Vegetable Matrices by SPE-UPLC-MS/MS. Toxins (Basel), 2018. 10(10).

64. Heussner, A.H., et al., Pitfalls in microcystin extraction and recovery from human blood serum. Chem Biol Interact, 2014. 223: p. 87-94.

65. Li, Y.W., et al., Analysis of trace microcystins in vegetables using solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatography triple-quadrupole mass spectrometry. J Agric Food Chem, 2014. 62(49): p. 11831-9.

66. Foss, A.J., et al., Diagnosing Microcystin Intoxication of Canines: Clinicopathological Indications, Pathological Characteristics, and Analytical Detection in Postmortem and Antemortem Samples. Toxins (Basel), 2019. 11(8): p. 456.

67. Foss, A.J., et al., Analysis of free and metabolized microcystins in samples following a bird mortality event. Harmful Algae, 2018. 80: p. 117-129.

68. Foss, A.J., et al., Nodularin from benthic freshwater periphyton and implications for trophic transfer. Toxicon, 2017. 140: p. 45-59.

69. Brown, A., et al., Detection of cyanotoxins (microcystins/nodularins) in livers from estuarine and coastal bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) from Northeast Florida. Harmful Algae, 2018. 76: p. 22-34.

70. Mhadhbi, H., et al., Generation and characterization of polyclonal antibodies against microcystins-Application to immunoassays and immunoaffinity sample preparation prior to analysis by liquid chromatography and UV detection. Talanta, 2006. 70(2): p. 225-35.

71. Xiao, F.G., et al., Necessity of screening water chestnuts for microcystins after cyanobacterial blooms break out. Arch Environ Contam Toxicol, 2009. 57(2): p. 256-63.

72. Aguete, E.C., et al., HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction. Talanta, 2003. 59(4): p. 697-705.

73. Backer, L.C., et al., Recreational exposure to low concentrations of microcystins during an algal bloom in a small lake. Mar Drugs, 2008. 6(2): p. 389-406.

74. Backer, L.C., et al., Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. Toxicon, 2010. 55(5): p. 909-21.

75. Ai, Y., S. Lee, and J. Lee, Drinking water treatment residuals from cyanobacteria bloom-affected areas: Investigation of potential impact on agricultural land application. Sci Total Environ, 2020. 706: p. 135756.

76. Aranda-Rodriguez, R., C. Kubwabo, and F.M. Benoit, Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns. Toxicon, 2003. 42(6): p. 587-99.

77. Tsutsumi, T., et al., Immunoaffinity column as clean-up tool for determination of trace amounts of microcystins in tap water. Food Chem Toxicol, 2000. 38(7): p. 593-7.

78. Williams, D.E., et al., Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin-LR epimers administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection. Toxicon, 1995. 33(2): p. 125-31.

79. Schaefer, A.M., et al., Exposure to microcystin among coastal residents during a cyanobacteria bloom in Florida. Harmful Algae, 2020. 92.

80. Wei, H., et al., Electrospun polymer nanofibres as solid-phase extraction sorbents for extraction and quantification of microcystins. Environ Technol, 2015. 36(21): p. 2796-802.

81. Zervou, S.K., et al., New SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins. J Hazard Mater, 2017. 323(Pt A): p. 56-66.

82. Palagama, D.S.W., R.E. West Iii, and D. Isailovic, Improved solid-phase extraction protocol and sensitive quantification of six microcystins in water using an HPLC-orbitrap mass spectrometry system. Analytical Methods, 2017. 9(13): p. 2021-2030.

Chapitre 3
Analyse par oxydation de Lemieux et LC-MS/MS des MC totales dans des échantillons de poissons et des moules aquatiques : optimisation et comparaison de deux protocoles

1. Synthèses des travaux

Les microcystines (MC) peuvent s'accumuler sous forme cellulaire libre ou liée aux protéines dans les organismes du réseau trophique d'eau douce (101, 150, 229). Les formes libres de MC sont extraites assez facilement à l'aide de solvants (37), mais le défi méthodologique est plus important pour l'extraction des formes totales (libres et liées aux protéines) des MC dans les organismes, pour lesquelles différentes stratégies ont été proposées (53). La méthode la plus courante consiste à oxyder le fragment Adda des MC totales, non impliqué dans la liaison covalente aux protéines, dans la matrice afin d'extraire et d'analyser le fragment libéré appelé MMPB (acide 2-méthyl-3-méthoxy-4-phénylbutyrique). L'un des principaux intérêts de cette méthode est d'analyser tous les variants de MC en une seule fois au moyen du fragment MMPB libéré, ce qui évite de devoir disposer d'un étalon analytique pour chacun des nombreux variants de MC. Cependant, cette méthode présente également des limites, notamment un temps de traitement élevé des échantillons qui rend difficile le traitement d'un grand nombre d'échantillons, la variabilité du processus de conversion global avec des taux de récupération très variables en fonction des protocoles d'oxydation de Lemieux et des matrices utilisées, ainsi que les effets matrices importants pendant l'analyse LC-MS/MS (53).

De nombreux protocoles d'oxydation de Lemieux ont été présentés dans la littérature. Tous ces protocoles diffèrent par les étapes impliquées : état de la matrice (fraîche ou lyophilisée), utilisation d'une étape de prétraitement (avec ou sans digestion enzymatique), conditions d'oxydation (concentration d'oxydant et temps d'oxydation), méthodes de purification (extraction liquide-liquide ou extraction en phase solide ou les deux) ainsi que la méthode d'étalonnage et l'utilisation d'un étalon interne. Il existe donc une grande variabilité non seulement dans les taux de récupération (efficacité) des méthodes, mais aussi dans les protocoles utilisés. Il est donc difficile de comparer les méthodes d'oxydation de Lemieux, ce qui explique probablement pourquoi cela n'a jamais été fait jusqu'à présent dans la littérature. De tous les protocoles proposés dans la littérature, deux (appelés ici "Lemieux1" et "Lemieux2") semblent avoir fait l'objet de travaux d'optimisation, mais ont également été appliqués à la plus grande variété de matrices (39, 159).

Les objectifs de cette étude étaient d'optimiser le protocole "Lemieux1" adapté aux tissus de mollusques (39, 48) sur des matrices de tissus de poissons frais. Plusieurs étapes ont été optimisées dans le protocole "Lemieux1", notamment la composition de la solution oxydante, le type de cartouches SPE utilisées pour la purification de l'extrait, ou l'étape de concentration du MMPB à la fin de la méthode d'oxydation. Cependant, les taux de récupération modérés du protocole "Lemieux1" sur des matrices de poissons, nous ont amenés à comparer ce protocole avec un autre protocole issu de la littérature, appelé ici "Lemieux2" (158, 159), sur différentes matrices fraîches (muscles et foie de poissons naturellement contaminés, muscles de poissons dopés en MC ou en MMPB) et lyophilisées (moules d'eau douce entières et leurs glandes digestives). Ces deux protocoles diffèrent dans la réalisation des différentes étapes de l'oxydation de Lemieux (prétraitement, oxydation, purification) mais utilisent également des méthodes de quantification distinctes (gamme étalon dans la matrice d'une part, et gamme étalon avec de la MC-LR oxydée en MMPB dans de l'eau d'autre part). Un effort particulier a

été fait pour comparer les différentes méthodes de quantification afin de mieux comprendre l'impact de cette étape sur le taux de récupération de l'analyse. Les comparaisons des taux de récupération des deux protocoles, des effets matrice associés à chaque protocole, des méthodes de quantification mais aussi de la facilité d'exécution du protocole ont été évaluées.

Pour le protocole "Lemieux1", trois types de cartouches SPE ont été comparés (SampliQ (40), HLB (39, 48) et Strata SDB-L (231)) avec des tests se rapprochant progressivement de la complexité du protocole d'oxydation de Lemieux. Le taux de récupération obtenu avec la cartouche SampliQ a indiqué que la cartouche ne retenait pas efficacement le MMPB dans l'échantillon aqueux (que ce soit pour un volume d'échantillon de 20 ou 35 ml, avec une récupération < 32 % pour l'échantillon d'eau dopé au MMPB) et a donc été écarté. La cartouche Strata SDB-L a obtenu les meilleurs taux de récupération pour le protocole "Lemieux1" avec 13,2 % et 10,4 % pour des volumes d'échantillons de 20 et 35 ml, respectivement, des performances bien inférieures à celles obtenues dans une étude précédente (91 - 98 % de récupération) (231). Les résultats obtenus lors de ces tests peuvent être expliqués par plusieurs facteurs, notamment l'influence du volume de l'échantillon et surtout la combinaison de la matrice et de la solution oxydante qui semble être à l'origine de la baisse de récupération. De plus, l'utilisation d'un étalon interne tel que le d_3-MMPB aurait pu atténuer les effets importants de la matrice observés lors de ces tests SPE car elle a permis d'augmenter les rendements de la méthode "Lemieux1" dans la section suivante.

Le protocole "Lemieux1" a été testé sur des filets de saumon frais ou lyophilisés enrichis en MC-LR. Les taux de récupération de l'étape d'oxydation étaient beaucoup plus élevés pour les échantillons frais que pour les échantillons lyophilisés (48,4 % et 8,0 %, respectivement) et inversement, l'étape de SPE a montré des taux de récupération plus élevés lorsqu'elle a été testée sur des matrices lyophilisées que sur des matrices fraîches (49,0 % et 9,1 %, respectivement). Une tendance similaire a été observée pour les filets de saumon frais ou lyophilisés au cours de l'étape d'évaporation avec des pertes significatives (95,5 % et 89,7, respectivement). Cette perte importante d'analytes lors de cette étape n'est probablement pas liée à une dégradation du MMPB lors de l'évaporation à 40°C (non observée avec l'autre protocole "Lemieux2" où la température d'évaporation est de 60°C) mais pourrait être due à des problèmes de resolubilisation ou à l'amplification des effets matrice liés aux sels utilisés lors de l'étape d'oxydation qui sont concentrés lors de l'évaporation. Cette étape d'évaporation n'a pas été conservée dans le protocole optimisé et l'analyse a été réalisée après élution des cartouches avec 5 mL de MeOH. Cette décision permet de s'affranchir des pertes importantes rencontrées lors de l'évaporation, mais entraine une augmentation du facteur de dilution (x25), ce qui pourrait poser problème en cas d'échantillons faiblement contaminés en MC totales.

Il existe différentes stratégies de quantification dans la littérature : utilisation d'une courbe d'étalonnage dans le solvant (4, 40, 232) ou dans la matrice (55, 110, 118, 158, 225), avec ou sans standard interne. L'effet matrice, estimé ici à -96 %, est proche d'autres effets matrice trouvés dans le sérum et les tissus d'échantillons d'escargots aquatiques de -63 % à -84 % (48). D'autres études ont montré un effet matrice plus faible, par exemple dans une étude précédente sur le foie de rat et de poulet où les effets matrice ont atteint -41,8 % (233) ou, à l'inverse, des effets matrice d'augmentation du signal conduisant à un signal récupéré de 122 %

pour les intestins et 142 % pour les muscles de la truite arc-en-ciel ou à une augmentation du signal de 300 % sur les tissus du bivalve *Dreissena polymorpha* (40, 225).

En raison des taux de récupération modérés de la méthode "Lemieux1" (mais pas inhabituels dans le contexte de l'oxydation Lemieux (53)) et pour avoir plus de recul sur les performances de ce protocole, les protocoles Lemieux 1 et 2 ont ensuite été comparés sur des échantillons dopés en MC-LR. Pour comparer les protocoles "Lemieux1" et "Lemieux2", la même méthode d'étalonnage (courbe d'étalonnage dans la matrice + d_3-MMPB) a été appliquée à chaque protocole sur la même matrice blanche de saumon dopée soit avec de la MC-LR, soit avec de la MC-RR. Le protocole "Lemieux2" a donné de meilleurs taux de récupération sur ces deux types d'échantillons (69,6 % et 61,4 %, respectivement) que le protocole "Lemieux1" (37,5 % et 28,1 %, respectivement). Cette variabilité entre les deux protocoles illustre la complexité de l'oxydation Lemieux et l'importance à la fois de la comparaison des protocoles et du choix de la méthode d'étalonnage, qui fait souvent défaut dans les études sur le sujet. En plus de donner de meilleurs taux de récupération, on peut rajouter que ce protocole "Lemieux2" peut permettre, grâce à des volumes de solution oxydante plus petits et des temps d'incubation plus courts (1 h contre 4 h), de traiter simultanément un plus grand nombre d'échantillons tout en utilisant de plus petites quantités de réactifs que le protocole "Lemieux1". Il est cependant important de souligner que la faible quantité (50 mg) de matrice utilisée dans le protocole "Lemieux2" peut poser des problèmes de représentativité de la contamination d'un échantillon et, dans le contexte d'échantillons peu contaminés tels que les filets de poisson, peut également être trop faible pour identifier la présence de MC (40, 111, 112).

En conclusion, le protocole "Lemieux1" développé à l'origine sur des matrices lyophilisées a été optimisé sur des matrices de poisson frais, en particulier l'étape de SPE où 3 cartouches SPE différentes ont été comparées. La cartouche Strata SDB-L a été préférée à HLB et SampliQ. De plus, d'autres étapes ont également été modifiées comme l'étape d'évaporation qui n'a pas été conservée dans ce protocole en raison des pertes rencontrées (>90 % de perte). Différentes méthodes d'étalonnage ont été testées : gamme d'étalonnage par solvant et gamme d'étalonnage adaptée à la matrice avec ou sans standard interne (d_3-MMPB) qui ont permis de mettre en évidence les effets matrice rencontrés sur la matrice des filets de saumon de -95 %. L'utilisation de la courbe d'étalonnage adaptée à la matrice présente l'avantage de prendre en compte l'important effet matrice affectant la détermination du MMPB. Les optimisations apportées au protocole Lemieux1 ont permis d'identifier les conditions expérimentales optimales. Ce protocole optimisé "Lemieux1" a ensuite été comparé au protocole "Lemieux2", qui utilise une prise d'essai plus petite, des volumes de réactifs plus petits, une étape de purification supplémentaire utilisant la SLE et une courbe d'étalonnage de MC-LR oxydée en MMPB avec du d_3-MMPB comme étalon interne. Le protocole "Lemieux2" a été sélectionné car il a donné de meilleurs taux de récupération (>60 %) et pour la faisabilité de la méthode (plus verte, plus rapide, moins encombrante).

L'article ci-après détaille les expérimentations réalisées sur l'optimisation et la comparaison de protocoles d'oxydation de Lemieux. Cet article sera soumis prochainement dans la revue Science of the Total Environment.

2. Analysis of total microcystins by Lemieux oxidation and LC-MS/MS of aquatic fish and mussels: optimization and comparison of protocol

Pierre Bouteiller [1,2], Ronel Biré [2], Amanda J. Foss [3], Thierry Guérin [4], and Emilie Lance [1,5,*]

1 Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO, Unité Stress Environnementaux et BIOsurveillance des Milieux Aquatiques (SEBIO), BP 1039 F, 51687, Reims, Cedex, France
2 ANSES, Laboratory for Food Safety, F-94701 Maisons-Alfort, France
3 GreenWater Laboratories/CyanoLab, 205 Zeagler Drive, Palatka, FL 32177, USA
4 ANSES, Strategy and Programmes Department, F-94701 Maisons-Alfort, France
5 UMR MNHN/CNRS MCAM, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75005 Paris, France
* Correspondence: emilie.lance@univ-reims.fr

2.1. Abstract

Microcystins can be detected in various matrices in two forms: a freely extractable fraction and a total fraction. To detect and quantify the concentration of MCs in various matrices (e.g. water, sediments, animal tissues), a panel of techniques are available. The analysis of MCs concerns the free or the total (free plus covalently bound) fraction. The chemical oxidation method (e.g. Lemieux) allows the detection of total forms of MCs (and nodularins) by oxidizing the Adda, and analysis of the resultant product MMPB. However, the execution of this method in the context of health monitoring is challenging due to the variability of the protocols, the recoveries obtained with these protocols, and the important matrix effects associated with the method. The objective of this study was not only to present an optimization of an existing protocol of chemical oxidation "Lemieux1" on fresh fish fillet matrices but also to compare two existing protocols ("Lemieux1" and "Lemieux2") by testing several calibration methods: solvent calibration curve, matrix-matched calibration curve, oxidized MC-LR calibration curve and also by testing the addition of an internal standard the d_3-MMPB. Optimization of the "Lemieux1" protocol, in particular in the oxidation and SPE steps improved the method's yields on the fresh fish fillet matrix (from <5% to around 40%). Moreover, investigation of interpretations of data through calibration techniques have been realized by comparing several quantification methods. Comparison with the "Lemieux2" protocol showed the best results on the same matrix, with yields of around 65%). These methods were then applied to fillets and liver from fishes and freshwater mussels contaminated naturally or in the laboratory with MC.

KEYWORDS: cyanotoxins; microcystins; Lemieux oxidation protocols; MMPB; total microcystin content; LC-MS/MS analysis

2.2. Introduction

Cyanobacteria are microorganisms which can proliferate in various ecosystems including moderately or highly eutrophic water bodies. A massive proliferation, so-called

bloom, can present deleterious effects for wildlife but also for humans, after direct contact, inhalation or ingestion (contaminated water and aquatic organisms). Cyanobacteria can produce secondary metabolites, including microcystins, which are considered the most commonly detected cyanotoxins in cyanobacterial blooms [1-3]. MCs are monocyclic heptapeptides with two variable amino-acids and several places for modifications that result in > 275 different variants [4]. In addition, all the MC variants have also two atypical amino acids called Adda (3-amino-9-methyoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadienoic acid, also present in nodularins (NOD), another cyanotoxin.) and Mdha (*N*-methyl-dehydroalanine) groups. These amino acids both play a role in the mechanism of the binding of MCs to protein phosphatase (PP). This is a two-step mechanism, which begins with the formation of a weakly-interacting bond of a hydrophobic and reversible nature between the Mdha group of MCs and the protein. Then the Adda group can form a strong covalent thioether bond with the cysteine residues present at the catalytic subunits of PP after a few hours [5-8]. One of the results of the binding of MCs to proteins is the deregulation of the PP, which disrupts the phosphorylation mechanisms [9, 10]. This could lead to a cascade of negative side effects, in particular, apoptosis, but also the production of reactive oxygen species, resulting in oxidative stress [11]. The toxicity caused by MCs can affect the liver, and via systemic shock other organs including the reproductive organs, kidneys, brain, heart, gastrointestinal tract, or lungs [12]. This specific organo-toxicity can be explained by the tropism of MCs towards organs containing organic-anion-transporting polypeptides (OATPs) [13]. The health impact of these toxins is therefore not marginal, and cases of human and animal poisoning are regularly reported [reviewed in 14]. MCs can be detected in cellular free or protein-bound forms in organisms of the freshwater food web [15-17]. The free forms of MC can be extracted with solvents [reviewed in 18] but the methodological challenge is more important for the extraction of total (free and protein-bound) forms of MCs in organisms, for which different strategies have been proposed [reviewed in 19]. The most common method is to oxidize the Adda fragment of MCs/NODs in order to extract and analyze the released fragment named MMPB (2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid), as promoted by the Lemieux oxidation. One of the main interests of this method is to analyze all the Adda MC/NOD variants at once by means of the released MMPB fragment, avoiding the need to have an analytical standard for each of the numerous MC/NOD variants. However, this method also has limitations, including a high variability of the overall conversion process with variable recovery yields depending on the oxidation protocols and the matrices used and also the important matrix effects to consider [19]. Many different chemical oxidation protocols have been presented in the literature. All these protocols differ in the steps involved: matrix state (fresh or freeze-dried) with a homogenization step, use of a pre-treatment step (with or without enzymatic digestion), oxidation conditions (oxidant concentration and oxidation time), purification methods (liquid-liquid extraction or solid-phase extraction or both) as well as calibration method and use of an internal standard. There is therefore a great variability not only in the yields of the methods but also in the protocols involved. This makes it difficult to compare chemical oxidation methods, and this probably explains why it had never been done so far in the literature. Of all the protocols put forward in the literature, two (here referred to as "Lemieux 1" and "Lemieux 2") appear to have been the subject of optimization works, but have also been applied to the greatest variety of matrices [20, 21]. The objectives of this study were to optimize

a protocol from the literature here referred to as "Lemieux1" that was adapted to mollusk tissues [20, 22] on fresh fish tissue matrices. Several steps have been optimized on the "Lemieux1" protocol including the type of SPE cartridges used, the composition of the oxidant solution or the concentration step at the end of the oxidation method. However, the moderate yields of the "Lemieux1" protocol on fish matrices, led us to compared this protocol with another one from the literature, here referred to as "Lemieux2" [21, 23], on various fresh (naturally contaminated fish muscles and liver, spiked fish muscles) and freeze-dried (whole freshwater mussels and digestive glands) matrices. These two protocols differ in the realization of the different steps of Lemieux oxidation (pre-treatment, oxidation, purification) but also use distinct calibration methods (matrix-matched calibration on the one side, and calibration with MC-LR oxidized to MMPB in water for the other). Each of these two calibration methods takes greater account of part of Lemieux's oxidation protocol: the MC-LR oxidized range method takes account of oxidation efficiency and SPE yield, but not the matrix effect, while the matrix range does not take account of oxidation method yields and conversion of MCs to MMPB, but does not allow sample quantification to be influenced by matrix effects. An alternative would be to create a matrix matched calibration curve with MC-LR, which would take into account conversion, oxidation efficiency, extraction losses and matrix effects. A special effort has been made to compare different calibration methods to better understand the impact of this step on the yield of the analysis. Results are discussed in terms of comparisons of the yields of the two protocols, matrix effects associated to each protocol, quantification methods but also ease of execution of the protocol.

2.3. Experimental

2.3.1. Standards and reagents

MC standards (MC-LR and MC-RR) were purchased from the NRC (Halifax, NS, Canada). MMPB standard was purchased from Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) and deuterated-MMPB (d_3-MMPB) was generously provided by Dr. Miles and Dr. McCarron of the NRCC. Sodium periodate ($NaIO_4$), potassium permanganate ($KMnO_4$), formic acid (FA), acetic acid, hydrochloric acid (HCl) and sulphuric acid were purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic dihydrate, sodium bicarbonate, sodium bisulfite and trypsin/EDTA were purchased from Merck-Sigma-Aldrich (Fontenay-sous-Bois, France). Oasis HLB 6 cc 200 mg cartridges were purchased from Waters (Guyancourt, France), SampliQ OPT Polymer 6 cc 150 mg were purchased from Agilent (Les Ulis, France), Strata-X 33 µm Polymeric Reversed phase 6 cc 100 mg and 200 mg, Strata SDB-L 6 cc 500 mg and Novum SLE were purchased from Phenomenex (Le Pecq, France). Solvents (acetonitrile (ACN), methanol (MeOH)) and ethyl acetate used during this study were of LC-MS grade (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France).

2.3.2. Biological material

Fish (muscle, liver) and mussels were used during the study to test the Lemieux oxidation and to assess the presence of free or total MCs. Blank salmon fillets were purchased from a local fishery, common and mirror carp (*Cyprinus carpio* and *Cyprinus carpio carpio*, respectively) fillets and livers were fished in the Pannecière lake (Nièvre, France) during a cyanobacterial bloom episode in September 2020, and freshwater mussels (*Anondonta anatina*) provided by Univers aquatique (Univers aquatique, Sartrouville, France) were laboratory exposed to MC-producing cyanobacteria at an intracellular concentration of 100 µg MCs.L^{-1} during three weeks. [24].

2.3.3. Optimization of the "Lemieux1" protocol on fresh fillet of fishes

2.3.3.1. Description of the "Lemieux1" protocol

In this study, the "Lemieux1" protocol was adapted from Lance et al. [20], originally performed on freeze-dried matrices of freshwater mussels (*Anondonta anatina*) or aquatic snail tissue (*Lymnaea stagnalis*) [17, 20, 22, 24]. Here, the protocol has been adapted for fresh fish matrices first by increasing the test portion, which was originally 10 mg on freeze-dried freshwater mussels, to 1.0 ± 0.1 g of fresh fish fillet. This adaptation has been done to account for the water content, in comparison to freeze-dried tissues and according to previous studies using this method on fish matrices normally far less contaminated than bivalve tissues. Fresh muscle tissue was homogenized in 5 mL of trypsin/EDTA (0.25/0.02 g/L) in phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.4), at 10,000 rpm for 90 s with a PT 3100D Polytron. Homogenates were digested for 2 h at +37°C before oxidation with 20 mL of oxidant solution (0.1 M $KMnO_4$ and 0.1 M $NaIO_4$ at pH = 9) for 2 h. If the solution turned brown (color of reduced product: MnO_2), 15 mL of fresh oxidant solution were added for one more hour. Reaction was quenched by 40% sodium bisulfite and 10% sulphuric acid before centrifugation and filtration (Chromafil Xtra PA, 25mm, 0.2 µM, Macherey Nagel, Hoerdt, France). The filtered sample was loaded into a solid phase extraction (SPE) Oasis HLB 30 mg cartridge (conditioned with 10 mL of MeOH followed by 10 mL of H_2O, washed with water and 15% aqueous MeOH and eluted with 1 mL of 80% MeOH). The eluate was finally evaporated to dryness under nitrogen at +40°C and reconstituted in 200 µL of 35% MeOH, 0,05% acetic acid.

2.3.3.2. SPE optimization

The SPE steps of the "Lemieux1" oxidation protocol have been optimized on fresh salmon matrix. Three types of SPE cartridges were selected based on a literature search [16, 20, 22, 24-27] and were compared: Oasis HLB 6 cc 30 mg; SampliQ 6 cc 150 mg and Strata SDB-L 6cc 500 mg. All three SPE cartridges were conditioned with 5 mL of MeOH and 5 mL of H_2O before the samples were loaded (25 or 40 mL depending on whether oxidant solution had to be added). Washing and elution steps differed for each cartridge type according to manufacturer's instructions. For Oasis HLB, cartridges were washed sequentially with 5 mL of 15% aqueous MeOH and 5 mL of H_2O, and the MCs were eluted with 1 or 2 mL of 80% MeOH. The SampliQ cartridges were washed with 4 mL of 15% MeOH and 10 mL of H_2O, and the

MCs were eluted with 4 mL of MeOH. For Strata SDB-L, cartridges were washed with 10 mL of 10% aqueous MeOH acidified with 0.1% FA, and the MCs were eluted with 5 mL of MeOH.

As in preliminary experiments important losses of MCs (about 90%) were observed during the SPE steps, we first decided to study the influence of the composition of the extract loaded onto the cartridge, on the toxin recovery. To do so, the strategy consisted in increasing progressively the complexity of the composition of the solution ("extract") to be purified and the toxin recovery of this so-called extract was determined after the SPE step (n=3, for each experiment). In the first test, no matrix was added. The MMPB standard (1 µg) was added to the mix of trypsin/EDTA (5 mL of 0.25/ 0.02 g/L) in phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.4) and instead of using oxidant solution, H_2O (20 mL corresponding to a weakly contaminated sample or 35 mL corresponding to a highly contaminated sample) was added, before loading the sample into the SPE cartridges. For the second test, H_2O was replaced by oxidant solution (20 and 35 mL as before). For the third test, the MMPB was spiked (1 µg) at the beginning of the experiment in 1 g of fresh blank salmon fillet matrix and 20 mL of water were used instead of oxidant solution. For the fourth and last test, the entire "Lemieux1" protocol (c.f. 2.3.1.) was tested by spiking 1 µg of MMPB at the beginning of the experiment in 1 g of fresh blank salmon fillet matrix with two different volumes (20 or 35 mL) of oxidant solution.

2.3.3.3. Lemieux oxidation on fresh or freeze-dried matrices

As many studies on Lemieux oxidation for MMPB analysis focus mainly on freeze-dried matrices, it was decided to compare the same protocol on a matrix in both states: fresh and freeze-dried. For that, the "Lemieux1" protocol subsequently optimized (c.f. 2.3.1) was tested on fresh and freeze-dried blank salmon fillet. Two experiments were performed.

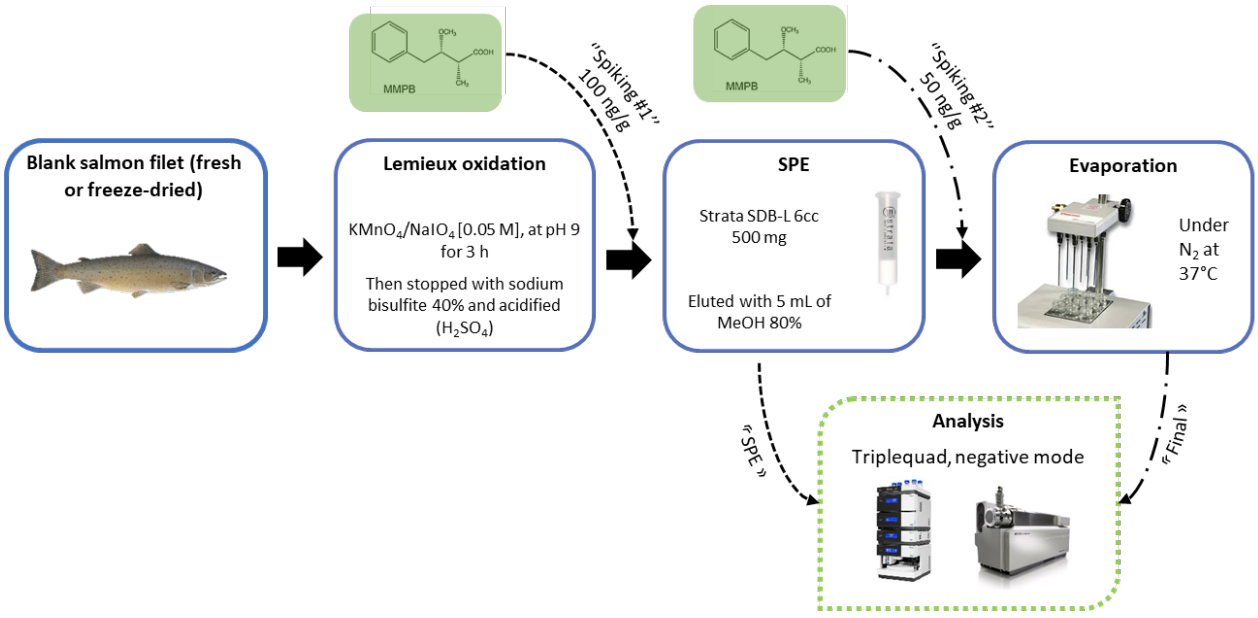


Figure 15: Graphical representation of the protocol followed to evaluate the performance of the SPE and evaporation steps.

The first study focused on the comparison of fresh and freeze-dried matrices and their impact on MMPB recoveries, with a particular focus on the last two steps of the protocol: SPE and evaporation of the eluates. A 48 g test portion of fresh blank salmon fillet was freeze-dried with a freeze-drier Lyovapor L-200 (Buchi) at -54°C and 0.1 mbar during 48 h. In the end, 16.3 g of freeze-dried salmon matrix were recovered after, equivalent to a dry matter content of the salmon flesh of 34%. For this purpose, 1 g test portion of fresh salmon fillet or 340 mg and 1.7 g test portions of freeze-dried salmon (corresponding respectively to 1 and 5 g of fresh salmon) were compared, with 3 replicates per condition. These samples were spiked with the MMPB standard at the concentration of 100 ng/g before the SPE step ("Spiking #1", **Figure 15)** or prior to evaporation step at a concentration of 50 ng/g ("Spiking #2", **Figure 15**). Sub-samples were collected for analysis after SPE and after evaporation.

The second experiment was carried out on the complete protocol. As for the previous study, 1 g test portion of fresh salmon fillet and 340 mg and 1.7 g test portions of freeze-dried salmon (corresponding respectively to 1 and 5 g of fresh salmon) were spiked with MC-LR at the concentration of 477.8 ng/g (equivalent of 100 ng/g after oxidation of MC-LR into MMPB) at the beginning of the protocol. Three replicates were done per conditions with subsamples collected for analysis throughout the workflow to calculate yields at each step.

2.3.3.4. Quantification method: solvent versus matrix-matched calibration curve

Here the "Lemieux1" protocol was applied to a fresh salmon sample spiked at two concentrations levels of MC-LR (0.5 and 2.3 µg/g) (**Figure 16**; n=3 for each concentration). No evaporation was done and samples were analyzed directly after elution from the cartridges (due to important losses of about 88% on average during this stage, c.f. **Table 7**). Two methods of quantification were used: a first one using a MMPB calibration curve in solvent (MeOH) (6; 25; 100; 400 and 1000 ng/mL), and a second one using a matrix-matched MMPB calibration curve. The matrix used (salmon fillet) went through the whole Lemieux oxidation protocol and the extract was spiked with known concentrations of MMPB standard (6; 25; 100; 400 and 1000 ng/g).

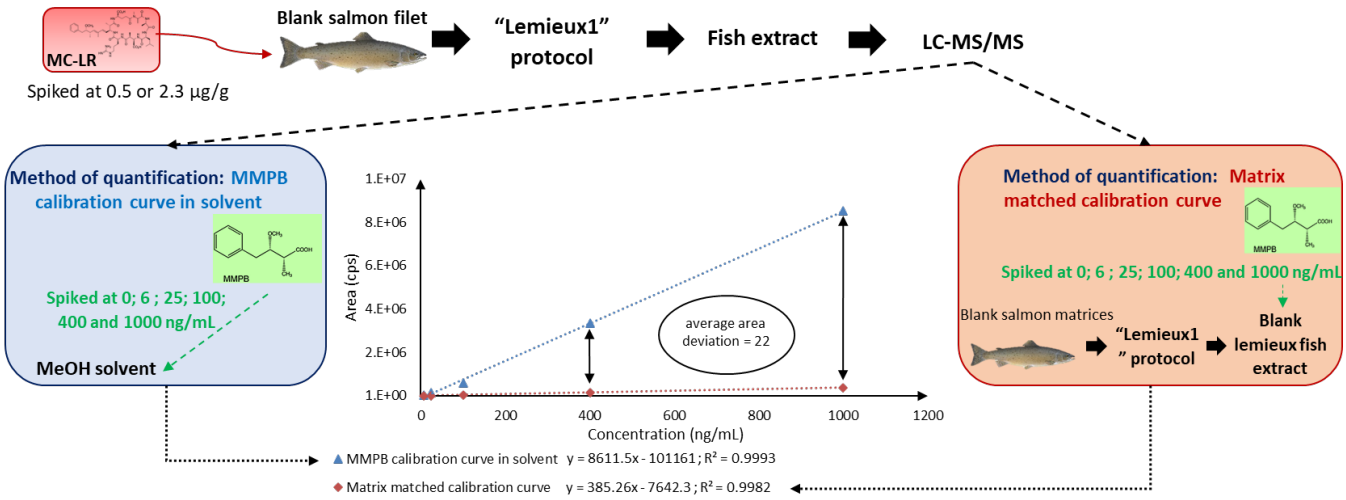


Figure 16: Comparison of two methods of quantification of blank salmon filet spiked with MC-LR [0.5 and 2.3 µg/g] during Lemieux oxidation (n=3).

2.3.4. Comparison of two Lemieux oxidation protocols

The optimized "Lemieux1" protocol used in this part corresponds to the protocol optimized on fresh fish matrices. A 1 g test portion of fresh matrices spiked with the internal standard (IS) d_3-MMPB (100 µg/L, 10 µL) was first digested for 2 h at 37°C with 5 mL of phosphate buffered trypsin (500 µg/mL) at pH 7.5. After digestion, samples were oxidized with 25 mL of a mixture of potassium permanganate ($KMnO_4$, 0.1 M) and sodium periodate ($NaIO_4$, 0.1 M) at pH= 9 for 3 h. Oxidation was stopped with 4 mL of sodium bisulfite (40%) and 900 µL of sulphuric acid was added to obtain a pH < 3. Samples were filtered (0.2 µm, nylon) and a purification step was performed with SPE cartridge Strata SDB-L as described previously (c.f. 2. 3. 2), without evaporation (cf section 2.3.4.). Quantification of samples with this method was done with matrix-matched calibration curve with and without taking into account the IS.

This protocol was compared to another protocol developed at GreenWater Laboratories, FL, USA) [21, 23], named "Lemieux2". In this protocol, the d_3-MMPB IS (100 µg/L, 10 µL) was added to 50 mg of fresh or freeze-dried samples and the test portions were oxidized by K_2CO_3 (1 M, 500 µL), $KMnO_4$ (0.25 M, 1 mL) and $NaIO_4$ (0.25 M, 1 mL) for 1 h. Oxidation reaction was then quenched with sodium bisulfite (40%) until the solution turned from purple or brown to transparent. Purification by SPE was done with Strata X 6 cc 200 mg, conditioned with 5 mL MeOH and 5 mL of H_2O; the samples were then loaded, and the cartridge was washed with 5 and 3 mL of H_2O before elution with 5 mL ACN 90%. After SPE, eluates were evaporated to dryness under N_2 flow at a temperature under 60°C and reconstituted in HCl (0.1 M, 750 µL) to obtain a pH < 3. A second purification step based on the principle of the liquid-liquid-extraction was achieved with solid-liquid extraction (SLE) Novum 6 cc cartridges. The samples were loaded into the cartridge with a slight vacuum to move the samples into the cartridge. After 10 min of contact between the SLE adsorbent and the extract, analytes were eluted with 2 x 2.5 mL of ethyl acetate. The eluates were evaporated to dryness (under N_2 flow, heat < 60°C) and reconstituted in 1 mL of 5% aqueous MeOH, sonicated, and filtered (0.2 µm,

PVDF) before analysis. Again, two methods of quantification were used. Firstly, the method described in the original studies [21, 23]. For this, an external calibration curve of at least 5 points, was made with the same amount of IS (d_3-MMPB) for each point and varying amounts of MC-LR in water (0.5; 1; 10; 50; 100 ng/mL). Then each vial was oxidized, purified by SPE, and reconstituted with 750 µL of 0.1 M HCl. The second quantification method for this "Lemieux2" protocol required a matrix-matched calibration curve spiked with the IS before the oxidation and with MMPB after the oxidation (100; 500; 2500; 12500 and 62500 ng/mL).

Both methods were tested on different samples: salmon fillet spiked with IS (with 10 µL of 100 µg/L d_3-MMPB) and MC-LR or MC-RR standard (at a concentration of 2.4 or 2.5 µg/g, respectively) before extraction; naturally contaminated carp fillet and liver and freshwater mussels exposed to MC-producing cyanobacteria (c.f. 2.2) (n=3 for each types of matrix).

2.3.5. LC-MS/MS conditions

For the chromatographic separation, an Agilent 1200 series gradient HPLC system was used. Mobile phases were 0.1% FA in H_2O (mobile phase A) and 0.1% in ACN (mobile phase B). A constant flow of 300 µL/min was used with an initial hold of 2 min with 20% of phase B. The percentage of phase B was then gradually increased to 100% at 7 min. This composition was maintained for 4 min before decreasing to 5% B between 11 and 11.1 min. Finally, 5% of B phase was kept until the end of the method at 13 min run time. The chromatographic column used was a Kinetex® 2.6 µm XB C18 100 Å (100 x 2.1 mm) by Phenomenex (Le Pecq, France) which was heated at +30°C during the LC run. The injection volume was 5 µL.

A triple quadrupole (API 4000, AB Sciex, Villebon-sur-Yvette, France) was used for the detection of analytes. Preliminary experiments showed better sensitivity of MMPB in negative ionization mode. The transitions monitored in multiple reaction monitoring (MRM) mode were 207.1 → 131.1 for the MMPB and 210.1 →131.1 for the d_3-MMPB. The source temperature was set at 550°C with IonSpray Voltage of -3000 V. GS1/GS2 were set at 40/50 psi, curtain gas at 30 psi and collision gas at 6 psi. The declustering potential was set at -50 V, the entrance potential at -6 V, the collision energy at -15 V and the collision cell exit potential at -11 V.

2.4. Results

2.4.1. Optimization of the "Lemieux1" protocol on fresh matrices

2.4.1.1. Comparison of three SPE cartridges for Lemieux oxidation method on fresh fish matrices

For samples of 20 mL of water spiked with MMPB, the average yields (n=3) of the three cartridges were 31.9% ± 17% for SampliQ, 76.6% ± 7.1% for Strata SDB-L, 75.1% ± 4.3% for HLB with an elution volume of 1 mL of 80% MeOH and 76.1% ± 1.4% for HLB with an elution volume of 2 mL of 80% MeOH (**Figure 17**). When the volume loaded onto the cartridge was of 35 mL of water spiked with MMPB, the average yields obtained were 30.2% ± 2.4% for

SampliQ, 60% ± 2.8% for Strata SBL-L, 82.5% ± 26.7% for HLB with 1 mL elution and 85.6% ± 4.2% for HLB with 2 mL elution. For 20 mL samples, the best performing cartridge type was the Strata SBL-L, followed by HLB 2 mL and 1 mL elution volume, and the worst results were obtained with the SampliQ. For a volume of 35 mL loaded onto the cartridge, the HLB cartridge with 1 and 2 mL elution volume gave the best MMPB recovery yields (with more than 20% difference with the 2nd cartridge, the Strata SDB-L). Again, the SampliQ cartridge was the worst performing cartridge in this experiment and was discarded from further testing.

For a loaded volume of 20 mL, the cartridge yields obtained for the oxidant solution spiked with MMPB were of 82.3% ± 14.7% for Strata SDB-L, 83.7% ± 15.5% on HLB with a 1 mL elution and 81.9% ± 14.9% with the 2 mL elution. When the volume was increased to 35 mL, the average yields obtained were of 81.9% ± 28.7% for Strata SDB-L, 77.4% ± 9.7% on HLB with a 1 mL elution and 67.6% ± 6.4% with a 2 mL elution.

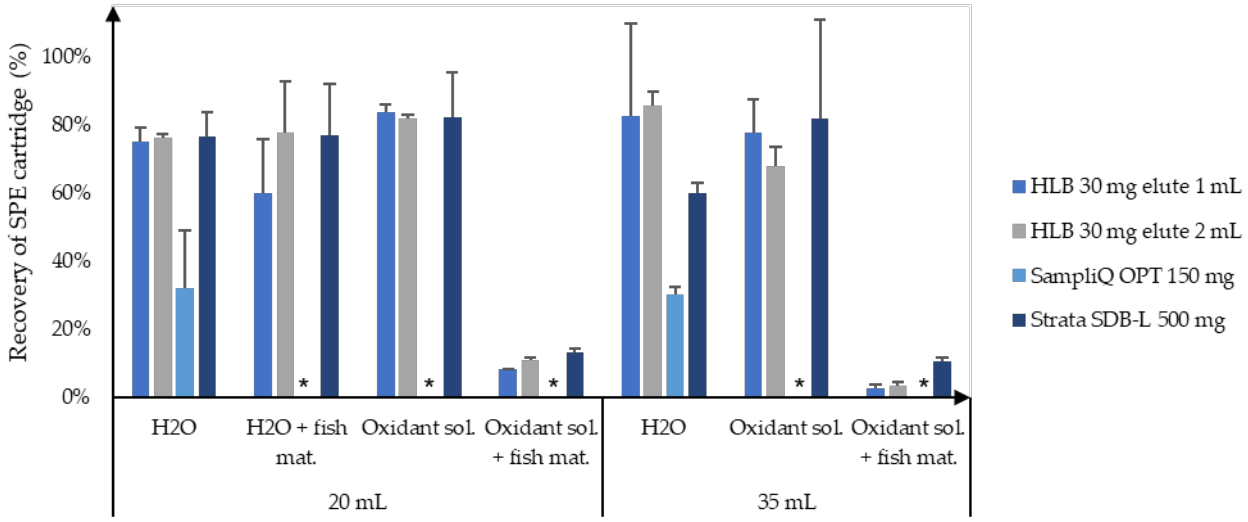


Figure 17: Comparison of the percentage of MMPB recovery from three SPE cartridges (Oasis HLB with 2 elution volumes 1 and 2 mL, SampliQ and Strata SDB-L) as a function of the volume of oxidant solution add to the sample (20 or 35 mL) and as a function of the sample composition (H2O; oxidant solution (0.1 M KMnO4 and 0.1 M INaO4); H2O and 1 g of fresh salmon fillet; oxidant solution (0.1 M KMnO4 and 0.1 M INaO4) and 1 g of fresh salmon fillet) (n=3). Error bars corresponds to SD.

**: the SampliQ OPT 150 mg cartridge was tested only in the "H2O" stage (test n°1) on both volumes (20 and 35 mL). Because of the performance at this stage, the cartridge was excluded from subsequent tests.*

By adding 1 g of fresh matrix to water and spiking with MMPB prior to the SPE step, the average yields obtained on 20 mL samples were 70.2% ± 12.7% for Strata SDB-L, 61.3% ± 2.5% for HLB with a 1 mL elution and 78.3% ± 1.1% for 2 mL elution. During this step, the addition of matrix without the oxidant solution leads to a decrease in yield. The best recovery has been obtained on HLB 2 mL and on Strata SDB-L (78.3% and 70.2%, respectively). It can be observed that the increase of the elution volume (1 to 2 mL of MeOH 80%) in this step allows an increase of the yield of the HLB cartridge from 61.3% to 78.3%. This step was only carried out on 20 mL samples, as the objective here was principally to see whether the addition of matrix would result in a decrease in cartridge yield.

Finally, when testing the “Lemieux1” protocol on uncontaminated fresh fish matrix enzymatically digested with trypsin, oxidized and spiked with MMPB prior to SPE purification, the average yields obtained were as follows: for 20 mL samples, the yields were of 13.2% ± 1.3% for Strata SDB-L, of 8.0% ± 0.2% for HLB with 1 mL elution and of 10.6% ± 0.7% for HLB with 2 mL elution. For samples requiring 35 mL of enzymatic digestion and oxidation solution, the yield of Strata was 10.4% ± 0.5%, that of HLB 1 mL elution was 2.6% ± 0.2% and that of HLB with 2 mL elution was 3.3% ± 0.2%. In this case, having matrix and oxidant solution leads to a strong decrease in the yields obtained compared to the previous experiments on SPE cartridges.

In conclusion, on this SPE experiment, the SampliQ cartridge showed poor results on the test involving H_2O spiked with MMPB and therefore was not considered for the other tests. The other two cartridges (HLB and Strata SDB-L) always had recovery percentages above 60% for the tests on H_2O, oxidant solution, H_2O and matrix. But when tested with the complete protocol (oxidant solution and matrix), the recovery of these cartridges dropped below 15%. In these tests, the best yields were obtained with Strata on both volumes of oxidant solution and it is this SPE cartridge which was used in the following tests.

2.4.1.2. Lemieux oxidation method on fresh or freeze-dried matrices

Salmon samples (fresh and freeze-dried) were spiked directly with MMPB to estimate SPE and evaporation efficiencies on these two types of matrices (**Table 7**). For the 1 g test portion of fresh salmon and the 340 mg freeze-dried test portion (obtained from 1 g of fresh salmon) spiked with MMPB (100 ng/g) after blank matrix oxidation and before the SPE step ("spiking #1”), the yields were respectively 9.2% and 14.9% for the SPE step and 1.3% and 3.5% for the SPE and evaporation steps combined. For a test portion of 1.7 mg of freeze-dried salmon (obtained from 5 g of fresh fish) spiked at the same concentration with MMPB, the yields were 20.3% for SPE only and 4.7% for SPE and evaporation step. For fresh salmon, a second spiking experiment at a concentration of MMPB of 50 ng/g (**Figure 15**; “spiking #2”) was tested after oxidation and SPE, to test the loss during the evaporation step only. The yield obtained was of 0.6% for this test.

In this part, important losses of MMPB were observed on fresh matrix both during SPE alone (90.8% of loss) and for the evaporation step alone (99.4% of loss). These losses were also observed but to a lesser extent on freeze-dried matrix, whether on 1 g of fresh matrix equivalent (85.1% of loss for SPE alone and 96.5% of loss for evaporation alone) or on 5 g of fresh matrix equivalent (79.7% of loss for SPE alone and 95.3% of loss for evaporation alone).

Table 7: Comparison of the yield of Lemieux oxidation method on MMPB spiked salmon matrices (n=2, for fresh salmon samples and n=3, for freeze-dried salmon samples).

	Yield (%)			
	SPE		Evaporation	
	Mean	SD	Mean	SD
1 g fresh salmon fillet spiked #1	9.2	0.8	1.3	0.5
1 g fresh salmon fillet spiked #2	n.d.	n.d.	0.6	0.5
340 mg freeze-dried salmon filet spiked #1	14.9	0.6	3.5	0.6
1.7 g freeze-dried salmon filet spiked #1	20.3	1.4	4.7	0.3

Each salmon sample followed the MMPB workflow described in "Lemieux1" for freeze-dried mollusc tissues (pre-treatment, oxidation, SPE, evaporation) and were spiked at different steps to evaluate the yields and matrix effects of each step (n.d.: not determined).

For the second experiment, the entire Lemieux protocol was tested including the oxidation of MCs to MMPB (**Table 8**), and the yields were determined at each step of the protocol (with a solvent MMPB calibration curve). Salmon samples, either fresh (1 g fresh mass) or freeze-dried (equivalent of 1 g and 5 g fresh mass) were spiked with MC-LR at the concentration of 477.8 ng/g. Concerning the oxidation step, the yields were much higher for the fresh samples (48.4%) than for the freeze-dried ones (8.0% and 5.6% for 1 g and 5 g of fresh mass equivalent, respectively). Concerning the SPE step, the best yields were obtained this time on freeze-dried samples (with 49.0% and 27.3% for 1 g and 5 g of fresh material equivalent) and 9.1% yield for fresh salmon samples. For both steps combined (oxidation + SPE), the yields were 4.4% for the 1 g fresh sample and 3.9% and 1.5% for the freeze-dried samples (1 g and 5 g fresh equivalent, respectively). The final yield after oxidation, SPE and evaporation was 0.2% for the fresh salmon and 0.4% and 0.2% for the freeze-dried samples (1 g and 5 g fresh equivalent).

Table 8: Comparison of the yields of the MMPB method according to the nature of the matrix: fresh or freeze-dried during the different steps of the Lemieux1 protocol (n=3).

	Yield (%)							
	Oxidation		SPE		Oxidation & SPE		Oxidation + SPE + evap.	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
1 g fresh salmon filet spiked with MC-LR [477.8 ng/g]	48.4	1.0	9.1	0.3	4.4	0.3	0.2	0.1
340 mg freeze-dried salmon filet spiked with MC-LR [477.8 ng/g]	8.0	0.8	49.0	12.3	3.9	0.6	0.4	0.1
1.7 g freeze-dried salmon filet spiked with MC-LR [477.8 ng/g]	5.6	0.9	27.3	2.3	1.5	0.1	0.2	0.01

Samples were oxidized following the optimized "Lemieux1" protocol on fish matrices.

2.4.1.3. Quantification method: calibration curve in solvent versus a matrix-matched calibration curve

As described in **Table 9,** for the first quantification method using the MMPB calibration curve in solvent, the oxidation yields were 66.7% for the MC-LR spiked at the concentration of 477.8 ng/g and 19.5% for 2.3 µg/g. On these same samples, when quantified with a MMPB matrix-matched calibration curve, the oxidation yields were 145.7% and 75.5% for the spiking concentrations of 477.8 ng/g and 2.3 µg/g, respectively. For the SPE step, the yields were 57.2% and 45.6% for the samples quantified using the MMPB calibration curve in the solvent (for both spiking concentrations, respectively). Using the other method of quantification (MMPB matrix-matched calibration curve), the yields obtained were 84.1% and 77.9% (for low and high sample spiking concentrations, respectively). Finally, after evaporation of the samples, the final yields obtained were 3.8% and 1.1% for the samples quantified with the calibration curve in solvent and 15.6% and 11.7% for the samples quantified with the matrix-matched calibration curve. As shown in **Figure 16**, there is a difference in peak area on average of 22-fold between the two types of calibration curve. The signal intensity is suppressed by a factor of 22 in the salmon matrix, which corresponds to a signal suppression of 96% in the matrix compared to the solvent (MeOH).

Table 9: Quantification of salmon fillet samples spiked with MC-LR at two concentration levels (477.8 ng/g and 2.3 µg/g, equivalent to 100 ng/g and 500 ng/g of MMPB, respectively) and extracted with the "Lemieux 1" protocol.

A- Calculation using the MMPB calibration curve in MeOH									
		Yield (%)							
	eq. MMPB	**Oxidation**		**SPE**		**Oxidation & SPE**		**Final Yield**	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Fresh salmon spiked with MC-LR [477.8 ng/g]	*100 ng/g*	66.7	12.1	57.2	6.6	37.6	2.0	3.8	0.3
Fresh salmon spiked with MC-LR [2.3 µg/g]	*500 ng/g*	19.5	1.1	45.6	4.8	8.9	1.4	1.1	0.2
B - Calculation using the MMPB matrix-matched calibration curve									
		Yield (%)							
	eq. MMPB	**Oxidation**		**SPE**		**Oxidation & SPE**		**Final Yield**	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Fresh salmon spiked with MC-LR [477.8 ng/g]	*100 ng/g*	146	4.7	84.1	1.7	150	47	15.6	7.6
Fresh salmon spiked with MC-LR [2.3 µg/g]	*500 ng/g*	75.5	25.9	77.9	20.2	62.3	32.5	11.7	4.9

Two methods of quantification, widely used, were applied to these same samples (A: MMPB calibration curve in MeOH, and B: MMPB matrix-matched calibration curve) (n=3). Equivalence between mass MC-LR and MMPB: mass 1 mol MC-LR = 0.209 x masse 1 mol of MMPB

2.4.2. Comparison of the two protocols of Lemieux oxidation on different samples

The two Lemieux protocols were compared on different aquatic samples, fish (fillet and liver) and mussels (**Table 10**). The first series was done on salmon fillet spiked with either MC-LR at a concentration of 2.4 µg/g or MC-RR at a concentration of 2.5 µg/g. For the "Lemieux1" protocol, the yields obtained with the matrix-matched calibration alone were 4.1% and 3.1%, for MC-LR and MC-RR, respectively. For the same samples, the use of the matrix-matched calibration curve with an addition an internal standard d_3-MMPB increased the yields of the method to 38.5% and 28.1% for MC-LR and -RR, respectively.

These same spiked salmon samples also underwent Lemieux oxidation using the "Lemieux2" protocol, employing the method of quantification with a MC-LR calibration curve in water oxidized to MMPB, and incorporation of d_3-MMPB. The yields of the samples were 105.4% and 99.8% for MC-LR and MC-RR, respectively. For the "Lemieux2" protocol, a second method was used with the same samples, by using as for "Lemieux1" protocol, a MMPB matrix-matched calibration curve (prepared using MMPB standard and not from oxidized MC-LR) and incorporating d_3-MMPB. The yield obtained with this quantification method were 69.6% and 61.4% for MC-LR and MC-RR, respectively.

Both oxidation methods were tested on carps naturally exposed to MC producing cyanobacteria. The "Lemieux1" protocol returned positive results for fillet of each of the fish, while all the livers samples were under the limit of quantification of 35 µg of MMPB/kg. Fillets were below the LOQ with the first method of quantification (matrix-matched calibration curve) for the carps fished on the 18th, the 22nd and the 24th of September 2020, respectively. With the second method of quantification (matrix-matched calibration curve with IS) of the "Lemieux1" protocol, results were 38.9, 38.3, 39.2 µg/kg for the carps' fillets fished on the 18th, the 22nd and the 24th of September, respectively. These results were not in agreement with those obtained using the "Lemieux2" protocol (with the oxidized MC-LR calibration curve + d_3 MMPB), since the fillets were below the limit of quantification of 14 µg MMPB / kg and the liver samples were quantified at 27.5, 19.1 and 17.9 µg/kg for the carps fished on the September 18th, 22nd and 24th, respectively (**Table 10**).

Freshwater mussel samples fed with MC producing cyanobacteria were also quantified using both Lemieux oxidation protocols. Two series of whole body of freshwater mussels (*Anondonta anatina*) were first tested. For the D1 samples, the "Lemieux1" protocol with matrix-matched MMPB calibration curve gave 700 µg/kg, "Lemieux1" protocol with matrix-matched MMPB calibration curve incorporating d_3-MMPB gave 1230 µg/kg and the "Lemieux2" protocol with the calibration curve prepared from oxidized MC-LR indicated a concentration of 1380 µg/kg. The second whole body E21 sample was quantified at 40, 50 and 100 µg/kg with "Lemieux1" matrix-matched MMPB calibration curve and matrix-matched MMPB calibration curve & IS and with the "Lemieux2" protocol, respectively. For digestive gland samples, D1 was quantified at 4520, 630 and 480 mg/kg; E21-1 at 320, 540, 3950 µg/kg and E21-2 at 32180, 2890 and 6170 µg/kg with "Lemieux1" matrix-matched calibration and matrix-matched calibration & IS and "Lemieux2" protocol, respectively.

2.5. Discussion

2.5.1. Comparison of three SPE cartridges for "Lemieux1" oxidation method on fresh fish matrices

Three types of cartridges were compared (SampliQ [25], HLB [20, 22]; and Strata SDB-L [27]) with tests progressively approaching the complexity of Lemieux's oxidation protocol. SampliQ extract indicated that the cartridge did not effectively retain MMPB into the aqueous sample (either on a sample volume of 20 or 35 mL, with recovery < 32% for water sample spiked with MMPB) and was subsequently dismissed. The recovery of 81.6% was found on the same cartridge on aqueous sample spiked with 50 ng of MMPB (elution with 80% MeOH) in a previous study [25], was not confirmed in our tests neither with aqueous nor with biological samples. The difference in recovery could be explained by the larger loading volume used here (20 to 35 mL versus a few mL) and the differences in the state of matrix (fresh versus freeze-dried) as well as the quantity used (1 g fresh versus 60 or 100 mg of freeze-dried materials). The much larger amount of salt (used in "Lemieux1") can therefore have an increased ion-suppressing effect, resulting in a lower yield, and the larger amount of matrix (in "Lemieux1" can in one case be more representative of the sample, but the quantity used also results in a more important matrix effect.

The recoveries obtained on the HLB cartridge with the "Lemieux1" protocol were both the lowest (10.6% and 3.3%, respectively) and most variable (7.3% decrease in recovery) between the two volumes of samples tested (20 and 35 mL) These results are well below those obtained in a previous study reporting recovery at the SPE stage in the range of 70 to 83% [22]. As for the previous cartridge, the reasons for these differences could be in the differences of loading volume, state or quantity of matrix. The Strata SDB-L cartridge obtained the best recovery in test No4 on the "Lemieux1" protocol with 13.2% and 10.4% for sample volumes of 20 and 30 mL, respectively. It is the best performing cartridge in tests that most closely resemble the real conditions of Lemieux oxidation, even though the yields obtained here are lower than those obtained in a previous study (91 - 98% of recovery) [27]. The results obtained during these tests can be explained by several factors, notably the influence of the volume of the sample and especially the combination of matrix and oxidizing solution, which seems to be at the origin of the drop in recovery between tests No1 (H2O spiked with MMPB) or No2 (oxidant solution spiked with MMPB) and test No4 (salmon fillet matrix spiked with MMPB). The use of an internal standard such as d_3-MMPB could have attenuated the important matrix effects observed during these SPE tests as it allowed to increase the yields of the "Lemieux1" method in the following section. Moreover, the type/brand of LC-MS/MS may also be important and generate variable the matrix effects. Furthermore, the use of an apparatus with a better sensitivity could allow to lower the injection volume and thus to reduce the matrix effects (*e.g.* ion suppression) encountered with Lemieux oxidation.

2.5.2. Comparison of fresh and freeze-dried fish matrices on "Lemieux 1" protocol

The majority of Lemieux oxidation protocols reported in the scientific literature have been performed on freeze-dried matrix [19]. Here, the objective was not only to develop a method on fresh aquatic matrix, but also to compare the performances of "Lemieux1" protocol

on fresh and freeze-dried matrices. The test where 1 g of fresh material or freeze-dried equivalent was spiked with MMPB before SPE and before evaporation step, showed slightly higher results on freeze-dried matrix (14.9% for freeze-dried matrices against 9.2% on fresh matrix, **Table 7**. These results confirm the recoveries observed on the optimization and comparison of SPE cartridges in the previous section, which was 10.4% on Strata SDB-L on fresh fish matrices with samples volume of 20 mL.

In the second experiment, the entirety of “Lemieux 1” protocol was tested and the recovery of its different steps was assessed on either fresh or freeze-dried salmon fillet spiked with MC-LR. The recovery of the oxidation step was much higher for the fresh samples than for the freeze-dried ones (48.4% and 8.0%, respectively) and inversely the SPE step showed higher yields when tested on freeze-dried matrices than on fresh matrix (49.0% and 9.1%, respectively). A similar trend was observed for fresh or freeze-dried salmon fillet during the evaporation step with significant losses (95.5% and 89.7, respectively). This high loss of analytes during this step is probably not linked to a degradation of the MMPB during the evaporation at 40°C (not observed with the other protocol "Lemieux2" where the evaporation temperature is 60°C) but could be due to problems of resolubilization or to the amplification of matrix effects related to the salts used during the oxidation step which are concentrated during the evaporation. This step was not kept for the optimized protocol and the analysis was performed after elution of the cartridges with 5 mL of MeOH. This decision allows to overcome the important losses encountered during the evaporation, but a 25-fold dilution factor can be encountered before analysis (volume of 200 µL after evaporation in the original “Lemieux1” protocol versus 5 mL in the optimized “Lemieux1” protocol without the evaporation step).

Table 10: Comparison of two MMPB protocols ("Lemieux1" and "Lemieux2" tested on three types of matrices (salmon filet spiked with MC-LR, filet and liver of naturally contaminated carp, digestive gland or whole body of freshwater mussels *A. anatina*) (n=3, for each types of matrices).

	Lemieux1				**Lemieux2**			
	Matrix-matched calibration curve		**Matrix-matched calibration curve + d_3-MMPB**		**Oxidized MC-LR calibration curve + d_3 MMPB**		**Matrix-matched calibration curve + d_3-MMPB**	
				Yield (%)				
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Salmon spiked with MC-LR [2.4 µg/g]	4.1	0.5	37.5	8.8	105.4	3.1	69.6	3.7
Salmon spiked with MC-RR [2.5 µg/g]	3.1	0.1	28.1	2.2	99.8	2.8	61.4	3.6
				MMPB (µg/kg)				
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Naturally contaminated carp 18sept - Filet	<LOQ	/	38.9	0.5	<LOD	/	n.d	n.d
Naturally contaminated carp 18sept - Liver	<LOD	/	<LOD	/	27.5	5.4	n.d	n.d
Naturally contaminated carp 22sept - Filet	<LOQ	/	38.3	1.0	<LOD	/	n.d	n.d
Naturally contaminated carp 22sept - Liver	<LOD	/	<LOD	/	19.1	0.7	n.d	n.d
Naturally contaminated carp 24sept - Filet	<LOQ	/	39.2	0.2	<LOD	/	n.d	n.d
Naturally contaminated carp 24sept - Liver	<LOD	/	<LOD	/	17.9	3.4	n.d	n.d
				MMPB (µg/kg)				
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Anondonta D1 whole body	700	50	1200	90	1400	50	n.d	n.d
Anondonta E21 whole body	40	5	50	9	100	10	n.d	n.d
Anondonta D1 digestive gland	4500	80	600	3	500	100	n.d	n.d
Anondonta E21-1 digestive gland	300	3	500	6	4000	300	n.d	n.d
Anondonta E21-2 digestive gland	32200	1400	2900	140	6200	1200	n.d	n.d

2.5.3. Comparison of solvent calibration curve and matrix-matched calibration curve on “Lemieux 1” protocol

There are different quantification strategies in the literature: using a calibration curve in solvent [25, 28, 29], a matrix-matched calibration curve [23, 30-33], with or without IS. To our knowledge, no study has investigated the influence of a calibration and compared so many different methods on different protocols.

Firstly, regardless of the calibration method tested, better recoveries have been observed when spiking fresh salmon fillet samples with a lower concentration of MC-LR (**Table 9**). This trend is particularly pronounced in the oxidation step with yields of 66.7% (or 145.7% with quantification method B: MMPB matrix-matched calibration curve) when spiking with 477.8 ng/g of MC-LR while only 19.5% (or 75.5% with quantification method B) recovery when spiking the same type of samples with a higher concentration of MC-LR (2.3 µg/g). This difference is also true for the next steps of the Lemieux oxidation (SPE and final yield). This phenomenon could be due to an insufficient concentration of oxidant solution or an oxidation threshold effect from a certain quantity of MCs to be oxidized.

It is also worth noting that the SPE recoveries in this experiment are better (on average 51.4% for calibration method A and 81% average for method B) than in the previous experiments (10.4% and 13.2%, **Figure 17**; 9.2%, **Table 7**; 9.1%, **Table 8)**. Switching from solvent calibration to matrix-matched calibration curve (method B), followed by the addition of an internal standard, enabled us to better compensate for interferences, in particular the matrix effect encountered during Lemieux oxidation. This could partly explain the improved yields of the SPE step. An additional strategy could also be to use a MC-LR oxidized range (as in “Lemieux2”) to establish the linear range for the entirety of the method.

Regarding the comparison of the two calibration methods (**Figure 16**), it was observed that the signal decreased by 22-fold between calibration curve in MeOH and matrix-matched calibration curve. This matrix effect of -96% is close to others matrix effects found in the serum and tissue of aquatic snail samples from -63% to -84% [22]. Others studies have shown weaker matrix effect, for example in a precedent study on rat and chicken liver where matrix effects were accessed to -41.8% [34] or conversely, enhancement matrix effects leading to a recovered signal of 122% for the intestines and 142% for the muscles of Rainbow trout or to an enhancement of signal of 300% on *Dreissena polymorpha* tissues [25, 32].

2.5.4. Comparison of “Lemieux1“ and “Lemieux2“ oxidation protocols on different aquatic matrices

Due to the moderate yields (**Table 9**) of the "Lemieux1" method (but not unusual in the context of Lemieux oxidation [19]) and to have more hindsight on the performance of this protocol, the Lemieux 1 and 2 protocols were then compared to samples spiked with MC-LR and samples naturally or laboratory contaminated. For each oxidation protocol, two different quantification methods were applied and tested (for "Lemieux1": matrix-matched MMPB calibration curve and matrix-matched MMPB calibration curve + d_3-MMPB; for "Lemieux2": oxidized MC-LR calibration curve + d_3-MMPB and matrix-matched MMPB calibration curve

+ d_3-MMPB). This highlights the diversity of existing possibilities but also the influence that this step can have on the results of the method.

For “Lemieux 1”, the use of the IS d_3-MMPB has improved the recovery of the method from 4.1% to 37.5% for salmon spiked with MC-LR and from 3.1% to 28.1% for salmon spiked with MC-RR. For “Lemieux2”, the results with the oxidized MC-LR calibration curve + d_3-MMPB were the best obtained during this experiment (105.4% and 99.8%, for MC-LR spiked salmon and MC-RR spiked salmon, respectively). However, this quantification method is influenced by both oxidation and extraction yields and does not take into account the matrix effects of the samples as the calibration curve is done in water. The second method of calibration (matrix-matched calibration curve) allows to take into account the matrix effects without being influenced by the oxidation and extraction yields. With this second calibration method, the recoveries determined for the same spiked salmon samples were of 69.6% and 61.4%, for MC-LR and MC-RR, respectively. A difference of 35.5% and 38.4% has been observed between the two calibration methods, explained by the spiking of the calibration curve after oxidation in the matrix of interest.

To compare “Lemieux1” and “Lemieux2” protocols, the same calibration method (matrix-matched calibration curve + d_3-MMPB) has been applied to each protocol on the same blank salmon matrix spiked with either MC-LR or -RR. The “Lemieux2” protocol gave better recoveries on these two types of samples (69.6% and 61.4%, respectively) than the “Lemieux1” protocol (37.5% and 28.1%, respectively). This variability between the two protocols illustrates the complexity of Lemieux oxidation and the importance of both protocol comparison and the choice of calibration method, which is often lacking in studies on the subject. In addition to giving better recoveries, it can be added that this "Lemieux2" protocol can allow, due to smaller volumes of oxidant solution and shorter incubation times (1 h versus 4 h), to treat simultaneously a larger number of samples as well as a greener side by using smaller quantities of reagents than the “Lemieux1” protocol. It is however important to highlight that the amount of matrix used in protocol 2 of 50 mg may pose problems in terms of representativeness of the contamination of a sample and in the context of poorly contaminated samples such as fish fillets may also be too low to identify the presence of MCs [25, 35, 36]. One should take into consideration the small sample weight by subsampling a larger sample sufficiently and homogenizing it fully.

On naturally contaminated carp fillet and liver samples, the "Lemieux1" protocol detected total MCs in the fillets, and lower levels of total MCs in the livers (< LOQ). Conversely, the second protocol found more total MCs in liver samples than in fillets. Since MCs are known to accumulate more in the liver than in the muscle [37-40], it is surprising that the "Lemieux1" protocol detected more total MCs in the fillet than in the liver. The initial aim of the study was to optimize a Lemieux1 oxidation protocol on fresh fish muscle matrices. This protocol, which requires a larger sample size (1 g vs. 0.05 g for "Lemieux2"), was not optimized for liver analysis, which may partly explain these results. The liver matrix is difficult to analyze due to its phospholipid fatty acids composition [27, 41]. On the contrary, the “Lemieux2” protocol was applied on a range of diversified matrices (water, lyophilized blooms, mallard, dog, salmon, carps, dolphins, periphyton) and types of tissues (whole fish, liver, bile, kidney,

urine, hair, vomitus and blood) and seems to be a more generalized protocol [21, 23, 42-44] even if its 0.05 g sample size seems to be rather small, particularly in order to be representative of the sample as a whole, and in comparison with the test sample used for CRMs.

Finally, regarding the analyses conducted on freeze-dried *A. anatina* mussel samples laboratory-exposed to MC-producing cyanobacteria, we observed quite similar results between the two calibration methods of the "Lemieux1" protocol (except for D1 digestive gland and E21-2 digestive gland where the values of total MCs detected are more important in the calibration method that does not use IS). A similar trend is observed between the results of the two protocols (second calibration method of the "Lemieux1" protocol and "Lemieux2" protocol) especially on the Anondonta whole body samples and on the D1 and E21-1 digestive gland samples. Also, more variability is observed on the digestive gland sample E21-2 with values of 32.2, 2.89 and 6.17 mg/kg for “Lemieux 1” with both calibration methods and “Lemieux 2”, respectively.

2.6. Conclusion

The "Lemieux1" protocol originally developed on freeze-dried matrix was optimized on fresh fish matrix, in particular the SPE step where 3 different SPE cartridges were compared. The Strata SDB-L cartridge was preferred to HLB and SampliQ. In addition, other steps were also modified such as the evaporation step which was not kept in this protocol because of the losses encountered during this step (>90% loss). Different calibration methods were tested: solvent calibration range and matrix-matched calibration range with or without IS (d_3-MMPB) which allowed highlighting matrix effects encountered on the salmon fillet matrix of -95%. The use of matrix-matched calibration curve presented the advantage of taking into account the important matrix effect affecting MMPB determination. The optimizations made to the Lemieux1 protocol helped identify the optimal experimental conditions.

This optimized "Lemieux1" protocol was then compared to the "Lemieux2" protocol, which uses a smaller test portion, smaller reagent volumes, an additional purification step using SLE and a calibration curve of MC-LR oxidized to MMPB with d_3-MMPB as internal standard. The "Lemieux2" protocol was selected as it gave better recoveries (>60%) and for the feasibility of the method (greener, quicker, less cumbersome).

In future work, it would be interesting to compare this "Lemieux2" protocol, which allows an efficient quantitative estimation of the total forms of MCs, to an alternative method of extraction and analysis of the total forms of MCs, such as deconjugation at basic pH, which allows a good qualitative estimation of the toxin profile of a sample while keeping the identity of the MCs variants present in the sample.

2.7. Aknowledgements

The author thanks ANSES and the doctoral school ABIES URCA for the funding of this work and the colleagues of the Pesticides and Marine Biotoxins (PBM) unit of ANSES for their help during the experiments.

2.8. References

1. Chorus, I. and M. Welker, *Toxic Cyanobacteria in Water*. Second edition ed. 2021, London: World Health Organization. 859.

2. ANSES, *Évaluation des risques liés aux cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux douces*, in *Avis de l'Anses- Rapport d'expertise collective*. 2020. p. 495.

3. Schopf, J.W., *The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage*, in *The Ecology of Cyanobacteria*, Springer, Editor. 2002: Dordrecht. p. 13-35.

4. Bouaïcha, N., et al., *Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins.* Toxins, 2019. **11**(12): p. 714.

5. Hastie, C.J., et al., *Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1726**(2): p. 187-93.

6. Maynes, J.T., et al., *Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins.* J Mol Biol, 2006. **356**(1): p. 111-20.

7. Campos, A. and V. Vasconcelos, *Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells.* Int J Mol Sci, 2010. **11**(1): p. 268-287.

8. Craig, M., et al., *Molecular mechanisms underlying he interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases.* Biochem Cell Biol, 1996. **74**(4): p. 569-78.

9. Liu, J. and Y. Sun, *The role of PP2A-associated proteins and signal pathways in microcystin-LR toxicity.* Toxicol Lett, 2015. **236**(1): p. 1-7.

10. McLellan, N.L. and R.A. Manderville, *Toxic mechanisms of microcystins in mammals.* Toxicol Res (Camb), 2017. **6**(4): p. 391-405.

11. Vichi, S., F.M. Buratti, and E. Testai, *Microcystins: Toxicological Profile*, in *Marine and Freshwater Toxins*, P. Gopalakrishnakone, et al., Editors. 2016, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 219-238.

12. Buratti, F.M., et al., *Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation.* Arch Toxicol, 2017. **91**(3): p. 1049-1130.

13. Kim, R.B., *Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition.* Eur J Clin Invest, 2003. **33 Suppl 2**: p. 1-5.

14. Wood, R., *Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature.* Environ Int, 2016. **91**: p. 276-82.

15. Zhang, D., et al., *Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health.* Sci Total Environ, 2009. **407**(7): p. 2191-9.

16. Lance, E., et al., *Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to Physa (= Physella) acuta.* Sci Total Environ, 2010. **408**(17): p. 3560-8.

17. Lance, E., et al., *Evidence of trophic transfer of microcystins from the gastropod Lymnaea stagnalis to the fish Gasterosteus aculeatus.* Harmful Algae, 2014. **31**: p. 9-17.

18. Massey, I.Y., et al., *A Mini-Review on Detection Methods of Microcystins.* Toxins (Basel), 2020. **12**(10): p. 641.

19. Bouteiller, P., et al., *Analysis of Total-Forms of Cyanotoxins Microcystins in Biological Matrices: A Methodological Review.* Toxins (Basel), 2022. **14**(8).

20. Lance, E., et al., *Accumulation of free and covalently bound microcystins in tissues of Lymnaea stagnalis (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure.* Environ Pollut, 2010. **158**(3): p. 674-80.

21. Foss, A.J., et al., *Analysis of free and metabolized microcystins in samples following a bird mortality event.* Harmful Algae, 2018. **80**: p. 117-129.

22. Neffling, M.R., E. Lance, and J. Meriluoto, *Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Environ Pollut, 2010. **158**(3): p. 948-52.

23. Foss, A.J., et al., *Diagnosing Microcystin Intoxication of Canines: Clinicopathological Indications, Pathological Characteristics, and Analytical Detection in Postmortem and Antemortem Samples.* Toxins (Basel), 2019. **11**(8): p. 456.

24. Lepoutre, A., et al., *Free or Protein-Bound Microcystin Accumulation by Freshwater Bivalves as a Tool to Evaluate Water Contamination by Microcystin-Producing Cyanobacteria?* Applied Sciences, 2020. **10**(10): p. 3426.

25. Cadel-Six, S., et al., *Detection of free and covalently bound microcystins in different tissues (liver, intestines, gills, and muscles) of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: method characterization.* Environ Pollut, 2014. **185**: p. 333-9.

26. Roy-Lachapelle, A., *Nouvelles stratégies pour l'analyse des cyanotoxines par spectrométrie de masse*, in *Département de Chimie, Faculté des Arts et Sciences*. 2015, Université de Montréal.

27. Roy-Lachapelle, A., et al., *Total Analysis of Microcystins in Fish Tissue Using Laser Thermal Desorption-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-High-Resolution Mass Spectrometry (LDTD-APCI-HRMS).* J Agric Food Chem, 2015. **63**(33): p. 7440-9.

28. Paerl, H.W., et al., *Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria.* Scientific World Journal, 2001. **1**: p. 76-113.

29. Wu, X., et al., *Rapid quantification of total microcystins in cyanobacterial samples by periodate-permanganate oxidation and reversed-phase liquid chromatography.* Anal Chim Acta, 2009. **651**(2): p. 241-7.

30. Williams, D.E., et al., *Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and Dungeness crab larvae.* Chem Res Toxicol, 1997. **10**(4): p. 463-9.

31. Williams, D.E., et al., *Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, Mytilus edulis, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues.* Toxicon, 1997. **35**(11): p. 1617-25.

32. Pires, L.M., et al., *Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, Dreissena polymorpha.* Aquat Toxicol, 2004. **69**(4): p. 385-96.

33. Vudathala, D., et al., *Analysis of microcystin-LR and nodularin using triple quad liquid chromatography-tandem mass spectrometry and histopathology in experimental fish.* Toxicon, 2017. **138**: p. 82-88.

34. Ott, J.L. and W.W. Carmichael, *LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues.* Toxicon, 2006. **47**(7): p. 734-41.

35. Xie, L., et al., *Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment.* Environ Pollut, 2004. **127**(3): p. 431-9.

36. Soares, R.M., V.F. Magalhaes, and S.M. Azevedo, *Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in Tilapia rendalli (Cichlidae) under laboratory conditions.* Aquat Toxicol, 2004. **70**(1): p. 1-10.

37. Amé, M.V., et al., *Microcystin–LR, –RR, –YR and –LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina.* Harmful Algae, 2010. **9**(1): p. 66-73.

38. Tencalla, F. and D. Dietrich, *Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).* Toxicon, 1997. **35**(4): p. 583-95.

39. Ibelings, B.W., et al., *Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification.* Microb Ecol, 2005. **49**(4): p. 487-500.

40. Greer, B., et al., *Detection of freshwater cyanotoxins and measurement of masked microcystins in tilapia from Southeast Asian aquaculture farms.* Anal Bioanal Chem, 2017. **409**(16): p. 4057-4069.

41. Bolotaolo, M., et al., *Analysis of Covalently Bound Microcystins in Sediments and Clam Tissue in the Sacramento–San Joaquin River Delta, California, USA.* Toxins, 2020. **12**(3): p. 178.

42. Foss, A.J. and M.T. Aubel, *Using the MMPB technique to confirm microcystin concentrations in water measured by ELISA and HPLC (UV, MS, MS/MS).* Toxicon, 2015. **104**: p. 91-101.

43. Foss, A.J., et al., *Nodularin from benthic freshwater periphyton and implications for trophic transfer.* Toxicon, 2017. **140**: p. 45-59.

44. Brown, A., et al., *Detection of cyanotoxins (microcystins/nodularins) in livers from estuarine and coastal bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) from Northeast Florida.* Harmful Algae, 2018. **76**: p. 22-34.

Chapitre 4
Cinétique d'accumulation et d'élimination des MC-LR libres et liées aux protéines chez les carpes exposées lors d'épisodes de prolifération cyanobactérienne et lors d'expositions contrôlées aux MC

1. Synthèse des travaux

Les MC s'accumulent dans les organismes d'eau douce, y compris les poissons, sous une forme libre bien étudiée, mais aussi sous une forme liée aux protéines, encore très peu étudiée, bien qu'elle puisse constituer une forme d'accumulation majoritaire dans les tissus (18, 101, 150, 202, 229). En outre, la cinétique d'accumulation des deux formes dans la chair des poissons et le temps nécessaire à la dépuration ne sont pas clairs. Malheureusement, les données disponibles dans la littérature sont insuffisantes pour répondre pleinement à ces questions. Elles ont néanmoins permis de définir des fréquences de consommation de poisson à ne pas dépasser, en fonction de la contamination en MC-LR (le variant de MC la plus étudiée), pour les enfants et les adultes (13).

Le premier objectif de ce projet est de déterminer la cinétique d'accumulation et d'élimination de la MC-LR chez la carpe, dans des conditions contrôlées. Afin de tenir compte de l'existence de MC accumulées sous forme libre ou liés aux protéines, ces deux formes ont été Sanalysées par LC-MS/MS en utilisant les méthodes d'extraction des MC libres et totales sélectionnées lors de la thèse. Afin de contrôler les doses de MC administrées aux carpes juvéniles utilisées dans l'expérience, et de se rapprocher le plus possible des conditions d'exposition à un bloom de cyanobactéries en limitant au maximum la manipulation des poissons qui générerait un stress très important, l'option choisie en ce qui concerne la méthode d'administration est celle de l'alimentation volontaire. Des aliments imprégnés de MC-LR à la concentration souhaitée ont été générés après un travail préparatoire. De plus, les données disponibles dans la littérature portent sur l'administration d'une dose unique de MC à des poissons. Or, il n'est pas rare qu'une efflorescence cyanobactérienne dure plusieurs jours/semaines dans la nature, exposant les poissons à des doses répétées de MC, d'où le choix de doses répétées sur 7 jours dans notre étude

Par ailleurs, le second objectif du projet concernait l'accumulation de MC chez la carpe en conditions naturelles, dans le contexte d'épisodes de prolifération de cyanobactéries dans deux lacs, l'un en France et l'autre au Liban. En France, quatre carpes (et une perche) ont été échantillonnées en 2020 du 18 au 24 septembre suite à une prolifération de cyanobactéries dans le lac de Pannecière. Au Liban, quatre carpes ont été échantillonnées en mai 2021 lors d'un épisode de mortalités massives de poissons dans le lac Qaraoun. Des analyses de MC libres et totales ont été réalisées dans différents tissus des carpes échantillonnées, notamment les filets, les reins et les foies.

Différents tests préliminaires ont été réalisés dans l'objectif de développer un mode de contamination à la MC-LR de carpes par alimentation volontaire. Pour cela, deux types d'aliments pour poissons, la marque "Tropical" nommée ici "Red" et la marque "Tetra" nommée "Brown" ont été utilisés. La dose journalière de granulés, de masse équivalente, correspondait à trois et sept granulés pour les types "Red" et "Brown" respectivement. Les deux aliments ont été testés pour différents paramètres relatifs au dopage en MC-LR et à l'évolution dans l'eau :

- **Comportement des granulés dans l'eau** (ramollissement, résistance, dispersion) : les granulés ont été placés dans un bécher contenant de l'eau pour vérifier leur comportement après 1, 3 et 60 min. Ce test a montré que les deux types de granulés sont restés intacts même après 1 h dans l'aquarium, ce qui garantit que le poisson peut ingérer la totalité de la dose journalière (= trois granulés "Red" et sept granulés "Brown")

- **Quantité maximale de solution de MC-LR absorbée par les granulés** pour assurer la contamination : des tests ont été effectués par pas de 5 µL pour estimer la quantité maximale de liquide (eau avec 1 % d'éthanol) absorbée par des doses de trois et sept granulés et ont montré que la quantité maximale de liquide absorbée par les trois et sept granulés (dose journalière pour les types "Red" et "Brown" respectivement) est de 50 µL.

- **Extraction et efficacité de dosage de la MC-LR libre dans les granulés** (3 ou 5 granulés "Red" et 7 ou 10 granulés "Brown" ont été dopées avec 25 ng/mL de MC-LR et extraites avec la méthode développée dans le chapitre 2. Le taux de récupération d'extraction du MC-LR des granulés et les effets matrice pendant l'analyse LC-MS/MS ont été évalués. Les rendements d'extraction de MC-LR étaient d'environ 150 % pour les deux marques de granulés, et un effet matrice de suppression de -22,5 % a été observé pour "Red" (en moyenne sur les deux quantités d'aliments "red", n=6) et de -6,5 % pour "Brown" (en moyenne sur les deux quantités d'aliments "brown", n=6). Une plus grande variabilité entre les taux de récupération a été observée pour la MC-RR : entre 30 et 60 % pour "Red" et 60 % pour "Brown". De meilleurs taux de récupération ont été observés dans l'ensemble pour la MC-LR, le variant utilisé dans le reste de l'expérience.

- **Evolution de la quantité de MC-LR dans les granulés en fonction du temps de contact avec l'eau** : trois granulés "Red" ou sept granulés "Brown" ont été dopés avec de la MC-LR à 25 ng/mL. Une série de granulés a été séchée pendant 2 h 30 après le dopage, l'autre n'a pas été séchée avant l'extraction. Les deux séries ont ensuite été mises en contact avec de l'eau pendant 0, 1, 5, 10, 30 ou 60 min. Les résultats ont montré une meilleure rétention de la MC-LR avec les granulés "Brown", ainsi qu'avec une étape de séchage des granulés entre le dopage avec le MC-LR et l'immersion dans l'eau.

Les granulés "Brown" (marque Tetra) ont donc été sélectionnés pour la suite de l'expérimentation, avec un dopage avec une solution de 50 µL contenant de la MC-LR, suivi d'un séchage pendant 2 h 30.

Les données disponibles dans la littérature montrent que l'administration par gavage d'une dose unique de 0,6 µg de MC-LR par g de poisson entraîne une accumulation de la toxine dans les tissus (foie et muscle), sans mortalité observée (40), alors qu'une dose de 0,8 µg/g devient létale (107). Comme les conditions d'administration de doses répétées n'ont pas encore

été testées, il est nécessaire de déterminer d'abord la dose sans effet nocif observable (NOAEL) (répétée) par le biais d'une étude préalable. Une fois cette NOAEL déterminée, elle a été utilisée dans l'étude cinétique, permettant d'éviter l'euthanasie inutile des poissons et le risque de ne tirer aucune information de l'expérience en raison de la mortalité précoce des animaux.

Dans la pré-étude, trois doses ont d'abord été testées pour déterminer la NOAEL de MC-LR (0,08 ; 0,3 et 0,6 µg/g) chez des carpes juvéniles en les nourrissant volontairement tous les jours pendant 7 j. Quatre carpes juvéniles ont été utilisées pour tester chacune des trois doses de MC-LR, et quatre poissons non exposés ont servi de témoins. Comme aucune accumulation de MC totales n'a été détectée dans les filets de carpe, une deuxième pré-étude a été réalisée en suivant la même procédure avec deux autres concentrations de MC-LR testées (0,8 et 1,2 µg/g) chez des carpes juvéniles en les nourrissant volontairement chaque jour pendant 7 j. Aucune mortalité n'a été observée et de la MC-LR libre a été trouvée dans le muscle, le foie et le tube digestif.

Une étude cinétique utilisant la dose sélectionnée dans la pré-étude (1 µg/g) a ensuite été réalisée. Pour cela, un lot de carpes a été exposé quotidiennement à la concentration de 1 µg/g de MC-LR (6 réplicas) selon 7 pas de temps (1, 5 et 7 j d'exposition suivis de 1, 7, 14 et 21 j d'élimination), soit 42 poissons. Un lot de carpes de contrôle (4 réplicas) a été échantillonné au même moment, soit un total de 28 poissons. Ces pas de temps ont été choisis pour imiter la durée des épisodes de prolifération des cyanobactéries auxquels les carpes peuvent être exposées dans leur environnement naturel. Après exposition, les échantillons de tissus de poissons prélevés à chacune des deux étapes (intoxication et dépuration) ont été transférés au LSAL de l'Anses. L'extraction des MC libres et totales et l'analyse LC-MS/MS des échantillons devaient être réalisées dans le cadre d'une collaboration de recherche et d'un voyage au Canada du doctorant Pierre Bouteiller dans le laboratoire de C. Miles (CNRC). L'objectif était d'appliquer l'oxydation de Lemieux (Chapitre 3, ''Lemieux2''), avec un échange direct avec le Dr. A. Foss pour la détermination des MC totales. Comme la quantité de tissus collectés était faible, aucun échantillon de secours n'a pu être stocké, et tous les tissus ont été envoyés au Canada par un transporteur spécialisé dans l'expédition d'échantillons biologiques congelés. Malheureusement, suite à un dysfonctionnement durant le transport entre la France et le Canada, les échantillons ont été très endommagés et sont arrivés à destination en état de putréfaction. Ils ont néanmoins été analysés, mais pas de MC-LR, que ce soit sous forme libre ou totale, n'a été trouvée dans les tissus, à l'exception d'un échantillon de foie, qui a montré une quantité de MMPB légèrement supérieure à la limite de quantification (montrant une faible concentration de MC totales). Ces résultats négatifs sont très probablement liés aux mauvaises conditions de préservation des échantillons les rendant inexploitables.

Parmi les échantillons contaminés naturellement pendant des épisodes de proliférations de cyanobactéries, des foies de poissons du lac Qaraoun ont été sélectionnés comme matrice d'étude en raison du profil hépatotoxique des MC et de la capacité de cet organe à accumuler des toxines (12). Les foies des individus du lac de Pannecière n'ayant pas été échantillonnés, les reins ont été choisis à la place. Les filets disponibles pour tous les individus pêchés ont également été sélectionnés afin de comparer les valeurs de contamination obtenues entre les 2 types de tissus et les sites d'échantillonnage. Un échantillon a été considéré comme contaminé

lorsque sa concentration en MMPB dépassait 1,1 ng/mL (équivalent à la limite de quantification). Cela équivaut à une concentration MC-LR eq. de 5 ng/mL et à une contamination MC-LR eq. de 105 µg/kg. Ainsi, 9 des 23 échantillons de tissus contenaient des MC. Parmi les échantillons de Pannecière, le rein de 2 des 4 carpes et le filet de perche ont montré une contamination en équivalent MC-LR allant de 333 à 875 µg/kg, la concentration la plus élevée étant obtenue pour le filet de perche. Parmi les échantillons libanais, tous les foies échantillonnés présentaient une contamination en MC, avec des valeurs MC-LR eq. allant de 225 à 2045 µg/kg. Selon les individus, les filets étaient également contaminés, 2 des 4 carpes présentant des concentrations MC-LR eq. de 109 et 115 µg/kg.

L'article ci-dessous détaille les expérimentations réalisées en qui concerne la cinétique d'accumulation et d'élimination d'échantillons de poissons (carpes et perche) exposées en conditions contrôlées à la MC-LR ou en conditions naturelles à des cyanobactéries productrices de MC. Ce chapitre a été rédigé sous la forme d'un article comme le reste du manuscrit mais ne fera pas l'objet d'une soumission à un journal

2. Kinetics of accumulation and elimination of free and protein-bound MC-LR in carp exposed during cyanobacterial bloom episodes and during controlled exposures to microcystins

Pierre Bouteiller [1,2], Ronel Biré [2], Thierry Guérin [3], Emilie Lance [1,4,*]

[1] Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO, Unité Stress Environnementaux et BIOsurveillance des Milieux Aquatiques (SEBIO), BP 1039 F, 51687, Reims, Cedex, France
[2] ANSES, Laboratory for Food Safety, F-94701 Maisons-Alfort, France; ronel.bire@anses.fr
[3] ANSES, Strategy and Programs Department, F-94701 Maisons-Alfort, France; thierry.guerin@anses.fr
[4] UMR MNHN/CNRS MCAM, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75005 Paris, France
* Correspondence: emilie.lance@univ-reims.fr

2.1. Abstract

Microcystins (MCs) is a family of secondary metabolite produced by cyanobacteria. MCs accumulate in freshwater organisms, including fish, in a well-studied free form, but also in a protein-bound form, which receives very little attention, even though it could constitute the majority in tissues. In this study, the accumulation and depuration of free and total MCs was assessed in carps exposed daily by voluntary feeding to MCs at 1 µg/g for 7 days followed by a depuration period of 21 days. However, due to air transport malfunctions, the samples were damaged, which could explain why no free toxins were detected in fillets and liver, and only one liver sample showed total MCs accumulation levels of 20 ng/g. The second objective of the project concerned the accumulation of MCs in carp under natural conditions, in the context of cyanobacteria proliferation episodes in two lakes, one in France and one in Lebanon. Analyses of free and bound MCs were carried out in various tissues of the carp sampled, including fillets, kidneys and livers. Fish were analyzed for free and total MCs following episodes of toxin proliferation in a French lake and a massive fish kill episode in a Lebanese lake. Total MCs were detected in the kidneys of carp from the French lake, ranging from 333 to 875 µg/kg, and in the fillets of a perch at 333 µg/kg. In fish from the Lebanese lake, total MCs were analyzed in carp fillets (from 109 to 115 µg/kg) and livers (from 225 to 2045 µg/kg).

KEYWORDS: Microcystin; *Cyprinus carpio*, free and protein-bound toxins, accumulation, elimination.

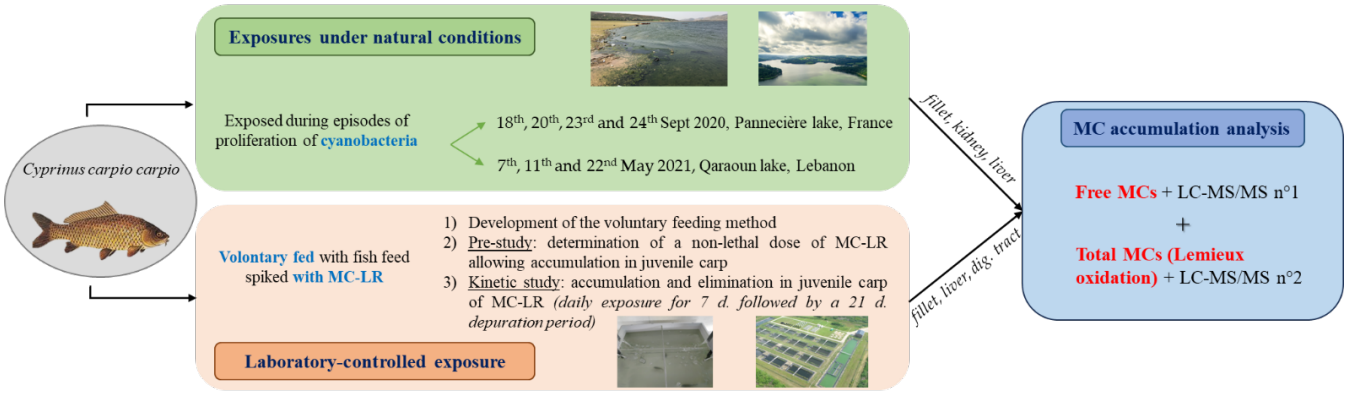


Figure 18: Graphical abstract

2.2. Introduction

The first objective of this project was to determine the kinetics of MC-LR accumulation and elimination in carp, under controlled conditions. To take account of the existence of MC accumulated in free or protein-bound form, these two forms were analyzed by LC-MS/MS using an extraction method for free toxins and the Lemieux oxidation method for extracting total MCs ("Lemieux 2", Chapter 3). In order to control the doses of toxins administered to the juvenile carp used in the experiment, and to get as close as possible to the conditions of environmental exposure to a cyanobacteria bloom while limiting to a minimum the handling of the fish, which would generate very considerable stress, the option chosen in terms of administration is that of voluntary feeding. In contrast to balneation, voluntary feeding makes it possible to control the doses of MC ingested by the fish; to do this, fish feed impregnated with the toxin at the desired concentration was generated. Moreover, as the few experiments carried out in the literature involved single-dose administration whereas it is not unusual for a cyanobacterial bloom to last several days/weeks in the wild, we choose to expose fish to repeated doses of MC over 7 days. Data available in the literature show that administration by gavage of a single dose of 0.6 µg of MC-LR per gram of fish leads to toxin accumulation in tissues (liver and muscle), with no observed mortality [12], whereas a dose of 0.8 µg/g becomes lethal [13]. As the conditions for repeated dose administration have not yet been tested, it is necessary to first determine the (repeated) no observable adverse effect level (NOAEL) through a pre-study. Once this NOAEL has been determined, it can be used in the study itself, thus avoiding unnecessary euthanasia of fish and the risk of drawing no information from the experiment due to early mortality of the animals.

The second objective of the project concerned the accumulation of MCs in carp under natural conditions, in the context of cyanobacteria proliferation episodes in two lakes, one in France and one in Lebanon. Analyses of free and bound MCs were carried out in various tissues of the carp sampled, including fillets, kidneys and livers.

2.3. Experimental

2.3.1. Standards and reagents

MC-LR was purchased from the NRCC (Halifax, NS, Canada). MMPB standard was purchased from Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) and deuterated-MMPB (d_3-MMPB) was generously provided by Dr. Miles and McCarron of the NRCC. Sodium periodate ($NaIO_4$), potassium permanganate ($KMnO_4$), formic acid (FA), acetic acid and hydrochloric acid (HCl) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic dihydrate, sodium bicarbonate, sodium bisulfite and were purchased from Merck-Sigma-Aldrich (Fontenay-sous-Bois, France). Strata-X 33 µm Polymeric Reversed phase 6 cc 100 mg and 200 mg and Novum SLE were purchased from Phenomenex (Le Pecq, France). Solvents (acetonitrile (ACN), methanol (MeOH)) and ethyl acetate used during this study were of LC-MS grade (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France).

2.3.2. Determination of the kinetics of free and protein bound MC-LR accumulation and elimination in carp, under controlled conditions

2.3.2.1. Development of an exposure method for juvenile carp by voluntary feeding

Two types of fish feed, "Tropical" brand named here "Red" and "Tetra" brand named "Brown" (**Figure 19**) were used. The daily dose of pellets, of equivalent mass, corresponded to 3 and 7 pellets for the "Red" and "Brown" types respectively. Both feeds were tested for various parameters relating to MC-LR doping and evolution in water:

- behavior of pellets in water (softening, resistance, dispersion): the pellets were placed in a beaker containing water to check their behavior after 1, 3 and 60 min.
- maximum volume of MC-LR solution absorbed by pellets to ensure contamination: tests were carried out in 5 µL steps to estimate the maximum volume of liquid (water with 1% ethanol) absorbed by doses of 3 and 7 pellets “Red” and “Brown” types respectively.
- extraction and dosing efficiency of free MC-LR in pellets (3 or 5 pellets “red” and 7 or 10 pellets “brown” were spiked with 25 ng/mL of MC-LR and extracted with the method described in 2.4.1.) The experience was done in triplicate for each condition.
- evolution of the quantity of MC-LR in pellets as a function of water contact time: 3 “Red” pellets or 7 “Brown” pellets were spiked with MC-LR at 25 ng/mL. A series of pellets were dried for 2 h 30 after spiking, the other was not dried before extraction. Both series were then put in contact with water during 0, 1, 5, 10, 30 or 60 min. The experience was done in triplicate for each condition. After being

in contact with the water for the expected duration, the pellets were extracted and analyzed.

Based on the results of these experiments the brown pellets were selected and impregnated with 50 µL of toxin solution. The pellets were dried at room temperature for 2.5 h before being given to the carps for voluntary feeding, as part of the pre-study as described in the following paragraph.

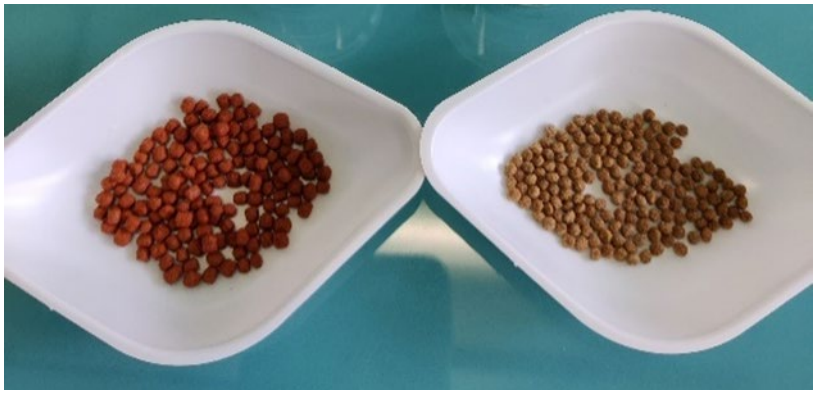


Figure 19: "Red" fish food on the left, "Brown" on the right.

2.3.2.2. Pre-study: determination of a non-lethal dose of MC-LR allowing accumulation in juvenile carp.

In the pre-study, three doses were first tested to determine the NOAEL of MC-LR (0.08, 0.3, and 0.6 µg/g) in juvenile carp by daily voluntary feeding for 7 days. Four juvenile carps were used to test each of the three doses of MC-LR. In addition, four unexposed fish were used as controls. As no accumulation of total toxins was detected in carp fillets, a second pre-study was realized following the same procedure with two other MC-LR concentrations tested (0.8, and 1.2 µg/g)

2.3.2.3. Kinetic study: accumulation and elimination in juvenile carp of free and protein bound MC-LR

A kinetic study using the dose selected in the pre-study (1 µg/g) was carried out, with a period of 7 d of daily exposure followed by 21 d of depuration. Six fish were sampled at different time points corresponding to each of the two phases, to monitor levels of accumulation (D1, D5 and D7) and elimination (D1, D7, D14 and D21) of MC-LR, in both free and protein-bound forms. Similarly, four "control" (unexposed) fish were euthanized and analyzed at the same times as for the exposed fish.

For this, one batch of carps was exposed daily to the concentration of 1 µg/g MC-LR (6 replicates) according to 7-time points (1, 5 and 7 days of exposure followed by 1, 7, 14 and 21 days of elimination), *i.e.* 42 carps (**Table 11**). In addition, 1 batch of control fish (4 replicates) were sampled at the same time point, for a total of 28 carps.

Table 11: Sampling plan for the experiment indicating the number of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) used during the MC-LR exposure ("Expo") and depuration ("Dep") phases.

	Expo D1	Expo D5	Expo D7	Dep D1	Dep D7	Dep D14	Dep D21	Total
Control	4	4	4	4	4	4	4	28
Exposed	6	6	6	6	6	6	6	42

2.3.3. Determination of the accumulation of free and total MCs in carps naturally exposed to cyanotoxins during bloom of cyanobacteria in Lake Pannecière (France) and lake Qaraoun (Lebanon)

Samples consisted of tissues from carps and a perch (taxonomy unspecified) previously ground on the Polytron PT 3100D and stored frozen in vials according to tissue type. Among the available samples, fish livers from Lake Qaraoun were selected due the capacity of this organ to accumulate MCs [14]. As livers were not sampled for individuals from Lac de Pannecière, kidneys were selected instead. Fillets available for all fished individuals were also selected in order to compare contamination values obtained between the 2 tissue types and sampling sites. Extractions of total forms of MCs were thus carried out on 23 samples referenced in **Table 14**: fillets (differentiated into proximal and distal fillets for carp) from 5 individuals from Pannecière (4 carp and 1 perch), kidneys from 4 carps, and fillets from 4 carps from Lake Qaraoun as well as livers from the same individuals.

2.3.4. Methods for extracting free and total MCs

2.3.4.1. Free MC extraction method

The protocol for extraction of the free MC was adapted from [15]. It included a 2 g test portion of fish fillets extracted with 10 mL MeOH. The mixture was ground at 10,000 rpm for 60 s with a PT 3100D Polytron, then vortexed for 15 min before centrifuging the samples at 15,000 g for 10 min. The supernatant was retained and the pellet was re-extracted with 10 mL MeOH and vortexed again for 15 min and centrifuged at 15,000 × g for 10 min. The two extracts were then pooled and filtered at 0.45 µm on nylon filters prior to LC-MS/MS analysis method 1.

2.3.4.2. Methods for extracting total MC by Lemieux oxidation

The Lemieux protocol used during this study was originally developed by Dr. Amanda Foss (Greenwater laboratories, FL, USA) [16, 17]. In this protocol, the d_3-MMPB IS (100 µg/L, 10 µL) was added to 50 mg of fresh or freeze-dried samples and the test portions were oxidized by K_2CO_3 (1 M, 500 µL), $KMnO_4$ (0.25 M, 1 mL) and $NaIO_4$ (0.25 M, 1 mL) for 1 h. Oxidation reaction was then quenched with sodium bisulfite (40%) until the solution turns from purple or brown to transparent.

Purification by SPE was done with Strata X 6 cc 200 mg, conditioned with 5 mL MeOH and 5 mL of H_2O; the samples were then loaded, and the cartridge was washed with 5 and 3 mL of H_2O before elution with 5 mL ACN 90%. After SPE, eluates were evaporated to dryness

under N_2 flow at a temperature under 60°C and reconstituted in HCl (0.1 M, 750 µL) to obtain a pH < 3.

A second purification step based on the principle of the liquid-liquid-extraction was achieved with solid-liquid extraction (SLE) Novum 6 cc cartridges. The samples were loaded into the cartridge with a slight vacuum to move the samples into the cartridge. After 10 min of contact between the SLE adsorbent and the extract, analytes were eluted with 2 × 2.5 mL of ethyl acetate. The eluates were evaporated to dryness (under N_2 flow, heat < 60°C) and reconstituted in 1 mL of 5% aqueous MeOH, sonicated, and filtered (0.2 µm, PVDF) before LC-MS/MS analysis method 2.

The method of quantification used was the method described in the original studies [16, 17]. It consisted of an external calibration curve of at least 5 points, made with the same amount of IS (d_3-MMPB) for each point and varying amounts of MC-LR in water (0.5; 1; 10; 50; 100 ng/mL). Then each vial was oxidized, purified by SPE, and reconstituted with 750 µL of 0.1 M HCl.

2.3.5. LC-MS/MS analysis

2.3.5.1. Method 1 following free MCs extraction

For the chromatographic separation, an UltiMate 3000 HPLC system (Thermo Fischer) was used. Mobile phases were 0.1% FA in H_2O (mobile phase A) and 0.1% in ACN (mobile phase B). A constant flow of 300 µL/min was used with an initial hold of 2 min with 20% of phase B. The proportion of phase B was then gradually increased to 50% at 6 min and to 70% at 8 min. After this, the proportion of mobile phase B was rapidly increased to 100% between 8 and 8.2 min. This composition was maintained until the 11th min of run time before decreasing to 20% B between 11 and 11.2 min. Finally, 20% of B phase was kept until the end of the method at 16 min run time. The chromatographic column used was a Kinetex® 2.6 µm XB C18 100 Å (100 x 2.1 mm) by Phenomenex (Le Pecq, France) which was heated at +40°C during the LC run. The injection volume was 2 µL.

A triple quadrupole (4000 QTRAP, AB Sciex, Villebon-sur-Yvette, France) was used for the detection of analytes. Preliminary experiments have been realized to optimize MS/MS parameters. The transitions monitored in multiple reaction monitoring (MRM) mode were 519.9 → 103.1 (with a collision energy (CE) of 45 V, and a collision cell exit potential (CXP) of 9 V) and 519.9 → 135.1 (CE = 45 V; CXP = 13 V) for the MC-RR. The dwell time for these transitions was 150 ms, the declustering potential (DP) was 120 volts. The transitions monitored for MC-LR were 995.50 → 135.1 (CE = 108 V; CXP = 7 V) and 995.5 → 213.1 (CE = 86 V; CXP = 13 V). The dwell time for these transitions was 150 ms, the DP was 210 volts. The source temperature was set at 500°C with IonSpray Voltage of 5000 V. GS1/GS2 were set at 40/60 psi, curtain gas at 25 psi and CAD to “High”.

2.3.5.2. Method 2 following Lemieux oxidation

For the chromatographic separation, an Agilent 1200 series gradient HPLC system was used. Mobile phases were 0.1% FA in H_2O (mobile phase A) and 0.1% in ACN (mobile phase

B). A constant flow of 300 µL/min was used with an initial hold of 2 min with 20% of phase B. The percentage of phase B was then gradually increased to 100% at 7 min. This composition was maintained for 4 min before decreasing to 20% B between 11 and 11.1 min. Finally, 20% of B phase was kept until the end of the method at 13 min run time. The chromatographic column used was a Kinetex® 2.6 µm XB C18 100 Å (100 x 2.1 mm) by Phenomenex (Le Pecq, France) which was heated at +30°C during the LC run. The injection volume was 5 µL.

A triple quadrupole (API 4000, AB Sciex, Villebon-sur-Yvette, France) was used for the detection of analytes. Preliminary experiments showed better sensitivity of MMPB in negative ionization mode. The transitions monitored in multiple reaction monitoring (MRM) mode were 207.1 → 131.1 for the MMPB and 210.1 →131.1 for the d_3-MMPB. The source temperature was set at 550°C with IonSpray Voltage of -3000 V. GS1/GS2 were set at 40/50 psi, curtain gas at 30 psi and collision gas at 6 psi. The declustering potential was set at -50 V, the entrance potential at -6 V, the collision energy at -15 V and the collision cell exit potential at -11 V.

2.4. Results & discussions

In order to be able to control the doses of MC-LR administered to the juvenile carp used in the experiment, and to be as close as possible to the conditions of exposure to a cyanobacteria bloom while limiting as much as possible the handling of the fish, the option chosen in terms of administration is that of voluntary feeding. Unlike balneation, voluntary feeding allows us to control the dose of MC ingested by the fish, using feed impregnated with the toxin at the desired concentration.

2.4.1. Development of an exposure method for juvenile carp by voluntary feeding

As regards to the behavior of the pellets in the water, both types of pellets remained intact even after an hour in the aquarium (**Figure 20**), ensuring that the fish can ingest the full daily dose (= 3 "Red" and 7 "Brown" pellets).

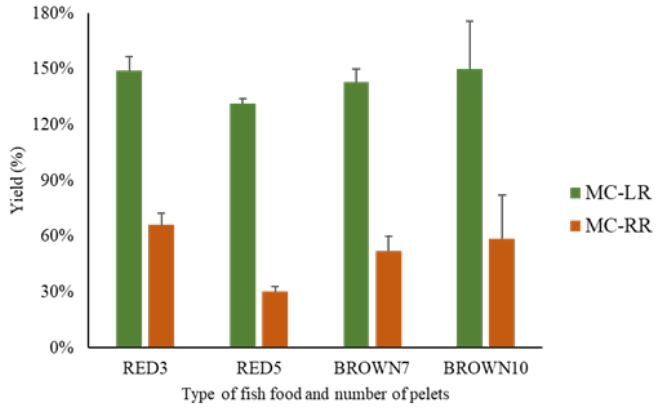
Tests carried out in 5 µL steps have shown that the maximum amount of liquid absorbed by the 3 and 7 pellets (daily dose for the "Red" and "Brown" types respectively) is 50 µL. The quantity of MC-LR required to ensure daily exposure to the NOAEL is therefore diluted in 50 µL of water, in which the pellets are soaked to ensure complete absorption.



Figure 20 : qualitative test concerning the behavior of fish food "Red" on the left, and "Brown" on the right after immersion in water for 1, 3 and 60 min.

The determination of free MC-LR in pellets was tested with the extraction method (2.4.1.) on pellets spiked with MC-LR. The percentage extraction efficiency of MC-LR from pellets and matrix effects during LC-MS/MS assay were evaluated. Extraction efficiencies for MC-LR were around 150% for both brands of pellets, and a suppression matrix effect of -22.5% is observed for "Red" (on average on both quantities of "red" feed, n=6) and -6.5% for "Brown" (on average on both quantities of "brown" feed, n=6). Greater variability between extraction yields is observed for MC-RR: between 30 and 60% for "Red" and 60% for "Brown" (**Figure 21**). Better yields were observed overall for MC-LR, the variant used in the rest of the experiment.

A



B

	MC-LR		MC-RR	
	Matrix effect	SD	Matrix effect	SD
RED3	-30%	17%	-24%	19%
RED5	-15%	10%	-20%	10%
BROWN7	-12%	7%	-12%	5%
BROWN10	-1%	6%	-8%	6%

Figure 21: extraction yields of free MC-LR and -RR (A) and matrix effects in LC-MS/MS assay (B) for two types of fish feed.

Concerning the evolution of the MC-LR quantity in the pellets once immersed, six contact times (0; 1; 5; 10; 30 and 60 min) with the water were tested, as well as two spiking methods (without drying of the pellets after spiking, identified as "WET" or with a drying of 2h30, identified as "DRY" before immersion in the aquarium of the fish), for both brands. The aim was to ensure

that the dose of MC-LR remained relatively constant in the pellets between the moment of immersion and the moment of ingestion by the carp (taking place within 5 min of feeding). The results showed a better retention of MC-LR in the "Brown" pellets, as well as with drying of the pellets after spiking with MC-LR and before immersion in water (**Figure 22**). Brown" pellets (Tetra brand) were therefore selected for further experiment, with spiking with a 50 µL solution containing MC-LR, followed by drying for 2h30.

To our knowledge, this is the first time that such a preliminary study about the preparation and the stability of the contaminated fish pellets is being presented to show the validity of the experimental design that was implemented.

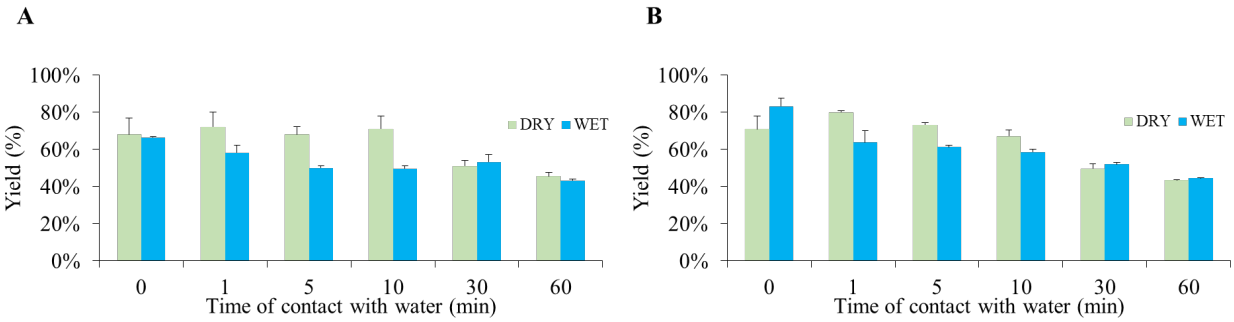


Figure 22 : evolution of the percentage of the initial dose of spiked MC-LR in A: "Red" fish food and B: "Brown" fish food as a function of immersion time in water and spiking method with or without drying.

2.4.2. Pre-study: determination of a non-lethal dose of MC-LR allowing accumulation in juvenile carp

Firstly, three doses of MC-LR were tested to determine the NOAEL of MC-LR (0.08, 0.3 and 0.6 µg MC-LR/g) in juvenile carps (approx. 40g) by voluntary daily feeding (7 pre-spiked and dried "Brown" pellets) for 7 days. Muscle, liver and digestive tract samples were taken for MC-LR analysis from four fish per dose (and four controls). Following this pre-exposure, no accumulation of free MC-LR was detected in muscles after 7 days' exposure to the three toxin concentrations. Low MC-LR accumulation (< LOQ) was observed in livers, and quantifiable accumulation was observed in intestines (103 to 361 ng/g).

A second pre-study *in vivo* test involved exposing 8 juvenile carps for 7 days to higher doses, 0.8 and 1.2 µg MC-LR/g, to ensure accumulation in the fish's muscles (the part consumed by humans). No mortality was observed, and MC-LR was found in muscle, liver and digestive tract. (

Table 12). An exposure concentration of 1 µg MC-LR/g was therefore chosen for juvenile carps to ensure accumulation in the muscles, while limiting the cost of the MC-LR standard and sub-lethal effects.

Table 12: Quantity of free MC-LR found in the various tissues of carp exposed to two different doses of MC-LR through voluntary daily feeding.

Organ/Dose of exposure	0.80 µg/g	1.2 µg/g
Muscle	4.7 ng/g	6.7 ng/g
Liver	6.0 ng/g	7.4 ng/g
Digestive tract	65 ng/g	905 ng/g

Other studies have exposed carp to voluntary feeding (**Tableau 2**). In one study, silver carp weighing around 10 g were fed *Microcystis viridis* cells (MC-LR content between 110 and 292 µg/g and MC-RR between 268 and 580 µg/g) [18]. Accumulations of free MC-RR were found in fish blood, liver and muscle (49.7, 17.8 and 1.77 µg/g, respectively). No MC-LR was detectable in muscle or blood samples [18]. In our pre-study results, after exposure by voluntary feeding to pellets mixed with MC-LR, the toxin was detected in carp muscle (at concentrations ranging from 4.7 to 6.7 ng/g), liver (from 6 to 7.4 ng/g) and digestive tract at higher levels (from 65 ng/g to 905 ng/g) depending on the MC-LR exposure concentration: 0.8 µg/g or 1.2 µg/g, respectively.

In another study, common carp (average weight 322 g) were orally exposed to *Microcystis* [19]. The cyanobacteria were mixed with powdered commercial carp feed and processed into small pellets. A dose of 0.05 µg MC-LR eq/g bw (1/10 of the oral LD50 of MC in carp) was adopted for subchronic exposure, and the protein phosphatase inhibition assay showed that MC concentrations in carp hepatopancreas and muscle were 261.0 ±108.3 ng MC-LR eq/g bw and 38.3 ± 12.3 ng MC-LR eq/g bw respectively [19]. In comparison, in our pre-study, the daily exposure levels used were 16 to 24 times higher than in the study [19]. The accumulation levels in muscle found in our pre-study were nevertheless lower than in the study [19] (5 to 6 times lower). The exposure time (7 d in our study, 28 d in study [19]) may explain these differences, as may the use of cyanobacteria [19] instead of MC-LR or a different commercial feed used to make the pellets.

Finally, a third study investigated the exposure of juvenile *Tilapia rendalli* through voluntary feeding [20]. Three types of exposure were performed, the first by exposing for 15 days gel feed containing commercial fish food plus MC-producing *M. aeruginosa* cells equivalent to an exposure dose of 20.4 µg MCs/fish/day followed by depuration for 15 d. Two fish were sampled every 3 d and the MC concentration in muscle was much lower than in liver, certainly because the liver is the target organ of these toxins. The highest concentration in muscle during the accumulation period (0.03 µg MC/g) was observed on day 9, and the mean concentration was 0.007 µg MC/g (±0.01 S.D.). In the depuration period, the highest concentration (0.05 µg MC/g) was observed on day 24, and the mean concentration of 0.012 µg MC/g (±0.02) was higher than in the accumulation period [20]. The second exposure was to gel feed containing only toxic *M. aeruginosa* cells, equivalent to an exposure dose of 14.6 µg MC/fish/day for 28 days. 3 fish were sampled every 7 days, and the highest concentration of MC in liver (2.8 µg/g) occurred on the first sampling date. In muscle, the highest concentration

of MC (0.08 µg/g) was observed during the third week. The mean concentration in muscle was 0.06 µg/g (±0.018) [20]. The third exposure was carried out with gel feed containing commercial fish food and previously lysed *M. aeruginosa* toxic cells equivalent to an exposure dose of 29.2 µg MC/fish/day, for 42 days. 3 fish were sampled every 7 days, and in contrast to previous exposures, the highest concentration of MC in liver (1.7 µg/g) was observed during the sixth week, and in muscle, the highest concentration (0.1 µg/g) was observed during the second week. The mean in muscle was 0.05 µg/g (±0.028) [20]. The concentrations used in study [20] (20.4, 14.6 and 29.2 µg MC/fish) are slightly lower than the concentrations used in our pre-studies (32 µg/fish/d and 48 µg/fish/d corresponding to 0.8 and 1.2 µg/g respectively). For the 20.4 µg/fish concentration used in the study [20], an average concentration of 12 ng MC/g was analyzed in the muscle; in our pre-study, 2 times less toxins were detected after the 7-day exposure period. The same applies to the other exposures reported in [20] (14.6 and 29.2 µg MC/fish), where the accumulation detected was greater than in our pre-study (60 and 50 ng/g in [20] versus 4.7 to 6.7 ng/g in our pre-studies. The longer exposure time in [20] (15 d) than in our pre-studies (7 d) could explain these differences, but also the difference in species (tilipia in [20] and carp in our pre-studies) or the type of contaminant used (cyanobacteria in [20] and MC-LR in our pre-studies).

2.4.3. Kinetic study: accumulation and elimination of MC-LR in juvenile carps

Following exposure, the fish tissue samples taken at each of the two stages (intoxication and depuration) were transferred to the LSAL at ANSES. Extraction of free and total MCs and LC-MS/MS analysis of the samples was to be carried out as part of a research collaboration and a trip to Canada by PhD student Pierre Bouteiller to C. Miles' laboratory (NRCC). The aim was to apply Lemieux oxidation, with a direct exchange with Dr. A. Foss for the determination of total MC. As the amount of tissue collected was small, no back-up samples could be stored, and all the tissues were sent to Canada via a courier specialized in the shipment of frozen biological samples. Unfortunately, the samples were damaged during the shipment between France and Canada and arrived in a rotten state.

The samples were nevertheless analyzed, but no MC-LR, either in free or total form, was found in the tissues, except for one liver sample in **Table 13** below, which showed a quantity of MMPB slightly above the limit of quantification (showing a low concentration of total MC). These negative results are most likely linked to the temperature change and thawing of the samples, which degraded them (tissue appearance and odour of degradation).

Table 13: Results of Lemieux oxidation on carp tissues (fillet and liver) after the kinetic study.

Quantification of a matrix matched range with the IS d_3-MMPB				
Sample	MMPB/d_3MMPB	[MMPB] ng/mL	Factor of dilution: 1000 ul/50mg	[MMPB] ng/g
Liver 1 expo 1j	0.001	0.20	20	<LOD
Liver 2 expo 1j	0.009	0.36	20	<LOQ
Liver 1 expo 7j	0.002	0.22	20	<LOD
Liver 2 expo 7j	0.005	0.29	20	<LOD
Liver 1 dep 1j	0.008	0.33	20	<LOQ
Liver 2 dep1j	0.007	0.33	20	<LOQ
Liver 1 dep 21j	0.042	1.01	20	20.2
Liver 2 dep 21j	0.006	0.30	20	<LOQ
Fillet 1 expo 1j	0.005	0.56	20	<LOQ
Fillet 2 expo 1j	0.002	0.51	20	<LOQ
Fillet 1 expo 7j	0.003	0.52	20	<LOQ
Fillet 2 expo 7j	0.004	0.54	20	<LOQ
Fillet 1 dep 1j	0.003	0.52	20	<LOQ
Fillet 2 dep1j	0.001	0.47	20	<LOQ
Fillet 1 dep 21j	0.007	0.60	20	<LOQ
Fillet 2 dep 21j	0.002	0.50	20	<LOQ
LOD = 6 ng/g ; LOQ = 14 ng/g				

2.4.4. Determination of the accumulation of free and total MCs in carps naturally exposed to cyanotoxins during bloom of cyanobacteria in Lake Pannecière (France) and lake Qaraoun (Lebanon)

A sample was considered contaminated when its MMPB concentration exceeded 1.1 ng/mL (equivalent to the limit of quantification). This is equivalent to a MC-LR eq. concentration of 5.3 ng/mL, and an MC-LR eq. contamination of 105 µg/kg. Thus, nine of the 23 tissue samples showed total MC contamination (**Table 14**). Among the Pannecière samples, the kidney of two of the five carps and the perch fillet showed MC-LR equivalent contamination ranging from 333 to 875 µg/kg, the highest concentration being obtained for the perch fillet. Among the Lebanese samples, all livers sampled showed MC contamination. Depending on the individual, fillets were also contaminated, with two of the four carps showing total MC-LR eq. concentrations of 109 and 114 µg/kg. A much higher concentration was observed in the livers, however, with MC-LR eq. values ranging from 225 to 2045 µg/kg.

Lemieux's oxidation method has not yet been frequently applied to naturally contaminated samples. One study applied the same protocol used in our study to bottlenose dolphin livers from estuarine or coastal populations [21]. MMPB concentrations ranging from 1.3 to 14.3 µg/kg were found in these samples. These concentrations are lower than those found in this study on carp kidney or perch fillet samples (**Table 14**). The reason for this could be: the sampling location: an estuarine/costal region in the USA affected by cyanobacterial blooms, where several cases of dolphin mortality have been reported without the cause being identified [21], and in our study two lakes at periods of high cyanobacterial blooms. Furthermore, the choice of carp, an omnivorous fish that can feed on cyanobacteria [22] and therefore be exposed through its diet, could explain the higher levels of total MCs contamination found in our study samples. Furthermore, both in the dolphin study [21] and in our study, LC-MS/MS analyses of free MCs (14 MCs variants tested in [21], 11 variants tested in our study) were negative, whereas analyses of total MCs showed non-negligible levels of contamination, suggesting either contamination of free MCs by variants for which analytical standards are not available, or metabolized forms of MCs not detected by tests on free MCs alone, or higher levels of contamination of tissues by bound MCs than by free MCs, already demonstrated for mollusks and fish [8, 23, 24].

Another study analyzed the presence of total MCs in whole Mullet or in the fillets of different fish species (Yellow perch, Walleye, Brown bullhead, lake whitefish) from 3 Canadian lakes regularly affected by cyanobacterial blooms [25]. The results of these analyses showed contamination levels ranging from 2.9 to 13.2 µg/kg MMPB [25]. These contamination levels are higher than those found in the carp fillets from Lac Pannecière (France) analyzed in our study, but lower than those found in the fillets from the perch sample from Lac Pannecière (344 µg/kg) or those found in 2 of the 4 carp fillets taken from Lac Qaraoun (with MMPB contamination levels of 109 and114 µg/kg). This confirms the very high contamination of samples from Lake Qaraoun, where fillets are almost 9 times more contaminated than fillets analyzed in the study [25]. Similarly, perch from Lake Pannecière is 26 times more contaminated with total MCs than the fish samples analyzed in the study [25], and three times more contaminated than the carp samples from Lake Qaraoun. Perch, being carnivorous fish,

may have been contaminated by cyanobacteria via the gills or orally by feeding on other contaminated species or primary consumers of cyanobacteria [26].

2.5. Conclusion

A voluntary feeding mode of exposure was developed by comparing two types of food, "red" and "brown". Qualitative tests showed that both types of pellets remain intact even after an hour in the aquarium. Other tests have shown that the maximum amount of liquid absorbed by the 3 and 7 pellets (daily dose for the "Red" and "Brown" types respectively) was 50 µL. A protocol for extracting free MCs from the pellets was developed to study the quantity of MC-LR and -RR present in the pellets after different contact times between water and toxin-doped pellets. The results showed a better retention of MC-LR in the "Brown" pellets, as well as with drying of the pellets between doping with MC-LR and immersion in water.

Following several pre-studies on juvenile carp, the MC-LR concentration of 1 µg/g was selected. Administered daily for 7 days, this concentration allowed MCs to accumulate in carp tissue without causing mortality. Fish were exposed to this concentration for 7 days, followed by a depuration period of 21 days. However, probably due to transport damage, no free toxins were detected in fillets and liver, and only one liver sample showed total MCs accumulation levels of 20 ng/g.

Fish were analyzed for free and total MCs following episodes of toxin proliferation in a French and a Lebanese lake. Total MC accumulations were detected in the kidneys of carp from the French lake, ranging from 333 to 875 µg/kg, and in the fillets of a perch at 333 µg/kg. In fish from the Lebanese lake, total MCs were analyzed in carp fillets (from 109 to 115 µg/kg) and livers (from 225 to 2045 µg/kg). This shows the importance of taking better account of total MC in the health monitoring of organisms contaminated by MC, on the assumption that total MC are toxic, released during digestion and the fraction released absorbed and toxic.

Table 14: Results of Lemieux oxidation on carp tissues (fillet, kidney, liver) collected in Pannecière (France) or Qaraoun (Lebanon) lakes during periods of cyanobacterial proliferation

Fish	Sampling dates	Tissu	Origin	MC-LR eq. concentrations (total forms; µg/kg)
Carp1	18 sept 2020	Proximal Fillet	Pannecière	<LOQ
		Distal fillet	Pannecière	<LOQ
		Kidney	Pannecière	<LOQ
Perch	20 sept 2020	Fillet	Pannecière	344
Carp 2	20 sept 2020	Proximal Fillet	Pannecière	<LOQ
		Distal fillet	Pannecière	<LOQ
		Kidney	Pannecière	875
Carp 3	23 sept 2020	Proximal Fillet	Pannecière	<LOQ
		Distal fillet	Pannecière	<LOQ
		Kidney	Pannecière	<LOQ
Carp4	24 sept 2020	Fillet	Pannecière	<LOQ
		Proximal Fillet	Pannecière	<LOQ
		Distal fillet	Pannecière	<LOQ
		Kidney	Pannecière	333
Carp 5	7 may 2021	Fillet	Qaraoun	109
		Liver	Qaraoun	225
Carp 6	11 may 2021	Fillet	Qaraoun	<LOQ
		Liver	Qaraoun	237
Carp 7	11 may 2021	Fillet	Qaraoun	<LOQ
		Liver	Qaraoun	2045
Carp 8	22 may 2021	Fillet	Qaraoun	114
		Liver	Qaraoun	1972
LOQ estimated: 100 µg MC-LR eq./kg				

2.6. Acknowledgements

The animal experimentation part of this study has been the subject of an APAFiS (Authorization for Projects Using Animals for Scientific Purposes) authorization n°2021072717245756 and is financed by the Research and development agreement (CRD) ANSES / MNHN / URCA n° 2021-CRD-02. The authors would like to thank the University of Reims Champagne Ardennes and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) for co-funding the thesis project of which this study is a part. The authors would like to thank the Planaqua experimental platform, CEREEP and its staff who took part in exposing the fish, A. Millot, B. Decencière, S. Agostini and S. Paolillo. The authors would like to thank colleagues from the PBM unit at ANSES Maisons-Alfort for their help with the experiments carried out in this study.

2.7. References

1. Chorus, I. and M. Welker, Toxic Cyanobacteria in Water. Second edition ed. 2021, London: World Health Organization. 859.
2. Paerl, H.W., et al., Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. Scientific World Journal, 2001. 1: p. 76-113.
3. Smith, V.H., Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. Environ Sci Pollut Res Int, 2003. 10(2): p. 126-39.
4. McLellan, N.L. and R.A. Manderville, Toxic mechanisms of microcystins in mammals. Toxicol Res (Camb), 2017. 6(4): p. 391-405.
5. ANSES, Évaluation des risques liés aux cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux douces, in Avis de l'Anses- Rapport d'expertise collective. 2020. p. 495.
6. Zhang, D., et al., Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. Sci Total Environ, 2009. 407(7): p. 2191-9.
7. Lance, E., et al., Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to Physa (= Physella) acuta. Sci Total Environ, 2010. 408(17): p. 3560-8.
8. Lance, E., et al., Evidence of trophic transfer of microcystins from the gastropod Lymnaea stagnalis to the fish Gasterosteus aculeatus. Harmful Algae, 2014. 31: p. 9-17.
9. Rezaitabar, S., et al., Transfer, tissue distribution and bioaccumulation of microcystin LR in the phytoplanktivorous and carnivorous fish in Anzali wetland, with potential health risks to humans. Sci Total Environ, 2017. 575: p. 1130-1138.
10. Kondo, F., et al., Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. Chem Res Toxicol, 1992. 5(5): p. 591-6.
11. Bouteiller, P., et al., Analysis of Total-Forms of Cyanotoxins Microcystins in Biological Matrices: A Methodological Review. Toxins (Basel), 2022. 14(8).
12. Cadel-Six, S., et al., Detection of free and covalently bound microcystins in different tissues (liver, intestines, gills, and muscles) of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by liquid

chromatography-tandem mass spectrometry: method characterization. Environ Pollut, 2014. 185: p. 333-9.

13. Fischer, W.J. and D.R. Dietrich, Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (Cyprinus carpio). Toxicol Appl Pharmacol, 2000. 164(1): p. 73-81.

14. Chorus, I. and M. Welker, Cyanobacterial toxins, in Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. 2021: London. p. 150.

15. Derrien, A., et al., From development to implementation of a new LC-MS/MS approach to quantify 43 lipophilic toxins within the French monitoring program, in International Conference on Harmful Algae. 2018: Nantes, France.

16. Foss, A.J., et al., Analysis of free and metabolized microcystins in samples following a bird mortality event. Harmful Algae, 2018. 80: p. 117-129.

17. Foss, A.J., et al., Diagnosing Microcystin Intoxication of Canines: Clinicopathological Indications, Pathological Characteristics, and Analytical Detection in Postmortem and Antemortem Samples. Toxins (Basel), 2019. 11(8): p. 456.

18. Xie, L., et al., Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. Environ Pollut, 2004. 127(3): p. 431-9.

19. Li, X.Y., et al., Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (Cyprinus carpio L.) exposed to Microcystis under laboratory conditions. Toxicon, 2004. 44(8): p. 821-7.

20. Soares, R.M., V.F. Magalhaes, and S.M. Azevedo, Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in Tilapia rendalli (Cichlidae) under laboratory conditions. Aquat Toxicol, 2004. 70(1): p. 1-10.

21. Brown, A., et al., Detection of cyanotoxins (microcystins/nodularins) in livers from estuarine and coastal bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) from Northeast Florida. Harmful Algae, 2018. 76: p. 22-34.

22. Carbis, C.R., et al., The histopathology of carp, Cyprinus carpio L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. Journal of Fish Diseases, 1996. 19(3): p. 199-207.

23. Lepoutre, A., et al., Free or Protein-Bound Microcystin Accumulation by Freshwater Bivalves as a Tool to Evaluate Water Contamination by Microcystin-Producing Cyanobacteria? Applied Sciences, 2020. 10(10): p. 3426.

24. Lance, E., et al., Accumulation of free and covalently bound microcystins in tissues of Lymnaea stagnalis (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure. Environ Pollut, 2010. 158(3): p. 674-80.

25. Roy-Lachapelle, A., et al., Total Analysis of Microcystins in Fish Tissue Using Laser Thermal Desorption-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-High-Resolution Mass Spectrometry (LDTD-APCI-HRMS). J Agric Food Chem, 2015. 63(33): p. 7440-9.

26. Ferrão-Filho, A.d.S., B. Kozlowsky-Suzuki, and S.M.F.O. Azevedo, Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. Aquatic Toxicology, 2002. 59(3): p. 201-208.

Chapitre 5
Application de la déconjugaison à pH basique suivie d'une réduction comme alternative qualitative à l'oxydation de Lemieux pour l'analyse de conjugués microcystines-peptides

1. Synthèses des travaux

La liaison des MC à la PP est un mécanisme en deux étapes avec d'abord la formation d'une liaison à faible interaction de nature hydrophobe et réversible entre le groupe Mdha des MC et les protéines et, après quelques heures, le groupe Adda peut former une liaison forte thioéther covalente avec les résidus cystéine présents dans les sous-unités catalytiques de la PP (14, 87-89). Une distinction est ainsi faite entre les formes libres circulantes et les formes liées de MC. Lors des analyses, les MC libres sont facilement extraites avec des solvants associés à des méthodes de purification et analysées la plupart du temps par des méthodes d'immunologie ou de spectrométrie (37). Cependant, l'analyse des MC totales (libres + liées) reste un défi méthodologique (53). La méthode la plus utilisée est l'oxydation de Lemieux, qui utilise le permanganate de sodium et le métapériodate de sodium pour oxyder le fragment Adda commun à toutes les MC. Ce fragment est alors nommé MMPB (acide 2-méthyl-3-méthoxy-4-phénylbutyrique) et analysé par LC-MS/MS. Cette méthode présente plusieurs inconvénients, notamment des taux de récupération très variables dûs aux effets matrices et à l'utilisation de sels dans le processus mais également la perte d'information sur le profil toxinique de l'échantillon lors de l'oxydation. Des méthodes alternatives ont peu à peu été développées dans la littérature, telles que l'ozonolyse ou la déconjugaison à pH basique. Cette dernière présente l'avantage de conserver la MC intacte et de permettre l'identification du variant par analyse LC-MS/MS. À ce jour, trois protocoles de déconjugaison à pH basique ont été mis au point et appliqués à des étalons de MC conjugués à des protéines (57, 58, 227). Le plus récent, celui de Miles et al. 2017 (57), met en évidence le risque de re-conjugaison du MC après déconjugaison.

L'objectif de cette étude est de développer une méthode rapide de déconjugaison à pH basique utilisant une réaction de réduction pour obtenir des MC déconjuguées non réactives avec les protéines. Pour ce faire, 5 variants de MC (MC-RR, MC-LR, [Dha^{7}]MC-LR, MC-LA, et [Leu^{1}]MC-YR) ont été conjugués à différentes protéines amines et thiols (glutathion, L-cystéine, N-acétyl-cystéine, γ-glutamilcystéine, cystéinglycine, hydroxyde d'ammonium, L-alaninamide, Nα-acétyl-L-Lysine, Nε-acétyl-L-lysine, N-acétyl-L-tyrosine) avant de tester différents protocoles de déconjugaison à pH basique avec du NaOH associés à des réactions de réduction avec du borohydrure de sodium ($NaBH_4$).

Dans cette étude, une gamme de conjugués MC-thiols et amines a été semi-synthétisée pour créer des composés modèles afin de tester des protocoles de déconjugaison catalysés par une base. La conjugaison des MC avec les protéines a été réalisée en faisant réagir 30 µL de mélange de toxines avec 1 à 2 mg de l'un des thiols ou des amines conjugués dans un tampon au bicarbonate [10 mg/mL] dans 50 % de MeOH pendant une nuit à température ambiante. La réussite de la conjugaison a ensuite été vérifiée par LC-MS/MS en observant à la fois la disparition des pics correspondant aux étalons de MC mais aussi l'apparition progressive des pics correspondant aux conjugués toxine-protéine. Pour chaque réaction, la nodularine (NOD-R) a été utilisée comme contrôle négatif car celle-ci réagit beaucoup plus lentement avec les protéines, et avec les conjugués peptides de cette étude, que les MC.

Des expériences de déconjugaison ont été réalisées avec les conjugués semi-synthétisés précédemment : MC-GSH et MC-CYS. Dans l'objectif d'accélérer les réactions de déconjugaison et de réduction, les concentrations de réactifs ont été augmentées au fur et à mesure des expériences et parmi l'ensemble des expériences, l'expérience 4 a permis une déconjugaison et une réduction des conjugués MC-thiol (GSH et CYS) plus rapides que les autres expériences. La différence entre les 4 expériences réside dans la concentration de NaOH (qui passe de 0,1 M dans l'expérience 1 à 0,5 M dans les expériences 2, 3 et 4), qui accélère la déconjugaison (de 24 à 48 h dans l'expérience 1 et de 1 à 4 h dans l'expérience 4). De plus, la concentration de l'agent réducteur ($NaBH_4$) change également entre les expériences (de 0,28 mM dans l'expérience 1 à 0,54 M dans l'expérience 4), ce qui accélère la réduction des MC déconjuguées (d'un mélange pas complètement réduit en 120 h dans l'expérience 1 à un mélange complètement réduit en moins de 22 h dans l'expérience 4). Cette expérience 4 a également inclus des données sur d'autres variants de MC présentes dans le mélange. La déconjugaison se produit plus rapidement sur les MC-GSH (entre 0 et 1 h pour tous les MC sauf pour la [Dha^7]MC-LR entre 1 et 2 h) que sur les MC-CYS où la déconjugaison se produit entre 0 et 1 h pour la MC-RR, entre 2 et 4 h pour la MC-LR et la MC-LA, entre 4 et 6 h pour la [Leu^1]MC-LY et entre 6 et 22 h pour la [Dha^7]MC-LR. De plus, la [Dha^7]MC-LR est le MC qui présente le temps de déconjugaison le plus long parmi les 5 MC testés dans ces expériences. A l'inverse, la MC-RR semble être le MC qui se déconjugue le plus rapidement des composés thiols GSH et CYS. En ce qui concerne la deuxième partie de la réaction : la réduction des toxines déconjuguées, il a été observé que le temps de réduction peut varier en fonction des variants. Par exemple, des toxines comme la MC-LA, la MC-LR et la [Leu^1]MC-LY (réduites entre 6 et 22 h) sont réduites plus rapidement que la [Dha^7]MC-LR ou la MC-RR (pas complètement réduites après 22 h de réaction).

Par rapport aux études précédentes, l'augmentation du pH a permis d'accélérer la réaction de déconjugaison. Par exemple, Miles et al. (58) qui ont également utilisé des conjugués synthétiques MC-GSH et MC-CYS et en traitant les conjugués [Dha^7]MC-LR- CYS avec un tampon carbonate dans MeOH (pH=10,7) ont obtenu un mélange partiellement déconjugué après 21 h et ont encore trouvé après 65 h la présence mineure de conjugués MC-CYS. En augmentant le pH de la réaction, une déconjugaison complète des mêmes conjugués a été obtenue entre 6 et 22 h après le début de la réaction (58). De même, la même étude a également réalisé une réaction de déconjugaison sur les conjugués [Asp^3]MC-RY avec l'isomère 2 du GSH par traitement du tampon carbonate dans MeOH (pH= 10,7). La déconjugaison de ce conjugué a été obtenue après 48 h de réaction mais la présence minoritaire d'un conjugué [Asp^3]MC-RY avec l'isomère 1 du GSH a tout de même été détectée (58). Dans notre étude, les conjugués [Leu^1]MC-YR-GSH ont été déconjugués très rapidement après seulement 1 h de réaction avec NaOH à un pH plus basique (pH = 13) sans détecter d'autres isomères des conjugués en utilisant la stratégie de réduction des MC déconjugués pour éviter tout phénomène de reconjugaison.

L'article prochainement soumis ci-dessous détaille les expérimentations réalisées dans le cadre d'une mobilité doctoral de 3 mois au NRC au Canada. Il détaille le développement d'une méthode alternative à l'oxydation de Lemieux pour l'analyse de conjugué MC-peptide.

2. Application of base-catalyzed deconjugation followed by a reduction as a qualitative alternative to Lemieux oxidation for analysis of microcystin–peptide thiol-conjugates

Pierre Bouteiller [1,2], Ronel Biré [2], Thierry Guérin [4], Emilie Lance [1,3,*], Christopher O. Miles [5]

1 Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 INERIS-URCA-ULH SEBIO, Unité Stress Environnementaux et BIOsurveillance des Milieux Aquatiques (SEBIO), BP 1039 F, 51687, Reims, Cedex, France
2 Laboratory for Food Safety, ANSES, F-94701 Maisons-Alfort, France; ronel.bire@anses.fr
3 UMR MNHN/CNRS MCAM, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75005 Paris, France
4 Strategy and Programs Department, ANSES, F-94701 Maisons-Alfort, France; thierry.guerin@anses.fr
5 National Research Council Canada, 1411 Oxford Street, Halifax, NS B3H 3Z1, Canada
***** Correspondence: emilie.lance@univ-reims.fr

2.1. Abstract

Microcystins (MCs) are cyclic heptapeptide toxins produced by many cyanobacteria. They can be accumulated in various matrices in two forms: a free cellular fraction and a covalently-bound form. Among the methods used to analyze the total MCs, the most common method is Lemieux oxidation, but this has several limitations, including the fact that it cannot distinguish between MC variants present in a sample. The aim of this study was to develop an alternative method for the analysis of total forms of MC that keeps MCs variants intact by deconjugating the toxins with a base. With the objective of developing a base-catalyzed deconjugation method, MC–peptide conjugates were semi-synthesized to serve as model compounds. A mixture of 5 MCs (MC-RR, MC-LR, [Dha^7]MC-LR, MC-LA and [D-Leu^1]MC-YR) and NOD-R were conjugated with a range of amines (ammonium hydroxide, L-alaninamide, N_α-acetyl-L-Lysine, N_ε-acetyl-L-lysine, *N*-acetyl-L-tyrosine) and thiol-containing amino acids and peptides (GSH, CYS, *N*-AcCys, γ-Glu-Cys, Cys-Gly). Among these, MC–GSH and MC–Cys conjugates were used to test base-catalyzed deconjugation. Among the four deconjugation experiments conducted with different concentrations of base and reducing agent, the best performing protocol was applied to the two model MC–peptide mixes, resulting in complete deconjugation within 1–2 h for MC–GSH conjugates and 1–6 h for MC–CYS conjugates. By adjusting the concentration of the reducing agent, reduction of the deconjugated toxins was obtained within a few hours (from 6 h to one day for MC-RR) and more rapidly for MC-LA, MC-LR and [Leu$_1$]MC-LY (reduced between 6 and 22 h).

KEYWORDS: cyanotoxins; bound microcystins; MC–peptide conjugates; base-catalyzed deconjugation; reduction; LC–MS/MS analysis

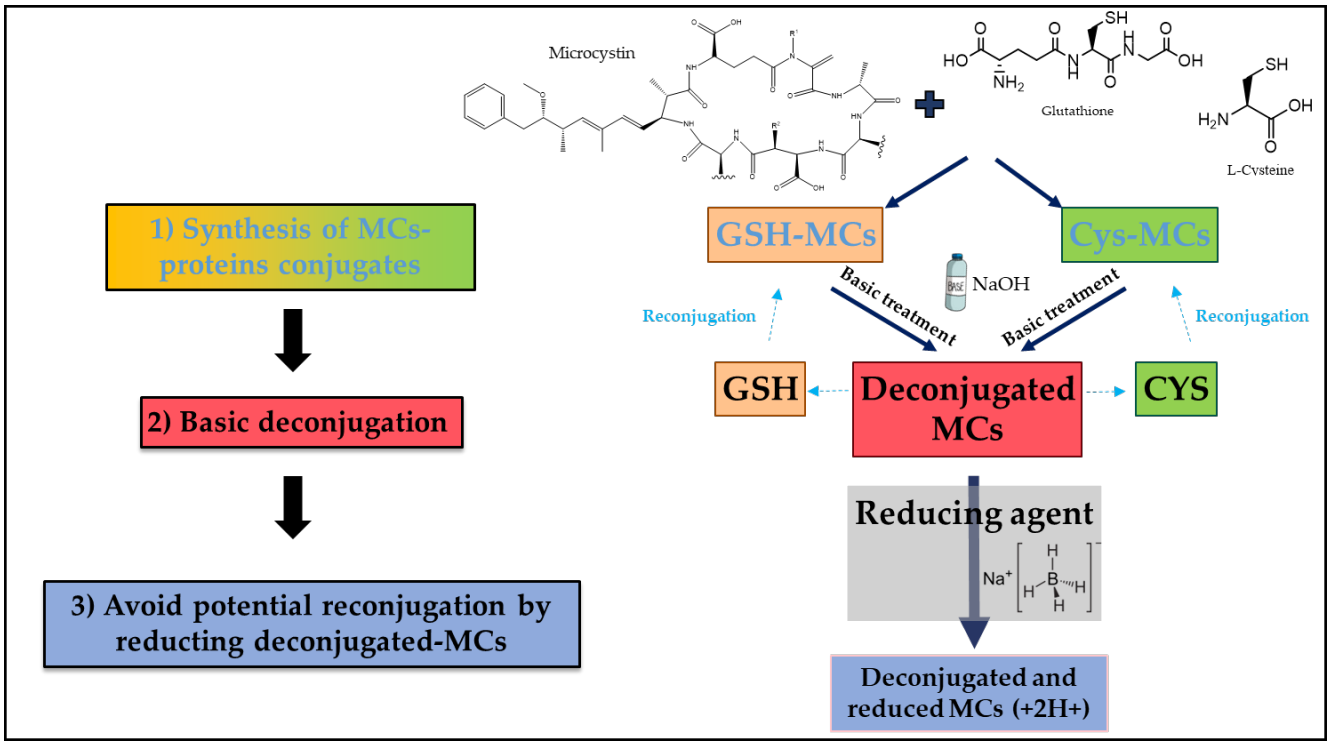


Figure 23: Graphical abstract

2.2. Introduction

Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms with important proliferative capacities [1] that can be enhanced by natural factors (*e.g.* temperature above 25 °C, alkaline pH) but also by anthropogenic factors (*e.g.* high nitrate and phosphorus inputs) [2-4]. Cyanobacteria appeared on earth 3.5 billion years ago and can be observed in freshwater, brackish and marine ecosystems [5]. They can produce secondary metabolites including many toxins such as the neurotoxic anatoxins and hepatotoxic microcystins (MCs), the latter being the most frequently detected cyanotoxins in cyanobacterial blooms [1]. MCs are monocyclic heptapeptides (**Figure 24**) containing the atypical amino acid 3*S*-amino-9*S*-methoxy-2*S*,6,8*S*-trimethyl-10-phenyl-4*E*,6*E*-decadienoic acid (Adda), a variant of which is present at position-5 in all MCs and nodularins. The thiol-reactive amino acids dehydroalanine (Dha) or *N*-methyldehydroalanine (Mdha), or their derivatives are also present in MCs. MCs also contain two highly variable L-amino acids at position-2 (**Figure 24**, ② and ④). These variations as well as potential substitutions at other sites of the MCs contribute to the identification of more than 300 MC congeners [6, 7]. When cyanobacteria proliferate and form dense biomass called a bloom, MCs are mainly intracellular, but as the cell death occurs after the bloom collapses, MCs can be released into the water or adsorbed onto particles and become extracellular. MCs can then accumulate in the food chain (*via* MCs released into the environment, but also through direct consumption of MC-producing cyanobacteria) in various organisms such as zooplankton, zoobenthos, or fish in two forms: a free, available, cellular fraction, and a bound form (*i.e.* intracellular for the cyanobacterial matrices or covalently bound to biomolecules such as proteins and peptides in biota tissues) [8-11]. These covalently-bound forms include MCs

bound to the serine/threonine protein phosphatases 1 (PP1) and 2A (PP2A) [12]. The binding of MCs to PP is a two-step mechanism with first the rapid formation of a strongly-bound MC–PP complex, followed by a much slower reaction between the Dha/Mdha[7] group of the MC and a nearby cysteinyl thiol group close to the binding site in the PP to form a covalently bound MC–PP complex [13-16]. A consequence of this binding of MCs is the permanent inactivation of the PP, which disrupts the phosphorylation mechanisms [17, 18]. The inactivation of PP leads to multiple negative effects, such as oxidative stress, disruption of the cytoskeleton, but also the production of reactive oxygen species, resulting in tumor promotion and apoptosis [19]. MCs cannot passively cross the cellular membrane, and use organic-anion-transporting polypeptides (OATPs) to do so. MCs therefore tend to accumulate in organs containing OATPs, such as the liver, reproductive organs, kidneys, brain, heart, gastrointestinal tract, or lungs, in which they induce toxicity [20, 21]. Therefore, MCs can induce health impacts on both humans and biota, *e.g.* after swimming in contaminated environments or after ingestion of contaminated raw or drinking waters or ingestion of aquatic organisms [22]. Intoxication can be acute or chronic, with syndromes ranging from gastroenteritis to kidney and liver failure, and sometimes even death [23].

To assess the environmental and human health risk, cyanobacteria and cyanotoxins can be monitored in water samples. The density or biovolume of cyanobacteria and the concentration of intracellular and extracellular cyanotoxins are parameters commonly monitored to regulate recreational activities in lakes and rivers. It is also important to evaluate the potential MC contamination of species consumed by humans. A distinction is made between free forms and the total levels of MCs during analysis. Free MCs are easily extracted with solvents and analyzed most of the time with immunochemical or spectrometric methods [24]. However, there is still a methodological challenge concerning analysis of total MCs [25]. The most widely used method remains Lemieux oxidation, which uses sodium permanganate and sodium metaperiodate to oxidize the Adda fragment common to most MCs. The cleavage product, 2*R*-methyl-3*S*-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB) can then be analyzed by LC–MS/MS or other methods. This method still presents several disadvantages including a long sample turnaround time, making it difficult to process a large number of samples, variability of the oxidative cleavage process with very variable recovery yields depending on the protocols and matrices used, occurrence of important matrix effects during LC–MS/MS analysis, and the complete loss of information on which MC variants were present in the sample (limiting toxicity assessment) [25]. Alternative methods are emerging in the literature, such as ozonolysis or base–catalyzed deconjugation. While ozonolysis, like Lemieux oxidation, results in the recovery of the MMPB fragment common to most MCs variants, deconjugation has the advantage of keeping the MC skeleton intact and thus allowing identification of the variant by LC–MS/MS analysis. To date, three base-catalyzed deconjugation protocols have been developed and applied to peptide–conjugated MC standards [26-28]. Miles et al. [27], highlights the risk of re-conjugation of MCs after being deconjugated.

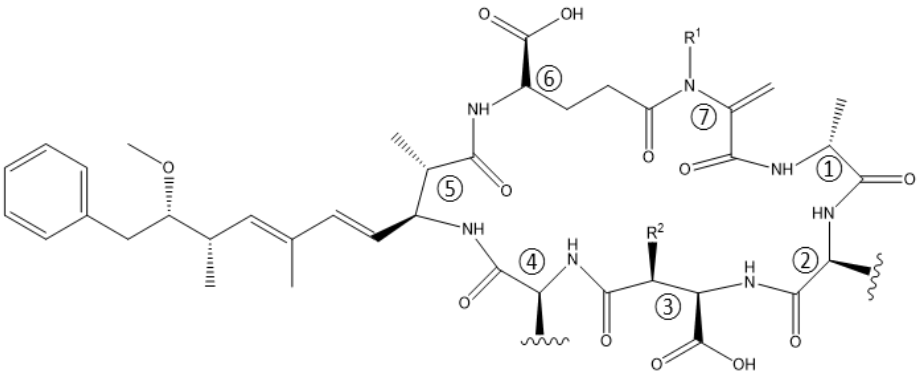
The objective of this study was to develop a rapid basic pH deconjugation method using a reduction reaction to obtain deconjugated MCs that are not reactive with the proteins or peptides from which they have been deconjugated. For this purpose, 5 MC variants were

conjugated with amines, amino acids or thiol-containing peptides (glutathione, L-cysteine, *N*-acetylcysteine, γ-glutamylcysteine, cysteinylglycine, ammonium hydroxide, L-alaninamide, *N*α-acetyl-L-lysine, *N*ε-acetyl-L-lysine, and *N*-acetyl-L-tyrosine) to use as model systems for testing different base-catalyzed deconjugation protocols with NaOH coupled to reduction reactions with sodium borohydride ($NaBH_4$).

2.3. Experimental

2.3.1. Standards and reagents

A standard MC mix was used throughout the study it has been provided by the NRC-CNRCC (Halifax, NS, Canada) and contained MC-RR [1.358 µg/mL], MC-LR [1.477 µg/mL], [Dha^7]MC-LR [1.377 µg/mL], MC-LA [1.424 µg/mL], [D-Leu^1]MC-LY [1.108 µg/mL] and NOD-R [1.380 µg/mL] (**Figure 24**) were prepared by mixing certified reference materials of these compounds [29-34]. The peptides glutathione (GSH), *N*-acetylcysteine (N-AcCys), γ-L-glutamyl-L-cysteine (γ-Glu-Cys), and cysteinglycine (Cys-Gly), amino acids L-cysteine (CYS), L-alaninamide, N_α-acetyl-L-lysine, N_ε-acetyl-L-lysine, *N*-acetyl-L-tyrosine, and ammonium hydroxide, (**Figure 25**), formic acid (FA), acetic acid, NaOH, sodium bicarbonate, $NaBH_4$, and $NaBH_4$ in NaOH were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). SPE cartridges (Oasis HLB 150 mg 6cc; Waters, Milford, MA, USA) were conditioned with 5 mL of MeOH, and then 5 mL of H_2O prior to use. Methanol and acetonitrile (LC-MS grade) were from Thermo Fischer (Ottawa, ON, Canada).



		②	④	R^1	R^2	R^3	*m/z*
1	MC-RR	Arg	Arg	Me	Me	Me	1037.5658
2	MC-LR	Leu	Arg	Me	Me	Me	994.5488
3	[Dha^7]MC-LR	Leu	Arg	H	Me	Me	980.5331
4	MC-LA	Leu	Ala	Me	Me	Me	909.4848
5	[Leu^1]MC-LY	Leu	Tyr	Me	Me	$CH_2CH(CH_3)_2$	1043.5579

Figure 24. Structures of MCs used in the study (1 - 5).
1 - 5 were conjugated with thiols and amines presented in Figure 25 to produce a range of MCs-proteins conjugates used for deconjugation experiments (Figure 29 & Figure 30.).

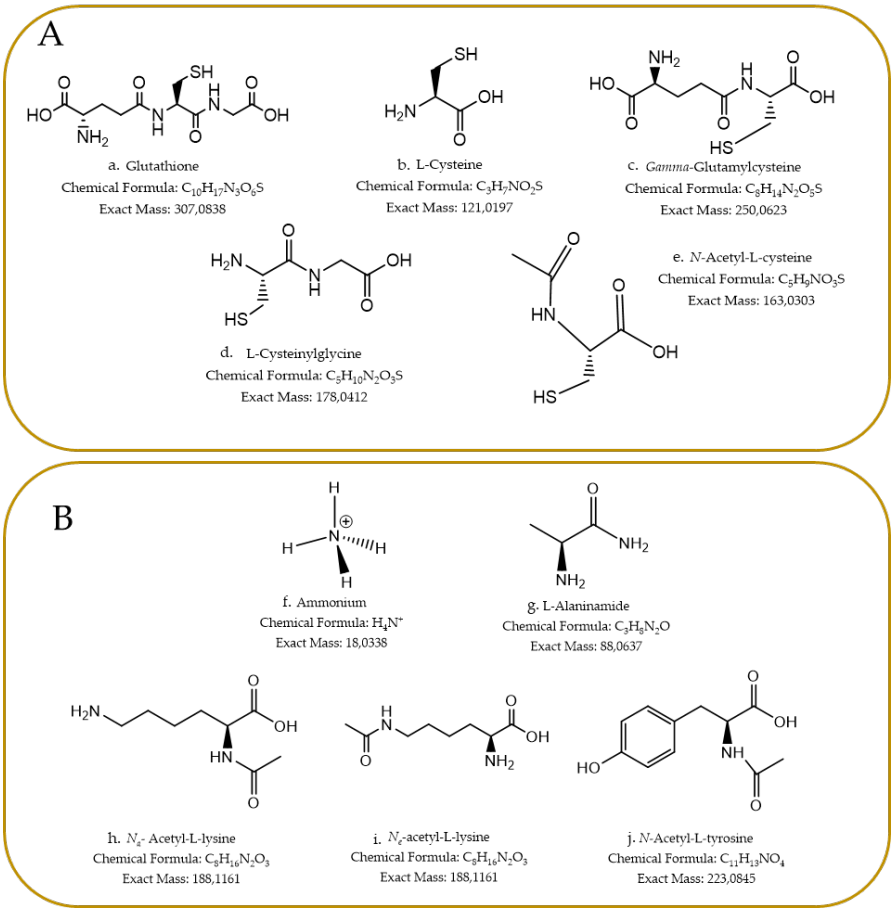


Figure 25. Thiols (A) and amines (B) (a – j) conjugated to the MCs 1- 5 **Figure 24**) to create model MCs-proteins compound (**Figure 26**).
These compounds have been used after that to test different deconjugation strategies (Figure 29 & Figure 30)

2.3.2. Conjugation of MCs with amines and thiols

Conjugation of MCs with thiols was initially attempted by reacting 30 µL of the MC mix with approx. 1–2 mg of either one of the thiols or amines in sodium bicarbonate (10 mg/mL) prepared in 50% MeOH overnight at ambient temperature. Progress of the reaction was checked by LC–HRMS by looking at both the disappearance of peaks corresponding to the toxin standards and at the progressive appearance of peaks corresponding to the toxin–peptide conjugates (**Figure 26**). For each reaction NOD-R, which reacts much more slowly than the MCs with peptides, acted as a negative control. For *N*-AcCys and Cys-Gly, the reaction did not work initially, possibly due to these compounds having autoxidized to their much less reactive disulfide derivatives prior to delivery. Therefore, a new attempt was made in which a little of the reducing agent $NaBH_4$ was added to the thiol solutions prior to addition of the MC mix, which yielded the desired *N*-AcCys and Cys-Gly conjugates.

Initially, conjugation of MCs with amines was performed in the same manner as described conjugation of thiols. As no MC-amine conjugates was detected by LC-MS/MS, a second attempt was performed using a higher concentration of the amines to the vials (10 mg

per vial) and lengthening the time of reaction to a day (for ammonium) and a week (for the other amines).

GSH and CYS conjugates were used to perform deconjugation assays. For this purpose, larger amounts of the conjugates were semi-synthesized using the same strategy as described above, but with a higher concentration of the MC mix. One ampoule of the MC mix (250 µL) and 3 mg of GSH or CYS were added to 250 µL of carbonate buffer (10 mg/mL) in 50% MeOH. After reaction overnight at ambient temperature, the reaction was checked by LC-MS/MS. No unconjugated MCs were detected, so the reaction was stopped by adding 20 µL of 20% FA to lower the pH from 11.0–11.5 to 5.0–6.0. The reaction solution was diluted with H_2O to less than 10% MeOH. The samples were loaded onto SPE cartridges and a washed with 5 mL of H_2O. The cartridges were eluted with a stepwise gradient of MeOH in H_2O (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100% MeOH, 3 mL each), and fractions were monitored by LC-MS/MS. For MC–GSH conjugates, fractions of 10, 20, 30, 40, 50 and 60% MeOH contained conjugates, and were combined. For MC–CYS conjugates, fractions of 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70% MeOH contained conjugates, and were combined. The conjugate fractions were evaporated to dryness with a rotary evaporator and was resuspended in 1.5 mL of 50% MeOH.

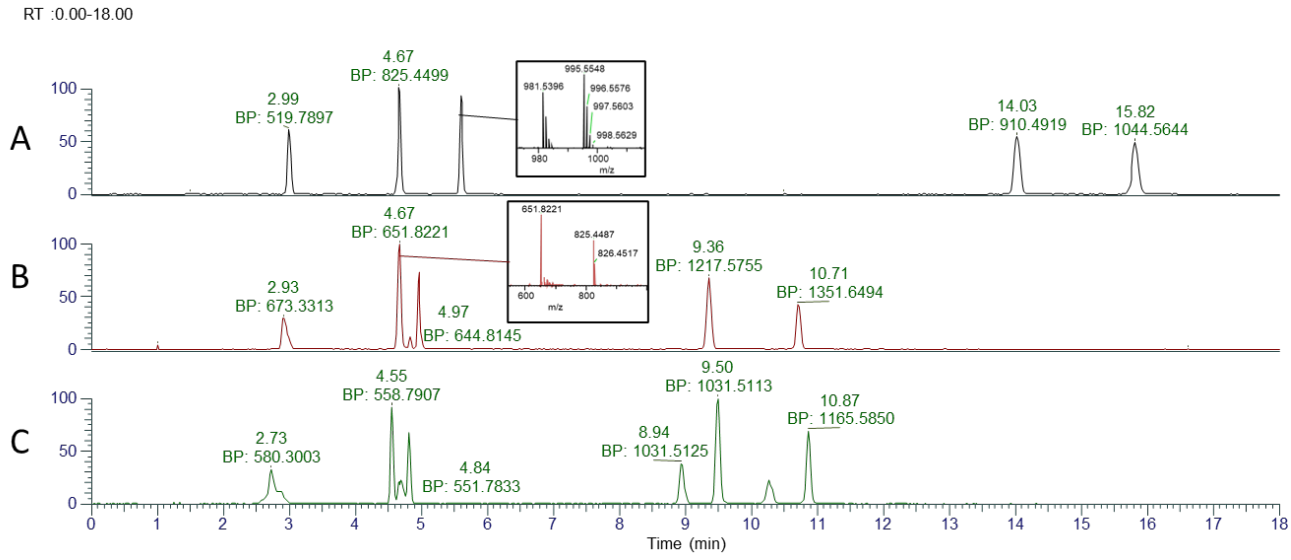


Figure 26. LC–HRMS chromatograms of conjugation reactions of toxins (1–5, **Figure 24** with GSH and CYS (a and b).

Chromatogram A shows the MCs standards before conjugation, Chromatogram B shows the MC–GSH conjugates after reaction of 1–5), with GSH. Chromatogram C shows MC–CYS conjugates after reaction of 1–5 with L-CYS. See **Table 15** for exact masses of MCs and their conjugates.

2.3.3. Reduction of MCs

Trial reductions of MCs were performed by adding $NaBH_4$ in excess (2–3 mg) to a vial insert containing 20 µL of the toxin mix and 180 µL of bicarbonate (**Figure 27**) or carbonate buffer (Supp. data. 1) (10 mg/mL for both buffers). The reaction was monitored by LC-MS/MS at 0, 2.5, 12, and 24 h after the start of the reaction.

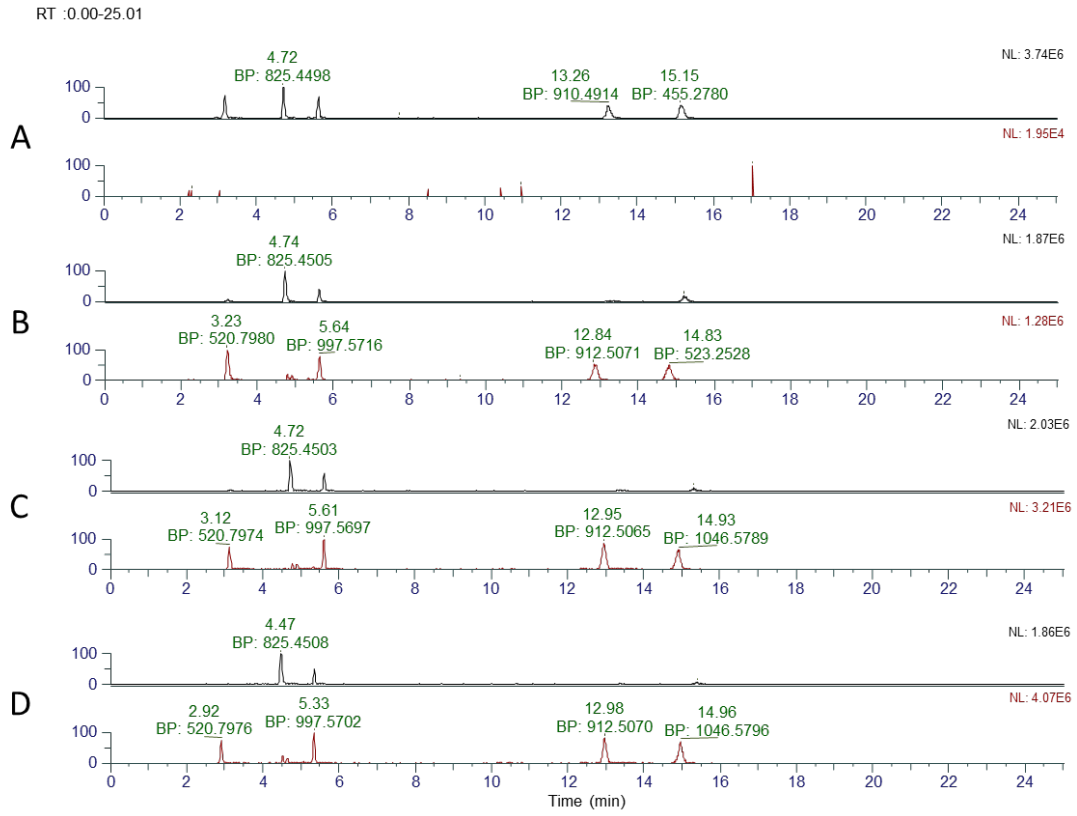


Figure 27. Reduction of the MC mix of standards $NaBH_4$.
Chromatograms of: A: MCs standards. B: 2h 30 min after the beginning of the reaction, C: 12 h after the beginning of the reaction, and; D: 24 h after the beginning of the reaction. For each time point, the first chromatogram (black) shows the MCs standards (1-5) and the second one (red) corresponds to the reduced MCs standards (m/z of reduced MC are presented in **Table 15**).

2.3.4. Deconjugation experiments

For each deconjugation experiment, aliquots of the semisynthetic conjugates MC–GSH and MC–CYS. For each time point, 10 µL of MC-conjugate, 10 µL of H2O, and 80 µL of NaOH/$NaBH_4$ solution (concentration depending on the experiment) were combined, and at the end of the reaction time the reaction was quenched by adding 100 µL of FA to give a pH < 6. Experiment 1 was performed with $NaBH_4$/NaOH (0.28 mM/ 0.1 M) at, pH 12,5, from 0–120 h with subsamples taken at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h. Experiment 2 was performed with $NaBH_4$/NaOH (0.14 M/ 0.5 M) at pH 13, from 0–20 h, with subsamples taken at 0, 1, 6 and 20 h. Experiment 3 was performed with $NaBH_4$/NaOH (0.27 M/ 0.5 M) at pH 13, from 0–2 h with subsamples taken at 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 h. Experiment 4 was carried out with $NaBH_4$/NaOH (0.54 M/ 0.5 M) at pH 13, from 0 to 22 h with sub-samples taken at 0, 1, 2, 4, 6 and 22 h.

2.3.5. LC–HRMS/MS conditions

For the chromatographic separation, an Agilent 1200 G1312B binary pump, G1367C autosampler and G1316B column oven (Agilent, Santa Clara, CA, USA) were used. Mobile phases were 0.1% FA in H_2O (A) and 0.1% in acetonitrile (B). A constant flow of 300 µL/min was used, with a linear gradient of B from 20% to 100% at 21 min, with a hold for 6 min, then returned to 20% B over 0.1 min with a hold for 3 min to equilibrate the column (total run time 30 min). The chromatographic column used was a Symmetry Shield RP18 (3.5 µm, 100 Å, 100 × 2.1 mm; Waters, Milford, MA, USA) which was held at +40 °C during the LC run. The injection volume was 5 µL.

A hybrid quadrupole–Orbitrap mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization interface (Q Exactive HF, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for the detection of analytes. A full-scan MS method was used with alternating scans in positive and negative modes (scan range *m*/*z* 500–1400 and *m*/*z* 750–1400, respectively). The resolution was set to 60,000, the AGC target at 1×10^6 and the maximum IT at 200 ms.

2.4. Results & discussion

2.4.1. Synthesis of model compounds: MC-protein conjugates

In this study, a range of MC–thiol and MC–amine conjugates were semi-synthesized to create model compounds in order to test base-catalyzed deconjugation protocols (c.f. Supplementary data 1 with all MC/thiol conjugates and Supplementary data 2 for all MC/amine conjugates). The conjugation reactions were performed with a mixture of MCs that contained, no, one, or two Arg residues, the thiols GSH and CYS (**Figure 26**), which served as model conjugates for the experiments. Conjugation with GSH and CYS correspond to addition of 307.0838 and 121.0197 Da, respectively, leading to the exact *m*/*z* values in **Table 15**. All these conjugates were detected with mass errors of less than 5 ppm. For the non-Arg-containing (MC-LA and [D-Leu$_1$]MC-LY) CYS -conjugates, the pairs of isomers were well resolved.

Table 15: Exact masses used for MCs on the MC mix, and their GSH and CYS conjugates.

		MC-RR	NOD-R	MC-LR	[Dha^7] MC-LR	MC-LA	[Leu^1]MC-LY
MCs	$[M+H]^+$	1038.5731	825.4505	995.556	981.5404	910.492	1044.5652
	$[M+2H]^+$	519.7902	413.2289	498.2817	491.2738	609.2916	522.7862
	$[M-H]^-$	1036.5585	823.4360	993.5415	979.5258	908.4775	1042.5507
MC–GSH	$[M+H]^+$	1345.6569	1132.5343	1302.6399	1288.6242	1217.5759	1351.6490
	$[M+2H]^+$	673.3321	566.7708	651.8236	644.8157	609.2916	676.3281
	$[M-H]^-$	1343.6423	1130.5198	1300.6253	1286.6096	1215.5613	1349.6345
MC–CYS	$[M+H]^+$	1159.5928	946.4703	1116.5758	1102.5601	1031.5118	1165.5850
	$[M+2H]^+$	580.3001	473.7388	558.7915	551.7837	516.2595	583.2961
	$[M-H]^-$	1157.5783	944.4557	1114.5612	1100.5456	1029.4972	1163.5704
MC–H_2 (reducted MC)	$[M+H]^+$	1040.5887	827.4662	997.5717	983.5560	912.5077	1046.5809
	$[M+2H]^+$	520.7980	414.2367	499.2895	492.2817	456.7575	523.7941
	$[M-H]^-$	1038.5742	825.4516	995.5571	981.5415	910.4931	1044.5663

2.4.2. Reduction of MCs with sodium borohydride

Previous studies on deconjugation had identified the risk of re-conjugation of MCs during base catalyzed deconjugation [27]. To avoid this phenomenon, several strategies had been proposed, such as increasing the pH of the reaction to raise the rate of deconjugation while minimizing the reverse reaction, or removing free thiols formed during the reaction. Another possibility suggested in the same study was to convert the freshly deconjugated MCs into non-reactive derivatives to prevent re-conjugation. Here, we tested the reduction of MCs as a way to convert the free MCs into non-reactive derivatives. For this, reduction of MCs standard was carried out (**Figure 27)**. The reduction of the MC standards was observed between chromatograms A and B where the disappearance of the peaks of the MCs standards (except for NOD-R which does not react as quickly as the MCs), and the appearance of the peaks of reduced MCs (in red) is concomitantly observed. The reduction reaction is almost complete after 2.5 h (B) and continues until 12 h (C) or 24 h (D) for [Dha$_7$]MC-LR.

2.4.3. Base catalyzed deconjugation and reduction of MCs-thiols conjugates

Deconjugation experiments of MC-protein conjugates were performed following different protocols and different kinetics **(Figure 28**).

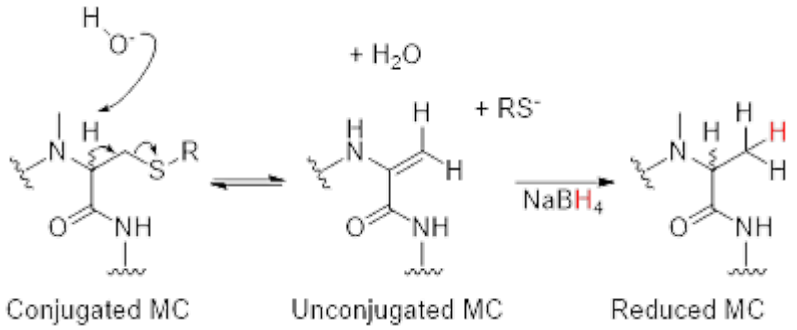


Figure 28: Schematic representation of the reactions involved in deconjugation experiments. Peptide-conjugated MCs first underwent a catalyzed base deconjugation followed by a reduction reaction to obtain a deconjugated, non-reactive MC.

Experiment 1 (**Figure 29**, Exp1.) was performed with $NaBH_4$/NaOH at [0.28 mM/ 0.1 M], with pH = 12.5, on a kinetic from 0 h to 120 h with subsamples taken at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h. A complete deconjugation of the MC-LR-GSH and MC-LR- CYS conjugates was observed between 0 h and 24 h and between 24 h and 48 h, respectively. In both cases, a peak of unreduced deconjugated MCs was observed between 0 and 24 h followed by a progressive decrease of unreduced deconjugated MCs marking the beginning due to the reduction reaction. The curves of unreduced deconjugated MCs and reduced deconjugated MCs cross between 24 and 48 h and the amount of deconjugated and reduced MCs will progressively increase until 120 h after the beginning of the reaction.

In experiment 2 **(Figure 29**, Exp2.), the concentrations of $NaBH_4$/NaOH were increased [0.14 M/ 0.5 M] until the obtention of a pH = 13. The kinetics were shortened from 0 h to 20 h with subsamples taken at 0, 1, 6 and 20h. Deconjugation was observed between 0 h and 1h for MC-LR-GSH and between 1 h and 6 h for MC-LR-CYS. During this reaction, the reduction of deconjugated MCs starts as early as 1h and continues during the reaction, until exceeding the unreduced deconjugated forms between 6 h and 20 h for both types of conjugates. The increase of the concentration of base and reducing agent accelerated both the deconjugation and reduction reaction for each of the conjugate types (-LR/GSH and -LR/ CYS) compared to the first experiment.

In the third experiment (**Figure 29**, Exp3.), the same NaOH concentration was used [0.5 M] with an increased concentration of $NaBH_4$ [0.27 M], with very short kinetics ranging from 0 h to 2 h with subsamples taken at 0, 0.5, 1, 1.5 and 2h. As before, deconjugation occurs very rapidly for MC-LR/GSH conjugates. This kinetic allows to have more precision on the deconjugation time which takes place for MC-LR/GSH between 0.5 h and 1h. For the -LR/CYS conjugates, the reaction is slower and after 2 h of reaction, the deconjugation is not completely finished. The reduction reaction is faster here since on graph of the 3rd column, the curves for unreduced MC-LR and reduced MC-LR cross between 0.5 h and 1 h whereas they only crossed between 6 h and 20 h for experiment 2 and between 24 h and 48 h for experiment 1.

In experiment 4 (**Figure 29**, Exp.4), the same NaOH was used (0.5 M) but with an increased concentration of $NaBH_4$ (0.54 M) and the reaction was followed for 22 h. Deconjugation of MC-LR-GSH occurred in less than 1 h, and a little more slowly for MC-LR-CYS (complete between 2 and 4 h). With this concentration of reducing agent, the reaction was complete between 6 and 22 h. The reduction has also worked on with the other MCs that were conjugated to GSH or CYS, and between 6 and 22 h we have obtained in both cases a mixture of MCs both deconjugated and reduced.

Experiment 4 resulted in both more rapid deconjugation and reduction of MC-thiol conjugates (GSH and CYS) than the other experiments. One difference between the four experiments lies in the base concentration (which was increased from 0.1 M in experiment 1 to 0.5 M in experiments 2, 3 and 4), which speeds up deconjugation (from 24 to 48 h in experiment 1, to 1 to 4 h in experiment 4). In addition, the concentration of reducing agent ($NaBH_4$) was also increased (from 0.28 mM in experiment 1, to 0.54 M in experiment 4), accelerating the reduction of deconjugated MCs (from a mixture not fully reduced in 120 h in experiment 1, to a fully reduced mixture in less than 22 h in experiment 4).

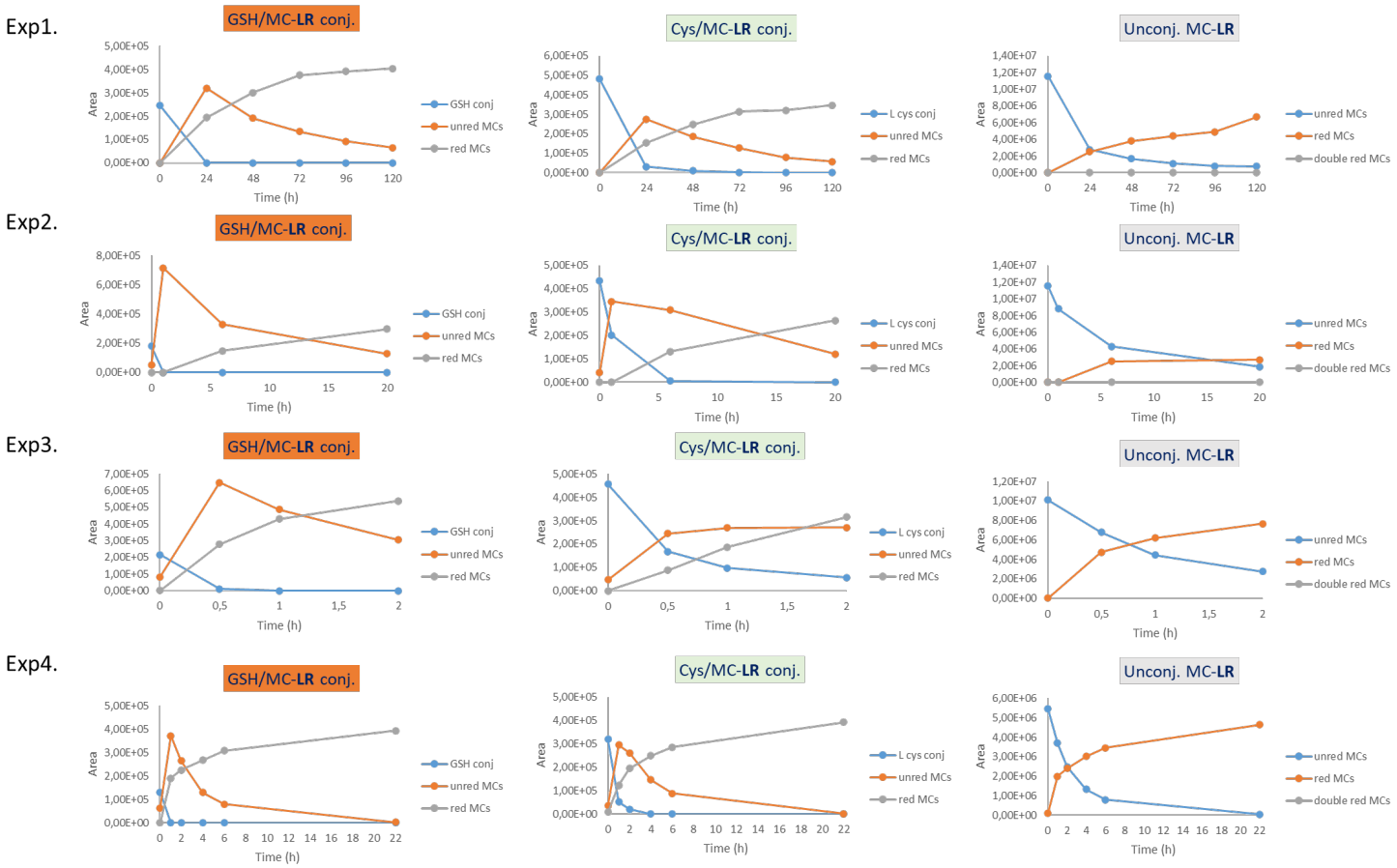


Figure 29. Deconjugations experiment on MC-LR-proteins conjugates with basic treatment (NaOH) and reduction of the deconjugated forms with $NaBH_4$.

Experiment 1 was performed with NaBH4/NaOH [0.28mM/ 0.1M], pH = 12,5, on a kinetic from 0 to 120h with subsamples taken at 0, 24, 48, 72, 96 and 120h. Experiment 2 was performed with NaBH4/NaOH [0.14 M/ 0.5 M], pH = 13, on a kinetic from 0 to 20h with subsamples taken at 0, 1, 6 and 20h. Experiment 3 was performed with NaBH4/NaOH [0.27M/ 0.5M], pH = 13, on a kinetic from 0 to 2h with subsamples taken at 0, 0.5, 1, 1.5 and 2h. The experiment 4 was carried out with NaBH4/NaOH [0.54M/ 0.5M], pH = 13, on a kinetic of 0 to 22h with sub-samples taken at 0, 1, 2, 4, 6 and 22h. For each experiment, the same method has been tested on: MC-LR/GSH conjugates (left column), MC-LR/ CYS conjugates (middle column) and unconjugated MC-LR (right column) (results on others MCs variants are available on Supplementary data 4 - 7). On each graphic blue curves represents the intensity of MCs/conjugates, orange curves: unreduced deconjugated MCs and grey curves: reduced and deconjugated MCs. In order to stop the reaction, when a subsample was taken, formic acid [0.2M] was added to neutralize the solution and reach a pH 5-6.

Experiment 4 also included results for the other MCs variants present in the mix (**Figure 30**). The deconjugation occured more rapidly on MC-GSH (complete in less than 1 h for all MCs, except for [Dha^{7}]MC-LR which was complete by 2 h) than for MC-CYS conjugates, where deconjugation occured in less than 1 h for MC-RR, by 4 h for MC-LR and MC-LA, by 6 h for [Leu^{1}]MC-LY, and by 22 h for [Dha^{7}]MC-LR. [Dha^{7}]MC-LR was the MC with the longest deconjugation time among the 5 MCs tested in these experiments. Conversely, MC-RR was the MC that deconjugated the fastest from for both the GSH and CYS conjugates. Turning now to the second part of the reaction, the reduction of the deconjugated toxins, it was observed that depending on the variant the reduction time can vary. For example, toxins like MC-LA, MC-LR and [Leu^{1}]MC-LY (complete reduced by 22 h) were reduced faster than [Dha^{7}]MC-LR or MC-RR (not fully reduced after 22 h of reaction).

As suggested in previous studies, increasing the pH significantly accelerated the deconjugation reaction. For example, Miles et al. [26], who also used synthetic MC-GSH and MC-CYS conjugates treatment of [Dha^{7}]MC-LR- CYS conjugates with carbonate buffer in MeOH (pH 10.7) resulted in a partially deconjugated mixture after 21 h, with residual MC-CYS conjugates still detectable after 65 h. However, by using a stronger base (**Figure 30**), complete deconjugation of the same conjugates was obtained in the present study at between 6 and 22 h. Similarly, Miles et al. [26] also performed a deconjugation reaction on [Asp^{3}]MC-RY-GSH conjugates by treatment of carbonate buffer in MeOH (pH= 10.7). Deconjugation of this conjugate was obtained after 48 h of reaction but traces of [Asp^{3}]MC-RY-GSH conjugate were detectable [26]. In our study, [Leu^{1}]MC-LY-GSH conjugates were deconjugated after only 1 h of reaction with NaOH at pH 13 without detecting other isomers of the conjugates by using the strategy of reducing the deconjugated MCs to prevent reconjugation.

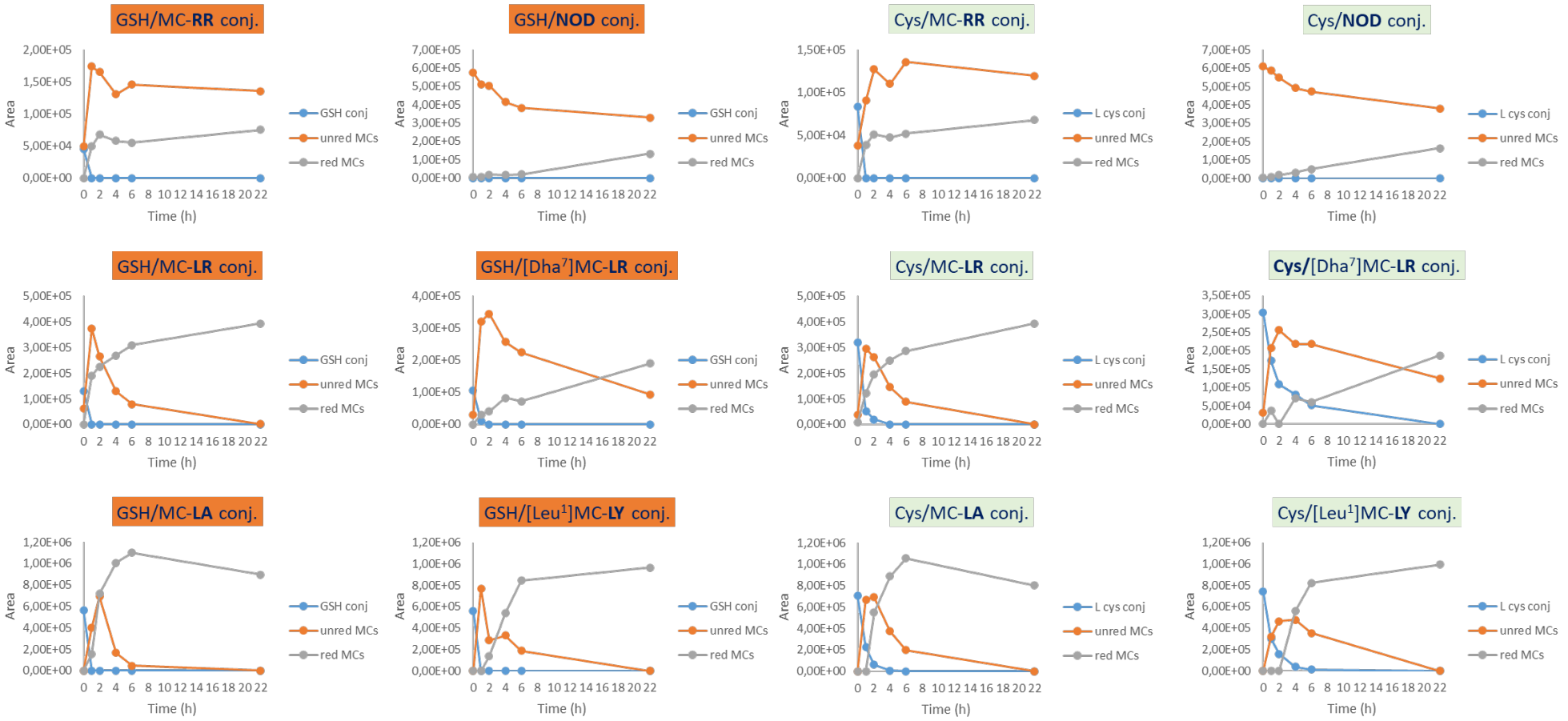


Figure 30. Results of deconjugation experiment 4 with all tested conjugates, (toxins 1-5, **Figure 24**, each conjugated with a and b, **Figure 25**).

The experiment 4 was carried out with NaBH4/NaOH [0.54M/ 0.5M], pH = 13, on a kinetic of 0 to 22 h with sub-samples taken at 0, 1, 2, 4, 6 and 22 h. On each graphic blue curves represents the intensity of MCs conjugates, orange curves: unreduced deconjugated MCs and grey curves: reduced and deconjugated MCs. In order to stop the reaction, when a subsample was taken, formic acid [0.2M] was added to neutralize the solution and reach a pH 5-6.

2.5. Conclusion

In this study, a mixture of 5 MCs (MC-RR, MC-LR, [Dha^{7}]MC-LR, MC-LA and [Leu^{1}]MC-LY) and NOD-R were conjugated with a range of amines (ammonia, L-alaninamide, Nα-acetyl-L-Lysine, N^{ε}-acetyl-L-lysine, N-acetyl-L-tyrosine) and thiol-containing peptides (GSH, CYS, *N*-AcCys, γ-Glu-Cys, CYS-Gly). Among these, MC-GSH and MCs- CYS conjugates were used to test base-catalyzed deconjugation as an alternative to Lemieux oxidation. The base-catalyzed deconjugation protocol tested here included a basic deconjugation step with NaOH together with *in situ* reduction of the deconjugated MCs with $NaBH_4$, to give the reduced (non-reactive) MCs. Among the four deconjugation protocols tested, with differing concentrations of base and reducing agent, the best performing was the one with NaOH/$NaBH_4$ at 0.5 M/ 0.54 M. This protocol was applied to the two model MCs-peptide mixes and resulted in complete deconjugation between 1 and 2 h for MC-GSH conjugates and between 1 and 6 h for MC-CYS conjugates. By adjusting the concentration of the reducing agent, a reduction of the deconjugated toxins was obtained within a few hours (from 6 h to one day for the MC-RR). The next step towards development of an operative method for the analysis of total forms of MCs would be to test this base-catalyzed deconjugation protocol on tissue matrices naturally- or laboratory-contaminated with MCs. Successful development of a base-catalyzed deconjugation procedure for real samples would lead to a qualitative, or even semi-quantitative, method for identifying the MC variants conjugated in tissue samples. This is in contrast to other methods like the Lemieux oxidation or the ozonolysis, where information about the variants is lost during the analysis.

2.6. Acknowledgements

The authors would like to thank the University of Reims Champagne Ardennes (URCA) and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) for co-funding the thesis project of which this study is a part. The authors would also like to thank the URCA and the ABIES doctoral school for funding a doctoral mobility grant, which enabled this study to be carried out at NRC-CNRC Canada. The author would also like to thank Dr. McCarron for assistance with setting up the study visit at NRC-CNRC. Special thanks also go to Krista Thomas and Eliott Wright for their support and advice during the experiments.

2.7. References

1. Chorus, I. and M. Welker, *Cyanobacterial toxins*, in *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. 2021: London. p. 150.
2. Smith, V.H., *Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem.* Environ Sci Pollut Res Int, 2003. **10**(2): p. 126-39.
3. Paerl, H.W., et al., *Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria.* Scientific World Journal, 2001. **1**: p. 76-113.

4. Mohamed, Z., et al., *Detection of free and bound microcystins in tilapia fish from Egyptian fishpond farms and its related public health risk assessment.* Journal of Consumer Protection and Food Safety, 2019. **15**(1): p. 37-47.

5. Schopf, J.W., *The Fossil Record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage.*, in *The Ecology of Cyanobacteria*, Springer, Editor. 2000. Dordrecht.

6. Bouaïcha, N., et al., *Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins.* Toxins, 2019. **11**(12): p. 714.

7. Jones, M.R., et al., *CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria.* Water Res, 2021. **196**: p. 117017.

8. Zhang, D., et al., *Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health.* Sci Total Environ, 2009. **407**(7): p. 2191-9.

9. Lance, E., et al., *Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to Physa (= Physella) acuta.* Sci Total Environ, 2010. **408**(17): p. 3560-8.

10. Lance, E., et al., *Evidence of trophic transfer of microcystins from the gastropod Lymnaea stagnalis to the fish Gasterosteus aculeatus.* Harmful Algae, 2014. **31**: p. 9-17.

11. Rezaitabar, S., et al., *Transfer, tissue distribution and bioaccumulation of microcystin LR in the phytoplanktivorous and carnivorous fish in Anzali wetland, with potential health risks to humans.* Sci Total Environ, 2017. **575**: p. 1130-1138.

12. Kondo, F., et al., *Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins.* Chem Res Toxicol, 1992. **5**(5): p. 591-6.

13. Hastie, C.J., et al., *Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1726**(2): p. 187-93.

14. Maynes, J.T., et al., *Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins.* J Mol Biol, 2006. **356**(1): p. 111-20.

15. Campos, A. and V. Vasconcelos, *Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells.* Int J Mol Sci, 2010. **11**(1): p. 268-287.

16. Craig, M., et al., *Molecular mechanisms underlying he interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases.* Biochem Cell Biol, 1996. **74**(4): p. 569-78.

17. Liu, J. and Y. Sun, *The role of PP2A-associated proteins and signal pathways in microcystin-LR toxicity.* Toxicol Lett, 2015. **236**(1): p. 1-7.

18. McLellan, N.L. and R.A. Manderville, *Toxic mechanisms of microcystins in mammals.* Toxicol Res (Camb), 2017. **6**(4): p. 391-405.

19. Vichi, S., F.M. Buratti, and E. Testai, *Microcystins: Toxicological Profile*, in *Marine and Freshwater Toxins*, P. Gopalakrishnakone, et al., Editors. 2016, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 219-238.

20. Buratti, F.M., et al., *Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation.* Arch Toxicol, 2017. **91**(3): p. 1049-1130.

21. Kim, R.B., *Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition.* Eur J Clin Invest, 2003. **33 Suppl 2**: p. 1-5.

22. Wood, R., *Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature.* Environ Int, 2016. **91**: p. 276-82.

23. Svircev, Z., et al., *Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings.* Arch Toxicol, 2019. **93**(9): p. 2429-2481.

24. Massey, I.Y., et al., *A Mini-Review on Detection Methods of Microcystins.* Toxins (Basel), 2020. **12**(10): p. 641.

25. Bouteiller, P., et al., *Analysis of Total-Forms of Cyanotoxins Microcystins in Biological Matrices: A Methodological Review.* Toxins (Basel), 2022. **14**(8).

26. Miles, C.O., *Rapid and Convenient Oxidative Release of Thiol-Conjugated Forms of Microcystins for Chemical Analysis.* Chem Res Toxicol, 2017. **30**(8): p. 1599-1608.

27. Miles, C.O., et al., *Conjugation of Microcystins with Thiols Is Reversible: Base-Catalyzed Deconjugation for Chemical Analysis.* Chem Res Toxicol, 2016. **29**(5): p. 860-70.

28. Zemskov, I., H.M. Kropp, and V. Wittmann, *Regioselective Cleavage of Thioether Linkages in Microcystin Conjugates.* Chemistry, 2016. **22**(31): p. 10990-7.

29. LeBlanc, P., et al., *Isolation and Characterization of [DLeu(1)]microcystin-LY from Microcystis aeruginosa CPCC-464.* Toxins (Basel), 2020. **12**(2): p. 77.

30. Thomas, K., et al., *CRM-dmMCLR, a certified calibration solution reference material for [Dha$_7$]-microcystin-LR*, in *Biotoxin Metrology Technical Report CRM-dmMCLR-20061116*. 2013, National Research Council Canada: Halifax, Canada.

31. Thomas, K., et al., *CRM-MCLR, a certified calibration solution reference material for microcystin-LR*, in *Biotoxin Metrology Technical Report CRM-MCLR-20070131*. 2013, National Research Council Canada: Halifax, Canada.

32. Thomas, K., et al., *CRM-MCRR, a certified calibration solution reference material for microcystin-RR*, in *Biotoxin Metrology Technical Report CRM-MCRR-20070207*. 2013, National Research Council Canada: Halifax, Canada.

33. Thomas, K., et al., *CRM-NOD-R, a certified calibration solution reference material for nodularin-R*, in *Biotoxin Metrology Technical Report CRM-MCLR-20070131*. 2013, National Research Council Canada: Halifax, Canada.

34. Thomas, K., et al., *CRM-MCLA, a certified calibration solution reference material for MC-LA*. 2022, National Research Council of Canada.

Discussion Générale

L'augmentation ces dernières années de la fréquence des proliférations de cyanobactéries, conséquence du changement climatique et de l'eutrophisation, fait l'objet de nombreuses publications (76). Du fait du risque sanitaire engendré par les cyanobactéries toxiques, il devient de plus en plus urgent de surveiller plus étroitement leur prolifération dans les ecosystèmes dulcicoles, mais également, de mettre en œuvre davantage de mesures préventives dans le cadre de la gestion des masses d'eau (13). De nombreux outils sont ainsi développés, à la fois pour détecter la présence de cyanobactéries (dosage chlorophylle-a, utilisation de sonde à phycocyanine) mais également leurs toxines (tests ELISA, utilisation de la LC-MS/MS) (3). Les impacts sanitaires de ces toxines ne sont pas négligeables et, chaque année, des cas d'intoxications humaines et animales sont rapportés (34). C'est pourquoi des seuils de suivis des cyanotoxines dans les eaux de baignade et de boisson sont mis en place, et parallèlement de plus en plus de méthodes de dosage des cyanotoxines sont également développées (13, 37).

Les MC, considérées comme étant les cyanotoxines les plus fréquemment retrouvées dans les blooms de cyanobactéries à travers le monde, sont soumises à un seuil réglementaire de l'OMS datant de 2007, de 1 µg/L d'équivalent MC-LR dans les EDCH (12, 14). L'Anses en 2020 a également fixé des concentrations maximales tolérables en MC dans les EDCH et les eaux récréatives à 0,2 µg/L et 0,3 µg/L, respectivement (13). Il existe cependant d'autres questions relatives au suivi du risque sanitaire de ces MC notamment lorsqu'elles s'accumulent dans des organismes (particulièrement aquatiques). Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun seuil règlementaire pour les MC dans les organismes aquatiques (poissons, crustacés…). Or, l'étude de la bibliographie a permis de montrer que ces toxines peuvent s'accumuler dans ces organismes. De plus, parmi les différentes formes d'accumulations des MC dans les organismes, il existe une fraction cellulaire libre bien caractérisée et une fraction liée à des protéines (par exemple aux protéines phosphatases) encore méconnues. Cette fraction liée a fait l'objet de recherches bibliographiques ayant permis de mettre en évidence plusieurs méthodes de dosage, à ce jour appliquées par très peu de laboratoires dans le monde. Pourtant, ces MC liées dans les tissus ne sont pas minoritaires et peuvent au contraire compter pour la forme majeure d'accumulation des MC dans les organismes (55, 159, 220).

Différentes méthodes permettent l'extraction et l'analyse des MC totales (libres et liées) Les premières méthodes décrites pour l'analyse des MC totales ont été l'oxydation de Lemieux (40, 231) et l'ozonolyse (56, 226). Plus récemment, deux autres méthodes ont été développées, la déconjugaison à pH basique (57, 58, 227) et la LID (59). Le chapitre 1 de ce mémoire a d'ailleurs été consacré au recensement, description et discussion de ces méthodes. Et deux autres chapitres ont été consacrés à la comparaison de deux de ces méthodes : l'oxydation de Lemieux (Chapitre 3) et la déconjugaison à pH basique (Chapitre 5)

Dans ce contexte, ce travail de doctorat avait pour objectif de développer et comparer des méthodes de dosage des MC totales dans des matrices de poissons frais. Pour cela une méthode de dosage de MC libres par LC-MS/MS a été validée après comparaison de trois protocoles d'extraction issus de la littérature. Par la suite, un travail d'optimisation et de comparaison a été réalisé sur l'oxydation de Lemieux qui est la méthode la plus utilisée dans la littérature pour le dosage des MC totales. Grâce à l'utilisation conjointe de ces deux méthodes,

MC libres et oxydation de Lemieux, il est alors possible de conclure à la présence de MC liées dans un échantillon (MC liées = MC totales - MC libres). Cette stratégie a ainsi été appliquée à des échantillons frais de carpes dans le but d'estimer l'accumulation et la dépuration des MC totales dans différents organes de poissons (filets, foie, reins, appareil digestif). Dans un objectif de comparaison des méthodes de dosages de MC totales recensées dans la littérature, un travail a été réalisé sur le développement d'une méthode à visée qualitative par déconjugaison à pH basique sur des conjugués MC-peptides.

Pour répondre à ces objectifs, les principales étapes de ces travaux de thèse ont été :

1) La comparaison et validation d'une méthode de dosage des MC libres dans les tissus de trois espèces de poissons (saumon, truite et carpe).
2) L'optimisation et la comparaison de deux protocoles d'extraction des MC totales par oxydation de Lemieux dans la matrice de poissons
3) L'étude de la bioaccumulation des MC totales dans des tissus de poissons exposés naturellement ou en laboratoire à des cyanotoxines MC.
4) La mise au point d'une méthode d'analyse qualitative des MC totales par déconjugaison à pH basique sur des composés MC/peptides

Les paragraphes qui suivent récapitulent les réponses apportées par les travaux effectués, ainsi que les perspectives de recherche et d'applications qu'ils ouvrent vis-à-vis de l'importance de la prise en compte des MC totales - lors de l'analyses d'espèces animales contaminées par des MC - ainsi que la nécessité de développer des approches harmonisées et validées pour l'analyse de ces formes de toxines.

1) Comparaison et validation des protocoles d'extraction pour l'analyse des MC libres dans les matrices de poisson par LC-MS/MS

Les analyses des MC libres sont les méthodes de dosages des MC les plus répandues (37), qui comprennent généralement une étape d'extraction avec différents mélanges de solvants organiques suivie d'une étape de purification (LLE, SPE ou IAC). Les extraits obtenus peuvent être analysés par différentes méthodes et notamment par LC-MS/MS. L'objectif ici était de développer et d'évaluer une méthode d'extraction et d'analyse LC-MS/MS des MC libres dans les filets de poisson frais. Trois méthodes d'extraction des MC libres (appelées ici "freeMC1", "freeMC2" et "freeMC3") ont été sélectionnées à partir de la littérature et comparées sur des matrices de poissons frais enrichies avec deux variants de MC (MC-LR & MC-RR) (40, 120, 230). Cette comparaison a été réalisée en s'appuyant sur les taux de récupération et les effets matrice. La méthode la plus performante a ensuite été sélectionnée et validée avec une approche par critères selon la norme NF V03-110 sur des filets de trois espèces de poissons (saumon, truite et carpe).

Tout d'abord, une comparaison des taux de récupération obtenus a été réalisée sur les trois protocoles d'extraction des MC libres sur des filets de saumon et de truite dopés avec deux concentrations de MC-RR et deux concentrations de MC-LR (n=6). Dans le cas de la MC-RR, la méthode ayant les meilleurs taux de récupération est "FreeMC3", suivie de "FreeMC1", sur laquelle on observe plus de variabilité, alors que "FreeMC2" donne les taux de récupération les plus faibles. La même tendance a été observée pour la MC-LR, avec des taux de récupération > 100 % pour FreeMC3, reflétant probablement une augmentation du signal due à la matrice. Lorsque l'on compare les deux matrices entre elles (truite et saumon), on observe peu de différence de taux de récupération quelle que soit la méthode considérée ("FreeMC3" ou "FreeMC1"), et quel que soit le variant (MC-RR ou –LR).

Une étude précédente a appliqué le même protocole "FreeMC1" à des échantillons de filets de poisson-chat dopés avec huit variants de MC, dont MC-RR et -LR. Des rendements d'extraction de 130% et 107% ont été obtenus, respectivement pour MC-RR et -LR (120). Ces rendements sont plus élevés que ceux obtenus dans notre étude sur des échantillons de saumon dopés (92% pour MC-RR et 63% pour MC-LR). Ces différences pourraient s'expliquer par le choix du mode d'ionisation lors de l'analyse LC-MS/MS, négatif dans (120) et positif dans cette étude.

Une autre étude a appliqué, cette fois-ci, le protocole " FreeMC2 " à des filets de truite dopés en MC-LR et a obtenu des rendements d'extraction de 80 % (40). Ici, la même méthode appliquée à des échantillons de truite dopés avec de la MC-LR a donné des rendements d'extraction de 45%. Ces différences de résultats pourraient s'expliquer par la condition de la matrice : lyophilisée (40) et fraîche dans notre cas, ce qui peut influencer les effets de matrice rencontrés lors de l'analyse LC-MS/MS.

Lors de nos études, les meilleurs taux de récupération ont été obtenus avec le protocole "FreeMC3", que ce soit pour la MC-RR ou -LR et quelle que soit la matrice (truite ou saumon). A l'inverse, le protocole "FreeMC2" a montré à la fois les taux de récupération les plus faibles et la plus grande variabilité en comparant les matrices ou les concentrations. Ce protocole a donc été écarté pour les étapes suivantes.

Afin d'évaluer les effets matrice rencontrés avec les deux protocoles sélectionnés à l'étape précédente, les protocoles "FreeMC1" et "FreeMC3" ont été exécutés à blanc pour récupérer des extraits non-contaminés, qui ont été dopés après extraction avec soit de la MC-RR soit de la MC-LR pour atteindre des concentrations finales de toxines de 15, 30, 60, 150 et 300 µg/kg (n=3). Une gamme dans le solvant a été réalisée en utilisant les mêmes concentrations de toxines que pour les gammes de la matrice. La différence d'intensité entre les gammes des deux protocoles d'extraction utilisés sur les deux matrices a ensuite été comparée à l'intensité de la gamme dans le solvant pour voir si le signal était augmenté ou diminué. Sur la base de ces résultats, l'effet matrice induit par les matrices de filet de truite et de saumon lors de l'utilisation de l'un des protocoles "FreeMC" a été calculé.

Il a été observé que pour la MC-RR, il n'y a eu que des augmentations du signal sauf pour le protocole "FreeMC1" sur la matrice truite, alors que pour la MC-LR, il y a eu à la fois une diminution du signal pour le protocole "FreeMC1" et une augmentation du signal pour le

protocole "FreeMC3". En outre, un examen plus approfondi de l'effet matrice par protocole révèle que pour le protocole "FreeMC1", il y a à la fois des cas de diminution du signal et des cas d'augmentation du signal, alors que pour le protocole "FreeMC3", il n'y a que des cas d'augmentation du signal. Ainsi, le protocole "FreeMC3" a été retenu, combinant les meilleurs taux de récupération et la faible variabilité des tests précédents, des effets matrices de type augmentation du signal uniquement quelle que soit la matrice de poisson ou le variant de MC testé, et une facilité d'exécution en laboratoire puisque le protocole "FreeMC3" ne nécessite pas d'étape de purification.

Des études antérieures impliquant le protocole "FreeMC1", appliqué à 8 variants de MC, y compris MC-RR et -LR, dopés dans des filets de poisson-chat, ont évalué les effets de matrice à -5% et 2%, sur MC-RR et -LR, respectivement (120). Dans notre étude, l'application du protocole "FreeMC1" à des échantillons de saumon a entraîné des effets de matrice de +21% pour MC-RR et de -12% pour MC-LR dans les filets de saumon et de -19% et -30% pour les filets de truite dopés avec MC-RR et -LR, respectivement. Les différences entre notre étude et l'étude originale (120) en termes d'effet matrice peuvent s'expliquer par la différence entre les matrices testées (poisson-chat dans (120) et saumon ou truite dans notre étude), mais aussi par des différences dans l'analyse LC-MS/MS réalisée, et notamment le choix du mode (négatif dans (120), positif dans notre étude).

En conclusion, après évaluation des taux de récupération et des effets matrice, la méthode "FreeMC3" a été sélectionnée. Une validation selon l'approche par critères de la norme NF V03-110 a alors été réalisée. Chaque série a été réalisée sur trois espèces de poissons différentes (truite, saumon et carpe) afin d'inclure de la variabilité et sur trois niveaux de concentration de MC-LR (1,5 ; 15 et 500 µg/kg) et de MC-RR (7,5 ; 75 et 500 µg/kg) et analysés en double. Les taux de récupération obtenues se situent entre 91 et 100 % pour la MC-RR et entre 94 et 106 %. La fidélité sous condition de répétabilité a été estimée entre 5 et 10 % pour la MC-RR et entre 4 et 7 % pour la MC-LR, et la fidélité intermédiaire entre 10 et 15 % pour la MC-RR et entre 11 et 18 % pour la MC-LR. Les LD et LQ pour la MC-LR ont été estimées à 1,4 et 4,7 µg/kg, respectivement, et pour la MC-RR à 0,2 et 0,5 µg/kg, respectivement. Les résultats des taux de récupérations obtenus lors de la validation de notre protocole "FreeMC3" semble cohérent avec ce qui a été observé dans la littérature et notamment les taux obtenus lors de la validation du protocole d'extraction "FreeMC2" (120) avec des résultats de 90 à 115% pour la MC-LR et de 130% en moyenne sur des échantillons de poissons-chats. De même, les LD et LQ obtenus dans notre étude sont comme celles obtenus dans (120), inférieures à 10 µg/kg.

Les MC libres ne représentant qu'une partie des MC accumulées dans les organismes, avec les MC liés aux protéines (phosphatases par exemple), il serait pertinent de développer des méthodes d'extraction et d'analyse qui permettraient ensuite d'analyser les MC totales dans un échantillon. De plus, en travaillant successivement avec une méthode d'analyse des MC libres et des MC totales, il serait possible de mieux comprendre la distribution des formes libres/liées des MC dans les organismes, notamment aquatiques.

2) Analyse des MC totales par oxydation de Lemieux et LC-MS/MS dans des échantillons de poissons et de moules dulcicoles : optimisation et comparaison de protocoles

Le défi méthodologique est plus important pour l'extraction des formes totales (libres et liées aux protéines) des MC dans les organismes, pour lesquelles la méthode la plus courante d'oxydation de Lemieux permet d'extraire et d'analyser le fragment libéré appelé MMPB. L'un des principaux intérêts de cette méthode est d'analyser tous les variants de MC en une seule fois au moyen du fragment MMPB libéré, permettant d'avoir une bonne estimation quantitative de la contamination d'un échantillon par des MC (et/ou nodularines). Il existe, dans la littérature, une grande variabilité non seulement dans les taux de récupération des méthodes, mais aussi dans les protocoles utilisés. Il est donc difficile de comparer les méthodes d'oxydation de Lemieux. Les objectifs de cette étude étaient d'optimiser / adapter sur des matrices de tissus de poissons frais un protocole de la littérature appelé ici "Lemieux1" qui a été développé sur des tissus de mollusques (39, 48) pour l'adapter à des matrices de tissus de poissons frais. Cependant, n'ayant pu obtenir que des taux de récupération modérés avec ce protocole "Lemieux1" sur des matrices de poissons, nous avons décidé de comparer ce protocole "Lemieux1" avec un autre protocole issu de la littérature, appelé ici "Lemieux2" (158, 159) que nous avons testés sur différentes matrices fraîches et lyophilisées. Un effort particulier a également été fait pour comparer les différentes méthodes d'étalonnage afin de mieux comprendre l'impact de cette étape sur le taux de récupération de l'analyse.

L'étape de SPE du protocole "Lemieux1" a fait l'objet d'optimisation : 3 types de cartouches SPE ont été comparés (SampliQ (40), HLB (39, 48) et Strata SDB-L (231)) avec des tests se rapprochant progressivement de la complexité du protocole d'oxydation de Lemieux. Le taux de récupération obtenu avec la cartouche SampliQ a indiqué que la cartouche ne retenait pas efficacement le MMPB dans l'échantillon aqueux (que ce soit pour un volume d'échantillon de 20 ou 35 ml, avec une récupération < 32 % pour l'échantillon d'eau dopé au MMPB) et a donc été écarté. La cartouche Strata SDB-L a obtenu le meilleur taux de récupération sur le protocole "Lemieux1" avec 13,2 % et 10,4 % pour des volumes d'échantillons de 20 et 35 ml, respectivement. C'est la cartouche la plus performante dans les tests qui se rapprochent le plus des conditions réelles de l'oxydation Lemieux, même si les taux de récupération obtenus ici sont très inférieurs à ceux obtenus dans une étude précédente (91 - 98 % de récupération) (231). Une explication pourrait être l'influence du volume de l'échantillon et surtout la combinaison de la matrice et de la solution oxydante qui semble être à l'origine de la baisse du taux de récupération. L'utilisation d'un étalon interne tel que le d_3-MMPB aurait pu atténuer les effets de matrice importants observés au cours de ces tests SPE, car elle a permis d'augmenter les rendements de la méthode "Lemieux1". De plus, le type/la marque du LC-MS/MS peut également être important et générer des effets de matrice variables. Ainsi, l'utilisation d'un appareil avec une meilleure sensibilité pourrait permettre de diminuer le volume d'injection et donc de réduire les effets de matrice (par exemple la suppression d'ions) rencontrés avec l'oxydation Lemieux.

Le protocole "Lemieux1" a ensuite été testé sur des filets de saumon frais ou lyophilisés enrichis en MC-LR. Les taux de récupération de l'étape d'oxydation étaient beaucoup plus élevés pour les échantillons frais que pour les échantillons lyophilisés (48,4 % et 8,0 %, respectivement) et inversement, l'étape de SPE a montré des taux de récupération plus élevés lorsqu'elle a été testée sur des matrices lyophilisées que sur des matrices fraîches (49,0 % et 9,1 %, respectivement). Une tendance similaire a été observée pour les filets de saumon frais ou lyophilisés au cours de l'étape d'évaporation avec des pertes significatives (95,5 % et 89,7, respectivement). Cette perte importante d'analytes lors de cette étape n'est probablement pas liée à une dégradation du MMPB lors de l'évaporation à 40 °C (non observée avec l'autre protocole "Lemieux2" où la température d'évaporation est de 60 °C) mais pourrait être due à des problèmes de resolubilisation ou à l'amplification des effets matrice liés aux sels utilisés lors de l'étape d'oxydation qui sont concentrés lors de l'évaporation. Cette étape d'évaporation n'a pas été conservée dans le protocole optimisé et l'analyse a été réalisée après élution des cartouches avec 5 mL de MeOH. Cette décision permet de s'affranchir des pertes importantes rencontrées lors de l'évaporation, mais entraine une augmentation du facteur de dilution (x 25).

Par ailleurs, il existe différentes stratégies de quantification dans la littérature : utilisation d'une courbe d'étalonnage dans le solvant (4, 40, 232), d'une courbe d'étalonnage dans la matrice (55, 110, 118, 158, 225), avec ou sans standard interne. En comparant une méthode d'étalonnage dans le solvant (MeOH) et dans la matrice de filet de saumon, l'effet matrice a été estimé à -96 %. Ce résultat est proche d'autres effets matrice trouvés dans le sérum et les tissus d'échantillons d'escargots aquatiques de -63 % à -84 % (48). D'autres études ont montré un effet matrice plus faible, par exemple dans une étude précédente sur le foie de rat et de poulet où les effets matrice ont atteint -42 % (233) ou, à l'inverse, des effets matrice d'augmentation du signal conduisant à un signal récupéré de 122 % pour les intestins et 142 % pour les muscles de la truite arc-en-ciel ou à une augmentation du signal de 300 % sur les tissus de *Dreissena polymorpha* (40, 225).

En raison des taux de récupération modérés de la méthode "Lemieux1" (mais pas inhabituels dans le contexte de l'oxydation Lemieux (53)) et pour avoir plus de recul sur les performances de ce protocole, les protocoles Lemieux 1 et 2 ont ensuite été comparés sur des échantillons dopés avec de la MC-LR. Pour comparer les protocoles "Lemieux1" et "Lemieux2", la même méthode d'étalonnage (courbe d'étalonnage dans la matrice + d_3-MMPB) a été appliquée à chaque protocole sur la même matrice de saumon blanche dopée soit avec de la MC-LR, soit avec de la MC-RR. Le protocole "Lemieux2" a donné de meilleurs taux de récupération sur ces deux types d'échantillons (69,6 % et 61,4 %, respectivement) que le protocole "Lemieux1" (37,5 % et 28,1 %, respectivement). Cette variabilité entre les deux protocoles illustre la complexité de l'oxydation Lemieux et l'importance à la fois de la comparaison des protocoles et du choix de la méthode d'étalonnage, qui fait souvent défaut dans les études sur le sujet. En plus de donner de meilleurs taux de récupération, on peut ajouter que ce protocole "Lemieux2" peut permettre, grâce à des volumes de solution oxydante plus petits et des temps d'incubation plus courts (1 h contre 4 h), de traiter simultanément un plus grand nombre d'échantillons tout en utilisant de plus petites quantités de réactifs que le protocole

"Lemieux1". Il est cependant important de souligner que la quantité de matrice utilisée dans le protocole "Lemieux2" de 50 mg peut poser des problèmes en ce qui concerne la représentativité de la contamination d'un échantillon, et dans le contexte d'échantillons peu contaminés tels que les filets de poisson, peut également être trop faible pour identifier la présence de MC (40, 111, 112).

Le protocole "Lemieux1" développé à l'origine sur des matrices lyophilisées a été optimisé sur des matrices de poisson frais, en particulier l'étape de SPE où 3 cartouches SPE différentes ont été comparées. La cartouche Strata SDB-L a été préférée à HLB et SampliQ. De plus, d'autres étapes ont également été modifiées comme l'étape d'évaporation qui n'a pas été conservée dans ce protocole en raison des pertes rencontrées lors de cette étape (>90 % de perte). Différentes méthodes d'étalonnage ont été testées : gamme d'étalonnage par solvant et gamme d'étalonnage adaptée à la matrice avec ou sans IS (d_3-MMPB) qui ont permis de mettre en évidence les effets matrice rencontrés sur la matrice des filets de saumon estimé à -95 %. L'utilisation de la courbe d'étalonnage adaptée à la matrice présente l'avantage de prendre en compte l'important effet matrice affectant la détermination du MMPB. Les optimisations apportées au protocole "Lemieux1" ont permis d'identifier les conditions expérimentales optimales. Ce protocole optimisé "Lemieux1" a ensuite été comparé au protocole "Lemieux2", qui utilise une prise d'essai plus petite, des volumes de réactifs plus petits, une étape de purification supplémentaire utilisant la SLE et une courbe d'étalonnage de MC-LR oxydée en MMPB avec du d_3-MMPB comme étalon interne. Le protocole "Lemieux2" a été sélectionné car il a donné de meilleurs taux de récupération (>60 %) et pour la faisabilité de la méthode (plus verte, plus rapide, moins encombrante).

Pour conclure, il nous a paru intéressant d'appliquer cette méthode quantitative de dosage des formes totales de MC à des échantillons de poissons contaminés naturellement ou en conditions contrôlées afin de mieux apprécier les cinétiques d'accumulation et d'élimination des formes libres et liées de MC, et par ailleurs, de comparer cette méthode quantitative à une méthode qualitative alternative permettant de connaître l'identité des variants de MC lors de la contamination, information qu'il n'est pas possible d'obtenir avec l'oxydation de Lemieux.

3) Cinétique d'accumulation et d'élimination des MC-LR libres et liés aux protéines chez les carpes exposées lors d'épisodes de prolifération cyanobactérienne et lors d'expositions contrôlées aux MC

Les MC s'accumulent dans les organismes d'eau douce, y compris les poissons, sous une forme libre bien étudiée, mais aussi sous une forme liée aux protéines, encore très peu étudiée, bien qu'elle puisse constituer une forme d'accumulation majoritaire dans les tissus (18, 101, 150, 202, 229). En outre, la cinétique d'accumulation des deux formes de MC dans la chair des poissons et le temps nécessaire à leur dépuration ne sont pas suffisamment décrits. Les données disponibles dans la littérature ont néanmoins permis de définir des fréquences de consommation de poisson à ne pas dépasser, en fonction des niveaux de contamination en MC-LR (le variant de MC le plus étudié), pour les enfants et les adultes (13). Le premier objectif de ce projet est de déterminer la cinétique d'accumulation et d'élimination des MC-LR libres et totales chez la

carpe, dans des conditions contrôlées par LC-MS/MS. Afin de contrôler les doses de toxines administrées aux carpes juvéniles utilisées dans l'expérience, et de se rapprocher le plus possible des conditions d'exposition à un bloom de cyanobactéries en limitant au maximum la manipulation des poissons qui générerait un stress très important, l'option choisie en ce qui concerne le mode d'administration est celle de l'alimentation volontaire. Par ailleurs, le second objectif du projet s'est intéressé à des contaminations de carpes et de perches en milieu naturel suite à des épisodes de proliférations de cyanobactéries dans les lacs de Pannecière (France) et Qaraoun (Liban). Des analyses de MC libres et totales ont été réalisées dans différents tissus des carpes (et une perche) échantillonnées, notamment les filets, les reins et les foies.

Différents tests préliminaires ont été réalisés dans l'objectif de développer un mode de contamination à la MC-LR de carpes par alimentation volontaire. Pour cela, deux types d'aliments pour poissons, la marque "Tropical" nommée ici "Red" et la marque "Tetra" nommée "Brown" ont été utilisés. La dose journalière de granulés, de masse équivalente, correspondait à 3 et 7 granulés pour les types "Red" et "Brown" respectivement. Les deux aliments ont été testés pour différents paramètres relatifs au dopage MC-LR et à l'évolution dans l'eau notamment le comportement des granulés dans l'eau (ramollissement, résistance, dispersion) permettant de conclure que les deux types de granulés sont restés intacts même après une heure dans l'aquarium, ce qui garantit que le poisson peut ingérer la totalité de la dose journalière. La quantité maximale de solution de MC-LR absorbée par les granulés pour assurer la contamination a été évaluée pour les 2 types de granulés à 50 µL. Pour finir, l'évolution de la quantité de MC-LR dans les granulés en fonction du temps de contact avec l'eau a été estimée meilleure pour les granulés "Brown" avec une étape de séchage des granulés entre le dopage avec le MC-LR et l'immersion dans l'eau.

Les données disponibles dans la littérature montrent que l'administration par gavage d'une dose unique de 0,6 µg de MC-LR par gramme de poisson entraîne une accumulation de la toxine dans les tissus (foie et muscle), sans mortalité observée (40), alors qu'une dose de 0,8 µg/g devient létale (107). Comme les conditions d'administration de doses répétées n'ont pas encore été testées, nous avons déterminé la dose sans effet nocif observable (NOAEL) (répétée) par le biais d'une étude préalable. Dans la pré-étude, trois doses ont d'abord été testées pour déterminer la NOAEL de MC-LR (0,08, 0,3 et 0,6 µg/g) chez des carpes juvéniles (n = 4) en les nourrissant volontairement et quotidiennement pendant 7 j. Comme aucune accumulation de toxines totales n'a été détectée dans les filets de carpe, une deuxième pré-étude a été réalisée en suivant la même procédure avec deux autres concentrations de MC-LR testées (0,8, et 1,2 µg/g) chez des carpes juvéniles en les nourrissant volontairement chaque jour pendant 7 j. Aucune mortalité n'a été observée et de la MC-LR libre a été trouvée dans le muscle, le foie et le tube digestif.

D'autres études avaient pu exposer des carpes par alimentation volontaire. Dans une étude des carpes argentés d'une dizaine de grammes avaient été nourries avec des cellules de *Microcystis viridis* (teneur en MC-LR comprise entre 110 et 292 µg/g et en MC-RR entre 268 et 580 µg/g (111). Des accumulations de MC-RR libre ont été retrouvées dans le sang, le foie et le muscle des poissons (49,7, 17,8 et 1,77 µg/g, respectivement). La MC-LR n'était pas détectable dans les échantillons de muscle et de sang (111). Dans les résultats de nos pré-études,

l'exposition par alimentation volontaire à des granulés mélangés avec de la MC-LR avait permis de détecter de la MC-LR dans le muscle (à des concentrations allant de 4,7 à 6,7 ng/g), dans le foie (de 6 à 7,4 ng/g) et dans l'appareil digestif à des niveaux plus importants (de 65 ng/g à 905 ng/g) selon la concentration d'exposition à la MC-LR 0.8 µg/g ou 1.2 µg/g, respectivement.

Dans une autre étude, des carpes communes (de 322 g en moyenne) ont été exposées oralement à *Microcystis* (113). Une dose de 0,05 µg MC-LR eq/g pc (1/10 de la DL_{50} orale de MC chez la carpe), a été adoptée pour l'exposition subchronique et l'essai d'inhibition de la protéine phosphatase a montré que les concentrations de MC dans l'hépatopancréas et le muscle de la carpe étaient respectivement de 261,0 ±108,3 ng d'équivalent MC-LR/g de poids frais et de 38,3 ± 12,3 ng d'équivalent MC-LR/g de poids frais (113). En comparaison, lors de notre pré-étude, les niveaux d'expositions quotidiens utilisés était 16 à 24 fois plus important que dans l'étude (113). Les niveaux d'accumulation dans le muscle retrouvés dans notre pré-étude ont été pourtant 5 à 6 fois plus faibles que dans l'étude (113). Le temps d'exposition, 7 j dans notre étude, 28 j dans l'étude (113) peut expliquer ces différences ainsi que l'utilisation de cyanobactéries (113) à la place de MC-LR ou d'une nourriture commerciale différente utilisée pour faire les boulettes.

Finalement, une troisième étude s'est intéressée à des expositions de *Tilapia rendalli* juvéniles par alimentation volontaire (112). Les concentrations utilisées dans l'étude (112) (20,4 ; 14,6 et 29,2 µg MC/poisson) sont légèrement plus faibles que les concentrations utilisées dans nos pré-études (32 µg/poisson/j et 48 µg/poisson/j correspondant respectivement à 0,8 et 1,2 µg/g pour des poissons d'en moyenne 40 g). Pour la concentration de 20,4 µg/poisson utilisée dans l'étude (112), une concentration moyenne de 12 ng MC/g avait été analysée dans le muscle. Dans notre pré-étude, 2 fois moins de MC-LR a été détecté après la période d'exposition de 7 j. Il en est de même concernant les autres expositions réalisées dans (112) (14,6 et 29,2 µg MC/poisson) où l'accumulation détectée est plus importante que dans notre pré-étude (60 et 50 ng/g dans (112) contre 4,7 à 6,7 ng/g dans nos pré-études). Le temps d'exposition plus important dans (112) (15 j) que dans nos pré-études (7 j) pourrait expliquer ces différences mais également la différence d'espèces (tilipia dans (112) et carpe dans nos pré-études) ou le type de contaminant utilisée (cyanobactéries dans (112) et MC-LR dans nos pré-études).

Une étude cinétique utilisant la dose sélectionnée dans la pré-étude (1 µg/g) a ensuite été réalisée. Pour cela, un lot d'organismes a été exposé quotidiennement à la concentration de 1 µg/g de MC-LR (n = 6), avec un lot d'organismes de contrôle (n = 4), selon 7 pas de temps (1, 5 et 7 j d'exposition suivis de 1, 7, 14 et 21 j d'élimination). Ces pas de temps ont été choisis pour imiter la durée des épisodes de prolifération des cyanobactéries auxquels les carpes peuvent être exposées dans leur environnement naturel. Les échantillons ont été analysés, mais pas de MC-LR, que ce soit sous forme libre ou totale, n'a été trouvée dans les tissus, à l'exception d'un échantillon de foie, qui a montré une quantité de MMPB légèrement supérieure à la limite de quantification (montrant une faible concentration de MC totale). Ces résultats négatifs sont très probablement liés à des problèmes lors de l'acheminement des échantillons

par un transporteur spécialisé pendant lequel des changements de température ont pu dégradés les échantillons (confirmé par l'aspect des tissus et odeur de dégradation).

Parmi les échantillons contaminés naturellement pendant des épisodes de proliférations de cyanobactéries, des foies de poissons du lac Qaraoun (Liban) ont été sélectionnés comme matrice d'étude en raison du profil hépatotoxique des MC et de la capacité de cet organe à accumuler des toxines (12). Les foies des individus du lac de Pannecière (France) n'ayant pas été échantillonnés, les reins ont été choisis à la place. Les filets disponibles pour tous les individus pêchés ont également été sélectionnés afin de comparer les valeurs de contamination obtenues entre les 2 types de tissus et les sites d'échantillonnage. Un échantillon a été considéré comme contaminé lorsque sa concentration en MMPB dépassait 1,1 ng/mL (équivalent à la limite de quantification). Cela équivaut à une concentration MC-LR eq. de 5 ng/mL et à une contamination MC-LR eq. de 105 µg/kg. Ainsi, 9 des 23 échantillons de tissus ont montré une contamination par les MC. Parmi les échantillons issus du lac de Pannecière, le rein de 2 des 4 carpes et le filet de perche ont montré une contamination en équivalent MC-LR allant de 333 à 875 µg/kg, la concentration la plus élevée étant obtenue pour le filet de perche. Parmi les échantillons libanais, tous les foies échantillonnés présentaient une contamination par les MC. Selon les individus, les filets étaient également contaminés, 2 des 4 carpes présentant des concentrations MC-LR eq. de 109 et 114 µg/kg. Une concentration beaucoup plus élevée a cependant été observée dans les foies, avec des valeurs MC-LR eq. allant de 225 à 2045 µg/kg.

Une étude a appliqué le même protocole utilisé dans notre étude sur des foie de dauphins issus de populations estuariennes ou costales (161). Des concentrations de MMPB allant de 1.3 à 14.3 µg/kg ont été retrouvés dans ces échantillons. Ces concentrations sont plus faibles que celles retrouvées dans cette étude sur des échantillons de reins de carpes ou de filet de perche. La raison pourrait être : le lieu d'échantillonnage : une région estuarienne/costales aux Etats-Unis touchée par blooms de cyanobactéries et où plusieurs cas de mortalité de dauphins ont été signalés sans que la cause n'ait été identifiée (161) et dans notre étude un lac français lors d'une période de fortes proliférations de cyanobactéries et un libanais à la suite d'un important épisode de mortalité de poissons. De plus, le choix de la carpe, poisson omnivore pouvant se nourrir de cyanobactéries (234) et donc pouvant être exposée par son alimentation pourrait expliquer les niveaux de contaminations en MC totales plus importants retrouvés dans les échantillons de notre étude. Par ailleurs, que ce soit dans l'étude réalisée sur des dauphins (161), comme dans notre étude, les analyses réalisées par LC-MS/MS sur les MC libres (14 variants de MC testés dans (161), 11 variants testés dans notre étude) ont été négatives alors que les analyses sur MC totales ont montré des niveaux de contamination non négligeables pouvant suggérer soit des contaminations en MC libres par des variants dont les standards analytiques ne sont pas disponibles, soit des formes de MC métabolisées et donc non détectées sur des tests portant uniquement sur les MC libres, soit des niveaux de contaminations des tissus plus importants en MC liées qu'en MC libre.

Une autre étude s'est intéressée à analyser la présence de MC totale dans des Mullet entier ou dans les filets de différentes espèces de poissons (Yellow perch, Walleye, Brown bullhead, lake whitefish) de 3 lacs canadiens affectés régulièrement par des proliférations de cyanobactéries (231). Les résultats de ces analyses ont montré des niveaux de contamination

allant de 2.9 à 13.2 µg/kg de MMPB (231). Ces niveaux de contaminations sont supérieurs à ceux retrouvés dans les filets de carpes du Lac Pannecière (France) analysés dans notre étude mais inférieurs à ceux retrouvé dans le filet de l'échantillon de perche du lac Pannecière (344 µg/kg) ou ceux retrouvés dans 2 des 4 filets des carpes prélevés dans le lac Qaraoun (avec des niveaux de contamination en MMPB de 109 et114 µg/kg). Cela confirme la très forte contamination des échantillons du lac Qaraoun ou les filets sont près de 9 plus contaminés que les filets analysés dans l'étude (231). De même, la perche provenant du lac Pannecière est 26 fois plus contaminée en MC totales que les échantillons de poisson analysés dans l'étude (231) et trois fois plus contaminée que les échantillons de carpes du lac Qaraoun. La perche, étant un poisson carnassier, a pu être contaminé par les cyanobactéries par voie branchiale ou par voie orale par consommation d'autres espèces contaminés ou des consommateurs primaires de cyanobactéries (235).

Il semble donc nécessaire d'évaluer les contaminations par les MC totales dans les filets de poissons consommés par l'homme, pour ne pas sous-estimer la contamination réelle comme en témoignent les résutlats de ce travail de thèse et la littérature. De plus, la bioaccessibilité, c'est à dire la fraction libérée d'un contaminant dans les sucs gastro-intestinaux et donc disponible pour absorption par l'épithélium digestif (236), des MCs liées doit être étudié. L'impact de la digestion de matrices contaminées sur les MC liées pourra permettre de déterminer s'il faut alors doser ses formes de MC ou non pour des raisons sanitaires.

La méthode d'oxydation de Lemieux a permis de déterminer des concentrations en MC-LR eq. dans différents échantillons de poissons contaminés en conditions naturelles ou contrôlés par des MC. Cette estimation quantitative est très pratique d'un point de vue analytique permettant de réunir tous les variants sur un même pic chromatographique. Mais d'un point de vue toxicologique, les variants n'ayant pas tous la même toxicité ni les mêmes propriétés physico-chimiques, il serait intéressant de développer une méthode alternative de dosages des formes totales permettant de garder l'identité du variant lors de l'analyse par LC-MS/MS.

4) Application de la déconjugaison à pH basique suivie d'une réduction comme alternative qualitative à l'oxydation de Lemieux pour l'analyse de conjugués MC-peptides

Des méthodes alternatives ont peu à peu été développées dans la littérature, telles que l'ozonolyse ou la déconjugaison à pH basique. Cette dernière présente l'avantage de conserver la MC intact et de permettre l'identification du variant par analyse LC-MS/MS. À ce jour, trois protocoles de déconjugaison à pH basique ont été mis au point et appliqués à des standards de MC conjugués à des protéines (57, 58, 227). Le plus récent, celui de Miles et al. 2017 (57), met en évidence le risque de re-conjugaison du MC après déconjugaison. L'objectif de cette étude est de développer une méthode rapide de déconjugaison à pH basique utilisant une réaction de réduction pour obtenir des MC déconjuguées non réactives avec les protéines. Pour ce faire, 5 variants de MC (MC-RR, MC-LR, [Dha^{7}]MC-LR, MC-LA, et [Leu^{1}]MC-YR) ont été conjugués à différentes protéines amines et thiols (glutathion, L-cystéine, N-acétyl-cystéine, γ-

glutamilcystéine, cystéineglycine, hydroxyde d'ammonium, L-alaninamide, Nα-acétyl-L-Lysine, Nε-acétyl-L-lysine, N-acétyl-L-tyrosine) avant de tester différents protocoles de déconjugaison à pH basique avec du NaOH associées à des réactions de réduction avec du borohydrure de sodium ($NaBH_4$).

La conjugaison des MC avec les protéines a été réalisée en faisant réagir 30 µL de mélange de toxines avec 1 à 2 mg de l'un des thiols ou des amines conjugués dans un tampon à base de bicarbonate [10 mg/mL] pendant une nuit à température ambiante. L'efficacité de la conjugaison a ensuite été vérifiée par LC-MS/MS en observant à la fois la disparition des pics correspondant aux standards de toxine mais aussi l'apparition progressive des pics correspondant aux conjugués toxine-protéine. Pour chaque réaction, la NOD-R qui réagit beaucoup plus lentement avec les protéines a été utilisée comme contrôle négatif car la réaction de conjugaison n'a pas eu lieu après une nuit.

Des expériences de déconjugaison ont été réalisées avec les conjugués semi-synthétisés précédemment : MC-GSH et MC-CYS. Dans l'objectif d'accélérer les réactions de déconjugaison et de réduction, les concentrations de réactifs ont été augmentées au fur et à mesure des expériences et parmi l'ensemble des expériences, l'expérience 4 a permis une déconjugaison et une réduction des conjugués MC-thiol (GSH et CYS) plus rapides que les autres expériences. La différence entre les 4 expériences réside dans la concentration de la base faible utilisée (qui passe de 0,1 M dans l'expérience 1 à 0,5 M dans les expériences 2, 3 et 4), qui accélère la déconjugaison (de 24 à 48 h dans l'expérience 1 et de 1 à 4 h dans l'expérience 4). De plus, la concentration de l'agent réducteur ($NaBH_4$) change également entre les expériences (de 0,28 mM dans l'expérience 1 à 0,54 M dans l'expérience 4), ce qui accélère la réduction des MC déconjuguées (d'un mélange pas complètement réduit en 120 h dans l'expérience 1 à un mélange complètement réduit en moins de 22 h). Cette expérience 4 a également inclus des données sur d'autres variants de MC présentes dans le mélange. La déconjugaison se produit plus rapidement sur les MC-GSH (entre 0 et 1 h pour tous les MC sauf pour la [Dha^7]MC-LR entre 1 et 2 h) que sur les MC-CYS où la déconjugaison se produit entre 0 et 1 h pour la MC-RR, entre 2 et 4 h pour la MC-LR et la MC-LA, entre 4 et 6 h pour la [Leu^1]MC-LY et entre 6 et 22 h pour la [Dha^7]MC-LR. De plus, la [Dha^7]MC-LR est le variant de MC qui présente le temps de déconjugaison le plus long parmi les 5 MC testées dans ces expériences. A l'inverse, la MC-RR semble être le variant de MC qui se déconjugue le plus rapidement des composés thiols GSH et CYS. En ce qui concerne la deuxième partie de la réaction : la réduction des toxines déconjuguées, il a été observé que le temps de réduction peut varier en fonction des variants. Par exemple, des toxines comme la MC-LA, la MC-LR et la [Leu^1]MC-LY (réduites entre 6 et 22 h) sont réduites plus rapidement que la [Dha^7]MC-LR ou la MC-RR (pas complètement réduites après 22 h de réaction).

Par rapport aux études précédentes, l'augmentation du pH de la base a significativement accéléré la réaction de déconjugaison. Par exemple, Miles et al. (58) qui ont également utilisé des conjugués synthétiques MC-GSH et MC-CYS et en traitant les conjugués [Dha^7]MC-LR-CYS avec un tampon carbonate dans MeOH (pH=10,7) ont obtenu un mélange partiellement déconjugué après 21 h et ont encore trouvé après 65 h la présence mineure de conjugués MC-CYS. En augmentant le pH de la réaction, une déconjugaison complète des mêmes conjugués

a été obtenue entre 6 et 22 h après le début de la réaction. De même, la même étude a également réalisé une réaction de déconjugaison sur les conjugués [Asp^3]MC-RY avec l'isomère 2 du GSH par traitement du tampon carbonate dans MeOH (pH= 10,7). La déconjugaison de ce conjugué a été obtenue après 48 h de réaction mais la présence minoritaire d'un conjugué [Asp^3]MC-RY avec l'isomère 1 du GSH a tout de même été détectée (58). Dans notre étude, les conjugués [Leu^1]MC-YR-GSH ont été déconjugués très rapidement après seulement 1 h de réaction avec NaOH à un pH plus basique (pH = 13) sans détecter d'autres isomères des conjugués en utilisant la stratégie de réduction des MC déconjuguées pour éviter tout phénomène de reconjugaison.

Conclusion Générale

Dans le cadre de ces travaux de thèse, une large part a été consacrée au volet analytique avec la comparaison et la validation d'une méthode de dosage de MC libres par LC-MS/MS et le développement de deux méthodes de dosages des MC totales par LC-MS/MS : l'oxydation de Lemieux et la déconjugaison à pH basique.

Une comparaison initiale de trois protocoles de dosages des MC libres issus de la littérature et distincts par leur étape d'extraction et leur stratégie de purification des échantillons a été réalisée. Le protocole "FreeMC3" a été choisi car il a permis d'obtenir les taux de récupération de toxines les plus élevés (87 % à 127 %), des effets de matrice comparables pour les deux poissons (+23 % en moyenne) et de plus, il est rapide et facile à utiliser. Ce protocole a ensuite été validé avec succès selon l'approche par critères inspirée de la norme NF V03-110 sur trois espèces de poissons (truite, saumon et carpe).

Le développement d'une méthode d'oxydation de Lemieux fonctionnelle malgré les difficultés rencontrées sur le protocole "Lemieux1" a été un grand challenge de ce volet. L'optimisation du protocole "Lemieux1", en particulier lors des étapes d'oxydation et de SPE, a permis d'améliorer les taux de récupération de la méthode sur des filets de saumon frais (de <5% à environ 40%) soit des niveaux très corrects en comparaison de la littérature sur le sujet. La comparaison avec un autre protocole, "Lemieux2" a permis d'obtenir une méthode encore plus performante avec des taux de récupération de 65% en moyenne. En outre, des recherches sur l'interprétation des données par des techniques d'étalonnage ont été réalisées en comparant plusieurs méthodes de quantification. Ces recherches vont dans le sens de l'utilisation combinée d'un étalon interne de d_3-MMPB et de l'approche d'oxidation de l'étalon de MC-LR en MMPB, en matrice pour tenir compte à la fois du taux de récupéraiton de l'oxydation et de l'effet matrice.

Le travail réalisé sur la déconjugaison à pH basique, une méthode alternative pour l'analyse des formes totales de MC, constitue un des aspects novateurs de ce volet. En effet, l'intérêt principal de cette méthode est de pouvoir, à l'inverse de l'oxydation de Lemieux, conserver l'identité des variants de MC intacts en déconjuguant les toxines avec une base. Cette méthode alternative a été développée sur des conjugués MC-peptides semi-synthétisés pour servir de composés modèles. Parmi les quatre expériences de déconjugaison réalisées avec différentes concentrations de base (NaOH) et d'agent réducteur ($NaBH_4$), le protocole le plus performant a permis une déconjugaison complète en 1 à 2 heures pour les conjugués MC-GSH et en 1 à 6 heures pour les conjugués MC-CYS. En ajustant la concentration de l'agent réducteur, la réduction des toxines déconjuguées a été obtenue en quelques heures (de 6 h à un jour pour MC-RR) et plus rapidement pour MC-LA, MC-LR et [Leu^1]MC-LY (réduction entre 6 et 22 h). Du travail reste à réaliser sur ce volet sur la deconjugation à pH basique notamment en ce qui concerne son passage de matrices semi-synthétiques (conjugués toxine/peptide) à des matrices animales contaminées en laboratoire ou en milieu naturel.

Le développement de ces méthodes analytiques a permis d'étudier l'accumulation et la dépuration des formes totales de MC dans un volet écotoxicologique de la thèse. La méthode de l'oxydation de Lemieux a été appliquée à des matrices de poissons contaminées *in situ* ou en laboratoire et a confirmé l'hypothèse de plusieurs études mettant en avant les formes liées

de MC comme une forme majeure d'accumulation. En effet, plusieurs échantillons de carpes des lacs Pannecière (France) et Qaraoun (Liban) ont été négatifs lors du dosage des MC libres par LC-MS/MS mais positifs lors de la prise en compte de l'ensemble des variants et des formes de toxines lors du dosage par oxydation de Lemieux. Cela montre l'importance de mieux envisager la prise en compte des MC totales dans le suivi sanitaire d'organismes contaminés par des MC, dans l'hypothèse où les MC totales sont toxiques, libérées lors de la digestion et la fraction libérée absorbée et toxique.

Il y a donc un vrai besoin de réitérer une étude en conditions controlées pour disposer de cinétiques de contamination/décontamination des poissons car il y a encore trop peu de données dans la littérature. Par ailleurs, il semble important de continuer de disposer de données d'occurrence concernant les niveaux de contamination en MC totales des poissons et d'autres organismes aquatiques comestibles afin de générer des données utiles et nécessaires pour conduire une évaluation des risques et aboutir à la définition de seuils réglementaires.

L'étude de la bioaccessibilité des MC totales initialement prévue dans cette thèse doit être poursuivie sur différentes matrices contaminées afin de mieux envisager l'impact de la digestion de matrices contaminées sur les MC liées et notamment si ces toxines liées peuvent redevenir libres, rester liées ou encore être métabolisées à la suite des mécanismes de digestion. La détermination de la bioaccessibilité des MC liées permettra ainsi de savoir s'il faut doser ses formes de toxines ou non pour des raisons sanitaires. Par la suite, la biodisponibilité des MC libres et liées devra également être étudiée dans l'objectif de comprendre le devenir des MC, quelle que soit leur forme, à la suite du passage dans la circulation sanguine.

Réfèrences bibliographiques

1. Pinay G, Gascuel C, Ménesguen A, Souchon Y, Le Moal M, Levain A, et al. L'eutrophisation2018.

2. Khan FA, Ansari AA. Eutrophication: An Ecological Vision. The Botanical Review. 2005;71(4):449-82.

3. Chorus I, Welker M. Toxic Cyanobacteria in Water. Second edition ed. London: World Health Organization; 2021 03/08/21. 859 p.

4. Paerl HW, Fulton RS, 3rd, Moisander PH, Dyble J. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. Scientific World Journal. 2001;1:76-113.

5. Schopf JW. The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage. In: Springer, editor. The Ecology of Cyanobacteria. Dordrecht2002. p. 13-35.

6. Oliver RL, Ganf GG. Freshwater Blooms. In: Springer, editor. The Ecology of Cyanobacteria. Dordrecht1999.

7. Smith VH. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. Environ Sci Pollut Res Int. 2003;10(2):126-39.

8. Humbert JF, Quiblier C, Gugger M. Molecular approaches for monitoring potentially toxic marine and freshwater phytoplankton species. Anal Bioanal Chem. 2010;397(5):1723-32.

9. Bernard C. Les cyanobactéries et leurs toxines. Revue francophone des Laboratoires. 2014:53-68.

10. Dvořák P, Poulíčková A, Hašler P, Belli M, Casamatta DA, Papini A. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. Biodiversity and Conservation. 2015;24(4):739-57.

11. Wiegand C, Pflugmacher S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. Toxicol Appl Pharmacol. 2005;203(3):201-18.

12. Chorus I, Welker M. Cyanobacterial toxins. Toxic Cyanobacteria in Water A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. 2nd Edition ed. London2021. p. 150.

13. ANSES. Évaluation des risques liés aux cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux douces. 2020.

14. Campos A, Vasconcelos V. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. Int J Mol Sci. 2010;11(1):268-87.

15. Singh S, Srivastava A, Oh HM, Ahn CY, Choi GG, Asthana RK. Recent trends in development of biosensors for detection of microcystin. Toxicon. 2012;60(5):878-94.

16. Bouaïcha N, Miles CO, Beach DG, Labidi Z, Djabri A, Benayache NY, et al. Structural Diversity, Characterization and Toxicology of Microcystins. Toxins. 2019;11(12):714.

17. Kim RB. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. Eur J Clin Invest. 2003;33 Suppl 2:1-5.

18. Kondo F, Ikai Y, Oka H, Okumura M, Ishikawa N, Harada K, et al. Formation, characterization, and toxicity of the glutathione and cysteine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. Chem Res Toxicol. 1992;5(5):591-6.

19. Liu J, Sun Y. The role of PP2A-associated proteins and signal pathways in microcystin-LR toxicity. Toxicol Lett. 2015;236(1):1-7.

20. McLellan NL, Manderville RA. Toxic mechanisms of microcystins in mammals. Toxicol Res (Camb). 2017;6(4):391-405.

21. Guzman RE, Solter PF, Runnegar MT. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. Toxicon. 2003;41(7):773-81.

22. Komatsu M, Furukawa T, Ikeda R, Takumi S, Nong Q, Aoyama K, et al. Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3. Toxicol Sci. 2007;97(2):407-16.

23. Li H, Xie P, Li G, Hao L, Xiong Q. In vivo study on the effects of microcystin extracts on the expression profiles of proto-oncogenes (c-fos, c-jun and c-myc) in liver, kidney and testis of male Wistar rats injected i.v. with toxins. Toxicon. 2009;53(1):169-75.

24. Vichi S, Buratti FM, Testai E. Microcystins: Toxicological Profile. In: Gopalakrishnakone P, Haddad Jr V, Tubaro A, Kim E, Kem WR, editors. Marine and Freshwater Toxins. Dordrecht: Springer Netherlands; 2016. p. 219-38.

25. Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, et al. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. Arch Toxicol. 2017;91(3):1049-130.

26. Chen L, Chen J, Zhang X, Xie P. A review of reproductive toxicity of microcystins. J Hazard Mater. 2016;301:381-99.

27. Nobre AC, Coelho GR, Coutinho MC, Silva MM, Angelim EV, Menezes DB, et al. The role of phospholipase A(2) and cyclooxygenase in renal toxicity induced by microcystin-LR. Toxicon. 2001;39(5):721-4.

28. Milutinovic A, Zivin M, Zorc-Pleskovic R, Sedmak B, Suput D. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR. Toxicon. 2003;42(3):281-8.

29. La-Salete R, Oliveira MM, Palmeira CA, Almeida J, Peixoto FP. Mitochondria a key role in microcystin-LR kidney intoxication. J Appl Toxicol. 2008;28(1):55-62.

30. Fischer WJ, Altheimer S, Cattori V, Meier PJ, Dietrich DR, Hagenbuch B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. Toxicol Appl Pharmacol. 2005;203(3):257-63.

31. Qiu T, Xie P, Liu Y, Li G, Xiong Q, Hao L, et al. The profound effects of microcystin on cardiac antioxidant enzymes, mitochondrial function and cardiac toxicity in rat. Toxicology. 2009;257(1-2):86-94.

32. Li X, Xu L, Zhou W, Zhao Q, Wang Y. Chronic exposure to microcystin-LR affected mitochondrial DNA maintenance and caused pathological changes of lung tissue in mice. Environ Pollut. 2016;210:48-56.

33. Wang C, Gu S, Yin X, Yuan M, Xiang Z, Li Z, et al. The toxic effects of microcystin-LR on mouse lungs and alveolar type II epithelial cells. Toxicon. 2016;115:81-8.

34. Wood R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature. Environ Int. 2016;91:276-82.

35. Svircev Z, Lalic D, Bojadzija Savic G, Tokodi N, Drobac Backovic D, Chen L, et al. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings. Arch Toxicol. 2019;93(9):2429-81.

36. Freitas M, Azevedo J, Carvalho AP, Campos A, Vasconcelos V. Effects of storage, processing and proteolytic digestion on microcystin-LR concentration in edible clams. Food Chem Toxicol. 2014;66:217-23.

37. Massey IY, Wu P, Wei J, Luo J, Ding P, Wei H, et al. A Mini-Review on Detection Methods of Microcystins. Toxins (Basel). 2020;12(10):641.

38. Carmichael WW, Li R. Cyanobacteria toxins in the Salton Sea. Saline Syst. 2006;2(1):5.

39. Lance E, Neffling MR, Gerard C, Meriluoto J, Bormans M. Accumulation of free and covalently bound microcystins in tissues of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda) following toxic cyanobacteria or dissolved microcystin-LR exposure. Environ Pollut. 2010;158(3):674-80.

40. Cadel-Six S, Moyenga D, Magny S, Trotereau S, Edery M, Krys S. Detection of free and covalently bound microcystins in different tissues (liver, intestines, gills, and muscles) of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: method characterization. Environ Pollut. 2014;185:333-9.

41. Manubolu M, Lee J, Riedl KM, Kua ZX, Collart LP, Ludsin SA. Optimization of extraction methods for quantification of microcystin-LR and microcystin-RR in fish, vegetable, and soil matrices using UPLC-MS/MS. Harmful Algae. 2018;76:47-57.

42. Kondo F, Ito Y, Oka H, Yamada S, Tsuji K, Imokawa M, et al. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. Toxicon. 2002;40(7):893-9.

43. Kondo F, Matsumoto H, Yamada S, Tsuji K, Ueno Y, Harada K. Immunoaffinity purification method for detection and quantification of microcystins in lake water. Toxicon. 2000;38(6):813-23.

44. Lawton LA, Edwards C, Codd GA. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. Analyst. 1994;119(7):1525-30.

45. ISO. Water quality - Determination of microcystins - Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. 2005.

46. Bateman KP, Thibault P, Douglas DJ, White RL. Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations. J Chromatogr A. 1995;712(1):253-68.

47. Lawton LA, Chambers H, Edwards C, Nwaopara AA, Healy M. Rapid detection of microcystins in cells and water. Toxicon. 2010;55(5):973-8.

48. Neffling MR, Lance E, Meriluoto J. Detection of free and covalently bound microcystins in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Environ Pollut. 2010;158(3):948-52.

49. Falconer IR, Smith JV, Jackson AR, Jones A, Runnegar MT. Oral toxicity of a bloom of the Cyanobacterium microcystis Aeruginosa administered to mice over periods up to 1 year. J Toxicol Environ Health. 1988;24(3):291-305.

50. Buryskova B, Hilscherova K, Babica P, Vrskova D, Marsalek B, Blaha L. Toxicity of complex cyanobacterial samples and their fractions in Xenopus laevis embryos and the role of microcystins. Aquat Toxicol. 2006;80(4):346-54.

51. Torokne A, Vasdinnyei R, Asztalos BM. A rapid microbiotest for the detection of cyanobacterial toxins. Environ Toxicol. 2007;22(1):64-8.

52. Moore CE, Juan J, Lin Y, Gaskill CL, Puschner B. Comparison of Protein Phosphatase Inhibition Assay with LC-MS/MS for Diagnosis of Microcystin Toxicosis in Veterinary Cases. Mar Drugs. 2016;14(3):54.

53. Bouteiller P, Lance E, Guerin T, Bire R. Analysis of Total-Forms of Cyanotoxins Microcystins in Biological Matrices: A Methodological Review. Toxins (Basel). 2022;14(8).

54. Kaya K, Sano T. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard. Analytica Chimica Acta. 1999;386(1-2):107-12.

55. Williams DE, Craig M, McCready TL, Dawe SC, Kent ML, Holmes CF, et al. Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and Dungeness crab larvae. Chem Res Toxicol. 1997;10(4):463-9.

56. Harada K, Murata H, Qiang Z, Suzuki M, Kondo F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. Toxicon. 1996;34(6):701-10.

57. Miles CO. Rapid and Convenient Oxidative Release of Thiol-Conjugated Forms of Microcystins for Chemical Analysis. Chem Res Toxicol. 2017;30(8):1599-608.

58. Miles CO, Sandvik M, Nonga HE, Ballot A, Wilkins AL, Rise F, et al. Conjugation of Microcystins with Thiols Is Reversible: Base-Catalyzed Deconjugation for Chemical Analysis. Chem Res Toxicol. 2016;29(5):860-70.

59. Shen Q, Feng J, Wang J, Li S, Wang Y, Ma J, et al. Laser irradiation desorption of microcystins from protein complex in fish tissue and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. Electrophoresis. 2019;40(14):1805-11.

60. Kauff F, Büdel B. Phylogeny of Cyanobacteria: An Overview. In: Lüttge UE, Beyschlag W, Büdel B, Francis D, editors. Progress in Botany 72. Progress in Botany. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 209-24.

61. Seckbach J. Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments: Springer Dordrecht; 2007.

62. Rasmussen B, Fletcher IR, Brocks JJ, Kilburn MR. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. Nature. 2008;455(7216):1101-4.

63. Palinska KA, Surosz W. Taxonomy of cyanobacteria: a contribution to consensus approach. Hydrobiologia. 2014;740(1):1-11.

64. Oren A, Garrity GM. Proposal to change General Consideration 5 and Principle 2 of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol. 2014;64(Pt 1):309-10.

65. Oren A. Three alternative proposals to emend the Rules of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes to resolve the status of the Cyanobacteria in the prokaryotic nomenclature. Int J Syst Evol Microbiol. 2020;70(7):4406-8.

66. Nagarajan A, Pakrasi HB. Membrane-Bound Protein Complexes for Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. eLS2016. p. 1-8.

67. Hentschke GS, Gama Junior WA. Trends in Cyanobacteria: a contribution to systematics and biodiversity studies. In: Lopes G, Silva M, Vasconcelos V, editors. The Pharmacological Potential of Cyanobacteria: Academic Press; 2022. p. 1-20.

68. Whitton BA, Potts M. The Ecology of Cyanobacteria: Springer Dordrecht; 2002.

69. Hu C, Gao K, Whitton BA. Semi-arid Regions and Deserts. In: Whitton BA, editor. Ecology of Cyanobacteria II. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 345-69.

70. Ward DM, Castenholz RW, Miller SR. Cyanobacteria in Geothermal Habitats. In: Whitton BA, editor. Ecology of Cyanobacteria II. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 39-63.

71. Vincent WF, Quesada A. Cyanobacteria in High Latitude Lakes, Rivers and Seas. In: Whitton BA, editor. Ecology of Cyanobacteria II. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 371-85.

72. Oren A. Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. Biodiversity and Conservation. 2015;24(4):781-98.

73. Lepoutre A. Etude de la pertinence de Bivalves en tant qu'organismes bioindicateurs de la présence de cyanobactéries et de cyanotoxines dans les écosytèmes aquatiques [Thesis]2019.

74. Salmaso N, Bernard C, Humbert J-F, Akçaalan R, Albay M, Ballot A, et al. Basic Guide to Detection and Monitoring of Potentially Toxic Cyanobacteria. In: Sons JW, editor. Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. 1 ed2017.

75. Huisman J, Codd GA, Paerl HW, Ibelings BW, Verspagen JMH, Visser PM. Cyanobacterial blooms. Nat Rev Microbiol. 2018;16(8):471-83.

76. Chorus I, Fastner J, Welker M. Cyanobacteria and Cyanotoxins in a Changing Environment: Concepts, Controversies, Challenges. Water. 2021;13(18):2463.

77. Kumar K, Mella-Herrera RA, Golden JW. Cyanobacterial heterocysts. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(4):a000315.

78. Adams DG, Carr NG. The developmental biology of heterocyst and akinete formation in cyanobacteria. Crit Rev Microbiol. 1981;9(1):45-100.

79. Catherine Q, Susanna W, Isidora ES, Mark H, Aurelie V, Jean-Francois H. A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria--ecology, toxin production and risk management. Water Res. 2013;47(15):5464-79.

80. Izaguirre G, Taylor WD. A guide to geosmin- and MIB-producing cyanobacteria in the United States. Water Sci Technol. 2004;49(9):19-24.

81. Hamilton DP, Wood SA, Dietrich DR, Puddick J. Costs of harmful blooms of freshwater cyanobacteria. Cyanobacteria2013. p. 245-56.

82. Steffensen DA. Economic cost of cyanobacterial blooms. In: Hudnell HK, editor. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. New York, NY: Springer New York; 2008. p. 855-65.

83. Dittmann E, Gugger M, Sivonen K, Fewer DP. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. Trends Microbiol. 2015;23(10):642-52.

84. Briand E, Yepremian C, Humbert JF, Quiblier C. Competition between microcystin- and non-microcystin-producing Planktothrix agardhii (cyanobacteria) strains under different environmental conditions. Environ Microbiol. 2008;10(12):3337-48.

85. Meriluoto J, Spoof L, Codd GA. Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis. 1 ed: John Wiley & Sons; 2017 2017.

86. Chen Y, Xu J, Li Y, Han X. Decline of sperm quality and testicular function in male mice during chronic low-dose exposure to microcystin-LR. Reprod Toxicol. 2011;31(4):551-7.

87. Hastie CJ, Borthwick EB, Morrison LF, Codd GA, Cohen PT. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. Biochim Biophys Acta. 2005;1726(2):187-93.

88. Maynes JT, Luu HA, Cherney MM, Andersen RJ, Williams D, Holmes CF, et al. Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins. J Mol Biol. 2006;356(1):111-20.

89. Craig M, Luu HA, McCready TL, Williams D, Andersen RJ, Holmes CF. Molecular mechanisms underlying he interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. Biochem Cell Biol. 1996;74(4):569-78.

90. Bagu JR, Sykes BD, Craig MM, Holmes CF. A molecular basis for different interactions of marine toxins with protein phosphatase-1. Molecular models for bound motuporin, microcystins, okadaic acid, and calyculin A. J Biol Chem. 1997;272(8):5087-97.

91. Pereira SR, Vasconcelos VM, Antunes A. The phosphoprotein phosphatase family of Ser/Thr phosphatases as principal targets of naturally occurring toxins. Crit Rev Toxicol. 2011;41(2):83-110.

92. Fu WY, Chen JP, Wang XM, Xu LH. Altered expression of p53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR in vivo and in vitro. Toxicon. 2005;46(2):171-7.

93. Zhou M, Tu WW, Xu J. Mechanisms of microcystin-LR-induced cytoskeletal disruption in animal cells. Toxicon. 2015;101:92-100.

94. Azevedo SM, Carmichael WW, Jochimsen EM, Rinehart KL, Lau S, Shaw GR, et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. Toxicology. 2002;181-182:441-6.

95. Li Y, Chen JA, Zhao Q, Pu C, Qiu Z, Zhang R, et al. A cross-sectional investigation of chronic exposure to microcystin in relationship to childhood liver damage in the Three Gorges Reservoir Region, China. Environ Health Perspect. 2011;119(10):1483-8.

96. Ibelings BW, Bruning K, de Jonge J, Wolfstein K, Pires LM, Postma J, et al. Distribution of microcystins in a lake foodweb: no evidence for biomagnification. Microb Ecol. 2005;49(4):487-500.

97. Larson D, Ahlgren G, Willén E. Bioaccumulation of microcystins in the food web: a field study of four Swedish lakes. Inland Waters. 2014;4(1):91-104.

98. Martins JC, Vasconcelos VM. Microcystin dynamics in aquatic organisms. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2009;12(1):65-82.

99. Ferrao-Filho ADS, Kozlowsky-Suzuki B. Cyanotoxins: bioaccumulation and effects on aquatic animals. Mar Drugs. 2011;9(12):2729-72.

100. Cazenave J, Wunderlin DA, de Los Angeles Bistoni M, Ame MV, Krause E, Pflugmacher S, et al. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in Corydoras paleatus, Jenynsia multidentata and Odontesthes bonariensis. A field and laboratory study. Aquat Toxicol. 2005;75(2):178-90.

101. Zhang D, Xie P, Liu Y, Qiu T. Transfer, distribution and bioaccumulation of microcystins in the aquatic food web in Lake Taihu, China, with potential risks to human health. Sci Total Environ. 2009;407(7):2191-9.

102. Ernst B, Hitzfeld B, Dietrich D. Presence of Planktothrix sp. and cyanobacterial toxins in Lake Ammersee, Germany and their impact on whitefish (Coregonus lavaretus L.). Environ Toxicol. 2001;16(6):483-8.

103. Magalhaes VF, Soares RM, Azevedo SM. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. Toxicon. 2001;39(7):1077-85.

104. Magalhaes VF, Marinho MM, Domingos P, Oliveira AC, Costa SM, Azevedo LO, et al. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). Toxicon. 2003;42(3):289-95.

105. Sipia VO, Kankaanpaa HT, Flinkman J, Lahti K, Meriluoto JA. Time-dependent accumulation of cyanobacterial hepatotoxins in flounders (Platichthys flesus) and mussels (Mytilus edulis) from the northern Baltic Sea. Environ Toxicol. 2001;16(4):330-6.

106. Mezhoud K, Bauchet AL, Chateau-Joubert S, Praseuth D, Marie A, Francois JC, et al. Proteomic and phosphoproteomic analysis of cellular responses in medaka fish (Oryzias latipes) following oral gavage with microcystin-LR. Toxicon. 2008;51(8):1431-9.

107. Fischer WJ, Dietrich DR. Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (Cyprinus carpio). Toxicol Appl Pharmacol. 2000;164(1):73-81.

108. Sahin A, Tencalla FG, Dietrich DR, Naegeli H. Biliary excretion of biochemically active cyanobacteria (blue-green algae) hepatotoxins in fish. Toxicology. 1996;106(1-3):123-30.

109. Tencalla F, Dietrich D. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Toxicon. 1997;35(4):583-95.

110. Vudathala D, Smith S, Khoo L, Kuhn DD, Mainous ME, Steadman J, et al. Analysis of microcystin-LR and nodularin using triple quad liquid chromatography-tandem mass spectrometry and histopathology in experimental fish. Toxicon. 2017;138:82-8.

111. Xie L, Xie P, Ozawa K, Honma T, Yokoyama A, Park HD. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. Environ Pollut. 2004;127(3):431-9.

112. Soares RM, Magalhaes VF, Azevedo SM. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in Tilapia rendalli (Cichlidae) under laboratory conditions. Aquat Toxicol. 2004;70(1):1-10.

113. Li XY, Chung IK, Kim JI, Lee JA. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (Cyprinus carpio L.) exposed to Microcystis under laboratory conditions. Toxicon. 2004;44(8):821-7.

114. Bieczynski F, Bianchi VA, Luquet CM. Accumulation and biochemical effects of microcystin-LR on the Patagonian pejerrey (Odontesthes hatcheri) fed with the toxic cyanobacteria Microcystis aeruginosa. Fish Physiol Biochem. 2013;39(5):1309-21.

115. Dyble J, Gossiaux D, Landrum P, Kashian DR, Pothoven S. A kinetic study of accumulation and elimination of microcystin-LR in yellow perch (Perca flavescens) tissue and implications for human fish consumption. Mar Drugs. 2011;9(12):2553-71.

116. Cheng H, Yan W, Wu Q, Lu J, Liu C, Hung T-C, et al. Adverse reproductive performance in zebrafish with increased bioconcentration of microcystin-LR in the presence of titanium dioxide nanoparticles. Environmental Science: Nano. 2018;5(5):1208-17.

117. Jang MH, Ha K, Lucas MC, Joo GJ, Takamura N. Changes in microcystin production by Microcystis aeruginosa exposed to phytoplanktivorous and omnivorous fish. Aquat Toxicol. 2004;68(1):51-9.

118. Williams DE, Dawe SC, Kent ML, Andersen RJ, Craig M, Holmes CF. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, Mytilus edulis, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. Toxicon. 1997;35(11):1617-25.

119. Yu H, Clark KD, Anderson JL. Rapid and sensitive analysis of microcystins using ionic liquid-based in situ dispersive liquid-liquid microextraction. J Chromatogr A. 2015;1406:10-8.

120. Geis-Asteggiante L, Lehotay SJ, Fortis LL, Paoli G, Wijey C, Heinzen H. Development and validation of a rapid method for microcystins in fish and comparing LC-MS/MS results with ELISA. Anal Bioanal Chem. 2011;401(8):2617-30.

121. Li YW, Zhan XJ, Xiang L, Deng ZS, Huang BH, Wen HF, et al. Analysis of trace microcystins in vegetables using solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatography triple-quadrupole mass spectrometry. J Agric Food Chem. 2014;62(49):11831-9.

122. Hemmati M, Tejada-Casado C, Lara FJ, Garcia-Campana AM, Rajabi M, Del Olmo-Iruela M. Monitoring of cyanotoxins in water from hypersaline microalgae colonies by ultra high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometry detection following salting-out liquid-liquid extraction. J Chromatogr A. 2019;1608:460409.

123. Tsutsumi T, Nagata S, Hasegawa A, Ueno Y. Immunoaffinity column as clean-up tool for determination of trace amounts of microcystins in tap water. Food Chem Toxicol. 2000;38(7):593-7.

124. Aranda-Rodriguez R, Kubwabo C, Benoit FM. Extraction of 15 microcystins and nodularin using immunoaffinity columns. Toxicon. 2003;42(6):587-99.

125. Wei H, Yang F, Wang Y, Zhou Y, Yan Y, Liang G, et al. Electrospun polymer nanofibres as solid-phase extraction sorbents for extraction and quantification of microcystins. Environ Technol. 2015;36(21):2796-802.

126. Palagama DSW, West Iii RE, Isailovic D. Improved solid-phase extraction protocol and sensitive quantification of six microcystins in water using an HPLC-orbitrap mass spectrometry system. Analytical Methods. 2017;9(13):2021-30.

127. Zervou SK, Christophoridis C, Kaloudis T, Triantis TM, Hiskia A. New SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins. J Hazard Mater. 2017;323(Pt A):56-66.

128. Jabot C. Développement de stratégies analytiques basées sur la LC-MS/MS pour la recherche de traces de pesticides et métabolites dans des matrices apicoles. France: Université Claude Bernard - Lyon I; 2017.

129. McCord J, Lang JR, Hill D, Strynar M, Chernoff N. pH dependent octanol-water partitioning coefficients of microcystin congeners. J Water Health. 2018;16(3):340-5.

130. Devasurendra AM, Palagama DSW, Rohanifar A, Isailovic D, Kirchhoff JR, Anderson JL. Solid-phase extraction, quantification, and selective determination of microcystins in water with a gold-polypyrrole nanocomposite sorbent material. J Chromatogr A. 2018;1560:1-9.

131. Vesterkvist PS, Misiorek JO, Spoof LE, Toivola DM, Meriluoto JA. Comparative cellular toxicity of hydrophilic and hydrophobic microcystins on Caco-2 cells. Toxins (Basel). 2012;4(11):1008-23.

132. Diez-Quijada L, Guzman-Guillen R, Prieto Ortega AI, Llana-Ruiz-Cabello M, Campos A, Vasconcelos V, et al. New Method for Simultaneous Determination of Microcystins and Cylindrospermopsin in Vegetable Matrices by SPE-UPLC-MS/MS. Toxins (Basel). 2018;10(10).

133. Lawrence JF, Menard C. Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. J Chromatogr A. 2001;922(1-2):111-7.

134. Moser AC, Hage DS. Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. Bioanalysis. 2010;2(4):769-90.

135. Nagata S, Soutome H, Tsutsumi T, Hasegawa A, Sekijima M, Sugamata M, et al. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. Nat Toxins. 1995;3(2):78-86.

136. Xiao FG, Zhao XL, Tang J, Gu XH, Zhang JP, Niu WM. Necessity of screening water chestnuts for microcystins after cyanobacterial blooms break out. Arch Environ Contam Toxicol. 2009;57(2):256-63.

137. Neumann AC, Melnik S, Niessner R, Stoeger E, Knopp D. Microcystin-LR Enrichment from Freshwater by a Recombinant Plant-derived Antibody Using Sol-Gel-Glass Immunoextraction. Anal Sci. 2019;35(2):207-14.

138. Mhadhbi H, Ben-Rejeb S, Cleroux C, Martel A, Delahaut P. Generation and characterization of polyclonal antibodies against microcystins-Application to immunoassays and immunoaffinity sample preparation prior to analysis by liquid chromatography and UV detection. Talanta. 2006;70(2):225-35.

139. McElhiney J, Drever M, Lawton LA, Porter AJ. Rapid isolation of a single-chain antibody against the cyanobacterial toxin microcystin-LR by phage display and its use in the immunoaffinity concentration of microcystins from water. Appl Environ Microbiol. 2002;68(11):5288-95.

140. Rivasseau C, Hennion M-C. Potential of immunoextraction coupled to analytical and bioanalytical methods (liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of cyanobacterial toxins. Analytica Chimica Acta. 1999;399(1-2):75-87.

141. Aguete EC, Gago-Martinez A, Leao JM, Rodriguez-Vazquez JA, Menard C, Lawrence JF. HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction. Talanta. 2003;59(4):697-705.

142. Lawrence JF, Niedzwiadek B, Menard C, Lau BP, Lewis D, Kuper-Goodman T, et al. Comparison of liquid chromatography/mass spectrometry, ELISA, and phosphatase assay for the determination of microcystins in blue-green algae products. J AOAC Int. 2001;84(4):1035-44.

143. Altaner S, Puddick J, Fessard V, Feurstein D, Zemskov I, Wittmann V, et al. Simultaneous Detection of 14 Microcystin Congeners from Tissue Samples Using UPLC- ESI-MS/MS and Two Different Deuterated Synthetic Microcystins as Internal Standards. Toxins (Basel). 2019;11(7).

144. Magalhães VF, Moraes Soares R, Azevedo SMFO. Microcystin contamination in fish from the Jacarepaguá Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. Toxicon. 2001;39(7):1077-85.

145. Adamovsky O, Kopp R, Hilscherova K, Babica P, Palikova M, Paskova V, et al. Microcystin kinetics (bioaccumulation and elimination) and biochemical responses in common carp (Cyprinus carpio) and silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) exposed to toxic cyanobacterial blooms. Environ Toxicol Chem. 2007;26(12):2687-93.

146. Kohoutek J, Adamovsky O, Oravec M, Simek Z, Palikova M, Kopp R, et al. LC-MS analyses of microcystins in fish tissues overestimate toxin levels-critical comparison with LC-MS/MS. Anal Bioanal Chem. 2010;398(3):1231-7.

147. Otto J, Safra D. [Visual training of partial blinds due to organic lesions (author's transl)]. Klin Monbl Augenheilkd. 1975;166(4):458-78.

148. Kopp R, Palikova M, Adamovsky O, Zikova A, Navratil S, Kohoutek J, et al. Concentrations of microcystins in tissues of several fish species from freshwater reservoirs and ponds. Environ Monit Assess. 2013;185(12):9717-27.

149. Lance E, Brient L, Bormans M, Gerard C. Interactions between cyanobacteria and gastropods Ingestion of toxic *Planktothrix agardhii* by *Lymnaea stagnalis* and the kinetics of microcystin bioaccumulation and detoxification. Aquat Toxicol. 2006;79(2):140-8.

150. Lance E, Brient L, Carpentier A, Acou A, Marion L, Bormans M, et al. Impact of toxic cyanobacteria on gastropods and microcystin accumulation in a eutrophic lake (Grand-Lieu, France) with special reference to Physa (= Physella) acuta. Sci Total Environ. 2010;408(17):3560-8.

151. Chen YM, Lee TH, Lee SJ, Lin JZ, Huang R, Chou HN. Potential of a simple solid-phase extraction method coupled to analytical and bioanalytical methods for an improved determination of microcystins in algal samples. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2006;844(1):134-41.

152. Babica P, Kohoutek J, Blaha L, Adamovsky O, Marsalek B. Evaluation of extraction approaches linked to ELISA and HPLC for analyses of microcystin-LR, -RR and -YR in freshwater sediments with different organic material contents. Anal Bioanal Chem. 2006;385(8):1545-51.

153. Palagama DSW, Baliu-Rodriguez D, Lad A, Levison BS, Kennedy DJ, Haller ST, et al. Development and applications of solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry methods for quantification of microcystins in urine, plasma, and serum. J Chromatogr A. 2018;1573:66-77.

154. Hu X, Ye J, Zhang R, Wu X, Zhang Y, Wu C. Detection of free microcystins in the liver and muscle of freshwater fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Environ Sci Health B. 2017;52(10):770-6.

155. Lepoutre A. Etude de la pertinence de Bivalves en tant qu'organismes bioindicateurs de la présence de cyanobactéries et de cyanotoxines dans les écosytèmes aquatiques. France: Université de Reims Champagne-Ardenne; 2019.

156. Li W, Xie P, Chen J, He J, Guo X, Yu D, et al. Quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of microcystin-RR and its glutathione and cysteine conjugates in fish plasma and bile. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2014;963:113-8.

157. Heussner AH, Altaner S, Kamp L, Rubio F, Dietrich DR. Pitfalls in microcystin extraction and recovery from human blood serum. Chem Biol Interact. 2014;223:87-94.

158. Foss AJ, Aubel MT, Gallagher B, Mettee N, Miller A, Fogelson SB. Diagnosing Microcystin Intoxication of Canines: Clinicopathological Indications, Pathological Characteristics, and Analytical Detection in Postmortem and Antemortem Samples. Toxins (Basel). 2019;11(8):456.

159. Foss AJ, Miles CO, Samdal IA, Lovberg KE, Wilkins AL, Rise F, et al. Analysis of free and metabolized microcystins in samples following a bird mortality event. Harmful Algae. 2018;80:117-29.

160. liuFoss AJ, Butt J, Fuller Sl, Cieslik K, Aubel MT, Wertz T. Nodularin from benthic freshwater periphyton and implications for trophic transfer. Toxicon. 2017;140:45-59.

161. Brown A, Foss A, Miller MA, Gibson Q. Detection of cyanotoxins (microcystins/nodularins) in livers from estuarine and coastal bottlenose dolphins (Tursiops truncatus) from Northeast Florida. Harmful Algae. 2018;76:22-34.

162. Backer LC, Carmichael W, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, Zhou Y, et al. Recreational exposure to low concentrations of microcystins during an algal bloom in a small lake. Mar Drugs. 2008;6(2):389-406.

163. Backer LC, McNeel SV, Barber T, Kirkpatrick B, Williams C, Irvin M, et al. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. Toxicon. 2010;55(5):909-21.

164. Ai Y, Lee S, Lee J. Drinking water treatment residuals from cyanobacteria bloom-affected areas: Investigation of potential impact on agricultural land application. Sci Total Environ. 2020;706:135756.

165. Williams DE, Kent ML, Andersen RJ, Klix H, Holmes CF. Tissue distribution and clearance of tritium-labeled dihydromicrocystin-LR epimers administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection. Toxicon. 1995;33(2):125-31.

166. Schaefer AM, Yrastorza L, Stockley N, Harvey K, Harris N, Grady R, et al. Exposure to microcystin among coastal residents during a cyanobacteria bloom in Florida. Harmful Algae. 2020;92.

167. Ai Y, Lee S, Lee J. Drinking water treatment residuals from cyanobacteria bloom-affected areas: Investigation of potential impact on agricultural land application. Science of The Total Environment. 2020;706.

168. Li PCH, Hu S, Lam PKS. Development of a Capillary Zone Electrophoretic Method for the Rapid Separation and Detection of Hepatotoxic Microcystins. Marine Pollution Bulletin. 1999;39(1-12):250-4.

169. Vasas G, Gaspar A, Pager C, Suranyi G, Mathe C, Hamvas MM, et al. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. Electrophoresis. 2004;25(1):108-15.

170. Vasas G, Szydlowska D, Gaspar A, Welker M, Trojanowicz M, Borbely G. Determination of microcystins in environmental samples using capillary electrophoresis. J Biochem Biophys Methods. 2006;66(1-3):87-97.

171. Birungi G, Li SF. Determination of cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins in drinking water using CE. Electrophoresis. 2009;30(15):2737-42.

172. Babica P, Blaha L, Marsalek B. Exploring the Natural Role of Microcystins-a Review of Effects on Photoautotrophic Organisms1. Journal of Phycology. 2006;42(1):9-20.

173. Vasas G, Gaspar A, Suranyi G, Batta G, Gyemant G, M MH, et al. Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from Aphanizomenon ovalisporum, by plant test (blue-green Sinapis test). Anal Biochem. 2002;302(1):95-103.

174. Perron MC, Qiu B, Boucher N, Bellemare F, Juneau P. Use of chlorophyll a fluorescence to detect the effect of microcystins on photosynthesis and photosystem II energy fluxes of green algae. Toxicon. 2012;59(5):567-77.

175. Metcalf JS, Lindsay J, Beattie KA, Birmingham S, Saker ML, Torokne AK, et al. Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp Artemia salina: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. Toxicon. 2002;40(8):1115-120.

176. Campbell DL, Lawton LA, Beattie KA, Codd GA. Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR-containing) cyanobacteria. Environmental Toxicology & Water Quality. 1994;9(1):71-7.

177. Bostan HB, Taghdisi SM, Bowen JL, Demertzis N, Rezaee R, Panahi Y, et al. Determination of microcystin-LR, employing aptasensors. Biosens Bioelectron. 2018;119:110-8.

178. Cunha I, Biltes R, Sales M, Vasconcelos V. Aptamer-Based Biosensors to Detect Aquatic Phycotoxins and Cyanotoxins. Sensors (Basel). 2018;18(7):2367.

179. Lin Z, Huang H, Xu Y, Gao X, Qiu B, Chen X, et al. Determination of microcystin-LR in water by a label-free aptamer based electrochemical impedance biosensor. Talanta. 2013;103:371-4.

180. Liu M, Sun C, Wang G, Wang Y, Lu H, Shi H, et al. A simple, supersensitive and highly selective electrochemical aptasensor for Microcystin-LR based on synergistic signal amplification strategy with graphene, DNase I enzyme and Au nanoparticles. Electrochimica Acta. 2019;293:220-9.

181. Guo YC, Lee AK, Yates RS, Liang S, Rochelle PA. Analysis of Microcystins in Drinking Water by ELISA and LC/MS/MS. Journal - American Water Works Association. 2017;109(3):13-25.

182. Kfir R, Johannsen E, Botes DP. Monoclonal antibody specific for cyanoginosin-LA: preparation and characterization. Toxicon. 1986;24(6):543-52.

183. Chu FS, Huang X, Wei RD, Carmichael WW. Production and characterization of antibodies against microcystins. Appl Environ Microbiol. 1989;55(8):1928-33.

184. Brooks WP, Codd GA. Immunoassay of hepatotoxic cultures and water blooms of cyanobacteria usingMicrocystis aeruginosapeptide toxin polyclonal antibodies. Environmental Technology Letters. 1988;9(12):1343-8.

185. Fischer WJ, Garthwaite I, Miles CO, Ross KM, Aggen JB, Chamberlin AR, et al. Congener-independent immunoassay for microcystins and nodularins. Environ Sci Technol. 2001;35(24):4849-56.

186. Yu FY, Liu BH, Chou HN, Chu FS. Development of a sensitive ELISA for the determination of microcystins in algae. J Agric Food Chem. 2002;50(15):4176-82.

187. Sheng J, He M, Yu S, Shi H, Qian Y. Microcystin-LR detection based on indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Frontiers of Environmental Science & Engineering in China. 2007;1(3):329-33.

188. Sheng JW, He M, Shi HC. A highly specific immunoassay for microcystin-LR detection based on a monoclonal antibody. Anal Chim Acta. 2007;603(1):111-8.

189. Akter S, Kustila T, Leivo J, Muralitharan G, Vehniainen M, Lamminmaki U. Noncompetitive Chromogenic Lateral-Flow Immunoassay for Simultaneous Detection of Microcystins and Nodularin. Biosensors (Basel). 2019;9(2).

190. Myburgh JG, Rösemann M, Ferreira GCH, Venter EA, Singo A, Laver PN, et al. Evaluation of a Norwegian-developed ELISA to determine microcystin concentrations in fresh water. Water Supply. 2019;19(3):743-52.

191. Metcalf JS, Bell SG, Codd GA. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. Water Research. 2000;34(10):2761-9.

192. Young FM, Metcalf JS, Meriluoto JA, Spoof L, Morrison LF, Codd GA. Production of antibodies against microcystin-RR for the assessment of purified microcystins and cyanobacterial environmental samples. Toxicon. 2006;48(3):295-306.

193. Tippkotter N, Stuckmann H, Kroll S, Winkelmann G, Noack U, Scheper T, et al. A semi-quantitative dipstick assay for microcystin. Anal Bioanal Chem. 2009;394(3):863-9.

194. Method 546: Determination of Total Microcystins and Nodularins in Drinking Water and Ambient Water by Adda Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. U.S. Environmental Protection Agency; 2016.

195. Preece EP, Moore BC, Swanson ME, Hardy FJ. Identifying best methods for routine ELISA detection of microcystin in seafood. Environ Monit Assess. 2015;187(2):12.

196. Baralla E, Varoni MV, Sedda T, Pasciu V, Floris A, Demontis MP. Microcystins Presence in Mussels (M. galloprovincialis) and Water of Two Productive Mediterranean's Lagoons (Sardinia, Italy). Biomed Res Int. 2017;2017:3769245.

197. Lu N, Ling L, Guan T, Wang L, Wang D, Zhou J, et al. Broad-specificity ELISA with a heterogeneous strategy for sensitive detection of microcystins and nodularin. Toxicon. 2020;175:44-8.

198. Heussner AH, Winter I, Altaner S, Kamp L, Rubio F, Dietrich DR. Comparison of two ELISA-based methods for the detection of microcystins in blood serum. Chem Biol Interact. 2014;223:10-7.

199. Meriluoto J. Chromatography of microcystins. Analytica Chimica Acta. 1997;352(1-3):277-98.

200. Rapala J, Erkomaa K, Kukkonen J, Sivonen K, Lahti K. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography–UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay. Analytica Chimica Acta. 2002;466(2):213-31.

201. Vasconcelos VM. Uptake and depuration of the heptapeptide toxin microcystin-LR in Mytilus galloprovincialis. Aquatic Toxicology. 1995;32(2-3):227-37.

202. Rezaitabar S, Esmaili Sari A, Bahramifar N, Ramezanpour Z. Transfer, tissue distribution and bioaccumulation of microcystin LR in the phytoplanktivorous and carnivorous fish in Anzali wetland, with potential health risks to humans. Sci Total Environ. 2017;575:1130-8.

203. Thuret-Benoist H, Pallier V, Feuillade-Cathalifaud G. Quantification of microcystins in natural waters by HPLC-UV after a pre-concentration step: validation of the analytical performances and study of the interferences. Environ Toxicol Pharmacol. 2019;72:103223.

204. Yan P, Zhang K, Wang L, Tong W, Chen DDY. Quantitative analysis of microcystin variants by capillary electrophoresis mass spectrometry with dynamic pH barrage junction focusing. Electrophoresis. 2019;40(18-19):2285-93.

205. Zheng B, Fu H, Berry JP, McCord B. A rapid method for separation and identification of microcystins using capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry. J Chromatogr A. 2016;1431:205-14.

206. Tong P, Zhang L, He Y, Tang S, Cheng J, Chen G. Analysis of microcystins by capillary zone electrophoresis coupling with electrospray ionization mass spectrometry. Talanta. 2010;82(4):1101-6.

207. Onyewuenyi N, Hawkins P. Separation of toxic peptides (microcystins) in capillary electrophoresis, with the aid of organic mobile phase modifiers. J Chromatogr A. 1996;749(1-2):271-7.

208. Gu C, Lin L, Li B, Chen X, Ren J, Jia J, et al. Rapid separation and determination of microcystins using monolithic columns in isocratic elution mode by pressurized capillary electrochromatography. Electrophoresis. 2008;29(18):3887-95.

209. Zeisbergerova M, Kost'al V, Sramkova M, Babica P, Blaha L, Glatz Z, et al. Separation of microcystins by capillary electrochromatography in monolithic columns. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2006;841(1-2):140-4.

210. MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. FEBS Lett. 1990;264(2):187-92.

211. An J, Carmichael WW. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. Toxicon. 1994;32(12):1495-507.

212. Metcalf JS, Bell SG, Codd GA. Colorimetric immuno-protein phosphatase inhibition assay for specific detection of microcystins and nodularins of cyanobacteria. Appl Environ Microbiol. 2001;67(2):904-9.

213. Bouaicha N, Maatouk I, Vincent G, Levi Y. A colorimetric and fluorometric microplate assay for the detection of microcystin-LR in drinking water without preconcentration. Food Chem Toxicol. 2002;40(11):1677-83.

214. Catanante G, Espin L, Marty JL. Sensitive biosensor based on recombinant PP1alpha for microcystin detection. Biosens Bioelectron. 2015;67:700-7.

215. Wharton RE, Cunningham BR, Schaefer AM, Guldberg SM, Hamelin EI, Johnson RC. Measurement of Microcystin and Nodularin Activity in Human Urine by Immunocapture-Protein Phosphatase 2A Assay. Toxins [Internet]. 2019; 11(12).

216. Garibo D, Flores C, Ceto X, Prieto-Simon B, Del Valle M, Caixach J, et al. Inhibition equivalency factors for microcystin variants in recombinant and wild-type protein phosphatase 1 and 2A assays. Environ Sci Pollut Res Int. 2014;21(18):10652-60.

217. Watson SB, Zastepa A, Boyer GL, Matthews E. Algal bloom response and risk management: On-site response tools. Toxicon. 2017;129:144-52.

218. Nasri AB, Bouaicha N, Fastner J. First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacteria Microcystis spp. in Lake Oubeira, eastern Algeria. Arch Environ Contam Toxicol. 2004;46(2):197-202.

219. Turner AP, Karube I, Wilson GS. Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford Science Publications ed1987 1987.

220. Greer B, Maul R, Campbell K, Elliott CT. Detection of freshwater cyanotoxins and measurement of masked microcystins in tilapia from Southeast Asian aquaculture farms. Anal Bioanal Chem. 2017;409(16):4057-69.

221. Wu X, Wang C, Xiao B, Wang Y, Zheng N, Liu J. Optimal strategies for determination of free/extractable and total microcystins in lake sediment. Anal Chim Acta. 2012;709:66-72.

222. Foss AJ, Aubel MT. Using the MMPB technique to confirm microcystin concentrations in water measured by ELISA and HPLC (UV, MS, MS/MS). Toxicon. 2015;104:91-101.

223. Wang C, Tian C, Tian Y, Feng B, We S, Li Y, et al. A sensitive method for the determination of total microcystins in water and sediment samples by liquid chromatography with fluorescence detection. Analytical Methods. 2015;7(2):759-65.

224. Munoz G, Vo Duy S, Roy-Lachapelle A, Husk B, Sauve S. Analysis of individual and total microcystins in surface water by on-line preconcentration and desalting coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. J Chromatogr A. 2017;1516:9-20.

225. Pires LM, Karlsson KM, Meriluoto JA, Kardinaal E, Visser PM, Siewertsen K, et al. Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, Dreissena polymorpha. Aquat Toxicol. 2004;69(4):385-96.

226. Tsuji K, Masui H, Uemura H, Mori Y, Harada K. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. Toxicon. 2001;39(5):687-92.

227. Zemskov I, Kropp HM, Wittmann V. Regioselective Cleavage of Thioether Linkages in Microcystin Conjugates. Chemistry. 2016;22(31):10990-7.

228. Schopf JW. The Fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Lineage. In: Springer, editor. The Ecology of Cyanobacteria. Dordrecht2000.

229. Lance E, Petit A, Sanchez W, Paty C, Gerard C, Bormans M. Evidence of trophic transfer of microcystins from the gastropod Lymnaea stagnalis to the fish Gasterosteus aculeatus. Harmful Algae. 2014;31:9-17.

230. Derrien A, Terre-Terrillon A, Duval A, Martin C, Sibat M, Rovillon GA, et al. From development to implementation of a new LC-MS/MS approach to quantify 43 lipophilic toxins within the French monitoring program. International Conference on Harmful Algae; Nantes, France.2018.

231. Roy-Lachapelle A, Solliec M, Sinotte M, Deblois C, Sauve S. Total Analysis of Microcystins in Fish Tissue Using Laser Thermal Desorption-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-High-Resolution Mass Spectrometry (LDTD-APCI-HRMS). J Agric Food Chem. 2015;63(33):7440-9.

232. Wu X, Xiao B, Li R, Wang Z, Chen X, Chen X. Rapid quantification of total microcystins in cyanobacterial samples by periodate-permanganate oxidation and reversed-phase liquid chromatography. Anal Chim Acta. 2009;651(2):241-7.

233. Ott JL, Carmichael WW. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues. Toxicon. 2006;47(7):734-41.

234. Carbis CR, Rawlin GT, Mitchell GF, Anderson JW, McCauley I. The histopathology of carp, Cyprinus carpio L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. Journal of Fish Diseases. 1996;19(3):199-207.

235. Ferrão-Filho AdS, Kozlowsky-Suzuki B, Azevedo SMFO. Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton community. Aquatic Toxicology. 2002;59(3):201-8.

236. Alves RN, Maulvault AL, Barbosa VL, Fernandez-Tejedor M, Tediosi A, Kotterman M, et al. Oral bioaccessibility of toxic and essential elements in raw and cooked commercial seafood species available in European markets. Food Chem. 2018;267:15-27.

Annexes

Table des annexes

Annexe 1. Supplementary data from Chapter 1. Analysis of total-forms of cyanotoxins microcystins in biological matrices: a methodological review 218

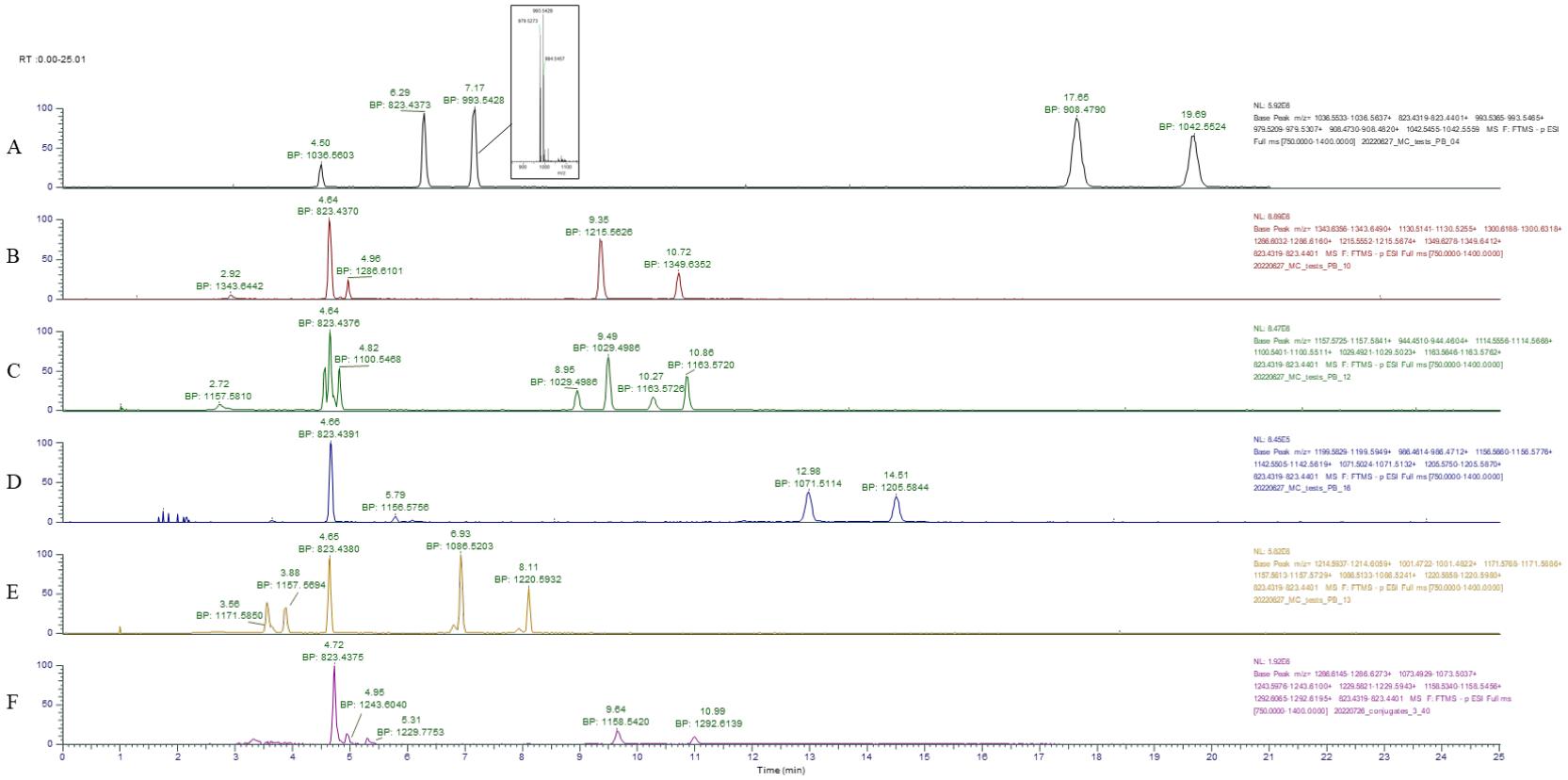
Annexe 2. Supplementary data from Chapter 5 219

Annexe 1. Supplementary data from Chapter 1. Analysis of total-forms of cyanotoxins microcystins in biological matrices: a methodological review

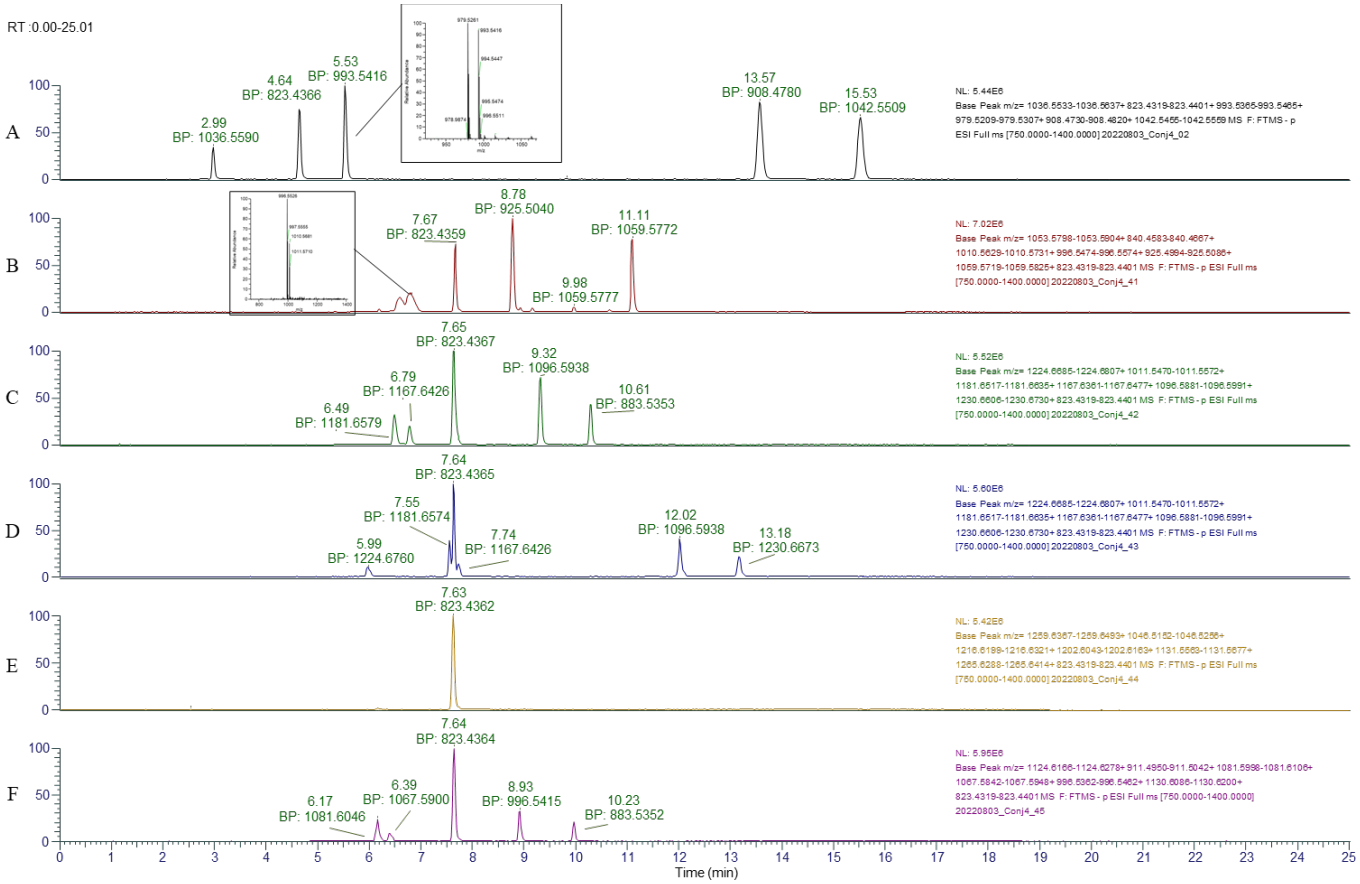
Table S1: Different genera of cyanobacteria known to produce microcystins classed by environment and morphotype (modified from (13), page 56)

Environment	**Morphotype**	**Main genera of cyanobacteria proven producers**	**Other genera of cyanobacteria known producers**
Fresh water and terrestrial environment (cyanobacteria in symbiosis with fungi to form lichens), brackish estuarine water.	Unicellular colonial	*Microcystis*	*Aphanocapsa, Merismopedia, Radiocystis, Woronichinia*
	Filamentous	*Planktothrix (Oscillatoria)*	*Annamia, Geitlerinema, Leptolyngbya, Limnothrix, Kamptonema/Phormidium/Microcoleus, Pseudanabaena, Spirulina, Trichodesmium, Plectonema*
	Filamentous with heterocyst	*Anabaena*	*Anabaenopsis, Calothrix, Nostoc, Trichormus*
	Filamentous with heterocyst and branching	*Hapalosiphon*	*Fischerella*

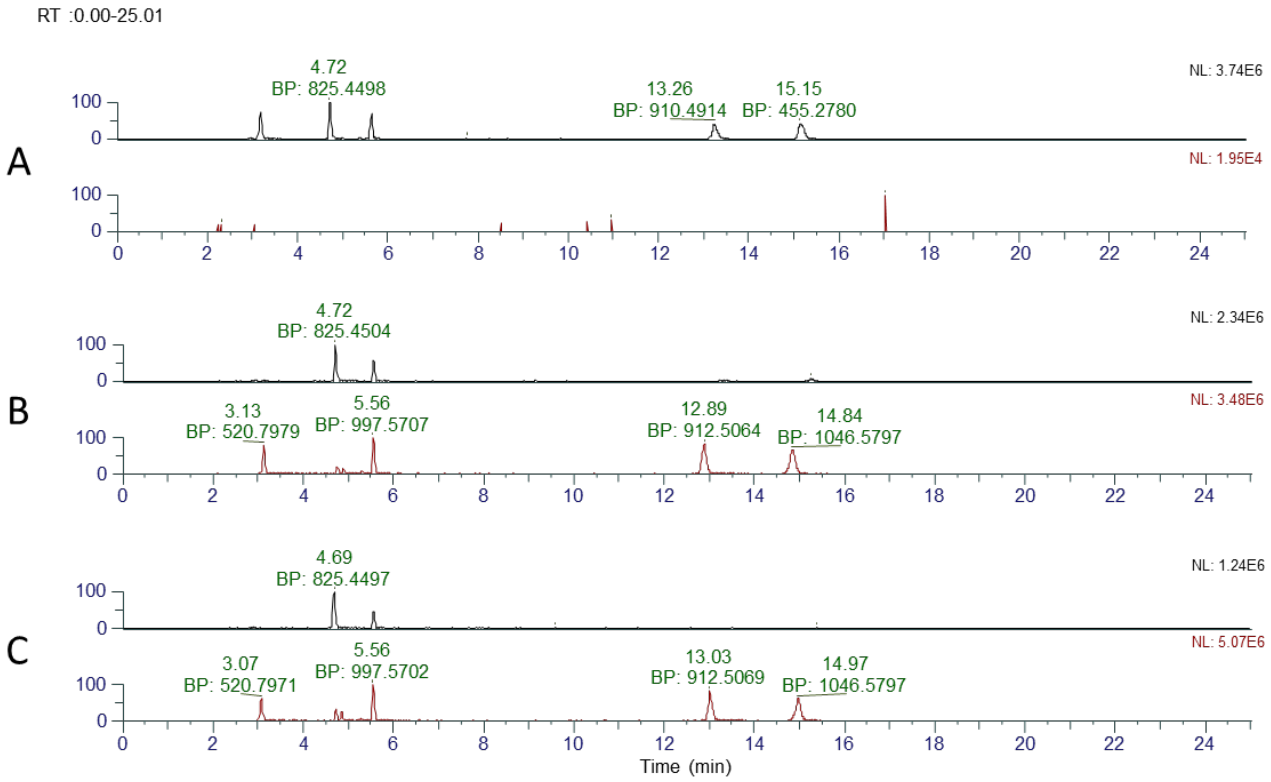
Annexe 2. Supplementary data from Chapter 5



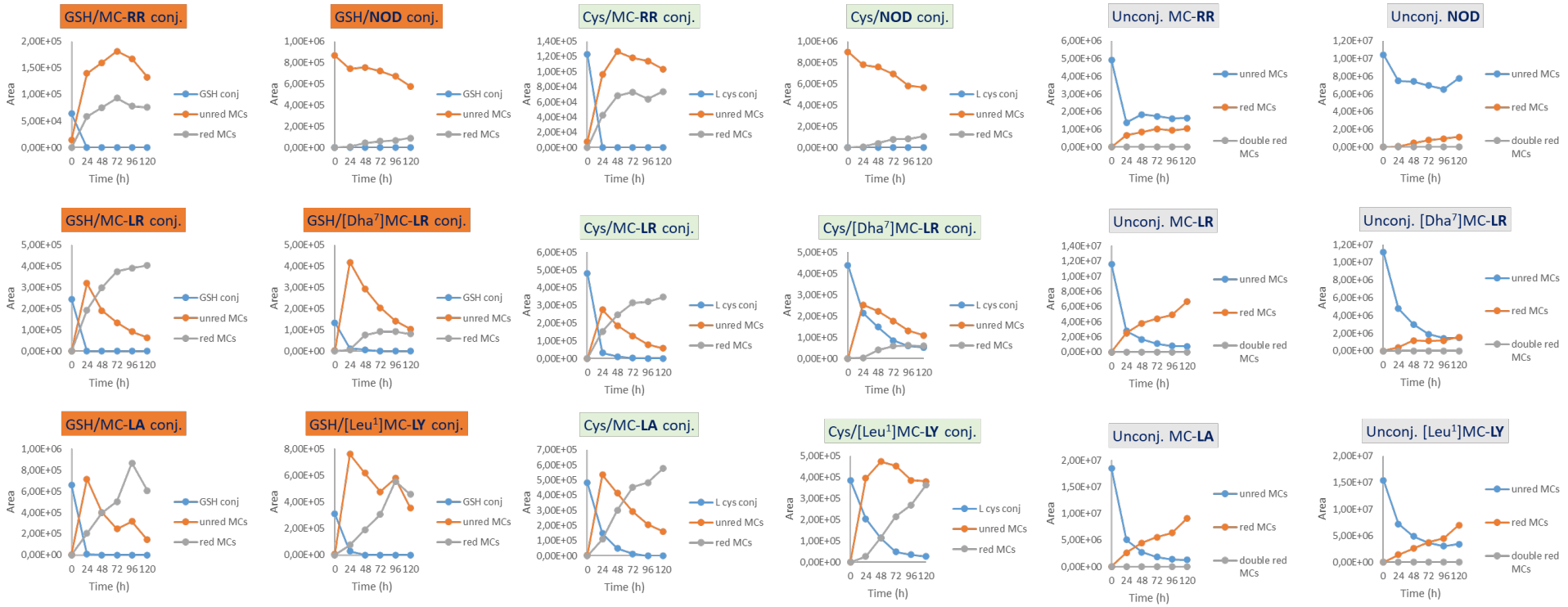
Supplementary data 1. LC/MS^2 of the conjugation reaction of MCs 1-5 with thiols proteins (c.f. 2.2.). For each chromatogram, [M - H]- 823.436 corresponds to the unconjugated NOD-R, which reacts more slowly and acts as a negative control for the conjugation reaction. All peaks are marked with their retention times and m/z for [M - H]-. A: Standards of MCs 1-5 in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1036.5585, 823.436, 993.5415, 979.5258, 908.4775 and 1042.5507. B: Conjugates of MCs 1-5 with thiol a. in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1343.6423, 1130.5198, 1300.6253, 1286.6096, 1215.5613, 1349.6345 and 823.436. C: Conjugates of MCs 1-5 with thiol b. in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1157.5783, 944.4557, 1114.5612, 1100.5456, 1029.4972, 1163.5704 and 823.436. D: Conjugates of MCs 1-5 with thiol e. in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1199.5889, 986.4663, 1156.5718, 1142.5562, 1071.5078, 1205.581 and 823.436. E: Conjugates of MCs 1-5 with thiol d. in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1214.5998, 1001.4772, 1171.5827, 1157.5671, 1086.5187, 1220.5919 and 823.436. F: Conjugates of MCs 1-5 with thiol c. in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1286.6209, 1073.4983, 1243.6038, 1229.5882, 1158.5398, 1292.613 and 823.436.



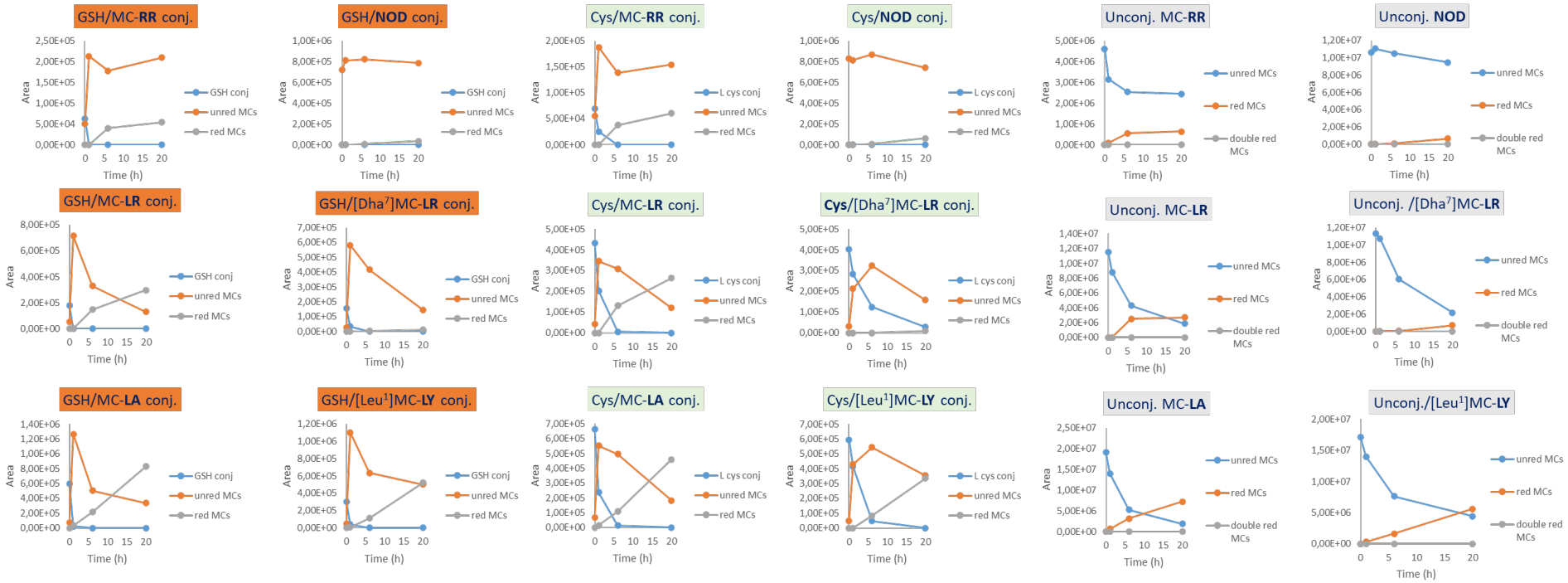
Supplementary data 2. LC/MS^2 of the conjugation reaction of MCs 1-5 with amine proteins (c.f. 2.2.). For each chromatogram, [M - H]- 823.436 corresponds to the unconjugated NOD-R, which reacts more slowly and acts as a negative control for the conjugation reaction. All peaks are marked with their retention times and m/z for [M - H]-. A: Standards of MCs 1-5 in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1036.5585, 823.436, 993.5415, 979.5258, 908.4775 and 1042.5507. B: Conjugates of MCs 1-5 with amine f., the chromatogram shows the sum of m/z 1053.5851, 840.4625, 1010.568, 996.5524, 925.504, 1059.5772 and 823.436. C: Conjugates of MCs 1-5 with amine h. in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1224.6746, 1011.5521, 1181.6576, 1167.6419, 1096.5936, 1230.6668 and 823.436. D: Conjugates of MCs 1-5 with amine i. in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1224.6746, 1011.5521, 1181.6576, 1167.6419, 1096.5936, 1230.6668 and 823.436. E: Conjugates of MCs 1-5 with amine j. in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1259.643, 1046.5204, 1216.626, 1202.6103, 1131.562, 1265.6351 and 823.436. F: Conjugates of MCs 1-5 with amine g. in bicarbonate buffer [10 mg/mL], MeOH 50 %, the chromatogram shows the sum of m/z 1124.6222, 911.4996, 1081.6052, 1067.5895, 996.5412, 1130.6143 and 823.436.



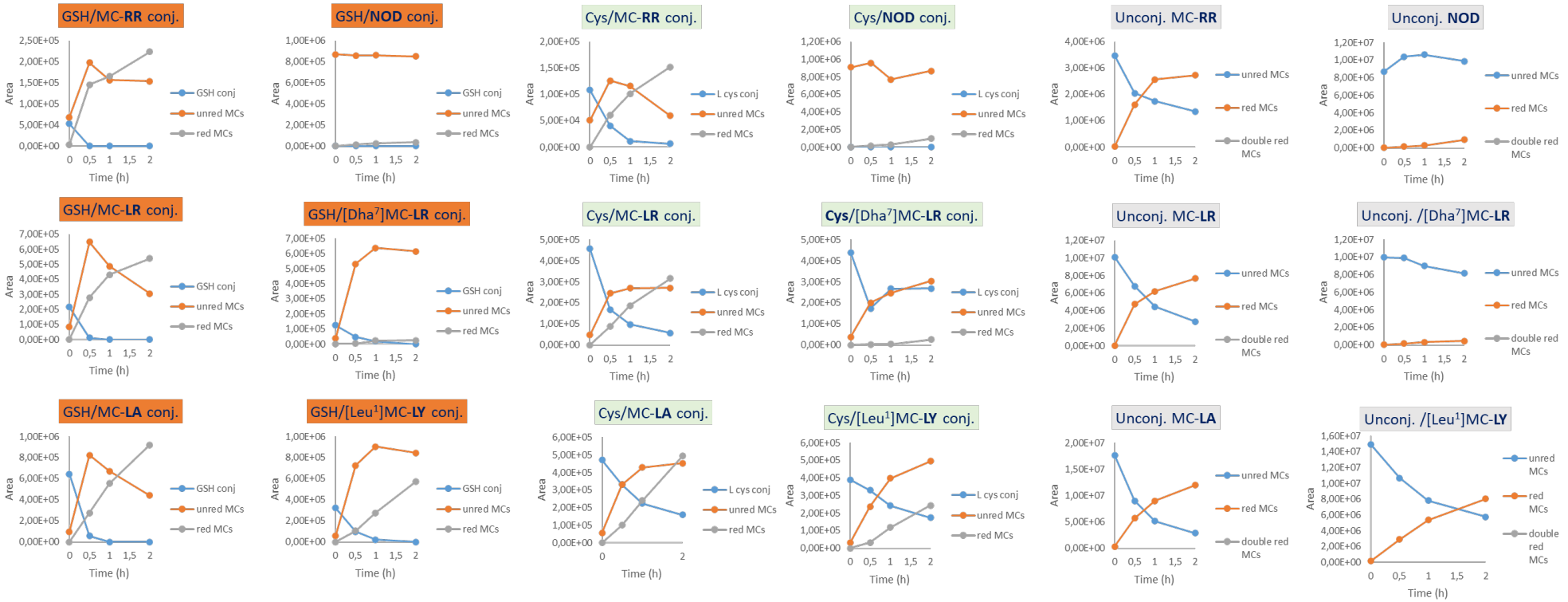
Supplementary data 3. Reduction of the MCs mix (2.1.) with 1 mg $NaBH_4$ in carbonate buffer [10 mg/mL], pH=11.5. A: Only MCs standards. B: 12h after the beginning of the reaction and C: 24h after the beginning of the reaction. For each time point, the first chromatogram (black) corresponds to the MCs standards and the second one (red) corresponds to the reduced MCs standards.



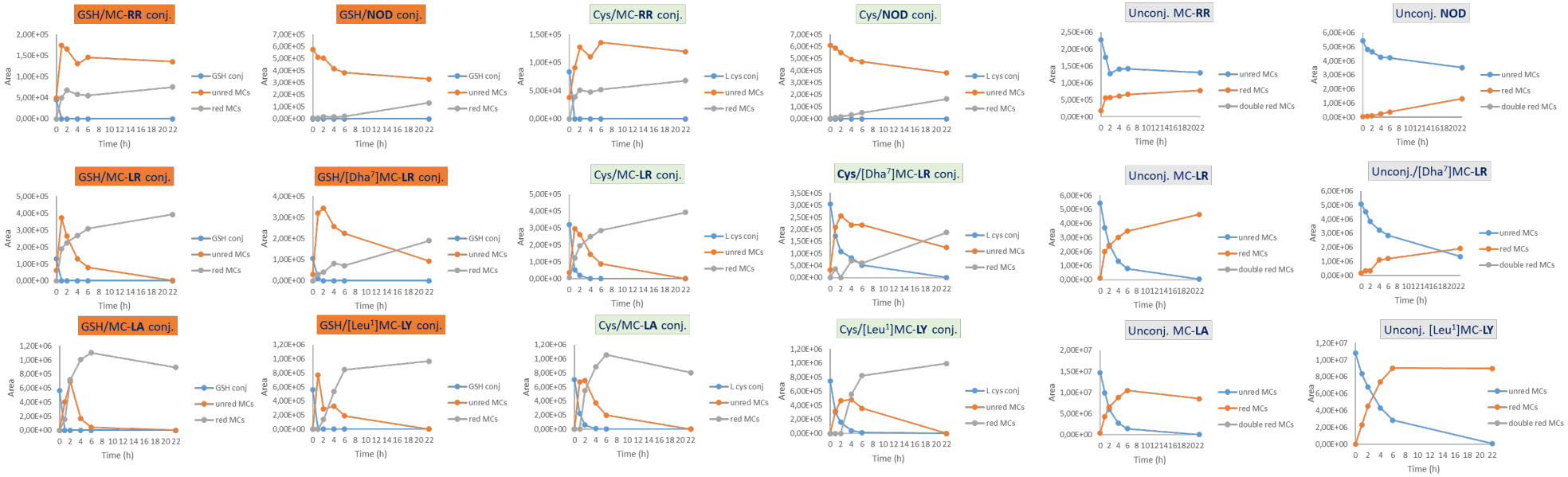
Supplementary data 4. Deconjugation experiment 1 on MCs 1-5-proteins conjugates with basic treatment (NaOH) and reduction of the deconjugated forms with $NaBH_4$. The experiment 1 was performed with $NaBH_4$/NaOH [0.28mM/ 0.1M], pH = 12,5, on a kinetic from 0 to 120h with subsamples taken at 0, 24, 48, 72, 96 and 120h. For each experiment, the same method has been tested on: MC-LR/GSH conjugates (left column), MC-LR/Cys conjugates (middle column) and unconjugated MC-LR (right column). On each graphic blue curves represents the intensity of MCs/conjugates, orange curves: unreduced deconjugated MCs and grey curves: reduced and deconjugated MCs. In order to stop the reaction, when a subsample was taken, formic acid [0.2M] was added to neutralize the solution and reach a pH 5-6.



Supplementary data 5. Deconjugation experiment 2 on MCs 1-5-proteins conjugates with basic treatment (NaOH) and reduction of the deconjugated forms with $NaBH_4$. The experiment 2 was performed with $NaBH_4$/NaOH [0.14 M/ 0.5 M], pH = 13, on a kinetic from 0 to 20h with subsamples taken at 0, 1, 6 and 20h. For each experiment, the same method has been tested on: MC-LR/GSH conjugates (left column), MC-LR/Cys conjugates (middle column) and unconjugated MC-LR (right column). On each graphic blue curves represents the intensity of MCs/conjugates, orange curves: unreduced deconjugated MCs and grey curves: reduced and deconjugated MCs. In order to stop the reaction, when a subsample was taken, formic acid [0.2M] was added to neutralize the solution and reach a pH 5-6.



Supplementary data 6. Deconjugations experiment 3 on MCs 1-5 proteins conjugates with basic treatment (NaOH) and reduction of the deconjugated forms with $NaBH_4$. The experiment 3 was performed with $NaBH_4$/NaOH [0.27M/ 0.5M], pH = 13, on a kinetic from 0 to 2h with subsamples taken at 0, 0.5, 1, 1.5 and 2h. For each experiment, the same method has been tested on: MC-LR/GSH conjugates (left column), MC-LR/Cys conjugates (middle column) and unconjugated MC-LR (right column). On each graphic blue curves represents the intensity of MCs/conjugates, orange curves: unreduced deconjugated MCs and grey curves: reduced and deconjugated MCs. In order to stop the reaction, when a subsample was taken, formic acid [0.2M] was added to neutralize the solution and reach a pH 5-6.



Supplementary data 7. Deconjugation experiment 4 on MCs 1-5 proteins conjugates with basic treatment (NaOH) and reduction of the deconjugated forms with $NaBH_4$. The experiment 4 was carried out with $NaBH_4$/NaOH [0.54M/ 0.5M], pH = 13, on a kinetic of 0 to 22h with sub-samples taken at 0, 1, 2, 4, 6 and 22h. For each experiment, the same method has been tested on: MC-LR/GSH conjugates (left column), MC-LR/Cys conjugates (middle column) and unconjugated MC-LR (right column). On each graphic blue curves represents the intensity of MCs/conjugates, orange curves: unreduced deconjugated MCs and grey curves: reduced and deconjugated MCs. In order to stop the reaction, when a subsample was taken, formic acid [0.2M] was added to neutralize the solution and reach a pH 5-6.

METHODES D'ANALYSE DES MICROCYSTINES TOTALES PAR LC-MS/MS DANS LES MATRICES DE POISSON

Les microcystines (MC) sont des hépatotoxines produites par diverses cyanobactéries. La prolifération massive de cyanobactéries productrices de MC peut présenter des effets délétères pour la faune mais aussi pour l'homme en raison de l'exposition, notamment par contact ou par ingestion (eau et organismes aquatiques contaminés). Les MC peuvent s'accumuler dans les matrices biologiques sous plusieurs formes : libres dans la cellule ou liées de manière covalente à diverses protéines (*e.g.,* protéines phosphatases (PP), cystéine (CYS), glutathion (GSH)) dans les organismes. Les formes totales de MC (libres + liées de manière covalente) sont encore rarement surveillées et pourtant elles peuvent être une forme majeure d'accumulation dans les réseaux trophiques aquatiques. Ce projet de doctorat vise à i) améliorer les méthodes d'extraction et d'analyse par LC-MS/MS des formes totales de MC dans les tissus de poissons et ii) évaluer la cinétique d'accumulation des MC libres et liés aux protéines dans la chair et les organes de poissons d'eau douce après une exposition controllée en laboratoire ou en milieu naturel.

Différentes méthodes d'extraction des formes libres dans la chair de diverses espèces de poissons (saumon, truite et carpe) ont d'abord été comparées en utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). La méthode donnant les meilleurs taux de récupération et des effets matrice comparables pour les différents poissons et les variants de MC testés (MC-LR, MC-RR), ainsi qu'un processus d'exécution rapide et facile, a ensuite été optimisée et validée selon l'approche critères inspirée de la norme V03-110. Pour les MC totales, deux protocoles d'oxydation de Lemieux ont été comparés sur différentes matrices fraîches et lyophilisées (poisson et moule d'eau douce). Le protocole le plus récent a donné de meilleurs taux de récupération moyens (66 %) que celui couramment utilisé dans la littérature (33 %). Différentes méthodes de quantification (courbe d'étalonnage en solvant versus en matrice, courbe d'étalonnage utilisant la MC-LR oxydée en MMPB, avec ou sans étalon interne) ont également été comparées pour chaque protocole.

Les inconvénients inhérents à la méthode d'oxydation de Lemieux tels que le temps de traitement de chaque échantillon, les taux de récupération modérés ainsi que la perte d'information sur l'identité des MC ont motivé la recherche d'une méthode alternative pour l'analyse des formes totales des MC par LC-MS/MS. La déconjugaison à pH basique a été choisie, non seulement pour sa nouveauté concernant l'analyse des cyanotoxines mais aussi parce que cette technique permet, contrairement à l'oxydation de Lemieux, de conserver l'information sur l'identité des variants de MC. La déconjugaison a été appliquée aux conjugués de MC-peptides (MC-CYS, MC-GSH) et aux matrices aquatiques avec de l'hydroxyde de sodium [NaOH 0,5 µM]. Pour éviter la reconjugaison des MC avec les peptides, du borohydrure de sodium [0,4 M] a été utilisé pour réduire et obtenir des MC déconjuguées non réactives. Une déconjugaison complète des MC-GSH a été obtenue après 1 h de réaction et après 4 h pour les MC-CYS avec une réduction des MC déconjugués entre 6 et 22 h pour les deux types de conjugués.

En raison du manque de connaissances sur la cinétique d'accumulation et de dépuration des MC totales chez les poissons, une expérience a été menée sur des carpes juvéniles, volontairement nourries avec des aliments pour poissons enrichis en MC-LR, pendant 7 j suivis d'une période de dépuration de 21 j. Des analyses des MC totales par oxydation de Lemieux ont été réalisées dans la chair et le foie des carpes exposées à MC-LR. Des analyses de MC totales *in situ* ont également été réalisée dans différents tissus de poissons provenant de deux lacs, le lac Pannecière (France) et le lac Qaraoun (Liban) à la suite d'un important épisode de mortalités de poissons. Des accumulations de MC totales ont été détectées dans les reins des carpes du lac français (de 333 à 8745 µg/kg), dans les filets d'une perche (333 µg/kg) et dans les filets de carpes (de 109 à 115 µg/kg) et les foies (de 225 à 2045 µg/kg) provenant des carpes du lac libanais. Pas d'accumulation de MC libre n'a été détecté dans ces échantillons.

Deux méthodes complémentaires de dosages des MC totales dans la chair de poissons ont été développés et appliqués à différents tissus de poissons contaminés en laboratoire ou *in situ* au MC. Ces dosages ont montré des niveaux accumulations supérieurs de MC totales par rapport aux MC libres soulignant l'importance de la prise en compte des MC totales lors du suivi sanitaire d'organismes contaminés par des MC.

MOTS-CLEFS : Cyanotoxines, microcystines libres, microcystines totales, LC-MS/MS, oxydation de Lemieux, déconjugaison à pH basique, matrices de poisson, bioaccumulation

Discipline : PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Spécialité : Ecotoxicologie

ANSES - agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Laboratoire de sécurité des aliments
Unité Pesticides et Biotoxines Marines

14 rue Pierre et Marie Curie 94 700 Maisons-Alfort

Université de Reims Champagne-Ardenne

SEBIO - UMR-I 02

METHODS OF ANALYSIS OF TOTAL MICROCYSTINS BY LC-MS/MS IN FISH MATRICES

Microcystins (MCs) are hepatotoxins produced by various cyanobacteria. Massive proliferation of MC-producing cyanobacteria can present deleterious effects for wildlife but also for humans due to exposure, particularly through contact or ingestion (contaminated water and aquatic organisms). MCs can accumulate in biological matrices in several forms: free in the cell or covalently bound to various proteins (*e.g.*, protein phosphatases (PPs), cysteine (CYS), glutathione (GSH)) in organisms. The total forms of MCs (free + covalently bound) are still rarely monitored and yet they can be a major form of accumulation in aquatic food webs. This PhD project aimed at i) improving methods of extraction and analysis by LC-MS/MS of total forms of MC in tissues of freshwater organisms and ii) evaluating the kinetics of accumulation of free and protein-bound MCs in freshwater fish flesh and organs.

Different methods of extraction of free forms in the flesh of various fish species (salmon, trout and carp) were first compared using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method giving the best recoveries and comparable matrix effects for all fishes and the tested MC variants (MC-LR, MC-RR), as well as a rapid and easy execution process, was further optimized and validated according to the criteria approach inspired from the V03-110 standard. For total MCs, two protocols of the Lemieux oxidation were compared on different fresh and freeze-dried matrices (fish and freshwater mussel). The more recently developed protocol gave better average yields (66%) than the one commonly used in the literature (33%). Different quantification methods (solvent versus matrix-matched calibration curve, calibration curve using MC-LR oxidized to MMPB, with or without internal standard) were also compared on each protocol. The use of d_3-MMPB as the internal standard gave better yields on both Lemieux methods.

Inconveniences inherent to the Lemieux oxidation method such as the processing time of each sample, the moderate yields of the method as well as the loss of information on the identity of the MCs have motivated the search for an alternative method for the analysis of total forms of MCs by LC-MS/MS. Deconjugation at basic pH was chosen, not only for its novelty regarding the cyanotoxin analysis but also because this technique allows, unlike the Lemieux oxidation, to keep information on the identity of the MC variants. Deconjugation was applied to MC-peptides conjugates (MC-CYS, MC-GSH) and aquatic matrices with sodium hydroxide [NaOH 0.5 µM]. To avoid reconjugation of MCs with peptides, sodium borohydride [0.4M] was used to reduce and to obtain non-reactive deconjugated MCs. A complete deconjugation of MC-GSH was achieved after 1 h of reaction and after 4 h for MC-CYS with reduction of deconjugated MCs between 6 and 22 h for both types of conjugates.

Due to the lack of knowledge on the kinetics of accumulation and depuration of total MC in fish, an experiment was carried out on juvenile carp, voluntarily fed fish feed enriched with MC-LR, for 7 days followed by a depuration period of 21 days. Analyses of total MC by Lemieux oxidation were carried out in the flesh and liver of carp exposed to MC-LR. In situ analyses of total MC were also carried out in various fish tissues from two lakes, Lake Pannecière (France) and Lake Qaraoun (Lebanon), following a major fish mortality event. Accumulations of total MC were detected in the kidneys of carp from the French lake (from 333 to 8745 µg/kg), in the fillets of a perch (333 µg/kg) and in carp fillets (from 109 to 115 µg/kg) and livers (from 225 to 2045 µg/kg) from carp from the Lebanese lake. No accumulation of free MC was detected in these samples.

Two complementary methods for measuring total MC in fish flesh were developed and applied to various fish tissues contaminated with MC in the laboratory or *in situ*. These assays showed higher accumulation levels of total MC than free MC, underlining the importance of taking total MC into account when monitoring the health of organisms contaminated by MC.

KEYWORDS : Cyanotoxins, free microcystins, total microcystins, LC-MS/MS, Lemieux oxidation, base catalyzed deconjugation, fish matrices, bioaccumulation

KEYWORDS: Cyanotoxins, free microcystins, total microcystins, LC-MS/MS, Lemieux oxidation, base catalyzed deconjugation, fish matrices, bioaccumulation

Discipline : PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS - INTERACTIONS

Spécialité : Ecotoxicologie

ANSES - agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

Laboratoire de sécurité des aliments
Unité Pesticides et Biotoxines Marines

14 rue Pierre et Marie Curie 94 700 Maisons-Alfort

Université de Reims Champagne-Ardenne

SEBIO - UMR-I 02