

Université de Montréal

**Analyse des cyanotoxines dans différents organismes
aquatiques et habitats de la Réserve Écologique de la
Rivière-aux-Brochets**

par MOURAD SKAFI

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise sciences (M. Sc.)
En Chimie
Option Chimie analytique d'environnement

Avril 2021

© MOURAD SKAFI, 2021

Université de Montréal
Département de chimie, Faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé
**Analyse des cyanotoxines dans différents organismes aquatiques et habitats de la
Réserve Écologique de la Rivière-aux-Brochets**

Présenté par
MOURAD SKAFI

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Kevin Wilkinson James
Président-rapporteur

Sébastien Sauvé
Directeur de recherche

Philippe Juneau
Codirecteur

Patrick Hayes
Membre du jury

Résumé

La diversité et la distribution des cyanobactéries dans les écosystèmes aquatiques conduisent à des effets nuisibles dans l'eau par la production d'une variété de toxines cyanobactériennes qui présentent des risques pour la faune et la santé humaine. Différentes techniques analytiques émergentes ont été développées pour détecter et quantifier les toxines cyanobactériennes dans l'environnement. Dans ce mémoire nous avons examiné la présence de cyanotoxines multi-classes, dont 12 microcystines, les anatoxines, la cylindrospermopsine (CYN), les anabaenopeptines (AP-A, AP-B) et la cyanopeptoline-A dans les eaux de surface et les poissons sauvages. L'échantillonnage a été conduit pendant l'été 2018, dans l'écosystème fluvial de la réserve écologique de la Rivière aux Brochets (QC, Canada) près de la Baie Missisquoi (Lac Champlain). La méthode analytique employée combine la chromatographie liquide ultra haute performance et une ionisation par électronébuliseur (UHPLC-ESI) avec l'usage d'un spectromètre de masse triple quadripôle. Sur les 18 cyanotoxines ciblées, 14 ont été détectées dans des échantillons d'eau de surface impactés par la floraison ; les toxines ont culminé au début de la mi-septembre avec les concentrations les plus élevées de MC-LR ($3,8 \mu\text{g L}^{-1}$) et MC-RR ($2,9 \mu\text{g L}^{-1}$). Parmi les 71 poissons prélevés sur le terrain (10 espèces au total), 38% avaient des détections positives d'au moins une cyanotoxine. Dans les échantillons positifs, les plages de concentration dans le muscle du poisson étaient les suivantes : la somme des microcystines $\sum\text{MC}$ ($0,16-9,2 \mu\text{g kg}^{-1}$), la CYN ($46-75 \mu\text{g kg}^{-1}$), et les anabaénopeptines AP-A ($1,1-5,4 \mu\text{g kg}^{-1}$) et AP-B ($0,01 \text{ à } 5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). Dans l'ensemble, 17% des échantillons de poisson étaient positifs pour AP-A ou AP-B. A notre connaissance, ceci constitue le premier signalement de bioaccumulation d'anabaénopeptines dans la faune. La somme maximale des concentrations des microcystines $\sum\text{MC}$ dans les poissons était 1,15 fois plus élevées que la recommandation de l'apport quotidien ($8 \mu\text{g kg}^{-1}$ de tissu⁻¹) de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour les adultes et équivalaient presque à la valeur dérivée pour les jeunes enfants $9.3 \mu\text{g kg}^{-1}$. La concentration de CYN était également environ 3 fois plus élevée que la limite dérivée des valeurs recommandées pour la santé humaine.

Mots-clés : Toxines cyanobactériennes, Distribution, Microcystines, Cylindrospermopsine, Anabaenopeptins, Poisson, Quantification, UHPLC-ESI-MS.

Abstract

The diversity and widespread distribution of cyanobacteria in aquatic ecosystems lead to harmful effects in water through the production of a variety of cyanobacterial toxins, which pose a great danger to fauna and human health. Different emerging analytical techniques have been developed to detect and quantify cyanobacterial toxins in the environment. In this thesis we examined the presence of multi-class cyanotoxins, including 12 microcystins, anatoxins, cylindrospermopsin (CYN), anabaenopeptins (AP-A, AP-B) and cyanopeptolin-A in surface water and wild fish. Sampling was conducted during the 2018 summer season in the fluvial ecosystem of the Pike River ecological reserve (QC, Canada) near Missisquoi Bay, Lake Champlain. This study was carried out using an analytical method combining ultra-high-performance liquid chromatography and ionization by electrospray (UHPLC-ESI) with the use of a triple quadrupole mass spectrometer. Of the 18 cyanotoxins targeted, 14 were detected in surface water samples impacted by the bloom; toxins peaked in early mid-September with the highest concentrations of MC-LR ($3.8 \mu\text{g L}^{-1}$) and MC-RR ($2.9 \mu\text{g L}^{-1}$). Among the 71 fish sampled in the field from 10 species, 38% had positive detections of at least one cyanotoxin. In positive samples, the concentration ranges in fish muscle were as follows: the sum of microcystins $\sum\text{MC}$ ($0.16\text{-}9.2 \mu\text{g kg}^{-1}$), CYN ($46\text{-}75 \mu\text{g kg}^{-1}$), AP -A ($1.1\text{-}5.4 \mu\text{g kg}^{-1}$) and AP-B (0.01 to $5.0 \mu\text{g kg}^{-1}$). Overall, 17% of the fish samples were positive for AP-A or AP-B; to our knowledge, this is the first report of accumulation of anabaenopeptins in wildlife. The maximum sum $\sum\text{MC}$ of microcystin concentrations in fish was 1.15 times higher than the recommendation of the World Health Organization (WHO) Daily Intake ($8 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ tissue}^{-1}$) for adults and was almost equivalent to the derived value for young children $9.3 \mu\text{g kg}^{-1}$. The concentration of CYN was also approximately 3 times higher than the limit derived from the recommended human health values.

Keywords : Cyanobacterial toxins, Distribution, Microcystins, Cylindrospermopsin, Anabaenopeptins, Fish, Quantification, UHPLC-ESI-MS.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations, sigles et acronymes.....	ix
Dédicace.....	xv
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1. Introduction générale.....	18
1.1 Problématique des cyanobactéries.....	18
1.2 Objectifs du projet.....	19
1.3 Structure du mémoire.....	20
Chapitre 2. Cyanobactéries : Développement, diversité et classification.....	21
2.1 Cyanobactéries.....	21
2.1.1 Description générale.....	21
2.1.2 Efflorescences de cyanobactéries.....	22
2.1.3 Cyanotoxines.....	22
2.2 Classification des cyanotoxines.....	23
2.2.1 Peptides cycliques.....	23
2.2.1.1 Microcystines.....	23
2.2.1.2 Nodularines.....	25
2.2.2 Alcaloïdes.....	26
2.2.2.1 Anatoxine-a.....	26
2.2.2.2 Anatoxine-a(s).....	27
2.2.2.3 Saxitoxines.....	28
2.2.2.4 Cylindrospermopsine.....	29
2.2.2.5 Lyngbyatoxine.....	30
2.2.2.6 Aplysiatoxine.....	31
2.2.3 Acides aminés non-protéinogènes.....	31
2.2.4 Lipopolysaccharides.....	32
2.2.5 Lipopeptides.....	33
2.2.5.1 Antillatoxines.....	34
2.2.5.2 Jamaicamides.....	35

2.2.5.3 Kalkitoxines.....	35
2.2.5.4 Barbamides.....	36
2.2.5.5 Majusculamides.....	37
2.2.5.6 Hectochlorins.....	38
2.2.5.7 Curacines.....	38
Chapitre 3. Techniques d'analyse des cyanotoxines.....	40
3.1 Mise en contexte.....	40
3.2 Méthodes d'extraction.....	40
3.3 Essais biologiques.....	42
3.3.1 Essais biologiques in vivo.....	42
3.3.2 Essais biochimiques.....	43
3.3.2.1 Essais d'inhibition enzymatique.....	43
3.3.2.2 Essais immunologiques.....	44
3.3.2.3 Essais biologiques des récepteurs.....	45
3.4 Méthodes physicochimiques.....	45
3.4.1 Électrophorèse capillaire.....	45
3.4.2 Chromatographie gazeuse.....	45
3.4.3 Chromatographie liquide.....	46
3.5 Spectrométrie de masse.....	48
3.5.1 Description générale.....	48
3.5.2 Ionisation EI.....	49
3.5.3 Ionisation ESI.....	49
3.5.4 Ionisation APCI.....	51
3.5.5 Triple quadripole.....	53
3.5.6 Spectrométrie de masse à haute résolution.....	55
3.5.6.1 Orbitrap.....	55
3.5.6.2 Q-Exactive.....	55
3.6 Méthodes moléculaires.....	59
Chapitre 4. Partie expérimentale.....	62
4.1 Description du site d'étude – Réserve Écologique de la Rivière aux Brochets.....	62
4.2 Échantillonnage de l'eau de surface et des poissons.....	63

4.3 Préparation des échantillons	65
4.4 Analyse LC-MS/MS	66
4.5 Validation de la méthode analytique et contrôle qualité.....	67
Chapitre 5. Présence de microcystines, d'anabaenopeptines et d'autres cyanotoxines dans les poissons d'une réserve faunique d'eau douce affectées par des proliférations cyanobactériennes nuisibles	70
Abstract	71
5.1 Introduction.....	72
5.2 Materials and methods	74
5.2.1 Chemicals and standards.....	74
5.2.2 Site description.....	74
5.2.3 Sampling	75
5.2.4 Sample preparation	76
5.2.4.1 Surface water.....	76
5.2.4.2 Fish muscle.....	77
5.2.5 Instrumental analysis	77
5.2.6 Method validation and quality assurance/quality control	78
5.3 Results.....	81
5.3.1 Occurrence and levels of cyanotoxins in surface water.....	81
5.3.2 Occurrence and levels of cyanotoxins in wild-caught fish	82
5.4 Discussion.....	83
5.4.1 Comparison with literature data.....	83
5.4.1.1 Surface water.....	83
5.4.1.2 Fish muscle.....	84
5.4.2 Human health risk assessment through fish consumption	85
5.5 Conclusions.....	86
5.6 Acknowledgments.....	87
5.7 Supplementary Information	88
Chapitre 6. Conclusions.....	108
Bibliographie.....	112

Liste des tableaux

Table 5-1. Analytical method validation in spiked fish muscle matrix, including linearity (R^2), method detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ), and whole-method accuracy % and precision (intraday/interday) for the 18 targeted cyanotoxins.	81
Table 5-2. Summary of cyanotoxin concentration ranges in surface waters ($n = 17$, ng L^{-1}) and fish muscle samples ($n = 71$, $\mu\text{g kg}^{-1}$ wet weight) with positive detections.	82
Table S5-1. Details on fish samples caught at different sampling locations in the Pike River (Lake Champlain, QC, Canada).....	89
Table S5-2. Gradient elution program for preconcentration and separation of the targeted cyanotoxins by on-line SPE – UHPLC-MS/MS.....	91
Table S5-3. Compound-dependent MS/MS acquisition parameters for the detection of the targeted cyanotoxins and associated isotope-labelled internal standards (IS).....	92
Table S5-4. Quantified concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of cyanotoxins spiked to haddock muscle quality control samples (nominal spiked concentration $40 \mu\text{g kg}^{-1}$).....	93
Table S5-5. Absolute recovery % of cyanotoxins during the evaporation to dryness and reconstitution step in HPLC water.....	94
Table S5-6. Quantified concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of cyanotoxins in field-collected fish samples ($n = 71$) from the present survey. (S5-6-1) CYN, anatoxins, cyanopeptolin, and anabaenopeptins.	95
Table S5-6. Quantified concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of cyanotoxins in field-collected fish samples ($n = 71$) from the present survey. (S5-6-2) Microcystins.	97
Table S5-7. Summary of cyanotoxins present in fish muscle, categorized by species, range of toxins detected, methods of extraction and analysis are included.	99

Liste des figures

Figure 2-1. Structure moléculaire des microcystines : 1 = D-Ala, 2 = X (variable), 3 = D-MeAsp, 4 = Z (variable), 5 = Adda, 6 = D-Glu et 7 = Mdha.....	24
Figure 2-2. Structure moléculaire des nodularines : 1 = Mdhb, 2 = D-MeAsp, 3 = Z (variable), 4 = Adda et 5 = D-Glu.	26
Figure 2-3. Structure moléculaire de l'anatoxine-a et de l'homoanatoxine-a.....	27
Figure 2-4. Structure moléculaire de l'anatoxine-a(s).	28
Figure 2-5. Structure moléculaire des saxitoxines.	29
Figure 2-6. Structure moléculaire des cylindrospermopsines.....	30
Figure 2-7. Structure moléculaire de la lyngbyatoxine.....	30
Figure 2-8. Structure moléculaire de L'aplysiatoxine.	31
Figure 2-9. Structure moléculaire du β -amino- <i>N</i> -méthylalanine (BAMA) et de ses isomères.....	32
Figure 2-10. Structure moléculaire des lipopolysaccharides.	33
Figure 2-11. Structure d'antillatoxine A et ses isomères.	34
Figure 2-12. Structure de Jamaicamide A et ses analogues.....	35
Figure 2-13. Structure de Kalkitoxine et ses congénères.....	36
Figure 2-14. Structure de barbamide et son analogue.....	37
Figure 2-15. Structure du majusculamide D (MJS-D) et analogues apparentés.....	37
Figure 2-16. Structures d'hectochlorine et ses analogues.....	38
Figure 2-17. Structure de la curacine A et ses isomères.	39
Figure 3-1. Schéma du mécanisme d'ionisation par électronébuliseur	50
Figure 3-2. Schéma des composants d'une source APCI.....	51
Figure 3-3. Une vue plus détaillée du mécanisme de l'APCI en mode positif.....	52
Figure 3-4. Schéma d'un quadripôle hyperbolique.....	53
Figure 3-5. Schéma d'un triple quadripôle adapté de.....	54
Figure 3-6. Schéma de l'Orbitrap.	57
Figure 3-7. Schéma du Q-Exactive.....	59

Figure 4-1. Réserve écologique de la rivière aux Brochets.	63
Figure 4-2. Échantillonnage des poissons à la senne dans la réserve écologique de la Rivière aux Brochets.....	64
Figure 5-1. General location of the surveyed area and spatial distribution of the sampling sites within the Pike River Ecological Reserve and Missisquoi Bay (Quebec, Canada).....	76
Figure 5-2. LC-MS/MS chromatograms of anabaenopeptin-B (retention time: 3.19 min; quantification transition: 837.6 → 201.0; confirmation transition: 837.6 → 637.6) in method blank (5-2-1), in blank fish matrix (haddock muscle, <i>Melanogrammus aeglefinus</i>) spiked at 50 µg kg ⁻¹ (5-2-2), and in a field-collected carp sample (<i>Cyprinus carpio</i>) from the present survey (5-2-3). NL refers to absolute signal height.....	83
Figure S5-1. Chromatographic performance illustrated in a spiked haddock muscle (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>), supplemented at 50 µg kg ⁻¹ with the 18 targeted cyanotoxins.	103

Liste des abréviations, sigles et acronymes

Les mots dans la langue anglaise et en latin sont indiqués en italique.

6-AQC	6-Aminoquinolyl- <i>N</i> -hydroxysuccinimidyl
ACN	Acétonitrile / <i>Acetonitrile</i>
Adda	Acide (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényldéca-4,6-diénoïque / (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-3- <i>Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid</i>
AEG	<i>N</i> -(2-Aminoéthyle) glycine / <i>N</i> -(2- <i>Aminoethyl</i>) <i>glycine</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique / <i>Deoxyribonucleic acid</i>
AIF	Fragmentation tous les ions / <i>All ion fragmentation</i>
AMNE	Barbotte brune / <i>Brown bullhead (Ameiurus nebulosus)</i>
AMRU	Crapet de roche / <i>Rock bass (Ambloplites rupestris)</i>
ANA-a	Anatoxine-a / <i>Anatoxin-a</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger / <i>Messenger ribonucleic acid</i>
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique / <i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
AP	Anabaenopeptine / <i>Anabaenopeptin</i>
ATX	Antillatoxine / <i>Antillatoxin</i>
ATRAPP	Proliférations d'algues, traitement, évaluation des risques, prédiction et prévention grâce à la génomique / <i>Algal Blooms, Treatment, Risk Assessment, Prediction and Prevention through Genomics</i>
BAMA	β -Amino- <i>N</i> -méthylalanine / β - <i>Amino-N-methylalanine</i>
BMAA	β -Méthylamino- <i>N</i> -alanine / β - <i>Methylamino-N-alanine</i>
BW	Poids corporel / <i>Body weight</i>
C18	Phase stationnaire à base d'octadécylsilane / <i>Stationary phase based on octadecylsilane</i>
C8	Phase stationnaire à base d'octasilane / <i>Stationary phase based on octasilane</i>
CACO	Meunier noir / <i>white sucker (Catostomus commersonii)</i>
CDEA	Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux / <i>Ethics Committee for Animal Experimentation</i>

COSEWIC	Comité sur la situation des espèces en péril au Canada / <i>Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada</i>
CP	Cyanopeptoline / <i>Cyanopeptolin</i>
CurA	Curacine A / <i>Curacin A</i>
CyanoHABs	Proliférations d'algues nuisibles de cyanobactéries / <i>Harmful algal blooms of cyanobacteria</i>
CYN	Cylindrospermopsine / <i>Cylindrospermopsine</i>
CYCA	Carpe commune / <i>Common carp (Cyprinus carpio)</i>
Da	Dalton
DAB Acide	2,4-diaminobutyrique / <i>2,4-Diaminobutyric acid</i>
D-Ala	D-Alanine
D-Asp3	Acide aspartique situé à la 3 ^e position du cycle peptidique
dcSTX	Décarbamoylsaxitoxine
DH-ATX	8-déméthyl-8,9-dihydro-antillatoxine / <i>8-demethyl-8,9-dihydro-antillatoxin</i>
D-MeAsp	Acide D-érythro-β-méthylaspartique / <i>D-erythro-β-methylaspartic acid</i>
DMEQ-TAD	4-[2-(6,7-diméthoxy-4-méthyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaliny) éthyl] -1, 2, 4-triazoline-3,5-dione
D-Glu	D-Glucose
DW	Poids sec / <i>Dry weight</i>
EC	Électrophorèse capillaire / <i>Capillary electrophoresis</i>
ECD	Détection par capture d'électrons / <i>Electron capture dissociation</i>
EI	Impact électronique / <i>Electronic impact</i>
ELISA	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée / <i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i>
ESI	Ionisation par électronébuliseur / <i>Electrospray ionization</i>
ESLU	Grand brochet / <i>Northern pike (Esox lucius)</i>
FA	Acide formique / <i>Formic Acid</i>
FIA	Immunoessai par fluorescence / <i>Fluorescence immunoassay</i>
FISH	Hybridation par fluorescence in situ / <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FLD	Détection par fluorescence / <i>Fluorescence detection</i>

FPIA	Immunoessai de polarisation de fluorescence / <i>Fluorescence polarization immunoassay</i>
FS	Balayage complet / <i>Full scan</i>
FTICR	Résonance cyclotronique ionique de transformée de Fourier / <i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
FW	Poids frais / <i>Fresh weight</i>
FWHM	Largeur à mi-hauteur / <i>Full width at half maximum</i>
GC	Chromatographie gazeuse / <i>Gas chromatography</i>
GTX	Gonyautoxine / <i>Gonyautoxin</i>
HCD	Dissociation collisionnelle à haute énergie / <i>Higher-energy collisional dissociation</i>
Hct	Hectochlorine / <i>Hectochlorine</i>
HESI	Ionisation par électronébuliseur chauffée / <i>Heated electrospray ionization</i>
HILIC	Chromatographie par interactions hydrophiles / <i>Hydrophilic interaction chromatography</i>
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance / <i>High performance liquid chromatography</i>
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution / <i>High resolution mass spectrometry</i>
HRP	Peroxydase de raifort / <i>Horseradish peroxidase</i>
H ₂ S	Sulfure d'hydrogène / <i>Hydrogen sulphide</i>
ICA	Immuno-chromatographie / <i>Immuno-chromatography</i>
KTX	Kalkitoxine / <i>Kalkitoxin</i>
LC	Chromatographie liquide / <i>Liquid chromatography</i>
LD ₅₀	Dose létale à la médiane / <i>Median lethal dose</i>
LC ₁₀₀	Concentration létale absolue / <i>Absolute lethal concentration</i>
LFICA	Dosage d'immuno-chromatographie par enzyme à flux latéral / <i>Lateral flow enzyme immuno-chromatography assay</i>
LOAEL	Niveau d'effet indésirable le plus bas observe / <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
LOD	Limites de détection / <i>Detection limits</i>
LOQ	Limites de quantification / <i>Quantification limits</i>

LPS	Lipopolysaccharides / <i>Lipopolysaccharides</i>
LWTX	Lyngbya wollei toxine / <i>Lyngbya wollei toxin</i>
MC	Microcystine / <i>Microcystin</i>
MC-HilR	Microcystine-Homoisoleucine/Arginine
MC-HtyR	Microcystine-Homotyrosine/Arginine
MC-LA	Microcystine-Leucine/Alanine
MC-LR	Microcystine-Leucine/Arginine
MC-LY	Microcystine-Leucine/Tyrosine
MC-RR	Microcystine-Arginine/Arginine
MC-WR	Microcystine-Tryptophane/Arginine
MC-YR	Microcystine-Tyrosine/Arginine
MC-YA	Microcystine-Tyrosine/Alanine
MeOH	Méthanol / <i>Methanol</i>
MFFP	Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs / <i>Ministry of Forests, Wildlife and Parks</i>
MMPB	Acide 2-méthyl-3-méthoxy-4-phénylbutyrique / <i>2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid</i>
MIDO	Achigan à petite bouche / <i>Smallmouth bass (Micropterus dolomieu)</i>
MJS	Majusculamide / <i>Majusculamide</i>
MRM	Multiplés fragmentations sélectives / <i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Spectrométrie de masse / <i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem / <i>Tandem mass spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Ratio masse sur charge / <i>Mass to charge ratio</i>
N ₂	Gaz d'azote / <i>Nitrogen gas</i>
NBDF	4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole
neoSTX	Néosaxitoxine / <i>Neosaxitoxin</i>
NMDA	N-méthyl-d-aspartate
NOAEL	Dose sans effet nocif observable / <i>No Observable Adverse Effect Level</i>
NOCR	Méné jaune / <i>Golden shiner (Notemigonus crysoleucas)</i>
NOD	Nodularine / <i>Nodularin</i>
OMS	Organisation mondiale de la Santé / <i>World health organization</i>

PDA	Détecteur à barrette de diode / <i>Photodiode array detector</i>
PETG	Polyéthylène téréphtalate modifié au glycol / <i>Polyethylene terephthalate glycol-modified</i>
PEFL	Perchaude / <i>Yellow perch (Perca flavescens)</i>
PCR	Réaction en chaîne par polymérase / <i>Polymerase chain reaction</i>
PNPP	Para-nitrophénylphosphate / <i>Para-nitrophenylphosphate</i>
PONI	Marigane noire / <i>Black crappie (Pomoxis nigromaculatus)</i>
PPIA	Essai d'inhibition de la protéine phosphatase / <i>Protein phosphatase inhibition assay</i>
PP1	Protéine phosphatase 1 / <i>Protein phosphatase 1</i>
PP2A	Protéine phosphatase 2A / <i>Protein phosphatase 2A</i>
ppm	Partie par million / <i>Part-per-million</i>
PSPs	Poisons paralysants de fruits de mer / <i>Paralytic Shellfish Poisons</i>
Q1	Premier analyseur quadripôle / <i>First quadrupole analyzer</i>
q2	Deuxième analyseur quadripôle ou cellule de collision / <i>Second quadrupole analyzer or collision cell</i>
Q3	Troisième analyseur quadripôle / <i>Third quadrupole analyzer</i>
R	Résolution / <i>Resolution</i>
R^2	Coefficient de détermination / <i>Coefficient of determination</i>
RF	Fréquence radio / <i>Radio frequency</i>
rpm	Tour par minute / <i>Revolutions per minute</i>
RSD	Écart type relatif / <i>Relative standard deviation</i>
SIM	Surveillance des ions sélectionnés / <i>Selected ion monitoring</i>
S/N	Rapport signal sur bruit / <i>Signal to noise ratio</i>
SPE	Extraction sur phase solide / <i>Solid phase extraction</i>
SRM	Surveillance des réactions sélectionnées / <i>Selected reaction monitoring</i>
STX	Saxitoxine / <i>Saxitoxin</i>
TDI	Apport journalier tolérable / <i>Tolerable daily intake</i>
TITI	Tanche / <i>Tench (Tinca tinca)</i>
t-MS2	Fragmentation ionique ciblée / <i>Targeted ion fragmentation</i>
TOF	Temps d'envol / <i>Time of flight</i>

TSA	Amplification de signe de Tyramide / <i>Tyramide Signal Amplification</i>
UF	Facteur d'incertitude / <i>Uncertainty factor</i>
UHPLC	Chromatographie liquide ultra haute performance / <i>Ultra high-performance liquid chromatography</i>
UV-vis	Ultraviolet-visible / <i>Ultraviolet-visible</i>
v/v	Volume par volume / <i>Volume per volume</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine / <i>Human immunodeficiency viruses</i>
WHO	Organisation Mondiale de la Santé / <i>World health organization</i>
X	Acides aminés variables des microcystines
Z	Acides aminés variables des microcystines

Dédicace

Je dédie ce mémoire à ... 

Mes Parents

Ma Femme

Mon Fils

Ma Fille

Ma Sœur

Mes Frères

Toute ma Famille

Tous mes amis

Ceux qui me sont chers

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Sébastien Sauvé, mon directeur de recherche pour m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de son groupe de recherche. Je le remercie profondément pour sa disponibilité, son encadrement efficace, sa compréhension, sa grande gentillesse et pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de cette étude. Malgré ses importantes obligations, il a toujours été présent pour encadrer mes recherches dans la bonne direction et ceci a été fondamental dans la bonne réalisation de ce projet.

Je remercie vivement le Professeur Philippe Juneau mon co-directeur pour son soutien professionnel et amical au cours de tout ce travail de recherche, tant pour l'aspect réalisation que pour l'aspect rédaction.

Mes remerciements vont aussi aux Messieurs Kevin Wilkinson et Patrick Hayes, Professeurs à l'Université de Montréal, pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail et pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour celui-ci.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du Laboratoire de chimie analytique environnementale du Prof. Sébastien Sauvé, pour leur aide et leur soutien : Sung Vo Duy, Gabriel Munoz, Dana Florina Simon, Alejandra Guitron, Dinh Quoc Tuc, Hermann Kaboré, Juan Manuel Montiel-León, Marc-Antoine Vaudreuil, Ken Goeury, Jean-Christophe Picard et Liu Zhen.

J'exprime toute ma gratitude à Sung Vo Duy, Gabriel Munoz, Dinh Quoc Tuc et Dana Florina Simon pour leur soutien technique, scientifique et pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail.

Je remercie aussi Bert Klein, Simon Bellefleur et Lyne Bouthillier du ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP) du Québec pour leur contribution au projet d'échantillonnage, ainsi qu'Alejandra Guitron de l'Université de Montréal pour sa participation à l'organisation des campagnes terrain.

Enfin, je voudrais remercier mes parents, ma femme, ma famille, mes amis et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail par leurs conseils ou simplement par leur présence.

Chapitre 1. Introduction générale

1.1 Problématique des cyanobactéries

Les cyanobactéries appelées « algues bleu-vert », sont des organismes procaryotes capables de photosynthèse, existant sous forme unicellulaire ou de colonies (Chorus et Bartram, 1999). Elles sont présentes naturellement à faibles concentrations dans la grande majorité des milieux aquatiques, notamment les lacs, les eaux courantes, les zones côtières marines et les réservoirs d'eau potable. Elles ne causent généralement pas de problèmes. Cependant, une croissance excessive de populations cyanobactériennes dans les milieux plus enrichis en nutriments peut entraîner des proliférations importantes dans les milieux aquatiques avec une abondance ($> 20\ 000$ cellules ml^{-1}) (WHO, 2003). Le phénomène d'eutrophisation qui s'accroît au cours des dernières décennies dans les systèmes d'eau douce, en lien avec les activités humaines comme l'agriculture, conduit à une augmentation des proliférations cyanobactériennes (Taranu et al., 2015). De nombreux problèmes environnementaux et sanitaires sont induits par ces épisodes de prolifération, tels que la diminution des concentrations d'oxygène dissous dans l'eau qui provoque l'asphyxie de la vie aquatique (Chorus et Bartram 1999; Rastogi et al. 2015). La production de cyanotoxines lors de ces épisodes de blooms cyanobactériens nocifs (CyanoHAB) constitue un autre problème majeur.

Plusieurs incidences de prolifération cyanobactérienne ont été enregistrées dans le monde (Carmichael et al., 2001; Codd et al., 2005; Duong et al., 2012; Hu et al., 2017). Les cyanobactéries peuvent produire une variété de cyanotoxines, dont certaines ont été impliquées dans des cas de mortalité d'animaux sauvages aquatiques et terrestres (Wood, 2016). Les CyanoHAB ou les proliférations d'algues nuisibles cyanobactériennes peuvent entraîner la mort massive de poissons de l'ordre de centaines à des milliers d'individus. Ces mortalités peuvent résulter non seulement de l'ingestion de toxines, mais aussi de l'hypoxie et de l'irritation des branchies (Wood et al., 2016 ; Huisman et al., 2018). Une population de flamants roses (*Phoenicopterus roseus*) d'un parc national espagnol a subi un épisode de mortalité soudaine au cours de laquelle 61% des poussins sont morts (Alonso-Andicoberry et al., 2002). Les eaux de la lagune contenaient environ $20\ 000$ cellules ml^{-1} de *Microcystis aeruginosa* et d'*Anabaena flos-aquae*, et la densité cellulaire était 20 fois plus élevée dans le tube digestif des poussins (Alonso-Andicoberry et al., 2002). L'intoxication par les cyanotoxines peut également affecter

le bétail et d'autres animaux domestiques (Wood, 2016). Récemment, l'analyse post-mortem de chiens retrouvés morts le long de la rivière South Umpqua dans le comté de Douglas, en Oregon, a montré que les décès ont été liés à une exposition aux alcaloïdes cyanobactériens (Farrer et al., 2015).

Les toxines cyanobactériennes peuvent se bioaccumuler dans la faune aquatique à des niveaux importants pendant les épisodes de CyanoHAB (Deblois et al., 2008a; Peng et al., 2010; Rezaitabar et al., 2017) et peuvent également se transférer aux réseaux trophiques riverains et terrestres (Moy et al., 2016). Dans une méta-analyse des microcystines dans les poissons d'eau douce sauvages dans le monde, Flores et al. (2018) ont dérivé des concentrations médianes de MC de $1,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ de poids sec dans le muscle du poisson ($n = 1035$). Sur la base des différentes Log K_{ow} et d'autres propriétés, une propension différente à la bioaccumulation est attendue entre différentes variantes de MC (McCord et al., 2018) et différentes classes de cyanotoxines. Ces hypothèses n'ont pas été entièrement confirmées, car les données de bioaccumulation sont relativement limitées, sauf pour les MC totales via détection ELISA (Berry et al., 2011) et quelques variantes de MC telles que MC-LR et MC-RR (Adamovský et al., 2007 ; Rezaitabar et al., 2017). Comparativement, il n'existe pratiquement pas de données de bioaccumulation pour d'autres cyanopeptides rarement surveillés (Janssen, 2019). Une étude récente pourtant sur 16 lacs dans l'est du Canada a suggéré la présence à potentiellement large échelle d'anabaénopeptides dans les eaux de surface touchées par la floraison, à des concentrations qui pouvaient égaler voire dépasser celles de la MC-LR (Roy-Lachapelle et al., 2019a). Dans quelle mesure ces cyanotoxines nouvellement détectées peuvent se bioaccumuler dans la faune sauvage, et quels sont leurs risques associés pour la faune et la santé humaine? Ces questions de recherche apparaissent pertinentes, compte tenu de la toxicité potentielle de ces toxines nouvellement détectées (Lenz et al., 2019).

1.2 Objectifs du projet

L'écosystème d'eau douce de la réserve écologique de la Rivière-aux-Brochets (*Pike River*) au Québec représente un site d'étude pertinent pour combler les lacunes dans les connaissances. Le site pilote est situé dans la zone nord-est de la Baie Missisquoi, elle-même située dans le bras nord-est du lac Champlain. Ce site a fait l'objet d'activités de surveillance intensive de CyanoHAB de 2000 à 2017 par le ministère de l'Environnement du Québec (Blais,

2019 ; Bowling et al., 2015). Des densités élevées de cellules cyanobactériennes (médiane ~ 100 000 cellules ml⁻¹, maximum ~ 1 000 000 à 5 000 000 cellules ml⁻¹) ont été enregistrées dans l'est de la baie Missisquoi d'août à octobre (Blais, 2015), et les fleurs d'eau peuvent s'étendre sur plusieurs kilomètres et pénétrer dans la réserve naturelle faunique de la Rivière-aux-Brochets. Certaines espèces sauvages sont déjà menacées par la perte d'habitat et les changements climatiques, et une aggravation des épisodes de CyanoHAB pourrait accentuer les déclinés observés dans cet écosystème (Levine et al., 2012).

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de maîtrise visait à examiner la présence des cyanotoxines multi-classes dans les eaux de surface et les poissons sauvages de la rivière aux Brochets (QC, Canada). Les échantillonnages ont été conduits durant l'été 2018 dans l'écosystème fluvial de la réserve écologique et 71 échantillons de poissons (10 espèces) ont été analysés. Les cyanotoxines ciblées dans cette étude incluaient 12 microcystines, les anatoxines ANA-a et HANA-a, la cylindrospermopsine (CYN), les anabaenopeptides AP-A et AP-B, et la cyanopeptoline-A. Cette étude permet de documenter la présence de cyanotoxines dans l'eau et diverses espèces de poissons, ainsi que d'évaluer les risques pour la santé humaine.

1.3 Structure du mémoire

Le présent mémoire est constitué de six chapitres :

Le **chapitre 1** constitué d'une introduction générale et de l'énoncé des objectifs du projet.

Le **chapitre 2** est une revue de littérature des principales catégories des cyanotoxines retrouvées dans les eaux environnementales, de leurs principales sources de production dans l'environnement par diverses cyanobactéries.

Le **chapitre 3** est une revue des principales techniques d'extraction et d'analyse des cyanotoxines avec leurs avantages et leurs limitations respectives.

Le **chapitre 4** est axé sur la partie expérimentale de ce travail qui comprend une description du site d'étude, l'échantillonnage, la préparation des échantillons, la méthode d'analyse et sa validation.

Dans le **chapitre 5**, les résultats de nos travaux de recherche sont présentés sous forme d'article rédigé en anglais.

Le **chapitre 6** présente une conclusion générale de ce mémoire et une mise en perspective des résultats de ce projet.

Chapitre 2. Cyanobactéries : Développement, diversité et classification

2.1 Cyanobactéries

2.1.1 Description générale

Les cyanobactéries, auparavant appelées « algues bleu-vert » sont des bactéries photo-autotrophes gram-négatives et leur distribution est omniprésente. Elles peuvent se retrouver dans des environnements extrêmes comme les zones arctiques, antarctiques et les sources chaudes du parc national de Yellowstone (Mataloni et Komárek, 2004 ; Whitton et Potts, 2000a, b). L'adaptabilité des cyanobactéries à des habitats divers et variés est le caractère important duquel résulte leur large distribution et certaines de leurs caractéristiques physiologiques et anatomiques modernes qui ont contribué à soutenir leur longue histoire sur Terre. On peut noter, par exemple, le niveau de tolérance élevé aux faibles teneurs en oxygène et en sulfure libre, la capacité d'utiliser H₂S comme photo-réducteur à la place de H₂O, et la forte tolérance aux rayonnements ultraviolets B et C (Whitton et Potts, 2000a, b).

Les caractéristiques anatomiques de base des cyanobactéries et leur origine sont de type bactérien typique, mais leurs caractéristiques morphologiques, biologiques et écologiques sont également spécifiques et diverses (Flores et al., 2006 ; Flores et Herrero, 2010 ; Kalaitzis et al., 2009). Certaines caractéristiques des cyanobactéries comme la fixation de l'azote atmosphérique, la photosynthèse oxygénée et la flottabilité (Berman-Frank et al., 2003 ; Burja et al., 2001 ; Castenholz, 2001 ; Walsby, 1994) rendent les cyanobactéries capables de s'adapter à des conditions et habitats variables. Les cyanobactéries agissent également comme des producteurs primaires phototrophes de premier plan dans les écosystèmes naturels (Bryant, 2003 ; Field et al., 1998). Elles ont joué un rôle majeur dans l'évolution des différentes formes de vie sur Terre, en tant que principaux producteurs d'oxygène sur cette planète. En plus les cyanobactéries sont l'un des principaux contributeurs aux chaînes mondiales de fixation de l'azote et du carbone (Karl et al., 2002).

Historiquement, les cyanobactéries ont été classées selon leurs caractéristiques morphologiques en cinq groupes, les cyanobactéries unicellulaires étant réparties entre les groupes I (Gloeothecae, Synechococcus, Cyanothecae), II (Myxosarcina, Xenococcus,

Dermocarpa) et III (Lyngbya, Trichodesmium, Plectonema, Pseudanabaena) ; et les cyanobactéries filamenteuses et hétérocystes contenues dans les groupes IV (Nostoc, Anabaena, Calothrix, Scytonema, Cylandrospermum, Nodularia, Tolypothrix, Trichormus) et V (Fischerella, Chlorogloeopsis) (Rippka et al., 1979, 2001).

2.1.2 Efflorescences de cyanobactéries

Les cyanobactéries sont présentes dans la grande majorité des milieux aquatiques, notamment les lacs, les eaux courantes, les zones côtières marines et les réservoirs d'eau potable. Elles se reproduisent de manière asexuée soit par une division binaire de la bactérie ou par spores (Flores et al., 2006 ; Whitton et Potts, 2012). Leurs concentrations sont généralement faibles et ne posent pas de problème majeur. Lorsque les conditions environnementales sont favorables, ces organismes sont capables de se multiplier à très grande vitesse formant alors des efflorescences de cyanobactéries ou « *blooms* » dans les plans d'eau avec une abondance supérieure à 20 000 cellules ml⁻¹ (WHO, 2003).

Le phénomène d'eutrophisation des eaux de surface, en particulier par l'utilisation excessive d'engrais et de fumier en agriculture ainsi que par les rejets d'eaux usées est la principale cause qui a entraîné une augmentation des proliférations cyanobactériennes dans les lacs du monde entier (He et al., 2016 ; Preece et al., 2017 ; Taranu et al., 2015). Les changements climatiques, les conditions plus chaudes et l'augmentation du CO₂ pourraient agir en synergie et accélérer la prolifération d'algues (Pick, 2016 ; Visser et al., 2016). Ces efflorescences en augmentation dans les plans d'eau potable, récréatifs et d'irrigation constituent de nombreux problèmes environnementaux et sanitaires. Par exemple, la diminution des concentrations d'oxygène dissous dans l'eau peut provoquer l'asphyxie de la faune aquatique (Chorus et Bartram 1999 ; Rastogi et al., 2015). La production de cyanotoxines constitue également un danger majeur pour les animaux sauvages et domestiques ainsi que pour les humains (Pham et Utsumi, 2018).

2.1.3 Cyanotoxines

Les cyanotoxines sont des molécules produites par de nombreux genres de cyanobactéries et qui ne participent pas à la croissance, au développement ou à la reproduction des cyanobactéries. Ainsi, elles sont considérées et classées comme métabolites secondaires (Carmichael, 1992). Les métabolites secondaires des cyanobactéries sont répartis entre plusieurs

genres et à travers différents environnements géographiques. Ils comprennent une gamme de composés présentant une menace pour l'environnement écologique et la santé humaine (Dittmann et Wiegand, 2006). Ces composés présentent aussi des propriétés antibactérienne, anticoagulant, antifongique, antiinflammatoire, antipaludéen, antiprotozoaire, antituberculeux, antiviral, antitumoral et des activités cytotoxiques (Carmichael, 2001 ; Gademann et Portmann, 2008 ; Haque et al., 2017 ; Kaplan et al., 2012). À l'heure actuelle, de nombreuses cyanotoxines n'ont pas encore été identifiées. En outre, la plupart des cyanotoxines ne sont pas extracellulaires et la grande majorité des toxines produites sont intracellulaires et un faible pourcentage est alors excrété hors des parois (Westrick et al., 2010).

Les cyanotoxines sont classées selon leur mode d'action : les hépatotoxines (foie), neurotoxines (système nerveux) et dermatotoxines (peau) : (aplysiatoxine, lyngbyatoxine-a) et sur la base de leur composition chimique en peptides cycliques (MC et NOD), alcaloïdes (Anatoxine, STX, CYN, aplysiatoxine, lyngbiatoxine-a) et lipopolysaccharides (Kaebernick et al., 2001, Pearson et al., 2010). Les toxines cyanobactériennes ont été largement étudiées, en particulier les MC, les saxitoxines et les cylindrospermopsines. Ces peptides se retrouvent fréquemment dans les proliférations cyanobactériennes (Fastner et al., 2001 ; Welker et al., 2006). Une meilleure compréhension de la production et de la toxicité de ces peptides est essentielle pour évaluer les contrôles environnementaux et les risques liés aux cyanotoxines.

2.2 Classification des cyanotoxines

2.2.1 Peptides cycliques

Un peptide cyclique est une chaîne polypeptidique cyclique formée par une liaison covalente entre les terminaisons amino et les terminaisons carboxyle, les terminaisons amino et la chaîne latérale, les terminaisons carboxyle et la chaîne latérale, ou la chaîne latérale avec une autre chaîne latérale. Les microcystines (MC) et les nodularines (NOD) sont deux peptides cycliques qui sont des toxines cyanobactériennes classiques.

2.2.1.1 Microcystines

Les microcystines (MCs) sont des heptapeptides cycliques (**Figure 2-1**) hépatotoxiques produits principalement par les cyanobactéries appartenant aux genres *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Microcystis*, *Oscillatoria* et *Nodularia* (Hotto et al., 2007 ; WHO, 2003) et leur structure générale est cyclo (-D-Ala-L-X-D-erythro- β -methylAsp-L-Y-Adda-D-Glu-N-

methyldehydro-Ala), dans laquelle Adda est l'acide aminé (3-amino- Acide 9-méthoxy-2,6,8-triméthyl-10-phényl-4,6-diénoïque) commun à toutes les MCs. La présence d'Adda est la principale cause de leur toxicité due à un diène conjugué (Catherine et al., 2017 ; Dawson, 1998 ; Jurczak et al., 2004).

Les microcystines sont des inhibiteurs puissants de l'activité des protéines phosphatases eucaryotes de types 2A et 1, conduisant à une accumulation de protéines phosphorylées dans les cellules qui peut affecter par la suite les différentes voies métaboliques. L'intoxication aiguë par les MCs peut entraîner la lyse cellulaire, la promotion des tumeurs et la mort rapide pour les humains et les animaux (Chorus et Bartram 1999 ; Dawson, 1998 ; Gupta et al., 2003 ; Merel et al., 2013).

Les microcystines sont les cyanotoxines les plus étudiés et les plus fréquemment rencontrées dans les milieux aquatiques (Zurawell et al., 2005). À ce jour, 246 congénères de MCs différents ont été identifiés, et la toxicité des MCs a été démontrée dans 79 pays (Buratti et al., 2017 ; Spoof et Catherine, 2017). La différence la plus importante entre les congénères est due à la variation des acides aminés dans les positions deux et quatre de la molécule de microcystine (**Figure 2-1**). Les microcystines sont aussi potentiellement plus mortelles pour les vertébrés et de nombreuses espèces de poissons (Lazar et al., 2016). En outre, la présence des acides aminés méthylés dans la molécule facilite la pénétration de MC dans les tissus qui peuvent entraine des effets toxiques croissants (Zurawell et al., 2005).

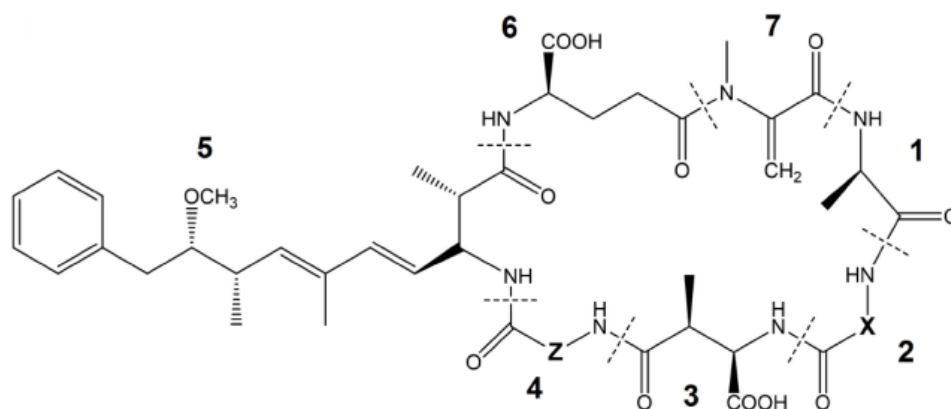


Figure 2-1. Structure moléculaire des microcystines : 1 = D-Ala, 2 = X (variable), 3 = D-MeAsp, 4 = Z (variable), 5 = Adda, 6 = D-Glu et 7 = Mdha (Altaner et al., 2019).

Les acides aminés les plus communs à la position X sont la leucine (L), l'arginine (R) et la tyrosine (Y), alors qu'à la position Z on retrouve généralement l'arginine (R), l'alanine (A) et la méthionine (M) (Svrcek et Smith, 2004).

2.2.1.2 Nodularines

Les nodularines (NODs) sont des hépatotoxines produites par *Nodularia spumigena*. On peut les retrouver dans des eaux saumâtres et dans les lacs estuariens en Australie et en Nouvelle-Zélande et dans la mer Baltique en Europe durant l'été (Beattie et al., 2000). Des études antérieures ont démontré que les NODs produites par les cyanobactéries n'avaient été trouvées que dans les cyanobactéries genre de *Nodularia* (Buratt et al., 2017), mais des recherches récentes ont démontré que l'*Iningainema pulvinus* gen nov., Sp nov. (Cyanobactéries, Scytonemataceae) est un nouveau producteur de nodularine. Elle a été isolée d'une zone humide printanière d'eau douce dans le nord-est de l'Australie tropicale (McGregor et Sendall, 2017). À ce jour, dix congénères de NODs ont été caractérisés (Spoof et Catherine, 2017).

La structure des NODs est similaire à celle des microcystines, à savoir acide D-glutamique, N-méthyldehydrobutyrine, acide D-érythro-méthylaspartique et L-arginine (**Figure 2-2**) (Buratt et al., 2017). En outre, le groupement Adda et l'acide glutamiques sont responsables de la toxicité des NODs comme pour les MCs (Pearson et al., 2010). Elles ont également les mêmes effets hépatotoxiques par inhibition des phosphatases protéiques que les MCs (Gehring et al., 2012). En raison du manque de données d'exposition humaine à l'ingestion de *Nodularia spumigena*, les NODs ne peuvent pas être classées selon leur cancérogénicité pour l'homme (Humans, 2010 ; Jurczak et al., 2004). Néanmoins, elles peuvent être considérées comme présentant au moins le même risque pour la santé humaine que les microcystines en cas d'ingestion d'eau potable contaminée (Beattie et al., 2000).

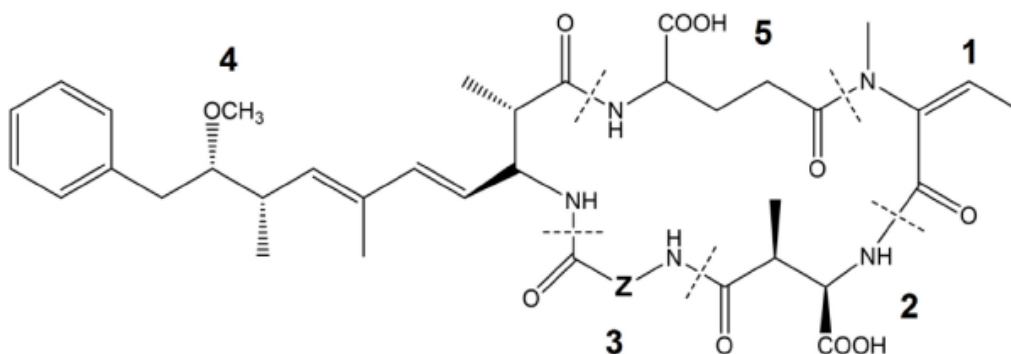


Figure 2-2. Structure moléculaire des nodularines : 1 = Mdhb, 2 = D-MeAsp, 3 = Z (variable), 4 = Adda et 5 = D-Glu (Boopathi et Ki, 2014).

2.2.2 Alcaloïdes

Les cyanotoxines alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées basiques de structures très variées, avec des propriétés toxiques toutes aussi diverses. Six cyanotoxines alcaloïdes sont discutées ici, y compris les cylindrospermopsines (CYN), les saxitoxines, l'anatoxine-a, l'anatoxine-a (s), les lyngbyatoxines et les aplysiatoxines.

2.2.2.1 Anatoxine-a

L'anatoxine-a (ANA-a) est un alcaloïde bicyclique neurotoxique, nommée 2-acétyl-9-azabicyclo (4,2,1) non-2-ène (**Figure 2-3**) (Devlin et al., 1977). Elle a été isolée pour la première fois des genres de cyanobactéries *Anabaena flos-aquae* dans les années 1970 et aussi définie structurellement par cristallographie aux rayons X et confirmée par RMN-1H (Devlin et al., 1977). Cette neurotoxine a quatre congénères dont ANA-a, homoANA-a, dihydroANA-a et dihydrohomoANA-a (Wood et al., 2018). L'ANA-a peut-être produite par de nombreux genres cyanobactériens, tels que *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Arthrospira*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermum*, *Dolichospermum*, *Oscillatoria* et *Phormidium* (Namikoshi et al., 2003 ; Salmaso et al., 2017 ; Wood et al., 2018).

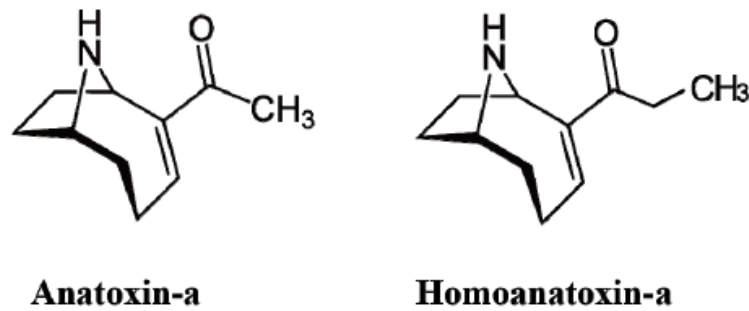


Figure 2-3. Structure moléculaire de l'anatoxine-a et de l'homoanatoxine-a (Boopathi et Ki, 2014).

L'ANA-a est une toxine stable en milieu acide ($\text{pH} < 3$) et instable dans des conditions de lumière et de pH élevé. Elle se dégrade en deux métabolites non toxiques : le dihydroanatoxine-a et l'époxyanatoxine-a (James et al., 1998). De plus, des concentrations élevées d'ANA-a peuvent induire une paralysie du système nerveux et entraîner la mort par asphyxie (Fawell et al., 1999).

L'HomoANA-a est un puissant analogue d'ANA-a, formé suite à la méthylation du carbone à l'extrémité de la fonction cétone (**Figure 2-3**) (Hiller et al., 2007). Cette toxine est un agent de blocage neuromusculaire qui augmente le flux d'ions Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses cholinergiques (Van Apeldoorn et al., 2007). Des dérivés moins toxiques incluent les 4*S* et 4*R* hydroxyhomoanatoxine-a, la cétohomoanatoxine-a, la dihydrohomoanatoxine-a, l'hydrométhoxyhomoanatoxine-a et la 2,3-époxyhomoanatoxine-a (Hiller et al., 2007 ; Namikoshi et al., 2004).

2.2.2.2 Anatoxine-a(s)

L'anatoxine-a(s) (ANA-a(s)) est un alcaloïde neurotoxique apparentée à ANA-a qui est également un ester de méthylphosphate de guanidinium unique (Van Apeldoorn et al. 2007). Elle est produite par *Anabaena flos-aquae* et *Abanaena lemmermannii* (Kaushik et Balasubramanian, 2013) et sa structure a été déterminée comme étant (5*S*)-2-amino-1-((hydroxylméthoxyphosphinyl)oxy)-*N,N*-diméthyl-4,5-dihydro-1*H*-imidazole-5-méthanimine (**Figure 2-4**) (Testai et al., 2016). ANA-a(s) est également un composé organique similaire aux insecticides organophosphorés et carbamates (Mahmood et Carmichael, 1986). Elle peut induire une paralysie musculaire causant potentiellement la mort par asphyxie (Matsunaga et al., 1989 ; Merel et al., 2013).

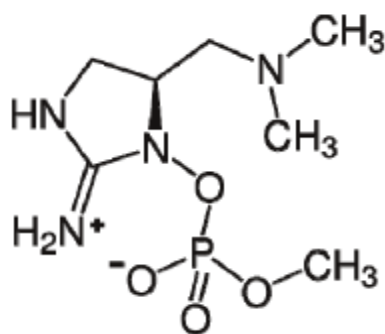


Figure 2-4. Structure moléculaire de l’anatoxine-a(s) (Testai et al., 2016).

2.2.2.3 Saxitoxines

Les STXs sont des alcaloïdes neurotoxiques puissants détectés à l’échelle globale et qui sont produits par *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Fischerella*, *Geitlerinema*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis*, *Scytonema* et *Tolypothrix* (Batsalova et al., 2019 ; Belykh et al., 2016 ; Buratti et al., 2017 ; Salmaso et al., 2017 ; Valério et al., 2010 ; Wiese et al., 2010). La saxitoxine est une toxine très stable et soluble dans l’environnement (Llewellyn, 2006) et sa structure est composée d'un système tricyclique 3,4-perhydropurine avec deux groupes guanidinium (**Figure 2-5**) (Wong et al., 1971). Plus de 50 dérivés de STXs ont été décrits jusqu’à présent (Wiese et al., 2010) et les variantes de sa famille se regroupent en formes non-sulfatées (STX et la néosaxitoxine (neoSTX)), mono-sulfatées (gonyautoxines ou GTXs) et di-sulfatées (C-toxines), les analogues qui ne possèdent pas de carbamate (dcSTX) et les analogues qui sont nommés en fonction de l’espèce *Lyngbya wollei* (LWTX) (Hiller et al., 2007 ; Merel, 2013). Ces toxines inhibent les canaux sodiques présents dans les membranes cellulaires nerveuses et ainsi les influx nerveux. Elles font partie du groupe des PSPs (*Paralytic Shellfish Poisons*) puisqu’elles sont produites principalement par des micro-organismes marins (Hall et al., 1990). La STX a été utilisée dans les armes chimiques et est l'une des toxines les plus mortelles (Ember, 1998). Elles causent environ 2 000 cas annuels d'empoisonnement paralytique aux mollusques dans le monde, avec un taux de mortalité de 15% (Hallegrae, 1995).

Toxine	Groupes fonctionnels variables des STXs				
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
STX	H	H	H	CONH ₂	OH
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	OH
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH
GTX5	H	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	OH
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃ ⁻	OH
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
neoSTX	OH	H	H	CONH ₂	OH
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	OH
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂	OH
GTX6	OH	H	H	CONHSO ₃ ⁻	OH
dcSTX	H	H	H	H	OH
dcneoSTX	OH	H	H	H	OH
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H	OH
dcGTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	H	OH
LWTX1	H	OSO ₃ ⁻	H	COCH ₃	H
LWTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	COCH ₃	OH
LWTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	COCH ₃	OH
LWTX4	H	H	H	H	H
LWTX5	H	H	H	COCH ₃	OH
LWTX6	H	H	H	COCH ₃	H

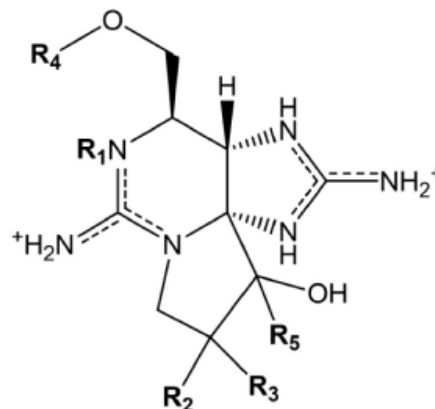


Figure 2-5. Structure moléculaire des saxitoxines (Hiller et al., 2007).

2.2.2.4 Cylindrospermopsine

La cylindrospermopsine (CYN) est une hépatotoxine alcaloïde qui a été signalée pour la première fois en 1979 lors d'un épisode d'hépatointérite causée par une floraison de *Cylindrospermopsis* à Palm Island en Australie (Bourke et al., 1983). Elle est formée d'un groupe guanidine tricyclique combiné avec l'hydroxyméthyluracile (**Figure 2-6**) (Hinojosa et al., 2019a) et sa structure chimique a été identifiée pour la première fois en 1992 (Ohtani et al., 1992). Il existe cinq analogues connus de la CYN à ce jour : la CYN, la 7-désoxydesulfo-CYN, la 7-désoxydesulfo-12-acétyl-CYN, la 7-épi-CYN, et la 7-désoxy-CYN (Kokocinski et al., 2017).

Les CYNs sont produits par diverses cyanobactéries, dont *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Raphidiospis curvata*, *Anabaena bergii*, *Chrysoosporum*, *Cylindrospermopsis* et *Oscillatoria* (Pearson et al., 2010 ; Pearson et al., 2016). Elles se trouvent principalement dans l'eau douce et l'eau de mer dans les zones climatiques tropicales, subtropicales et tempérées (Pearson et al., 2016 ; Van Apeldoorn et al., 2007).

La CYN est une toxine qui cible principalement le foie, mais aussi a des effets cytotoxiques et neurotoxiques et peut ainsi interférer dans plusieurs voies métaboliques (Hinojosa et al., 2019a, b ; Kiss et al., 2002). Des études de bioaccumulation de

cylindrospermopsine dans les mollusques et poissons ont démontré que cette toxine est concentrée dans les tissus de ces espèces en contact avec la toxine (Saker et al., 2004).

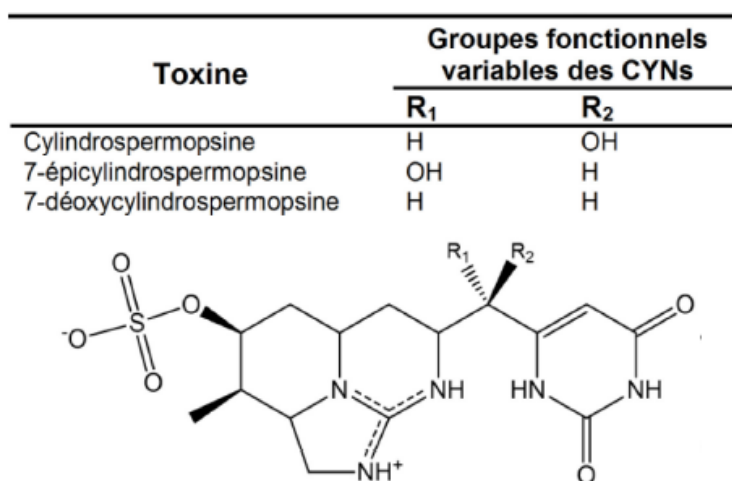


Figure 2-6. Structure moléculaire des cylindrospermopsines (Hiller et al., 2007).

2.2.2.5 Lyngbyatoxine

La lyngbyatoxine est un alcaloïde dermatotoxique et sa structure est composée d'un cycle indolactame, avec un groupe latéral linalyle attaché en C-7 (**Figure 2-7**) (Cardellina et al., 1979). Les lyngbyatoxines sont produites par la souche *Lyngbya majuscula* et elles ont été identifiées pour la première fois en 1979 dans le milieu marin (Cardellina et al., 1979 ; van Apeldoorn et al., 2007). À ce jour, sept variantes de lyngbyatoxine ont été décrites, à savoir la lyngbyatoxine AC, la 12-épi-lyngbyatoxine A, la 2-oxo-3 (R) -hydroxy-lyngbyatoxine A, la 2-oxo-3 (R) -hydroxy- 13-N -desméthyllyngbyatoxine A et la 2,3-seco-2,3-dioxolyngbyatoxine A (Aimi et al., 1990 ; Cullen et al., 2019 ; Youssef et al., 2015).

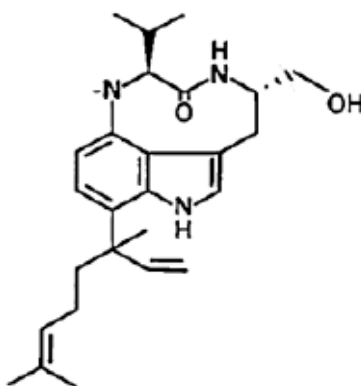


Figure 2-7. Structure moléculaire de la lyngbyatoxine (Du et al., 2019).

Les lyngbyatoxines sont des toxines avec des effets irritants et inflammatoires (Fujiki et al., 1981). De plus, elles ont été signalées comme un agent causal de l'empoisonnement des tortues marines (Cardellina et al., 1979 ; Ito et al., 2002) et sont également considérées comme un promoteur tumoral efficace qui induit l'activité de la protéine kinase C (Jiang et al., 2014).

2.2.2.6 Aplysiatoxine

L'aplysiatoxine est une cyanotoxine alcaloïde dermatotoxique (Van Apeldoorn et al., 2007) et sa structure est constituée de bislactones d'acide 3,4-dihydroxyvalérique et d'acide 4,6,6,10,12-pentaméthyl-3,7,9,11,15-tétraoxy-15-phénylpentadécanoïque (**Figure 2-8**) (Kato et al., 1974). Les aplysiatoxines sont produites par les cyanobactéries marines *Lyngbya majuscula* dans les climats tropicaux et subtropicaux (Youssef et al., 2015). Jusqu'à présent, cinq variantes de l'aplysiatoxine ont été décrites à savoir l'aplysiatoxine, la debromo-aplysiatoxine, l'anhydro-aplysiatoxine, la méthoxydebromo-aplysiatoxine, l'oscillatoxine A et la 31-noroscillatoxine B (Ding et al., 2018).

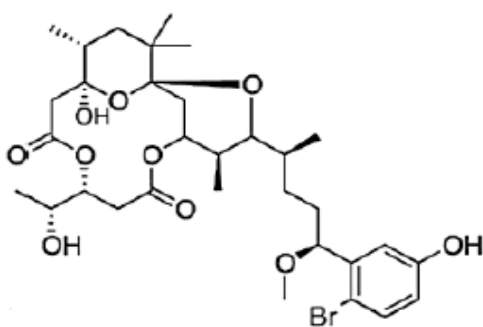


Figure 2-8. Structure moléculaire de L'aplysiatoxine (Du et al., 2019).

L'aplysiatoxine entraîne une dermatite par l'activation de la protéine kinase C et est aussi considérée comme un puissant promoteur de tumeurs cutanées (Fujiki et al., 1985 ; Pearson et al., 2016). De plus, elle induit l'expression du provirus latent du VIH-1 dans les modèles de lignée cellulaire et de cellules primaires (Richard et al., 2018).

2.2.3 Acides aminés non-protéinogènes

L'acide aminé non-protéinogène β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) est un composé bioactif neurotoxique excitotoxique produit par la plupart des genres de cyanobactéries nuisibles (Cox et al., 2005). Le BMAA est fréquemment détecté dans les souches d'espèces cyanobactériennes appartenant à *Anabaena*, *Calothrix*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Synechococcus* et *Trichodesmium* (Rodgers et al., 2018).

Le BMAA a été identifié pour la première fois en 1967 dans des graines de *Cycas circinalis* sur l'île de Guam (Bradley et al., 2009 ; Vega et al., 1967). Il est composé de carbone avec un groupement carboxyle, une amine secondaire et une méthylamine dans la chaîne latérale (**Figure 2-9**) (Buratti et al., 2017 ; Vega et Bell, 1967). Sept isomères du BMAA ont été identifiés, dont le β -amino-*N*-méthylalanine (BAMA), l'acide 2,4-diaminobutyrique (2,4-DAB), la *N*-2-aminoéthylglycine (AEG), l'acide 2,3-diaminobutanoïque, l'acide 3,4-diaminobutanoïque, l'acide 3-amino-2-(aminométhyle) propanoïque et l'acide 2,3-diamino-2-méthylpropanoïque (**Figure 2-9**) (Jiang et al., 2012 ; Banack et al., 2018).

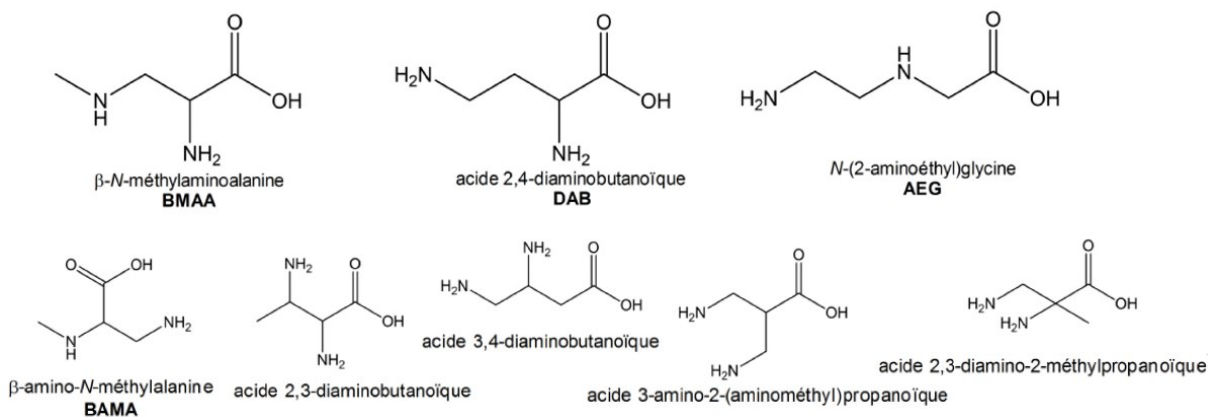


Figure 2-9. Structure moléculaire du β -amino-*N*-méthylalanine (BAMA) et de ses isomères (Jiang et al., 2012).

Le BMAA est une molécule très stable qui agit essentiellement sur les neurones moteurs en se fixant sur les récepteurs glutamates et induit un effet excitotoxique. De plus, le BMAA pourrait causer un mauvais repliement des protéines intra-neuronales (Lobner et al., 2007 ; Merel et al., 2013 ; Pablo et al., 2009) et peut facilement bioaccumulée dans certaines parties de végétaux (racines, fruits et graines) (Cox et al., 2005).

2.2.4 Lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) ou les lipoglycanes sont de larges endotoxines produites par plusieurs cyanobactéries telles que *Agmenellum*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Schizothrix* et *Spirulina* (Durai et al., 2015). Elles sont des composantes majeures de la membrane externe cellulaire cyanobactérienne et elles sont constituées d'un lipide et d'un polysaccharide (Kehr et Dittmann, 2015).

La structure du LPS est constituée d'une chaîne polysaccharidique externe (antigène), d'un domaine central (un oligosaccharide) et d'un glycolipide acylé interne (lipide-A) qui est le responsable de la toxicité des LPS (**Figure 2-10**) (Funari et Testai, 2008 ; Stewart et al., 2006). La toxicité du LPS d'origine cyanobactérienne est moins grande que celle des bactéries hétérotrophes. Les LPS d'origine cyanobactérienne peuvent cependant provoquer ou contribuer à une maladie humaine comme des réactions allergiques épidermiques, les inflammations de la peau, les problèmes gastro-intestinaux, les maladies respiratoires, la fièvre et les maux de tête (Durai et al. 2015 ; Rapala et al., 2002).

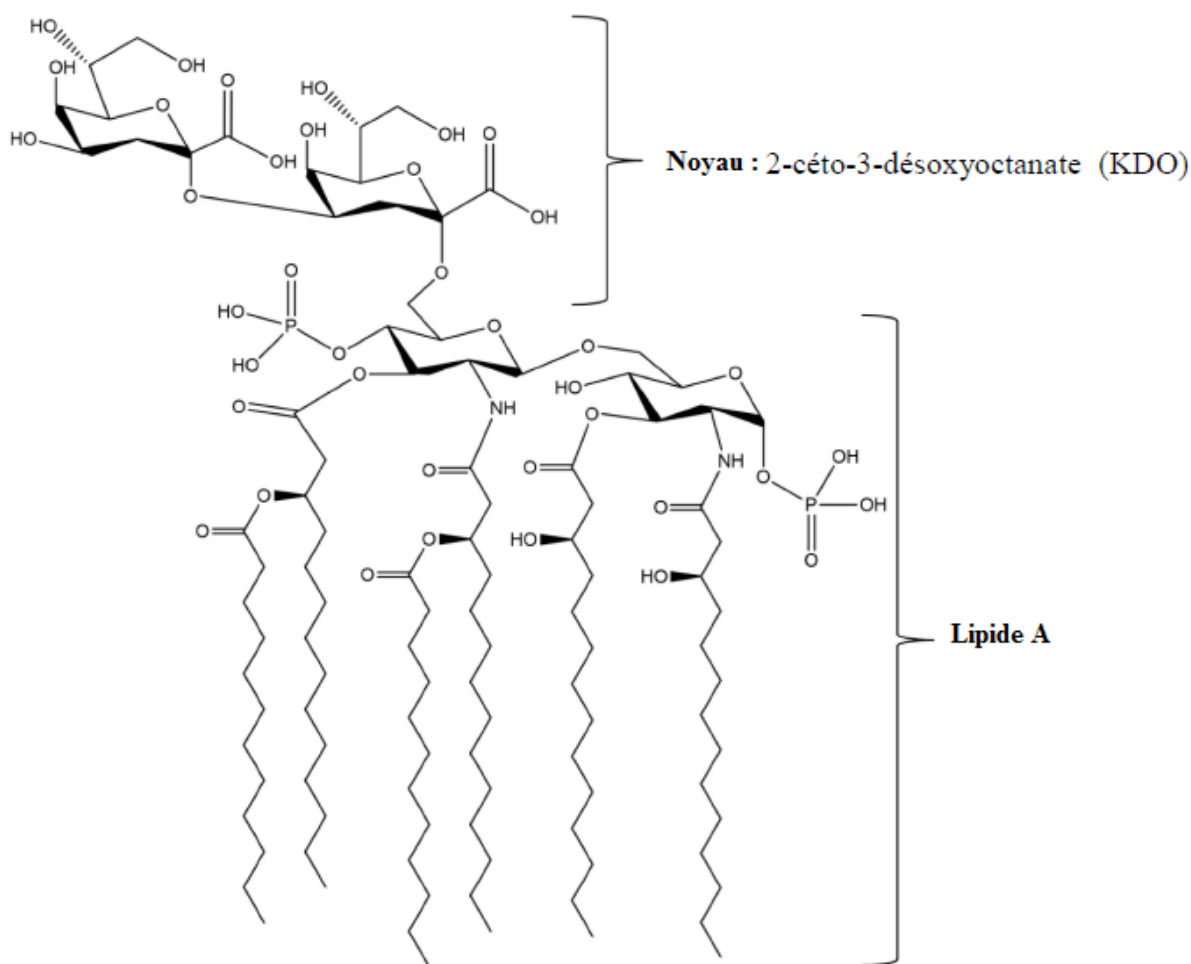


Figure 2-10. Structure moléculaire des lipopolysaccharides (Wiegand et Pflugmacher, 2005).

2.2.5 Lipopeptides

Les lipopeptides constituent un groupe structurellement divers de métabolites produits par divers genres de micro-organismes y compris les cyanobactéries. Ces composés possèdent

des chaînes aliphatiques et des chaînes peptidiques, qui ont des activités biologiques polyvalentes. Nous présentons dans cette partie les sept cyanotoxines lipopeptidiques d'origine marines (Du et al., 2019).

2.2.5.1 Antillatoxines

L'antillatoxine (ATX) est une neurotoxine lipopeptidique produite par la cyanobactérie marine *Lyngbya majuscula* dans les régions tropicales et subtropicales (Osborne et al., 2001). La structure de cette toxine a été déterminée par RMN tridimensionnelle et qui se compose d'un tripeptide glycine-N-méthylvaline-alanine, d'un acide hydroxycarboxylique et d'un 9-tert-butyl-6,8-diméthyl-6,8-diène lié à l'atome C5 du squelette du peptide cyclique (INOUE, 2014 ; Li et al., 2004 ; Orjala et al., 1995). L'ATX a trois structures analogues : l'antillatoxine A (Orjala et al., 1995), l'antillatoxine B (8-déméthyl-antillatoxine) et la DH-ATX (8-déméthyl-8,9-dihydro-antillatoxine) (**Figure 2-11**) (Cao et al., 2010 ; Nogle et al., 2001). L'antillatoxine est une neurotoxine très puissante (Orjala et al., 1995) qui active les canaux sodiques voltage-dépendants provoquant un afflux de sodium dans les neurones des granules cérébelleux et les neurones cérébrocorticaux (Jabba et al., 2010 ; Nogle et al., 2001). Elle a aussi un effet cytotoxique pour des cellules de neuroblastome de souris Neuro 2a (Okura et al., 2013).

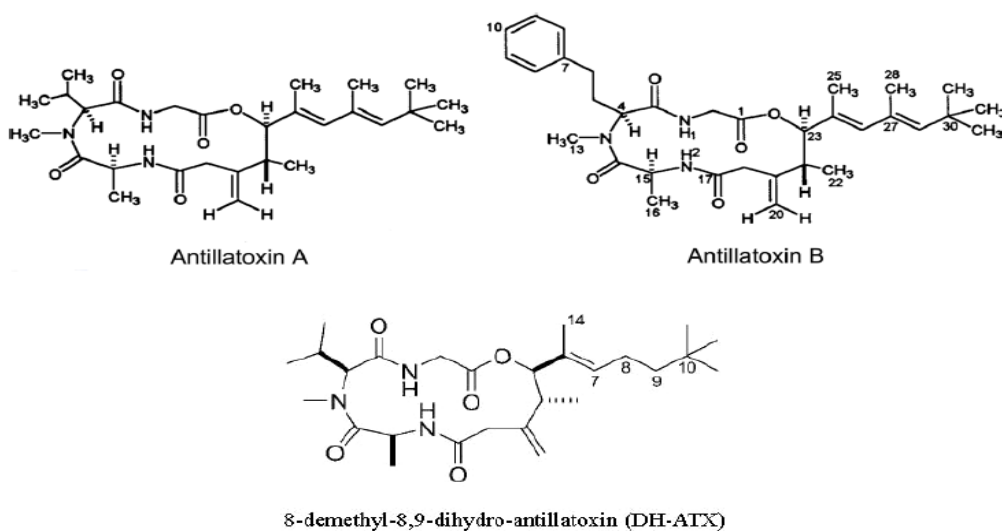


Figure 2-11. Structure d'antillatoxine A et ses isomères (Cao et al., 2010 ; Nogle et al., 2001).

2.2.5.2 Jamaicamides

Les jamaicamides sont des neurotoxines lipopeptidiques isolées de la cyanobactérie *Lyngbya majuscula*. Ces toxines possèdent un bromure d'alcynyle, du chlorure de vinyle, un système -méthoxy énéone et un cycle pyrrolinone. Un programme de dépistage des composés bioactifs des cyanobactéries marines *Lyngbya majuscula* en 2004 a conduit à l'isolement des trois jamaicamides A, B et C (**Figure 2-12**) (Edwards et al., 2004). Ces toxines diffèrent entre elles par des variations à l'extrémité de leurs chaînes aliphatiques polycétides (Edwards et al., 2004 ; Graf et al., 2009). Trois autres analogues appelés jamaicamides D – F (**Figure 2-12**) ont été trouvés dans l'extrait brut de cyanobactéries marines *Lyngbya majuscula* en 2015 (Boudreau et al., 2015). Ces jamaicamides ont présenté une cytotoxicité sur les lignées cellulaires de neuroblastome de poumon humain H-460 et de souris Neuro-2a (Edwards et al., 2004). Ces composés présentent également une activité de blocage des canaux sodiques dans les neurones néocorticaux, la toxicité des arthropodes et des poissons (Boudreau et al., 2015 ; Edwards et al., 2004 ; Pearson et al., 2016).

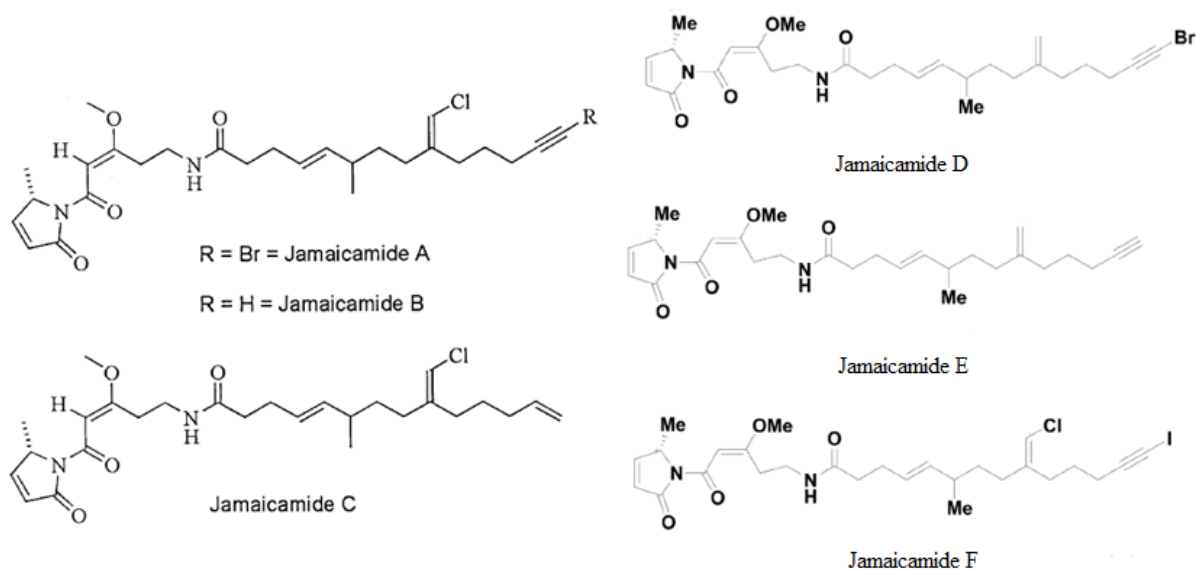


Figure 2-12. Structure de Jamaicamide A et ses analogues (Boudreau et al., 2015 ; Edwards et al., 2004).

2.2.5.3 Kalkitoxines

La kalkitoxine (KTX) est un lipopeptide neurotoxique produit par la cyanobactérie marine pantropicale *Lyngbya majuscula* (Wu et al., 2000). Ces produits sont biologiquement actifs et possédant une valeur médicinale potentielle. La structure des kalkitoxines est unique et

contient une thiazoline 2,4-disubstituée, une chaîne lipophile et une unité CH₂=CH₂ insaturée (Araoz et al., 2010). La structure de la KTX et de ses six isomères 3-épi-kalkitoxine, 7-épi-kalkitoxine, 8-épi-kalkitoxine, 10-épi-kalkitoxine, 10-ni-kalkitoxine et 16-ni-kalkitoxine (**Figure 2-13**) a été déterminée au moyen d'analyses RMN (Umezawa et al., 2012). Les kalkitoxines (KTXs) sont des toxines puissantes et son mécanisme de neurotoxicité implique un effet sur les neurones des granules cérébelleux qui est arrêtée par les antagonistes des récepteurs N-méthyl-d-aspartate (NMDA) non compétitifs (Berman et al., 1999). Les kalkitoxines présentent également des effets antiprolifératifs dans les cellules HepG2 et bloquent fortement des canaux sodiques sensibles à la tension dans les cellules neuro-2a de murines (Wu et al., 2000). De plus, les kalkitoxines ont une neurotoxicité qui influence sur les mitochondries et les canaux sodiques de l'homme (Morgan et al., 2015).

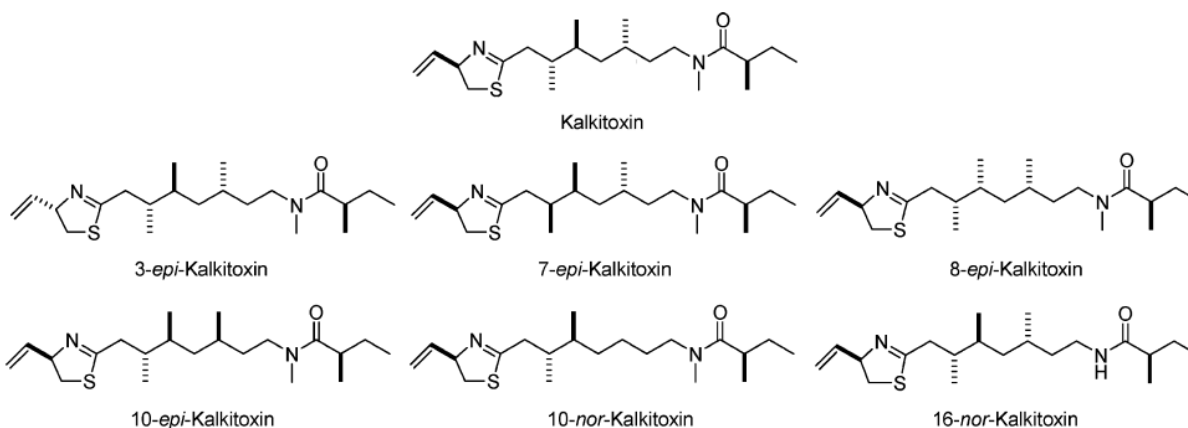


Figure 2-13. Structure de Kalkitoxine et ses congénères (Umezawa et al., 2012).

2.2.5.4 Barbamides

La barbamide (Bar) est un lipopeptide chloré qui a été isolé des cyanobactéries marines *Lyngbya majuscula* de Curaçao. Cette toxine présente une activité molluscicide avec une concentration létale absolue de LC₁₀₀ = 10 µg mL⁻¹ contre *Biomphalaria glabrata* (Orjala et Gerwick, 1996). L'activité biologique du barbamide et ses caractéristiques structurales sont uniques telles qu'un groupe trichlorométhyle et l'éther de méthylénol d'un β-cétoamide. Sa structure a été déterminée par des techniques spectroscopiques tel que La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) (**Figure 2-14**) (Sitachitta et al., 2000).

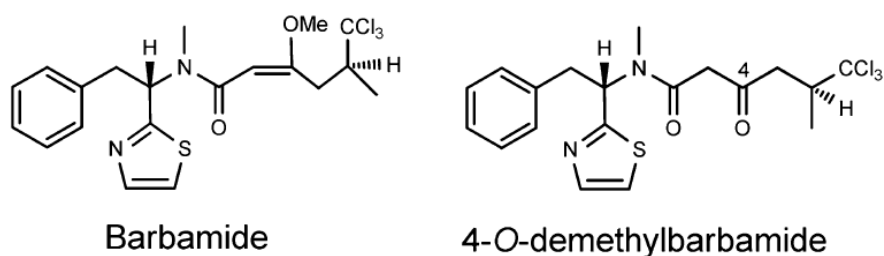


Figure 2-14. Structure de barbamide et son analogue (Kim et al., 2012).

2.2.5.5 Majusculamides

Les majusculamides (MJS) (**Figure 2-15**) ont été isolés des cyanobactéries marines *Lyngbya majuscula* pour la première fois en 1977 (Marner et al., 1977). Ces composés naturels possèdent une partie dipeptide comprenant du N, O-diméthyl-D-tyrosine et du N -méthyl-L-valine, avec une amide primaire C-terminal (Nakajima et al., 2019). Les majusculamides A et B sont des constituants cytotoxiques avec des variétés productrices de dermatite et de non-dermatite (Marner et al., 1977). La majusculamide C (MJS-C) est un depsipeptide cyclique antifongique fortement cytotoxique (Carter et al., 1984). La majusculamide D (MJS-D) et la déoxymajusculamide D (**Figure 2-15**) sont des lipopentapeptides cytotoxiques qui sont des constituants mineurs d'une variété d'eau profonde des cyanobactéries *Lyngbya majuscula* (Caro-Diaz et al., 2019 ; Moore et al., 1988).

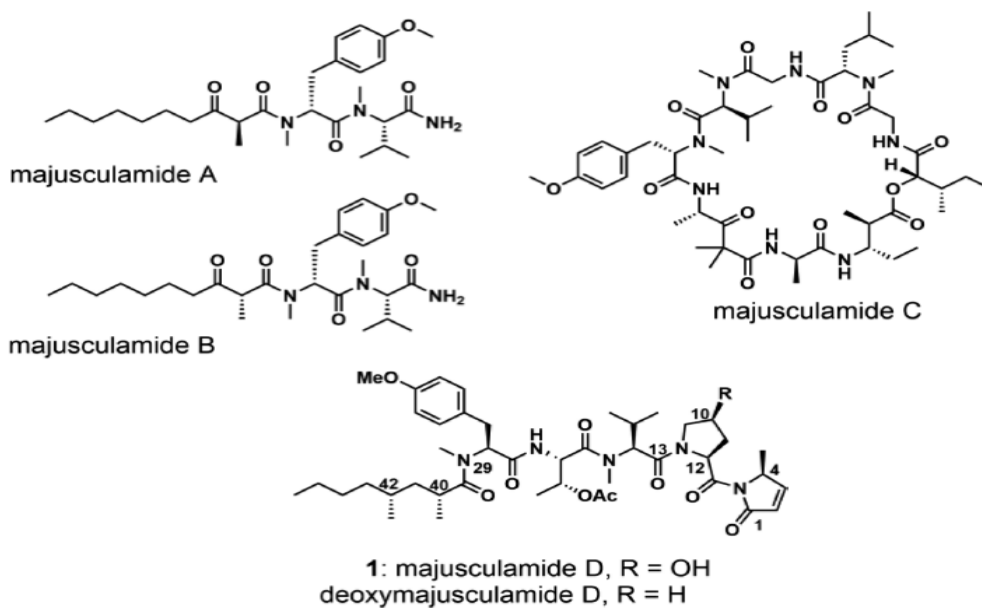


Figure 2-15. Structure du majusculamide D (MJS-D) et analogues apparentés (Caro-Diaz et al., 2019).

2.2.5.6 Hectochlorins

L'hectochlorine (Hct) est un lipopeptide qui a été isolé pour la première fois à partir de cyanobactéries marines *Lyngbya majuscula* de la Hector Bay, en Jamaïque. Il a ensuite été isolé à nouveau de *Lyngbya majuscula* de la plage de Boca del Toro, au Panama (Cetusic et al., 2002 ; Marquez et al., 2002). Sa structure plane a été déterminée par des analyses RMN (1D et 2D) et MS, et sa configuration absolue a été déduite par cristallographie aux rayons X (Marquez et al., 2002). L'hectochlorine a trois analogues Hectochlorin B (HctB), C (HctC) et D (HctD) (**Figure 2-16**) (Boudreau et al., 2015). L'hectochlorine est un puissant promoteur de la polymérisation de l'actine et possède des propriétés antifongiques et cytotoxiques remarquables (Cetusic et al., 2002 ; Ramaswamy et al., 2007). Structurellement, elle ressemble aux lyngbyabellines A et B (Marquez et al., 2002).

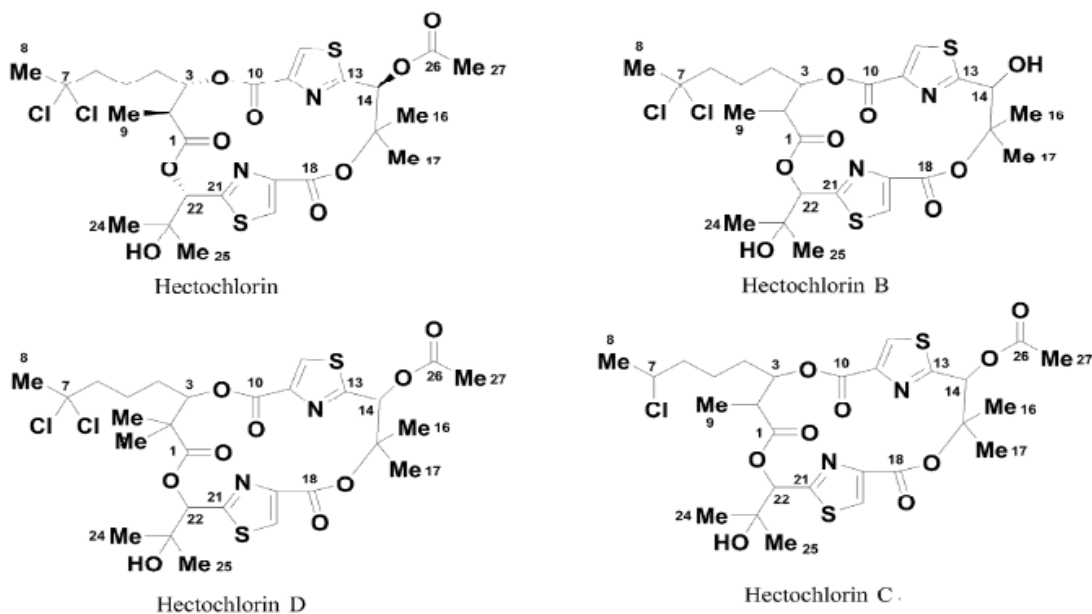


Figure 2-16. Structures d'hectochlorine et ses analogues (Boudreau et al., 2015).

2.2.5.7 Curacines

La curacine A (CurA) est un produit naturel lipopeptidique isolé de cyanobactéries marines tropicales *Lyngbya majuscula*, recueilli dans les Caraïbes au large de la côte de Curaçao en 1994 (Burja et al., 2002). Sa structure planaire a été déterminée à partir d'une étude spectroscopique (Nagle et al., 1995). Elle possède une unité thiazoline 2,4-disubstituée, un cyclopropane chiral, une longue chaîne aliphatique comprenant 4 liaisons doubles carbone-carbone et un groupement méthoxy. Les curacines B (CurB) et C (CurC) constituent des

isomères géométriques de la curacine A (**Figure 2-17**) et ont été isolées d'une collection Curagao de *Lyngbya majuscula* (Yoo et Gerwick, 1995). La curacine D (CurD) a été isolée de la cyanobactérie marine *Lyngbya majuscula* d'une collection des îles Vierges. Sa structure a été élucidée par les analyses de RMN multidimensionnelle, la GC / MS et des comparaisons avec la CurA (**Figure 2-17**) (Márquez et al., 1998 ; Zhang et al., 2017). La curacine E est un congénère de la curacine A (**Figure 2-17**), elle a été isolée de cellules d'*Ophiocoma scolopendrina* recueillies au récif de Kabira sur l'île d'Ishigaki. Sa structure a été étudiée par interprétation des données RMN et du spectre ECD qui ont montré que la CurE a une extrémité éthylcarbonyle dans sa chaîne latérale (Ueoka et al., 2016). Les curacines présentent une forte cytotoxicité contre la leucémie murine L-1210 et les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt CA46 humain (Blokhin et al., 1995 ; Hamel et al., 1995), antitubulines du site de colchicine (Wipf et al., 2004), antiprolifératif qui arrêtent la mitose par l'inhibition de la polymérisation de la tubuline, ce qui conduit à empêcher la formation de la paroi cellulaire essentielle à la division cellulaire (Chang et al., 2004 ; Gerwick et al., 1994). De plus, les curacines ont montré une grande activité cytotoxique pour prévenir le cancer du sein, du rein et du colon (Fiers et al., 2016 ; Wipf et al., 2004).

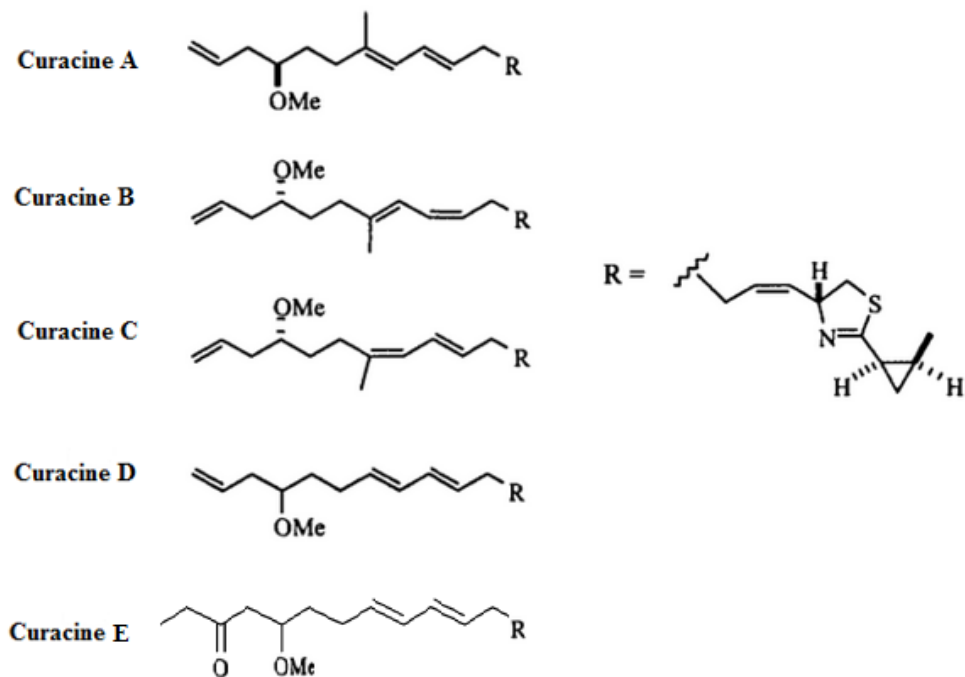


Figure 2-17. Structure de la curacine A et ses isomères (Gerwick et al., 1994 ; Ueoka et al., 2016).

Chapitre 3. Techniques d'analyse des cyanotoxines

3.1 Mise en contexte

Plusieurs méthodes d'analyses et instrumentation ont été développées ces dernières années pour l'évaluation des cyanotoxines dans diverses matrices. Ces méthodes sont résumées dans la SI (**Tableau S5-7**). Ces méthodes sont souvent de type immunologique ou physicochimique et ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients (Kaushik et Balasubramanian, 2013). Malgré les progrès considérables de ces méthodes, la présence des cyanotoxines à des concentrations relativement faibles, ainsi que la présence de composés interférants dans des matrices complexes, rendent souvent l'analyse difficile. Il est donc nécessaire d'effectuer préalablement une étape de préparation de l'échantillon qui permet de purifier la matrice et de préconcentrer les analytes d'intérêt afin d'améliorer globalement les performances analytiques. Nous présentons dans ce chapitre les méthodes les plus répandues pour l'analyse de cyanotoxines.

3.2 Méthodes d'extraction

De nombreuses techniques d'extraction dans la SI (**Tableau S5-7**) ont été employées pour extraire les cyanotoxines de différentes matrices complexes comme la chair de poisson (Mohamed et al., 2018 ; Rezaitabar et al., 2017 ; Tokodi et al., 2018 ; Zewde et al. 2018). Le choix de l'une de ces méthodes pour une telle analyse dépend de plusieurs paramètres tels que les composés cibles, la nature de la matrice où se trouvent les composés et la méthode d'analyse disponible. L'extraction et l'enrichissement des composés d'intérêt permettent d'éliminer plusieurs composés interférents qui peuvent engendrer un effet de matrice lors de l'analyse. Généralement, les toxines sont présentes sous deux formes dans les matrices aqueuses, une forme libre dissoute (extracellulaire) et une forme liée (intracellulaire). La fraction dissoute peut être séparée de la fraction cellulaire par filtration ou ultracentrifugation avant l'analyse. Mais, cette partie ne présente pas la totalité des cyanotoxines dans un échantillon. Une lyse cellulaire doit être effectuée pour éclater les cellules et libérer les toxines intracellulaires afin d'évaluer la toxicité totale d'un échantillon. Différentes techniques de lyse de la fraction solide sont utilisées comme le gel-dégel, la lyophilisation et la sonication (Lawton et Edwards, 2001).

Pour les matrices solides comme la chair de poisson, on peut réaliser une lyophilisation suivie d'une sonication en solvant puis une filtration avant application de la méthode d'analyse instrumentale (Nicholson et Burch, 2001).

Pour la quantification des cyanotoxines qui sont présentes à très faibles concentrations dans des échantillons d'eau environnementale ou dans la chair de poisson, une étape de purification et d'enrichissement des analytes d'intérêt peut s'avérer nécessaire avant la procédure analytique choisie. L'extraction sur phase solide (*solid phase extraction*, SPE) est la méthode la plus utilisée qui permet de relever les défis analytiques liés à la préconcentration. Cette méthode repose sur l'affinité entre les analytes cibles présents en phase aqueuse et la phase stationnaire solide. Généralement, le filtrat obtenu après l'étape de filtration d'un échantillon est passé sur une cartouche SPE montée sur une cuve. Dans le cas des matrices solides préalablement extraites avec un solvant, il peut être nécessaire de diluer les extraits avec un volume d'eau approprié avant de procéder à la charge SPE pour éliminer les composés qui peuvent interférer avec l'extraction et l'analyse afin d'assurer une rétention adéquate.

Parmi les principaux types de matériaux utilisés dans les cartouches SPE, on trouve : les sorbants à base de silice avec groupements silanols résiduels ou greffés avec des groupements polaires tels que des diols, des amines ou des nitriles sont des sorbants à phases normales. Ces cartouches à phase normale retiennent les composés analysés via différentes liaisons polaires comme les liaisons des hydrogènes, dipolaires et dipôle-dipôle. Les sorbants à base de silice greffée d'une chaîne alkyle tel l'octadécylsilane (C18) sont préférées pour l'analyse des cyanotoxines (Merel et al., 2013). Ce type de cartouche à phase inverse permet la rétention des composés via des forces de London hydrophobes générées par les chaînes alkyles de l'agent sorbant. Donc on peut obtenir une bonne efficacité d'extraction pour les analytes non polaires ou peu polaires. Le sorbant polymérique de type hydrophile-lipophile (Oasis HLB) est parmi les plus courants. Il est fabriqué à partir d'un rapport spécifique de deux monomères, la N-vinylpyrrolidone hydrophile et le divinylbenzène lipophile. Ce sorbant est idéal pour les analytes acides, basiques et neutres (analgésiques, anti-inflammatoires, stimulants, antibiotiques, antihistaminiques, médicaments psychiatriques, inhibiteurs de corrosion et herbicides) (Nödler et al. 2010), car il est stable à pH 0-14.

Les sorbants à base d'échangeurs d'ions sont des cartouches qui peuvent aussi être utilisées pour les analytes d'intérêts présents sous formes ionisées dans l'échantillon. Ces

cartouches échangeuses d'ions possèdent des supports de silice ou de polymères greffés par des groupements chargés de types acides/bases fortes ou faibles comme NR_3^+ , NHR_2^+ , COO^- et SO_3^- . Généralement, l'étape de l'élution des composés retenus sur les cartouches se fait avec un solvant organique, tel que le méthanol (MeOH) acidifié ou basifié, conformément aux composés étudiés. La SPE peut s'effectuer manuellement qui permet de concentrer et purifier l'échantillon de manière séparée pour ensuite être injecté dans un système d'analyse (Petrović et al., 2005). Cette technique permet l'analyse des analytes à faible concentration de l'ordre de ng L^{-1} grâce à un facteur de préconcentration élevé. Elle a été utilisée le type de cartouche *HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance*, ou équilibre hydrophile/lipophile) pour l'extraction de la microcystine-LR et de la microcystine-RR dans les matrices de poisson, de légumes et de sol. Cette procédure a donné des récupérations de MC-LR et MC-RR variant de 93 à 98% (Manubolu et al., 2018).

L'extraction en phase solide peut aussi être couplée en ligne directement à un système LC-MS/MS (Tagiri-Endo et al., 2009 ; Viglino et al., 2008). Ce système en ligne offre divers avantages, tels que l'automatisation des injections de l'échantillon, l'utilisation de petit volume d'échantillon, l'utilisation de moins de solvant organique, l'augmentation du nombre d'extractions réalisable dans un même intervalle du temps, la minimisation des manipulations de l'échantillon et le fait d'être moins onéreux à long terme (Bayen et al., 2014 ; García-Galán et al., 2010 ; Kampioti et al., 2005). Cette technique a été utilisée pour l'analyse de huit cyanotoxines dans les eaux de prolifération d'algues qui comprennent les microcystines, l'anatoxine-a et la cylindrospermopsine avec un rendement variant de 91 à 101% et des limites de détection de la méthode à des niveaux inférieurs au microgramme par litre de 0.01 à 0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fayad et al., 2015).

3.3 Essais biologiques

Les essais biologiques, sont des méthodes impliquant l'utilisation des cellules, des plantes ou des animaux vivants pour déterminer l'effet biologique ou la toxicité d'une substance comme les cyanotoxines.

3.3.1 Essais biologiques in vivo

Cette méthode repose sur l'injection intra-péritonéale d'un animal (souris) avec les composés d'intérêts qui sont obtenu après une méthode d'extraction et de nettoyage d'une matrice complexe ou de biomasse de cyanobactéries. Les animaux qui subissent cette technique

sont surveillé pendant 24h pour observer les différents symptômes engendrés. Ensuite, les animaux sont tués par un procédé approuvé plus une réalisation d'observation sur le foie et les reins. Les symptômes développés et l'observation post-mortem des tissus permet de déterminer la présence et le type des cyanotoxines. Les résultats de toxicité sont exprimés sous la forme de DL_{50} (dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée dans des conditions d'expérimentation précises), en mg de cellule sèche par kg de souris (Chorus et Bartam 1999). La toxicité est ensuite évaluée en se basant sur les critères suivants : $> 1\ 000$: non toxique ; $500 < x < 1\ 000$: toxicité faible ; $100 < x < 500$: toxicité moyenne ; < 100 : toxicité élevée. Les principaux inconvénients de cette méthode sont un coût élevé, une faible sensibilité, les faux-positifs ou faux-négatifs peuvent apparaître, une non-spécificité et l'utilisation d'un nombre important de souris qui pose de plus en plus question d'un point de vue éthique (Kaushik et Balasubramanian, 2013 ; Merel et al., 2013).

3.3.2 Essais biochimiques

Les essais biochimiques sont des méthodes d'identification basées sur les interactions entre les macromolécules biologiques et les cyanotoxines.

3.3.2.1 Essais d'inhibition enzymatique

Le test d'inhibition des protéines phosphatases (PPIA) est un test *in vitro* utilisé pour mesurer l'effet des inhibiteurs sur l'activité des protéines phosphatases. Les phosphatases protéiques sont hautement conservées chez les eucaryotes et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires (Metcalf et al., 2017). Le test d'origine a utilisé la libération de ^{32}P à partir de substrats marqués, l'inhibition de l'enzyme entraînant une libération réduite de phosphate radioactif (Mackintosh et al., 1990). Cette méthode est sensible, rapide et accessible en raison de la disponibilité commerciale des enzymes. Un certain nombre de composés sont connus pour inhiber les protéines phosphatases, y compris les MC et les NOD qui sont les inhibiteurs des protéines phosphatases de sérine/théorine, responsables de la déphosphorylation des phosphoprotéines intracellulaires de type 1 et 2A (PP1 et PP2A) (Metcalf et al., 2017 ; Pereira et al., 2011). La réaction de la microcystine avec PP1 est environ 50 fois moins sensible que celle de PP2A (Bouaïcha et al. 2002). L'effet des MCs sur les protéines phosphatases est mesuré soit par un test radiochimique, soit par un test spectrophotométrique. Dans la méthode spectrophotométrique l'enzyme protéine phosphatase peut hydrolyser le para-nitrophénylphosphate (PNPP), libérant

du phosphate et produisant du para-nitrophénol, un produit coloré (An et Camichael, 1994). Récemment, la sensibilité du test d'inhibition de la protéine phosphatase PP2A a été amélioré par l'utilisation des substrats fluorescents qui permettent ainsi de détecter de très faibles quantités en MCs de l'ordre du picogramme (Douma et al., 2016).

3.3.2.2 Essais immunologiques

La méthode immuno-enzymatique appelée ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assays*) est une méthode conventionnelle pour l'analyse des cyanotoxines, et a été utilisée pour détecter les MCs, les NODs, les CYNs, les ATXs et les STXs dans les échantillons (Vogiazzi et al., 2019 ; Wharton et al., 2017). Deux types d'anticorps sont utilisés pour les analyses par ELISA, les anticorps monoclonaux, ayant un seul site de reconnaissance et les anticorps polyclonaux, étant un mélange d'anticorps possédant plusieurs sites de reconnaissance (Metcalfe et Codd, 2003). Cette méthode est facile d'effectuer, relativement peu coûteux, et fournissent des estimations semi-quantitatives des concentrations de toxines. En plus, elle peut détecter jusqu'à quelques ng L⁻¹. Cependant, la méthode est moins sélective, susceptible de produire de faux positifs et elle ne peut pas identifier les variantes individuelles des cyanotoxines. L'ELISA est aussi moins précis que les méthodes physicochimiques basées sur la spectrométrie de masse pour la quantification des toxines (Kaushik et Balasubramanian, 2013 ; Nicholson et Burch, 2001 ; Sangolkar et al., 2006 ; Tillmanns et al., 2007).

Plusieurs méthodes d'immunoessais à base d'anticorps ont été développées dans les dernières années pour la détection des cyanotoxines, particulièrement l'immunochromatographie (ICA) (Wu et al., 2019 ; Zhang et al., 2019), l'immunoessai par fluorescence (FIA) et les techniques de biocapteurs (Cunha et al., 2018 ; Zhang et al., 2017). L'immunoessai de polarisation de fluorescence (FPFA) est une méthode immunochimique économique basée sur la différence de polarisation de fluorescence de l'antigène marqué et du complexe analyte-anticorps marqué (Rossi et Taylor, 2011 ; Smith et Eremin, 2008). Le dosage d'immunochromatographie par enzyme à flux latéral (LFICA) couplé à une technique d'empreinte moléculaire a été développé pour la détection rapide de MC-LR dans les produits aquatiques (Wu et al., 2019). Les biocapteurs sont des dispositifs analytiques simple et sensible largement utilisés dans la surveillance de l'environnement, et ils peuvent fournir des informations analytiques quantitatives ou semi-quantitatives sélectives (Bickman et al., 2018).

3.3.2.3 Essais biologiques des récepteurs

Le test biologique des récepteurs est une méthode utilisée pour la détection et la quantification des cyanotoxines notamment l'ATX et les STX dans les crustacés et l'eau (Ruberu et al., 2018). Leur principe est basé sur le mécanisme de certaines toxines qui concurrencent le récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Ce récepteur peut se lier aux spirolides, aux gymnodimines et à d'autres toxines marines (Araoz et al., 2010 ; Vogiazzi et al., 2019). Donc, cette méthode ne peut pas différencier le type spécifique de la toxine. La résolution de ce problème impliquera la conception de récepteurs de cholinestérase spécifiques et sensibles.

3.4 Méthodes physicochimiques

3.4.1 Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique analytique pour la séparation quantitative d'ions. Elle a été utilisée pour les analyses des cyanotoxines notamment les MCs, la CYN, l'ANA-a, et le BMAA. Cette technique a des qualités intrinsèques telles que : la résolution élevée, la composition du tampon électrophorétique simple, le conditionnement du capillaire facile, les séparations d'ions rapides, la consommation d'échantillons et de tampons faible. En plus, on peut utiliser plusieurs types de détecteurs comme l'UV, la fluorimétrie, la conductométrie et la spectrométrie de masse. La technique EC a des inconvénients tels que la robustesse, les limites de détections trop élevées allant autour du mg L^{-1} par exemple les limites de détection de 1 à 4 mg L^{-1} pour une analyse simultanée de la MC-LR, l'ANA-a et la CYN (Baptista et al., 2011 ; Kaushik et Balasubramanian, 2013 ; Morin, 1999 ; Vasas et al., 2004).

3.4.2 Chromatographie gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles, thermiquement stables en phase gazeuse. Le principe physicochimique de cette méthode est basé sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse qui est généralement inerte. La séparation des analytes repose sur la différence d'affinité de ces composés pour la phase mobile et pour la phase stationnaire (Douglas et Barbara, 1961). La GC a été utilisée pour la séparation des cyanotoxines notamment l'anatoxine-a (ANA-a), et les microcystines (MCs) à l'aide d'une dérivation chimique (Kaya et Sano, 1999).

La technique GC a été couplée avec de nombreux détecteurs pour l'analyse des cyanotoxines tels que, la détection par spectrométrie de masse (MS) et la détection par capture d'électrons (ECD). La méthode GC-ECD a été utilisée pour l'analyse d'anatoxine-a et de l'homoanatoxine-a à l'aide d'une dérivation par l'acétylation ou l'alkylation des molécules et leurs limites de détections se retrouvent de 0.1 à 5 ng injectés (Osswald et al., 2007). La méthode GC-MS a aussi été utilisée pour les analyses des microcystines à l'aide de l'oxydation de Lemieux pour la forme d'acide carboxylique MMPB (acide 2-méthyl-3-méthoxy-4-phénylbutyrique) suivie par une dérivation de ce dernier pour obtenir un *composé* estérifié plus volatil qui peut ensuite être analysé par GC (Kaya and Sano, 1999). Cette méthode a une bonne sensibilité, mais le temps de réaction et de préparation d'échantillon est long ce qui rend la méthode fastidieuse (Kaushik et Balasubramanian, 2013 ; Sano et al., 1992). Plusieurs études ont été faites pour améliorer les performances de l'oxydation telles que l'utilisation d'ozone et l'analyse directe du MMPB avec une détection en picomolaire (Harada et al., 1996 ; Msagati et al., 2006).

3.4.3 Chromatographie liquide

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou *liquid chromatography* (LC) est une technique analytique séparative permettant de séparer les analytes avant leur détection (Skoog et al., 2003). Elle a été utilisée en analyse quantitative, qualitative et employée dans des domaines variés tels que la toxicologie et la biochimie. Elle est l'approche séparative la plus utilisée pour la détermination des cyanotoxines. Le principe de séparation de cette méthode repose sur les interactions que peuvent avoir les composés à séparer (solutés) avec la phase liquide qui représente la phase mobile et la phase stationnaire de la colonne chromatographique (Skoog et al., 2003). Le mélange à analyser est injecté à petit volume (μL) dans une colonne chromatographique remplie d'une phase stationnaire composée de microparticules sphériques de gel de silice ou d'un polymère ayant un diamètre compris entre (2 à 5 μm) puis transporté au travers du système chromatographique par une phase mobile composée d'un ou plusieurs solvants organiques ou aqueux dépendamment de la polarité des composés. Le choix de la colonne chromatographique et la composition de la phase mobile sont très importants pour une séparation adéquate et dans un temps minimal (Rouessac et Rouessac, 1997 ; Skoog et al., 2003).

La chromatographie en phase normale et la chromatographie en phase inverse sont deux types de modes de séparation qui sont utilisés selon la nature des composés que l'on souhaite séparer. Le mode inverse est le plus utilisé et basé sur des interactions de type hydrophobes. En plus, il permet d'utiliser des colonnes apolaires composé de gel de silice qui est greffé avec des chaînes alkyles de 8 ou 18 atomes carbones (C8 et C18) (Rouessac et Rouessac, 1997 ; Skoog et al., 2003). Pour le mode normal les colonnes les plus utilisées comportent des groupements silanols ou siloxanes permettant les interactions par liaisons hydrogènes. Un type des phases normales appelé chromatographie par interactions hydrophiles (HILIC) est le plus utilisée pour la séparation de composés polaires hydrophiles. En plus, l'augmentation de la polarité de la phase mobile permettra de séparer les composés polaires dans la colonne. Nombreuses colonnes sont retrouvées sur le marché notamment à base de silanols, amines, amides et zwitterionique (Cohen, 2012). Ainsi, la phase stationnaire utilisée doit avoir une polarité opposée à la phase mobile.

La chromatographie en phase inverse est la méthode la plus utilisée pour les analyses des cyanotoxines avec des colonnes apolaires (notamment C18) et d'une phase mobile constituée d'un mélange de H₂O/MeOH ou de H₂O/ACN. Pour la séparation des MCs, le MeOH est préféré à l'ACN qui leur donne une bonne résolution et la séparation se fait par C18 (Lawton et al., 1994). Cette méthode a été utilisée pour la séparation de la nodularine (NOD) et phenylalanine (PHE). La séparation de l'anatoxine-a (ANA-a) et la cylindrospermopsine (CYN) se fait aussi par C18, mais avec la phase mobile à base d'ACN (de la Cruz et al., 2013 ; Osswald et al., 2007). La PHE est une interférence isobarique de l'ANA-a (deux éléments distincts ont des isotopes de même masse) et ils ne peuvent pas être résolus en s'appuyant sur la sélectivité d'un spectromètre de masse à trois quadripôles (Furey et al., 2005). De plus, étant donné leurs masses molaires similaires, leurs produits de fragmentation identiques ainsi que leurs temps de rétention en chromatographie liquide (LC) comparables, cela peut potentiellement conduire à une mauvaise identification ou une surestimation de l'ANA-a. Différentes stratégies LC ont été proposées pour réaliser une séparation suffisante de l'ANA-a et de la PHE, mais des travaux supplémentaires sont nécessaires, car les analyses requises sont généralement longues et coûteuses (Fayad et al., 2015 ; Furey et al., 2005; Osswald et al., 2007).

De plus, la CYN et l'ANA-a peuvent être retenues à l'aide de colonnes HILIC dû à leur caractère hydrophile. La séparation de la STX et du BMAA se fait aussi par HILIC (Osswald et

al., 2007). En outre, le BMAA a été séparé en phase inverse avec l'utilisation de la dérivation avec le 6-ACQ (Cohen, 2012) ou le FMOC-Cl (Vo Duy et al., 2019).

Il existe plusieurs types de détecteurs photométriques pouvant être couplés avec les méthodes de séparation chromatographique comprenant la détection par absorption moléculaire dans l'ultraviolet-visible (UV-vis) comme le détecteur à barrettes de diode (PDA) et par fluorescence moléculaire (FLD). Ces détecteurs doivent réunir des critères essentiels notamment, la sensibilité, un faible bruit de fond, la stabilité dans le temps, l'utilisation en gradient d'élution et ils doivent une réponse proportionnelle à la concentration instantanée pour chaque composé détecté. Ces méthodes de détection reposent sur les propriétés optiques des composés cibles tels que l'absorption, la fluorescence et l'indice de réfraction.

De nombreuses cyanotoxines ont été analysées par HPLC-UV notamment les MCs et la NOD avec une longueur d'absorption maximum de 238 nm (Lawton et al., 1994 ; Lawton et al., 1995 ; Merel et al., 2013). La CYN et l'ANA-a ont été analysées par HPLC-UV avec des longueurs d'onde d'absorption maximales de 262 et 227 nm respectivement (de la Cruz et al., 2013 ; Osswald et al., 2007). Le BMAA a été analysé par spectroscopie en utilisant une dérivation à l'aide d'un agent fluorescent, le 6-aminoquinoly-*N*-hydroxysuccinimidyde (6-ACQ) (Cohen, 2012). Cette technique peut avoir des limites de détection jusqu'à quelques dizaines de ng L⁻¹ pour de nombreuses cyanotoxines (Kaushik et Balasubramanian, 2013). La méthode de fluorescence moléculaire (FLD) a été utilisée pour l'analyse des cyanotoxines comme une alternative à l'UV-vis qui permet d'améliorer la sensibilité et diminuer les interférences par l'ajout d'une étape de dérivation post-colonne des analytes qui est nécessaire avant leur détection. Par exemple l'utilisation du NBDF (4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole) pour l'analyse de l'ANA-a et l'utilisation du DMEQ-TAD (4-[2-(6,7-diméthoxy-4-méthyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalinyloxy)éthyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione) pour l'analyse des MCs (Harada et al., 1998 ; James et al., 1997).

3.5 Spectrométrie de masse

3.5.1 Description générale

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet l'identification et la séparation de molécules à analyser d'un échantillon (solide, liquide ou gazeux) avec une très grande résolution et sensibilité. Son mode de fonctionnement est de produire des ions à partir

de notre molécule ciblée (M) et de les séparer en fonction de leur rapport masse / charge (m/z). Un spectromètre de masse se compose de quatre parties distinctes : un dispositif d'introduction de l'échantillon, une source productrice d'ions, un analyseur et un détecteur suivis d'un traitement du signal (Gross, 2004 ; Skoog et al., 2003). Son principe de fonctionnement général est le suivant : un échantillon est introduit dans la source productrice d'ions du spectromètre, les composés sont ionisés en phase gazeuse avant leur entrée dans l'analyseur et les espèces ionisées sont séparées par l'analyseur selon leur rapport masse sur charge (m/z) avant d'atteindre le détecteur (Gross, 2004). Cette technique a deux modes d'acquisition principaux, le mode d'acquisition par spectrométrie de masse simple (MS) et par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Le couplage chromatographie-spectrométrie de masse est basé sur la réalisation d'une méthodologie analytique qui permet d'assembler en série plusieurs sous-ensembles traversés successivement par les échantillons à analyser (Arpino, 2006). Les méthodes chromatographiques GC et HPLC sont couplées avec une détection en spectrométrie de masse (MS) en simple et triple quadripôles pour des fins qualitatives et quantitatives. Les techniques d'ionisation les plus utilisées sont l'impact électronique (EI) en GC-MS et l'ionisation par électrobuliseur (ESI) en HPLC-MS.

3.5.2 Ionisation EI

La source d'ionisation par l'impact électronique est la plus ancienne des méthodes d'ionisation. Dans cette source l'échantillon, sous forme de gaz, entre dans une chambre sous vide et est traversé par un faisceau d'électrons. Ces électrons sont émis par un filament de tungstène ou de rhenium chauffés et accélérés par une différence de potentiel d'environ 70 V que l'on impose entre le filament et l'anode. L'échantillon est alors ionisé par bombardement à l'aide d'un faisceau d'électrons accélérés et les ions positifs qui en résultent sont attirés à travers la fente de la première plaque accélératrice par une faible différence de potentiel 5 V en général appliquée entre les plaques accélératrices et l'électrode de répulsion, et vont ensuite se diriger vers l'analyseur et subir une sélection par leur masse (Skoog et al., 2003).

3.5.3 Ionisation ESI

Le mode d'ionisation par électrobuliseur (ESI) (**Figure 3-1**) s'effectue à pression atmosphérique, nécessite un échantillon liquide, facile à coupler avec un HPLC. L'ESI est

sensible aux composés polaires et considérée comme une source d'ionisation douce, car il y a très peu de fragmentation. Cette technique a été utilisée pour l'analyse des molécules biochimiques comme les polypeptides, les protéines et les oligonucléotides qui sont à haute masse molaire pouvant dépasser > 100 kDa (Bakhtiar et al., 1996 ; De Hoffmann et al., 1994 ; Martínez-Carballo et al., 2007). De plus, elle a été la plus utilisée pour l'analyse des cyanotoxines.

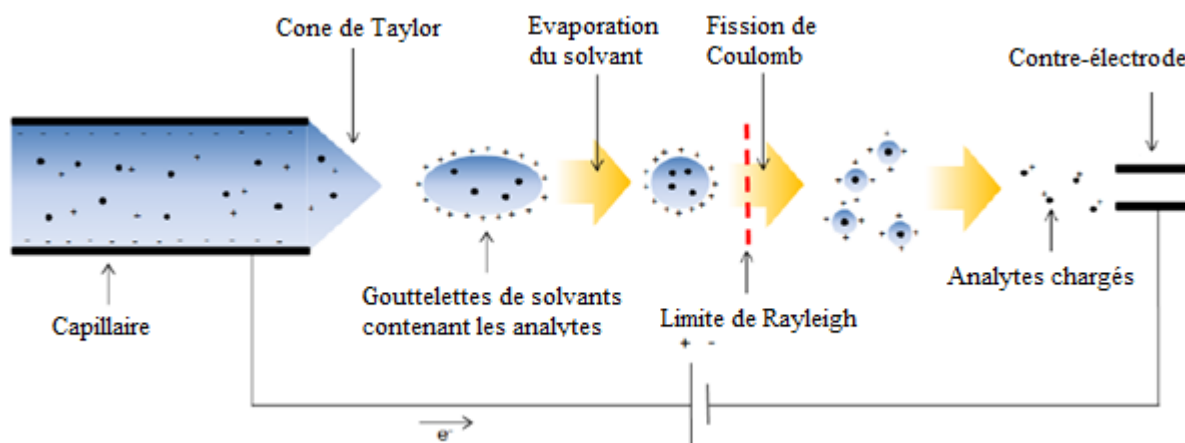


Figure 3-1. Schéma du mécanisme d'ionisation par électronébuliseur adapté de De Hoffmann et al., 1994.

En ce qui concerne l'ionisation par électronébuliseur, l'échantillon en solution provenant de la séparation par HPLC est introduit dans la source d'ionisation du spectromètre à travers un capillaire métallique (Cole, 1997). Un fort champ électrique est induit entre ce capillaire et la contre-électrode par application d'une différence de potentiel de 3 à 6 kV. Le liquide est vaporisé en brouillard de fines gouttelettes chargées. Le solvant de ces dernières est progressivement évaporé par le gaz de nébulisation (N_2). Au fur et à mesure que le solvant s'évapore, la taille des gouttelettes diminue jusqu'à ce que la limite de Rayleigh soit atteinte de façon que les répulsions électrostatiques deviennent plus importantes que la tension de surface qui maintient les gouttelettes ensemble (limite de Rayleigh) (Cole, 1997 ; De Hoffmann et al., 1994). Une fission de Coulomb se produit, engendrant une explosion des gouttelettes, devenant plus petites et plus stables. Enfin, Les solvants évaporés et les ions libres de solvant sont refocalisés par une série de lentilles placées sous vide à l'entrée de l'analyseur, les conduisant vers le premier quadripôle du MS, ce qui permet leur filtration (De Hoffmann et al., 1994).

3.5.4 Ionisation APCI

L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est une technique d'ionisation douce complémentaire à l'ESI. Elle est couramment utilisée pour analyser les petits composés thermiquement stables polaires et relativement moins polaires qui sont mal ionisés par l'ESI, mais qui fonctionnent bien en ionisation chimique, qui génèrent des ions chargés individuellement à des températures plus élevées variant de 300 à 600 °C. L'APCI est basée sur le transfert d'espèces chargées d'un ion réactif à une molécule en phase gazeuse. Elle permet de produire plus de fragmentation comparativement à l'ESI qui peut donner une information additionnelle sur la structure des molécules (Byrdwell, 2001). Le principe de l'ionisation positive par APCI est décrit dans la **Figure 3-2** (Horning et al., 1977 ; King et al., 2000).

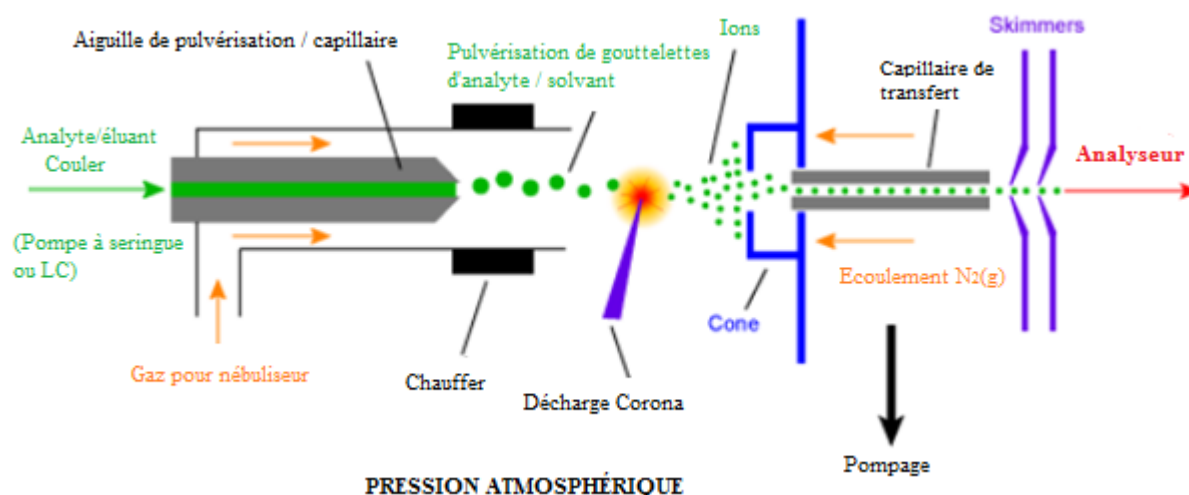


Figure 3-2. Schéma des composants d'une source APCI (Taylor et Linforth, 2000).

En APCI, l'échantillon est généralement dissous dans un solvant et pompé à travers un capillaire à l'intérieur d'un tube de quartz non chargé. À l'extrémité du capillaire, mais toujours à l'intérieur du tube, l'échantillon est converti en aérosol puis vaporisé à l'aide d'azote gazeux (Horning et al., 1977). Le solvant gazeux (S) et l'échantillon (M) sont ensuite ionisés par une décharge corona, dans laquelle une électrode fortement chargée crée un champ électrique suffisamment puissant pour ioniser les molécules voisines (Kostiainen et Kauppila, 2009 ; Watson et Sparkman, 2008). Un potentiel de plusieurs kilovolts est appliqué à l'électrode ce qui enlève généralement un électron d'une molécule neutre, sans déposer suffisamment d'énergie interne pour provoquer une fragmentation. La décharge corona peut directement ioniser une molécule d'analyte pour former un cation radicalaire ($M^{+\bullet}$). Cependant, parce que les molécules

de solvant sont beaucoup plus nombreuses que l'analyte, il est plus probable qu'une molécule de solvant soit ionisée de manière similaire. Les collisions fréquentes entre les ions et les molécules peuvent transférer la charge d'un ion à un autre neutre. La collision d'un ion solvant ionisé avec une molécule d'analyte peut créer un transfert de charge direct pour former un ion analyte cationique radicalaire. Alternativement, la collision des ions solvants avec une molécule d'analyte neutre peut entraîner l'abstraction d'un atome d'hydrogène de la molécule (Sunner et al., 1988). Le solvant ionisé résultant peut aussi ioniser l'analyte par transfert de protons. Les ions d'analyte résultants ($M^{+\bullet}$ ou $[M+H]^+$) sont ensuite injectés dans le spectromètre de masse pour la détection (Figure 3-3).

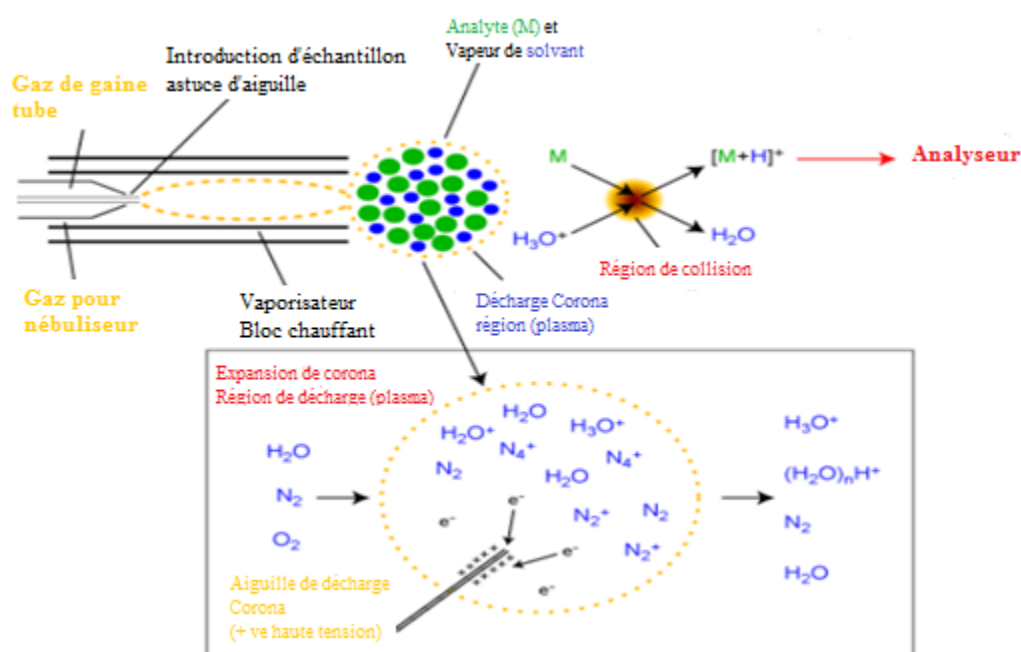


Figure 3-3. Une vue plus détaillée du mécanisme de l'APCI en mode positif adapté de De Hoffmann et al. 1994

Étant donné que l'ionisation se produit dans la phase gazeuse et non dans la phase liquide, il n'est pas nécessaire que le solvant soit polaire et capable de transporter une charge, car aucun ion n'a besoin d'être présent en solution. Par conséquent, contrairement à l'ionisation par électronébuliseur, l'APCI peut ioniser des molécules polaires ou légèrement polaires qui ne contiennent aucun site acide ou basique. De plus, l'APCI fonctionne mieux à des débits plus élevés que l'ionisation par ESI et est ainsi plus facilement couplé à un chromatographe en phase liquide à haute performance. Cependant, compte tenu de la température élevée et du besoin de vaporisation, l'analyte doit être thermiquement stable et volatil. Les molécules hautement

polaires, thermiquement instables ou de poids moléculaire élevé, s'ils se vaporisent, se fragmentent généralement pendant le processus d'ionisation.

3.5.5 Triple quadripole

L'analyseur quadripolaire est un analyseur à balayage et le plus répandu dans les spectromètres de masse. Il est constitué de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique ou cylindrique connectées deux à deux électriquement et permet la séparation des ions en fonction de leur rapport m/z (**Figure 3-4**) (De Hoffmann et al., 1994).

Les ions traversent le quadripôle selon l'axe z . Ils sont soumis au potentiel appliqué aux électrodes opposées ($+\Phi_0$ et $-\Phi_0$) qui combine deux tensions, l'une continue (U) et l'autre alternative (V) (De Hoffmann et al., 1994). Pour séparer les ions par rapport à leur ratio m/z , on fait varier les valeurs de U et V tout en maintenant le rapport U/V constant. Les tensions appliquées influencent la stabilité de la trajectoire des ions traversant les quatre électrodes parallèles. En effet, selon le potentiel appliqué, seuls les ions de valeur m/z définie auront une trajectoire stable jusqu'au détecteur tandis que les autres ions instables seront projetés hors de leur chemin originel (De Hoffmann et al., 1994).

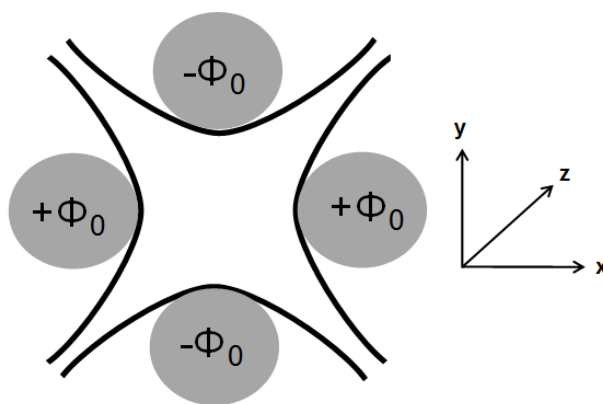


Figure 3-4. Schéma d'un quadripôle hyperbolique adapté de (De Hoffmann et al., 1994).

Pour les types de balayages utilisés dans un simple quadripôle on trouve le balayage complet (*full scan ou FS*) ou surveillance des ions sélectionnés (*selected ion monitoring ou SIM*). Le premier type de balayage est utilisé à des fins qualitatives, il permet de détecter et d'identifier tous les composés présents dans un échantillon à partir du spectre de masse complet

de chaque analyte. Le deuxième type de balayage est utilisé principalement à des fins quantitatives. Les ions d'un rapport masse / charge sont sélectionnés et tous les autres ions sont éjectés de l'analyseur de masse. Ensuite, les ions sélectionnés sont balayés séquentiellement hors de l'analyseur de masse, ce qui donne un spectre SIM (Arpino, 2006).

La spectrométrie de masse triple quadripolaire, permet de faire de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et est constituée par deux filtres quadripolaires, Q1 et Q3, séparés par une cellule de collision, q2. Elle permet de fragmenter les ions préalablement sélectionnés dans le premier quadripôle (Q1) par collision sur des molécules de gaz inerte en général l'argon qui est situé dans la chambre de collision (q2). Les ions produits de la fragmentation sont filtrés par le troisième quadripôle (Q3) (**Figure 3-5**) (De Hoffmann et al., 1994). Ce mode sélectif appelé suivi de réaction ciblée ou multiples fragmentations sélectionnées (*selected reaction monitoring*, SRM ou *multiple reaction monitoring*, MRM) a été utilisé pour quantifier les cyanotoxines (De Hoffmann et al., 1994).

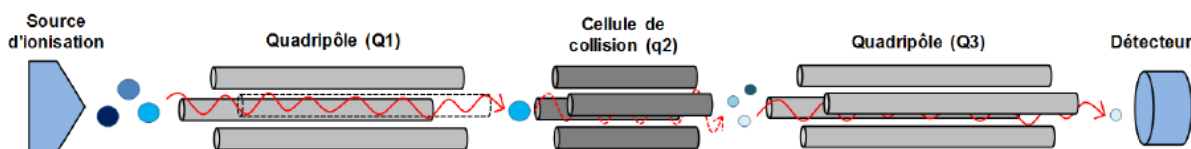


Figure 3-5. Schéma d'un triple quadripôle adapté de (De Hoffmann et al., 1994).

La spectrométrie de masse à triple quadripôles est largement utilisée pour l'analyse des cyanotoxines notamment les MCs (Oehrle et al., 2010 ; Pietsch et al., 2001), la NOD (Pietsch et al., 2001; Beltran et al., 2012 ; Spooft et al., 2003), l'ANA-a (Oehrle et al., 2010 ; Vasas et al., 2004), la CYN (Bláhová et al., 2009), le BMAA (Fan et al., 2014 ; Jiang et al., 2013) et la STX (Pietsch et al., 2001). La méthode UHPLC-ESI couplée au triple quadripôle a été utilisée pour quantifier plusieurs cyanotoxines dans le **Chapitre 5** pour sa sélectivité et sa sensibilité. Plusieurs éléments doivent être vérifiés pour quantifier des cyanotoxines dans des matrices chargées qui contiennent beaucoup d'interférences comme le muscle du poisson pour s'assurer d'une grande précision avec un minimum de faux positifs tels que : le temps de rétention, au minimum deux transitions de masses précurseurs-fragments et le ratio de ces deux transitions.

3.5.6 Spectrométrie de masse à haute résolution

La spectrométrie de masse à haute résolution (*high-resolution mass spectrometer*, HRMS) a connu une grande d'évolution technologique. Elle est devenue une technologie très puissante pour une variété d'applications environnementales comme l'analyse des cyanotoxines. Elle a été utilisée pour l'analyse de cylindrospermopsine, d'anatoxine-a, d'homoanatoxine-a, d'anabaénopeptides A et B et de douze microcystines (-RR, [Asp3] -RR, -YR, -HtyR, -LR, [Asp3] -LR, -HilR, -WR, -LA, -LY, -LW et -LF) dans les eaux de surface de lacs au Québec et en Ontario (Roy-Lachapelle et al., 2019a). Aussi, elle a été utilisée pour l'analyse de la neurotoxine β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) et des isomères dans les eaux de surface au Canada (Vo Duy et al., 2019).

Des exemples d'instruments HR-MS sont le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique ionique de transformée de Fourier (FTICR) et l'Orbitrap. Ces instruments mesurent la masse exacte d'analytes sans fragmentation. Cependant, ils peuvent être combinés avec un quadripôle dans lequel la fragmentation est également possible et qui peut ajouter plus de sélectivité à la méthode (Prasse et Ternes, 2016).

On compare la performance des analyseurs par leurs pouvoirs de résolution qui sont définis comme la capacité de l'analyseur à distinguer deux pics de masses voisines; plus le pouvoir de résolution est élevé, plus l'analyseur sera capable de séparer les signaux de deux pics de m/z très proche. Le pouvoir de résolution R , se calcule par $m/\delta m$, où m est la masse du second pic et δm est la plus petite différence de masse entre deux pics résolus avec une intensité de la vallée entre ces deux pics égale 10% du pic le plus faible (Balogh, 2004 ; Harris, 2010). Le pouvoir de résolution, largeur à mi-hauteur (*full width at half maximum*, FWHM) est une autre appellation du pouvoir de résolution avec m la masse mesurée du pic et δm largeur à la moitié de l'hauteur du pic résolu. De manière générale, un spectromètre de masse est considéré à haute résolution si son pouvoir de séparation dépasse 10 000 FWHM. Les analyseurs TOF et QTOF peuvent aller jusqu'à 60 000 FWHM, l'analyseur Orbitrap peut atteindre un pouvoir de résolution jusqu'à 480 000 FWHM pour l'Orbitrap *Exploris* (Makarov et al., 2009 ; Xian et al., 2012) et le FTICR peut aller jusqu'à 1 000 000 FWHM. L'avantage majeur de cette technique est qu'elle est très sélective parce qu'elle permet de mesurer la masse exacte d'un composé permettant de distinguer de deux m/z très proches. Par ailleurs, elle est comme pour réduire les

interférences isobariques. La précision sur la masse a été calculée pour nos analyses par une erreur en partie par million (ppm) avec une tolérance plus faible que 5 ppm (Hu et al., 2005).

3.5.6.1 Orbitrap

L'Orbitrap est l'un des analyseurs de la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) des plus récents, inventé et breveté par Alexander Makarov (Makarov, 2000). L'Orbitrap est un analyseur de type trappe ionique constitué d'une électrode creuse externe et d'une électrode centrale en forme de fuseau représenté schématiquement à la **Figure 3-6**. Les deux électrodes sont connectées à des sources de tension indépendantes (Makarov, 1999 ; Makarov et Hardman, 2006).

Lorsqu'une tension est appliquée entre les deux électrodes axiales externe et centrale, le champ électrique est strictement linéaire le long de l'axe z et les ions présents entre ces deux électrodes adopte une trajectoire spirale d'un rayon r autour de l'électrode centrale, donc les oscillations dans cette direction seront purement harmoniques, mais ce mouvement est indépendant de la coordonnée cylindrique en r (Hu et al., 2005 ; Makarov et al., 2009). En outre, la fréquence et l'amplitude des oscillations axiales des ions dépendent uniquement du rapport m/z et pas de l'énergie cinétique des ions injectés qui donne un mouvement cohérent aux ions (Hu et al., 2005 ; Makarov et al., 2009). L'injection des ions en très courtes rafales ou (paquets) peut réduire l'effet de charge d'espace et permet de donner un mouvement cohérent aux ions et une détection sensible avec une haute résolution (Hu et al., 2005). Le courant d'image induit par les oscillations est mesuré par les électrodes externes qui sont utilisées comme plaques réceptrices. Le résultat de cette mesure est amplifié puis converti par la méthode de la transformée de Fourier en fréquence qui permet de l'obtention du spectre de masse des ions présents dans la trappe avec une résolution de masse allant jusqu'à 480 000 FWHM à 200 m/z et une large plage dynamique en m/z . L'Orbitrap permet des mesures de masse de haute précision à moins de 5 ppm (De Hoffmann et al., 1994 ; Hu et al., 2005 ; Makarov, 2000 ; Xian et al., 2012).

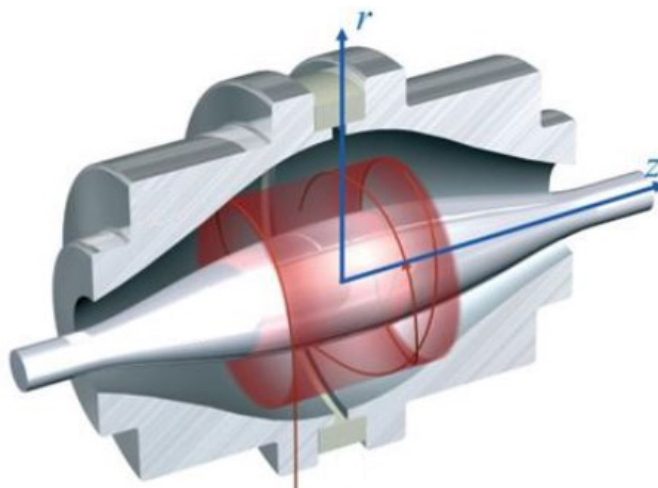


Figure 3-6. Schéma de l'Orbitrap adapté de (Scigelova et Makarov, 2006).

L'analyseur orbitrap a été utilisé pour une variété d'applications de l'identification de composés de routine à l'analyse de composants à l'état de traces dans des mélanges complexes. En particulier, il est très utilisé pour les approches omiques, notamment la protéomique et la métabolomique des médicaments (Eliuk et Makarov, 2015 ; Lu et al., 2008 ; Olsen, 2005). L'Orbitrap est généralement couplé avec HPLC et une ionisation par ESI (Kamleh et al., 2008 ; Scigelova et Makarov, 2006). Hogenboom et al., ont décrit la première application environnementale de cet analyseur en 2009 pour l'identification des contaminants émergents dans les eaux usées traitées, les eaux de surface et l'eau potable (Hogenboom et al., 2009). En général, l'Orbitrap peut être appliqué sur les échantillons environnementaux pour un dépistage ciblé, suspect et non ciblé (Krauss et al., 2010). Ces appareils ne disposent pas d'un système qui permet la fragmentation des ions, donc, ils ont été utilisés uniquement pour les analyses en balayage complet des ions. Grâce à la création des systèmes hybrides qui disposent d'un quadripôle en amont de l'analyseur qui permet la sélection d'ions et d'une cellule de collision qui permet de former des fragments spécifiques ont permis d'étendre les utilisations de ces types d'appareils dans différentes domaines analytiques.

3.5.6.2 Q-Exactive

Le Q-Exactive est un spectromètre de masse hybride quadripôle-orbitrap (Thermo Scientific™) et est constitué d'un analyseur de masse Orbitrap équipé d'un filtre de masse quadripolaire et d'une cellule de collision. Cette configuration ouvre la voie vers de nouvelles méthodes quantitatives basées sur des mesures à haute résolution et de masse précise, y compris

une analyse ciblée en mode MS et en mode MS/MS. Le Q-Exactive est également utile pour le dépistage non ciblé ou ciblé et pour de nombreuses applications qualitatives et quantitatives dans la découverte de médicaments, la protéomique, la sécurité environnementale et alimentaire, la recherche clinique et la toxicologie médico-légale (Cotton et al., 2014 ; Fedorova et al., 2013 ; Hurtaud-Pessel et al., 2011 ; Liu et al., 2014 ; Michalski et al., 2011 ; Rochat, 2012 ; Wang et al., 2014). Les différentes parties de cet instrument sont présentées sous forme d'un schéma en **Figure 3-7**.

Après ionisation, les ions formés passent au travers d'un système *S-lens* constitué d'une série de lentilles de focalisation qui permettent d'augmenter la transmission des ions dans le système et aussi d'augmenter la sensibilité. Ensuite, ces ions sont dirigés vers un quadripôle à haute performance par l'intermédiaire du flatapôle. Ce dernier est constitué de quatre barreaux plats et la courbure de ses barreaux favorise l'élimination des gouttelettes de solvant et des composés neutres. Le quadripôle va permettre la filtration des ions pour sélectionner les composés désirés. Les ions pénètrent ensuite dans la *C-Trap* qui va permettre de ralentir les ions et les accumuler pour les injecter directement dans l'Orbitrap où les ions seront fragmentés dans la cellule de collision HCD (*Higher-energy collisional dissociation*) composée d'un multipôle et se diriger à nouveau vers la *C-Trap* avant analyse par l'Orbitrap. Les ions sont ensuite détectés selon le mécanisme général décrit ci-dessus. Le Q-Exactive a un pouvoir de résolution allant de 17 500 à 140 000 (FWHM à m/z 200), une plage de masse allant de 50 à 6000 m/z . L'appareil peut améliorer la détection des petites molécules et biomolécules chargées individuellement et une précision de masse se retrouvant entre 1 et 3 ppm (Scheltema et al., 2014).

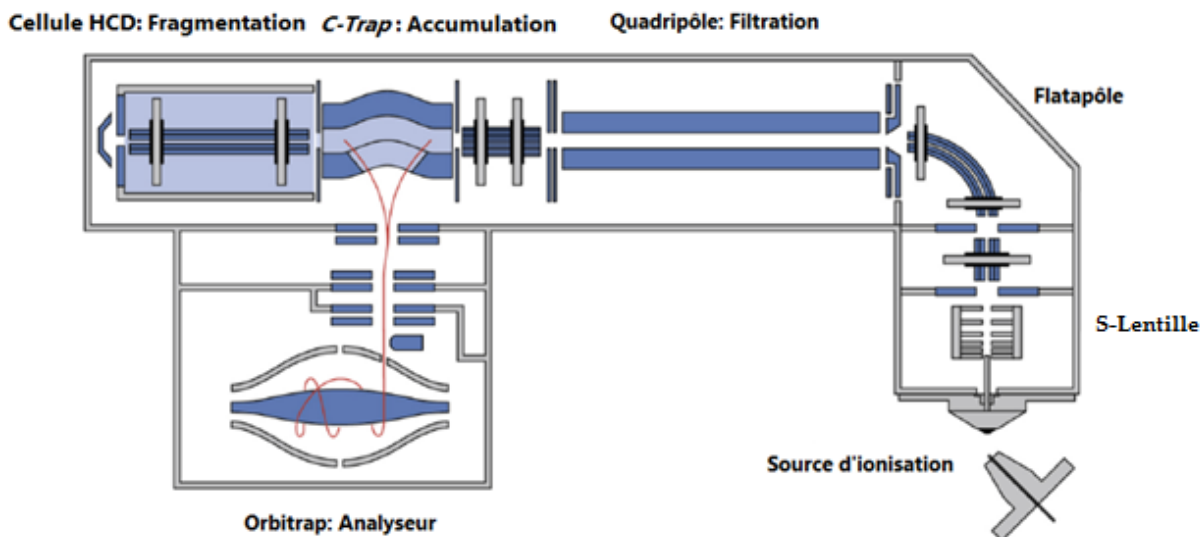


Figure 3-7. Schéma du Q-Exactive adapté de (Michalski et al., 2011).

De nombreuses méthodes d'acquisition peuvent être appliquées sur le Q-Exactive vu sa combinaison entre un quadripôle qui fait la présélection des ions désirés et une cellule de collision HCD pour la fragmentation. Le mode FS permet d'effectuer un balayage de larges gammes de masses sélectionnées au niveau du quadripôle. Ce mode peut être utilisé pour la détection simultanée de plusieurs composés par analyse et aussi utilisé à des fins qualitatives. Le mode AIF (*all ion fragmentation*) ou fragmentation tous les ions est un type de fragmentation dans lequel tous les ions générés dans la source sont guidés à travers l'optique ionique du spectromètre de masse; accumulés dans le piège *C-Trap*; puis envoyés à la dissociation collisionnelle à énergie plus élevée (HCD) pour la fragmentation.

Dans ce cas, le quadripôle n'est pas réglé pour sélectionner un précurseur particulier, mais il fonctionne en mode d'intercommunication RF uniquement. En plus, il est possible de sélectionner plusieurs ions spécifiques par le quadripôle et les accumuler dans la *C-Trap* avant l'analyse au niveau de l'orbitrap pour l'utilisation du mode SIM à des fins quantitatives. Finalement, le mode de fragmentation t-MS2 (*targeted ion fragmentation*) est aussi possible en sélectionnant les ions désirés au niveau du quadripôle et en les fragmentant dans la cellule HCD.

3.6 Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires, basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) ont été développées au cours des deux dernières décennies. La PCR est une technique

d'amplification enzymatique efficace pour caractériser les génotypes. À partir d'une simple copie d'une séquence particulière d'acides nucléiques, cette séquence peut être spécifiquement amplifiée et détectée. Cette technique a été utilisée pour l'identification des clusters (groupes de gènes) responsables de la production de cyanotoxines (Pacheco et al., 2016). Différentes méthodes basées sur la PCR ont été utilisées pour la détection des cyanotoxines comme la PCR conventionnelle qui cible un seul gène. Cette méthode fournit des résultats qualitatifs qui peuvent être utilisés pour détecter des espèces cyanobactériennes potentiellement toxiques au début de la prolifération. La deuxième approche basée sur l'utilisation de la PCR quantitative (qPCR) qui cible un gène impliqué dans la biosynthèse des cyanotoxines. Cette méthode permet d'offrir des résultats quantitatifs de l'abondance des gènes des cyanotoxines (Humbert et al., 2010 ; Humbert, 2017 ; Pearson et Neilan, 2008 ; Srivastava et al., 2013). De plus, la combinaison de la PCR et de la puce à ADN est une autre méthode utilisée pour évaluer les cyanotoxines. Cette méthode a été utilisée pour réaliser la détection et la semi-quantification simultanées de cyanotoxines dans des échantillons environnementaux (McNamee et al., 2014). Une méthode de détection multiple basée sur la cytométrie en flux couplée à un réseau de microsphères a été développée comme un moyen de dépistage simple, rapide et semi-quantitatif pour la détection simultanée de plusieurs cyanotoxines d'eau douce et saumâtre (Fraga et al., 2014). Une technologie intéressante pour la surveillance des producteurs des cyanotoxines dans l'environnement est l'hybridation in situ en fluorescence (FISH). Cette méthode a utilisé une sonde oligonucléotidique marquée à la fluorescéine pour s'hybrider avec des séquences cibles d'acide nucléique dans des échantillons, afin d'obtenir des informations spécifiques sur l'expression génique. L'utilisation de sondes d'ARNm (acide ribonucléique messenger, est une copie transitoire d'une portion de l'ADN correspondant à un ou plusieurs gènes), en imagerie FISH, donnera des informations sur l'expression d'un gène particulier, tandis que l'utilisation de sondes d'ARNr spécifiques permet l'identification de micro-organismes au niveau du genre (Zeller et al., 2016). Donc, cette technique est très puissante pour l'identification et le dénombrement des cyanobactéries toxiques, notamment les producteurs de MCs dans l'environnement (Gan et al., 2010 ; Johnson et Mutharasan, 2013 ; Zeller et al., 2016). Le tyramine signal amplification (TSA) est un supplément à la méthode FISH qui peut augmenter la sensibilité du test et implique un oligonucléotide spécifique qui est lié à la peroxydase de raifort (HRP). La HRP catalyse le dépôt permanent de nombreux tyramides fluorescents dans

l'environnement de la sonde. Cette combinaison (TSA-FISH) a une puissance d'amplifications de signal allant de 10 à 20 fois par rapport aux sondes marquées à la fluorescéine (Pernthaler et al., 2002 ; Ramm et al., 2012 ; Riou et al., 2017 ; Schonhuber et al., 1997).

Chapitre 4. Partie expérimentale

4.1 Description du site d'étude – Réserve Écologique de la Rivière aux Brochets

La Rivière aux Brochets draine un bassin versant d'environ 630 km² (Deslandes et al., 2002). La rivière prend naissance près de la ville de Frelighsburg (QC, Canada) et serpente sur 67 km dans les directions générales nord-ouest et sud-ouest avant de se jeter dans la baie Missisquoi, le bras nord-est du lac Champlain. La réserve écologique de la Rivière aux Brochets est située près de l'embouchure de la rivière dans la baie Missisquoi, à environ 3 km à l'est de Venise-en-Québec et à 3 km au nord du littoral de Philipsburg. La réserve écologique de la Rivière aux Brochets et la baie Missisquoi abritent une faune emblématique, notamment des tortues (*Apalone spinifera*, *Graptemys geographica*), des poissons, des amphibiens et des oiseaux aquatiques. Certaines de ces espèces ont été classées menacées (vulnérables ou en voie de disparition) par le COSEPAC (Comité sur la situation des espèces en péril au Canada). Bien que les dernières décennies aient vu des améliorations significatives de certains paramètres de qualité de l'eau dans la Rivière aux Brochets (Simoneau, 2019), des dépassements du critère de qualité du phosphore pour prévenir l'eutrophisation fluviale étaient toujours observés (OBVBM et Amphibia-Nature, 2014).

L'ichtyofaune présente dans la région de la réserve écologique de la Rivière aux Brochets et de la baie Missisquoi peut souffrir de déplacements communautaires, de pertes de biodiversité et de taux élevés d'anomalies morphologiques (Levine et al., 2012). L'augmentation des températures de l'eau pendant la saison estivale peut également faire baisser les niveaux d'oxygène dissous et contribuer à l'accélération de la croissance des cyanobactéries, ce qui peut entraîner d'autres impacts négatifs entravant la récupération de l'écosystème. Au moins 15 taxons cyanobactériens considérés comme potentiellement toxiques ont été identifiés dans la baie Missisquoi lors d'épisodes de CyanoHAB en 2000-2014 (Blais, 2015; Blais, 2019; Bowling et al., 2015). Parmi ceux-ci, certains ont été observés à plusieurs reprises au fil des ans, notamment *Aphanizomenon flos-aquae*, *Dolichospermum flos-aquae*, *Dolichospermum spiroides*, *Gloeotrichia echinulata* et *Microcystis aeruginosa* (Blais, 2019; Bowling et al., 2015).

4.2 Échantillonnage de l'eau de surface et des poissons

L'échantillonnage a été effectué à la fin de la saison estivale 2018 (août-octobre) à diverses stations de surveillance de la réserve écologique de la Rivière aux Brochets - baie Missisquoi (lac Champlain) (**Figure 4-1**). L'approbation et l'autorisation d'accéder aux sites d'échantillonnage ont été obtenues auprès du ministère de l'Environnement Lutte contre les changements climatiques du Québec (MMELCC). Le formulaire CDEA-F1 définissant le nombre et les types de poissons à collecter a également été approuvé par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (Université de Montréal).



Figure 4-1. Réserve écologique de la rivière aux Brochets (Photos : M. SKAFI).

Des échantillons d'eau de surface ont été prélevés dans la Réserve écologique de la Rivière aux Brochets et dans la partie nord de la baie Missisquoi près de l'embouchure de la Rivière aux Brochets, environ une fois par semaine d'août 2018 à octobre 2018. Les échantillons d'eau de surface pour l'analyse des cyanotoxines ont été recueillis par bateau à l'aide de bouteilles PETG (polyester glycolisé) de 60 mL (Kamp et al., 2016). Sur chaque site, les bouteilles en PETG ont été rincées trois fois avec l'eau de surface du site, remplies et scellées, et congelées sur place à l'aide d'un pulvérisateur de réfrigérant appliqué sur la partie externe de la bouteille. Les bouteilles ont été conservées congelées dans une boîte de refroidissement contenant de la neige

carbonique et transportées vers les installations du laboratoire d'analyse dans les 12-24 heures suivant l'échantillonnage.

Un total de 71 poissons de 10 espèces, dont le grand brochet (*Esox lucius*, ESLU), La barbotte brune (*Ameiurus nebulosus* (*Ictalurus nebulosus*), AMNE), la carpe commune (*Cyprinus carpio*, CYCA), la perche jaune (*Perca flavescens*, PEFL), le mené doré (*Notemigonus crysoleucas*, NOCR), le meunier noir (*Catostomus commersonii*, CACO), l'achigan à petite bouche (*Micropterus dolomieu*, MIDO), la marigane noire (*Pomoxis nigromaculatus*, PONI), le crapet de roche (*Ambloplites rupestris*, AMRU) et la tanche (*Tinca tinca*), ont été collectés à la senne ou au filet maillant (**Figure 4-2**). De plus amples détails sur les caractéristiques des poissons sont fournis dans les annexes de l'article associé (**Table S5-1**). Après l'euthanasie, les poissons ont été placés chacun dans un sac Ziploc refermable étiqueté, stockés dans une boîte de refroidissement avec de la neige carbonique et transportés vers les installations du laboratoire d'analyse dans les 12 à 24 heures. Les poissons ont été mesurés et pesés avant stockage à -20 °C jusqu'à l'étape de préparation des échantillons.



Figure 4-2. Échantillonnage des poissons à la senne dans la réserve écologique de la Rivière aux Brochets (Photos : M. SKAFI).

4.3 Préparation des échantillons

La préparation d'échantillons d'eau de surface a été effectuée comme décrit dans Roy-Lachapelle et al. (2019a). Une aliquote d'échantillon de 1,5 mL a été introduite dans un flacon en verre ambré de 2 mL. Les étalons internes isotopiquement marqués ($^{15}\text{N}_{10}$ -MC-LR et $^{15}\text{N}_5$ -CYN) ont été dopés pour une concentration de 200 ng L⁻¹. Après agitation au vortex, les échantillons ont été analysés par SPE en-ligne couplée à la LC-MS/MS (volume d'injection : 1 mL).

Les échantillons de poisson ont été disséqués et le muscle a été récupéré. Pour chaque échantillon individuel, le muscle a été écrasé et homogénéisé à l'aide d'un broyeur ou d'un mortier, selon la taille du poisson. Le broyeur, le mortier et les autres équipements de préparation ont été soigneusement nettoyés avec des lingettes Kimwipes, rincés avec de l'eau de qualité HPLC et de l'acétone, et séchés entre chaque échantillon pour éviter la contamination croisée. Pour chaque échantillon de muscle de poisson, 500 mg de tissu (poids humide) ont été pesés dans un tube en polypropylène de 15 mL. Puis 150 µL d'un mélange d'étalons internes isotopiquement marqués ont été ajoutés, contenant 20 µg L⁻¹ de MC-LR- $^{15}\text{N}_{10}$ et 40 µg L⁻¹ de CYN- $^{15}\text{N}_5$.

Après un temps d'attente de 1 h, 4 mL de méthanol ont été ajoutés aux échantillons et les échantillons ont été soumis à une agitation au vortex à grande vitesse (3200 tr min⁻¹, 1 min). Les échantillons ont été placés dans un bain à ultrasons pendant 15 min, puis centrifugés (4427 g, 10 min). Le surnageant a été introduit dans un nouveau tube en polypropylène de 15 mL et le muscle du poisson a été ré-extrait deux fois comme décrit précédemment (3 cycles d'extraction au total). Les surnageants combinés ont été concentrés à 4 mL sous un léger courant d'azote (N₂) et un chauffage modéré (40 ° C). Les échantillons ont ensuite été congelés pendant 2 h à -20°C, puis centrifugés à 4427 g pendant 10 min (pour éliminer la matière grasse présente dans l'extrait). Les surnageants ont été évaporés à sec (N₂, 40 ° C), reconstitués dans 2 mL d'eau de qualité HPLC, vortexés (2500 tr min⁻¹, 1 min) et ultrasoniqués (5 min) pour assurer une redissolution complète des analytes. Les échantillons ont été filtrés sur des filtres GHP (polypropylène hydrophile) à seringue Acrodisk de 0,2 µm et le filtrat (~ 1,6 mL) a été recueilli dans un flacon en verre ambré de 2 mL. Un volume de 1 mL de l'extrait propre a ensuite été soumis à analyse instrumentale par SPE en ligne couplée à la LC-MS/MS.

4.4 Analyse LC-MS/MS

L'analyse a été effectuée à l'aide d'une extraction sur phase solide (SPE) en ligne avec une chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à une spectrométrie de masse en tandem (en ligne SPE – UHPLC-MS/MS) via une source d'électronébuliseur chauffée (HESI) en mode positif (Fayad et al., 2015; Munoz et al., 2017). La SPE en ligne a été réalisée avec une colonne Hypersil Gold aQ C18 (20 mm x 2,1 mm, granulométrie 12 µm). Les phases mobiles pour la SPE en ligne étaient de l'eau HPLC + 0,1% d'acide formique (A) et du méthanol + 0,1% d'acide formique (B). Le volume d'injection était de 1 ml. Après le chargement de l'échantillon, la phase mobile aqueuse s'écoule pendant 0,5 mL supplémentaire à travers la colonne SPE en ligne pour une élimination supplémentaire de la matrice (étape de lavage) (Munoz et al., 2017). L'élution des analytes ciblés de la colonne SPE en ligne vers la colonne analytique s'est ensuite déroulée comme suit. Les analytes ont été transférés dans la colonne de séparation en utilisant la pompe à gradient. Le débit analytique de la phase mobile a été fixé à 525 mL min⁻¹. Les phases mobiles analytiques étaient HPLC-eau + 0,1% d'acide formique (A), méthanol + 0,1% d'acide formique (B) et acétonitrile + 0,1% d'acide formique (C). La séparation des analytes a été effectuée avec une colonne Thermo Hypersil Gold C18 (100 mm x 2,1 mm, granulométrie 1,9 µm) de Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, États-Unis.). La colonne a été thermostatée à 55 °C et équipée d'un préfiltre de colonne de 0,2 µm. Les détails du gradient chromatographique sont résumés dans la SI (**Table S5-2**).

La détection a été effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse de triple quadripôle TSQ Quantiva (Thermo Scientific, Waltham, MA, États-Unis) en mode de balayage de transitions multiples (*selected reaction monitoring*, SRM). Deux transitions MS/MS ont été ciblées pour chaque composé, une pour la quantification et une autre pour la qualification/confirmation. Le traitement des données LC-MS/MS a été effectué à l'aide du logiciel Xcalibur 3.0 (Thermo Scientific). Les paramètres de la source ESI chauffée utilisée étaient les suivants: température du vaporisateur 400 °C, température du tube de transfert d'ions 350 °C, gaz gainant 35 (unités arbitraires), gaz auxiliaire 20 (unités arbitraires), gaz de balayage 0 (unités arbitraires), tension de pulvérisation +3600 V. Le temps de balayage a été réglé à 20 ms. Les premier et troisième quadripôles (Q1 et Q3) ont été réglés avec une résolution unitaire de 0,7 Da FWHM. La pression

du gaz de collision a été fixée à 2 mTorr. Les paramètres MS/MS de chaque composé sont fournis en SI (**Table S5-3**).

4.5 Validation de la méthode analytique et contrôle qualité

La validation de la méthode analytique a été effectuée conformément aux recommandations de la littérature (Triantis et al., 2017; Turner et al., 2018). Différents paramètres de validation ont été déterminés, notamment les limites de détection de la méthode (LOD) et les limites de quantification (LOQ), la linéarité, l'exactitude et la précision. La validation de la méthode pour les eaux de surface a été décrite en détail dans notre récente étude (Roy-Lachapelle et al., 2019a) et est résumée comme suit. Le gradient chromatographique complexe appliqué a permis une séparation chromatographique de l'anatoxine-a (ANA-a) avec la phénylalanine d'interférence isobarique couramment détectée dans les proliférations d'algues (Fayad et al., 2015). Les limites de détection de la méthode dans les eaux de surface étaient de l'ordre de 8 à 50 ng L⁻¹. Des courbes d'étalonnage ont été construites dans une matrice d'eau de surface avec des coefficients de détermination (R^2) > 0,9950. Lorsque les concentrations dans les échantillons de terrain dépassaient le plus haut point de courbe, les échantillons étaient nouvellement préparés et analysés en appliquant un facteur de dilution. Les échantillons d'eau de surface répliqués enrichis à 200 ng L⁻¹ (n = 5) avaient une précision de 80 à 120% et des écarts-types relatifs (RSD) de 2,5 à 16% (Roy-Lachapelle et al., 2019a).

Les critères de validation ont également été évalués dans la matrice du poisson en utilisant la procédure développée ici (**Table 5-1**). Une matrice blanche de poisson (muscle d'aiglefin, *Melanogrammus aeglefinus*) achetée au supermarché a été utilisée à cette fin. Des courbes d'étalonnage ont été construites dans une matrice blanche de poisson en dopant les analytes natifs (un mélange de 18 cyanotoxines) à 8 niveaux allant de 0,05 à 250 µg kg⁻¹, tandis que les étalons internes isotopiquement marqués ont été ajoutés à une concentration identique à celle des échantillons de terrain. Des courbes d'étalonnage ont été produites avec une linéarité appropriée et des coefficients de détermination R^2 compris entre 0,9930 et 0,9998 (**Table 5-1**). Les LOD / LOQ ont été estimés à partir de deux approches parallèles. Dans la première méthode, La LOD a été définie comme la concentration minimale d'analyte produisant des pics identifiables pour les deux transitions MS/MS (quantification et confirmation) avec un rapport signal sur bruit (S/N) ≥ 3. Ces valeurs ont été estimées par l'approche graphique en utilisant bas

la gamme basse de la courbe d'étalonnage. La LOQ a ensuite été définie comme la concentration minimale d'analyte produisant des pics avec un rapport $S / N \geq 10$ avec une précision appropriée. Dans la deuxième méthode, nous avons appliqué la procédure EURACHEM, dans laquelle des répliquats ($n = 10$) de matrice de poisson vierge ont été enrichis à un faible niveau avec des analytes ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$). La LOD a été calculée à trois fois l'écart type des concentrations mesurées et la LOQ à dix fois l'écart type (guide de validation EURACHEM 2014). La LOD / LOQ rapportée correspond donc à la valeur S / N ou EURACHEM, selon la valeur la plus élevée (**Table 5-1**).

La précision de l'ensemble de la méthode a été évaluée à un niveau de dopage de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ dans la matrice de poisson en triple exemplaire (**Table 5-1**; voir également SI le **Table S5-4**). Des analytes natifs et des étalons internes marqués par des isotopes ont tous les deux été ajoutés avant le début de l'extraction par solvant de la matrice de poisson. L'exactitude (*accuracy*) a été dérivée de la concentration quantifiée divisée par la concentration dopée théoriquement. L'exactitude obtenue par dopage de la matrice de poisson variait entre 83,2 et 109,8%, selon la cyanotoxine ciblée. Les performances se situent dans la plage d'acceptation de 70 à 130% de l'exactitude définie par les méthodes de l'US EPA (par exemple, Shoemaker et al., 2015 (EPA Method 544, Determination of Microcystins and Nodularins by LC-MS / MS)). En raison du grand nombre d'échantillons criblés ($N = 71$), il était hors de la portée de la présente étude d'évaluer comment les effets de matrice relatifs pouvaient varier entre les échantillons individuels, car cela aurait impliqué d'effectuer des ajouts étalons détaillés. Bien que la courbe d'étalonnage appariée à la matrice ait été construite à l'aide d'une matrice de poisson modèle, une limitation potentielle est le nombre réduit d'isotopologues de cyanotoxines disponibles pour la compensation interne.

La précision a été dérivée du pourcentage de RSD des rapports de surface dans les répliques de poissons blancs dopés à $40 \mu\text{g kg}^{-1}$. Des étalons de cyanotoxine et des étalons internes marqués par des isotopes ont été tous les deux ajoutés avant l'extraction au solvant, correspondant ainsi à la précision globale de la préparation des échantillons et de l'analyse instrumentale. La précision intraday ($n = 3$) variait de 1,8 à 11,4% et la précision interday ($n = 9$) de 7,2 à 25,5% (**Tableau 5-1**), dans les limites du critère d'acceptation fixé de $<30\%$ (Commission européenne, 2010).

Nous avons recherché s'il pouvait y avoir des pertes d'analytes dues à la reconstitution d'extraits de poisson dans de l'eau pure avant analyse. Parmi six répliqués d'extraits de solvants organiques de poisson, trois répliqués ont été enrichis avant évaporation et reconstitution avec un mélange de cyanotoxine, tandis que trois autres répliqués ont été enrichis après évaporation et reconstitution avec une quantité équivalente. Les récupérations absolues variaient entre 82,1 et 122,4% (SI **Tableau S5-5**), indiquant une influence limitée de cette étape.

L'identification des analytes cibles reposait sur des temps de rétention correspondants avec des normes authentiques dans les courbes d'étalonnage, des pics détectables pour les transitions MS/MS de quantification (QT) et de confirmation (CT), et des intensités relatives QT/CT qui ne devraient pas s'écarter de plus de $\pm 30\%$ à partir de la moyenne des quotients dans les niveaux de la courbe d'étalonnage (Commission européenne, 2017).

Le calcul des concentrations dans les échantillons de terrain a été dérivé du rapport de l'analyte natif à la surface standard interne de l'échantillon et de la régression de la courbe d'étalonnage dans l'eau de surface ou la matrice musculaire de poisson. Une illustration de la performance chromatographique des cyanotoxines ciblées dans le muscle de l'aiglefin à pointes est fournie dans SI (**Figure S5-1**).

Des blancs d'injection d'eau HPLC ont été injectés au début de chaque séquence LC-MS et après le dernier niveau de la courbe d'étalonnage pour contrôler l'absence de contamination. Des blancs de méthode ont été exécutés pour chaque lot d'échantillons, comprenant de l'eau HPLC (pour la procédure de l'eau de surface) et du muscle d'aiglefin vierge (pour la procédure du poisson) enrichis avec les étalons internes et soumis aux mêmes procédures détaillées dans la section 4.3. Aucune des cyanotoxines ciblées n'a été détectée dans les blancs d'injection ni dans les blancs de méthode.

Chapitre 5. Présence de microcystines, d'anabaenopeptines et d'autres cyanotoxines dans les poissons d'une réserve faunique d'eau douce affectées par des proliférations cyanobactériennes nuisibles

Occurrence of microcystins, anabaenopeptins and other cyanotoxins in fish from a freshwater wildlife reserve impacted by harmful cyanobacterial blooms

Mourad Skafi, Sung Vo Duy, Gabriel Munoz, Quoc Tuc Dinh, Dana F. Simon, Philippe Juneau, Sébastien Sauvé.

Toxicon, 194 (2021) 44–52.

Note sur ma contribution

Ma participation aux travaux de recherche : J'ai réalisé les manipulations pour la validation de la méthode et fait l'interprétation des résultats.

Rédaction : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires et les suggestions du Prof. Sébastien Sauvé, mon directeur de recherche et du Prof. Philippe Juneau mon co-directeur.

Co-auteurs : Sung Vo Duy et Dinh Quoc Tuc m'ont aidé avec les expériences en laboratoire. Gabriel Munoz m'a assisté dans l'interprétation des résultats et dans la rédaction de l'article. Dana Florina Simon a contribué dans le côté administratif au projet d'échantillonnage et aussi elle m'a aidé dans la rédaction de l'article.

Abstract

Harmful algal blooms of cyanobacteria (CyanoHABs) can lead to the release of potent toxins that can seriously affect ecosystem integrity. Some freshwater watersheds are particularly at risk considering the threats to already imperiled wildlife. The consumption of tainted drinking water and contaminated food also raises concerns for human health. In the present study, a pilot survey was conducted in the riverine ecosystem of the Pike River Ecological Reserve (QC, Canada) near Missisquoi Bay, Lake Champlain. We examined the occurrence of multiclass cyanotoxins including 12 microcystins, anatoxins, cylindrospermopsin (CYN), anabaenopeptins (AP-A, AP-B), and cyanopeptolin-A in surface waters and wild-caught fish during the summer 2018. Out of the 18 targeted cyanotoxins, 14 were detected in bloom-impacted surface water samples; toxins peaked during early-mid September with the highest concentrations for MC-LR ($3.8 \mu\text{g L}^{-1}$) and MC-RR ($2.9 \mu\text{g L}^{-1}$). Among the 71 field-collected fish from 10 species, 30% had positive detections to at least one cyanotoxin. In positive samples, concentration ranges in fish muscle were as follows for summed microcystins ($\sum\text{MCs}$: $0.16\text{-}9.2 \mu\text{g kg}^{-1}$), CYN ($46\text{-}75 \mu\text{g kg}^{-1}$), AP-A ($1.1\text{-}5.4 \mu\text{g kg}^{-1}$) and AP-B ($0.12\text{-}5.0 \mu\text{g kg}^{-1}$). To the best of our knowledge, this is one the first reports of anabaenopeptins occurrence in wildlife. The maximum $\sum\text{MCs}$ in fish was 1.15-fold higher than the World Health Organization (WHO) daily intake recommendation for adults and nearly equated the derived value for young children. The concentration of CYN was also about 3-fold higher than the limit derived from the human health guideline values.

Keywords: Harmful algal blooms; Cyanotoxins; Microcystins; Cylindrospermopsin; Anabaenopeptins; Fish bioaccumulation.

5.1 Introduction

Cyanobacteria or ‘blue-green algae’ represent a phylum of prokaryotic organisms capable of photosynthesis (Duchoud et al., 2016). In nutrient-rich freshwater and marine environments, cyanobacteria can grow quickly and form dense water blooms, which can be harmful to ecosystems (Christophoridis et al., 2018; Paerl and Otten, 2013; Winter et al., 2012). Eutrophication and changing climatic conditions are significant factors modulating the intensity and distribution of cyanobacterial harmful algal blooms (CyanoHABs) (Paerl and Huisman, 2009; O’Neil et al., 2012; Sukenik et al., 2015; Paerl et al., 2016; Huisman et al., 2018). Common genera within the Cyanophyceae that can form CyanoHABs include, for instance, *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Dolichospermum*, *Nodularia*, and *Planktothrix* (Huisman et al., 2018).

Numerous incidences of cyanobacterial proliferations have been recorded worldwide (Carmichael et al., 2001; Codd et al., 2005; Duong et al., 2012; Hu et al., 2017). Cyanobacteria can produce a variety of cyanotoxins, some of which have been implicated in mortality cases of aquatic and terrestrial wildlife (Wood, 2016). CyanoHABs can result in massive fish kills in the order of hundreds to thousands of individuals; these mortalities may result not only from toxin ingestion, but also from apoxia and gill irritation (Wood et al., 2016; Huisman et al., 2018). Sudden mortality episodes resulting from cyanotoxin exposure have also been recorded in wild bird populations (Alonso-Andicoberry et al., 2002). Additionally, cyanotoxin intoxication can affect livestock and other domestic animals (Farrer et al., 2015; Wood, 2016).

Anatoxins are potent alkaloid neurotoxins (Farrer et al., 2015). Above a certain dose, anatoxins may induce paralysis, asphyxia, and death (Farrer et al., 2015; Health Canada, 2017). Cylindrospermopsin (CYN) is a toxic alkaloid with both hepatotoxic and cytotoxic effects (Chorus and Bartram, 1999; Chong et al., 2002; Falconer, 2004; Funari and Testai, 2008).

Microcystins (MCs) are cyclic heptapeptides with potent hepatotoxic effects. MC bioaccumulation in zebrafish gonads was also linked to reproductive toxicity at environmentally relevant concentrations (Chen et al., 2016). MCs are rapidly becoming a global issue for environmental health and public safety through contaminated drinking water, surface water, seafood, and other exposure routes (Asencio, 2013; Chen et al., 2009; Jochimsen et al., 1998; Peng et al., 2010; Wood, 2016). Higher liver cancer incidence in certain regions may be related to microcystin exposures (WHO, 2010; Greer et al., 2017).

Cyanopeptolins (CPs) and anabaenopeptins (APs) are non-ribosomal oligopeptides produced by a range of cyanobacterial species (Lenz et al., 2019; Mazur-Marzec et al., 2018).

CPs and APs are inhibitors of serine proteases and protein phosphatases (Spoof et al., 2016; Gademann and Portmann, 2008; Gademann et al., 2010; Gkelis et al., 2006). Exposure to CP-1020 was shown to induce neurotoxicity in zebrafish in the picomolar to nanomolar concentration ranges (Gademann et al., 2010; Faltermann et al., 2014). CP-1020 also showed lethal concentrations (LC_{50}) in the micromolar ranges in Anostraca crustaceans (Gademann et al., 2010). A recent study evaluated the comparative toxicity of cyanopeptolins (CYP-1007, CYP-1020, and CYP-1041), anabaenopeptins (AP-A, AP-B, AP-F), and MC-RR to the nematode *Caenorhabditis elegans* (Lenz et al., 2019). Under similar exposure conditions ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ or $0.01\text{--}0.014 \mu\text{M}$), anabaenopeptins presented the highest systemic toxicity among the tested cyanopeptides (Lenz et al., 2019).

Cyanobacterial toxins may bioaccumulate in aquatic wildlife at significant levels during CyanoHAB episodes (Deblois et al., 2008a; Peng et al., 2010; Rezaitabar et al., 2017) and may also transfer to riparian and terrestrial food webs (Moy et al., 2016). In a meta-analysis of microcystins in wild freshwater fish worldwide, Flores and collaborators (Flores et al., 2018) derived median MC concentrations of $1.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight in fish muscle ($n = 1035$). Adamovský et al. (2007) estimated bioconcentration factors of $0.57\text{--}1.1 \text{ L/kg}$ (muscle) and $7.8\text{--}12.8 \text{ L/kg}$ (liver) for three microcystins in silver carp and common carp. Different bioaccumulation propensity may be expected between MC variants (McCord et al., 2018) and among cyanotoxin classes. The assumptions have not been fully confirmed as limited bioaccumulation data are available except for total MCs via ELISA detection (Berry et al., 2011) and a few MC congeners such as MC-LR and MC-RR (Adamovský et al., 2007; Rezaitabar et al., 2017). Comparatively, there exist limited bioaccumulation data for other infrequently monitored cyanopeptides (Janssen, 2019). A recent survey of 16 lakes in Eastern Canada suggested the potential widespread presence of anabaenopeptins in bloom-impacted surface waters, at concentrations that could equate or surpass those of individual MCs (Roy-Lachapelle et al., 2019a). To what extent can the newly monitored cyanotoxins bioaccumulate in wildlife appears an important research question, considering their potential toxicities (Lenz et al., 2019).

The freshwater ecosystem within the Pike River Ecological Reserve – Missisquoi Bay (Eastern Canada) represents a relevant study site to address the knowledge gaps. The pilot site has been the subject of intensive CyanoHAB monitoring activities from 2000 to 2017 by Quebec's Ministry of the Environment (Blais, 2019; Bowling et al., 2015). High cyanobacterial cell densities (median $\sim 100,000 \text{ cells mL}^{-1}$, maximum $\sim 1,000,000\text{--}5,000,000 \text{ cells mL}^{-1}$) were previously recorded in eastern Missisquoi Bay from August to October months (Blais, 2015),

and the blooms may spread several kilometers into the natural wildlife reserve. The present study aimed to document the occurrence of 18 cyanotoxins in 10 fish species from the Pike River Ecological Reserve and Missisquoi Bay (QC, Canada). The target compounds included anatoxin-a (ANA-a) and homoanatoxin-a (HANA-a), cylindrospermopsin (CYN), 12 microcystins, cyanopeptolin A (CP-A), and anabaenopeptins (AP-A, AP-B). Cyanotoxin concentrations were recorded in surface water (n = 17) and fish (n = 71) during a CyanoHAB episode that occurred during the late summer 2018, and a health risk assessment was performed. To the best of our knowledge, this study is the first to report on the accumulation of anabaenopeptins in wildlife.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Chemicals and standards

Native standards of anatoxin-a (ANA-a), cylindrospermopsin (CYN), microcystin-LR (MC-LR), [Asp³]MC-LR and MC-RR (purity ≥ 99%) were purchased from the National Research Council of Canada (Halifax, NS, Canada). Cyanopeptolin A (CP-A), [Asp³]MC-RR, MC-YR, MC-LA, MC-LY, MC-LW, MC-LF, MC-WR, MC-HtyR and MC-HilR (purity ≥ 95%) were purchased from Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA). Homoanatoxin-a (HANA-a, purity ≥ 99%) was obtained from Abraxis, Inc (Warminster, PA, USA). Anabaenopeptins A and B (AP-A, AP-B, purity ≥ 90%) were from Cyano Biotech GmbH (Berlin, Germany). MC-LR-¹⁵N₁₀ (95%) from Cambridge Isotopes Laboratories, Inc. (Tewksbury, MA, USA) and CYN-¹⁵N₅ (purity ≥ 95%) from Abraxis, Inc. (Warminster, PA, USA) were the isotope-labelled internal standards used in the present study. Organic solvents and water of HPLC grade quality were obtained from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). Acrodisc GH Polypro filters (GHP filters, 25 mm diameter, 0.2 µm pore size) were purchased from Waters (Milford, MA, U.S.A.) and polyethylene terephthalate glycol-modified (PETG) bottles (60-mL, amber) from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada).

5.2.2 Site description

The Pike River (*Rivière aux Brochets*) drains a watershed of *circa* 630 km² (Deslandes et al., 2002). The river originates near the town of Frelighsburg (QC, Canada) and flows over 67 km in general northwestward and southwestward directions prior discharging into Missisquoi Bay, Lake Champlain's northeast arm. The Pike River Ecological Reserve is situated near the river mouth discharge into Missisquoi Bay, about 3 km to the East of Venise-en-Québec and 3 km to the North of Philipsburg littoral. The Pike River Ecological Reserve and Missisquoi Bay are home to an iconic wildlife, including turtles (*Apalonespinifera*,

Graptemysgeographica), fishes, amphibians, and waterfowl. Some of these species were classified as threatened (vulnerable or endangered) by COSEWIC (*Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada*). Although the past decades have seen significant improvements in certain water quality parameters in the Pike River (Simoneau, 2019), exceedances to the phosphorus quality criterion for preventing riverine eutrophication were still observed (OBVBM and Amphibia-Nature, 2014).

The ichthyofauna present in the Pike River Ecological Reserve – Missisquoi Bay area may already suffer from community shifts, biodiversity losses, and high rates of morphological anomalies (Levine et al., 2012). Increasing water temperatures during the summer season can also lower dissolved oxygen levels and contribute to the accelerated growth of cyanobacteria. At least 15 cyanobacterial taxa considered as potentially toxic were identified in Missisquoi Bay during CyanoHABs in 2000-2014 (Blais, 2015; Blais, 2019; Bowling et al., 2015). Of these, some were repeatedly observed across years including *Aphanizomenonflos-aquae*, *Dolichospermumflos-aquae*, *Dolichospermumspiroides*, *Gloeotrichiaechinulata*, and *Microcystis aeruginosa* (Blais, 2019; Bowling et al., 2015).

5.2.3 Sampling

The Pike River Ecological Reserve is situated near the river mouth discharge into Missisquoi Bay, the northeast arm of Lake Champlain (**Figure 5-1**). Further details on the study site are provided in the Supporting Information (**SI Text S5-1**).

Sampling was conducted in the 2018 late summer season (August–October) at various monitoring stations within the Pike River Ecological Reserve – Missisquoi Bay (**Figure 5-1**). Approval and authorization to access the sampling sites were obtained from Quebec’s Ministère du Développement Durable, de l’Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC), and sampling was conducted with assistance of Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP). The CDEA-F1 form defining the number and types of fishes to be collected was also approved by the Comité de déontologie de l’expérimentation sur les animaux (Université de Montréal’s animal ethics committee). Surface water samples were collected in the Pike River Ecological Reserve and northern part of Missisquoi Bay near the Pike River mouth approximately once per week from August 2018–October 2018. Surface water samples for cyanotoxin analysis were collected by boat using 60- mL PETG bottles (Kamp et al., 2016). At each site, the PETG bottles were rinsed three times with the site surface water, filled to the brim and sealed, and frozen on site using a refrigerant spray device applied to the outer part of the bottle (Dinh et al., 2020). The bottles were kept frozen in a cooling box containing dry ice and transported to the analytical laboratory facilities within 12–24h.

A total of 71 fishes from 10 species, including northern pike (*Esox lucius*, ESLU), brown bullhead (*Ameiurus nebulosus* (*Ictalurus nebulosus*), AMNE), carp (*Cyprinus carpio*, CYCA), yellow perch (*Perca flavescens*, PEFL), golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*, NOCR), white sucker (*Catostomus commersonii*, CACO), smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*, MIDO), black crappie (*Pomoxis nigromaculatus*, PONI), rock bass (*Ambloplites rupestris*, AMRU) and tench (*Tinca tinca*, TITI), were collected by seine or gillnets. Further details on fish characteristics, including dates of sample collections, are provided in SI (**Table S5-1**). Following euthanasia, the fish were placed each in a labelled resealable Ziploc bag, stored in a cooling box with dry ice, and transported to the analytical laboratory facilities within 12–24h. The fish were measured and weighed prior storage at - 20 °C until sample preparation and analysis.



Figure 5-1. General location of the surveyed area and spatial distribution of the sampling sites within the Pike River Ecological Reserve and Missisquoi Bay (Quebec, Canada) (OBVBM, Amphibia-Nature, 2014).

5.2.4 Sample preparation

5.2.4.1 Surface water

Sample preparation of surface water samples was conducted as described in Roy-Lachapelle et al. (2019a). A 1.5-mL sample aliquot was introduced into a 2-mL amber glass vial amended with isotope-labelled internal standards ($^{15}\text{N}_{10}$ -MC-LR and $^{15}\text{N}_5$ -CYN) for a concentration of 200 ng L⁻¹. Following brief vortexing, 1 mL of the sample was submitted to instrumental analysis.

5.2.4.2 Fish muscle

Fish samples were dissected, and the muscle was retrieved. For each individual sample, the muscle was crushed and homogenized using a mixer or a mortar, depending on fish size. The mixer, mortar and other preparation equipment were thoroughly cleaned with Kimwipes, rinsed with HPLC grade water and acetone, and dried between each sample to avoid cross-contamination.

For each fish muscle sample, 500 mg of tissue (wet weight) was weighed in a 15-mL polypropylene tube and amended with 150 μL of a mixture of isotope-labelled internal standards containing 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ of MC-LR- $^{15}\text{N}_{10}$ and 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ of CYN- $^{15}\text{N}_5$. After a 1h equilibration time, 4 mL of methanol were added to the samples and submitted to high-speed vortexing (3200 rpm, 1 min). The samples were ultrasonicated for 15 min followed by centrifugation (6000 rpm, 10 min). The supernatant was introduced in a new 15-mL polypropylene tube, and the fish muscle was re-extracted twice as previously described (3 extraction cycles in total). The combined supernatants were concentrated to 4 mL under a gentle stream of nitrogen (N_2) and moderate heating (40 °C). The samples were then frozen for 2h at -20 °C followed by centrifugation at 6000 rpm for 10 min (defatting step). The supernatants were evaporated to dryness (N_2 , 40 °C), reconstituted in 2 mL of HPLC-grade water, vortexed (2500 rpm, 1 min), and ultrasonicated (5 min) to ensure complete analyte redissolution. The samples were filtered onto GHP (hydrophilic polypropylene) 0.2 μm Acrodisk syringe filters and the filtrate (~1.6 mL) was collected in a 2-mL amber glass vial. A volume of 1 mL of the clean extract was then submitted to instrumental analysis.

5.2.5 Instrumental analysis

Analysis was performed using on-line solid-phase extraction hyphenated to ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (on-line SPE-UHPLC-MS/MS) through a positive mode electrospray ionization source (Munoz et al., 2017; Zhang et al., 2020). The on-line SPE was conducted with a Hypersil Gold aQ C18 column (20 mm \times 2.1 mm, particle size 12 μm). The on-line SPE mobile phases were 0.1% formic acid in HPLC water (A) and 0.1% formic acid in methanol (B). The injection volume was 1 mL. After sample loading, the aqueous mobile phase was left to flow for an additional 0.5 mL through the on-line SPE column for additional matrix removal (wash step) (Munoz et al., 2017). Elution of the targeted analytes from the on-line SPE column to the analytical column then proceeded as follows. Analytes were transferred to the separation column using the analytical pump gradient. The analytical mobile phase flowrate was set at 525 mL min^{-1} . The analytical mobile phases

were 0.1% formic acid in HPLC-water (A), 0.1% formic acid in methanol (B), and 0.1% formic acid in acetonitrile (C). Analyte separation was carried out with a Thermo Hypersil Gold C18 column (100 mm × 2.1 mm, particle size 1.9 μm) from Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, U.S.A.). The column was thermostated at 55 °C and equipped with a 0.2 μm column pre-filter. Details on the gradient program are summarized in SI (**Table S5-2**).

Detection was conducted using a TSQ Quantiva triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) operated in Selected Reaction Monitoring (SRM) mode. Two MS/MS transitions were monitored for each compound for quantification and qualification. Processing of LC-MS/MS data was performed using the Xcalibur 3.0 software (Thermo Scientific). The parameters of the heated-ESI source were set as follows: vaporizer temperature 400 °C, ion transfer tube temperature 350 °C, sheath gas 35 (arbitrary units), auxiliary gas 20 (arbitrary units), sweep gas 0 (arbitrary units), spray voltage +3600 V. The scanning time was set at 20 ms. The first and third quadrupoles (Q1 and Q3) were operated at unit resolution (0.7 Da FWHM). The collision gas pressure was set at 2 mTorr. Compound-dependent MS/MS parameters are provided in SI (**Table S5-3**).

5.2.6 Method validation and quality assurance/quality control

Analytical method validation was conducted following literature guidelines (Meriluoto et al., 2017; Turner et al., 2018). Different validation parameters were determined including method detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ), linearity, accuracy, and precision. The method validation for surface water was described in detail in our recent study (Roy-Lachapelle et al., 2019a) and is summarized as follows. The complex chromatographic gradient applied allowed chromatographic separation of ANA-a with its isobaric interference phenylalanine commonly detected in algal blooms (Fayad et al., 2015). Method limits of detection in surface water were in the range of 8-50 ng L⁻¹. Calibration curves were constructed in surface water matrix with determination coefficients (R^2) >0.9950. When concentrations in field samples exceeded the upper bound, the samples were newly prepared and analyzed applying a dilution factor. Replicate surface water samples spiked at 200 ng L⁻¹ (n = 5) had accuracy within 80-120% and relative standard deviations (RSDs) within 2.5-16% (Roy-Lachapelle et al., 2019a).

Validation endpoints were also evaluated in fish matrix using the herein developed procedure (**Table 5-1**). A blank fish matrix (haddock muscle, *Melanogrammus aeglefinus*) purchased from the supermarket was used for this purpose. Calibration curves were constructed in blank fish matrix by adding native analytes (a mixture of 18 cyanotoxins) at 8 levels ranging

from 0.05-250 $\mu\text{g kg}^{-1}$, while isotope-labelled internal standards were added at a concentration identical to that of the field samples. Calibration curves were produced with suitable linearity and determination coefficients R^2 between 0.9930-0.9998 (**Table 5-1**). The LOD/LOQ were estimated from two parallel approaches. In the first method, the LOD was defined as the minimum analyte concentration yielding identifiable MS/MS peaks with a signal-to-noise (S/N) ratio of ≥ 3 . These values were estimated by the graphical approach using low-end calibration curve levels. The LOQ was then defined as the minimum analyte concentration producing peaks with S/N ratio ≥ 10 with suitable precision. In the second method, we applied the EURACHEM procedure, wherein replicates ($n = 10$) of blank fish matrix were spiked at low level with analytes ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$). The LOD was derived as three times the standard deviation of the measured concentrations, and the LOQ as ten times the standard deviation (EURACHEM 2014 validation guide). The reported LOD/LOQ thus correspond to the S/N or EURACHEM value, whichever was greater (**Table 5-1**).

The accuracy of the whole method was evaluated at a spike level of $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ in fish matrix in triplicate (**Table 5-1**; see also SI **Table S5-4**). Native analytes and isotope-labelled internal standards were both added prior the start of the solvent extraction from fish matrix. The accuracy % was derived from the quantified concentration divided by the theoretically spiked concentration. Accuracy in fish matrix ranged between 83.2-109.8%, depending on the particular cyanotoxin. The accuracy performance is within the 70-130% acceptance range set by U.S. EPA methods (e.g., Shoemaker et al., 2015 (EPA Method 544, Determination of Microcystins and Nodularins by LC-MS/MS)). Due to the large number of screened samples ($N = 71$), it was beyond the scope of the present study to evaluate how relative matrix effects could vary between individual samples, as this would have implied to perform detailed standard additions. Though the matrix-matched calibration curve was constructed using a model fish matrix, one potential limitation is the reduced number of cyanotoxin isotopologs available for internal compensation.

Precision was derived from the RSD% of area ratios in blank fish replicates spiked at $40 \mu\text{g kg}^{-1}$. Cyanotoxin standards and isotope-labelled internal standards were both added prior solvent extraction, thus corresponding to the overall precision of sample preparation and instrumental analysis. Intraday precision ($n = 3$) ranged from 1.8 to 11.4% and interday precision ($n = 9$) from 7.2 to 25.5% (**Table 5-1**), within the set acceptance criterion of $<30\%$ (European Commission, 2010).

We investigated whether there might be analyte losses due to reconstitution of fish extracts in pure water prior analysis. Among six replicates of fish organic solvent extracts, three

replicates were spiked before evaporation and reconstitution with a cyanotoxin mix, while another three replicates were spiked after evaporation and reconstitution with an equivalent amount. Absolute recoveries ranged between 82.1 and 122.4% (SI **Table S5-5**), indicating limited influence of this step.

The identification of target analytes relied on matching retention times (± 0.1 min) with authentic standards in calibration curves, detectable peaks for quantification (QT) and confirmation (CT) MS/MS transitions, and QT/CT relative intensities that should not deviate more than $\pm 30\%$ from the average in calibration curve levels (European Commission, 2017). The calculation of concentrations in field samples was derived from the native analyte to internal standard area ratio in the sample and the calibration curve regression in surface water or fish muscle matrix. An illustration of the chromatographic performance of the targeted cyanotoxins in spiked haddock muscle is provided in SI (**Figure S5-1**).

HPLC water injection blanks were injected at the beginning of each LC-MS batch sequence and after calibration curve standards to control the absence of carryover. Method blanks were executed for each sample batch, consisting of HPLC-water (for surface water procedure) and blank haddock muscle (for fish procedure) spiked with internal standards and submitted to the same procedures detailed in sections 5.2.4.1 and 5.2.4.2. None of the targeted cyanotoxins were detected in injection blanks nor in method blanks.

Table 5-1. Analytical method validation in spiked fish muscle matrix, including linearity (R^2), method detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ), and whole-method accuracy % and precision (intraday/interday) for the 18 targeted cyanotoxins.

	R^2	LOD	LOQ	Accuracy	Intraday Precision	Interday precision
		($\mu\text{g kg}^{-1}$)	($\mu\text{g kg}^{-1}$)	(%)	RSD% (n=3)	RSD% (n=9)
CYN	0.9950	2.5 ^a	8.3 ^a	88.9	3.4	10.7
ANA-A	0.9955	10.0 ^a	33 ^a	97.8	1.8	19.0
HANA-A	0.9998	0.3 ^a	1.0 ^a	92.6	7.4	19.2
CP-A	0.9982	0.5 ^a	1.7 ^a	90.8	7.0	13.7
AP-A	0.9930	1.1 ^a	3.7 ^a	83.2	7.9	25.4
AP-B	0.9995	0.1 ^b	0.3 ^b	107.2	11.4	20.6
MC-RR	0.9941	1.1 ^a	3.5 ^a	107.9	6.0	25.5
MC-LR	0.9995	0.4 ^b	1.3 ^b	109.8	5.8	12.7
MC-LA	0.9992	0.2 ^a	0.6 ^a	95.0	8.4	7.2
MC-YR	0.9983	0.5 ^a	1.7 ^a	95.8	5.0	21.6
MC-WR	0.9987	1.2 ^b	4.0 ^b	92.0	8.3	10.8
[D-Asp ³]MC-RR	0.9979	3.0 ^a	10 ^a	83.6	6.2	24.5
[D-Asp ³]MC-LR	0.9997	0.6 ^b	2.0 ^b	103.7	8.0	13.8
MC-HilR	0.9989	0.7 ^b	2.3 ^b	93.4	5.9	8.2
MC-LY	0.9991	0.1 ^b	0.3 ^b	91.0	5.3	12.3
MC-HtyR	0.9994	3.0 ^b	10 ^b	93.2	4.7	17.8
MC-LW	0.9995	0.25 ^a	0.8 ^a	87.5	2.2	10.7
MC-LF	0.9993	2.6 ^b	8.5 ^b	95.6	3.3	8.1

Linearity range: LOQ-250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for all cyanotoxins. LOD/LOQ were calculated based either on the S/N method or the EURACHEM method, whichever was greater.

^a S/N method.

^b EURACHEM method.

5.3 Results

5.3.1 Occurrence and levels of cyanotoxins in surface water

Of the 18 targeted cyanotoxins, 14 were variously detected in the surface water samples (Table 5-2). Summed concentrations of targeted microcystins (ΣMCs) were <LOD in August but increased at several stations in early-mid September to reach 1000–7000 ng L^{-1} levels. By end-October/early-November, ΣMCs concentrations had receded to near-background levels (<LOD to $\sim 50 \text{ ng L}^{-1}$). The MCs present at highest concentrations included MC-LR (max: 3800 ng L^{-1}) and MC-RR (2900 ng L^{-1}), and to a lower extent MC-LA (320 ng L^{-1}), MC-YR (290 ng L^{-1}), MC-WR (140 ng L^{-1}), and [D-Asp³]MC-LR (120 ng L^{-1}). Other microcystins with few detections and lower concentrations (<LOQ-80 ng L^{-1}) included MC-HilR, MC-LY, MC-LW, and MC-LF. Anatoxin-a was detected in 5/17 samples (maximum: 70 ng L^{-1}) and homoanatoxin-a detected with similar frequency but at concentrations remaining below the method LOQ at 36 ng L^{-1} . Nearly half of the samples had detectable levels of either AP-A or

AP-B. Concentrations of anabaenopeptins A and B in positive surface water samples were in the range of 31–70 and 10–76 ng L⁻¹, respectively.

Table 5-2. Summary of cyanotoxin concentration ranges in surface waters (n = 17, ng L⁻¹) and fish muscle samples (n = 71, µg kg⁻¹ wet weight) with positive detections.

	Surface water (ng L ⁻¹)		Fish muscle (µg kg ⁻¹ w.w.)	
	n = 17		n = 71	
	min	max	min	max
CYN	-	-	46	75
ANA-a	31	70	-	-
HANA-a	22	25	-	-
AP-A	31	70	1.1	5.4
AP-B	9.2	76	0.01	5.0
MC-RR	14	2900	7.8	9.2
MC-LR	25	3800	0.41	0.51
MC-LA	11	320	-	-
MC-YR	33	290	-	-
MC-WR	-	140	-	-
[D-Asp ³]MC-LR	14	120	-	-
MC-HiIR	-	83	-	-
MC-LY	-	54	0.16	0.77
MC-LW	-	43	-	1.2
MC-LF	-	19	-	-

5.3.2 Occurrence and levels of cyanotoxins in wild-caught fish

Cyanotoxins concentration ranges in fish muscle samples (n = 71) are summarized in **Table 5-2** (see also SI **Table S5-6**). Overall, 30% of the fish samples were positive to at least one cyanotoxin and 17% of fish samples were positive to at least one microcystin. MC-LR, MC-RR, MC-LW, MC-LY and CYN were detected with overall low occurrence frequencies (3-14%), and 8% of the samples had detectable levels of AP-A or AP-B.

The concentration of summed microcystins (ΣMCs) in positive samples was in the range of 0.16-9.2 µg kg⁻¹. Microcystin-LR (MC-LR) was detected in two *Perca flavescens* samples with concentrations of 0.41 and 0.51 µg kg⁻¹. MC-RR was detected in two *Ambloplites rupestris* samples with concentrations of 9.2 and 7.8 µg kg⁻¹. MC-LY was detected at sub µg kg⁻¹ concentrations (0.13-0.77 µg kg⁻¹) in ten samples from five fish species.

Cylindrospermopsin (CYN) was detected in *Ambloplites rupestris* and *Perca flavescens* samples with concentration ranges of 46-75 µg kg⁻¹. Anatoxin-a was not detected in any fish sample. Anabaenopeptin B was detected in 5 samples from three fish species with concentrations below 5.0 µg kg⁻¹. An illustration of the LC-MS/MS chromatograms of AP-B in this sample is provided in **Figure.5-2**, showing intense signals for both quantitation and confirmation MS/MS ions, and agreement of their intensity ratio compared to the calibration curve reference.

Positive detection of two cyanotoxins in the same fish individual was confirmed in five out of 27 positive samples: CYN and MC-RR in a sample of *Ambloplites rupestris*, MC-LY and MC-LW in a sample of *Ameiurus nebulosus*, MC-LR and MC-LY in two samples of *Perca flavescens*, and AP-B and AP-A in a sample of *Tinca tinca*.

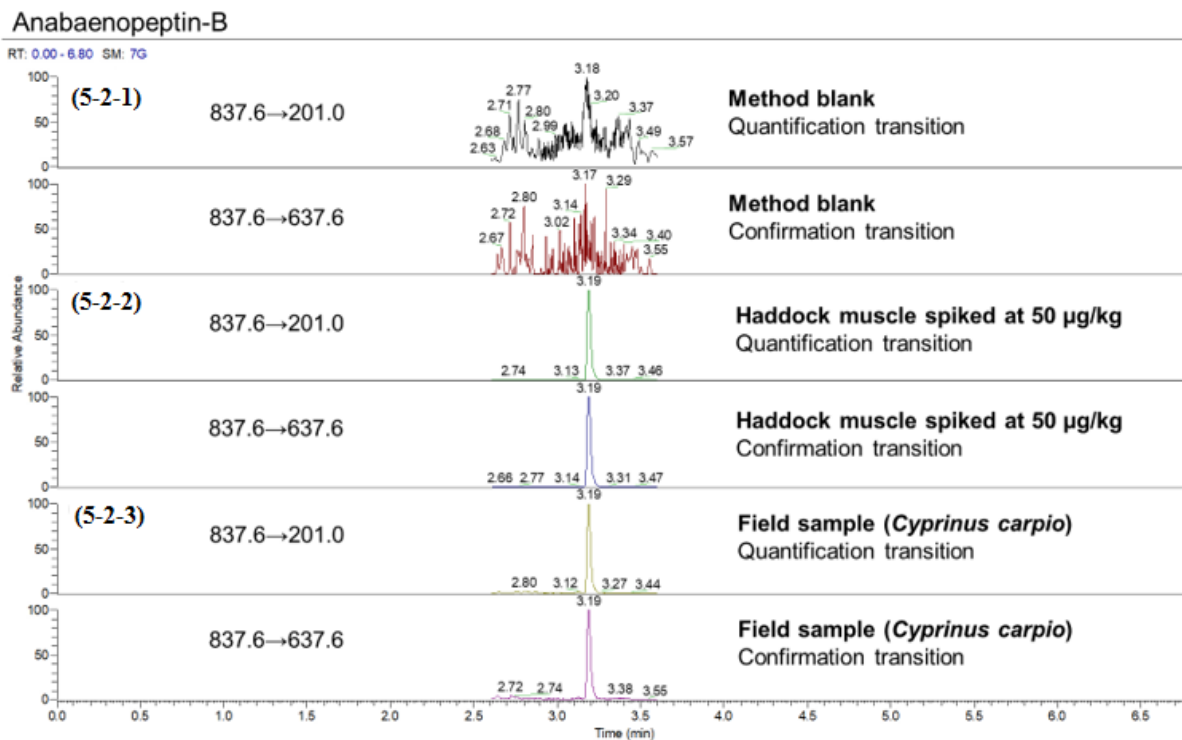


Figure 5-2. LC-MS/MS chromatograms of anabaenopeptin-B (retention time: 3.19 min; quantification transition: 837.6 → 201.0; confirmation transition: 837.6 → 637.6) in method blank (5-2-1), in blank fish matrix (haddock muscle, *Melanogrammus aeglefinus*) spiked at 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (5-2-2), and in a field-collected carp sample (*Cyprinus carpio*) from the present survey (5-2-3). NL refers to absolute signal height.

5.4 Discussion

5.4.1 Comparison with literature data

5.4.1.1 Surface water

The surface water samples from the present survey were collected close to cyanobacterial blooms but not directly within the scums formed on the littoral; hence, low to moderate levels of cyanotoxins were observed in agreement with previous surveys at this and other sampling locations worldwide (Blais, 2015; Pham and Utsumi, 2018). The ΣMCs of CyanoHAB impacted lakes are generally below 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the water column (Pham and Utsumi, 2018), while much lower levels are expected for rivers (Graham et al., 2020). As part of a nationwide reconnaissance survey conducted by the U.S. EPA across 1161 lakes, microcystins were detected in 31% of surface water samples with a mean ΣMC concentration

of $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$ in positive samples (Loftin et al., 2016). The results from the present survey in the Pike River Ecological Reserve and Missisquoi Bay fall within this range and are also in agreement with a Canadian survey across lakes in the 2018 summer season (ΣMCs range: $0.05\text{--}4.1 \mu\text{g L}^{-1}$) (Roy-Lachapelle et al., 2019a).

In Canada, limited data are available on the levels of toxic alkaloids in natural waters affected by cyanobacterial blooms (Health Canada, 2017). Overall low concentrations of anatoxin-a were reported in bloom-impacted surface water samples from the present survey, with a maximum concentration at $0.07 \mu\text{g L}^{-1}$. This falls within the range of values reported in previous surveys of U.S. rivers ($0.10 \mu\text{g L}^{-1}$) and lakes in Qu'ebec and Ontario ($0.02\text{--}0.08 \mu\text{g L}^{-1}$) (Graham et al., 2020; Roy-Lachapelle et al., 2019a).

The two targeted anabaenopeptins, AP-A and AP-B, were the most frequently detected cyanotoxins in water samples from the present survey. There are not many reports of anabaenopeptins in environmental surface water samples. A previous Canadian survey indicated positive detections of either AP-A or AP-B in six out of 16 monitored lakes; one site in Eastern Townships (QC, Canada) displayed $\Sigma\text{APs} \sim 18 \mu\text{g L}^{-1}$ (Roy-Lachapelle et al., 2019a). A study of 36 freshwater lakes and reservoirs in Greece showed the presence of anabaenopeptins in 18.2% of the analyzed samples and the total content of intracellular anabaenopeptins (ΣAPs) varied from undetectable to $1730 \mu\text{g L}^{-1}$ (Gkelis et al., 2015). Anabaenopeptin B was predominant over AP-A in most samples, with a mean contribution to ΣAPs of 77% (Gkelis et al., 2015). In Lake Averno, Italy, anabaenopeptins B and F were reported while microcystins were not detected (Ferranti et al., 2008). Even higher concentrations may be reported in future surveys using expanded analytical methods covering suspect-target and non-target AP congeners (Roy-Lachapelle et al., 2019b). Given their suspected systemic toxicity (Lenz et al., 2019), the occurrence of these infrequently monitored cyanopeptides is of concern and calls for further monitoring and ecotoxicological studies.

5.4.1.2 Fish muscle

The MC concentrations from 10 fish species in the present survey was in the lower concentration range compared to concentrations reported in other studies (SI **Table S5-7**). MCs were found between $2\text{--}680 \mu\text{g kg}^{-1}$ in tilapia (*Coptodon rendalli*) (Magalhaes et al., 2001; Soares et al., 2004) and carp (*Cyprinus carpio*) samples (Amrani et al., 2014). MC-LR was reported in the range of $10\text{--}41 \mu\text{g kg}^{-1}$ in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Rezaitabar et al., 2017), and $5\text{--}16 \mu\text{g kg}^{-1}$ in walleye (*Sander vitreus*) (Manubolu et al., 2018; Mohamed et al., 2018). The maximum ΣMC in fish from the present study at $9.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ is higher than the

median ($1.4 \mu\text{g kg}^{-1}$) from 1035 fish muscle data compiled by Flores et al., but about 300 times lower than the maximum reported in literature (Flores et al., 2018).

Comparatively fewer reports are available regarding the occurrence of cylindrospermopsin in fish. The herein reported CYN concentrations are about one order of magnitude higher than the maximum in fish muscle ($4.1 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 11$) from literature data (Flores et al., 2018). Different results may be due to several factors that influence the concentrations of cyanotoxins in fish such as the concentration of the specific toxin in the environment in combination with the period of exposure and fish metabolic processes (Jia et al., 2014; Gurbuz et al., 2016). The types of tissues targeted for analysis, and fish feeding behavior and trophic ecology, can also explain the variability between studies. Different analytical method performance, including effective extraction recovery and matrix effects, is another potential confounder of variability in reported concentrations between studies.

There is also limited or no information as regards the occurrence of anabaenopeptins in wildlife. A previous survey on microcystins in aquatic fauna from Greek freshwaters suspected the concomitant presence of anabaenopeptins and anabaenopeptilides in samples, based on the examination of HPLC-UV chromatograms and UV spectra (Gkelis et al., 2006). To date and to our knowledge, this is the first known study to confirm the detection of anabaenopeptin A (AP-A) and anabaenopeptin B (AP-B) in wildlife using LC-MS.

5.4.2 Human health risk assessment through fish consumption

Recreational tourism is well developed in the municipalities along Missisquoi Bay (e.g., Venise-en-Québec), with a range of outdoor activities including fishing and boating. Beaches may be closed during intense cyanobacterial blooms implying economic losses (EXXEP, 2004), and anglers may be at risk from cyanotoxin exposure through the consumption of wild-caught fish or even from skin contact with contaminated water (Lévesque et al., 2015).

Based on the studies by Humpage and Falconer (2002, 2003) and Heinze (1999), it is also possible to derive the values for health recommendations for cylindrospermopsin and microcystins present in fish. The steps are described in detail in the SI **Text S5-2** (Mulvennaet al., 2012).

In this study, the safety related to fish consumption (muscle samples) can be assessed based on these guideline values. The concentrations of MCs in fish muscle samples are between 0.16 and $9.19 \mu\text{g kg}^{-1}$. For an adult, the maximum concentration of MCs in fish ($9.19 \mu\text{g kg}^{-1}$) represents an estimated daily intake of $0.034 \mu\text{g kg}^{-1}$ of body weight. This is 0.85 times lower than the TDI value = $0.05 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ suggested by our derivation of the health guide

values for microcystins. For a young child (weighing 18.6 kg and ingesting 100 g of fish muscle), the maximum concentration of MCs ($9.19 \mu\text{g kg}^{-1}$) in fish muscle represents an estimated daily intake of $0.049 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight. It is almost equal to the derived TDI value = $0.05 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$.

Cylindrospermopsin (CYN) was detected in four fish samples. For an adult, CYN concentration values would correspond to daily intakes of $0.17\text{-}0.28 \mu\text{g kg}^{-1}$ of body weight. The minimum of these values is 1.7 time greater than the limit from our derivation of health guide values for cylindrospermopsin (TDI = $0.1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$). For a young child (same assumptions as above), the minimum concentration of cylindrospermopsin in fish muscle samples represents a daily intake of $0.25 \mu\text{g kg}^{-1}$ body weight. This value is 2.5 times higher than the TDI value = $0.1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$.

5.5 Conclusions

The surface water samples from the present survey followed similar trends as cyanoHAB-impacted ecosystems in Northern America, with peak concentrations of MC-LR (and MC-RR) about 1–2 orders of magnitude higher than those of other detected MC variants. A wider variety of cyanotoxins was, however, identified in this study, including some rarely monitored cyanopeptides (anabaenopeptins AP-A and AP-B). Anabaenopeptins, anabaenopeptilides, and other related toxins may be increasingly reported in bloom-impacted freshwater lakes worldwide, as analytical methods previously developed for microcystins may successfully be expanded to include these structurally related cyanopeptides.

The present study also confirmed the presence of multiple cyanotoxins in Cyano-HAB impacted biota, targeting 71 fish samples from 10 species contemporaneously collected along the surface water samples.

Although present at the highest concentrations in surface water among targeted cyanotoxins, microcystins (MC-LR, MC-RR) were only occasionally detected in fish from the Pike River Ecological Reserve. The results agree with the relatively low MC bioaccumulation factors experimentally determined in fish (Adamovský et al., 2007). Anabaenopeptins AP-A and AP-B were found at similar or higher concentration ranges than MCs in fish muscle, despite lower water exposure concentrations. This may indicate a higher accumulation propensity. This study is also the first to confirm the occurrence of anabaenopeptins in wildlife. The organotropism of anabaenopeptins is currently unknown but based on structural similarities with MCs, higher accumulation may be expected in protein-rich tissues including liver, kidney,

and blood. Future studies should also consider the trophic transfer of toxic cyanopeptides through food webs, including ecotoxicological impacts to piscivorous birds and mammals.

A preliminary human health risk assessment was performed, based on the consumption of fish muscle, and several of the samples neared or surpassed the derived guidelines for MCs and cylindrospermopsin. Health risk assessments remain a challenge due to the lack of available criteria for many cyanotoxins; several toxins are often present simultaneously and little is known about their potential interactions. Due to the current lack of analytical standards, cyanotoxin-associated risks may be underestimated. Future research endeavors involving non-target high-resolution mass spectrometry are needed to identify other potentially relevant cyanotoxins not currently included in monitoring lists.

5.6 Acknowledgments

This study was carried out as part of the ATRAPP project (*Algal Blooms, Treatment, Risk Assessment, Prediction and Prevention through Genomics*) financed by Genome Canada/Génomique Québec, and as part of the *Impacts actuels et appréhendés pour 2050 des fleurs d'eau de cyanobactéries (CYANO) et des cyanotoxines sur différents organismes fauniques de la baie Missisquoi et de la réserve écologique de la Rivière-aux-Brochets*, financed by the OURANOS consortium. We thank Bert Klein, Simon Bellefleur and Lyne Bouthillier from the Quebec *Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs* (MFFP) for their contribution to this study. We also thank Alejandra Guitron (Université de Montréal) for the administrative input in the sampling project. We acknowledge technical support from Thermo Fisher Scientific.

5.7 Supplementary Information

Table S5-1. Details on fish samples caught at different sampling locations in the Pike River (Lake Champlain, QC, Canada)

Code	Scientific name	Common names	N°	Date	Site name	Capture mode	Size (cm)	Weight (g)
AMRU	<i>Ambloplites rupestris</i>	Rock bass	1	03/10/2018	S4	Net	19.7	154
			2	04/10/2018	SC1	Net	20.3	166.4
			3	04/10/2018			13.3	49.5
			4	04/10/2018			17.9	105
			5	04/10/2018			13.9	67.1
			6	04/10/2018			14.1	68
			7	04/10/2018			15.9	89.7
			8	04/10/2018			15.6	89.1
			9	04/10/2018			14.9	70.8
			10	04/10/2018			14.7	70.8
			11	04/10/2018			13.6	55.7
			12	04/10/2018			13.5	55.7
			13	04/10/2018			12.8	41.5
AMNE	<i>Ameiurus nebulosus (Ictalurus nebulosus)</i>	Brown bullhead	14	24/08/2018			S20	Net
CACO	<i>Catostomus commersonii</i>	White sucker	15	02/10/2018	S2	Net	9.8	10.4
CYCA	<i>Cyprinus carpio</i>	Common carp	16	24/08/2018	S20	Net	17.3	91.6
ESLU	<i>Esox lucius</i>	Northern Pike	17	24/08/2018				
			18	30/08/2018	F04	Gillnet	881	4073
			19	30/08/2018			709	2019
			20	30/08/2018			667	1993
			21	30/08/2018			650	1842
			22	30/08/2018			646	1716
			23	30/08/2018			719	2344
			24	30/08/2018			799	2671
			25	30/08/2018			563	1200
			26	04/10/2018			SC1	Net
			27	04/10/2018	33.9	283.3		
MIDO	<i>Micropterus dolomieu</i>	Smallmouth ed bass	28	30/08/2018	F04	Gillnet	357	630.9
			29	30/08/2018			303	376.7
			30	30/08/2018			308	368.1
			31	30/08/2018			212	113.2
			32	02/10/2018	S2	Net	36.5	936.8
			33	02/10/2018			22.1	150
NOCR	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Golden shiner	34	24/08/2018	S20	Net	17.6	66.2
			35	24/08/2018			15.4	40.2
			36	24/08/2018			16.1	42.3
			37	24/08/2018			16.1	48.5
			38	24/08/2018			15.6	40

			39	24/08/2018			16.4	50.9
			40	24/08/2018			14.7	39.9
			41	24/08/2018			15.8	46.7
			42	24/08/2018			16.1	47
			43	24/08/2018			13.8	34.7
			44	04/10/2018	SC1	Net	15.1	34.2
			45	04/10/2018	SC1	Net	15.2	34.4
			46	04/10/2018			16.2	43.8
PEFL	<i>Perca flavescens</i>	Yellow perch	47	24/08/2018	S20	Net	17.2	58.9
			48	24/08/2018			12.3	23
			49	24/08/2018			14.9	33.4
			50	24/08/2018			12.7	23.5
			51	24/08/2018			14.1	26.9
			52	24/08/2018			13.9	29.5
			53	24/08/2018			14	31.2
			54	24/08/2018			13.5	24.6
			55	24/08/2018			12.1	20.5
			56	24/08/2018	11.8	16.5		
			57	30/08/2018	F04	Gillnet	187	67.2
			58	30/08/2018			200	90.5
			59	30/08/2018			198	66.5
			60	30/08/2018			184	76.4
61	30/08/2018	230	130.5					
			62	30/08/2018			200	84.4
			63	30/08/2018			250	169.9
			64	02/10/2018	S1	Net	22.2	112
			65	04/10/2018	SC1	Net	17.2	65.8
			66	04/10/2018			23.1	141.3
PONI	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>	Black crappie	67	03/10/2018	S4	Net	24.6	188.4
TITI	<i>Tinca tinca</i>	Tench	68	04/10/2018	SC1	Net	19.3	179.4
			69	04/10/2018			35.2	717.6
			70	04/10/2018			15.6	66
			71	04/10/2018			16.5	89.4

Table S5-2. Gradient elution program for preconcentration and separation of the targeted cyanotoxins by on-line SPE – UHPLC-MS/MS.

N°	Gradient Profile (analytical column)					Gradient Profile (on-line SPE)				Mobile Phases
	Time	A%	B%	C%	Flow rate (µl min ⁻¹)	Time	A%	B%	Flow rate (µl min ⁻¹)	
0	0.00	75	25	0	525	0.00	100	0	1500	A : H ₂ O + 0.1%FA
1	1.00	75	25	0	525	1.00	100	0	1500	
2	1.25	45	55	0	525	1.10	0	100	1500	B : MeOH + 0.1%FA
3	2.05	45	55	0	525	5.00	0	100	1500	
5	2.06	55	0	45	525	5.01	100	0	1500	C : ACN + 0.1%FA
5	3.85	55	0	45	525	8.00	100	0	1500	
6	5.55	5	0	95	525					
7	5.56	75	25	0	525					
8	8.00	75	25	0	525					

Table S5-3. Compound-dependent MS/MS acquisition parameters for the detection of the targeted cyanotoxins and associated isotope-labelled internal standards (IS).

Compounds	Retention time (min)	Experimental precursor mass (m/z)	Quantification fragment (m/z)	Confirmation fragment (m/z)	Q/C ions (%)	IS
CYN	2.23	416.1	193.9	336.1	69.0	CYN- ¹⁵ N ₅
ANA-A	2.28	166.2	149.0	131.1	70.6	CYN- ¹⁵ N ₅
HANA-A	2.38	180.2	163.1	145.1	59.8	CYN- ¹⁵ N ₅
AP-B	3.19	837.6	201.0	637.6	8.8	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
[D-Asp ³]MC-RR	3.88	513.0	499.0	445.7	95.5	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
MC-RR	3.89	519.9	134.9	510.0	0.6	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
AP-A	3.99	844.6	663.3	637.4	0.5	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
MC-YR	4.08	1045.5	135.0	1017.3	6.4	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
MC-HtyR	4.09	1059.6	599.4	617.3	85.8	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
MC-LR	4.15	995.6	134.8	553.1	39.7	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
[D-Asp ³]MC-LR	4.17	981.5	135.0	539.2	27.4	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
MC-WR	4.23	1068.7	626.3	1040.6	85.7	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
MC-HilR	4.24	1009.7	599.5	567.4	94.8	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
CA-P	4.38	957.6	939.6	726.5	45.8	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
MC-LA	5.57	910.5	776.3	402.1	57.9	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
MC-LY	5.69	1002.5	868.3	494.2	96.2	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
MC-LW	6.10	1025.5	517.2	891.3	81.3	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀
MC-LF	6.21	986.5	852.3	478.2	97.9	MC-LR- ¹⁵ N ₁₀

Table S5-4. Quantified concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of cyanotoxins spiked to haddock muscle quality control samples (nominal spiked concentration $40 \mu\text{g kg}^{-1}$).

	CYN	ANA-A	HANA-A	AP-B	dMC-RR	MC-RR	AP-A	MC-YR	MC-HtyR	MC-LR	dmMC-LR	MC-WR	MC-HiiR	CP-A	MC-LA	MC-LY	MC-LW	MC-LF
	Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)																	
QC1	35.5	38.5	38.4	39.4	31.5	40.8	33.7	37.2	36.2	41.2	38.6	33.5	34.9	33.4	36.2	35.7	35.9	38.9
QC2	36.8	39.0	38.9	48.4	35.6	45.9	35.7	40.5	39.3	46.3	45.1	37.4	38.2	38.2	41.7	38.6	34.6	39.1
QC3	34.4	39.9	33.9	40.7	33.2	42.8	30.5	37.2	36.3	44.2	40.7	39.5	39.1	37.3	36.1	34.9	34.5	36.8
Average	35.6	39.1	37.1	42.9	33.4	43.1	33.3	38.3	37.3	43.9	41.5	36.8	37.4	36.3	38.0	36.4	35.0	38.2
RSD%	3.4	1.8	7.4	11.4	6.2	6.0	7.9	5.0	4.7	5.8	8.0	8.3	5.9	7.0	8.4	5.3	2.2	3.3

Table S5-5. Absolute recovery % of cyanotoxins during the evaporation to dryness and reconstitution step in HPLC water.

	Recovery% (n = 3)	STDEV (n = 3)
CYN	105.9	8.4
ANA-A	114.5	5.2
HANA-A	93.5	2.7
CP-A	92.3	0.2
AP-A	101.0	2.7
AP-B	98.4	1.0
MC-RR	98.7	0.7
MC-LR	98.4	14.1
MC-LA	108.7	4.7
MC-YR	83.3	5.7
MC-WR	100.9	3.0
[D-Asp³]MC-RR	108.4	2.8
[D-Asp³]MC-LR	88.1	13.2
MC-HtyR	82.1	1.4
MC-HilR	95.8	2.1
MC-LY	112.4	6.4
MC-LW	122.4	17.5
MC-LF	112.1	14.8

Table S5-6. Quantified concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of cyanotoxins in field-collected fish samples ($n = 71$) from the present survey. **(S5-6-1) CYN, anatoxins, cyanopeptolin, and anabaenopeptins.**

Sample No	Species	CYN	ANA-A	HANA-A	CP-A	AP-A	AP-B
1		nd	nd	nd	nd	nd	nd
2		nd	nd	nd	nd	nd	nd
3		nd	nd	nd	nd	nd	nd
4		nd	nd	nd	nd	nd	nd
5		nd	nd	nd	nd	nd	0.28
6		nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	AMRU (Ambloplites rupestris)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8		47.0	nd	nd	nd	nd	nd
9		nd	nd	nd	nd	nd	nd
10		nd	nd	nd	nd	nd	nd
11		nd	nd	nd	nd	nd	nd
12		nd	nd	nd	nd	nd	nd
13		nd	nd	nd	nd	nd	nd
14	AMNE (Ameiurus nebulosus)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	CACO (Catostomus commersonii)	nd	nd	nd	nd	1.1	nd
16	CYCA (Cyprinus carpio)	nd	nd	nd	nd	nd	5.0
17	ESLU	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18	(Esox lucius)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
19		nd	nd	nd	nd	nd	nd
20		nd	nd	nd	nd	nd	nd
21		nd	nd	nd	nd	nd	nd
22		nd	nd	nd	nd	nd	nd
23		nd	nd	nd	nd	nd	nd
24		nd	nd	nd	nd	nd	nd
25		nd	nd	nd	nd	nd	nd
26		nd	nd	nd	nd	nd	nd
27		nd	nd	nd	nd	nd	nd
28	MIDO	nd	nd	nd	nd	nd	nd
29	(Micropterus dolomieu)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
30		nd	nd	nd	nd	nd	nd
31		nd	nd	nd	nd	nd	nd
32		nd	nd	nd	nd	nd	nd
33		nd	nd	nd	nd	nd	nd
34	NOCR (Notemigonus crysoleucas)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
35		nd	nd	nd	nd	nd	nd

36		nd	nd	nd	nd	nd	0.09
37		nd	nd	nd	nd	nd	nd
38		nd	nd	nd	nd	nd	nd
39		nd	nd	nd	nd	nd	nd
40		nd	nd	nd	nd	nd	0.02
41		nd	nd	nd	nd	nd	nd
42		nd	nd	nd	nd	nd	nd
43		nd	nd	nd	nd	nd	0.004
44		nd	nd	nd	nd	nd	0.005
45		nd	nd	nd	nd	nd	nd
46		nd	nd	nd	nd	nd	nd
47		nd	nd	nd	nd	nd	nd
48		nd	nd	nd	nd	nd	nd
49		nd	nd	nd	nd	nd	nd
50		nd	nd	nd	nd	nd	nd
51		nd	nd	nd	nd	nd	nd
52		nd	nd	nd	nd	nd	nd
53		nd	nd	nd	nd	nd	nd
54		48.7	nd	nd	nd	nd	nd
55		46.1	nd	nd	nd	nd	nd
56	PEFL (Perca flavescens)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
57		nd	nd	nd	nd	nd	nd
58		nd	nd	nd	nd	nd	nd
59		nd	nd	nd	nd	nd	nd
60		nd	nd	nd	nd	nd	nd
61		nd	nd	nd	nd	nd	0.01
62		75.3	nd	nd	nd	nd	nd
63		nd	nd	nd	nd	nd	nd
64		nd	nd	nd	nd	nd	nd
65		nd	nd	nd	nd	nd	nd
66	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
67	PONI (Pomoxis nigromaculatus)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
68	TITI	nd	nd	nd	nd	nd	0.14
69	(Tinca tinca)	nd	nd	nd	nd	nd	0.12
70		nd	nd	nd	nd	5.4	0.52
71		nd	nd	nd	nd	nd	0.08
Maximum ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		75.3	0	0	0	5.4	5.0
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		2.5	10	0.3	0.5	1.12	0.004

(nd: analyte not detected)

Table S5-6. Quantified concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$) of cyanotoxins in field-collected fish samples ($n = 71$) from the present survey. (S5-6-2) **Microcystins**

Sample No	Species	dMC-RR	MC-RR	MC-YR	MC-HtyR	MC-LR	dmMC-LR	MC-WR	MC-HiIR	MC-LA	MC-LY	MC-LW	MC-LF	
1		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
2		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
3		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
4		nd	9.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
5		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
6		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
7	AMRU (<i>Ambloplites rupestris</i>)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.77	nd	nd	
8		nd	7.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
9		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
10		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
11		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
12		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
13		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
14	AMNE (<i>Ameiurus nebulosus</i>)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.35	1.2	nd	
15	CACO (<i>Catostomus commersonii</i>)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
16	CYCA (<i>Cyprinus carpio</i>)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
17	ESLU (<i>Esox lucius</i>)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
18		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
19		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
20		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
21		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
22		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
23		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
24		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.17	nd	nd
25		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.24	nd	nd
26		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
27	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
28	MIDO (<i>Micropterus dolomieu</i>)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
29		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
30		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.16	nd	nd
31		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
32		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
33		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
34	NOCR (<i>Notemigonus crysoleucas</i>)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
35		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	

36		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
37		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
38		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
39		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
41		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
42		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
43		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
44		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
45		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
46		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
47		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
48		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
49		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
50		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
51		nd	nd	nd	nd	0.41	nd	nd	nd	nd	0.18	nd	nd
52		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
53		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
54		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
55		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
56	PEFL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
57	(Perca flavescens)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.29	nd	nd
58		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
59		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.31	nd	nd
60		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.16	nd	nd
61		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
62		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
63		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
64		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
65		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
66		nd	nd	nd	nd	0.51	nd	nd	nd	nd	0.33	nd	nd
67	PONI (Pomoxis nigromaculatus)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
68	TITI	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
69	(Tinca tinca)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
70		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
71		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Maximum ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		0	9.2	0	0	0.51	0	0	0	0	0.77	1.2	0
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		3	1.07	0.5	1.5	0.21	0.38	0.5	0.3	0.17	0.03	0.25	0.21

(nd: analyte not detected)

Table S5-7. Summary of cyanotoxins present in fish muscle, categorized by species, range of toxins detected, methods of extraction and analysis are included.

Fish species	Toxins and range detected (ng g⁻¹)	Muscle (FW or DW)	Analytical Method	Extractions protocol	Authors	Year
white Amur bream (Parabramis pekinensis)	MC-RR : 660	DW	LC-PDA	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, C18 and Si cleanup	Xie et al.	2005
African sharp tooth Catfish (Clarias gariepinus)	MC-LR < LOD = 0.5 MC-RR < LOD = 0.5 MC-YR < LOD = 0.5	DW	LC-ESI-HRMS	100% methanol extraction	Zewde et al.	2018
Tilapia rendalli (Cichlidae)	MCs :2.4–337.3	DW	ELISA	100% methanol extraction	Magalhaes et al.	2001
	MCs : 39.6	FW	ELISA	100% methanol, hexane, C18 cleanup	Magalhaes et al	2003
	MCs: 2–100 (estimated from their figures 1-3)	FW	ELISA, LC-PDA	100% methanol, hexane extraction, C18 cleanup	Soares et al.	2004
	MCs :0,9 -12,0	DW	PPI, HPLC-PDA	80% methanol extraction, Hexan	Deblois et al.	2008a
Goldfish (Carassius auratus L.)	MC-RR : 970 MC-LR : 2290	DW	LC-PDA	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, C18 and Si cleanup	Xie et al.	2005
Yellow perch (Perca flavescens)	MCs :0.12–4.0	FW	ELISA	75% methanol and acetic acid extraction	Wilson et al.	2008
	MCs < LOD = 0.5	FW	ELISA	100% methanol	Deblois et al.	2008b
	Copco Reservoir dm-MC-LR: 58–422 MC-YR: ND-3.2 Irongate Reservoir dm-MC-LR: ND-227 MC-YR: ND-4.2	FW	LC-MS/MS	100% methanol and acidified water, cleanup with C18 cleanup	Mekebri et al.	2009
	MCs :0.5–7.0	DW	ELISA	75% methanol extraction	Poste et al.	2011
Largemouth bass (Micropterus salmoides)	MCs :210.0–320.0	FW	ELISA	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, C18 cleanup	NDEQ	2011
Smallmouth bass (Micropterus dolomieu)	MCs :1.5–43.6	DW	ELISA	75% methanol extraction	Poste et al.	2011
Blue Leopard Corydoras (Corydoras paleatus)	MCs : 40±10	FW	LC-ESI-TOF-MS	70% methanol, 1% trifluoroacétique acide (TFA), C18 cleanup	Cazenave et al.	2005
Nile tilapia (Oreochromis niloticus)	MCs :102	FW	ELISA	100% methanol, C18 cleanup	Mohamed et al.	2003
	MCs :0,9 - 12,0	DW	PPI, HPLC-PDA	80% methanol extraction, Hexan	Deblois et al.	2008a

	MCs :0.8–63.4	DW	ELISA	75% methanol extraction	Poste et al.	2011
	MCs :45-225 (estimated from their Figure 1B)	FW	LC-MS	Homogenization in methanol, hexane	Palikova et al.	2011
	MC-LR < LOD = 0.5 MC-RR < LOD = 0.5 MC-YR < LOD = 0.5	DW	LC-ESI- HRMS	100% methanol extraction	Zewde et al.	2018
	MCs : 0.38	FW	ELISA	80% methanol extraction, C18 cleanup	Mohamed et al.	2018
Goodea sp	MCs: 157±61.5	FW	ELISA, LC-MS	75% methanol, acetic acid	Berry et al.	2011
Common carp (Cyprinus carpio)	MCs :38.3	FW	PPIA	100% methanol extraction	Li et al.	2004
	MC-RR : 660	DW	LC-PDA	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, C18 and Si cleanup	Xie et al.	2005
	MCs :3.3–19.0	FW	ELISA	50% methanol, hexane	Adamovsky et al.	2007
	MCs : 4.99±2.14	FW	ELISA, LC-MS	75% methanol, acetic acid	Berry et al.	2011
	August MCs: (119.07 ± 32.99) November MCs: (95.78 ±30.79)	FW	ELISA	100% methanol extraction	Papadimitriou et al.	2012
	MCs :3.5	FW	LC-MS/MS	5% acetic acid, 0.01M EDTA extraction, charcoal	Schmidt et al	2013
	329 - 680	DW	PP2A, LC– MS/MS	75% methanol extraction	Amrani et al.	2014
	MC-RR : 20.1 ± 0.692 MC-YR : 8.40 ± 12.1 MC-LR : 3.12 ± 0.402 MCs : 31.7 ± 12.1	DW	HPLC– MS/MS	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, ODS cleanup	Jia et al.	2014
	MCs : 0.69-3.45	DW	ELISA, HPLC-PDA	80% methanol extraction	Gurbuz et al.	2016
	MC-LR < LOD = 0.5 MC-RR < LOD = 0.5 MC-YR < LOD = 0.5	DW	LC-ESI- HRMS	100% methanol extraction	Zewde et al.	2018
Black crappie (Pomoxis nigromaculatus)	MCs :1.5–1.9	FW	ELISA	75% methanol extraction	Poste et al.	2011
	MCs :1.04–70.43	FW	LC-MS/MS	5% acetic acid, 0.01M EDTA extraction, charcoal cleanup	Schmidt et al	2013
White crappie (Pomoxis annularis)	MCs :270.0–320.0	FW	ELISA	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, C18 cleanup	NDEQ	2011
Onesided livebearers (Jenynsia multidentata)	MCs : 110±40	FW	LC-ESI- TOF–MS	70% methanol, 1% trifluoroacétique acide (TFA), C18 cleanup	Cazenave et al.	2005

Silver carp (Hypophthalmichthys molitrix)	MC-RR : 550–1770	DW	LC-MS	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, ODS cleanup	Xie et al.	2004
	MC-RR : 1650	DW	LC-PDA	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, C18 and Si cleanup	Xie et al.	2005
	MC-RR : 20.3 ± 0.766 MC-YR : 5.66 ± 3.93 MC-LR : 3.17 ± 0.261 MCs : 29.1 ± 3.95	DW	HPLC– MS/MS	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, ODS cleanup	Jia et al.	2014
	MC-LR: 10.12 - 40.98	FW	HPLC-UV	70% methanol, 1% trifluoroacétique acide (TFA), C18 cleanup	Rezaitabar et al.	2017
Northern pike (Esox lucius)	MCs :1.6–25.8	DW	ELISA	75% methanol extraction	Poste et al.	2011
	MC-LR: 15.18 - 35.1	FW	HPLC-UV	70% methanol, 1% trifluoroacétique acide (TFA), C18 cleanup	Rezaitabar et al.	2017
Bighead carp (Aristichthys nobilis)	MC-RR : 19.6 ± 0.51	FW	HPLC– MS/MS	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, ODS cleanup	Jia et al.	2014
	MC-YR : 2.72 ± 2.54					
	MC-LR : 3.12 ± 0.61					
	MCs : 25.5 ± 2.67					
Crucian carp (Carassius auratus)	MC-RR : 20.1 ± 0.56	DW	HPLC– MS/MS	Water: methanol: butanol (15:4:1) extraction, ODS cleanup	Jia et al.	2014
	MC-YR : 3.15 ± 2.63					
	MC-LR : 3.42 ± 1.67					
	MCs : 26.7 ± 3.35					
Pejerrey (Odontesthes bonariensis)	MCs : 10±10	FW	LC-ESI- TOF–MS	70% methanol, 1% trifluoroacétique acide (TFA), C18 cleanup	Cazenave et al.	2005
	MC–LR: 0.7 ± 0.9	FW	HPLC–	70% methanol, 1% trifluoroacétique acide (TFA), C18 cleanup	Amé et al.	2010
	MC–RR: 2.5 ± 2.	MS/MS				
	MC–LA: 0.7 ± 0.6					
	MC–YR: <LOQ=0,45					
MCs : 3.9 ± 2.2						
Prussian carp (Carassius gibelio)	MC-RR : 0.06	DW	LC-MS/MS	100% methanol, hexan, HLB cleanup	Tokodi et al	2018
European eel (Anguilla anguilla)	MCs :54 - 67	DW	PP2A, LC– MS/MS	75% methanol extraction	Amrani et al.	2014
Walleyes (Sander vitreus)	MCs :0.5–41.2	FW	ELISA	75% methanol extraction	Poste et al.	2011
	MC–LR: 5 - 16	FW	UPLC–	5% acetic acid, 0.01M EDTA extraction, HLB cleanup	Manubolu et al.	2018
	MC–RR: 9 - 35	MS/MS				
White perch (Morone americana)	MCs :0.7–15	FW	ELISA	75% methanol extraction	Poste et al.	2011
White bass (Morone chrysops)	MCs :4.2–27.1					
Whitefish (Coregonus clupeaformis)	MCs :2.9–5.4					
Freshwater Drum (Aplodinotus grunniens)	MCs :0.5–10.1					

Pumpkinseed (<i>Lepomis gibbosus</i>)	MCs :0.7–2.9
Alluaud's haplo (<i>Astatoreochromis alluaudi</i>)	MCs : 7.1–197.7
Brown bullhead (<i>Ameiurus nebulosus</i>)	MCs : 3.3–5.0
Alewife (<i>Alosa pseudoharengus</i>)	MCs : 20.0–37.5
Redbelly tilapia (<i>Coptodon zillii</i>)	MCs : 2.1–33.8
blue spotted tilapia (<i>Oreochromis leucostictus</i>)	MCs : 0.9–78.4
Cichlids (<i>Haplochromis spp.</i>)	MCs : 2.5–1917

(FW: fresh weight or DW: dry weight).



Figure S5-1. Chromatographic performance illustrated in a spiked haddock muscle (*Melanogrammus aeglefinus*), supplemented at $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ with the 18 targeted cyanotoxins.

Text S5-1. Site description

The Pike River (*Rivière aux Brochets*) drains a watershed of *circa* 630 km² (Deslandes et al., 2002). The river originates near the town of Frelighsburg (QC, Canada) and flows over 67 km in general northwestward and southwestward directions prior discharging into Missisquoi Bay, Lake Champlain's northeast arm. The Pike River Ecological Reserve is situated near the river mouth discharge into Missisquoi Bay, about 3 km to the East of Venise-en-Québec and 3 km to the North of Philipsburg littoral. The Pike River Ecological Reserve and Missisquoi Bay are home to an iconic wildlife, including turtles (*Apalone spinifera*, *Graptemys geographica*), fishes, amphibians, and waterfowl. Some of these species were classified as threatened (vulnerable or endangered) by COSEWIC (*Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada*). Although the past decades have seen significant improvements in certain water quality parameters in the Pike River (Simoneau, 2019), exceedances to the phosphorus quality criterion for preventing riverine eutrophication were still observed (OBVBM and Amphibia-Nature, 2014).

The ichthyofauna present in the Pike River Ecological Reserve – Missisquoi Bay area may already suffer from community shifts, biodiversity losses, and high rates of morphological anomalies (Levine et al., 2012). Increasing water temperatures during the summer season can also lower dissolved oxygen levels and contribute to the accelerated growth of cyanobacteria. At least 15 cyanobacterial taxa considered as potentially toxic were identified in Missisquoi Bay during CyanoHABs in 2000-2014 (Blais, 2015; Blais, 2019; Bowling et al., 2015). Of these, some were repeatedly observed across years including *Aphanizomenonflos-aquae*, *Dolichospermumflos-aquae*, *Dolichospermumspiroides*, *Gloeotrichiaechinulata*, and *Microcystis aeruginosa* (Blais, 2019; Bowling et al., 2015).

Text S5-2. Derivation of Health Guideline Values

Step 1: Determine the TDI ($\mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$):

$$TDI (\mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}) = NOAEL \text{ or } LOAEL \div UF \quad \text{Eq. (1)}$$

Step 2: Determine the acceptable limit of toxin consumption per person per day ($\mu\text{g day}^{-1}$):

$$\text{Acceptable limit } (\mu\text{g day}^{-1}) = TDI \times BW (\text{kg}) \times \text{allocation factor} \quad \text{Eq. (2)}$$

Step 3: Define the high-level intake of fish per consumer per day (kg day^{-1}).

Step 4: Derive health guideline level for toxin in fish:

$$\text{Guideline value } (\mu\text{g kg}^{-1}) = \text{Acceptable limit } (\mu\text{g day}^{-1}) \div \text{consumption of fish per day } (\text{kg day}^{-1})$$

Eq. (3)

Text S5-2.1. Microcystins

Text S5-2.1.1. Young preschool children

Guideline value for young preschool children is calculated as follows:

$$\text{GV} = (50 \mu\text{g/kg/day} \times 18.6 \text{ kg} \times 1) / (1000 \times 0.1 \text{ kg/day}) = 9.3 \mu\text{g kg}^{-1}$$

Or:

$50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ = LOAEL for effects on the liver in 11-week-old male hybrid rats exposed to microcystin-LR in drinking water for 28 days (Heinze, 1999).

1000 = composite UF including a 10 for intraspecific variability (UF_H), a 10 for interspecific differences (UF_A), a 3 for LOAEL extrapolation to NOAEL (UF_L) and a 3 for uncertainties in the base of data (UF_D).

18.6 kg = BW average body weight of young preschool children aged 3 to 6 years (USEPA, 2011).

0.1 kg day^{-1} = daily fish consumption (supposition)

100% = intake attributable to fish consumption (Mulvenna et al., 2012)

$0.05 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ bw day}^{-1}$ = TDI

GV of $9.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ is considered protective of non-carcinogenic adverse effects on the health of young preschool children during short-term exposure to microcystins in fish.

Text S5-2.1.2. Adults

Guideline value for adults is calculated as follows:

$$GV = (50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day} \times 80 \text{ kg} \times 1) / (1000 \times 0.3 \text{ kg}/\text{day}) = 13.3 \mu\text{g } \text{kg}^{-1}$$

Or:

$50 \mu\text{g } \text{kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ = LOAEL for effects on the liver in 11-week-old male hybrid rats exposed to microcystin-LR in drinking water for 28 days (Heinze, 1999).

1000 = composite UF including a 10 for intraspecific variability (UF_H), a 10 for interspecific differences (UF_A), a 3 for LOAEL extrapolation to NOAEL (UF_L) and a 3 for uncertainties in the base of data (UF_D).

80 kg = BW average adult body weight > 21 years (USEPA, 2011).

$0.3 \text{ kg } \text{day}^{-1}$ = daily fish consumption (supposition)

100% = intake attributable to fish consumption (Mulvenna et al. 2012)

$0.05 \mu\text{g } \text{kg}^{-1} \text{ bw } \text{day}^{-1}$ = TDI

GV of $13.3 \mu\text{g } \text{kg}^{-1}$ is considered protective of non-carcinogenic adverse effects on adult health during short-term exposure to microcystins in fish.

Text S5-2.2. Cylindrospermopsin

Text S5-2.2.1. Young preschool children

Guideline value for young preschool children is calculated as follows:

$$GV = (30 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day} \times 18.6 \text{ kg} \times 1) / (300 \times 0.1 \text{ kg}/\text{day}) = 18.6 \mu\text{g } \text{kg}^{-1}$$

Or:

$30 \mu\text{g } \text{kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ = NOAEL for effects on the kidneys in mice exposed to cylindrospermopsin in water for 11 weeks (Humpage and Falconer, 2002, 2003).

300 = The composite uncertainty factor (UF) including a 10 for intraspecific variability (UF_H), a 10 for interspecific differences (UF_A) and a 3 for uncertainties in the database (UF_D).

18.6 kg = BW average body weight of young preschool children aged 3 to 6 years (USEPA, 2011).

0.1 kg day⁻¹ = daily fish consumption (supposition)

100% = intake attributable to fish consumption (Mulvenna et al. 2012)

0.1 µg kg⁻¹ bw day⁻¹ = TDI

GV of 18.6 µg kg⁻¹ is considered protective of non-carcinogenic adverse effects on the health of young preschool children during a short-term exposure to cylindrospermopsin in fish.

Text S5-2.2.2. Adults

Guideline value for adults is calculated as follows:

$$GV = (30 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day} \times 80 \text{ kg} \times 1) / (300 \times 0.3 \text{ kg}/\text{day}) = 26.6 \mu\text{g kg}^{-1}$$

Or:

30 µg kg⁻¹day⁻¹ = NOAEL for effects on the kidneys in mice exposed to cylindrospermopsin in water for 11 weeks (Humpage and Falconer, 2002, 2003).

300 = The composite UF including a 10 for intraspecific variability (UF_H), a 10 for interspecific differences (UF_A) and a 3 for uncertainties in the database (UF_D)

80 kg = average body weight of adults > 21 years (USEPA, 2011).

0.3 kg day⁻¹ = daily fish consumption (supposition)

100% = intake attributable to fish consumption (Mulvenna et al. 2012)

0.1 µg kg⁻¹ bw day⁻¹ = TDI

GV of 26.6 µg kg⁻¹ is considered protective of non-carcinogenic adverse health effects in adults at short-term exposure to cylindrospermopsin in fish.

Chapitre 6. Conclusions

Une évaluation critique des développements de la recherche sur la présence, l'origine des principales classes des cyanotoxines dans l'environnement et les différentes techniques analytiques utilisées pour la détection et la quantification des cyanotoxines a été présentée dans les chapitres 2 et 3. Cette revue de littérature démontre la grande importance liée aux effets nocifs associés aux toxines produites par les cyanobactéries. Des études antérieures ont démontré que plusieurs cyanotoxines ont une toxicité multi-organes et des effets cancérigènes, ce qui peut sérieusement affecter la santé humaine (Testai, et al., 2016 ; Zheng et al., 2017). Pour gérer les risques associés aux cyanotoxines qui représentent une menace pour l'homme, il est nécessaire de renforcer la surveillance des cyanotoxines dans les écosystèmes.

Dans ce travail, nous avons examiné la présence de plusieurs types de cyanotoxines, dont 12 microcystines, anatoxines, cylindrospermopsine (CYN), anabaenopeptines (AP-A, AP-B) et cyanopeptoline-A dans les eaux de surface et les poissons sauvages pendant la saison d'échantillonnage de l'été 2018 dans l'écosystème fluvial de la réserve écologique de la Rivière aux Brochets (QC, Canada) près de la baie Missisquoi (Lac Champlain).

L'analyse a été effectuée à l'aide d'une extraction sur phase solide (SPE) en ligne avec une chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à une spectrométrie de masse en tandem (en ligne SPE – UHPLC-MS/MS) via une source d'électronébuliseur chauffée (HESI) en mode positif. Les limites de détection de la méthode dans les eaux de surface étaient de l'ordre de 8 à 50 ng L⁻¹. Des courbes d'étalonnage ont été construites dans une matrice d'eau de surface avec des coefficients de détermination (R^2) > 0,9950.

Des courbes d'étalonnage ont été construites dans une matrice blanche de poisson en dopant les analytes natifs (un mélange de 18 cyanotoxines) à 8 niveaux allant de 0,05 à 250 µg kg⁻¹, tandis que les étalons internes isotopiquement marqués ont été ajoutés à une concentration identique à celle des échantillons de terrain. Des courbes d'étalonnage ont été produites avec une linéarité appropriée et des coefficients de détermination R^2 compris entre 0,9930 et 0,9998 (**Table 5-1**).

Les LOD / LOQ ont été estimés à partir de deux approches parallèles. Dans la première méthode, La LOD a été définie comme la concentration minimale d'analyte produisant des pics

identifiables pour les deux transitions MS/MS (quantification et confirmation) avec un rapport signal sur bruit (S/N) ≥ 3 . Ces valeurs ont été estimées par l'approche graphique en utilisant bas la gamme basse de la courbe d'étalonnage. La LOQ a ensuite été définie comme la concentration minimale d'analyte produisant des pics avec un rapport S / N ≥ 10 avec une précision appropriée. Dans la deuxième méthode, nous avons appliqué la procédure EURACHEM, dans laquelle des répliquats (n = 10) de matrice de poisson vierge ont été enrichis à un faible niveau avec des analytes ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$). La LOD a été calculée à trois fois l'écart type des concentrations mesurées et la LOQ à dix fois l'écart type (guide de validation EURACHEM 2014). La LOD / LOQ rapportée correspond donc à la valeur S / N ou EURACHEM, selon la valeur la plus élevée (**Table 5-1**). La précision de l'ensemble de la méthode a été évaluée à un niveau de dopage de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ dans la matrice de poisson en triple exemplaire (**Table 5-1**; voir également SI **Table S5-4**). L'exactitude obtenue par dopage de la matrice de poisson variait entre 83,2 et 109,8%, selon la cyanotoxine ciblée. Les performances se situent dans la plage d'acceptation de 70 à 130% de l'exactitude définie par les méthodes de l'US EPA (par exemple, Shoemaker et al., 2015 (EPA Method 544, Determination of Microcystins and Nodularins by LC-MS / MS)). La précision intraday (n = 3) variait de 1,8 à 11,4% et la précision interday (n = 9) de 7,2 à 25,5% (**Tableau 5-1**), dans les limites du critère d'acceptation fixé de <30% (Commission européenne, 2010).

Sur les 18 cyanotoxines ciblées, 14 ont été détectées dans des échantillons d'eau de surface contaminés par des efflorescences; les toxines ont atteint un pic entre le début et la mi-septembre, avec les concentrations les plus élevées de MC-LR ($3,8 \mu\text{g L}^{-1}$) et de MC-RR ($2,9 \mu\text{g L}^{-1}$). Parmi les 71 poissons prélevés sur le terrain auprès de 10 espèces, 30% avaient des détections positives d'au moins une cyanotoxine. Dans les échantillons positifs, les plages de concentration dans les muscles du poisson étaient les suivantes pour les microcystines additionnées ($\sum\text{MCs}$: $0,16\text{-}9,2 \mu\text{g kg}^{-1}$), CYN ($46\text{-}75 \mu\text{g kg}^{-1}$), AP-A ($1,1\text{-}5,4 \mu\text{g kg}^{-1}$) et AP-B ($0,12\text{-}5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$). À notre connaissance, il s'agit de l'un des premiers rapports sur la présence d'anabaenopeptides dans la faune. Les $\sum\text{MCs}$ maximales dans les poissons étaient 1,15 fois plus élevées que la recommandation de l'apport quotidien de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) pour les adultes et équivalaient presque à la valeur dérivée pour les jeunes enfants. La concentration de CYN était également environ 3 fois plus élevée que la limite dérivée des valeurs guides pour la santé humaine.

Les concentrations de MC de 10 espèces de poissons dans le présent relevé se situaient dans la plage de concentrations inférieure par rapport aux concentrations rapportées dans d'autres études (SI, **Tableau S5-7**). Les concentrations de CYN rapportées ici sont environ un ordre de grandeur plus élevées que le maximum dans les muscles du poisson ($4,1 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 11$) d'après les données de la littérature (Flores et al., 2018). Des résultats différents peuvent être dus à plusieurs facteurs qui influencent les concentrations de cyanotoxines dans les poissons tels que la concentration de la toxine spécifique dans l'environnement en combinaison avec la période d'exposition et les processus métaboliques des poissons (Jia et al., 2014; Gurbuz et al., 2016). Les types de tissus ciblés pour l'analyse, le comportement alimentaire des poissons et l'écologie trophique peuvent également expliquer la variabilité entre les études. Les différentes performances des méthodes analytiques, y compris la récupération efficace de l'extraction et les effets de matrice, sont un autre facteur de confusion potentiel de la variabilité des concentrations rapportées entre les études.

L'apport de nos travaux de recherche pour l'analyse des cyanotoxines ne se limite pas seulement aux muscles de poisson. En effet, la méthode d'analyse (en ligne SPE – UHPLC-MS/MS) avec une source d'ionisation d'électronébuliseur chauffée (HESI) en mode positif se prête bien à l'analyse des cyanotoxines dans différents organes des poissons tels que foies, reins et les viscères. Aussi, on peut adapter la méthode développée dans ce projet d'étude à un grand nombre des cyanotoxines dans différents organismes aquatiques comme (les grenouilles et les tortues) et ensuite de bien comprendre les enjeux liés à cette accumulation de cyanotoxines dans certains tissus et aux problèmes potentiels liés aux transferts trophiques et la toxicité associée. Les accumulations de cellules cyanobactériennes sont beaucoup plus importantes que les proliférations en eaux libres, présentant ainsi un risque plus élevé pour la santé humaine et animale. Les humains exposés aux cyanotoxines peuvent présenter des symptômes d'intoxication qui sont des guides importants pour découvrir la source et le groupe des cyanotoxines. Les effets indésirables sur la santé liés à l'exposition aux cyanotoxines peuvent aller d'une légère éruption cutanée à une maladie grave ou à la mort.

L'évaluation des risques pour la santé reste un défi en raison du manque de critères disponibles pour la plupart des toxines cyanobactériennes. Ce manque actuel de critères de qualité rend les risques associés aux cyanotoxines difficiles à évaluer et possiblement gravement sous-estimés. Les études futures de recherche devraient également considérer le transfert trophique

des cyanopeptides toxiques via les réseaux trophiques, y compris les impacts écotoxicologiques sur les oiseaux et les mammifères piscivores. Ceci démontre donc la nécessité de l'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution non ciblée pour identifier d'autres cyanotoxines potentiellement pertinentes non actuellement incluses dans les listes de surveillance.

Bibliographie

- Adamovský, O., Kopp, R., Hilscherová, K., Babica, P., Palíková, M., Pašková, V., Navrátil, S., Maršálek, B., Bláha, L. 2007. 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.*, 26, 2687–2693. DOI: [10.1897/07-213.1](https://doi.org/10.1897/07-213.1)
- Aimi, N., Odaka, H., Sakai, S.I., Fujiki, H., Suganuma, M., Moore, R.E., Patterson, G.M.L. 1990. Lyngbyatoxins B and C, two new irritants from *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.*, 53, 1593–1596. DOI: [10.1021/np50072a035](https://doi.org/10.1021/np50072a035)
- Alonso-Andicoberry, C., García-Viliada, L., Lopez-Rodas, V., Costas, E. 2002. Catastrophic mortality of flamingos in a Spanish national park caused by cyanobacteria. *Veterinary Record.*, 151, 706-707. DOI: [10.1136/vr.151.23.706](https://doi.org/10.1136/vr.151.23.706)
- Altaner, S., Puddick, J., Fessard, V., Feurstein, D., Zemskov, I., Wittmann, V., Dietrich, D. R. 2019. Simultaneous Detection of 14 Microcystin Congeners from Tissue Samples Using UPLC- ESI-MS/MS and Two Different Deuterated Synthetic Microcystins as Internal Standards. *Toxins*, 11, 388. DOI: [10.3390/toxins11070388](https://doi.org/10.3390/toxins11070388)
- Amé, M. V., Galanti, L. N., Menone, M. L., Gerpe, M. S. 2010. Microcystin–LR, –RR, –YR and –LA in water samples and fishes from a shallow lake in Argentina. *Harmful Algae*, 9, 66–73. DOI: [10.1016/j.hal.2009.08.001](https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.08.001)
- Amrani, A., Nasri, H., Azzouz A., Kadi, Y., Bouaicha, N. 2014. Variation in Cyanobacterial Hepatotoxin (Microcystin) Content of Water Samples and Two Species of Fishes Collected from a Shallow Lake in Algeria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 66, 379–389 DOI: [10.1007/s00244-013-9993-2](https://doi.org/10.1007/s00244-013-9993-2)
- An, J., Camichael, W.W. 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon*, 32, 1495-1507. DOI: [10.1016/0041-0101\(94\)90308-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90308-5)
- Araoz, R., Molgo, J., de Marsac, N.T. 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*, 56, 813–828. DOI: [10.1016/j.toxicon.2009.07.036](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.036)
- Araoz, R., Vilarino, N., Botana, L.M., Molgo, J. 2010. Ligand-binding assays for cyanobacterial neurotoxins targeting cholinergic receptors. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 1695–1704. DOI: [10.1007/s00216-010-3533-y](https://doi.org/10.1007/s00216-010-3533-y)

- Arpino, P. 2006. Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. I. Société Française de Chimie, p 1490-18.
<https://www.researchgate.net/publication/260298330>
- Asencio, A.D., 2013. Determination of microcystins in reservoirs of different basins in a semiarid area. *J. Appl. Phycol.* 25, 1753–1762. DOI: [10.1007/s10811-013-0025-4](https://doi.org/10.1007/s10811-013-0025-4)
- Bakhtiar, R., Hofstadler, S. A., Smith, R. D. 1996. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Part II: Applications in Characterization of Peptides and Proteins. *J. Chem. Educ.*, 73, A118. DOI:[10.1021/ed073pa118](https://doi.org/10.1021/ed073pa118)
- Balogh, M. P. 2004. Debating resolution and mass accuracy in mass spectrometry. *Spectroscopy*, 19, p. 34-40.
- Banack, S.A., Murch, S.J. 2018. Methods for the chemical analysis of β -N-Methylamino-L-Alanine: What is known and what remains to be determined. *Neurotox. Res.*, 33, 184–191. DOI: [10.1007/s12640-017-9744-7](https://doi.org/10.1007/s12640-017-9744-7)
- Baptista, M.S., Cianca, R.C.C., Lopes, V.R., Almeida, C.M.R. et Vasconcelos, V.M. 2011. Determination of the non-protein amino acid beta-N-methylamino-L-alanine in estuarine cyanobacteria by capillary electrophoresis. *Toxicon*, 58, 410-414.
DOI: [10.1016/j.toxicon.2011.08.007](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.08.007)
- Batsalova, T., Basheva, D., Bardarov, K., Bardarov, V., Dzhambazov, B., Teneva, I. 2019. Assessment of the cytotoxicity, antioxidant activity and chemical composition of extracts from the cyanobacterium *Fischerella major* Gomont. *Chemosphere*, 218, 93–103. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2018.11.097](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.097)
- Bayen, S., et al., 2014. Analysis of selected antibiotics in surface freshwater and seawater using direct injection in liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1338, 38-43. DOI: [10.1016/j.chroma.2014.02.034](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.034)
- Beattie, K.A., Kaya, K. et Codd, G.A. 2000. The cyanobacterium *Nodularia* PCC 7804, of freshwater origin produces [L-Har 2] nodularin. *Phytochemistry*, 54, 57-61.
DOI: [10.1016/s0031-9422\(00\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00045-5)
- Beltran, E., Ibanez, M., Sancho, J.V. et Hernandez, F. 2012. Determination of six microcystins and nodularin in surface and drinking waters by on-line solid phase extraction-ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1266, 61-68. DOI: [10.1016/j.chroma.2012.10.017](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.017)
- Belykh, O.I., Tikhonova, I.V., Kuzmin, A.V., Sorokovikova, E.G.; Fedorova, G.A., Khanaev,

- I.V., Sherbakova, T.A., Timoshkin, O.A. 2016. First detection of benthic cyanobacteria in Lake Baikal producing paralytic shellfish toxins. *Toxicon*, 121, 36–40. DOI: [10.1016/j.toxicon.2016.08.015](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.015)
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., Falkowski, P. 2003. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Res. Microbiol.*, 154, 157–164. DOI: [10.1016/S0923-2508\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00029-9)
- Berman, F.W., Gerwick, W.H., Murray, T.F. 1999. Antillatoxin and kalkitoxin, ichthyotoxins from the tropical cyanobacterium *Lyngbya majuscula*, induce distinct temporal patterns of NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Toxicon*, 37, 1645–1648. DOI: [10.1016/s0041-0101\(99\)00108-7](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(99)00108-7)
- Berry, J. P., Lee, E., Walton, K., Wilson, A. E., Bernal-Brooks, F. 2011. Bioaccumulation of microcystins by fish associated with a persistent cyanobacterial bloom in Lago de Patzcuaro (Michoacan, Mexico). *Environ. Toxicol. Chem.*, 30, 1621–1628. DOI: [10.1002/etc.548](https://doi.org/10.1002/etc.548)
- Bickman, S.R., Campbell, K., Elliott, C., Murphy, C., O’Kennedy, R., Papst, P., Lochhead, M.J. 2018. An innovative portable biosensor system for the rapid detection of freshwater cyanobacterial algal bloom toxins. *Environ. Sci. Technol.*, 52, 11691–11698. DOI: [10.1021/acs.est.8b02769](https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02769)
- Bláhová, L., Oravec, M., Maršálek, B., Šejnohová, L., Šimek, Z. et Bláha, L. 2009. The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. *Toxicon*, 53, 519–524. DOI: [10.1016/j.toxicon.2009.01.014](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.014)
- Blais, S. 2015. Faits saillants - État de situation sur les cyanobactéries à la baie Missisquoi de 2000 à 2008 en lien avec les seuils provisoires pour les eaux récréatives, Québec, ministère du Développement durable, de l’Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction du suivi de l’état de l’environnement, 12 p.
- Blais, S. 2019. État de situation sur les cyanobactéries et les algues eucaryotes à la baie Missisquoi en 2014. Québec, ministère de l’Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction générale du suivi de l’état de l’environnement, 30 p.
- Blokhin, A.V., Yoo, H.-D., Gerald, R. S., Nagle, D.G., Gerwick, W. H., Hamel, E. 1995. Characterization of the interaction of the marine cyanobacterial natural product

- curacin A with the colchicine site of tubulin and initial structure-activity studies with analogues. *Mol. Pharmacol.*, 48, 523-531. PMID: [7565634](#)
- Boopathi, T., Ki, J. S. 2014. Impact of Environmental Factors on the Regulation of Cyanotoxin Production. *Toxins*, 6, 1951-1978, DOI: [10.3390/toxins6071951](#)
- Bouaïcha N., Maatouk I., Vincent G., Levi Y. 2002. A colorimetric and fluorometric microplate assay for the detection of microcystin-LR in drinking water without preconcentration. *Food and Chem. Toxicol.*, 40, 1677-83.
DOI: [10.1016/s0278-6915\(02\)00103-5](#)
- Boudreau, P. D., Monroe, E. A., Mehrotra, S., Desfor, S., Korobeynikov, A., Sherman, D. H., Murray, T.F., Gerwick, L., Dorrestein, P.C., Gerwick, W. H. 2015. Expanding the Described Metabolome of the Marine Cyanobacterium *Moorea producens* JHB through Orthogonal Natural Products Workflows. *PLOS ONE*, 10, e0133297.
DOI: [10.1371/journal.pone.0133297](#)
- Bourke, A.T.C., Hawes, R.B., Neilson, A., Stallman, N.D. 1983. An outbreak of hepatitis enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon*, 21, 45–48. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(83\)90151-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90151-4)
- Boutray, M. L., Maghsoudi, E., Ndong, M., Dorner, S. 2017. Revue de littérature sur les cyanotoxines dans les milieux aquatiques d'eau douce : leurs effets potentiels sur la santé des usagers et les critères ou seuils d'alerte de toxicité chronique et aiguë, Polytechnique, Montréal, 230 p.
- Bowling, L. C., Blais, S., Sinotte, M. 2015. Heterogeneous spatial and temporal cyanobacterial distributions in Missisquoi Bay, Lake Champlain: An analysis of a 9-year data set. *J. Great Lakes Res.*, 41, 164-179. DOI: [10.1016/j.jglr.2014.12.012](#)
- Bradley, W.G., Mash, D.C. 2009. Beyond Guam: The cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotroph. Lateral Scler.*, 10, 7-20. DOI: [10.3109/17482960903286009](#)
- Bryant, D.A. 2003. The beauty in small things revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 9647–9649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834558100>
- Burja, A. M., Abou-Mansour, E., Banaigs, B., Payri, C., Burgess, J. G., Wright, P. C. 2002. Culture of the marine cyanobacterium, *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriaceae), for bioprocess intensified production of cyclic and linear lipopeptides. *J. Microbiol. Meth.*, 48(2-3), 207–219. DOI: [10.1016/s0167-7012\(01\)00324-4](#)

- Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J.G., Wright, P.C. 2001. Marine Cyanobacteria - A prolific source of natural products. *Tetrahedron*, 57, 9347–9377. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00931-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00931-0)
- Buratti, F. M., Manganelli, M., Vichi, S., Stefanelli, M., Scardala, S., Testai, E., Funari, E. 2017. Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Arch. Toxicol.*, 91, 1049–1130. DOI: [10.1007/s00204-016-1913-6](https://doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6)
- Byrdwell, W. C. 2001. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids*, 36, 327-346.
- Cao, Z., Gerwick, W. H., Murray, T. F. 2010. Antillatoxin is a sodium channel activator that displays unique efficacy in heterologously expressed rNav1.2, rNav1.4 and rNav1.5 alpha subunits. *BMC Neuroscience*, 11, 154. DOI: [10.1186/1471-2202-11-154](https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-154)
- Cardellina, J.H., Marner, F.J., Moore, R.E. 1979. Seaweed dermatitis: Structure of lyngbyatoxin A. *Science*, 204, 193-5. DOI: [10.1126/science.107586](https://doi.org/10.1126/science.107586)
- Carmichael, W.W. 2001. Health effects of toxin-producing cyanobacteria “The CyanoHABs”. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 7, 1393-1407. <https://doi.org/10.1080/20018091095087>
- Carmichael, W. W., Azevedo, S. M. F. O., An, J. S., Molica, R. J. R., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., Shaw, G. R., Eaglesham, G. K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109, 663-668.
- Castenholz, R.W. 2001. Phylum BX. Cyanobacteria, oxygenic photosynthetic bacteria. In: Boone, D.R., Castenholz, R.W. (Eds.), *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Springer-Verlag, New York/Berlin/Heidelberg, p. 473–597.
- Caro-Diaz, E. J. E., Valeriote, F. A., Gerwick, W. H. 2019. Highly Convergent Total Synthesis and Assignment of Absolute Configuration of Majusculamide D, a Potent and Selective Cytotoxic Metabolite from *Moorea* sp. *Org. Lett.*, 21, 793–796. DOI: [10.1021/acs.orglett.8b04050](https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b04050)
- Carter, D. C., Moore, R. E., Mynderse, J. S., Niemczura, W. P., Todd, J. S. 1984. Structure of majusculamide C, a cyclic depsipeptide from *Lyngbya majuscula*. *J. Org. Chem.*, 49, 236–241. DOI: [10.1021/jo00176a004](https://doi.org/10.1021/jo00176a004)
- Catherine, A., Bernard, C., Spooof, L., Bruno, M. 2017. Microcystins and nodularins. *Handb. Cyanobacterial Monit. Cyanotoxin Anal.*, 11, 107–126.

- Cazenave, J., Wunderlin, D. A., Bistoni, M. L. A., Amé, M. V., Krause, E., Pflugmacher, S., Wiegand, C. 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin- RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsiamultidentata* and *Odontesthesbonariensis* A field and laboratory study. *Aquat. Toxicol.*, 75, 178–190.
DOI: [10.1016/j.aquatox.2005.08.002](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.002)
- Cetusic, J. R. P., Green, F. R., Graupner, P. R., Oliver, M. P. 2002. Total Synthesis of Hectochlorin. *Org. Lett.*, 4, 1307–1310. DOI: [10.1021/ol025604h](https://doi.org/10.1021/ol025604h)
- Chang, Z., Sitachitta, N., Rossi, J. V., Roberts, M. A., Flatt, P. M., Jia, J., Sherman, D.H., Gerwick, W. H. 2004. Biosynthetic Pathway and Gene Cluster Analysis of Curacin A, an Antitubulin Natural Product from the Tropical Marine Cyanobacterium *Lyngbyamajuscula*. *J. Nat. Prod.*, 67, 1356–1367. DOI: [10.1021/np0499261](https://doi.org/10.1021/np0499261)
- Chen, J., Xie, P., Li, L., Xu, J. 2009. First identification of the hepatotoxic microcystins in the serum of a chronically exposed human population together with indication of hepatocellular damage. *Toxicol. Sci.*, 108, 81–89. DOI: [10.1093/toxsci/kfp009](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp009)
- Chen, L., Chen, J., Zhang, X. 2016. A review of reproductive toxicity of microcystins. *J. Hazard. Mater.*, 301, 381–399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.041>
- Chong, M. W. K., Wong, B. S. F., Lam, P. K. S., Shaw, G. R., Seawright, A. A. 2002. Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes. *Toxicon*, 40, 205–211. DOI: [10.1016/s0041-0101\(01\)00228-8](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00228-8)
- Chorus, I. 2012. Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt), Dessau-Roblau. Germany. pp. 2-147. <http://www.uba.de/uba-info-medien-e/4390.html>
- Chorus, I., Bartram, J. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Published on behalf of WHO by E & FN Spon /Chapman & Hall, London, 416 p. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42827>
- Christophoridis, C., Zervou, S.K., Manolidi, K., Katsiapi, M., Moustaka-Gouni, Maria., Kaloudis, T., Triantis, T.M., Hiskia, A. 2018. Occurrence and diversity of cyanotoxins in Greek lakes. *Sci. Rep.*, 8 :17877, 1-22. DOI: [10.1038/s41598-018-35428-x](https://doi.org/10.1038/s41598-018-35428-x)
- Codd, G. A., Morrison, L. F., Metcalf, J. S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Phar.*, 203, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.02.016>
- Cohen, S.A. 2012. Analytical techniques for the detection of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. *Analyst*, 137, 1991-2005. DOI: [10.1039/c2an16250d](https://doi.org/10.1039/c2an16250d)
- Cole, R.B. 1997. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals Instrumentation*

and Applications, Publisher: Wiley, New-York.

- Cotton, J., Leroux, F., Broudin, S., Marie, M., Corman, B., Tabet, J.-C., Ducruix, C. Junot, C. 2014. High-resolution mass spectrometry associated with data mining tools for the detection of pollutants and chemical characterization of honey samples. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 11335-11345. <https://doi.org/10.1021/jf504400c>
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A. et Bergman, B. 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 9734-9734. DOI: [10.1073/pnas.0501526102](https://doi.org/10.1073/pnas.0501526102)
- Cunha, I., Biltés, R., Sales, M., Vasconcelos, V. 2018. Aptamer-based biosensors to detect aquatic phycotoxins and cyanotoxins. *Sensors*, 18, 2367. DOI: [10.3390/s18072367](https://doi.org/10.3390/s18072367)
- Cullen, A., Pearson, L.A., Mazmouz, R., Liu, T., Soeriyadi, A.H., Ongley, S.E., Neilan, B.A. 2019. Heterologous expression and biochemical characterisation of cyanotoxin biosynthesis pathways. *Nat. Prod. Rep.*, 36, 1117–1136. DOI: [10.1039/c8np00063h](https://doi.org/10.1039/c8np00063h)
- Dawson, R. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon*, 36, 953-962. DOI: [10.1016/s0041-0101\(97\)00102-5](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(97)00102-5)
- Deblois, C. P., Aranda-Rodriguez, R., Giani, A., Bird, D. F. 2008a. Microcystin accumulation in liver and muscle of tilapia in two large Brazilian hydroelectric reservoirs. *Toxicon*, 51, 435–448. DOI: [10.1016/j.toxicon.2007.10.017](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.10.017)
- Deblois, C. P., Mochon, A., Juneau, P. 2008b. Toxines de cyanobactéries dans les perchaudes : Analyse exploratoire dans quatre lacs du bassin de la rivière Yamaska. *Le Naturaliste Canadien*. 132, 56-59.
- De Hoffmann, E., Charette, J. Stroobant, V. 1994. Spectrométrie de masse.
- de la Cruz, A.A., Hiskia, A., Kaloudis, T., Chernoff, N., Hill, D., Antoniou, M.G., He, X.X., Loftin, K., O'Shea, K., Zhao, C., Pelaez, M., Han, C., Lynch, T.J. Dionysiou, D.D. 2013. A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environ. Sci. Process. Impacts*, 15, 1979-2003. DOI: [10.1039/c3em00353a](https://doi.org/10.1039/c3em00353a)
- Deslandes, J., Michaud, A., Bonn, F. 2002. Développement et validation d'indicateurs Agroenvironnementaux associés aux pertes diffuses de phosphore dans le bassin-versant de la rivière aux Brochets. *Agrosol.*, 13, 111–123.
- Devlin, J.P., Edwards, O.E., Gorham, P.R., Hunter, N.R., Pike, R.K., Stavric, B. 1977. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Can. J. Chem.*, 55, 1367–1371. <https://doi.org/10.1139/v77-189>

- Ding, C.Y.G., Pang, L.M., Liang, Z.X., Goh, K.K.K., Glukhov, E., Gerwick, W.H., Tan, L.T. 2018. MS/MS-based molecular networking approach for the detection of aplysiatoxin-related compounds in environmental marine cyanobacteria. *Mar. Drugs*, 16, 505. DOI: [10.3390/md16120505](https://doi.org/10.3390/md16120505)
- Dinh, Q.T., Munoz, G., Simon, D.F., Duy, S.V., Husk, B., Sauve, S., 2020. Stability issues of microcystins, anabaenopeptins, anatoxins, and cylindrospermopsin during short-term and long-term storage of surface water and drinking water samples. *Harmful Algae* 101955. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101955>
- Douglas, A., Barbara, A. A. 1961. *Gas chromatography*, Londres, G. Newnes, 220 p.
- Douma, M., Sabour, B., Manaut, N., Hassouani, M., Oudra, B., Loudiki, M. 2016. Cyanotoxins : Detection methods and control measures – A mini-review (Cyanotoxines : Méthodes de détection et mesures de contrôle – Mini-revue), *J. Mater. Environ. Sci.*, 7, 4136-4143
- Du, X., Liu, H., Yuan, L., Wang, Y., Ma, Y., Wang, R., Chen, X., Losiewicz, M.D., Guo, H., Zhang, H. 2019. The Diversity of Cyanobacterial Toxins on Structural Characterization, Distribution and Identification: A Systematic Review. *Toxins*, 11, 530, DOI:[10.3390/toxins11090530](https://doi.org/10.3390/toxins11090530).
- Duchoud, F., Chuang, D. S. W., Liao, J. C. 2016. Cyanobacteria as a Host Organism. *Ind. Biotechnol.*, 581–604. DOI: [10.1002/9783527807796.ch15](https://doi.org/10.1002/9783527807796.ch15)
- Duong, T. T., Le, T. P. Q., Dao, T. S., Pflugmacher, S., Rochelle-Newall, E., Hoang, T. K., Vu, T. N., Ho, C. T., Dang, D. K. 2012. Seasonal variation of cyanobacteria and microcystins in the Nui Coc Reservoir, Northern Vietnam. *J. Appl. Phyco.*, 25, 1065–1075. DOI: [10.1007/s10811-012-9919-9](https://doi.org/10.1007/s10811-012-9919-9)
- Durai, P., Batool, M., Choi, S. 2015. Structure and effects of cyanobacterial lipopolysaccharides. *Mar. Drugs*, 13, 4217–4230. DOI: [10.3390/md13074217](https://doi.org/10.3390/md13074217)
- Edwards, D. J., Marquez, B. L., Nogle, L. M., McPhail, K., Goeger, D. E., Roberts, M. A., Gerwick, W. H. 2004. Structure and Biosynthesis of the Jamaicamides, New Mixed Polyketide-Peptide Neurotoxins from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Chem. Biol.*, 11, 817–833. DOI: [10.1016/j.chembiol.2004.03.030](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.03.030)
- Eliuk, S. Makarov, A. 2015. Evolution of Orbitrap mass spectrometry instrumentation, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 8, 61-80. DOI: [10.1146/annurev-anchem-071114-040325](https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040325)
- Ember, L. 1998. Chemical weapons convention. *Chem. Eng. News Arch.*, 76, 9.

- European Commission, 2010. Directorate General Health and Consumer Protection. Guidance document on pesticide residue analytical methods. SANCO/825/00 rev. 8.1 16/11/2010.
- European Commission. 2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11813/2017. 42 p.
- EXXEP, 2004. Gestion de la qualité de l'eau à la baie Missisquoi : Regard sur les solutions. Document préparé pour la Corporation bassin versant baie Missisquoi par EXXEP Environnement, 136 p.
- Falconer, I.R. 2004. Cyanobacterial toxins of drinking water supplies. Cylindrospermopsins and microcystins. CRC Press, Boca Raton, Florida. 296 p.
- Faltermann, S., Zucchi, S., Kohler, E., Blom, J.F., Pernthaler, J., Fent, K. 2014. Moleculareffects of the cyanobacterial toxin cyanopeptolin (CP1020) occurring in algal blooms: global transcriptome analysis in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.*, 149, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.018>
- Fan, H., Qiu, J., Fan, L. Li, A. 2014. Effects of growth conditions on the production of neurotoxin 2, 4-diaminobutyric acid (DAB) in *Microcystis aeruginosa* and its universal presence in diverse cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Environ. Sci.Pollut. Res.*, 22, 5943-5951. DOI: [10.1007/s11356-014-3766-y](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3766-y)
- Farrer, D., Counter, M., Hillwig, R., Cude, C. 2015. Health-Based Cyanotoxin Guideline Values Allow for Cyanotoxin-Based Monitoring and Efficient Public Health Response to Cyanobacterial Blooms. *Toxins*, 7, 457-477. DOI: [10.3390/toxins7020457](https://doi.org/10.3390/toxins7020457)
- Fawell, J.K., Mitchell, R.E., Hill, R.E., Everett, D.J. 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: II Anatoxin-a. *Hum. Exp. Toxicol.*, 18, 168-173. <https://doi.org/10.1177/096032719901800306>
- Fayad, P. B., Roy-Lachapelle, A., Duy, S. V., Prévost, M., Sauvé, S. 2015. Online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the analysis of cyanotoxins in algal blooms. *Toxicon*, 108, 167-175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.10.010>
- Fedorova, G., Randak, T., Lindberg, R.H. et Grabic, R. 2013. Comparison of the quantitative performance of a Q-Exactive high-resolution mass spectrometer with that of a triple quadrupole tandem mass spectrometer for the analysis of illicit drugs in wastewater. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 27, 1751-1762. DOI:[10.1002/rcm.6628](https://doi.org/10.1002/rcm.6628)

- Fiers, W. D., Dodge, G. J., Sherman, D. H., Smith, J. L., Aldrich, C. C. 2016. Vinylogous Dehydration by a Polyketide Dehydratase Domain in Curacin Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 138, 16024–16036. DOI: [10.1021/jacs.6b09748](https://doi.org/10.1021/jacs.6b09748)
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281, 237–240. DOI: [10.1126/science.281.5374.237](https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237)
- Flores, E., Herrero, A. 2010. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 39–50. DOI: [10.1038/nrmicro2242](https://doi.org/10.1038/nrmicro2242)
- Flores, E., Herrero, A., Wolk, C.P. Maldener, I. 2006. Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? *Trends Microbiol.*, 14, 439-443. DOI: [10.1016/j.tim.2006.08.007](https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.08.007)
- Flores, N. M., Miller, T. R., Stockwell, J. D. 2018. A global analysis of the relationship between concentrations of microcystins in water and fish. *Front. Mar. Sci.*, 5, 30. DOI: [10.3389/fmars.2018.00030](https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00030)
- Fraga, M., Vilariño, N., Louzao, M.C., Rodríguez, L.P., Alfonso, A., Campbell, K., Elliott, C.T., Taylor, P., Ramos, V., Vasconcelos, V., Botana, L.M. 2014. Multi-detection method for five common microalgal toxins based on the use of microspheres coupled to a flow-cytometry system. *Anal. Chim. Acta*, 850, 57–64. DOI: [10.1016/j.aca.2014.08.030](https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.08.030)
- Fujiki, H., Ikegami, K., Hakii, H., Suganuma, M., Yamaizumi, Z., Yamazato, K., Moore, R.E., Sugimura, T. 1985. A blue-green alga from Okinawa contains aplysiatoxins, the third class of tumor promoters. *Jpn. J. Cancer. Res.*, 76, 257–259.
- Fujiki, H., Mori, M., Nakayasu, M., Terada, M., Sugimura, T., Moore, R.E. 1981. Indole alkaloids: Dihydroteleocidin B, teleocidin, and lymbbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3872–3876. DOI: [10.1073/pnas.78.6.3872](https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3872)
- Funari, E. et Testai, E. 2008. Human health risk assessment related to cyanotoxins exposure. *Crit. Rev. Toxicol.*, 38, 97-125. DOI: [10.1080/10408440701749454](https://doi.org/10.1080/10408440701749454)
- Furey, A., Crowley, J., Hamilton, B., Lehane, M., & James, K. J. 2005. Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning. *J. Chromatogr. A*, 1082, 91–97.

DOI: [10.1016/j.chroma.2005.05.040](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.040)

Gademann, K., Portmann, C. 2008. Secondary metabolites from cyanobacteria: complex structures and powerful bioactivities. *Curr. Org. Chem.*, 12, 326-341.

DOI: [10.2174/138527208783743750](https://doi.org/10.2174/138527208783743750)

Gademann, K., Portmann, C., Blom, J.F., Zeder, M., Juttner, F. 2010. Multiple toxin production in the cyanobacterium microcystis: isolation of the toxic proteaseinhibitor cyanopeptolin 1020. *J. Nat. Prod.*, 73, 980-984. DOI: [10.1021/np900818c](https://doi.org/10.1021/np900818c)

Gan, N., Huang, Q., Zheng, L., Song, L. 2010. Quantitative assessment of toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural environments using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Sci. China Life Sci.*, 53, 973–980. DOI: [10.1007/s11427-010-4038-9](https://doi.org/10.1007/s11427-010-4038-9)

García-Galán, M.J., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D. 2010. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC–MS/MS). *Talanta*, 81, 355-366. DOI: [10.1016/j.talanta.2009.12.009](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.009)

Gehringer, M.M., Adler, L., Roberts, A.A., Moffitt, M.C., Mihali, T.K., Mills, T.J., Fieker, C. et Neilan, B.A. 2012. Nodularin, a cyanobacterial toxin, is synthesized in planta by symbiotic *Nostoc* sp. *The ISME Journal*, 6, 1834-1847. DOI: [10.1038/ismej.2012.25](https://doi.org/10.1038/ismej.2012.25)

Gerwick, W. H., Proteau, P. J., Nagle, D. G., Hamel, E., Blokhin, A., Slate, D. L. 1994. Structure of Curacin A, a Novel Antimitotic, Antiproliferative and Brine Shrimp Toxic Natural Product from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Org. Chem.*, 59, 1243–1245. DOI: [10.1021/jo00085a006](https://doi.org/10.1021/jo00085a006)

Gkelis, S., Lanaras, T., Sivonen, K. 2006. The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. *Aquat. Toxicol.*, 78, 32-41. DOI: [10.1016/j.aquatox.2006.02.001](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.001)

Gkelis, S., Lanaras, T., Sivonen, K. 2015. Cyanobacterial toxic and bioactive peptides in freshwater bodies of Greece: concentrations, occurrence patterns, and implications for human health. *Mar. Drugs*, 13, 6319-6335. <https://doi.org/10.3390/md13106319>

Graf, K.M., Tabor, M.G., Brown, M.L., Paige, M. 2009. Synthesis of (S)-jamaicamide C carboxylic acid. *Org. Lett.*, 11, 5382–5385. DOI: [10.1021/ol9021222](https://doi.org/10.1021/ol9021222)

Graham, J. L., Dubrovsky, N. M., Foster, G. M., King, L. R., Loftin, K. A., Rosen, B. H., Stelzer, E. A. 2020. Cyanotoxin occurrence in large rivers of the United States. *Inland Waters*, 1-9. <https://doi.org/10.1080/20442041.2019.1700749>

- Greer, B., Maul, R., Campbell, K., Elliott, C. T. 2017. Detection of freshwater cyanotoxins and measurement of masked microcystins in tilapia from Southeast Asian aquaculture farms. *Anal. Bioanal. Chem.*, 409, 4057–4069. DOI: [10.1007/s00216-017-0352-4](https://doi.org/10.1007/s00216-017-0352-4)
- Gross, J.H. 2004. *Mass spectrometry: a textbook*. Springer Science & Business Media.
- Gurbuz, F., Uzunmehmetoğlu, O. Y., Diler, Ö., Metcalf, J. S., Codd, G. A. 2016. Occurrence of microcystins in water, bloom, sediment and fish from a public water supply, *Sci. Total. Environ.*, 562, 860–868. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.027>
- Gupta, N., Pant, S. C., Vijayaraghavan, R., Rao, P. V. L. 2003. Comparative toxicity evaluation of cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin variants (LR, RR, YR) in mice. *Toxicology*, 188(2–3), 285–296. DOI: [10.1016/s0300-483x\(03\)00112-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00112-4)
- Hall, S., Strichartz, G., Moczydlowski, E., Ravindran, A., Reichardt, P. B. 1990. The Saxitoxins. *ACS Symposium Series*, 29–65. DOI: [10.1021/bk-1990-0418.ch003](https://doi.org/10.1021/bk-1990-0418.ch003)
- Hallegrae, G. 1995. Harmful algal blooms: A global overview. *Camb. Law J*, 9, 268–270.
- Hamel, E., Blokhin, A. V., Nagle, D. G., Yoo, H.-D., Gerwick, W. H. 1995. Limitations in the use of tubulin polymerization assays as a screen for the identification of new antimetabolic agents: The potent marine natural product curacin A as an example. *Drug Dev. Res.*, 34, 110–120. DOI: [10.1002/ddr.430340204](https://doi.org/10.1002/ddr.430340204)
- Harada, K.I, Murata, H., Qiang, Z., Suzuki, M. et Kondo, F. 1996. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon*, 34, 701-710. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00163-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00163-8)
- Harada, K.I., Oshikata, M., Shimada, T., Nagata, A., Ishikawa, N., Suzuki, M., Kondo, F., Shimizu, M. et Yamada, S. 1998. High-performance liquid chromatographic separation of microcystins derivatized with a highly fluorescent dienophile. *Natural Toxins*, 5, 201-207. <https://doi.org/10.1002/19970505NT5>
- Harris, D.C. 2010. *Quantitative Chemical Analysis*, Fiorillo, J., Quinn, D., Treadway, K., Szczepanski, T. et Byrd, M.L., Éditeurs. Clancy Marshall: New York. 750 p.
- He, X., Liu, Y. L., Conklin, A., Westrick, J., Weavers, L. K., Dionysiou, D. D., Lenhart, J. J., Mouser, P. J., Szlag, D., Walker, H. W. 2016. Toxic cyanobacteria and drinking water: impacts, detection, and treatment. *Harmful Algae*, 54:174–193. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.001>
- Health Canada, 2017. *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document – Cyanobacterial toxins*, p.181.

- Heinze, R. 1999. Toxicity of the Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR to Rats after 28 Days Intake with the Drinking Water. *Environ. Toxicol.*, 14, 57-60.
- Hiller, S., Krock, B., Cembella, A., Luckas, B. 2007. Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 42, 1238-1250. DOI: [10.1002/jms.1257](https://doi.org/10.1002/jms.1257)
- Hinojosa, M.G., Gutierrez-Praena, D., Prieto, A.I., Guzman-Guillen, R., Jos, A., Camean, A.M. 2019a. Neurotoxicity induced by microcystins and cylindrospermopsin: A review. *Sci. Total Environ.*, 668, 547–565. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.02.426](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.426)
- Hinojosa, M.G., Prieto, A.I., Gutiérrez-Praena, D., Moreno, F. J., Cameán, A.M., Jos, A. 2019b. Neurotoxic assessment of Microcystin-LR, cylindrospermopsin and their combination on the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Chemosphere*, 224, 751–764. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.02.173](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.173)
- Hogenboom, A.C., van Leerdam, J.A., de Voogt, P. 2009. Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216, 510-519. DOI: [10.1016/j.chroma.2008.08.053](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.053)
- Hotto, A. M., Satchwell, M.F., Boyer, G.L. 2007. Molecular characterization of potential microcystin-producing cyanobacteria in Lake Ontario embayments and nearshore Waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, 4570-4578. DOI: [10.1128/AEM.00318-07](https://doi.org/10.1128/AEM.00318-07)
- Horning, E., Carroll, D., Dzidic, I., Lin, S.-N., Stillwell, R. et Thenot, J.-P. 1977. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry: Studies of negative ion formation for detection and quantification purposes. *J. Chromatogr. A*, 142, 481-495.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)92061-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)92061-8)
- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. et Graham Cooks, R. 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.*, 40, 430-443.
DOI: [10.1002/jms.856](https://doi.org/10.1002/jms.856)
- Hu, X., Ye, J., Zhang, R., Wu, X., Zhang, Y., Changlong, W. 2017. Detection of free microcystins in the liver and muscle of freshwater fish by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Health Part B*. 52, 770–776.
DOI: [10.1080/03601234.2017.1356670](https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1356670)
- Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M., Visser, P. M. 2018. Cyanobacterial blooms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 16, 471.
DOI:[10.1038/s41579-018-0040-1](https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1)

- Humans, I. 2010. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. 94, p. 464.
- Humbert, J.F. 2017. Molecular tools for the detection of toxigenic cyanobacteria in natural ecosystems. *Handb. Cyanobacterial Monit. Cyanotoxin Anal.* 28, 280–283.
- Humbert, J.F., Quiblier, C., Gugger, M. 2010. Molecular approaches for monitoring potentially toxic marine and freshwater phytoplankton species. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 1723–1732. DOI: [10.1007/s00216-010-3642-7](https://doi.org/10.1007/s00216-010-3642-7)
- Humpage, A.R., Falconer, I.R. 2002. Oral Toxicity of Cylindrospermopsin: No Observed Adverse Effect Level Determination in Male Swiss Albino Mice. *Water Quality and Treatment. Research Report No. 13* Salisbury, South Australia. 94 p.
- Humpage, A.R., Falconer, I.R., 2003. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of No Observed Adverse Effect Level for deriving a drinking water guideline value. *Environ. Toxicol.*, 18, 94–103. DOI: [10.1002/tox.10104](https://doi.org/10.1002/tox.10104)
- Hurtaud-Pessel, D., Jagadeshwar-Reddy, T. Verdon, E. 2011. Development of a new screening method for the detection of antibiotic residues in muscle tissues using liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry with a LC-LTQ-Orbitrap instrument. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk. Assess.*, 28, 1340-1351. DOI: [10.1080/19440049.2011.605772](https://doi.org/10.1080/19440049.2011.605772)
- Inoue, M. 2014. Chemical construction and structural permutation of neurotoxic natural product, antillatoxin: importance of the three-dimensional structure of the bulky side chain. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 90, 56–66. DOI: [10.2183/pjab.90.56](https://doi.org/10.2183/pjab.90.56)
- Ito, E., Satake, M., Yasumoto, T. 2002. Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice. *Toxicon*, 40, 551–556. DOI: [10.1016/s0041-0101\(01\)00251-3](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00251-3)
- Jabba, S.V., Prakash, A., Dravid, S.M., Gerwick, W. H., Murray, T.F. 2010. Antillatoxin, a novel lipopeptide, enhances neurite outgrowth in immature cerebrocortical neurons through activation of voltage-gated sodium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 332, 698–709. DOI: [10.1124/jpet.109.161802](https://doi.org/10.1124/jpet.109.161802)
- James, K.J., Furey, A., Sherlock, I.R., Stack, M.A., Twohig, M., Caudwell, F.B., Skulberg, O.M. 1998. Sensitive determination of anatoxin-a, homoanatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A*, 798(1-2), 147-157. DOI: [10.1016/s0021-9673\(97\)01207-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)01207-7)
- James, K.J., Sherlock, I.R. et Stack, M.A. 1997. Anatoxin-a in Irish freshwater and

- cyanobacteria determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method. *Toxicon*, 35, 963-971. DOI: [10.1016/s0041-0101\(96\)00201-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(96)00201-2)
- Janssen, E. M. L. 2019. Cyanobacterial peptides beyond microcystins—A review on co-occurrence, toxicity, and challenges for risk assessment. *Water Res.*, 151, 488- 499. DOI:[10.1016/j.watres.2018.12.048](https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.048)
- Jia, J., Luo, W., Lu, Y., Giesy, J. P. 2014. Bioaccumulation of microcystins (MCs) in four fish species from Lake Taihu, China: Assessment of risks to humans, *Sci.Total Environ.*, 487, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.037>
- Jiang, L.Y., Aigret, B., De Borggraeve, W.M., Spacil, Z. et Ilag, L.L. 2012. Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 403, 1719-1730. DOI: [10.1007/s00216-012-5966-y](https://doi.org/10.1007/s00216-012-5966-y)
- Jiang, L.Y., Johnston, E., Aberg, K.M., Nilsson, U., Ilag, L.L. 2013. Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405, 1283-1292. DOI: [10.1007/s00216-012-6550-1](https://doi.org/10.1007/s00216-012-6550-1)
- Jiang, W., Zhou, W., Uchida, H., Kikumori, M., Irie, K., Watanabe, R., Suzuki, T., Sakamoto, B., Kamio, M., Nagai, H. 2014. A new lyngbyatoxin from the Hawaiian cyanobacterium *Moorea producens*. *Mar. Drugs*, 12, 2748–2759. DOI: [10.3390/md12052748](https://doi.org/10.3390/md12052748)
- Jochimsen, E. M., Carmichael, W.W., An, J., Cardo, D.M., Cookson, S. T., Holmes, C.M., Antunes, M. B. C., Filho, D. M. A., Lyra, T. M., Barreto, V. S. P. T., Zevedo, S. M.F.O, Jarvis, W. R. 1998. liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England J. Med.*, 338, 873-878. DOI:[10.1056/nejm199803263381304](https://doi.org/10.1056/nejm199803263381304)
- Johnson, B.N., Mutharasan, R. 2013. A cantilever biosensor-based assay for toxin-producing cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* using 16S rRNA. *Environ. Sci. Technol.*, 47, 12333–12341. <https://doi.org/10.1021/es402925k>
- Jurczak, T., Tarczynska, M., Karlsson, K. Meriluoto, J. 2004. Characterization and diversity of cyano-bacterial hepatotoxins (microcystins) in blooms from polish freshwaters identified by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Chromatographia*, 59, 571-578. DOI: [10.1365/s10337-004-0279-8](https://doi.org/10.1365/s10337-004-0279-8)
- Kaebnick, M., Neilan, B. A. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00782.x>
- Kalaitzis, J.A., Lauro, F.M., Neilan, B.A. 2009. Mining cyanobacterial genomes for genes

- encoding complex biosynthetic pathways. *Nat. Prod. Rep.*, 26, 1447–1465.
DOI: [10.1039/b817074f](https://doi.org/10.1039/b817074f)
- Kamleh, A., Barrett, M., Wildridge, D., Burchmore, R., Scheltema, R. et Watson, D. 2008. Metabolomic profiling using Orbitrap Fourier transform mass spectrometry with hydrophilic interaction chromatography: a method with wide applicability to analysis of biomolecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22, 1912-1918.
DOI: [10.1002/rcm.3564](https://doi.org/10.1002/rcm.3564)
- Kamp, L., Church, J. L., Carpino, J., Faltin-Mara, E., Rubio, F. 2016. The effects of water sample treatment, preparation, and storage prior to cyanotoxin analysis for cylindrospermopsin, microcystin and saxitoxin. *Chem. Biol. Interact.*, 246, 45- 51.
DOI: [10.1016/j.cbi.2015.12.016](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.016)
- Kampioti, A.A., Borba da Cunha, A.C., López de Alda, M., Barceló, D. 2005. *Anal. Bioanal. Chem.*, 382, 1815. DOI: [10.1007/s00216-005-3332-z](https://doi.org/10.1007/s00216-005-3332-z)
- Kaplan, A., Harel, M., Kaplan-Levy, R.N., Hadas, O., Sukenik, A., Dittmann, E. 2012. The languages spoken in the water body (or the biological role of cyanobacterial toxins). *Front. Microbiol.*, 3, 138:1–138:11. DOI: [10.3389/fmicb.2012.00138](https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00138)
- Karl, D., Michaels, A., Bergman, B., Capone, D., Carpenter, E., Letelier, R., Lipschultz, F., Paerl, H., Sigman, D., Stal, L. 2002. Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochemistry*, 57, 47–98. DOI: [10.1023/A:1015798105851](https://doi.org/10.1023/A:1015798105851)
- Kato, Y., Scheuer, P. J. 1974. Aplysiatoxin and debromoaplysiatoxin, constituents of the marine mollusk *Stylocheilus longicauda*. *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 2245–2246.
<https://doi.org/10.1021/ja00814a041>
- Kaushik, R. Balasubramanian, R. 2013. Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 43, 1349-1383. DOI: [10.1080/10643389.2011.644224](https://doi.org/10.1080/10643389.2011.644224)
- Kaya, K., Sano, T. 1999. Total microcystin determination using erythro-2-methyl-3-(methoxy-d3)-4-phenylbutyric acid (MMPB-d3) as the internal standard. *Anal. Chim. Acta*, 386, 107-112.
- Kehr, J.C., Dittmann, E. 2015. Biosynthesis and function of extracellular glycans in cyanobacteria. *Life (Basel)*, 5, 164–180. DOI: [10.3390/life5010164](https://doi.org/10.3390/life5010164)
- Kiss, T., Vehovszky, A., Hiripi, L., Kovacs, A. et Vörös, L. 2002. Membrane effects of toxins isolated from a cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*, on identified molluscan neurones. *Comp. Biochem. Phys. C.*, 131, 167-176.
DOI: [10.1016/S1532-0456\(01\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00290-3)

- Kim, E. J., Lee, J. H., Choi, H., Pereira, A. R., Ban, Y. H., Yoo, Y. J., Yoon, Y. J., Kim, E., Park, J.W., Sherman, D.H., Gerwick, W.H., Yoon, Y.J. 2012. Heterologous Production of 4-O-Demethylbarbamide, a Marine Cyanobacterial Natural Product. *Org. Lett.*, 14, 5824–5827. DOI: [10.1021/ol302575h](https://doi.org/10.1021/ol302575h)
- King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C. et Olah, T. 2000. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J. Am Soc. Mass Spectr.*, 11, 942-950. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(00\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(00)00163-X)
- Kokocinski, M., Maria Cameán, A., Carmeli, S., Guzmán-Guillén, R., Jos, A., Mankiewicz-Boczek, J., Metcalf, J., Moreno, I., Isabel Prieto, A., Sukenik, A. 2017. Cylindrospermopsin and congeners. *Handb. Cyanobacterial Monit. Cyanotoxin Anal.*, 12, 127–137. DOI:[10.1002/9781119068761.ch12](https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch12)
- Kostiainen, R., Kauppila, T. J. 2009. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr. A*, 1216:685-699. DOI: [10.1016/j.chroma.2008.08.095](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.095)
- Krauss, M., Singer, H., Hollender, J. 2010. LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns, *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 943-951. DOI: [10.1007/s00216-010-3608-9](https://doi.org/10.1007/s00216-010-3608-9)
- Lawton, L. A., Edwards, C. 2001. Purification of microcystins. *J. Chromatogr. A*, 912, 191–209. DOI:[10.1016/s0021-9673\(01\)00592-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)00592-1)
- Lawton, L.A., Edwards, C., Beattie, K.A., Pleasance, S., Dear, G.J. Codd, G.A. 1995. Isolation and characterization of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of *Microcystis aeruginosa* and from an associated animal toxicosis. *Nat. Toxins*, 3, 50-57. <https://doi.org/10.1002/nt.2620030110>
- Lawton, L.A., Edwards, C. Codd, G.A. 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters *Analyst*, 119, 1525-1530. DOI: [10.1039/AN9941901525](https://doi.org/10.1039/AN9941901525)
- Lazar, S., Egoz, I., Brandeis, R., Chapman, S., Bloch-Shilderman, E., Grauer, E. 2016. Propagation of damage in the rat brain following sarin exposure: Differential progression of early processes. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 310, 87–97. DOI: [10.1016/j.taap.2016.09.008](https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.09.008)
- Lenz, K. A., Miller, T. R., Ma, H. 2019. Anabaenopeptins and cyanopeptolins induce systemic toxicity effects in a model organism the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 214, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.076>

- Lévesque, B., Gervais, M.-C., Chevalier, P., Gauvin, D., Anassour-Laouan-Sidi, E., Gingras, S., Fortin, N., Brisson, G., Greer, C., Bird, D. 2016. Exposure to cyanobacteria: acute health effects associated with endotoxins. *Public Health*, 134, 98–101.
DOI: [10.1016/j.puhe.2015.11.027](https://doi.org/10.1016/j.puhe.2015.11.027).
- Levine, S. N., Lini, A., Ostrofsky, M. L., Bunting, L., Burgess, H., Leavitt, P. R., Reuter, D., Lami, A., Guilizzoni, P., Gilles, E. 2012. The eutrophication of Lake Champlain's northeastern arm: Insights from paleolimnological analyses. *J. Great Lakes Res.*, 38, 35-48. DOI: [10.1016/j.jglr.2011.07.007](https://doi.org/10.1016/j.jglr.2011.07.007)
- Li, W.I., Marquez, B.L., Okino, T., Yokokawa, F., Shioiri, T., Gerwick, W.H., Murray, T.F. 2004. Characterization of the preferred stereochemistry for the neuropharmacologic actions of antillatoxin. *J. Nat. Prod.*, 67, 559–568. <https://doi.org/10.1021/np0303409>
- Li, X., Chung, I., Kim, J., Lee, J. 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol.*, 44, 821–827. DOI: [10.1016/j.toxicol.2004.06.010](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2004.06.010)
- Liu, X., Ser, Z., Locasale, J.W. 2014. Development and quantitative evaluation of a high-resolution metabolomics technology. *Anal. Chem.*, 86, 2175-2184.
<https://doi.org/10.1021/ac403845u>
- Llewellyn L.E. 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Nat. Prod. Rep.*, 23, 2000-22. DOI: [10.1039/b501296c](https://doi.org/10.1039/b501296c)
- Lobner, D., Piana, P.M.T., Salous, A.K. et Peoples, R.W. 2007. beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol. Dis.*, 25, 360-366. DOI: [10.1016/j.nbd.2006.10.002](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.10.002)
- Loftin, K. A., Graham, J. L., Hillborn, E. D., Lehmann, S. C., Meyer, M. T., Dietze, J. E., Griffith, C. B. 2016. Cyanotoxins in inland lakes of the United States: Occurrence and potential recreational health risks in the EPA National Lakes Assessment 2007. U.S. Environmental Protection Agency Papers. 253.
<http://digitalcommons.unl.edu/usepapapers/253>
- Lu, W., Bennett, B.D., Rabinowitz, J.D. 2008. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 871, 236-242.
DOI: [10.1016/j.jchromb.2008.04.031](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.04.031)
- Mackintosh, C., Beattie, K.A., Klumpp, S. Cohen, P., Codd, G.A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.*, 264, 187-192.
DOI: [10.1016/0014-5793\(90\)80245-e](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80245-e)

- Magalhaes, V.F., Soares, R.M., Azevedo, S.M.F.O. 2001. Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk. *Toxicon*, 39, 1077–1085. DOI: [10.1016/s0041-0101\(00\)00251-8](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00251-8)
- Magalhaes, V.F., Marinho, M.M., Domingos, P., Oliveira, A.C., Costa, S.M., Azevedo, L.O., Azevedo, S.M.F.O. 2003. Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon*, 42, 289–295. DOI: [10.1016/s0041-0101\(03\)00144-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00144-2)
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W. 1986. The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon*, 24, 425–434. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90074-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90074-7)
- Makarov, A. 1999. “Mass Spectrometer” United States Patent No US 5886346.
- Makarov, A., 2000. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.*, 72, 1156-1162. DOI: [10.1021/ac991131p](https://doi.org/10.1021/ac991131p)
- Makarov, A., E. Denisov, Lange, O. 2009. Performance evaluation of a high-field Orbitrap mass analyzer. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, 20, 1391-1396. DOI: [10.1016/j.jasms.2009.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.01.005)
- Makarov, A., Hardman, M. E. 2006. “Mass Spectrometry Method and Apparatus” United States Patent No US 6998609 B2.
- Manubolu, M., Lee, J., Riedl, K. M., Kua, Z. X., Collart, L. P., Ludsin S. A. 2018. Optimization of extraction methods for quantification of microcystin-LR and microcystin-RR in fish, vegetable, and soil matrices using UPLC–MS/MS. *Harmful Algae*, 76, 47–57. DOI: [10.1016/j.hal.2018.04.009](https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.04.009)
- Marner, F.-J., Moore, R. E., Hirotsu, K., Clardy, J. 1977. Majusculamides A and B, two epimeric lipodipeptides from *Lyngbya majuscula* Gomont. *J. Org. Chem.*, 42, 2815–2819. DOI: [10.1021/jo00437a005](https://doi.org/10.1021/jo00437a005)
- Martínez-Carballo, E., Gonzalez-Barreiro, C., Scharf, S., Gans, O. 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environ. Pollut.*, 148, 570-579. DOI: [10.1016/j.envpol.2006.11.035](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.11.035)
- Márquez, B., Verdier-Pinard, P., Hamel, E., Gerwick, W. H. 1998. Curacin D, a nontumorigenic agent from the marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry*, 49, 2387–2389. DOI: [10.1016/s0031-9422\(98\)00365-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(98)00365-3)
- Marquez, B. L., Watts, K. S., Yokochi, A., Roberts, M. A., Verdier-Pinard, P., Jimenez, J. I., Gerwick, W. H. 2002. Structure and Absolute Stereochemistry of Hectochlorin, a

- Potent Stimulator of Actin Assembly. *J. Nat. Prod.*, 65, 866–871.
DOI:[10.1021/np0106283](https://doi.org/10.1021/np0106283)
- Mataloni, G., Komarek, J. 2004. *Gloeocapsopsis aurea*, a new subaerophytic cyanobacterium from maritime Antarctica. *Polar Biol.*, 27, 623–628. DOI: [10.1007/s00300-004-0620-6](https://doi.org/10.1007/s00300-004-0620-6)
- Matsunaga, S., Moore, R.E., Niemczura, W.P. et Carmichael, W.W. 1989. Anatoxin-a (s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 8021-8023. <https://doi.org/10.1021/ja00202a057>
- Mazur-Marzec, H., Fidor, A., Cegłowska, M., Wieczerek, E., Kropidłowska, M., Goua, M., Macaskill, J., Edwards, C. 2018. Cyanopeptolins with Trypsin and Chymotrypsin Inhibitory Activity from the Cyanobacterium *Nostocedaphicum CCNP1411*. *Mar. Drugs*, 16, 220 DOI:[10.3390/md16070220](https://doi.org/10.3390/md16070220)
- McCord, J., Lang, J. R., Hill, D., Strynar, M., Chernoff, N. 2018. pH dependent octanol–water partitioning coefficients of microcystin congeners. *J. Water Health*, 16, 340-345.
- McGregor, G.B., Sendall, B.C. 2017. *Iningainema pulvinus* gen nov., sp nov. (Cyanobacteria, Scytonemataceae) a new nodularin producer from Edgbaston Reserve, north-eastern Australia. *Harmful Algae*, 62, 10–19. DOI: [10.1016/j.hal.2016.11.021](https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.021)
- McNamee, S.E., Elliott, C.T., Greer, B., Lochhead, M., Campbell, K. 2014. Development of a planar waveguide microarray for the monitoring and early detection of five harmful algal toxins in water and cultures. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 13340–13349.
DOI: [10.1021/es504172j](https://doi.org/10.1021/es504172j)
- Mekebri, A., Blondina, G.J., Crane, D.B. 2009. Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216, 3147–3155. DOI: [10.1016/j.chroma.2009.01.095](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.095)
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O. 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environ. Int.*, 59, 303–327. DOI: [10.1016/j.envint.2013.06.013](https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013)
- Metcalf, J., Hiskia, A., Kaloudis, T. 2017. Protein Phosphatase Inhibition Assays. *Handb. Cyanobacterial Monit. Cyanotoxin Anal.*, 26, 267–271.
- Metcalf, J.S. et Codd, G.A. 2003. Analysis of cyanobacterial toxins by immunological methods. *Chem. Res. Toxicol.*, 16 103-112. <https://doi.org/10.1021/tx0200562>
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J.P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M. et Horning, S. 2011. Mass spectrometry-based proteomics using

- Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole orbitrap mass spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics*, 10, M111.011015. DOI: [10.1074/mcp.M111.011015](https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011015)
- Mohamed, Z. A., Bakr, Asmaa., Soliman, H.A. 2018. Bioavailability of bound microcystins in mice orally fed with contaminated tilapia edible tissues: Implications to human health. *Toxicon*, 151, 34–36. DOI: [10.1016/j.toxicon.2018.06.082](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.082)
- Mohamed, Z. A., Carmichael W. W., Hussein, A. A. 2003. Estimation of Microcystins in the Freshwater Fish *Oreochromis niloticus* in an Egyptian Fish Farm Containing a Microcystis Bloom. *Environ. Toxicol.*, 18, 137–141. DOI: [10.1002/tox.10111](https://doi.org/10.1002/tox.10111)
- Morgan, J.B., Liu, Y., Coothankandaswamy, V., Mahdi, F., Jekabsons, M.B., Gerwick, W. H., Valeriote, F.A., Zhou, Y.D., Nagle, D.G. 2015. Kalkitoxin inhibits angiogenesis, disrupts cellular hypoxic signaling, and blocks mitochondrial electron transport in tumor cells. *Mar. Drugs*, 13, 1552–1568. DOI: [10.3390/md13031552](https://doi.org/10.3390/md13031552)
- Morin, Ph. 1999. Améliorations récentes dans l'analyse des ions par électrophorèse capillaire *Analisis*, 27, 107-120. <http://dx.doi.org/10.1051/analisis:1999270107>
- Moore, R. E., Entzeroth, M. 1988. Majusculamide D and deoxymajusculamide D, two cytotoxins from *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry*, 27, 3101–3103. DOI: [10.1016/0031-9422\(88\)80008-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80008-6)
- Moy, N. J., Dodson, J., Tassone, S. J., Bukaveckas, P. A., Bulluck, L. P. 2016. Biotransport of algal toxins to riparian food webs. *Environ. Sci. Technol.*, 50, 10007-10014.
- Mtagati, T.A., Siame, B.A., Shushu, D.D. 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat. Toxicol.*, 78, 382-397. DOI: [10.1016/j.aquatox.2006.03.011](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.011)
- Mulvenna, V., Dale, K., Priestly, B., Mueller, Utz., Humpage, A., Shaw, G., Allinson, G., Falconer, I. 2012. Health Risk Assessment for Cyanobacterial Toxins in Seafood, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9, 807-820. DOI: [10.3390/ijerph9030807](https://doi.org/10.3390/ijerph9030807)
- Munoz, G., Vo Duy, S., Roy-Lachapelle, A., Husk, B., Sauvé, S. 2017a. 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*. 1516, 9-20. DOI: [10.1016/j.chroma.2017.07.096](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.096)
- Nagle, D. G., Gerald, R. S., Yoo, H.-D., Gerwick, W. H., Kim, T.-S., Nambu, M., White, J. D. 1995. Absolute configuration of curacin A, a novel antimitotic agent from the tropical marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Tetrahedron Lett.*, 36, 1189–1192. DOI: [10.1016/0040-4039\(95\)00030-g](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)00030-g)
- Nakajima, D., Sueyoshi, K., Orihara, K., Teruya, T., Yokoshima, S. 2019. Synthesis of

- Majusculamides A and B. Synlett., 30, A–D. DOI:[10.1055/s-0037-1611805](https://doi.org/10.1055/s-0037-1611805)
- Namikoshi, M., Murakami, T., Fujiwara, T., Nagai, H., Niki, T., Harigaya, E., Watanabe, M.F., Oda, T., Yamada, J. et Tsujimura, S. 2004. Biosynthesis and transformation of homoanatoxin-a in the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja and structures of three new homologues. Chem. Res. Toxicol., 17, 1692-1696. DOI: [10.1021/tx0498152](https://doi.org/10.1021/tx0498152)
- Namikoshi, M., Murakami, T., Watanabe, M.F., Oda, T., Yamada, J., Tsujimura, S., Nagai, H., Oishi, S. 2003. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. Toxicon, 42, 533–538. DOI: [10.1016/s0041-0101\(03\)00233-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00233-2)
- NDEQ, 2011. Microcystin Toxin Migration, Bioaccumulation, and Treatment; Nebraska Department of Environmental Quality: Fremont Lake #20, Dodge County, NE, USA, 48 p.
- Nicholson, B.C. et Burch, M.D. 2001. Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines. National Health and Medical Research Council of Australia: Canberra. 64 p.
- Nödler K, Licha T, Bester K, Sauter M. 2010. Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples. J. Chromatogr. A 1217:6511–6521. DOI: [10.1016/j.chroma.2010.08.048](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.048)
- Nogle, L. M., Okino, T., Gerwick, W. H. 2001. Antillatoxin B, a Neurotoxic Lipopeptide from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. J. Nat. Prod., 64, 983–985. DOI:[10.1021/np010107f](https://doi.org/10.1021/np010107f)
- OBVBM, Amphibia-Nature, 2014. Conservation volontaire des habitats et de la biodiversité riveraine de la rivière aux Brochets. Organisme de bassin versant de la baie Missisquoi et Amphibia-Nature, Bedford, Québec. 51 p.
<https://www.amphibia-nature.org/fr/eco-dossiers/conservation-volontaire-riviere-aux-brochets/>
- Oehrle, S.A., Southwell, B. et Westrick, J. 2010. Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Toxicon, 55, 965-972. DOI: [10.1016/j.toxicon.2009.10.001](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.10.001)
- Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M. 1992. Cylindrospermopsin: A potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. J. Am. Chem. Soc., 114, 7941–7942. <https://doi.org/10.1021/ja00046a067>

- Okura, K., Matsuoka, S., Inoue, M. 2013. The bulky side chain of antillatoxin is important for potent toxicity: Rational design of photoresponsive cytotoxins based on SAR studies. *Chem. Commun.*, 49, 8024–8026. <https://doi.org/10.1039/C3CC44066D>
- Olsen, J.V. 2005. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a c-trap, *Mol. Cell. Proteomics*, 4, 2010–2021.
DOI: [10.1074/mcp.T500030-MCP200](https://doi.org/10.1074/mcp.T500030-MCP200)
- O’Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J. 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 14, 313–334. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>
- Orjala, J., Gerwick, W.H. 1996. Barbamide, a chlorinated metabolite with molluscicidal activity from the caribbean cyanobacterium *lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.*, 59, 427–430. <https://doi.org/10.1021/np960085a>
- Orjala, J., Nagle, D. G., Hsu, V., Gerwick, W. H. 1995. Antillatoxin: An Exceptionally Ichthyotoxic Cyclic Lipopeptide from the Tropical Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 8281–8282. DOI: [10.1021/ja00136a031](https://doi.org/10.1021/ja00136a031)
- Osborne, N. J. T., Webb, P. M., Shaw, G. R. 2001. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environ. Int.*, 27, 381–392.
DOI: [10.1016/s0160-4120\(01\)00098-8](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(01)00098-8)
- Osswald, J., Rellan, S., Gago, A. et Vasconcelos, V. 2007. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environ. Int.*, 33, 1070–1089. DOI: [10.1016/j.envint.2007.06.003](https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.06.003)
- Pablo, J., Banack, S.A., Cox, P.A., Johnson, T.E., Papapetropoulos, S., Bradley, W.G., Buck, A. et Mash, D.C. 2009. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.*, 120, 216–225. DOI: [10.1111/j.1600-0404.2008.01150.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2008.01150.x)
- Pacheco, A.B., Guedes, I.A., Azevedo, S.M. 2016. Is qPCR a reliable indicator of cyanotoxin risk in freshwater? *Toxins (Basel)*, 8, 172. DOI: [10.3390/toxins8060172](https://doi.org/10.3390/toxins8060172)
- Paerl, H.W., Huisman, J. 2009. Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Env. Microbiol. Rep.*, 1, 27–37.
DOI: [10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x)
- Paerl, H. W., Otten, T. G. 2013. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb. Ecol.*, 65, 995–1010. DOI: [10.1007/s00248-012-0159-y](https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y)
- Paerl, H. W., Gardner, W. S., Havens, K. E., Joyner, A. R., McCarthy, M. J., Newell, S. E., Qin, B., Scott, J. T. 2016. Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic

- ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae*, 54, 213–222. DOI: [10.1016/j.hal.2015.09.009](https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.009)
- Palíkova, M., Mares, J., Kopp, R., Hlavkova, J., Navratil, S., Adamovsky, O., Chmelar, L., Blaha, L. 2011. Accumulation of microcystins in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., and effects of a complex cyanobacterial bloom on the dietetic quality of muscles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 87, 26–30. DOI: [10.1007/s00128-011-0279-y](https://doi.org/10.1007/s00128-011-0279-y)
- Papadimitriou, T., Kagalou, I., Stalikas, C., Pilidis, G., Leonardos, I. D. 2012. Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potential risks to public health. *Ecotoxicology*. 21, 1155–1166. DOI: [10.1007/s10646-012-0870-y](https://doi.org/10.1007/s10646-012-0870-y)
- Pearson, L.A., Dittmann, E., Mazmouz, R., Ongley, S.E., D'Agostino, P.M., Neilan, B.A. 2016. The genetics, biosynthesis and regulation of toxic specialized metabolites of cyanobacteria. *Harmful Algae*, 54, 98–111. DOI: [10.1016/j.hal.2015.11.002](https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.11.002)
- Pearson, L.A., Neilan, B.A. 2008. The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19, 281–288. DOI: [10.1016/j.copbio.2008.03.002](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.03.002)
- Pearson, L., Mihali, T., Moffitt, M., Kellmann, R., Neilan, B. 2010. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Mar. Drugs*, 8, 1650–1680. DOI: [10.3390/md8051650](https://doi.org/10.3390/md8051650)
- Peng, L., Liu, Y., Chen, W., Liu, L., Kent, M., Song, L. 2010. Health risks associated with consumption of microcystin-contaminated fish and shellfish in three Chinese lakes: Significance for freshwater aquacultures. *Ecotox. Environ. Safe.*, 73, 1804–1811. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2010.07.043](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.043)
- Pereira, S. R., Vasconcelos, V. M., Antunes, A. 2011. The phosphoprotein phosphatase family of Ser/Thr phosphatases as principal targets of naturally occurring toxins. *Crit. Rev. Toxicol.*, 41, 83–110. DOI: [10.3109/10408444.2010.515564](https://doi.org/10.3109/10408444.2010.515564)
- Petrović, M., Hernando, M.D., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D. 2005. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Pharmaceutical Residues in Environmental Samples: A Review. *J. Chromatogr. A*, 1067, 1-14. DOI: [10.1016/j.chroma.2004.10.110](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.110)

- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R. 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3094–3101. DOI: [10.1128/aem.68.6.3094-3101.2002](https://doi.org/10.1128/aem.68.6.3094-3101.2002)
- Pham, T. L., Utsumi, M. 2018. An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *J. Environ. Manag.*, 213, 520–529. DOI: [10.1016/j.jenvman.2018.01.077](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.077)
- Pick, F.R. 2016. Blooming algae: a Canadian perspective on the rise of toxic cyanobacteria. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 73, 1149–1158. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2015-0470>
- Pietsch, C., Wiegand, C., Amé, M.V., Nicklisch, A., Wunderlin, D. Pflugmacher, S. 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ. Toxicol.*, 16, 535-542. <https://doi.org/10.1002/tox.10014>
- Poste, A. E., Hecky, R.E., Guildford, S.J. 2011. Evaluating microcystin exposure risk through fish consumption. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 5806–5811. DOI: [10.1021/es200285c](https://doi.org/10.1021/es200285c)
- Prasse, C., Ternes, T.A. 2016. Chapter 9 - Application of Orbitrap Mass Spectrometry for the Identification of Transformation Products of Trace Organic Contaminants Formed in the Environment *Compr. Anal. Chem.*, 71, 263-282. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.02.010>
- Preece, E. P, Hardy, F. J., Moore, B. C., Bryan M. 2017. A review of microcystin detections in estuarine and marine waters: Environmental implications and human health risk. *Harmful Algae*, 61 (Supplement C): 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.006>
- Ramaswamy, A. V., Sorrels, C. M., Gerwick, W. H. 2007. Cloning and Biochemical Characterization of the Hectochlorin Biosynthetic Gene Cluster from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.*, 70, 1977–1986. DOI: [10.1021/np0704250](https://doi.org/10.1021/np0704250)
- Ramm, J., Lupu, A., Hadas, O., Ballot, A., Rucker, J., Wiedner, C., Sukenik, A. 2012. A CARD-FISH protocol for the identification and enumeration of cyanobacterial akinetes in lake sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 82, 23–36. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2012.01401.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01401.x)
- Rapala, J., Lahti, K., Rasanen, L.A., Esala, A.L., Niemela, S.I., Sivonen, K. 2002. Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment. *Water Res.*, 36, 2627–2635. DOI: [10.1016/s0043-1354\(01\)00478-x](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00478-x)
- Rastogi, R.P., Madamwar, D., Incharoensakdi, A. 2015. Bloom dynamics of cyanobacteria and their toxins: Environmental health impacts and mitigation strategies. *Front. Microbiol.*, 6,1–22. DOI: [10.3389/fmicb.2015.01254](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01254)

- Rezaitabar, S., Sari, A. E., Bahramifar, N., Ramezanpour, Z. 2017. 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.*, 575, 1130–1138. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.199>.
- Richard, K., Williams, D.E., de Silva, E.D., Brockman, M.A., Brumme, Z.L., Andersen, R.J., Tietjen, I. 2018. Identification of novel HIV-1 latency-reversing agents from a library of marine natural products. *Viruses*, 10, 348. DOI: [10.3390/v10070348](https://doi.org/10.3390/v10070348)
- Riou, V., Périot, M., Biegala, I.C. 2017. Specificity re-evaluation of oligonucleotide probes for the detection of marine picoplankton by tyramide signal amplification-fluorescent in situ hybridization. *Front. Microbiol.*, 8, 854. DOI: [10.3389/fmicb.2017.00854](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00854)
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., B., Herdman, M., Stanier, R. Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 111, 1-61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
- Rippka, R., Castenholz, R. W., Herdam, M. 2001. Form-genus III. Cyanobacterium Rippka and Cohen-Bazire 1983. In: Garrity, G., Boone, D. R. Castenholz, R. W. (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Second edition, Springer-Verlag, New York. p. 497–498.
- Rochat, B. 2012. Quantitative/qualitative analysis using LC-HRMS: the fundamental step forward for clinical laboratories and clinical practice. *Bioanalysis*, 4, 1709-1711. DOI: [10.4155/bio.12.159](https://doi.org/10.4155/bio.12.159)
- Rodgers, K.J., Main, B.J., Samardzic, K. 2018. Cyanobacterial neurotoxins: Their occurrence and mechanisms of toxicity. *Neurotox. Res.*, 33, 168–177. DOI: [10.1007/s12640-017-9757-2](https://doi.org/10.1007/s12640-017-9757-2)
- Rossi, A.M., Taylor, C.W. 2011. Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization. *Nat. Protoc.*, 6, 365–387. DOI: [10.1038/nprot.2011.305](https://doi.org/10.1038/nprot.2011.305)
- Rouessac, F. Rouessac, A. 1997. *Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales Modernes*. Masson.
- Ruberu, S.R., Langlois, G.W., Masuda, M., Kittredge, C., Perera, S.K., Kudela, R.M. 2018. Receptor binding assay for the detection of paralytic shellfish poisoning toxins: Comparison to the mouse bioassay and applicability under regulatory use. *Food Addit. Contam. Part A, Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, 35, 144–158. DOI: [10.1080/19440049.2017.1369584](https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1369584)

- Roy-Lachapelle, A., Duy, S. V., Munoz, G., Dinh, Q. T., Bahl, E., Simon, D. F., Sauvé, S. 2019. Analysis of multiclass cyanotoxins (microcystins, anabaenopeptins, cylindrospermopsin and anatoxins) in lake waters using on-line SPE liquid chromatography high-resolution Orbitrap mass spectrometry. *Anal. Methods*, 11, 5289-5300. <https://doi.org/10.1039/C9AY01132C>
- Roy-Lachapelle, A., Solliec, Morgan., Sauvé, S. Gagnon, C. 2019. A Data-Independent Methodology for the Structural Characterization of Microcystins and Anabaenopeptins Leading to the Identification of Four New Congeners. *Toxins*, 11, 619. DOI:[10.3390/toxins11110619](https://doi.org/10.3390/toxins11110619)
- Saker, M.L., Metcalf, J.S., Codd, G.A. et Vasconcelos, V.M. 2004. Accumulation and depuration of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Toxicon*, 43, 185-194. DOI: [10.1016/j.toxicon.2003.11.022](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.022)
- Salmaso, N.; Bernard, C.; Humbert, J.F., Akçaalan, R., Albay, M., Ballot, A., Catherine, A., Fastner, J., Häggqvist, K., Horecká, M., et al. 2017. Basic guide to detection and monitoring of potentially toxic cyanobacteria. *Handb. Cyanobacterial Monit. Cyanotoxin Anal.*, 6, 46–69.
- Sangolkar, L.N., Maske, S.S., Chakrabarti, T. 2006. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Res.*, 40, 3485–3496. DOI: [10.1016/j.watres.2006.08.010](https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.010)
- Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F. et Kaya, K. 1992. A method for micro-determination of total microcystin content in waterblooms of cyanobacteria (blue-green algae). *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 49, 163-170. <https://doi.org/10.1080/03067319208027567>
- Scheltema, R. A., Hauschild, J. P., Lange, O., Hornburg, D., Denisov, E., Damoc, E., Kuehn, A., Makarov, A., Mann, Matthias. 2014. The Q-Exactive HF, a Benchtop Mass Spectrometer with a Pre-filter, High Performance Quadrupole and an Ultra-High Field Orbitrap Analyzer. *Mol. Cell. Proteomics*, 13, 3698–3708. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.043489>
- Schmidt, J. R., Shaskus, M., Estenik, J. F., Oesch. C., Khidekel. R., Boyer, G. L. 2013. Variations in the Microcystin Content of Different Fish Species Collected from a Eutrophic Lake. *Toxins*, 5, 992-1009. DOI:[10.3390/toxins5050992](https://doi.org/10.3390/toxins5050992)
- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., Amann, R. 1997. Improved sensitivity of whole cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Env. Microbiol.*, 63, 3268–3273. PMID: [9251215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9251215/)

- Scigelova, M. et Makarov, A. 2006. Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics. *Proteomics*, 6, 16-21. DOI: [10.1002/pmic.200600528](https://doi.org/10.1002/pmic.200600528)
- Shoemaker, J., Tettenhorst, D., Delacruz, A., 2015. METHOD 544. Determination of Microcystins and Nodularin in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid
- Simoneau, M. 2019. Qualité de l'eau des tributaires de la baie Missisquoi : évolution temporelle 1999-2017 et portrait récent 2015-2017. Québec, ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, Direction générale du suivi de l'état de l'environnement, 92 p.
- Sitachitta, N., Márquez, B.L., Williamson, R.T., Rossi, J., Roberts, M.A., Gerwick, W.H., Nguyen, V.A., Willis, C.L.J.T. 2000. Biosynthetic pathway and origin of the chlorinated methyl group in barbamide and dechlorobarbamide, metabolites from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Tetrahedron*, 56, 9103–9113.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00763-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00763-8)
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. 2003. Principes d'analyse instrumentale. De Boeck Supérieur.
- Smith, D.S., Eremin, S.A. 2008. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 1499–1507. DOI: [10.1007/s00216-008-1897-z](https://doi.org/10.1007/s00216-008-1897-z)
- Soares, R. M., Magalhaes, V. F., Azevedo, S.M.F.O. 2004. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat.Toxicol.*, 70, 1–10. DOI: [10.1016/j.aquatox.2004.06.013](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.06.013)
- Spoof, L., Blaszczyk, A., Meriluoto, J., Ceglowska, M., Mazur-Marzec, H. 2016. Structures and activity of new anabaenopeptins produced by Baltic Sea cyanobacteria. *Mar. Drugs*, 14, 8. <https://doi.org/10.3390/md14010008>
- Spoof, L. Catherine, A. 2017. Appendix 3: Tables of Microcystins and Nodularins. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, 526–537.
DOI: [10.1002/9781119068761.app3](https://doi.org/10.1002/9781119068761.app3)
- Spoof, L., Vesterkvist, P., Lindholm, T., Meriluoto, J. 2003. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1020, 105-119. DOI: [10.1016/s0021-9673\(03\)00428-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00428-x)
- Srivastava, A., Singh, S., Ahn, C.Y., Oh, H.M., Asthana, R.K. 2013. Monitoring approaches for a toxic cyanobacterial bloom. *Environ. Sci. Technol.*, 47, 8999–9013.
DOI: [10.1021/es401245k](https://doi.org/10.1021/es401245k)

- Stewart, I., Schluter, P.J. et Shaw, G.R. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health—a review. *Environmental Health*, 5, 7. DOI: [10.1186/1476-069X-5-7](https://doi.org/10.1186/1476-069X-5-7)
- Sukenik, A., Quesada, A., Salmaso, N. 2015. Global expansion of toxic and non-toxic cyanobacteria: effect on ecosystem functioning. *Biodivers. Conserv.*, 24, 889–908. DOI: [10.1007/s10531-015-0905-9](https://doi.org/10.1007/s10531-015-0905-9)
- Sunner, J., Nicol, G. et Kebarle, P. 1988. Factors determining relative sensitivity of analytes in positive mode atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 60, 1300-1307. <https://doi.org/10.1021/ac00164a012>
- Svrcek, C., Smith, D.W. 2004. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review, *J. Environ. Eng. Sci.*, 3, 155-184. <https://doi.org/10.1139/s04-010>
- Tagiri-Endo, M., Suzuki, S., Nakamura, T., Hatakeyama, T., Kawamukai, K. 2008. Rapid determination of five antibiotic residues in swine wastewater by online solid-phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 1367–1375. DOI: [10.1007/s00216-008-2543-5](https://doi.org/10.1007/s00216-008-2543-5)
- Taranu, Z. E., Gregory-Eaves, I., Leavitt, P. R., Bunting, L., Buchaca, T., Catalan, J., Domaizon, I., Guilizzoni, P., Lami, A., McGowan, S., Moorhouse, H., Morabito, G., Pick, F. R., Stevenson, M. A., Thompson, P. L., Vinebrooke, R.D. 2015. Acceleration of cyanobacterial dominance in north temperate-subarctic lakes during the Anthropocene. *Ecol. Lett.*, 18, 375–384. DOI: [10.1111/ele.12420](https://doi.org/10.1111/ele.12420)
- Taylor, A. J., Linforth, R. S. T. 2000. Techniques for Measuring Volatile Release In Vivo during Consumption of Food. *Flavor Release*, 8–21. DOI: [10.1021/bk-2000-0763.ch002](https://doi.org/10.1021/bk-2000-0763.ch002)
- Testai, E., Scardala, S., Vichi, S., Buratti, F.M., Funari, E. 2016. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Crit. Rev. Toxicol.*, 46, 385–419. DOI: [10.3109/10408444.2015.1137865](https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1137865)
- Tillmanns, A.R., Pick, F.R. Aranda-Rodriguez, R. 2007. Sampling and analysis of microcystins: implications for the development of standardized methods. *Environ. Toxicol.*, 22, 132-143. DOI: [10.1002/tox.20250](https://doi.org/10.1002/tox.20250)
- Tokodi, N., Drobac, D., Meriluoto, J., Lujčić, J., Marinović, Z., Važić, T., Nybom, S., Simeunović, J., Dulić, T., Lazić, G., Petrović, T., Vuković-Gačić, B., Sunjog, K., Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Subakov-Simić, G., MiljanovićBranko, Codd A. G., Svirčev, Z. 2018. Cyanobacterial effects in Lake Ludoš, Serbia - Is preservation of

- a degraded aquatic ecosystem justified? *Sci. Total Environ.*, 635, 1047–1062.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.177>
- Triantis, T. M., Kaloudis, T., Hiskia, A. 2017. Method Validation Guidelines for the Analysis of Cyanotoxins. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, 287-291. <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch29>
- Turner, A.D., Waack, J., Lewis, A., Edwards, C., Lawton, L. 2018. Development and single-laboratory validation of a UHPLC-MS/MS method for quantitation of microcystins and nodularin in natural water, cyanobacteria, shellfish and algal supplement tablet powders. *J Chromatogr. B.* 1074, 111–123. DOI: [10.1016/j.jchromb.2017.12.032](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.032)
- Ueoka, R., Hitora, Y., Ito, A., Yoshida, M., Okada, S., Takada, K., Matsunaga, S. 2016. Curacin E from the Brittle Star *Ophiocoma scolopendrina*. *J. Nat. Prod.*, 79, 2754–2757. DOI: [10.1021/acs.jnatprod.6b00701](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00701)
- Umezawa, T., Sueda, M., Kamura, T., Kawahara, T., Han, X., Okino, T., Matsuda, F. 2011. Synthesis and Biological Activity of Kalkitoxin and its Analogues. *J. Org. Chem.*, 77, 357–370. DOI: [10.1021/jo201951s](https://doi.org/10.1021/jo201951s)
- USEPA, 2011. *Exposure Factors Handbook Chapter 8—Body Weight Studies*. pp. 8-52.
- Valério, E., Chaves, S., Tenreiro, R. 2010. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review. *Toxins (Basel)*, 2, 2359–2410. DOI: [10.3390/toxins2102359](https://doi.org/10.3390/toxins2102359)
- Van Apeldoorn, M.E., Van Egmond, H.P., Speijers, G.J. et Bakker, G.J. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 7-60. DOI: [10.1002/mnfr.200600185](https://doi.org/10.1002/mnfr.200600185)
- Vasas, G., Gaspar, A., Pager, C., Suranyi, G., Máthé, C., Hamvas, M.M. Borbely, G. 2004. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 25, 108-115. DOI: [10.1002/elps.200305641](https://doi.org/10.1002/elps.200305641)
- Vega, A., Bell, E.A. 1967. α -Amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry*, 6, 759–762. DOI: [10.1016/s0031-9422\(00\)86018-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)86018-5)
- Viglino, L., Aboufadel, K., Prévost, M., Sauvé, S. 2008. Analysis of Natural and Synthetic Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Waters Using Online Preconcentration Coupled With LC-APPI-MS/MS. *Talanta*, 76, 1088-1096. DOI: [10.1016/j.talanta.2008.05.008](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.008)
- Visser, P. M., Verspagen, J. M. H., Sandrini, G., Stal, L. J., Matthijs, H. C. P., Davis, T. W.,

- Paerl, H. W., Huisman, J. 2016. How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 145–159.
DOI: [10.1016/j.hal.2015.12.006](https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.006)
- Vogiazzi, V., de la Cruz, A., Mishra, S., Shanov, V., Heineman, W.R., Dionysiou, D.D. 2019. A comprehensive review: Development of electrochemical biosensors for detection of cyanotoxins in freshwater. *ACS Sens.*, 4, 1151–1173.
DOI: [10.1021/acssensors.9b00376](https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00376)
- Vo Duy, S., Munoz, G., Dinh, Q. T., Tien Do, D., Simon, D. F., Sauvé, S. 2019. Analysis of the neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers in surface water by FMOc derivatization liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *PLOS ONE*, 14, e0220698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220698>
- Wang, J., Chow, W., Chang, J. Wong, J.W. 2014. Ultrahigh-performance liquid chromatography electrospray ionization Q-Orbitrap mass spectrometry for the analysis of 451 pesticide residues in fruits and vegetables: method development and validation. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 10375-10391. DOI: [10.1021/jf503778c](https://doi.org/10.1021/jf503778c)
- Watson, J. T., Sparkman, O. D. 2008. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*, 4 ed. Wiley.
- Westrick, J.A., Szlag, D.C., Southwell, B.J. Sinclair, J. 2010. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 1705-1714. DOI: [10.1007/s00216-010-3709-5](https://doi.org/10.1007/s00216-010-3709-5)
- Wharton, R.E., Feyereisen, M.C., Gonzalez, A.L., Abbott, N.L., Hamelin, E.I., Johnson, R.C. 2017. Quantification of saxitoxin in human blood by ELISA. *Toxicon*, 133, 110–115.
DOI: [10.1016/j.toxicon.2017.05.009](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.05.009)
- Whitton, B.A., Potts, M. 2000a. *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Whitton, B.A., Potts, M. 2000b. Introduction of cyanobacteria. In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 1–10.
- Whitton, B.A., Potts, M. 2012. Introduction to the cyanobacteria, publié dans *Ecology of Cyanobacteria II*, Whitton, B.A., Éditeur, Springer: Dordrecht. p. 1-13.
- WHO, 2003. *Guidelines for safe recreational water environments: coastal and freshwaters*. *Environments*, 1, 3505–3518.

- WHO, 2010. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. Lyon, France, 94, 464 p.
- Wiegand, C. Pflugmacher, S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 203, 201–218. DOI: [10.1016/j.taap.2004.11.002](https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.002)
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A. 2010. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Mar. Drugs*, 8, 2185–2211. DOI: [10.3390/md8072185](https://doi.org/10.3390/md8072185)
- Wilson, A.E., Gossiaux, D.C., Höök, T.O., Berry, J.P., Landrum, P.F., Dyble, J., Guildford, S.J. 2008. Evaluation of the human health threat associated with the hepatotoxin microcystin in the muscle and liver tissues of yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 65, 1487–1497. DOI: [10.1139/F08-067](https://doi.org/10.1139/F08-067)
- Winter, J. G., Howell, E. T., Nakamoto, L. K. 2012. Trends in nutrients, phytoplankton, and chloride in nearshore waters of Lake Ontario: Synchrony and relationships with physical conditions. *J. Great Lakes Res.*, 38, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2011.09.003>
- Wipf, P., Reeves, J., Day, B. 2004. Chemistry and Biology of Curacin A. *Curr. Pharm. Des.*, 10, 1417–1437. DOI: [10.2174/1381612043384853](https://doi.org/10.2174/1381612043384853)
- Wong, J.L., Oesterlin, R., Rapoport, H. 1971. The structure of saxitoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 7344–7345. <https://doi.org/10.1021/ja00755a052>
- Wood, R. 2016. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure—A review of the literature. *Environ. Int.*, 91, 276–282.
- Wood, S.A., Biessy, L., Puddick, J. 2018. Anatoxins are consistently released into the water of streams with *Microcoleus autumnalis*-dominated (cyanobacteria) proliferations. *Harmful Algae*, 80, 88–95. DOI: [10.1016/j.hal.2018.10.001](https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.10.001)
- Wu, M., Okino, T., Nogle, L.M., Marquez, B.L., Williamson, R.T., Sitachitta, N., Berman, F.W., Murray, T.F., McGough, K., Jacobs, R., Colsen, K., Asano, T., Yokokawa, F., Shioiri, T., Gerwick, W.H. 2000. Structure, synthesis, and biological properties of kalkitoxin, a novel neurotoxin from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 12041–12042. <https://doi.org/10.1021/ja005526y>
- Wu, Z., He, D., Cui, B., Jin, Z. 2019. Ultrasensitive detection of microcystin-LR with gold immunochromatographic assay assisted by a molecular imprinting technique. *Food Chem.*, 283, 517–521. DOI: [10.1016/j.foodchem.2019.01.064](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.064)

- Xian, F., Hendrickson, C.L., Marshall, A.G. 2012. High resolution mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 84, 708-719. DOI: [10.1021/ac203191t](https://doi.org/10.1021/ac203191t)
- Xie, L., Xie, P., Guo, L., Li, L., Miyabara, Y., Park, H. 2005. Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish and different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ. Toxicol.*, 20, 293–300. DOI: [10.1002/tox.20120](https://doi.org/10.1002/tox.20120)
- Xie, L., Xie, P., Ozawa, K., Honma, T., Yokoyama, A., Park, H. D. 2004. Dynamics of microcystins-LR and -RR in the phytoplanktivorous silver carp in a sub-chronic toxicity experiment. *Environ. Pollut.*, 127, 431–439. DOI: [10.1016/j.envpol.2003.08.011](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.08.011)
- Yoo, H.-D., Gerwick, W. H. 1995. Curacins B and C, New Antimitotic Natural Products from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.*, 58, 1961–1965. DOI: [10.1021/np50126a029](https://doi.org/10.1021/np50126a029)
- Youssef, D.T., Shaala, L.A., Mohamed, G.A., Ibrahim, S.R., Banjar, Z.M., Badr, J.M., McPhail, K.L., Risinger, A.L., Mooberry, S.L. 2015. 2,3-seco-2,3-dioxo-lyngbyatoxin A from a Red Sea strain of the marine cyanobacterium *Moorea producens*. *Nat. Prod. Res.*, 29, 703–709. DOI: [10.1080/14786419.2014.982647](https://doi.org/10.1080/14786419.2014.982647)
- Zeller, P., Mejean, A., Biegala, I., Contremoulins, V., Ploux, O. 2016. Fluorescence in situ hybridization of *Microcystis* strains producing microcystin using specific mRNA probes. *Lett. Appl. Microbiol.*, 63, 376–383. DOI: [10.1111/lam.12634](https://doi.org/10.1111/lam.12634)
- Zewde, T. W., Johansen, J.A., Kifle, D., Demissie, T. B., Hansen, J. H., Tadesse, Z. 2018. Concentrations of microcystins in the muscle and liver tissues of fish species from Koka reservoir, Ethiopia: A potential threat to public health. *Toxicon*, 153, 85–95. DOI: [10.1016/j.toxicon.2018.08.013](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.08.013)
- Zhang, C., Naman, C., Engene, N., Gerwick, W. 2017. Laucysteinamide A, a Hybrid PKS/NRPS Metabolite from a Saipan Cyanobacterium, cf. *Caldora penicillata*. *Mar. Drugs*, 15, 121. DOI: [10.3390/md15040121](https://doi.org/10.3390/md15040121)
- Zhang, H., Luo, J., Beloglazova, N., Yang, S., De Saeger, S., Mari, G.M., Zhang, S., Shen, J., Wang, Z., Yu, X. 2019. Portable multiplex immunochromatographic assay for quantitation of two typical algae toxins based on dual-color fluorescence microspheres. *J. Agric. Food Chem.*, 67, 6041–6047. DOI: [10.1021/acs.jafc.9b00011](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00011)