



HAL
open science

Caractérisation des sous-produits de chloration de la microcystine-LR et de la cylindrospermopsine

Sylvain Merel

► **To cite this version:**

Sylvain Merel. Caractérisation des sous-produits de chloration de la microcystine-LR et de la cylindrospermopsine. Autre. Université Rennes 1, 2009. Français. NNT : . tel-00472435

HAL Id: tel-00472435

<https://theses.hal.science/tel-00472435>

Submitted on 12 Apr 2010

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

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



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale Vie Agro Santé

présentée par

Sylvain Merel

préparée à l'unité de recherche LERES
Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé
Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique
S.V.E.

**Caractérisation des
sous-produits de
chloration de la
microcystine-LR
et de la
cylindrospermopsine**

**Thèse soutenue à Rennes
le 21 décembre 2009**

devant le jury composé de :

Cécile BERNARD

Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle /
président

Damià BARCELO

Directeur de recherche, IIQAB-CSIC / *rapporteur*

Catherine GONZALEZ

Professeur, Ecole des Mines d'Ales / *rapporteur*

Bertrand LE ROUZIC

Maître de conférence, Université de Rennes 1 /
examineur

Olivier THOMAS

Professeur, Ecole des Hautes Etudes en Santé
Publique / *examineur*

Michel CLEMENT

Professeur, Ecole des Hautes Etudes en Santé
Publique / *directeur de thèse*

REMERCIEMENTS

Je dédie ce travail à mes parents pour leur soutien tout au long de la thèse.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur Michel Clément, Professeur à l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP) et directeur adjoint du Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé (LERES). Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour les conseils avisés qu'il a su me dispenser depuis le master recherche jusqu'à l'aboutissement de cette thèse. La confiance qu'il m'a accordée ainsi que la liberté qu'il m'a laissée dans mes recherches ont grandement contribué à développer mes capacités d'analyse et de raisonnement.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur Olivier Thomas, Professeur à l'EHESP et directeur du LERES, pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche ainsi que pour avoir su me faire partager son expérience. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a témoignée, ses conseils bienveillants, son dynamisme et son investissement professionnel et personnel lors de cette étude, depuis l'élaboration de la démarche expérimentale jusqu'à la valorisation des résultats. En tant que mentor, il a amplement contribué au développement de ma personnalité de chercheur.

Je tiens à remercier Monsieur René Seux, ancien directeur du LERES et Professeur émérite de l'EHESP, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire lors de mon stage de master recherche ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée en me recrutant pour mener ce travail de thèse.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse, Monsieur Damià Barceló, Directeur de recherche à l'Institut de Recherche en Chimie et Environnement de Barcelone (IIQAB) dépendant du Conseil Supérieur de la Recherche Scientifique espagnol (CSIC), et Madame Catherine Gonzalez, Professeur à l'Ecole des Mines d'Alès, pour avoir accepté de relire et de commenter ce mémoire. Mes remerciements vont aussi à Madame Cécile Bernard, Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle, et à Monsieur Bertrand Le Rouzic, Maître de conférence à l'Université de Rennes 1, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans la participation du Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes. J'exprime donc toute ma gratitude à son directeur, Monsieur Bruno Lebizec, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, et à monsieur Fabrice Monteau pour son aide précieuse et ses conseils lors des analyses sur le LTQ-Orbitrap.

J'adresse également mes sincères remerciements à l'Unité de Toxicologie Génétique des Contaminants Alimentaires de l'AFSSA de Fougères, et plus particulièrement à Mesdames Valérie Fessard et Annick Mourot sans qui l'étude de la toxicité des sous-produits de chloration n'aurait pas été envisageable.

Je suis particulièrement reconnaissant envers Fabien Mercier, Ingénieur de recherche au LERES, pour m'avoir initié à la spectrométrie de masse lors de mon stage de master recherche, et envers Barbara LeBot, responsable de l'unité micropolluant au LERES, pour son aide et ses remarques pertinentes lors de l'élaboration des protocoles d'analyse.

Je remercie l'ensemble du personnel du LERES que j'ai pu côtoyer durant ces 3 années pour leur gentillesse, leur bonne humeur, leurs conseils et leurs encouragements. J'adresse des remerciements particuliers aux techniciens et ingénieurs de l'unité micropolluant pour leur capacité à s'organiser afin d'assurer la disponibilité des appareils lorsque les doctorants les sollicitent.

Je n'oublie pas mes collègues de recherche du LERES (Hélène, Sabrina, Olivier, Sophie, Vincent, Ianis et Youssef) dont certains ont déjà soutenu leur thèse et avec qui j'ai eu plaisir à partager des idées mais aussi des moments de détente.

Je tiens également à remercier Madame Hayet Djelal, enseignant-chercheur à l'Ecole des Métiers de l'Environnement (EME) pour m'avoir orienté vers la recherche et pour ses encouragements depuis le master jusqu'à l'aboutissement de cette thèse.

J'adresse enfin une attention particulière à Ruth ainsi qu'à Monsieur et Madame Chicana pour leurs encouragements et leur soutien indéfectible.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLEAUX	19
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	20
AVANT-PROPOS	25
INTRODUCTION	29

CHAPITRE I : Etude Bibliographique

1. De la cellule cyanobactérienne aux efflorescences toxiques	35
1.1. Les cyanobactéries dans l'environnement.....	35
1.1.1. Position taxonomique.....	35
1.1.2. Diversité écologique.....	36
1.2. La cellule cyanobactérienne	37
1.2.1. Organisation cellulaire et diversité morphologique	37
1.2.2. Pigmentation et photosynthèse.....	38
1.2.3. Multiplication et organisation en colonies	39
1.3. Les efflorescences à cyanobactéries.....	39
1.3.1. Définition et effets indésirables d'une efflorescence	39
1.3.2. Milieux aquatiques concernés	41
1.3.3. Principaux facteurs favorisant les proliférations.....	41
1.3.3.1. <i>L'intensité lumineuse</i>	41
1.3.3.2. <i>La température</i>	41
1.3.3.3. <i>La teneur en azote et en phosphore</i>	43
1.3.3.4. <i>Le temps de séjour et l'agitation de l'eau</i>	43
1.3.4. Détection des proliférations	44
1.3.4.1. <i>Examen visuel du plan d'eau</i>	44
1.3.4.2. <i>Suivi de la transparence et de la turbidité</i>	44
1.3.4.3. <i>Mesure de la chlorophylle a et de la fluorescence pigmentaire</i> ...	45
1.3.5. Identification et dénombrement des cyanobactéries	46
1.3.6. Production de toxines	47
1.3.6.1. <i>Synthèse des toxines</i>	47
1.3.6.2. <i>Libération des toxines dans l'eau</i>	48
1.3.7. Occurrence des blooms de cyanobactéries en France et dans le monde ...	48
1.4. Rôle et classification des cyanotoxines	50
1.4.1. Impact des cyanotoxines sur le biotope.....	50
1.4.2. Nomenclature des cyanotoxines.....	50
2. Les hépatotoxine et autres cyanotoxines dans l'environnement	52
2.1. Les microcystines et les nodularines	52
2.1.1. Synthèse et occurrence	52

2.1.2. Structure et caractéristiques	53
2.1.3. Données toxicologiques	55
2.2. La Cyindrospermopsine	56
2.2.1. Synthèse et occurrence	56
2.2.2. Structure et caractéristiques	56
2.2.3. Données toxicologiques	57
2.3. Autres cyanotoxines	58
2.3.1. Les anatoxines	58
2.3.2. Les saxitoxines	59
2.3.3. Les molécules à effets irritants	60
2.4. Identification et quantification des hépatotoxines.....	61
2.4.1. Préparation des échantillons.....	61
2.4.2. Analyse des toxines par bio-essais	62
2.4.2.1. <i>Les tests sur souris</i>	62
2.4.2.2. <i>Les tests biochimiques</i>	62
2.4.2.3. <i>Les tests immunologiques</i>	63
2.4.2.4. <i>Les tests sur des cellules de mammifères</i>	63
2.4.3. Analyse des toxines par méthodes chromatographiques.....	63
2.4.3.1. <i>Le couplage HPLC-UV</i>	64
2.4.3.2. <i>Le couplage HPLC-MS</i>	65
2.5. Epidémiologie des cyanotoxines	65
2.5.1. Voies d'exposition.....	65
2.5.1.1. <i>Exposition dans les eaux récréatives</i>	65
2.5.1.2. <i>Exposition par l'alimentation</i>	66
2.5.2. Episodes d'intoxication rapportés	67
3. Cyanobactéries, cyanotoxines et production d'eau alimentaire	70
3.1. Gestion des cyanobactéries en amont du traitement	70
3.1.1. La gestion du point de captage	70
3.1.2. Application de traitements algicides	71
3.2. Comportement des cyanobactéries et cyanotoxines lors des traitements.....	72
3.2.1. Description générale de la production d'eau alimentaire.....	72
3.2.2. La clarification	73
3.2.3. L'adsorption sur charbon actif	74
3.2.4. La filtration membranaire.....	76
3.2.5. La biodégradation.....	77
3.2.6. L'irradiation UV	78
3.2.7. L'ozonation	79
3.2.8. La chloration	81
4. Comportement des cyanotoxines vis-à-vis du chlore	82
4.1. Propriétés et réactivité du chlore en solution aqueuse	82
4.1.1. Propriétés du chlore en solution aqueuse et définitions	82
4.1.2. Réactivité du chlore en solution aqueuse	83
4.1.2.1. <i>Réactivité sur les fonctions azotées</i>	83
4.1.2.2. <i>Réactivité sur les composés organiques aliphatiques</i>	84
4.1.2.3. <i>Réactivité sur les composés organiques aromatiques</i>	85
4.2. Réaction du chlore avec les cyanotoxines.....	85
4.2.1. Réaction avec les microcystines et les nodularines.....	85

4.2.1.1. Réactivité avec les toxines.....	85
4.2.1.2. Identification des sous-produits formés	87
4.2.2. Réaction avec la cylindrospermopsine.....	89
4.2.2.1. Réactivité avec la toxine.....	89
4.2.2.2. Identification des sous-produits formés	90
4.2.3. Réaction avec les autres cyanotoxines	91
4.3. Toxicité du milieu après chloration des cyanotoxines	91
4.3.1. Cas des microcystines et des nodularines	92
4.3.2. Cas de la cylindrospermopsine.....	93
4.3.3. Cas des autres cyanotoxines.....	94
5. Synthèse et objectifs de la thèse	95

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

1. Matériels.....	99
1.1. Réactifs.....	99
1.1.1. Préparation des solutions mères de toxines.....	99
1.1.2. Préparation de la solution mère de chlore	100
1.1.3. Réactifs pour le suivi analytique de la chloration	100
1.1.4. Réactifs pour les tests de toxicité	100
1.1.4.1. Le test Microtox.....	100
1.1.4.2. Les tests MTT et rouge neutre	101
1.2. Chromatographie liquide et spectrométrie de masse.....	102
1.2.1. Conditions chromatographiques.....	102
1.2.1.1. Chloration de la microcystine-LR.....	102
1.2.1.2. Chloration de la cylindrospermopsine	103
1.2.2. Spectromètre de masse LTQ-Orbitrap	104
1.2.3. Spectromètre de masse Waters Micromass ZQ.....	105
1.3. Spectrophotométrie UV-visible.....	105
1.4. Etude de la toxicité post-chloration.....	105
2. Méthodes	107
2.1. Préparation du milieu réactionnel	108
2.1.1. Préparation d'eau et de verrerie sans demande en chlore	108
2.1.2. Apport de toxine.....	108
2.1.3. Dosage de la solution mère de chlore.....	109
2.1.4. Chloration des toxines	109
2.2. Suivi du chlore et du spectre UV du milieu	110
2.2.1. Suivi du chlore libre et total	110
2.2.2. Suivi du spectre UV du milieu	110
2.3. Identification et suivi des sous-produits de chloration.....	111
2.3.1. Recherche et identification des sous-produits.....	111
2.3.2. Examen du massif isotopique.....	112
2.3.2.1. Définition du massif isotopique	112
2.3.2.2. Calcul du massif isotopique théorique	112
2.3.3. Suivi des toxines et de leurs sous-produits.....	113
2.4. Examen de la toxicité du milieu réactionnel	113
2.4.1. Le test Microtox	114

2.4.1.1. Principe	114
2.4.1.2. Mise en œuvre.....	115
2.4.1.3. Calcul du facteur d'inhibition de la luminescence.....	116
2.4.2. Le test MTT.....	116
2.4.2.1. Principe	116
2.4.2.2. Mise en œuvre.....	116
2.4.3. Le test rouge neutre	119
2.4.3.1. Principe	119
2.4.3.2. Mise en œuvre.....	119

CHAPITRE III : Chloration de la Microcystine-LR

1. Suivi des réactifs et du spectre UV	123
1.1. Suivi des réactifs	123
1.1.1. Suivi des différentes formes de chlore	123
1.1.2. Suivi de la microcystine-LR.....	125
1.1.3. Cinétique de la réaction.....	126
1.1.4. Discussion	127
1.2. Suivi du spectre UV du milieu réactionnel	128
1.2.1. Examen des spectres UV bruts.....	128
1.2.2. Recherche des points isobestiques	130
1.2.3. Discussion	130
2. Etude des sous-produits de chloration	132
2.1. Examen des sous-produits identifiés dans la littérature	132
2.1.1. La dihydroxy-microcystine	132
2.1.2. La dihydroxy-microcystine hydratée	134
2.1.3. Discussion	137
2.2. Identification de nouveaux sous-produits de chloration	138
2.2.1. La monochloro-microcystine	138
2.2.2. La monochloro-dihydroxy-microcystine.....	140
2.2.3. La dichloro-dihydroxy-microcystine.....	143
2.2.4. La trichloro-hydroxy-microcystine	145
2.2.5. Discussion	147
2.3. Suivi des sous-produits de chloration.....	149
2.4. Examen de la chloration par l'intermédiaire de l'ion m/z 135.....	151
3. Effet du ration molaire [chlore]/[toxine].....	154
3.1. Effet du ratio molaire sur la demande en chlore	154
3.2. Effet du ratio molaire sur l'évolution du spectre UV	155
3.3. Effet du ratio molaire sur la cinétique de transformation de la toxine.....	156
3.4. Effet du ratio molaire sur la formation des sous-produits	156
4. Effet de la chloration sur la toxicité.....	158
4.1. Le test Microtox	158
4.2. Le test MTT.....	159
4.3. Le test rouge neutre	160
4.4. Discussion	161

CHAPITRE IV : Chloration de la Cyindrospermopsine

1. Suivi des réactifs et du spectre UV	165
1.1. Suivi des réactifs	165
1.1.1. Suivi des différentes formes de chlore	165
1.1.2. Suivi de la cyindrospermopsine	166
1.1.3. Cinétique de la réaction	167
1.1.4. Discussion	168
1.2. Suivi du spectre UV du milieu réactionnel	168
1.2.1. Examen des spectres UV bruts	168
1.2.2. Recherche des points isobestiques	169
1.2.3. Discussion	170
2. Etude des sous-produits de chloration	171
2.1. Examen des sous-produits identifiés dans la littérature	171
2.1.1. La 5-chloro-cyindrospermopsine	171
2.1.2. L'acide cyindrospermopsique	173
2.1.3. Discussion	176
2.2. Identification d'un nouveau sous-produit de chloration	176
2.3. Suivi des sous-produits de chloration	179
3. Effet de la chloration sur la toxicité	182
3.1. Le test Microtox	182
3.2. Le test MTT	183
3.3. Le test Rouge Neutre	184
3.4. Discussion	185
DISCUSSION GENERALE	189
1. Transformation des toxines	189
2. Effet de la chloration sur la toxicité du milieu	190
3. Conséquences pour la production d'eau alimentaire	191
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	195
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	201
LISTE DES VALORISATIONS SCIENTIFIQUES	225
ANNEXES	227
Annexe I	229
Annexe II	247
Annexe III	257

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la cellule cyanobactérienne.....	37
Figure 2 : Organisation des cyanobactéries sous forme unicellulaire (A) ; de colonie irrégulière (B) ; de trichome ramifié (C) ; de trichome non ramifié (D) (Mur <i>et al.</i> , 1999 ; Lawton <i>et al.</i> , 1999a)	39
Figure 3 : Accumulation de cyanobactéries sur la berge d'un plan d'eau (photo de Luc Brient à gauche) et prolifération de <i>Planktothrix rubescens</i> (photo de Michel Roux à Droite).....	40
Figure 4 : Modélisation de l'hydrodynamique et de la dynamique du phytoplancton pendant un été froid, normal et chaud dans un lac des Pays-Bas (Jöhnk <i>et al.</i> , 2008)	42
Figure 5 : Représentation de la population d'un bloom de <i>C. raciborskii</i> en fonction de sa précocité et du nombre initial de cellules (Wiedner <i>et al.</i> , 2007).	42
Figure 6 : Abondance des cyanobactéries en fonction de la concentration en azote et en phosphore (Downing <i>et al.</i> , 2001)	43
Figure 7 : Pays dans lesquels des blooms de cyanobactéries toxiques ont été documentés (Carmichael, 2008).....	48
Figure 8 : Nombre de prélèvements effectués en France pour la gestion du risque lié aux cyanobactéries dans l'eau entre 2002 et 2004 (AFSSA/AFSSET, 2006).....	49
Figure 9 : Dénombrement des cyanobactéries dans les plans d'eau bretons en 2008 (DRASS Bretagne).....	49
Figure 10 : Structure générale des MCs.....	53
Figure 11 : Structure générale des NODs	53
Figure 12 : Structure de la MC-LR	54
Figure 13 : Structure de la CYL.....	57
Figure 14 : Structure de l'ANTX-a et de l'ANTX-a(s)	58
Figure 15 : Structure générale des STXs	59
Figure 16 : Structure de la lynbyatoxine-a (A), de l'aplysiatoxine (B) et de la debromoaplysiatoxine (C)	60
Figure 17 : Synoptique du traitement des échantillons pour l'analyse des cyanotoxines (Harada <i>et al.</i> , 1999).....	61
Figure 18 : Détection de plusieurs variants de MCs par HPLC-UV (Harada <i>et al.</i> , 1999).....	64
Figure 19 : Organigramme pour la surveillance des eaux récréatives en cas de prolifération de cyanobactéries en France.....	66
Figure 20 : Cellules de <i>Microcystis aeruginosa</i> avant (A et B) et après 24 heures (C et D) d'exposition au sulfate de cuivre (Kenefick <i>et al.</i> , 1993)	71
Figure 21 : Effet de la coagulation au sulfate d'aluminium sur la concentration en MC-LR intra et extracellulaire (Hall <i>et al.</i> , 2000).....	73
Figure 22 : Isotherme d'adsorption de la MC-LR en eau ultra pure sur du charbon actif vierge (a), en eau ultra pure sur du charbon actif préchargé (b), en compétition avec la matière organique sur du charbon actif vierge (c) (Lambert <i>et al.</i> , 1996).....	76

Figure 23 : Transformation de la MC-LR par irradiation UV (Tsuji <i>et al.</i> , 1995)	79
Figure 24 : Action de l’ozone sur le diène conjugué des MCs (Lawton et Robertson, 1999b).....	80
Figure 25 : Formation de l’acide 3-méthoxy-2méthyle-4phénylbutirique (Harada <i>et al.</i> , 1996).....	80
Figure 26 : Mécanisme classique de réaction du chlore avec les acides aminés (Hureiki <i>et al.</i> , 1994)	84
Figure 27 : Influence du pH sur la cinétique de réaction de la MC-LR avec le chlore (Acero <i>et al.</i> , 2005).....	86
Figure 28 : Observation de 4 isomères associés à m/z 1029 après chloration de la MC-LR (Tsuji <i>et al.</i> , 1997)	88
Figure 29 : Formation de la dihydroxy-microcystine (Merel <i>et al.</i> , 2010).....	88
Figure 30 : Influence du pH sur la cinétique de réaction de la CYL avec le chlore (Rodríguez <i>et al.</i> , 2007b).....	89
Figure 31 : Formation des sous-produits de chloration de la CYL (Merel <i>et al.</i> , 2010).....	90
Figure 32 : Représentation du dispositif LTQ-Orbitrap	104
Figure 33 : Dispositif Microtox 500	106
Figure 34 : Synoptique des expérimentations pour l’étude de la chloration des toxines	107
Figure 35 : Spectres UV de la CYL (dans l’eau) et de la MC-LR (dans un mélange méthanol/eau)	109
Figure 36 : Synoptique de mise en oeuvre du test Microtox	115
Figure 37 : Synoptique de mise en oeuvre des tests MTT et rouge neutre.....	117
Figure 38 : Suivi du chlore libre entre 0 et 6 heures lors de la chloration de la MC-LR.....	123
Figure 39 : Demande en chlore de la MC-LR (A), et évolution du chlore combiné (B).....	124
Figure 40 : Chromatogrammes de m/z 995,5 et aire du signal de la MC-LR après 0, 1, 2 et 5 minutes de chloration (respectivement de haut en bas).....	125
Figure 41 : Evolution de la concentration résiduelle en MC-LR.....	126
Figure 42 : Représentation de l’équation de cinétique de premier ordre pour la transformation de la MC-LR	127
Figure 43 : Spectres UV bruts (A) et normés (B) du milieu réactionnel durant la chloration de la MC-LR (décroissance chronologique du maximum à 240 nm).....	129
Figure 44 : Evolution de l’absorbance à 240 nm et de la quantité de MC-LR résiduelle équivalente	130
Figure 45 : Chromatogramme du rapport m/z 1029,5 après 2 minutes de chloration (dihydroxy-microcystine).....	132
Figure 46 : Spectre de masse en FTMS de la dihydroxy-microcystine	133
Figure 47 : Spectre MS ² de la dihydroxy-microcystine sur le rapport m/z 1029,560.....	133
Figure 48 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la dihydroxy-microcystine	134
Figure 49 : Chromatogramme du rapport m/z 1047 après 2 minutes de chloration	134
Figure 50 : Spectre de masse en FTMS de la monochloro-hydroxy-microcystine.....	135

Figure 51 : Spectre MS ² de la monochloro-hydroxy-microcystine sur le rapport m/z 1047,560	136
Figure 52 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la monochloro-hydroxy-microcystine.....	136
Figure 53 : Chromatogramme du rapport m/z 1029,5 après 2 minutes de chloration (monochloro-microcystine)	138
Figure 54 : Spectre de masse en FTMS de la monochloro-microcystine	139
Figure 55 : Spectre MS ² de la monochloro-microcystine sur le rapport m/z 1029,516.....	139
Figure 56 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la monochloro-microcystine	140
Figure 57 : Chromatogramme du rapport m/z 1063,5 après 2 minutes de chloration	140
Figure 58 : Spectre de masse en FTMS de la monochloro-dihydroxy-microcystine.....	141
Figure 59 : Spectre MS ² de la monochloro-dihydroxy-microcystine sur le rapport m/z 1063,521	142
Figure 60 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la monochloro-dihydroxy-microcystine.....	142
Figure 61 : Chromatogramme du rapport m/z 1079 après 30 minutes de chloration	143
Figure 62 : Spectre de masse en FTMS de la dichloro-dihydroxy-microcystine	143
Figure 63 : Spectre MS ² de la monochloro-dihydroxy-microcystine sur le rapport m/z 1063,521	144
Figure 64 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la dichloro-dihydroxy-microcystine.....	144
Figure 65 : Chromatogramme du rapport m/z 1115 après 15 minutes de chloration	145
Figure 66 : Spectre de masse en FTMS de la trichloro-hydroxy-microcystine	146
Figure 67 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la trichloro-hydroxy-microcystine.....	146
Figure 68 : Proposition de mécanisme de transformation de la MC-LR par le chlore (Merel <i>et al.</i> , 2009).....	148
Figure 69 : Evolution temporelle des sous-produits de chloration de la MC-LR (Merel <i>et al.</i> , 2009).....	149
Figure 70 : Fragmentation de la MC-LR pour former l'ion m/z 135.....	151
Figure 71 : Chromatogrammes de divers ions après différents temps de chloration.....	152
Figure 72 : Evolution temporelle des ions m/z 135 et m/z 77	153
Figure 73 : Effet du ratio molaire [chlore]/[MC-LR] R sur la demande en chlore de la MC-LR	154
Figure 74 : Influence du ratio [chlore]/[MC-LR] R sur les spectres UV normés enregistrés 0, 1, 2, 5 et 30 minutes (dans l'ordre décroissant d'absorbance à 240 nm) après la mise en contact des réactifs	155
Figure 75 : Représentation de l'équation de cinétique de premier ordre de transformation de la MC-LR pour différents ratios [chlore]/[MC-LR] R.....	156
Figure 76 : Influence du ratios [chlore]/[MC-LR] R sur la formation de dihydroxy-microcystine	157
Figure 77 : Estimation de la toxicité du milieu contenant la MC-LR par Microtox.....	158
Figure 78 : Résultats du test MTT pour la MC-LR chlorée et non chlorée	159
Figure 79 : Résultats du test rouge neutre pour la MC-LR chlorée et non chlorée	160
Figure 80 : Demande en chlore de la CYL (A), et évolution du chlore combiné (B).....	165

Figure 81 : Chromatogrammes de m/z 416,1 et aire des signaux après différents temps de chloration	166
Figure 82 : Evolution de la concentration résiduelle en CYL.....	167
Figure 83 : Représentation de l'équation de cinétique de premier ordre pour la CYL.....	167
Figure 84 : Spectres UV bruts (A) et normés (B) du milieu réactionnel avant (spectre en pointillé) et durant la chloration de la CYL (décroissance chronologique du maximum à 305 nm)	169
Figure 85 : Chromatogramme du rapport m/z 450,1 après 2 minutes de chloration	171
Figure 86 : Spectre de masse en FTMS de la 5-chloro-cylindrospermopsine	172
Figure 87 : Spectre MS ² de la 5-chloro-cylindrospermopsine sur le rapport m/z 450,084	172
Figure 88 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la 5-chloro-cylindrospermopsine	173
Figure 89 : Chromatogramme du rapport m/z 350,1 après 2 minutes de chloration	174
Figure 90 : Spectre de masse en FTMS de l'acide cylindrospermopsique	174
Figure 91 : Spectre MS ² de l'acide cylindrospermopsique sur le rapport m/z 350,101.....	175
Figure 92 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de l'acide cylindrospermopsique	175
Figure 93 : Chromatogramme du rapport m/z 375,1 après 60 minutes de chloration	176
Figure 94 : Spectre de masse en FTMS du nouveau sous-produit de la CYL observé à m/z 375,1	177
Figure 95 : Spectre MS ² du nouveau sous-produit de la CYL sur le rapport m/z 375,097	177
Figure 96 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental du nouveau sous-produit de la CYL.....	178
Figure 97 : Evolution temporelle des sous-produits de chloration de la CYL.....	180
Figure 98 : Proposition de mécanisme de transformation de la CYL par le chlore.....	181
Figure 99 : Estimation de la toxicité du milieu contenant la CYL par Microtox	182
Figure 100 : Résultats du test MTT pour la CYL chlorée et non chlorée.....	183
Figure 101 : Résultats du test rouge neutre pour la CYL chlorée et non chlorée	184

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Correspondance entre classification botanique et bactériologique des cyanobactéries	36
Tableau 2 : Classification des principales cyanotoxines suivant leur organe cible et leur nature chimique	51
Tableau 3 : Exemples d'intoxications associées aux cyanobactéries toxiques recensées dans la littérature	68
Tableau 4 : Synthèse des travaux relatifs à la toxicité des cyanotoxines chlorées (Merel <i>et al.</i> , 2010)	92
Tableau 5 : Composition de la phase mobile pour l'analyse de la MC-LR sur colonne greffée C18	103
Tableau 6 : Composition de la phase mobile pour l'analyse de la MC-LR sur colonne HILIC	103
Tableau 7 : Echantillons soumis aux tests MTT et rouge neutre	118

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

Adda	Acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyle-10-phényle-4,6diénoïque
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AFSSET	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
Ala	Alanine
ANTX	Anatoxine
CAG	Charbon actif en grain
CAP	Charbon actif en poudre
CID	Collision induced dissociation
COD	Carbone organique dissous
COT	Carbone organique total
CYL	Cylindrospermopsine
DDASS	Direction départementale des affaires sanitaires et sociales
DJA	Dose journalière admissible
DL₅₀	Dose létale à 50%
DPD	N,N-diéthyle-p-phénylènediamine
DRASS	Direction régionale des affaires sanitaires et sociales
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FMN	Flavine mononucléotide
FTMS	Spectrométrie de masse à transformée de Fourier
GIS	Groupement d'intérêt scientifique
Glu	Acide iso-glutamique
HILIC	Chromatographie liquide d'interaction hydrophile
HPLC-MS	High performance liquid chromatography – mass spectrometry
HPLC-UV	High performance liquid chromatography – ultraviolet spectrophotometry

IARC	Agence internationale pour la recherche sur le cancer
i.p.	Intrapéritonéal
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LPS	Lipopolysaccharide
m/z	Rapport masse/charge d'un ion
MC	Microcystine
Mdha	Méthyle-déhydro-alanine
Mdhb	Méthyle-déhydro-butyrique
MeAsp	Acide méthyle-aspartique
MES	Matières en suspension
MMPB	Acide 2-méthyle-3-méthoxy-4-phénylbutyrique
MON	Matière organique naturelle
MS²	Spectrométrie de masse en tandem
MTT	Bromure de méthylthiazolyldiphenyl-tetrazolium
NOAEL	No observable adverse effect level (dose maximale sans effet observable)
NOD	Nodularine
OAS	Solution d'ajustement de la pression osmotique
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	Polymerase chain reaction
PSP	Paralytic shellfish poison (toxine paralysante des coquillages)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDBR	Solution de dilution des bactéries réhydratées
SPDs	Sous-produits de désinfection
STX	Saxitoxine
THMs	Trihalométhanes
u.m.a.	Unité de masse atomique

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. Michel Clément, enseignant-chercheur à l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP), en étroite collaboration avec le Pr. Olivier Thomas, directeur du Laboratoire d'Etude et de Recherche en Environnement et Santé (LERES) et enseignant-chercheur à l'EHESP. Sa dimension pluridisciplinaire a impliqué la collaboration de divers laboratoires.

Tout d'abord, l'ensemble des expériences relatives à la cinétique de consommation des réactifs et de formation des sous-produits a été mené au LERES. Les analyses d'échantillons par spectrométrie de masse conventionnelle ont été réalisées au sein de l'unité « micropolluants » dirigée par le Dr. Barbara Lebot. Les analyses par spectrophotométrie UV-visible ont quant à elles été conduites au sein de l'unité « physico-chimie » sous la responsabilité de Dominique Verrey. De plus, les analyses de toxicité à l'aide du dispositif Microtox ont été mises en œuvre au sein de l'unité « microbiologie » sous la tutelle de Fleur Chaumet.

Ensuite, les expériences exigeant le recours à un spectromètre de masse d'une plus haute résolution ont été réalisées au Laboratoire d'Analyse des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA) situé à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes et dirigé par le Dr. Bruno Le Bizec. Le paramétrage du système LTQ-Orbitrap a alors été réalisé par Frabrice Monteau, ingénieur et responsable d'exploitation.

Enfin, les analyses de toxicité sur les cellules Caco-2 ont été conduites à l'unité de toxicologie de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) de Fougères, sous la direction du Dr Valérie Fessard. La culture des cellules ainsi que la mise en œuvre des tests MTT et rouge neutre ont été effectuées par Annick Mourot.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les cyanobactéries, encore connues sous le nom de cyanophycées ou algues bleu-vert, sont des êtres unicellulaires reconnus comme des micro-organismes pionniers de la terre primitive (Mur *et al.*, 1999). L'oxygène libéré dans l'atmosphère grâce à leur activité photosynthétique serait à l'origine de la couche d'ozone protégeant du rayonnement ultraviolet et ayant permis à la vie de se développer hors de l'eau. Aujourd'hui, les cyanobactéries sont présentes sur l'ensemble du globe et même dans les milieux les plus inhospitaliers tels que les sources chaudes, les glaciers, le sable des zones désertiques... (Mur *et al.*, 1999). Néanmoins, les eaux douces et marines tempérées restent leur habitat principal.

Les cyanobactéries se développent particulièrement dans des milieux aquatiques enrichis en nutriments par l'eutrophisation, phénomène naturel de vieillissement des plans d'eau (Heisler *et al.*, 2008). Par conséquent, dans les zones tempérées, l'accélération de l'eutrophisation en raison des activités anthropiques s'accompagne d'une augmentation des cas de développement excessif de biomasse algale appelés blooms. Par exemple, à la surface de l'eau, la prolifération des cyanobactéries peut ainsi aboutir à la formation d'un voile constitué de cellules et visible à l'œil nu. De plus, le changement climatique pourrait contribuer à accroître la fréquence et l'intensité de ces épiphénomènes (Dale *et al.*, 2006 ; Paul, 2008).

En plus de leur aspect inesthétique, des problèmes de mortalité de poissons qu'ils engendrent et des conséquences négatives sur la fréquentation touristique, les blooms de cyanobactéries représentent aussi une contrainte pour la production d'eau potable. En effet, leur présence dans l'eau brute occasionne généralement diverses perturbations des filières de traitement telles que le colmatage plus rapide des filtres ou l'augmentation de la consommation des réactifs. De plus, la géosmine et le 2-méthyl-isobornéol potentiellement libérés par les cyanobactéries sont également à l'origine de l'odeur et du goût désagréables de l'eau dénoncés par des plaintes de la part des consommateurs (Falconer *et al.*, 1999).

Cependant, depuis environ une vingtaine d'années, la recherche s'est progressivement orientée vers les toxines produites par certaines espèces de cyanobactéries et appelées cyanotoxines. Celles-ci représentent aujourd'hui une problématique majeure en termes d'environnement et de santé publique. En effet, les cyanotoxines ont été associées à divers cas

d'intoxication humaine et animale (Edwards *et al.*, 1992; Mez *et al.*, 1997; Pouria *et al.*, 1998 ; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999; Briand *et al.*, 2003 ; Griffiths et Saker, 2003).

La France fait partie des pays concernés par les blooms de cyanobactéries et les toxines qui les accompagnent. En 1998, le ministère de la santé et celui de l'environnement lancent le programme EFFLOCYA afin d'obtenir une première évaluation du risque toxique lié aux cyanobactéries d'eau douce. Les résultats de cette étude montrent qu'a priori aucune région n'est épargnée (Sarazin *et al.*, 2002). A cette époque, les proliférations cyanobactériennes se manifestent majoritairement entre juin et septembre. Avec jusqu'à 82 % des plans d'eau envahis par des blooms, la région Ouest de la France semble particulièrement touchée. *Microcystis aeruginosa* apparaît alors comme l'espèce toxique la plus fréquemment rencontrée devant *Anabaena sp.*, *Aphanizomenon flos-aquae* et *Planktothrix agardhii*.

Pour faire suite au programme EFFLOCYA, les mêmes ministères saisissent l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) et l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET) afin de réaliser une étude détaillée du risque sanitaire lié à la présence de cyanobactéries dans l'eau. En juillet 2006, ce travail aboutit à la publication d'un rapport intitulé « Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives », qui présente, d'une part, un état des connaissances et, d'autre part, une analyse des données recueillies en France entre 2002 et 2004.

Hormis la baignade et l'ingestion d'aliments potentiellement contaminés tels que le poisson ou les fruits de mer (Dietrich et Hoeger, 2005 ; Ibelings et Chorus, 2007), l'homme peut être exposé aux cyanotoxines par l'eau de boisson lorsque celle-ci est produite à partir d'une eau de surface affectée par un bloom. En effet, diverses intoxications se traduisant majoritairement par des gastroentérites ont été rapportées dans le monde (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999), mais des cas d'empoisonnements létaux sont également connus (Jochimsen *et al.*, 1998; Pouria *et al.*, 1998; Azevedo *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2006). Afin de protéger la santé du consommateur, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) considère la cyanotoxine la plus fréquemment détectée (la microcystine-LR) et propose une concentration maximale de 1 µg/L dans l'eau alimentaire (OMS, 1998).

Connaître le comportement des cyanotoxines au sein des filières de production d'eau destinée à la consommation humaine est donc un enjeu important dans le but d'optimiser les

traitements et diverses études ont d'ores et déjà été publiées (Pendleton *et al.*, 2001; Brooke *et al.*, 2006; Gijbbersen-Abrahamse *et al.*, 2006 ; Huang *et al.*, 2007 ; Rodríguez *et al.*, 2007a).

Dans ce contexte, les travaux réalisés au cours de cette thèse se focalisent sur le comportement des cyanotoxines lors de l'étape de désinfection de l'eau par le chlore. En effet, la chloration est le traitement de désinfection le plus répandu en France car, quelle que soit l'installation, la circulaire DGS n°524 : DE n°19-03 du 7 novembre 2003 exige une teneur en chlore libre résiduel de 0,3 mg/L en sortie des réservoirs.

En production d'eau destinée à la consommation humaine, le chlore est utilisé pour inactiver les micro-organismes pathogènes et prévenir l'apparition des maladies d'origine hydrique. Cependant, en raison de son fort pouvoir oxydant, le chlore réagit également avec la matière organique présente dans l'eau, dont certains micropolluants et toxines. La transformation des cyanotoxines pourrait donc être a priori une conséquence positive de la chloration, comme en témoignent plusieurs publications (Nicholson *et al.*, 1994; Tsuji *et al.*, 1997; Kull *et al.*, 2004; Acero *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2006a; Xagorarakis *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2007b). Néanmoins, ces études ne font majoritairement que confirmer la transformation de la molécule mère sans considérer les sous-produits formés. Or, avant de conclure au bénéfice de la chloration des cyanotoxines pour le consommateur d'eau, les produits issus de la réaction doivent être caractérisés, car ceux-ci peuvent tout autant s'avérer inoffensifs que toxiques.

Les travaux de recherche menés au cours de cette thèse visent donc à améliorer nos connaissances du comportement des cyanotoxines vis-à-vis du chlore et ceci sur deux plans : l'identification des sous-produits formés et l'examen de la toxicité résiduelle du milieu. Devant l'impossibilité d'étudier l'ensemble des métabolites toxiques de cyanobactéries, les recherches seront centrées sur 2 hépatotoxines : la microcystine-LR (MC-LR) et la cylindrospermopsine (CYL), la première étant la cyanotoxine la plus fréquemment détectée et la seconde une cyanotoxine émergente en Europe (Fastner *et al.*, 2003; Brient *et al.*, 2009).

Ce mémoire est divisé en quatre parties. La première est consacrée à une étude bibliographique présentant les cyanobactéries, la formation des blooms toxiques, les principales cyanotoxines ainsi qu'un bref état de l'art sur leur comportement au sein des filières de production d'eau de consommation. La seconde partie détaille ensuite les matériels et méthodes utilisés pour étudier la chloration des toxines et la toxicité du milieu. Enfin, la troisième et la quatrième partie présentent les résultats obtenus ainsi que leur interprétation.

CHAPITRE I

Etude Bibliographique

La problématique des cyanobactéries et de leurs toxines en production d'eau destinée à la consommation humaine est un sujet complexe. Afin de l'appréhender au mieux, il est indispensable de comprendre l'écologie des cyanobactéries, la toxicologie de leurs métabolites ainsi que l'effet des différents traitements appliqués à l'eau.

Ce chapitre permettra d'introduire en détail l'intérêt de prendre en considération la présence potentielle des cyanotoxines dans la ressource lors de la production d'eau potable et de situer dans ce contexte particulier les travaux de recherche menés au cours de cette thèse. Quatre sous-parties présenteront respectivement : la cellule cyanobactérienne et la formation d'efflorescences toxiques ; les cyanotoxines dans l'environnement ; le devenir des cyanobactéries et de leurs métabolites en production d'eau alimentaire ; l'état de l'art de la chloration des cyanotoxines. Un paragraphe définira ensuite les objectifs de la thèse.

Une partie des éléments présentés dans ce chapitre a fait l'objet d'un article (Annexe I) intitulé « State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine » publié dans la revue *Toxicon*.

1. DE LA CELLULE CYANOBACTERIENNE AUX EFFLORESCENCES TOXIQUES

Grâce à leurs propriétés cellulaires et à leur grande diversité les cyanobactéries occupent une place prépondérante dans l'environnement. Cependant, leur multiplication parfois excessive dans certains plans d'eau peut aboutir à une accumulation de cellules en surface allant jusqu'à former une pellicule de couleur variable selon les espèces. En termes de santé publique, la survenue d'un tel phénomène doit alors faire l'objet d'une attention particulière en raison de la production de métabolites toxiques associée à certaines souches cellulaires.

1.1. Les cyanobactéries dans l'environnement

Examiner la place des cyanobactéries dans l'environnement implique, d'une part, de préciser leur positionnement parmi les autres organismes au sein de la classification taxonomique et, d'autre part, d'étudier leur répartition dans différents milieux en fonction de leur diversité écologique.

1.1.1. Position taxonomique

Le règne végétal et le règne animal font chacun l'objet d'une classification spécifique basée sur de multiples corrélations de caractères communs. La classification botanique se fonde alors essentiellement sur la morphologie cellulaire tandis que la classification bactériologique considère également des caractéristiques physiologiques, biochimiques et génétiques.

Leur structure cellulaire semblable aux bactéries (en particulier par l'absence de noyau) associée à des similitudes avec les algues (dans le mécanisme de la photosynthèse et la possession de chlorophylle a) valent aux cyanobactéries d'être répertoriées à la fois dans la classification botanique et bactériologique. Le tableau 1 tiré du rapport AFSSA/AFSSET publié en 2006 illustre alors la correspondance entre les deux systématiques.

Tableau 1: Correspondance entre classification botanique et bactériologique des cyanobactéries (AFSSA/AFSSET, 2006)

	Classification botanique	Classification bactériologique
Division	Cryptogames	Procaryotes Eubactéries Gracilicutes Cyanobactéries
Classe	Thallophytes	
	Algues	
	Procaryotes	
	Cyanophytes	
	Cyanophycées	

L'emploi des deux classifications étant admis, chacun des termes cyanobactéries ou cyanophycées est valide et en accord avec la systématique pour désigner les 150 genres et environ 2000 espèces d'algues bleu-vert (Skulberg *et al.*, 1993). Cependant, les cyanobactéries sont aujourd'hui répertoriées suivant la nouvelle classification phylogénique basée sur le modèle évolutif et la notion d'ascendance commune. La hiérarchie fixe de catégories (espèce, genre, famille, etc) est alors abandonnée au profit d'un système de taxons emboîtés les uns dans les autres sous forme de cladogrammes.

1.1.2. Diversité écologique

Les cyanobactéries font preuve d'une grande diversité écologique leur permettant de coloniser un grand nombre de milieux incluant les environnements extrêmes tels que les sources chaudes, les glaciers, le sable des zones désertiques (Castenholz, 1973 ; Dor et Danin, 1996 ; Laamanen, 1996). Néanmoins, les eaux douces et marines tempérées sont les principaux habitats de ces micro-organismes.

Les cyanobactéries adoptent des écostratégies très diverses (Mur *et al.*, 1999). Certains genres tels *Microcystis*, *Anabaena* ou *Aphanizomenon* forment des agrégats distribués de façon non homogène dans la colonne d'eau selon l'activité cellulaire. Au voisinage de la surface, la photosynthèse permet une accumulation de carbohydrates qui alourdissent la cellule et l'entraînent vers des zones plus profondes. La cellule retrouve sa flottabilité et remonte vers la surface lorsqu'elle consomme ses réserves, puis son activité photosynthétique augmente à nouveau. D'autres cyanobactéries telles que *Planktothrix agardhii* se développent dans des zones peu profondes et ne forment que de petites colonies dispersées de manière homogène par la simple circulation de l'eau. Certaines espèces telles *Planktothrix rubescens*

se positionnent elles-mêmes dans la colonne d'eau en ajustant leur flottabilité à l'aide d'une vacuole à gaz afin de se maintenir dans une zone optimale pour leur croissance. Enfin, d'autres cyanobactéries, qualifiées de benthiques, se développent sur les sédiments des eaux peu profondes où l'intensité lumineuse permet encore une activité photosynthétique.

D'autre part, certaines espèces des genres *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* ou *Nodularia* ont également la propriété de pouvoir fixer l'azote atmosphérique N_2 , ce qui leur offre un avantage écologique dans les eaux à faible teneur en N (Zevenboom et Mur, 1980).

1.2. La cellule cyanobactérienne

1.2.1. Organisation cellulaire et diversité morphologique

La cellule cyanobactérienne, généralement comprise entre 1 et 10 μm , ne contient pas de noyau. L'organisation cellulaire diffère selon les espèces car celles-ci ne contiennent pas nécessairement les mêmes organites. Néanmoins, la structure type des cyanobactéries peut être représentée comme sur la figure 1.

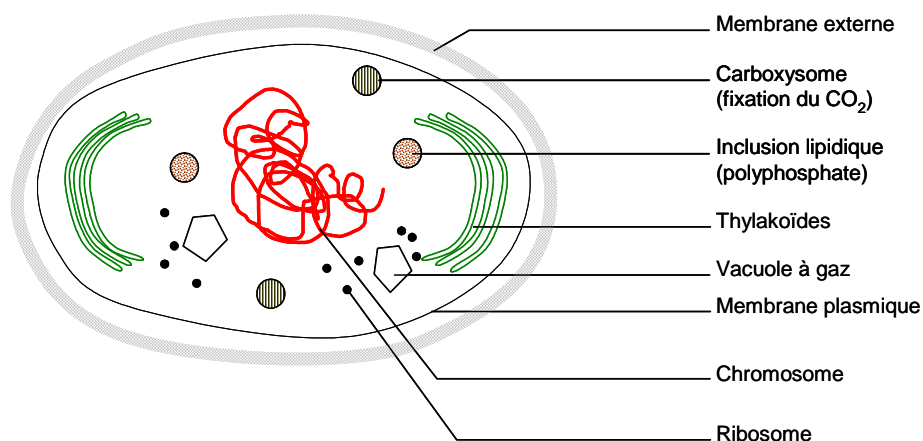


Figure 1 : Représentation schématique de la cellule cyanobactérienne (http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/article.php3?id_article=392)

Les cyanobactéries sont des cellules photosynthétiques dites Gram négatives, dont la paroi se compose d'une membrane externe séparée de la membrane plasmique par l'espace périplasmique. Chacune de ces membranes est constituée d'une bicouche de phospholipide incorporant des protéines structurales et enzymatiques. Alors que la membrane plasmique inclut également une couche de peptidoglycane, la membrane externe contient des

lipopolysaccharides (LPS). Après la lyse cellulaire, ces derniers peuvent provoquer chez l'homme des réactions cutanées.

En plus du matériel chromosomique et des ribosomes indispensables à toute cellule, la figure 1 montre également la présence de carboxyzomes permettant la fixation du CO₂ et d'inclusions lipidiques constituant une réserve de phosphate. Celle-ci représente alors un avantage écologique sur les autres micro-organismes lors d'une carence du milieu en phosphore. Quant aux thylakoïdes, ils permettent à la cellule de réaliser la photosynthèse grâce aux pigments qu'ils contiennent. Enfin, la vacuole à gaz n'est présente que chez certaines cyanobactéries. Comme évoqué auparavant, ce dispositif permet à la cellule de réguler sa flottabilité afin de se maintenir dans la zone optimale de la colonne d'eau (richesse en nutriments, luminosité...).

Par ailleurs, la morphologie cellulaire varie fortement suivant les cyanobactéries. Il est en effet possible d'observer des formes sphériques, ovoïdes ou cylindriques. Par conséquent, la morphologie se révèle ainsi être le critère de base pour l'identification du genre et de l'espèce des cyanobactéries présentes dans un échantillon.

1.2.2. Pigmentation et photosynthèse

Les cyanobactéries réalisent la photosynthèse en présence d'oxygène en utilisant l'eau comme donneur d'électrons pour la réduction du CO₂. Afin de capter l'énergie solaire nécessaire à la photolyse de l'eau, chaque cellule possède un pigment essentiel : la chlorophylle a contenue dans les thylakoïdes.

Cependant, les cyanobactéries comportent également d'autres pigments dits accessoires. Parmi ces derniers, on retrouve en particulier la phycocyanine, les caroténoïdes, l'allophycocyanine ou la phycoérythrine situés à la surface du thylakoïde dans une structure nommée phycobilisome. Leur présence permet d'optimiser le captage de l'énergie lumineuse par la cellule en permettant à cette dernière d'absorber la lumière naturelle dans une gamme de longueur d'onde allant de 450 à 700 nm. Ces pigments accessoires peuvent parfois masquer la coloration verte de la chlorophylle pour donner à la cellule une teinte allant du bleu-vert au rouge.

1.2.3. Multiplication et organisation en colonies

Les cyanobactéries se multiplient de manière asexuée, grâce au phénomène de fission binaire au cours duquel la cellule mère se divise en deux cellules filles. Les cellules cyanobactériennes peuvent soit rester sous forme individualisée, ou s'agréger en colonies de différents aspects, comme illustré sur la figure 2. En effet, grâce à la fine matrice sécrétée au cours de la croissance, les formes unicellulaires (figure 2a) sont susceptibles de s'agglomérer pour former des colonies irrégulières (figure 2b). En revanche, les formes filamenteuses sont le résultat de multiples divisions cellulaires dans un même plan. La structure multicellulaire ramifiée ou non (figure 2c et 2d) qui en résulte est alors appelée trichome.

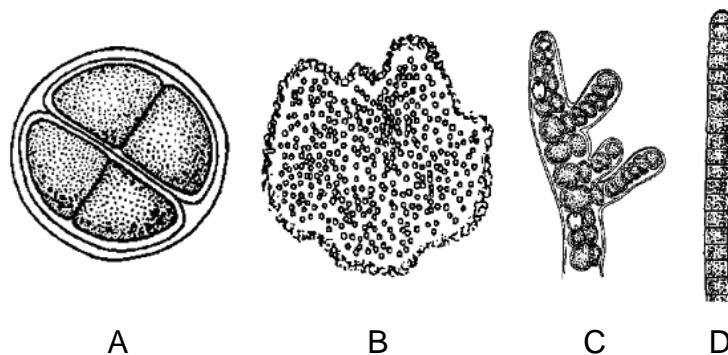


Figure 2 : Organisation des cyanobactéries sous forme unicellulaire (A) ; de colonie irrégulière (B) ; de trichome ramifié (C) ; de trichome non ramifié (D). (Mur *et al.*, 1999 ; Lawton *et al.*, 1999a)

1.3. Les efflorescences à cyanobactéries

Lorsque les conditions optimales à la croissance des cyanobactéries sont réunies, la multiplication excessive de ces micro-organismes peut alors donner lieu au phénomène d'efflorescence, encore appelé prolifération, fleur d'eau ou bloom.

1.3.1. Définition et effets indésirables d'une efflorescence

Aujourd'hui, il n'existe pas de définition claire et précise d'une efflorescence de cyanobactéries au niveau international. Cependant, le rapport AFSSA/AFSSET (2006) définit une prolifération comme la production d'une biomasse importante sur une courte période de temps associée à une diminution de la diversité phytoplanctonique. En effet, une ou deux espèces deviennent alors très largement dominante(s) et un doublement du nombre de cellules peut être observé en une semaine, ce qui se traduit généralement par une coloration de l'eau et l'apparition d'un film de biomasse en surface (figure 3).



Figure 3 : Accumulation de cyanobactéries sur la berge d'un plan d'eau (photo de Luc Brient à gauche) et prolifération de *Planktothrix rubescens* (photo de Michel Roux à Droite)

D'autre part, même si les proliférations de cyanobactéries peuvent disparaître très rapidement, leurs effets indésirables sont multiples :

- Nuisance visuelle due à l'aspect de l'eau et nuisance olfactive due à la décomposition des cellules ;
- Perturbation de l'écosystème aquatique et de la biodiversité ;
- Mortalité piscicole par asphyxie (la respiration des organismes et la décomposition des matières d'origine algale épuisent la quantité d'oxygène contenu dans l'eau) ;
- Mortalité animale (poissons, oiseaux, bétail, animaux domestiques...) par intoxication en cas de bloom toxique (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999) ;
- Irritation cutanée en cas de baignade dans une eau affectée par un bloom ;
- Perturbations des procédés de production d'eau alimentaire telles que le colmatage accéléré des filtres ou l'augmentation de la consommation des réactifs de traitement (Hoehn *et al.*, 1980 ; Bernhardt, 1984) ;
- Dégradation de la qualité organoleptique de l'eau de distribution en raison de la présence de composés sapides (Rebhun *et al.*, 1971 ; Narayan et Nunez, 1974) ;
- Apparition d'un risque pour l'homme en cas d'exposition par voie cutanée (baignade) ou par ingestion (eau alimentaire) aux toxines produites par certaines proliférations.

1.3.2. Milieux aquatiques concernés

D'une manière générale, tous les milieux aquatiques peu turbulents et dans lesquels pénètre la lumière sont susceptibles de subir une efflorescence à cyanobactéries. Des proliférations ont été répertoriées partout dans le monde, aussi bien en mer que dans des lacs ou des rivières (Svrcek et Smith 2004). En revanche, en raison de l'absence de lumière, les eaux souterraines sont épargnées par ce phénomène (les cyanobactéries étant des organismes phototrophes).

1.3.3. Principaux facteurs favorisant les proliférations

L'apparition de prolifération d'algues bleu-vert est généralement associée à une combinaison de facteurs environnementaux dont les 4 principaux sont détaillés ici.

1.3.3.1. L'intensité lumineuse

Les cyanobactéries étant des organismes photosynthétiques, la quantité d'énergie lumineuse disponible représente un facteur de croissance important (Van Liere et Walsby, 1982) expliquant en partie pourquoi les proliférations apparaissent principalement en période estivale. De plus, comme souligné précédemment, l'absorption de la lumière naturelle est optimisée par la pigmentation de ces micro-organismes. Par conséquent, le paramètre crucial pour la formation d'un bloom de cyanobactéries ne réside donc pas tant dans l'intensité de l'irradiation que dans la durée de l'éclairement.

1.3.3.2. La température

La plupart des cyanobactéries atteignent un taux de croissance maximum pour des températures supérieures à 25°C (Robarts et Zohary, 1987). Par conséquent, le réchauffement lié au changement climatique pourrait accroître le nombre de plans d'eau affectés par des blooms dans certaines régions, ainsi que les risques pour la santé publique qui en découlent. En effet, les vagues de chaleur estivales et un climat plus chaud favorisent les cyanobactéries dans la compétition avec les autres espèces phytoplanctoniques (Arheimer *et al.*, 2005 ; Jöhnk *et al.*, 2008), comme l'évoque la figure 4.

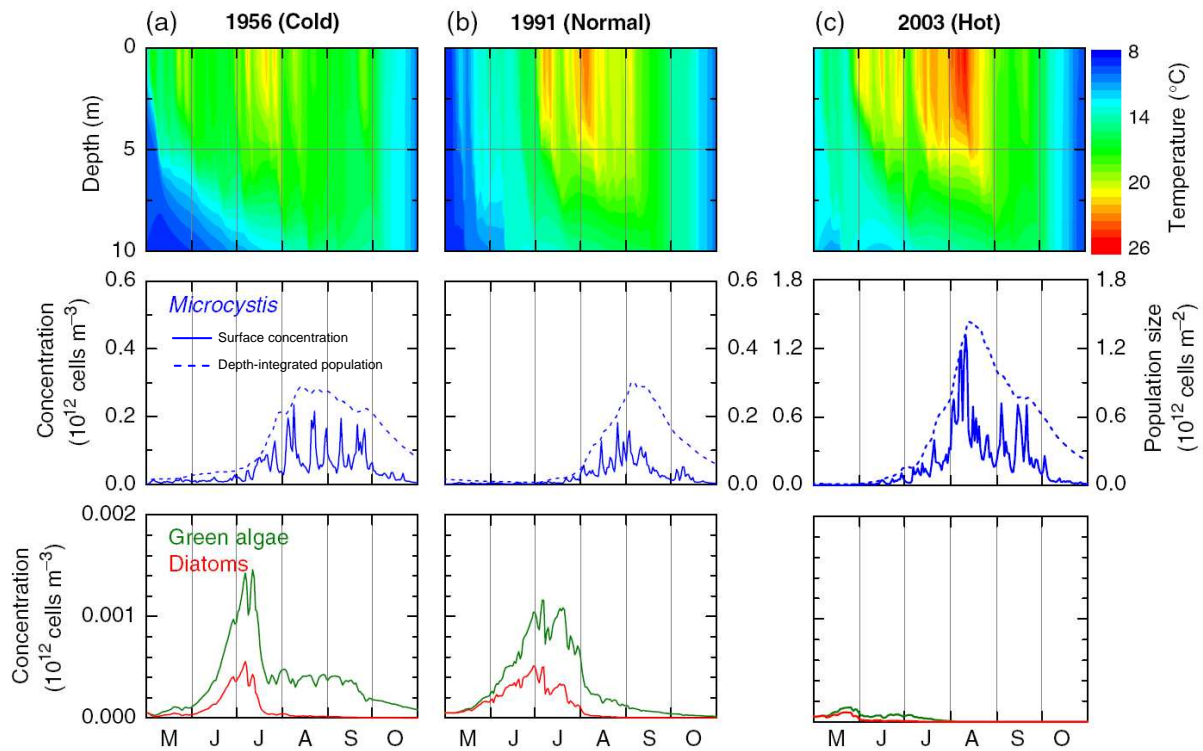


Figure 4 : Modélisation de l'hydrodynamique et de la dynamique du phytoplancton pendant un été froid, normal et chaud dans un lac des Pays-Bas (Jöhnk *et al.*, 2008)

D'autre part, comme le montre la figure 5, les blooms de cyanobactéries sont davantage intenses lorsqu'ils se forment tôt au cours de l'année et lorsque la concentration initiale des cellules est élevée (Wiedner *et al.*, 2007). Or, une élévation des températures pourrait induire une apparition plus précoce des proliférations ainsi qu'une augmentation du nombre de cyanobactéries qui résistent à la période hivernale. Par conséquent, le changement climatique pourrait accroître l'intensité des blooms (Dale *et al.*, 2006 ; Paul, 2008).

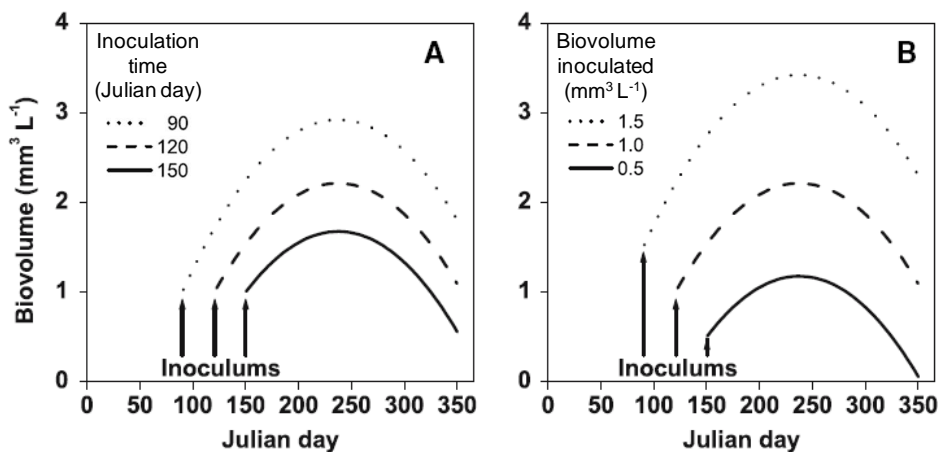


Figure 5 : Représentation de la population d'un bloom de *C. raciborskii* en fonction de sa précocité (A) et du nombre initial de cellules (B). (Adapté de Wiedner *et al.*, 2007)

1.3.3.3. La teneur en azote et en phosphore

N et P sont des éléments nécessaires à la croissance des cyanobactéries. Ainsi, la formation de bloom a souvent lieu dans des plans d'eau eutrophes (Deppe *et al.*, 1999). Une théorie controversée mais fréquemment avancée stipule que la prolifération des cyanobactéries serait essentiellement gouvernée par le rapport N/P. En effet, il semble que les algues bleu-vert se développent de manière optimale pour un ratio N/P de l'ordre de 10 à 15, tandis qu'un ratio de 15 à 20 est nécessaire pour les autres espèces algales (Mur *et al.*, 1999). Cependant, lors d'une étude menée sur 99 lacs, Downing *et al.* (2001) montrent que le risque de dégradation de la qualité de l'eau par une prolifération de cyanobactéries est plus fortement corrélée avec la variation du P total et du N total qu'avec le rapport N/P (figure 6).

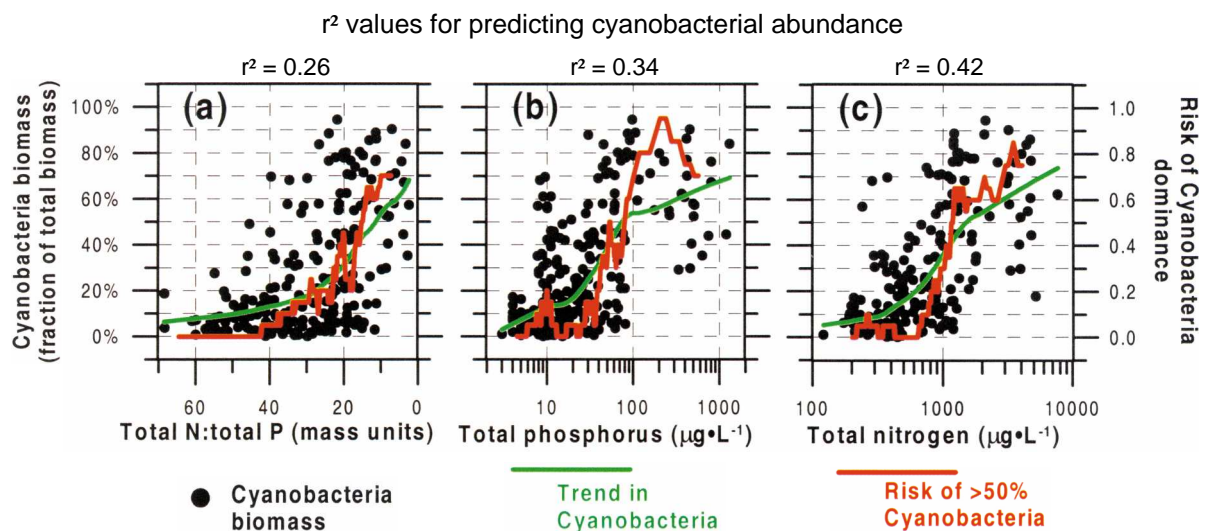


Figure 6 : Abondance des cyanobactéries en fonction de la concentration en N et P (Downing *et al.*, 2001)

De plus, rappelons que les cyanobactéries ont la capacité de stocker le phosphore sous forme de polyphosphate, ce qui les rend plus compétitives lorsque cet élément devient un facteur limitant pour d'autres organismes phytoplanctoniques.

1.3.3.4. Le temps de séjour et l'agitation de l'eau

Les cyanobactéries ont généralement un taux de croissance plus faible que de nombreuses autres espèces algales (Hoogenhout et Ames, 1965). Par exemple, on observe 0,3 à 1,4 division cellulaire par jour pour les cyanophycées contre 0,8 à 1,9 pour les diatomées (Van Liere et Walsby, 1982). Par conséquent, les cyanobactéries ne peuvent former des

efflorescences que dans des zones à faible renouvellement d'eau. D'autre part, les mouvements turbulents provoqués par le vent ou de forts courants aquatiques interfèrent également avec la croissance des cyanobactéries car, dans ces conditions, les cellules ne peuvent plus réguler correctement leur position dans la colonne d'eau.

1.3.4. Détection des proliférations

La détection des proliférations de cyanobactéries peut être assurée selon différentes méthodes allant du simple examen visuel à la mesure sur le terrain de différents paramètres reflétant la concentration en phytoplancton.

1.3.4.1. Examen visuel du plan d'eau

La simple observation à l'œil nu d'un plan d'eau peu permettre de détecter la formation d'une prolifération. En effet, la coloration de l'eau est un bon indicateur et l'apparition d'une teinte rouge ou bleu-vert en l'espace de quelques jours est généralement assez spécifique au développement de cyanobactéries. L'aspect de la surface de l'eau est également révélateur car de nombreuses espèces cyanobactériennes s'y accumulent et forment des amas de cellules ou une fine pellicule, voire de l'écume.

Cependant, la simple surveillance de l'aspect visuel d'un plan d'eau n'est pas suffisante car cela permet de détecter une prolifération établie mais pas de prévoir une apparition soudaine. De plus, des efflorescences peuvent également se produire en profondeur dans la colonne d'eau et demeurer invisible à l'œil nu.

1.3.4.2. Suivi de la transparence et de la turbidité

La transparence est fonction de la coloration et du nombre de particules en suspension dans l'eau. En cas de prolifération cyanobactérienne une coloration verte se développe, la densité de cellules augmente et la transparence diminue. Lorsqu'un disque de Secchi (disque de 20 cm de diamètre divisé en secteurs blancs et noirs) est lentement immergé, la transparence correspond à la profondeur à partir de laquelle on ne distingue plus les cadrans noirs des cadrans blancs. En présence d'un bloom algal, la transparence peut être réduite à quelques centimètres, comme dans le cas d'une eau de surface très chargée en substances humiques.

La turbidité est une estimation indirecte de la quantité des matières colloïdales dans l'eau par mesure de la lumière à 860 nm réfléchi à un angle de 90°C par rapport à la source d'émission (ISO 7027). Cependant, en cas de prolifération, l'augmentation de la turbidité peut être limitée car le phytoplancton absorbe une forte quantité de lumière, et donc la part réfléchi est nettement plus faible qu'en présence de colloïdes.

La transparence ainsi que la turbidité ne sont donc pas des indicateurs spécifiques aux cyanobactéries et leur interprétation doit être reliée à des facteurs environnementaux. Par exemple, après une forte pluviométrie, le ruissellement apporte des matières en suspension pouvant diminuer la transparence et augmenter la turbidité sans lien avec la prolifération phytoplanctonique.

1.3.4.3. Mesure de la chlorophylle *a* et de la fluorescence pigmentaire

La chlorophylle *a* est un paramètre en lien direct avec la quantité de biomasse photosynthétique vivante. Après une étape d'extraction à l'acétone, sa concentration peut être déterminée en laboratoire selon une formule faisant intervenir l'absorbance à 665 et 750 nm (Lorenzen, 1967). Compte tenu de sa sensibilité, cette méthode permet de détecter des proliférations à un stade encore précoce. D'autre part, après excitation à 430 nm, la chlorophylle *a* fluoresce à 665 nm. Des sondes basées sur ce principe permettent alors d'en déterminer la concentration *in situ*. Cependant, ce pigment n'est pas spécifique des cyanobactéries. En cas d'apparition d'une efflorescence, il faudra donc mettre en œuvre des moyens permettant de déterminer quel est le micro-organisme dominant.

Afin de quantifier spécifiquement la population de cyanobactéries, le système de mesure doit donc être basé sur un pigment qui leur est propre. Pour cette raison, une nouvelle génération de sonde a pour but de mesurer la phycocyanine grâce à son maximum d'absorption à 620 nm associé à un maximum d'émission à 645 nm (Brient *et al.*, 2008). Cette méthode rapide et sensible permet la détection de cyanobactéries à partir de 100 cellules/mL (Gregor *et al.*, 2007). Néanmoins, la sonde à phycocyanine à elle seule ne permet pas de connaître la proportion des cyanobactéries dans la biomasse totale. Pour se faire, la phycocyanine doit être mesurée en association avec la chlorophylle *a*. Enfin, une analyse en laboratoire reste indispensable afin d'identifier le genre des cyanobactéries détectées *in situ*.

1.3.5. Identification et dénombrement des cyanobactéries

L'identification et la quantification des cyanobactéries sont les principaux outils permettant d'estimer le risque toxique lié à une prolifération. En effet, selon qu'elles soient connues ou non pour synthétiser des toxines, les cyanophycées sont associées à des niveaux de risque différents.

Tout d'abord, le choix de la zone d'échantillonnage est stratégique. Il varie principalement en fonction de l'usage du plan d'eau surveillé. Par exemple, pour un plan d'eau à usage récréatif, le prélèvement sera généralement réalisé en surface et dans la zone de baignade. En revanche, pour estimer le risque en production d'eau de consommation, le prélèvement sera réalisé au voisinage de la zone de captage et à une profondeur identique.

Les cyanobactéries présentes dans les échantillons sont généralement identifiées et dénombrées selon des critères morphologiques lors de leur observation au microscope en cellule de Malassez (Lawton *et al.*, 1999a). Alors que l'identification des genres ne présente pas de difficulté pour du personnel qualifié, la différenciation des espèces n'est pas toujours possible. Par ailleurs, cette méthode n'aboutit qu'à une estimation du risque toxique car seule une analyse génétique permet de différencier les souches de cyanobactéries toxiques ou non (Sangolkar *et al.*, 2006). De plus, les résultats du comptage cellulaire exprimés en nombre de cellules par mL sont sujets à des erreurs statistiques significatives (Gregor *et al.*, 2007).

Afin de palier aux inconvénients du dénombrement des cyanobactéries par microscopie, des tests génétiques basés en particulier sur le recours à la polymérase chain reaction (PCR) sont en phase de développement (Litaker et Tester, 2002 ; Hisbergues *et al.*, 2003 ; Sangolkar *et al.*, 2006). Après avoir extrait le matériel génétique présent dans l'échantillon d'eau à analyser, la réplique d'une séquence ciblée d'ADN ou d'ARN à l'aide d'une amorce spécifique permet de détecter la présence d'un groupe plus ou moins restreint de cyanobactéries. Par exemple, la séquence de l'espaceur intergénique de la phycocyanine (PC-IGS) permet la détection des cyanobactéries dans leur ensemble tandis que le segment d'ARN ribosomal 16s rARN permet de détecter les souches d'une espèce ou d'un genre en particulier (Sangolkar *et al.*, 2006). Selon Hawkins *et al.* (2005), la détection des cyanobactéries par PCR est très sensible et peu coûteuse (environ 8 \$ par échantillon) mais les résultats ne sont que qualitatifs ou semi-quantitatifs (Hisbergues *et al.*, 2003 ; Dittmann et Börner, 2005). Bien qu'ils doivent encore être optimisés, les tests génétiques sont donc très prometteurs pour la détection des cyanobactéries.

1.3.6. Production de toxines

1.3.6.1. Synthèse des toxines

Les blooms de cyanobactéries ne sont pas tous nécessairement associés à la production de toxines (Sarazin *et al.*, 2002). En effet, ces dernières ne sont produites que lorsque les souches présentes dans l'efflorescence ont les caractéristiques génétiques nécessaires (Brient *et al.*, 2001a, Kurmayer et Christiansen, 2009). La toxicité d'une prolifération à dominante cyanobactérienne dépend donc du potentiel toxique des souches présentes dans le milieu et de leurs proportions respectives au sein du phytoplancton (Sivonen et Jones, 1999).

Tandis que le dénombrement cellulaire par microscopie n'apporte pas d'information sur la production de toxine, les progrès importants réalisés dans le domaine de la génétique durant la dernière décennie ont permis de mieux comprendre ce phénomène, comme le montrent Kurmayer et Christiansen (2009). En effet, les cyanotoxines sont généralement considérées comme des métabolites secondaires (Carmichael, 1992) et les gènes impliqués dans leur synthèse ont été progressivement identifiés (Tillett *et al.*, 2000 ; Moffitt et Neilan, 2004 ; Kellmann *et al.*, 2006 ; Kellmann *et al.*, 2008). Le développement des méthodes PCR permet alors de révéler la présence et la proportion de génotypes toxiques dans les plans d'eau afin d'évaluer la toxicité d'une efflorescence. Par exemple, alors qu'une étude de Vaitomaa *et al.* (2003) montre que le nombre de copies du gène *mcyE* impliqué dans la production de microcystine est positivement corrélé à la concentration de la toxine dans le milieu, une étude de Kurmayer et Kutzenberger (2003) montre que la proportion de *Microcystis* toxique ne varie pas, quelle que soit la taille de la population.

D'autre part, à elle seule, la base génétique de la biosynthèse des toxines ne semble pas expliquer totalement la toxinogénèse. En effet, il est souvent avancé que la production de toxine serait couplée à la division cellulaire (Orr et Jones, 2008), bien que Kosol *et al.* (2009) indiquent qu'il n'y a pas de relation causale. De plus, la production de cyanotoxines semble également régulée par des facteurs environnementaux. Par exemple, la disponibilité en fer dans le milieu (Sevilla *et al.*, 2008) et l'intensité de l'irradiation lumineuse (Tonk *et al.*, 2005) influent sur la transcription de certains gènes impliqués dans la production de microcystine et donc sur la quantité de toxine produite. En définitive, tandis que le patrimoine génétique constitue la base primordiale de la toxinogénèse, le processus de synthèse des toxines serait aussi lié à la croissance cellulaire et la quantité de toxine produite serait régulée en réponse aux facteurs environnementaux (Kurmayer et Christiansen, 2009).

1.3.6.2. Libération des toxines dans l'eau

Les cyanotoxines sont répertoriées comme des endotoxines, des métabolites sécrétés puis stockés à l'intérieur de la cellule. Lors de leur production durant la phase de croissance des cyanobactéries, les cyanotoxines sont donc essentiellement intracellulaires (Hrudey *et al.*, 1999). Elles sont ensuite libérées dans l'eau lors de la mort cellulaire survenant à l'occasion de la phase de sénescence du bloom ou suite à un traitement chimique (algicides utilisés pour le contrôle des efflorescences dans les plans d'eau ou agents oxydants utilisés en tête d'installation de production d'eau potable). Cependant, parmi les cyanotoxines, la cylindrospermopsine (CYL) semble déroger à cette règle générale, car une fraction importante peut être libérée dans le milieu par des cellules en phase de croissance (Chiswell *et al.*, 1999).

1.3.7. Occurrence des blooms de cyanobactéries en France et dans le monde

Actuellement, il n'existe pas de bases de données nationales ou internationales gardant la trace des survenues de blooms de cyanobactéries (Hudnell et Dortch, 2008). Néanmoins, la géographie des efflorescences toxiques peut être estimée grâce aux nombreux articles relatant la détection de cyanotoxines dans les eaux. Ainsi, en 2004, plus de 60 états répartis sur les 5 continents étaient concernés par la présence de cyanobactéries toxiques tant sur le domaine maritime que dans les eaux intérieures (Svrcek et Smith, 2004). Cependant, la liste ne cesse de s'allonger et inclut maintenant, entre autres, l'Espagne (Carrasco *et al.*, 2007), la Tunisie (El Herry *et al.*, 2008) et l'Arabie Saoudite (Mohamed, 2008). La cartographie récente établie par Carmichael (2008) et représentée sur la figure 7 illustre clairement le caractère mondial de la problématique des cyanobactéries toxiques.

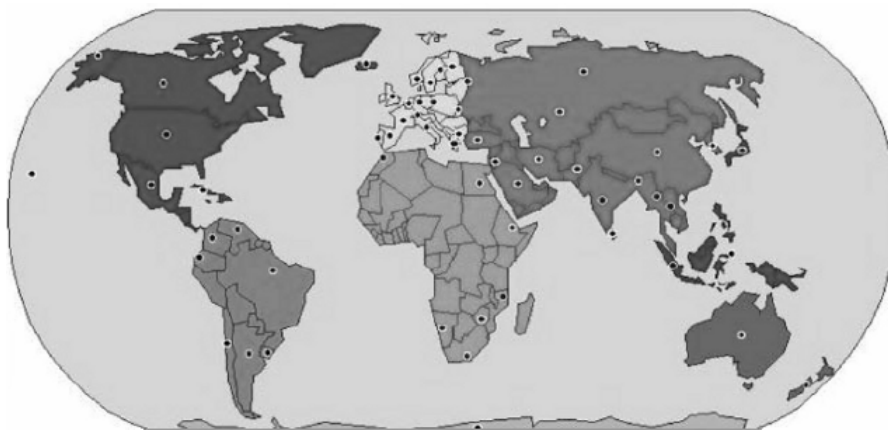


Figure 7 : Pays dans lesquels des blooms de cyanobactéries toxiques ont été documentés (Carmichael, 2008)

Comme le montre la figure 7, la France est également confrontée à ce phénomène. L'étude nationale EFFLOCYA sur l'évaluation du risque toxique lié aux cyanobactéries d'eau douce indique qu'aucune région ne semble épargnée (Sarazin *et al.*, 2002). Avec 82 % des plans d'eau étudiés envahis par des proliférations, l'Ouest du pays semble particulièrement concerné. Cependant, ces résultats, obtenus sur la base des données fournies par les collectivités locales, peuvent être interprétés de 2 manières différentes : soit il y a plus de problèmes avec les cyanobactéries dans l'Ouest donc il y a plus de comptages (figure 8), soit les comptages plus importants dans l'Ouest expliquent les détections de blooms de cyanobactéries plus élevées que dans l'Est.

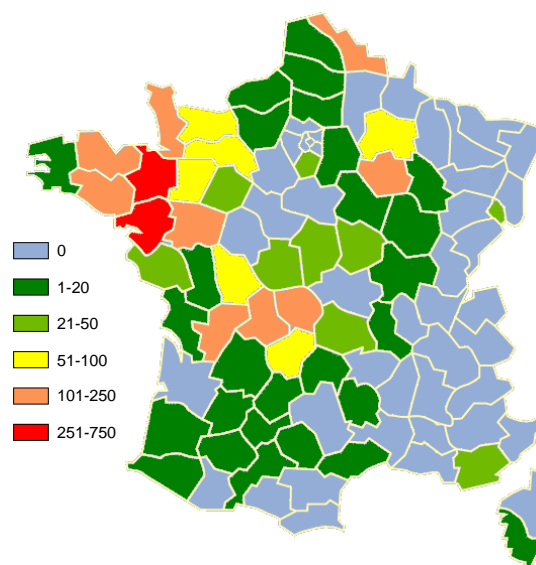


Figure 8 : Nombre de prélèvements effectués en France pour la gestion du risque lié aux cyanobactéries dans l'eau entre 2002 et 2004 (AFSSA/AFSSET, 2006)

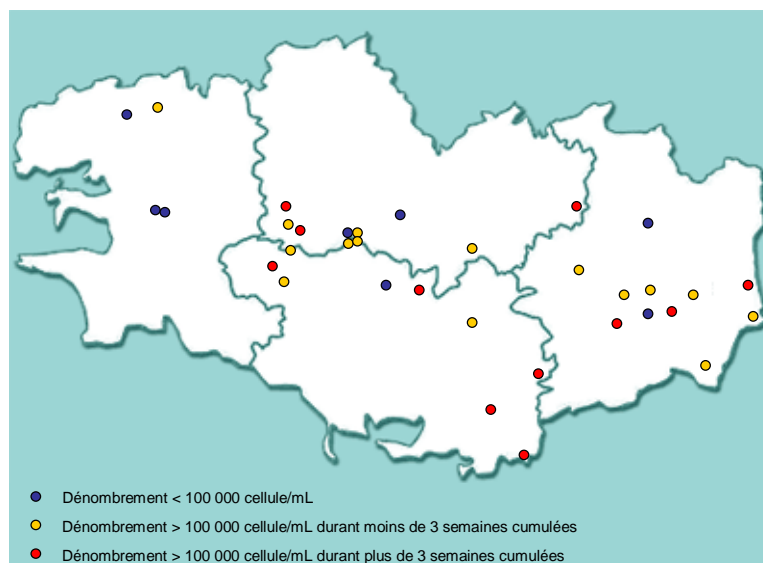


Figure 9 : Dénombrement des cyanobactéries dans les plans d'eau bretons en 2008 (DRASS Bretagne)

La Bretagne n'échappe pas au phénomène de prolifération de cyanobactéries. La figure 9 représente les résultats des dénombrements de cyanobactéries sur 34 plans d'eau surveillés par les Directions Départementales et Régionale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS et DRASS) en 2008. Sur 26 de ces sites, le nombre de cellules par mL s'est révélé supérieur à 300 000 (ce qui correspond à un niveau d'alerte exigeant la recherche de toxines et une surveillance quotidienne du plan d'eau) parfois pendant plus de 3 semaines.

1.4. Rôle et classification des cyanotoxines

1.4.1. Impact des cyanotoxines sur le biotope

Aujourd'hui, le rôle des cyanotoxines n'a toujours pas été clairement établi. Néanmoins, plusieurs hypothèses ont été formulées. Tout d'abord, ces composés ont été considérés comme des métabolites secondaires. Puis, considérant que certaines toxines sont constituées d'acides aminés, Orr et Jones (1998) ont envisagé que celles-ci soient des métabolites primaires constituant une forme de stockage d'azote pour la cellule.

Dans leur synthèse bibliographique, Sivonen et Jones (1999) indiquent que les études existantes ne permettent pas de conclure quant à l'impact des cyanotoxines sur le phytoplancton car leurs résultats sont trop variables. En revanche, ces composés toxiques affectent les poissons ainsi que le bétail et les animaux domestiques lors de l'ingestion d'eau contaminée. Plusieurs cas d'intoxication ont ainsi été décrits dans la littérature (Edwards *et al.*, 1992 ; Mez *et al.*, 1997 ; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999 ; Briand *et al.*, 2003).

1.4.2. Nomenclature des cyanotoxines

Le terme cyanotoxine désigne un grand nombre de composés très différents, tant du point de vue de leur structure que de leurs propriétés toxicologiques. On les répertorie généralement selon leur organe cible (Sivonen et Jones, 1999). Comme le montre le tableau 2, on distingue 3 familles de cyanotoxines :

- Les hépatotoxines
- Les neurotoxines
- Les dermatotoxines

Tableau 2 : Classification des principales cyanotoxines suivant leur organe cible et leur nature chimique

		Classification suivant la nature chimique		
		Polypeptides cycliques	Alcaloïdes	Lipopolysaccharides
Classification suivant l'organe cible	Hépatotoxines	Microcystine Nodularine	Cylindrospermopsine	
	Neurotoxines		Anatoxine-a Anatoxine-a(S) Saxitoxine	
	Dermatotoxines		Aplysiatoxine Lyngbyatoxine-a	Fragments de la membrane cellulaire

Plus rarement, une seconde classification basée sur la nature chimique des cyanotoxines peut être employée. Comme le montre le tableau 2, on distingue alors :

- les polypeptides cycliques
- les alcaloïdes
- les lipopolysaccharides.

Afin de mieux comprendre l'effet de ces composés sur l'homme et l'animal ainsi que la nécessité de les éliminer au sein des filières de production d'eau alimentaire, la section suivante exposera la structure et les données toxicologiques de chacun d'entre eux.

2. LES HEPATOTOXINES ET AUTRES CYANOTOXINES DANS L'ENVIRONNEMENT

Les cyanotoxines diffèrent fortement dans leur structure, leurs caractéristiques physicochimiques et leur mécanisme de toxicité. Une vue d'ensemble de chacune d'entre elles permettra donc de mieux comprendre leur réaction avec le chlore. Néanmoins, les hépatotoxines (MC-LR et CYL), au cœur de ce travail de thèse, seront présentées de manière plus approfondie.

2.1. Les microcystines et les nodularines

2.1.1. Synthèse et occurrence

Les microcystines (notées MCs) sont probablement les cyanotoxines les plus fréquemment détectées dans les eaux. En effet, leur présence a été rapportée dans un large panel de climats et de régions comme les pays scandinaves (Fristachi et Sinclair, 2008), l'Afrique du nord (El Herry *et al.*, 2008 ; Fristachi et Sinclair, 2008), l'Amérique du nord (Fristachi et Sinclair, 2008), l'Europe (Gkelis *et al.*, 2005 ; Fristachi et Sinclair, 2008 ; Ernst *et al.*, 2009), et l'Asie (Dai *et al.*, 2008 ; Fristachi et Sinclair, 2008 ; Zhang *et al.*, 2009). En revanche, les nodularines (notées NODs) n'ont été détectées que dans une zone plus restreinte incluant la Nouvelle-Zélande, l'Australie et la mer baltique (Sivonen et Jones, 1999).

Les MCs sont produites par un grand nombre de cyanobactéries incluant, entre autres, les genres *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaena* et *Anabaenopsis* (Kaebernick et Neilan, 2001). Par contre, les NODs semblent produites uniquement par le genre *Nodularia*. La synthèse de ces toxines est un procédé complexe influencé par les conditions environnementales et variant suivant les souches de micro-organismes présentes dans l'eau. Les avancées technologiques des dernières années dans le domaine de la biologie ont permis de mieux comprendre la production des MCs en révélant que la synthèse de ces composés était contrôlée par l'expression de certains gènes. Par exemple, le groupe de gènes *mcyA-J* code pour un complexe multi-enzyme incluant des peptidases synthétases et des polycétides synthases permettant l'assemblage des composants de la toxine de manière non ribosomale (Kaebernick et Neilan, 2001 ; Dittmann et Wiegand, 2006). Il est alors supposé que la synthèse des NODs suit un processus similaire.

2.1.2. Structure et caractéristiques

Les MCs et les NODs représentent deux groupes de cyanotoxines dont les structures générales sont illustrées sur les figures 10 et 11.

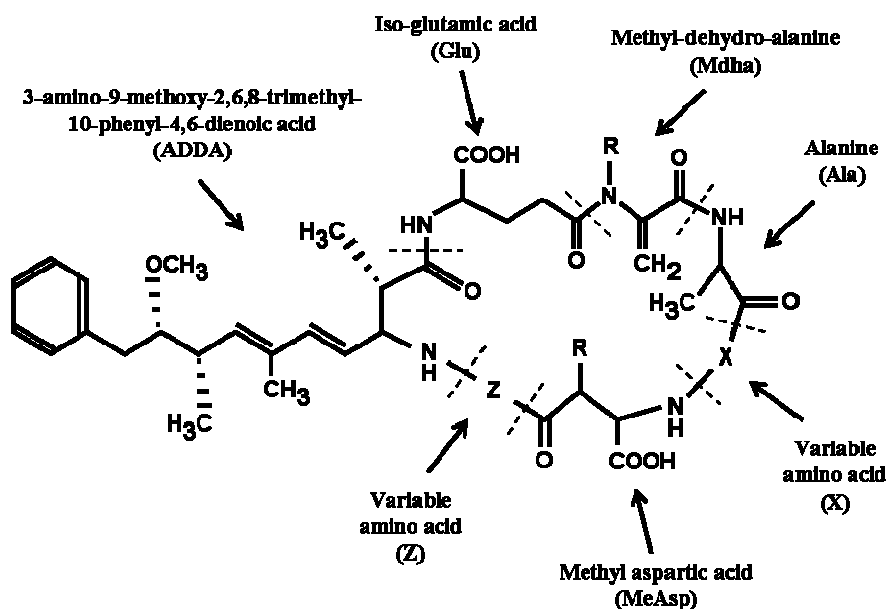


Figure 10 : Structure générale des MCs

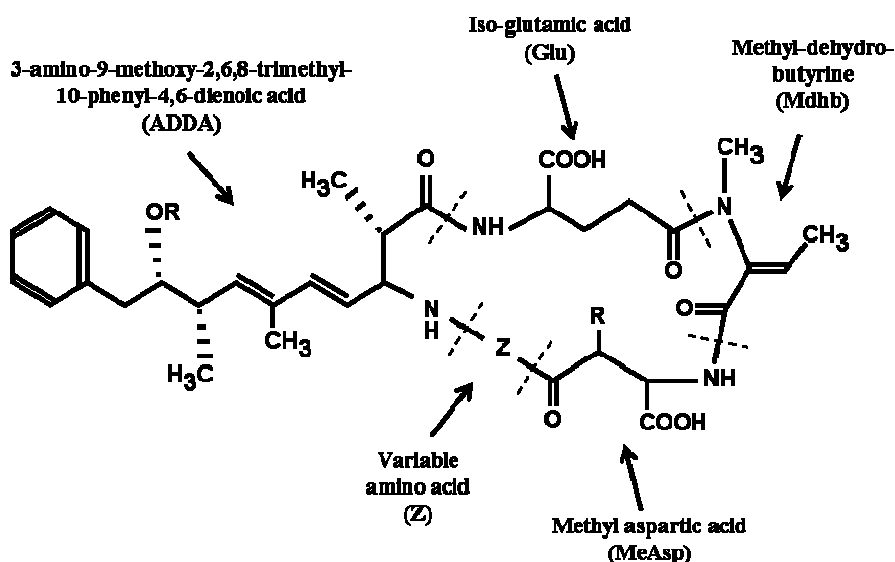


Figure 11 : Structure générale des NODs

Les MCs et les NODs sont respectivement des heptapeptides et pentapeptides cycliques incluant un acide aminé peu commun : Adda (acide 3-amino-9-méthoxy-2,6,8-triméthyle-10-phényle-4,6diénoïque). Le diène conjugué de ce dernier semble être à l'origine de la toxicité de ces deux familles de composés discutée plus loin (An et Carmichael, 1994 ; Tsuji *et al.*, 1997 ; Dawson, 1998). D'autre part, les acides aminés dits variables (X et Z pour les MCs, et seulement Z pour les NODs) ont également une importance toute particulière. En effet, leurs différentes combinaisons permettent de différencier plus de 70 MCs déjà observées (Sivonen et Jones, 1999 ; Westrick, 2003 ; De Figueiredo *et al.*, 2004 ; Codd *et al.*, 2005a ; Codd *et al.*, 2005b ; Dietrich et Hoeger, 2005 ; Sangolkar *et al.*, 2006) et 9 NODs (Codd *et al.*, 2005a). Chaque variant de toxine est alors clairement identifié grâce aux initiales de ses acides variables X et Z. Par exemple, la MC la plus fréquente (illustrée sur la figure 12) qui comporte la leucine (initiale L) en position X et l'arginine (initiale R) en position Z est identifiée comme la MC-LR. De la même manière, la NOD ayant l'arginine en position Z est identifiée comme la NOD-R.

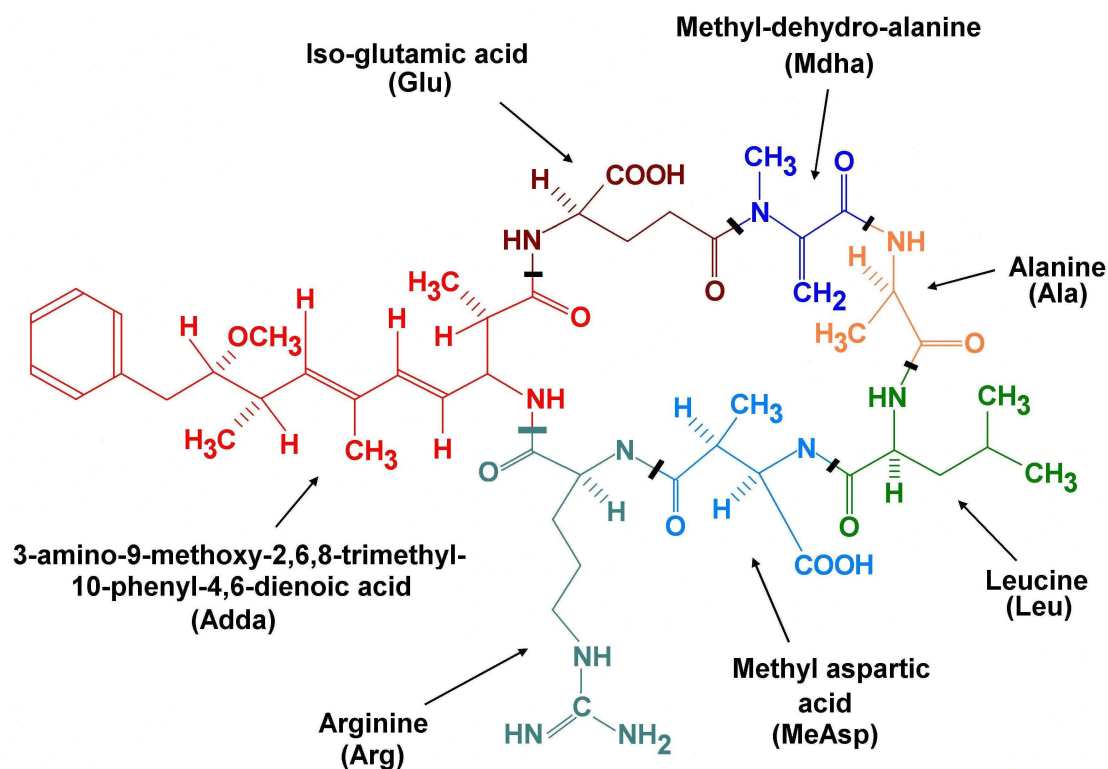


Figure 12 : Structure de la MC-LR

Les MCs et les NODs sont des composés solubles dans l'eau et dotés d'une grande stabilité chimique en raison de leur structure cyclique. En effet, ces molécules sont connues pour leur résistance à l'ébullition, à l'hydrolyse chimique et à l'oxydation à pH proche de la neutralité. Par exemple, dans les eaux naturelles et à l'obscurité, les MCs restent stables pendant plusieurs mois ou années (Sivonen et Jones, 1999). Cependant, ces toxines peuvent être dégradées en quelques dizaines de minutes par une irradiation aux rayons UV de l'ordre de $500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Tsuji *et al.*, 1995 ; Gajdek *et al.*, 2004), et en quelques secondes par une dose de l'ordre du mg/L d'oxydants puissants tels que l'ozone (Hoeger *et al.*, 2002 ; Brooke *et al.*, 2006 ; Onstad *et al.*, 2007) ou le chlore (Nicholson *et al.*, 1994 ; Tsuji *et al.*, 1997 ; Kull *et al.*, 2004 ; Acero *et al.*, 2005).

2.1.3. Données toxicologiques

Les MCs et NODs sont des hépatotoxines. Une fois assimilées par l'organisme, elles sont rapidement et majoritairement concentrées au niveau du foie (Fischer *et al.*, 2000) où elles se fixent sur la protéine phosphatase en établissant des liaisons covalentes (Dawson, 1998 ; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). En conséquence, l'action de la protéine phosphatase est inhibée et les protéines phosphorylées s'accumulent dans les cellules hépatiques qui se nécrosent. Chez la souris, une intoxication aiguë conduit alors à la mort en quelques heures par le biais d'une hémorragie hépatique massive (MacKintosh *et al.*, 1990 ; Dawson, 1998 ; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999 ; Gupta *et al.*, 2003). En revanche, en plus des dommages hépatiques, une intoxication chronique par les MCs pourrait induire des atteintes pulmonaires et rénales (Falconer, 1991 ; Milutinovic *et al.*, 2003). De plus les MCs ont également montré un pouvoir promoteur de cancer (Falconer, 1991 ; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992 ; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). Elles sont ainsi classées parmi les agents possiblement cancérigènes pour l'homme (groupe 2b) par l'Agence International pour la Recherche sur le Cancer (IARC).

La toxicité d'un échantillon dépend du variant de toxine présent dans le milieu (Sivonen et Jones, 1999). Cependant, la MC-LR et la NOD-R (les plus souvent détectées) semblent généralement servir de référence pour les MCs et les NODs. Lorsqu'elles sont administrées par injection intrapéritonéale (i.p.), les doses létales 50 (DL_{50}) de la MC-LR et de la NOD-R varient respectivement de 25 à 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et de 50 à 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

2.2. La Cylindrospermopsine

2.2.1. Synthèse et occurrence

La cylindrospermopsine (notée CYL) a longtemps été considérée comme une toxine tropicale (Rücker *et al.*, 2007) car on l'a retrouvée principalement en Australie (Saker *et al.*, 1999 ; Shaw *et al.*, 1999 ; Griffiths et Saker, 2003 ; Fristachi et Sinclair, 2008 ; Stewart *et al.*, 2008), Nouvelle-Zélande (Stirling et Quilliam, 2001), Thaïlande (Carmichael *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2001) ou dans le sud des USA (Burns, 2008). Néanmoins, depuis quelques années, la CYL a été détectée dans des pays tempérés tels que l'Allemagne (Fastner *et al.*, 2003; Fastner *et al.*, 2007; Rücker *et al.*, 2007; Wiedner *et al.*, 2008) et la France (Bernard *et al.*, 2003; Briant *et al.*, 2009), mais également dans un environnement boréal comme en Finlande (Spoof *et al.*, 2006).

La CYL est principalement synthétisée par *Cylindrospermopsis raciborskii*, mais elle a également été associée à d'autres cyanobactéries telles que *Aphanizomenon ovalisporum*, *Raphidiopsis curvata* et *Umezakia natans* (Banker *et al.*, 1997 ; Fristachi et Sinclair, 2008). Cependant, il peut également exister des souches non toxiques de ces mêmes cyanobactéries (Schembri *et al.*, 2001). Tout comme pour les MCs, la synthèse de CYL semble régulée par l'expression de gènes codant pour des polykétides synthases impliquées notamment dans la condensation de 5 acétates sur une unité de guanidinoacétate (Schembri *et al.*, 2001 ; Shalev-Alon *et al.*, 2002).

2.2.2. Structure et caractéristiques

La CYL (figure 13) est un alcaloïde de 415 Da dont la structure zwitterionique comprend une unité guanidine tricyclique ainsi qu'un groupement uracile qui serait responsable de la toxicité de la molécule (Banker *et al.*, 2001). A ce jour, deux autres variants de cette toxine ont été identifiés. Le premier, appelé 7-epicylindrospermopsine diffère simplement par l'orientation de la fonction hydroxyle voisine du groupement uracile (Banker *et al.*, 2000 ; Briand *et al.*, 2003). Le second, appelé déoxycylindrospermopsine, semble être non toxique (Briand *et al.*, 2003) et est caractérisé par l'absence de l'atome d'oxygène formant la fonction hydroxyle proche du groupement uracile sur la figure 13 (Norris *et al.*, 1999 ; Li *et al.*, 2001).

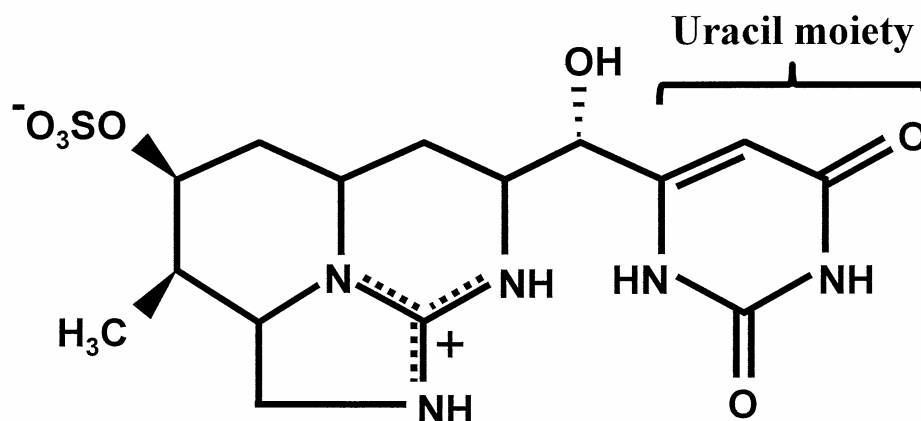


Figure 13 : Structure de la CYL

La CYL est un composé très polaire rendu très soluble dans l'eau par sa structure zwitterionique (Chiswell *et al.*, 1999). Contrairement aux autres cyanotoxines, la CYL semble être présente en phase aqueuse avant la phase de déclin des blooms de cyanobactéries. Elle présente alors une certaine stabilité dans le milieu car Wormer *et al.* (2008) indiquent qu'elle n'est pas dégradée par la population bactérienne autochtone sur une période de 40 jours. De plus, la CYL semble également résister à la dégradation due au changement de pH et de température (Chiswell *et al.*, 1999).

2.2.3. Données toxicologiques

Des essais sur souris ont montrés que la CYL pouvait affecter les reins, les poumons et l'intestin, mais elle attaque principalement le foie et figure donc parmi les hépatotoxines (Bernard *et al.*, 2003). Cependant, contrairement aux MCs, la CYL agit selon un mécanisme encore mal connu d'inhibition irréversible de la synthèse protéique aboutissant à la mort des cellules exposées (Froschio *et al.*, 2003 ; Metcalf *et al.*, 2004 ; Froschio *et al.*, 2008). D'autre part, l'induction de micronoyaux, de perte de chromosome (Humpage *et al.*, 2000), l'initiation tumorale (Falconer et Humpage, 2001) et la toxicité fœtale (Rogers *et al.*, 2007) sont d'autres effets connus de la CYL.

Chez la souris, 24 heures après l'injection de CYL purifiée par voie i.p., la DL₅₀ a été estimée à 2100 µg/kg. Une administration orale de la toxine pendant 11 semaines a alors permis d'établir une dose maximale sans effet observable (NOAEL) de 30 µg/kg/jour (Humpage et Falconer, 2003).

2.3. Autres cyanotoxines

2.3.1. Les anatoxines

Les anatoxines (notées ANTXs) regroupent deux types de molécules qui diffèrent dans leur structure et toxicodynamique : l'anatoxine-a (notée ANTX-a) et l'anatoxine-a(s) (notée ANTX-a(s)) présentées sur la figure 14.

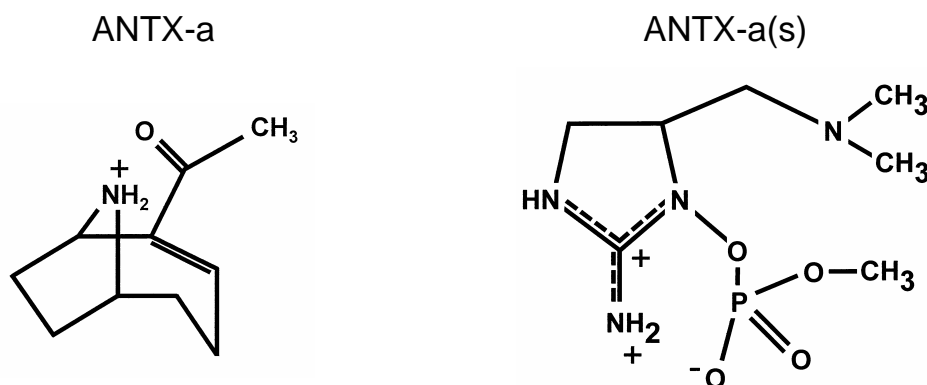


Figure 14 : Structure de l'ANTX-a et de l'ANTX-a(s)

L'ANTX-a est principalement produite par des cyanobactéries du genre *Anabaena*, *Aphanizomenon* ou *Planktothrix* (Osswald *et al.*, 2007 ; Van Apeldoorn *et al.*, 2007), mais elle peut aussi être synthétisée par des cyanobactéries benthiques du genre *Phormidium* (Gugger *et al.*, 2005). Sa présence dans des plans d'eau a été détectée aussi bien aux USA qu'en Afrique (Krienitz *et al.*, 2003; Ballot *et al.*, 2003), en Asie (Park *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1998; Namikoshi *et al.*, 2003) et en Europe (James *et al.*, 1997; Fromme *et al.*, 2000; Viaggiu *et al.*, 2004; Gugger *et al.*, 2005; Carrasco *et al.*, 2007). En revanche, l'ANTX-a(s) n'est associée qu'au genre *Anabaena* (Sivonen et Jones, 1999) et n'a été détectée que dans une zone plus restreinte incluant l'Ecosse, le Danemark, le Brésil et les USA (Onodera *et al.*, 1997; Sivonen et Jones, 1999; Molica *et al.*, 2005).

L'ANTX-a est un alcaloïde très polaire de 165 Da dont on connaît un autre variant, appelé homoanatoxine-a, qui diffère par la méthylation de l'atome de carbone situé à l'extrémité de la fonction cétone (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Quant à l'ANTX-a(s), il s'agit d'un ester de phosphate de 252 Da. Ces molécules sont altérées par la chaleur et un pH alcalin (Carmichael *et al.*, 1997).

Les ANTXs sont des neurotoxines agissant selon 2 mécanismes différents. D'une part, l'ANTX-a stimule les récepteurs de l'acétylcholine et n'est pas dégradée par l'acétylcholinestérase (Osswald *et al.*, 2007). D'autre part, l'ANTX-a(s) inhibe l'action de l'acétylcholinestérase. L'acétylcholine fixée sur ses récepteurs spécifiques n'est donc plus dégradée (Molica *et al.*, 2005). Dans les deux cas, les muscles (dont ceux impliqués dans la respiration) sont surstimulés et paralysés, ce qui entraîne la mort par arrêt respiratoire.

2.3.2. Les saxitoxines

Les saxitoxines (notées STXs) sont principalement produites par *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Lyngbya Wollei* ou encore *Cylindrospermopsis raciborskii* (Carmichael *et al.*, 1997, Kuiper-Goodman *et al.*, 1999, Molica *et al.*, 2002). Leur présence dans les plans d'eau est majoritairement signalée en Australie, aux USA et au Brésil (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999, Molica *et al.*, 2005).

Les STXs présentées sur la figure 15 sont une famille de molécules tricycliques dont les 20 variants identifiés varient entre 241 et 491 Da. Selon une étude récente de Kellmann *et al.* (2008), leur biosynthèse est associée à un cluster de gène de plus de 35 kb. Tandis qu'un nouveau type de polykétide synthase initie la production de toxine en réalisant la méthylation d'acétate ainsi qu'une condensation de Claisen entre propionate et arginine, d'autres enzymes catalysant 3 hétérocyclisations et diverses réactions complémentaires permettraient d'aboutir aux différents variants de STXs connus aujourd'hui. Ces composés solubles et stables dans l'eau peuvent alors persister dans le milieu pendant plus de 90 jours (Jones et Negri, 1997). Cependant, l'ébullition transforme certains variants de STXs en une forme plus toxique (Sivonen et Jones, 1999).

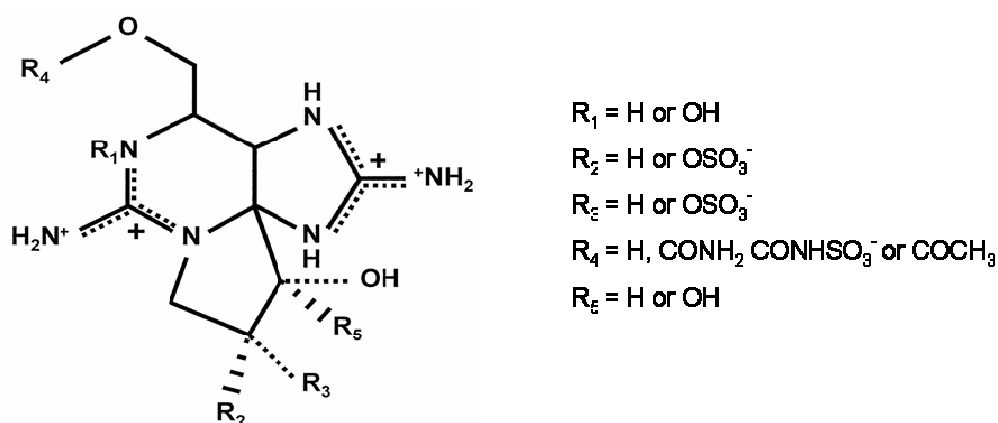


Figure 15 : Structure générale des STXs

Les STXs sont des neurotoxines provoquant une paralysie et la mort par arrêt respiratoire en cas d'intoxication aiguë. Elles sont également connues sous le terme de toxines paralysantes des coquillages (PSP). Chez la souris, après injection par voie i.p., le variant le plus toxique présente une DL₅₀ de 10 µg/kg (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999).

2.3.3. Les molécules à effets irritants

Les molécules à effets irritants sont probablement les cyanotoxines les moins connues. La figure 16 présente la structure des 3 composés identifiés à ce jour : l'aplysiatoxine, la debromoaplysiatoxine et la lynbyatoxine-a (Mynderse *et al.*, 1977 ; Cardellina *et al.*, 1979). Cependant, ces métabolites de cyanobactéries mis en évidence en eau de mer ne semblent pas avoir fait l'objet d'étude en eau douce et leur présence dans ce type de milieu reste à démontrer.

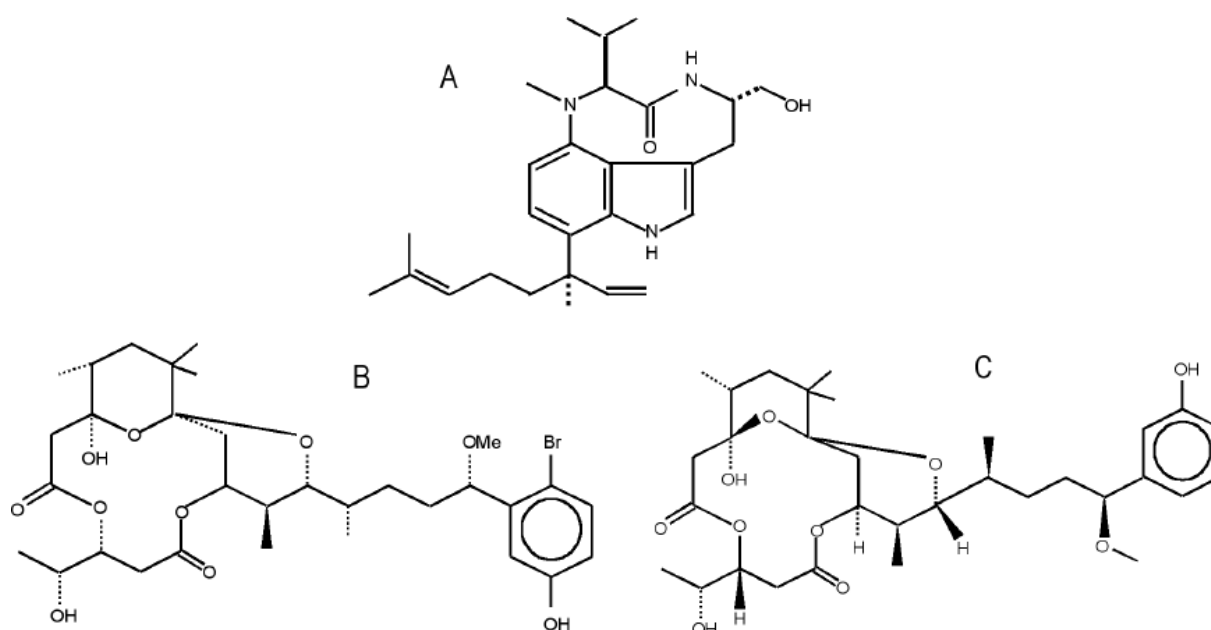


Figure 16 : Structure de la lynbyatoxine-a (A), de l'aplysiatoxine (B) et de la debromoaplysiatoxine (C)

D'autre part, on intègre également les LPS parmi les molécules à effets irritants. En effet, lors de la mort des cyanobactéries, ces éléments constitutifs de la paroi cellulaire se retrouvent sous une forme libre dans l'eau et peuvent alors provoquer des irritations cutanées.

2.4. Identification et quantification des hépatotoxines

2.4.1. Préparation des échantillons

L'identification et la quantification des cyanotoxines incluent nécessairement une phase de préparation des échantillons se déroulant en 3 étapes illustrées sur la figure 17. La première étape consiste à filtrer l'échantillon afin de retenir les matières en suspension, dont les cyanobactéries. Il est alors possible de doser séparément les toxines extracellulaires (dans le perméat) et les toxines intracellulaires (dans les cyanobactéries retenues sur le filtre).

La seconde étape consiste à extraire les toxines intracellulaires (s'il y a lieu de les quantifier). Pour cela, les cellules doivent être lysées, soit par congélation/décongélation, soit par ajout de méthanol (Utkilen et Gjølme, 1994 ; Harada *et al.*, 1996). Les toxines sont alors récupérées en phase aqueuse lors du rinçage du filtre.

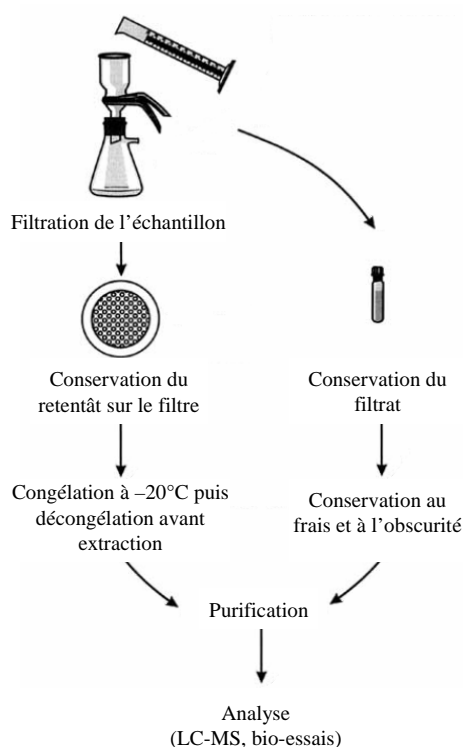


Figure 17 : Synoptique du traitement des échantillons pour l'analyse des cyanotoxines (Harada *et al.*, 1999)

La troisième étape consiste à purifier et concentrer les toxines. Pour ce faire, au moins 500 mL d'échantillon sont déposés sur un support, généralement en phase inverse greffé C₁₈. Les toxines adsorbées sur ce support sont ensuite éluées à l'aide de 2,5 mL d'un mélange à 90% de méthanol et 10% d'eau. Le milieu est alors évaporé jusqu'à sec à 40°C sous un jet d'azote puis repris avec 0,5 mL d'un mélange à 80% d'eau et 20% de méthanol. De cette

manière, un facteur de concentration des toxines de 10^3 peut être obtenu. Néanmoins, celui-ci peut encore être augmenté en fonction du volume d'échantillon initialement déposé sur le support C₁₈.

Enfin, l'analyse des toxines peut être réalisée selon divers procédés :

- les bio-essais
- les méthodes chromatographiques

2.4.2. Analyse des toxines par bio-essais

2.4.2.1. Les tests sur souris

Ce test consiste à injecter le milieu à analyser par voie i.p. à au moins 3 souris puis à procéder à leur nécropsie au bout de 24 heures (Falconer *et al.*, 1993). L'observation des symptômes permet alors de déterminer la famille de toxines (hépatotoxines, neurotoxines) présente dans le milieu. Par exemple, les MCs provoquent une augmentation du poids et du volume du foie ainsi qu'une altération des cellules hépatiques visible lors de l'examen au microscope (Falconer *et al.*, 1993).

Les résultats donnent une réponse qualitative sur la présence de toxine dans le milieu analysé mais le variant en cause ne peut pas être déterminé. Cependant, bien que peu sensible, le test sur souris peut aussi être utilisé comme méthode semi-quantitative en comparant l'étendue des lésions à celles d'autres animaux ayant reçu diverses doses de toxine. Aujourd'hui, cette méthode n'est plus utilisée car, en plus des raisons éthiques dues à l'expérimentation animale, d'autres techniques plus spécifiques, plus sensibles et plus rapides ont été développées. Les tests sur souris sont à présent limités à la recherche.

2.4.2.2. Les tests biochimiques

Les MCs peuvent être détectées par des tests biochimiques car elles sont connues pour leur pouvoir inhibiteur de la protéine phosphatase (Heresztyn et Nicholson, 2001 ; Bouaïcha *et al.*, 2002 ; Rapala *et al.*, 2002 ; Ortea *et al.*, 2004 ; Almeida *et al.*, 2006). Dans ce cas, l'enzyme est mise en présence de son substrat et du milieu à analyser pendant un temps défini. La lecture de l'absorbance du mélange à une longueur d'onde spécifique permet de suivre la consommation du substrat et donc de connaître l'activité enzymatique. La

concentration de MCs est alors inversement proportionnelle à la quantité de substrat transformé.

Ce test réalisable en quelques heures sur une large série d'échantillons permet de quantifier des concentrations en MC-LR minimales de l'ordre de 0,1 µg/L à 0,5 µg/L selon la méthode utilisée (Heresztyn et Nicholson, 2001 ; Bouaïcha *et al.*, 2002 ; Rapala *et al.*, 2002), avec une limite de détection pouvant atteindre 0,01 µg/L (Almeida *et al.*, 2006). Cependant, il ne peut être exclu que d'autres composés présents dans le milieu puissent aussi inhiber la protéine phosphatase.

2.4.2.3. Les tests immunologiques

Ces tests sont basés sur la reconnaissance des toxines ou de certains de leurs motifs par des anti-corps. Plusieurs tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) sont ainsi commercialisés pour la détection des MCs dans l'eau (Carmichael et An, 1999 ; Rapala *et al.*, 2002 ; Lindner *et al.*, 2004 ; Hilborn *et al.*, 2005). Leur domaine de linéarité est généralement compris entre 0,5 et 5 µg/L de toxine pour un seuil de détection situé à 0,2 µg/L (OMS, 2004).

Cependant, même si le test est fonctionnel pour divers variants de MCs, il ne permet pas de les distinguer. Les résultats sont alors exprimés en équivalent de MC-LR.

2.4.2.4. Les tests sur des cellules de mammifères

Ces tests sont principalement utilisés dans le domaine de la recherche mais pas pour des analyses en routine. La quantité de toxines présentes dans l'échantillon est déterminée par l'observation des atteintes cellulaires (principalement sur des cultures d'hépatocytes) et les résultats sont exprimés en équivalent du composé ayant servi au calibrage du test (Aune et Berg, 1986 ; Heinze, 1996 ; Puerto *et al.*, 2008).

2.4.3. Analyse des toxines par méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques sont de plus en plus utilisées car elles permettent de détecter plusieurs familles de toxines au cours d'une même analyse et d'identifier avec précision les différents variants présents dans un échantillon.

2.4.3.1. Le couplage HPLC-UV

L'étape de chromatographie liquide (HPLC) permet de séparer les différents composés présents dans le milieu et donc de distinguer les diverses toxines ainsi que leurs variants. Pour ce faire, on adopte généralement des colonnes phase inverse greffées C₁₈ tandis que l'éluant est le plus souvent un mélange acétonitrile/eau ou encore méthanol/eau. Dans les deux cas, l'éluant est légèrement acidifié par 0,1 à 0,5% d'acide trifluoroacétique ou d'acide formique (Harada *et al.*, 1999).

La détection des composés est ensuite assurée par spectrophotométrie UV selon la norme ISO 20179. Si cette méthode permet de visualiser les différents variants d'une toxine, elle ne suffit pas nécessairement à les identifier. Par exemple, les spectres UV très similaires des MCs (figure 18) ne permettent pas l'identification précise de chacune d'entre elles. Dans ce cas, seule la comparaison du temps de rétention du composé avec une toxine standard permet d'identifier le variant en question. Cependant, seuls 7 standards sont actuellement disponibles et pour un coût élevé (plusieurs centaines d'euros par mg), contre plus de 70 variants de MCs.

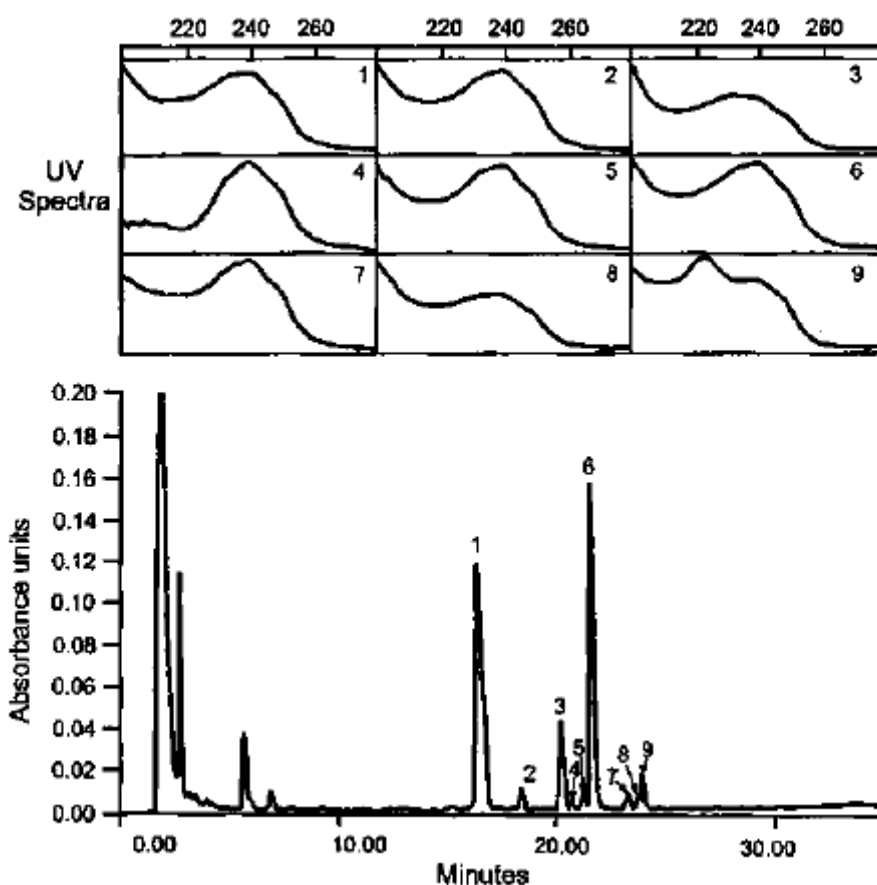


Figure 18 : Détection de plusieurs variants de MCs par HPLC-UV (Harada *et al.*, 1999)

2.4.3.2. Le couplage HPLC-MS

La détection par spectrométrie de masse remplace aujourd'hui la spectrophotométrie UV (Lawton et Edwards, 2008) car elle offre une garantie d'identification des toxines et de leurs variants. En effet, en sortie de colonne chromatographique, les composés sont ionisés (généralement en captant un proton H⁺) et détectés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Dans ce cas, les standards ne sont plus nécessaires pour l'identification des toxines déjà caractérisées par leurs m/z spécifiques. De plus, les variants pour lesquels aucun standard n'est disponible peuvent également être quantifiés. Les résultats sont alors exprimés en équivalent de MC-LR.

D'autre part, la spectrométrie de masse offre également une très bonne sensibilité. Par exemple, en ce qui concerne la MC-LR, lorsque la purification/concentration de la toxine est réalisée sur un volume d'au moins 500 mL d'échantillon, les seuils de quantification sont de l'ordre de 0,1 à 0,2 µg/L (Harada *et al.*, 1999).

2.5. Epidémiologie des cyanotoxines

2.5.1. Voies d'exposition

On distingue deux principaux contextes d'exposition humaine aux cyanotoxines :

- la baignade dans une eau récréative contaminée
- l'alimentation

2.5.1.1. Exposition dans les eaux récréatives

Dans le cadre de la baignade dans des eaux récréatives contaminées, l'exposition humaine aux cyanotoxines se fait majoritairement par voie dermique car une surface corporelle importante peut être au contact des cyanobactéries et de leurs métabolites. Cependant, les voies orale et pulmonaire sont également à considérer car la natation peut entraîner l'inhalation ou l'ingestion d'eau.

Par conséquent, en cas de bloom, les plans d'eau à usage récréatif doivent faire l'objet d'une étroite surveillance. En France, celle-ci s'effectue selon un organigramme présenté sur la figure 19 et rendu officiel par la circulaire DGS/SD 7 A n° 2003-270 du 4 juin 2003 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de

prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans des eaux de zones de baignade et de loisirs nautiques. Selon les résultats des analyses effectuées, les mesures de protection des usagers peuvent aller d'une simple information à la fermeture du lieu.

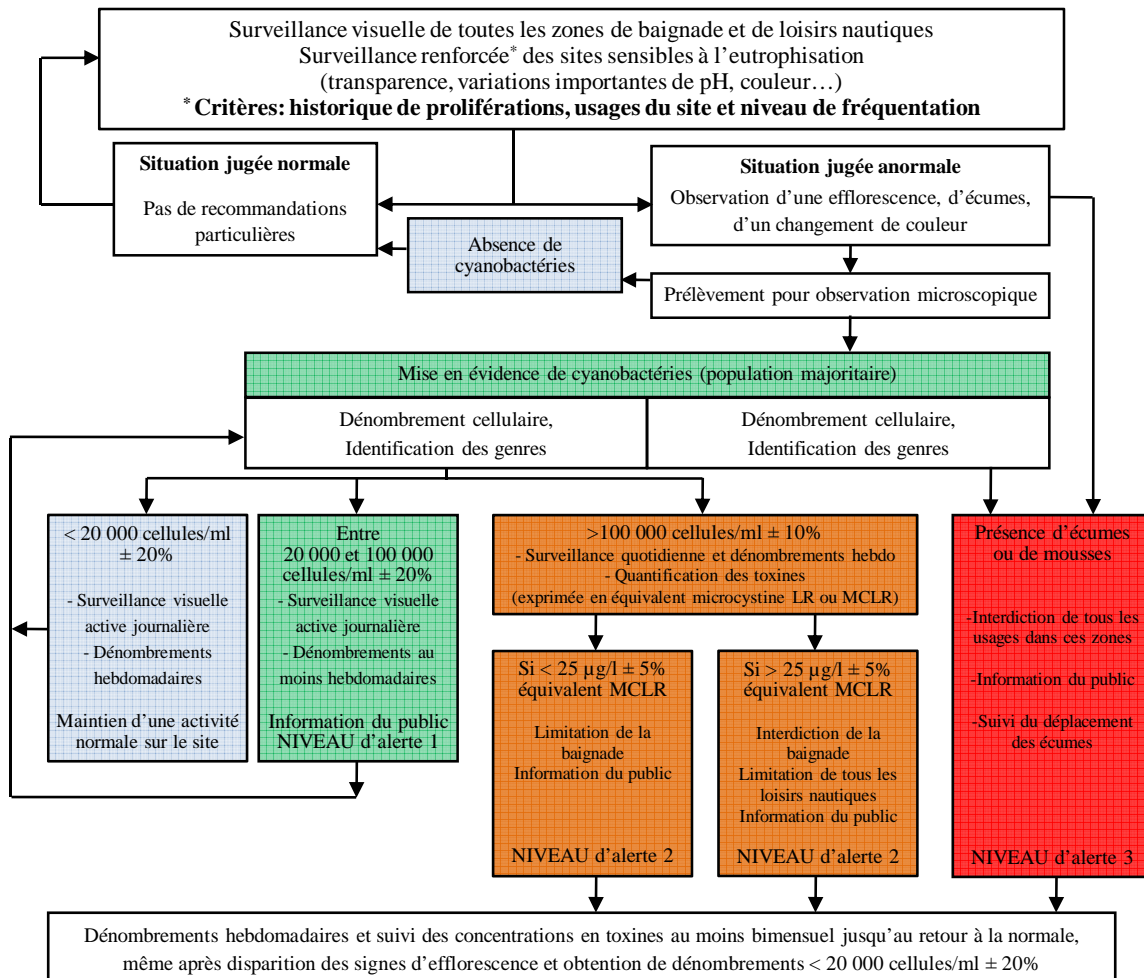


Figure 19 : Organigramme pour la surveillance des eaux récréatives en cas de prolifération de cyanobactéries en France

2.5.1.2. Exposition par l'alimentation

L'homme est également susceptible d'être exposé aux cyanotoxines par la consommation d'aliments potentiellement contaminés tel que le poisson et les fruits de mer ou par l'intermédiaire de compléments alimentaires à base de cyanobactéries (Dietrich et Hoeger, 2005 ; Ibelings et Chorus, 2007). Cependant, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) considère que 80 % de l'exposition aux cyanotoxines est due à la consommation d'eau potable produite à partir d'une ressource subissant un bloom d'algues bleu-vert. Par conséquent, afin de protéger la santé du consommateur, l'OMS indique que la concentration

maximale en MC-LR (la toxine la plus fréquemment détectée) ne devrait pas dépasser le seuil de 1µg/L dans l'eau destinée à l'alimentation (OMS, 1998).

Cette valeur guide de l'OMS provient des données et des calculs suivants :

<u>Données :</u>	NOAEL : 40 µg/kg/jour (Fawell <i>et al.</i> , 1999)
	Facteur d'incertitude : 1000
	Poids moyen d'un individu : 60 kg
	Quantité d'eau ingérée chaque jour : 2 L
	Fraction journalière de toxine apportée par l'eau : 80 %
<u>Calculs :</u>	Dose Journalière Admissible = $40/1000 = 0,04 \mu\text{g/kg/j}$
	Concentration Limite en toxine = $(0,04*60*0,8)/2 = 0,96 \mu\text{g/L}$
	Valeur limite proposée : 1µg/L

En France, cette valeur limite a été rendue officielle par le décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine et inscrite à l'annexe 13.1 du code de la santé publique. Cependant, depuis le 11 janvier 2007, le seuil de 1µg/L se réfère désormais à la somme de toutes les MCs détectées et quantifiées.

2.5.2. Episodes d'intoxication rapportés

Depuis le premier cas de bloom toxique rapporté dans une revue scientifique par Francis (1878), les cyanobactéries ont été associées à de nombreux épisodes d'intoxication animale et humaine dont certains sont recensés dans le tableau 3. Un certain nombre de ces antécédents sont liés à la présence de MCs ou de CYL dans l'eau de distribution. La majorité de ces intoxications ne se traduisent généralement que par des gastro-entérites (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999), mais plusieurs décès ont également été recensés (Azevedo *et al.*, 2002 ; Yuan *et al.*, 2006).

Le principal empoisonnement attribué aux MCs a eu lieu en 1996 au centre de dialyse de Caruaru au Brésil (Jochimsen *et al.*, 1998 ; Pourria *et al.*, 1998 ; Azevedo *et al.*, 2002 ; Yuan *et al.*, 2006). Les toxines présentes dans l'eau utilisée pour le traitement médical ont été rapidement acheminées jusqu'au foie par la circulation sanguine, causant le décès de 60 patients ainsi que des insuffisances hépatiques chez d'autres malades.

Tableau 3 : Exemples d'intoxications associées aux cyanobactéries toxiques recensées dans la littérature

Occurrence de cyanobactéries toxiques (Svrcek et Smith 2004)	Incidents rapportés		
	<u>Année, Pays</u>	<u>Description</u>	<u>Références</u>
Asie 9 pays	1995 Japon	Mort d'oiseaux associée à un bloom de <i>Microcystis aeruginosa</i> produisant des microcystines	Matsunaga <i>et al.</i> , 1999 Stewart <i>et al.</i> , 2008
Afrique 3 pays	1960-1965 Zimbabwe	Gastro-entérites attribuées à un bloom de <i>Microcystis</i>	Zilberg, 1966
	2001-2002 Kenya	Mort de flamants roses attribuée aux microcystines et à l'anatoxine-a	Krienitz <i>et al.</i> , 2003
Europe 16 pays	1989 Royaume-Uni	Mort de chiens et de moutons attribuée à un bloom de <i>Microcystis</i>	Done et Bain, 1993
	1992 Royaume-Uni	Intoxication de chiens par l'anatoxine-a en Ecosse	Codd <i>et al.</i> , 1992
	1993-1994 Danemark	Morts d'oiseaux associées à un bloom de d' <i>A. lemmermanii</i> et à l'anatoxine-a(s)	Onodera <i>et al.</i> , 1997 Henriksen <i>et al.</i> , 1997
	1970-1995 Suisse	Mort d'animaux de bétail après ingestion d'eau contenant des cyanobactéries	Mez <i>et al.</i> , 1997
	2003 France	Mort de chien après ingestion d'eau contenant de l'anatoxine-a	Gugger <i>et al.</i> , 2005 Stewart <i>et al.</i> , 2008
Amérique du Nord Canada: 5 Provinces USA: 27 Etats	1931 Virginie-Occidentale (USA)	Gastro-entérites attribuées à une contamination de l'eau potable, conséquence d'un bloom de cyanobactéries sur la rivière Ohio	Veldee, 1931 Tisdale 1931
	1975 Pennsylvanie (USA)	Gastro-entérites suivant l'utilisation d'algicide pour le traitement d'un bloom de cyanobactéries dans la ressource en eau potable	Lippy et Erb, 1976
Océanie 2 pays	1979 Australie	Gastro-entérites avec symptômes hépatiques attribuées à la présence de cylindrospermopsine dans l'eau potable	Byth, 1980 Bourke <i>et al.</i> , 1983 Griffiths et Saker, 2003
	1981 Australie	Gastro-entérites et atteintes hépatiques suivant l'utilisation d'algicide pour le traitement d'un bloom de cyanobactéries dans la ressource en eau potable d'Armidale	Falconer <i>et al.</i> , 1983
	1997 Australie	Mort d'animaux de bétail après ingestion d'eau contenant de la cylindrospermopsine	Saker <i>et al.</i> , 1999
	2001 Australie	Mort d'animaux de bétail après ingestion d'eau contenant de la cylindrospermopsine	Stewart <i>et al.</i> , 2008
	2005 Nouvelle-Zélande	Mort de chiens après ingestion de cellules de cyanobactéries contenant de l'anatoxine-a et de l'homoanatoxine-a	Wood <i>et al.</i> , 2007
Amérique du Sud 3 pays	1988 Brésil	Gastro-entérites et décès de 88 personnes attribués à un bloom d' <i>Anabaena</i> et de <i>Microcystis</i> dans la ressource en eau potable d'Itaparica Dam	Teixeira <i>et al.</i> , 1993
	1996 Brésil	Décès de 60 patients au centre d'hémodialyse de Caruaru attribué à la présence de microcystine dans l'eau utilisée pour le traitement	Jochimsen <i>et al.</i> , 1998 Pouria <i>et al.</i> , 1998 Azevedo <i>et al.</i> , 2002 Yuan <i>et al.</i> , 2006

La CYL est également responsable d'une intoxication majeure à travers l'eau potable connue sous le nom de « Palm Island Mystery disease » (Byth *et al.*, 1980 ; Bourke *et al.*, 1983 ; Griffiths et Saker, 2003). En 1979, un traitement algicide est appliqué dans la ressource en eau potable de Palm Island (Queensland, Australie) afin d'éliminer un bloom de cyanobactéries très dense. Or, la destruction des cellules provoque la libération de la cylindrospermopsine dans l'eau suivie quelques jours plus tard par l'admission à l'hôpital local d'une centaine de personnes souffrant de gastro-entérites attribuées à la consommation d'eau contaminée.

La présence de cyanobactéries et de cyanotoxines dans les eaux de surface utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine pose donc un réel problème de santé publique. Afin de protéger le consommateur, le traitement de l'eau doit alors permettre une élimination efficace des cyanobactéries mais également de leurs métabolites. Pour se faire, l'effet de chaque procédé mis en œuvre doit être considéré.

3. CYANOBACTERIES, CYANOTOXINES ET PRODUCTION D'EAU ALIMENTAIRE

Au-delà des perturbations engendrées au sein des usines de production d'eau potable, l'apparition de blooms de cyanobactéries dans l'eau brute représente également un problème de santé publique car certaines espèces sont généralement associées à la synthèse de toxines. En effet, la présence de celles-ci dans l'eau de boisson pourrait être à l'origine de multiples intoxications. La protection du consommateur passe donc par une gestion appropriée du risque lié aux cyanobactéries et à leurs toxines en amont mais aussi au sein des filières de production d'eau destinée à l'alimentation.

3.1. Gestion des cyanobactéries en amont du traitement

En amont de la production d'eau potable, la gestion du risque lié aux cyanobactéries et à leurs toxines consiste à limiter le nombre de cellules susceptibles de pénétrer dans la filière de traitement. Cela passe, en premier lieu, par la gestion du point de pompage de l'eau brute mais également par l'application d'algicide dans la retenue.

3.1.1. La gestion du point de captage

La localisation du point de captage joue un rôle de première importance dans la restriction du pompage des cyanobactéries (Hrudey *et al.*, 1999). Par exemple, la prise d'eau ne doit pas se trouver dans une baie abritée où sont susceptibles de s'amonceler les cyanobactéries. Cependant, il est toujours possible d'installer une barrière physique destinée à empêcher l'accumulation des cellules autour de la zone de pompage. En effet, la pose de barrages flottants tels que ceux utilisés en cas de pollution aquatique a donné de bons résultats en Australie et en Amérique du Nord (Hrudey *et al.*, 1999). Néanmoins, de telles mesures ne sont applicables que pour des blooms se développant à la surface de l'eau. Or, les cyanobactéries peuvent également se former à plusieurs mètres de profondeur. Par conséquent, la profondeur de pompage de l'eau brute devrait être ajustable en fonction du profil vertical de la concentration en cellules.

Cependant, une gestion optimale du point de captage ne prévient en aucun cas le pompage des cyanotoxines fatalement libérées dans l'eau lors du déclin d'un bloom toxique.

3.1.2. Application de traitements algicides

Le sulfate de cuivre est un agent algicide très employé pour éliminer les blooms de cyanobactéries dans les eaux de surface (Hrudey *et al.*, 1999 ; Brient *et al.*, 2001b). En effet, ces micro-organismes font partie des espèces les plus vulnérables à l'ion Cu^{2+} qui affecte le transport des électrons dans le photosystème et l'activité de certaines enzymes fondamentales (Hrudey *et al.*, 1999 ; Le Jeune *et al.*, 2006).

Cependant, l'usage d'algicide conduit à la lyse des cellules et donc à la libération des toxines dans l'eau (Jones et Orr, 1994 ; Peterson *et al.*, 1995 ; Drikas *et al.*, 2001a). Par exemple, en exposant une souche de *Microcystis aeruginosa* pendant 24 heures à une dose de cuivre total de 650 $\mu\text{g/L}$, Kenefick *et al.* (1993) observent que les cellules décaissent en donnant aux échantillons une coloration bleue typique de la libération de pigments tels que la phycocyanine. Comme présentée sur la figure 20, une observation des cellules au microscope montre alors une forte altération de la membrane cellulaire corrélée à une augmentation progressive de la concentration en MC-LR extracellulaire.

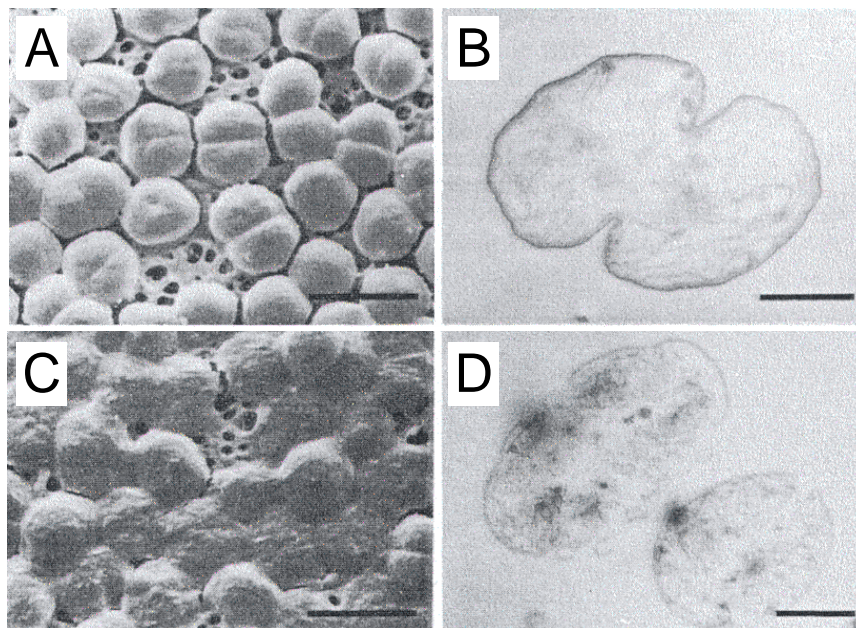


Figure 20 : Cellules de *Microcystis aeruginosa* avant (A et B) et après 24 heures (C et D) d'exposition au sulfate de cuivre (Kenefick *et al.*, 1993)

Par conséquent, les traitements algicides sont aujourd'hui déconseillés et leur recours doit être restreint à un stade précoce d'apparition d'un bloom afin de minimiser le risque de libération de toxines.

3.2. Comportement des cyanobactéries et cyanotoxines lors des traitements

3.2.1. Description générale de la production d'eau alimentaire

L'organisation des techniques mises en oeuvre au sein d'une usine de production d'eau potable varie fortement suivant la qualité de l'eau brute mais également suivant les pays. Néanmoins, une filière de traitement classique d'eau de surface est constituée d'une succession de procédés unitaires répartis en 2 catégories :

- Les procédés basés sur la rétention de la matière et des micropolluants :
 - la clarification (commune à la majorité des installations)
 - l'adsorption sur charbon actif
 - la filtration membranaire

- Les procédés aboutissant à la transformation (désirée ou non) des micropolluants :
 - la biodégradation
 - l'irradiation UV
 - l'ozonation
 - la chloration (commune à toutes les installations)

Le recours à l'ensemble de ces procédés unitaires n'est pas systématique. Par exemple, une installation destinée à traiter une eau brute de bonne qualité se limitera généralement à la clarification suivie d'une étape de désinfection au chlore. Cette dernière est obligatoire en France pour assurer un pouvoir désinfectant rémanent. En fonction de la charge organique et en micropolluants de la ressource, ce traitement de base peut être complété par la mise en oeuvre d'autres techniques selon une architecture variable.

Dans le cas d'une eau de surface présentant un bloom de cyanobactéries, l'objectif de la filière de production d'eau potable est double. En effet, l'ensemble des traitements doit permettre, d'une part, d'éliminer les cellules sans provoquer leur lyse afin d'éviter la

libération des toxines intracellulaires, et d'autre part, de retenir ou dégrader les toxines extracellulaires. Par conséquent, chaque procédé doit être examiné selon ces deux aspects.

3.2.2. La clarification

La clarification a pour but de retenir la matière colloïdale afin d'abaisser la turbidité de l'eau. Pour ce faire, un coagulant (généralement un sel de fer ou d'aluminium) neutralise les charges négatives à la surface des particules, ce qui supprime le phénomène de répulsion électrostatique et permet aux particules de s'agglomérer. Les structures de taille plus importante (flocs) ainsi formées sont alors éliminées par sédimentation.

Comme le montre la figure 21, en présence d'un bloom dans l'eau brute, un tel procédé est inefficace pour la rétention des cyanotoxines en phase aqueuse (Hoffman, 1976 ; Mouchet et Bonnelye, 1998). Tout l'enjeu de la clarification est donc de retenir les cyanobactéries (et les toxines intracellulaires) sans porter atteinte à l'intégrité de la membrane cellulaire.

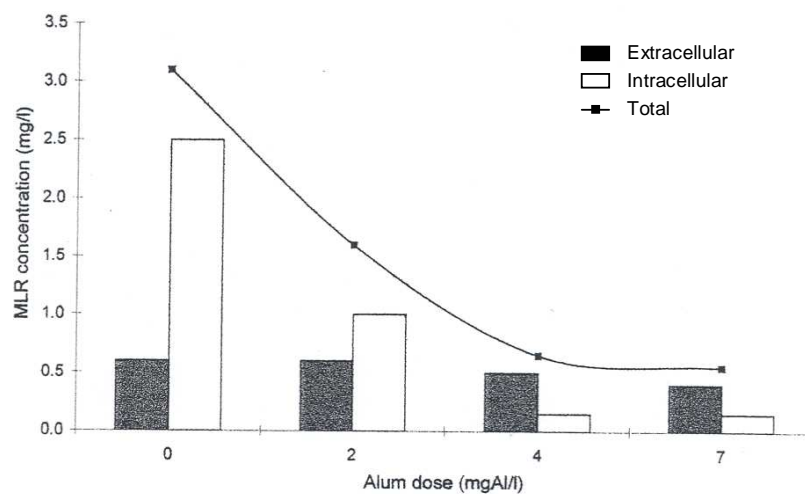


Figure 21 : Effet de la coagulation au sulfate d'aluminium sur la concentration en MC-LR intra et extracellulaire (Hall *et al.*, 2000)

Mouchet et Bonnelye (1998) rapportent un rendement d'élimination des algues de 50 % à 60 % lors de la clarification. Cependant, l'optimisation des conditions de traitement doit permettre d'atteindre une valeur de 90 %, comme c'est le cas avec une culture de *Microcystis* (Hall *et al.*, 2000). En effet, la dose de coagulant doit être adaptée à la concentration de cellules dans l'eau à traiter (Velzeboer *et al.*, 1995 ; Briley et Knappe, 2002)

car plus il y a de cyanobactéries et plus le nombre de charges de surface à neutraliser est important. Par exemple, en appliquant 4,8 mg/l de sulfate d'aluminium (exprimé en Al) à une concentration initiale d'*Anabaena. circinalis* de 10^4 et $5 \cdot 10^4$ cellule/mL, Velzeboer *et al.* (1995) obtiennent respectivement un rendement épuratoire de 81% et 57%.

Néanmoins, l'élimination des cyanobactéries par clarification varie également selon l'âge des cellules (Konno, 1993 ; Pieterse et Cloot, 1997). En effet, en période de croissance, la cellule produit des mucopolysaccharides qui s'accumulent sur la membrane externe et la rendent plus électronégative. De plus, Pieterse et Cloot (1997) soulignent que la présence de pili et de vacuole à gaz chez certaines cyanobactéries pourrait leur permettre de s'extraire des floccs ou de perturber la sédimentation.

D'autre part, la clarification ne semble pas provoquer la lyse des cyanobactéries. En effet, lors de leur étude mentionnée auparavant, Velzeboer *et al.* (1995) ne constatent pas de variation significative de la viabilité des cellules (déterminée par un test de coloration au diacétate de florescéine et à l'iodure de propidium) ni de libération de géosmine (composé malodorant révélateur de lyse cellulaire) au cours du traitement. Ces résultats sont ensuite confortés par des travaux ultérieurs (Chow *et al.*, 1999). De plus, lors de la clarification d'une culture de *Microcystis* à l'aide de sulfate d'aluminium Hall *et al.* (2000) montrent que la concentration en toxine extracellulaire ne varie pas (figure 21).

De la même manière, les travaux menés par Drikas *et al.* (2001a et 2001b) confirment les résultats précédents mais indiquent qu'une libération importante de MC-LR a lieu dans les boues de traitement. En effet, après 24 heures, seulement 10 % des cellules sont toujours intactes. Par conséquent, la clarification est un procédé efficace pour la rétention des cellules et des toxines intracellulaires mais les boues doivent être extraites régulièrement.

3.2.3. L'adsorption sur charbon actif

L'adsorption est un procédé destiné à la rétention des micropolluants et, par conséquent, particulièrement adapté à l'élimination des cyanotoxines extracellulaires. En production d'eau de consommation, le support le plus répandu est le charbon actif que l'on retrouve sous deux formes :

- En poudre (CAP), pour une adsorption couplée à la clarification ou en lit fluidisé
- En grain (CAG), dans des unités d'adsorption au sein desquelles l'eau percole

Que se soit en poudre ou en grain, l'efficacité de l'adsorption des toxines dépend principalement de la nature du charbon actif (Donati *et al.*, 1994 ; Drikas *et al.*, 2001a ; Duguet, 2001 ; Newcombe et Nicholson, 2004 ; Huang *et al.*, 2007). En effet, Donati *et al.* (1994) ont étudié l'adsorption de la MC-LR sur 8 supports caractérisés par des volumes de pores différents et concluent à la plus grande efficacité des charbons actifs mésoporeux. Cependant, il n'existe que très peu de données concernant les autres cyanotoxines.

D'autre part, la qualité de l'eau est également un facteur déterminant dans le rendement d'adsorption des cyanotoxines (Donati *et al.*, 1994 ; Bernazeau *et al.*, 1995 ; Drikas *et al.*, 2001a ; Duguet, 2001 ; Huang *et al.*, 2007). Afin d'illustrer ce phénomène de compétition avec la matière organique, Lambert *et al.* (1996) ont tracé 3 isothermes d'adsorption de la MC-LR :

- Dans une eau ultra pure avec un charbon actif vierge
- Dans une eau ultra pure avec un charbon actif préalablement utilisé pendant 5 mois en production d'eau potable
- Dans une eau prélevée sur une installation de production d'eau de consommation (en amont d'un lit de charbon actif en grain) avec un adsorbant vierge

En comparant ces isothermes illustrées sur la figure 22, on remarque une nette diminution de la capacité d'adsorption lorsque le support est préalablement chargé, ainsi qu'en cas de compétition avec la matière organique. Ensuite, lors de la présence de matière organique dans le milieu ou sur l'adsorbant, les isothermes présentent une cassure. Lambert *et al.* (1996) n'expliquent pas cette observation mais concluent que traiter des eaux contenant moins de 0,15 µg/L de MC-LR demandera une quantité importante d'adsorbant. En effet, en dessous de cette valeur, la quantité de toxine adsorbée par unité de masse de charbon actif diminue fortement.

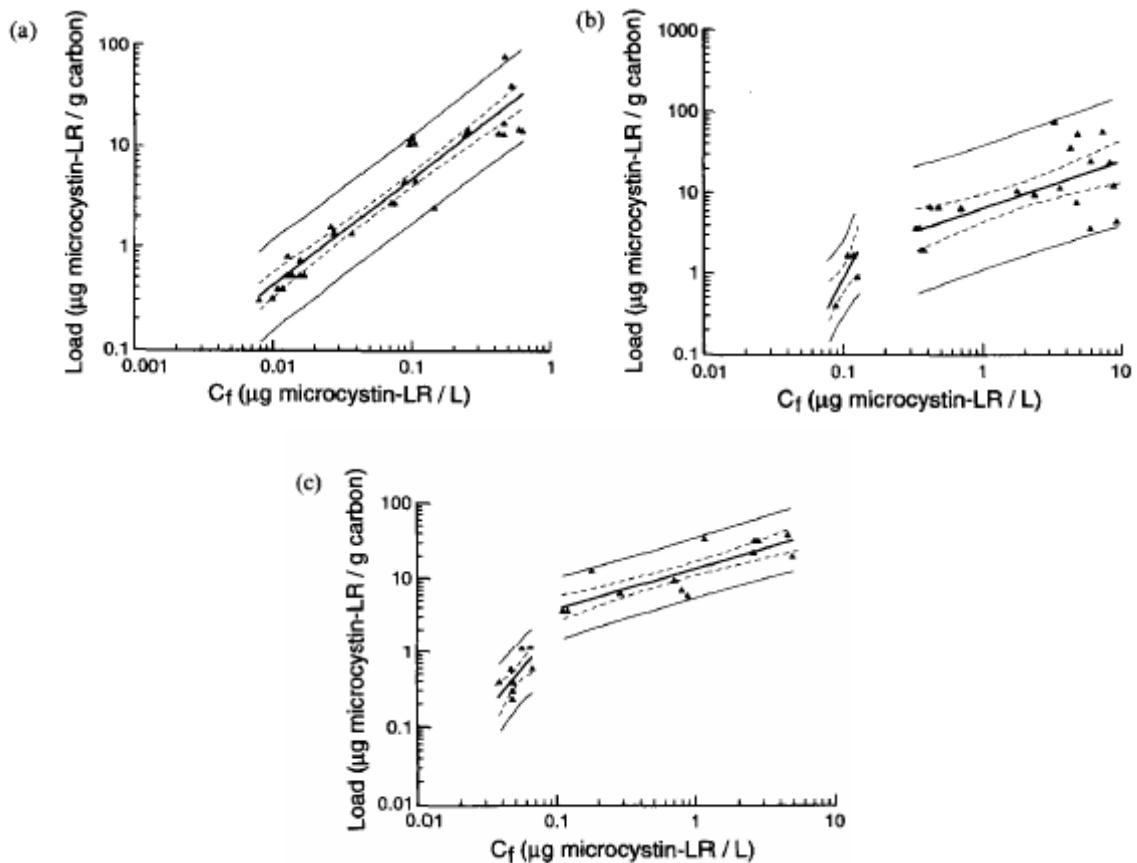


Figure 22 : Isotherme d'adsorption de la MC-LR en eau ultra pure sur du charbon actif vierge (a), en eau ultra pure sur du charbon actif préchargé (b), en compétition avec la matière organique sur du charbon actif vierge (c) (Lambert *et al.*, 1996)

Sous réserve d'un support adapté et non saturé, l'adsorption sur charbon actif offre donc la possibilité de retenir une partie des toxines extracellulaires. Néanmoins, en raison de la difficulté à retenir des quantités inférieures à $0,15 \mu\text{g/L}$, ce type de traitement ne peut être considéré comme une alternative suffisante. Cependant, il trouve parfaitement sa place au sein d'une approche multibarrières incluant par exemple une étape de filtration membranaire.

3.2.4. La filtration membranaire

Selon le type de membrane utilisée, la filtration assure aussi bien la rétention des cyanobactéries que de leurs toxines.

Du point de vue de la rétention des cellules, la microfiltration et l'ultrafiltration sont des traitements très efficaces car elles sont respectivement adaptées aux particules comprises entre $0,1-10\mu\text{m}$ et $0,01-0,1\mu\text{m}$. Par exemple, pour chacune de ces membranes, une étude de Chow *et al.* (1997) met en évidence la rétention de plus de 98 % des cellules de

M. aeruginosa. Une étude de Drikas *et al.* (2001a) aboutit également à des résultats similaires quelque soit le mode de filtration (frontale ou tangentielle). Cependant, l'inconvénient majeur de ce type de procédé réside dans le phénomène de colmatage car celui-ci pourrait engendrer la lyse des cyanobactéries. Toutefois, les dommages cellulaires semblent limités. En effet, lors du rétrolavage des membranes, Drikas *et al.* (2001a) ne constatent pas de mortalité cellulaire et moins de 5 % des cellules de *M. aeruginosa* sont endommagées. De plus, dans chacune des études, aucune toxine n'a été détectée dans le perméat (Chow *et al.*, 1997 ; Drikas *et al.*, 2001a).

Du point de vue de la rétention des toxines, l'efficacité des traitements membranaires dépend largement du type de membrane et de l'encombrement stérique de la molécule (Duguet, 2001). En effet, seules les membranes dont le seuil de coupure est inférieur à 200 Da semblent adaptées (Hitzfeld *et al.*, 2000). La nanofiltration et l'osmose inverse, affichant des rendements de 96 % à 99 % pour la rétention de la MC-LR, sont donc les techniques les plus appropriées (Hrudey *et al.*, 1999 ; Lawton *et al.*, 1999b ; Duguet, 2001 ; Teixeira et Rosa, 2005 ; Teixeira et Rosa, 2006). En pratique, leur mise en œuvre est relativement lourde et leur fort pouvoir rétenteur peut demander une reminéralisation ultérieure de l'eau.

Bien que peu de données soient disponibles, la filtration membranaire semble représenter une technique de choix pour l'élimination des cyanobactéries et de leurs toxines. Cependant, même si les premières études semblent montrer le contraire, la crainte principale reste la libération de toxines lors du colmatage des membranes.

3.2.5. La biodégradation

La biodégradation peut être un procédé maîtrisé grâce à un support sur lequel se développe un micro-organisme spécifiquement sélectionné pour sa capacité à dégrader un polluant précis. Dans le cas des cyanotoxines, la biodégradation est généralement associée à l'adsorption sur charbon actif ou à la filtration sur sable (Newcombe et Nicholson, 2004 ; Bourne *et al.*, 2006 ; Ho *et al.*, 2006b ; Ho *et al.*, 2007 ; Kato *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2007).

En effet, après une période de latence et d'acclimatation, le CAG et le filtre à sable peuvent servir de support au développement de la biomasse autochtone. Dans certains cas, celle-ci se révèle alors capable de dégrader les MCs. Par exemple, en faisant percoler une eau dopée à 16µg/L d'un mélange de MC-LR et MC-LA sur du charbon actif en usage depuis 6 mois sur une installation de production d'eau potable, Newcombe et Nicholson (2004)

n'observent la présence de toxines dans le perméat que pendant les 16 premiers jours. La toxine est ensuite totalement transformée durant 70 jours. Lorsque le CAG est stérilisé, la biodégradation cesse et la toxine est à nouveau détectée dans le perméat.

De la même manière, Miller et Fallowfield (2001) ont mis en évidence la biodégradation des MCs sur un sol sableux en déposant 40 mL de MC-LR et de MC-LA à 0,75 mg/L sur 2 échantillons contenant 53 % et 81 % de sable. En effet, respectivement après 16 et 10 jours d'incubation à 20°C et à l'obscurité, les MCs sont totalement transformées.

Avec l'isolation de micro-organismes responsables de la transformation des MCs (Ho *et al.*, 2007), la biodégradation représente une perspective novatrice pour l'élimination des cyanotoxines. Cependant, il n'est pas certain que la sélection biologique permette à de telles espèces de se développer sur chaque filtre de chaque installation. De plus, la biodégradation ne semble pas avoir été mise en évidence pour des cyanotoxines autres que les MCs, et les sous-produits générés sont encore peu connus. Par conséquent, un tel procédé ne doit représenter qu'un maillon d'une approche multibarrières privilégiant la rétention des micropolluants à leur dégradation.

3.2.6. L'irradiation UV

Dans la filière de production d'eau alimentaire, l'irradiation UV est utilisée en raison de ces propriétés désinfectantes car l'énergie du rayonnement déstabilise l'ADN et inactive les virus et autres micro-organismes pathogènes. Ce procédé physique étant placé en fin de traitement des eaux, son effet sur les cellules de cyanobactéries n'a pas été étudié car celles-ci ont déjà été retenues lors des étapes précédentes. Cependant, l'irradiation UV a également pour effet d'induire la dégradation de certains micropolluants tels que les cyanotoxines.

Selon Tsuji *et al.* (1995), en raison de leur maximum d'absorption à 240 nm, les MCs devraient être sensibles aux rayonnements des lampes UV émettant généralement à une longueur d'onde voisine. En effet, lors d'une expérience réalisée sur 40 µg/L de MC-LR dans l'eau ultra pure, Rositano et Nicholson (1994) montrent qu'après 5 minutes et 20 minutes d'une irradiation de 1200 µW/cm² à 254 nm, la toxine est respectivement transformée à 50 % et 90 %.

Tsuji *et al.* (1995), obtiennent alors des résultats similaires à l'aide d'une solution de MC-LR à 10 mg/L dans l'eau ultra pure. Néanmoins, ils montrent que la transformation de la toxine est fonction de l'intensité de l'irradiation, comme l'illustre la figure 23. En effet, le

taux de transformation de la MC-LR passe de 60 % en 30 minutes à 100 % en 10 minutes lorsque l'intensité de l'irradiation augmente de $147 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ à $2550 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

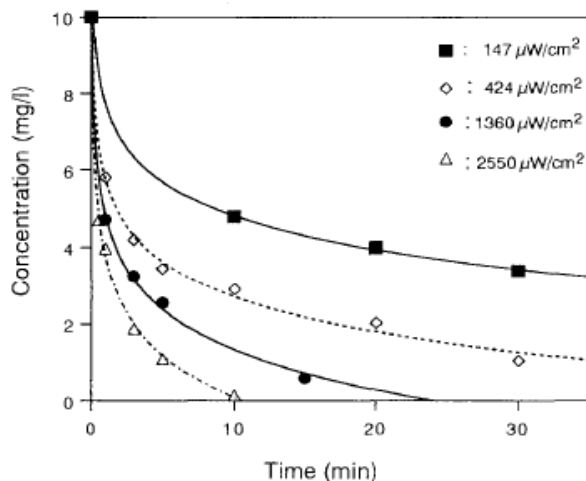


Figure 23 : Transformation de la MC-LR par irradiation UV (Tsuji *et al.*, 1995)

Les composés résultant de l'irradiation de la MC-LR seraient principalement des isomères de la toxine formés par la modification de la conformation du groupement Adda (Tsuji *et al.* 1995). De plus, ceux-ci se révèlent non toxiques lors de la mise en œuvre du test d'inhibition de la protéine phosphatase. Par conséquent, l'irradiation UV (encore peu utilisée en France) semble être un procédé prometteur. Cependant, en raison du temps d'irradiation nécessaire et du manque de données concernant son effet sur les métabolites autres que les MCs, en l'état actuel des connaissances ce traitement à lui seul ne peut garantir une protection suffisante contre les cyanotoxines.

3.2.7. L'ozonation

L'ozone est parfois utilisé en production d'eau alimentaire afin de réaliser une pré-oxydation de la matière organique ou comme agent désinfectant. Dans le premier cas, l'ozonation conduit à la lyse des cyanobactéries et donc à la libération des toxines intracellulaires (Hart *et al.*, 1997). Cependant, afin de transformer les toxines ainsi libérées, une dose d'oxydant supérieure à 1 mg/L est nécessaire (Rositano et Nicholson, 1994 ; Hart *et al.*, 1997). Or, en raison de la forte demande en ozone en tête de traitement, la transformation efficace des toxines ne peut être garantie.

Dans le cas d'une désinfection de l'eau par l'ozone, la demande en oxydant est nettement plus faible en raison de la charge organique réduite de l'eau. L'ozonation assure alors une transformation efficace des cyanotoxines (Nicholson *et al.*, 1993 ; Rositano 1996 ; Nicholson et Rositano, 1997). Par exemple, en appliquant 0,071 mg/L d'ozone à 155 µg/L de MC-LR, Rositano et Nicholson (1994) observent la dégradation de 99 % de la toxine en 15 secondes. Une publication récente de Rodríguez *et al.* (2007c) met alors en évidence la constante cinétique apparente de 3 cyanotoxines dans l'eau ultra pure à pH 8 : $4,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour la MC-LR ; $3,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour la CYL et $6,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour l'ANTX-a. D'autre part, Rositano et Nicholson (1994) montrent que la dose d'ozone nécessaire à la transformation des cyanotoxines augmente avec le COD mais concluent qu'un résiduel de 0,05 mg/L d'oxydant garantit l'absence de ces métabolites toxiques dans l'eau traitée.

Les produits d'ozonation des toxines demeurent inconnus, mais une consommation de 8 moles d'oxydant par mole de MC-LR dans l'eau ultra pure (Shawwa et Smith, 2001) laisse supposer des réactions complexes. Selon Lawton et Robertson (1999b), l'ozone agirait sur une des doubles liaisons du groupement Adda de la microcystine selon le mécanisme illustré sur la figure 24. De leur côté, Harada *et al.* (1996) rapportent la formation d'acide 2-méthyle-3-méthoxy-4-phénylbutyrique (noté MMPB) comme présenté sur la figure 25.

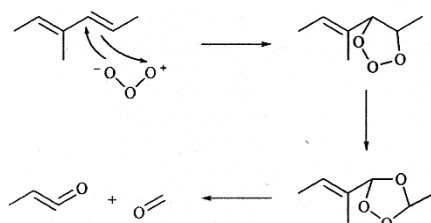


Figure 24 : Action de l'ozone sur le diène conjugué des MCs (Lawton et Robertson, 1999b)

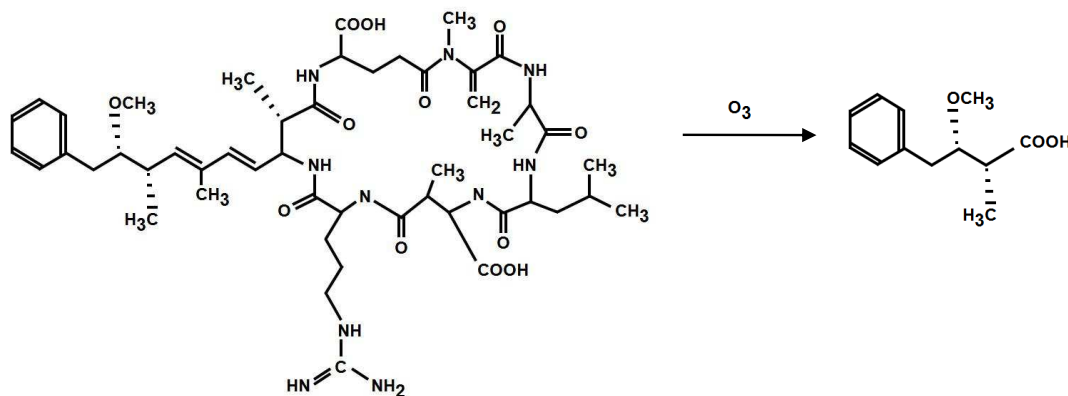


Figure 25 : Formation de l'acide 3-méthoxy-2-méthyle-4-phénylbutyrique (Harada *et al.*, 1996)

Enfin, l'ozonation des MCs semble associée à une diminution de la toxicité (Nicholson et Rositano, 1997 ; Hitzfeld *et al.*, 2000 ; Duguet, 2001). Par exemple, des souris exposées par voie i.p. à un échantillon contenant 5 fois la dose létale de MC-LR meurent dans un délai de 2 heures, mais aucune mortalité animale n'est constatée avec les échantillons ozonés (Brooke *et al.*, 2006). De plus, des résultats similaires sont obtenus avec la mise en œuvre du test d'inhibition de la protéine phosphatase. Par conséquent, bien que relativement peu employée, la désinfection à l'ozone semble représenter une protection efficace contre le risque lié aux cyanotoxines dans l'eau.

3.2.8. La chloration

En production d'eau potable, le chlore peut être employé afin de réaliser une pré-oxydation de la matière organique en tête de traitement. Cependant, ce procédé n'est pas recommandé lors de la présence d'un bloom dans l'eau brute car il aboutit à la lyse des cyanobactéries et à la libération des toxines intracellulaires (Daly *et al.*, 2007). De plus, la préchloration induit la formation de nombreux sous-produits toxiques tels que les trihalométhanes (THMs) et tend à disparaître. En effet, les contraintes réglementaires liées aux THMs (maximum fixé à 100 µg/L directive européenne 98/83/CE du 3 novembre 1998) interdisent de fait cette pratique.

En revanche, le recours au chlore pour la désinfection de l'eau de distribution est systématique en France. De plus, ce procédé très répandu a pour conséquence la transformation des micropolluants. Pour cette raison, la chloration des cyanotoxines est donc le thème central de cette thèse. L'état de l'art détaillé à ce sujet sera alors développé de manière spécifique au sein de la section suivante.

4. COMPORTEMENT DES CYANOTOXINES VIS-A-VIS DU CHLORE

Le chlore ou ses dérivés sont fréquemment utilisés afin d'assurer la désinfection de l'eau potable. Malgré la production de sous-produits de désinfection (SPDs) tels que les THMs, la chloration représente un progrès majeur dans le traitement de l'eau et la protection de la santé publique. En effet, le chlore assure la destruction ou l'inactivation de nombreux micro-organismes pathogènes. De plus, sa rémanence dans le réseau de distribution prévient l'apparition de maladies d'origine hydrique (Galal-Gorchev, 1996). En raison de la forte réactivité du chlore, l'utilisation de ce réactif comme désinfectant induit également la transformation d'un certain nombre de micropolluants tels que les pesticides ou les cyanotoxines. Les SPDs générés et leur toxicité potentielle doivent donc être examinés avec attention.

En France, la chloration de l'eau alimentaire est généralement réalisée par addition de chlore gazeux (Cl_2) ou d'hypochlorite de sodium (NaOCl). Cependant, certains pays préfèrent recourir à d'autres formes d'oxydants tels que le dioxyde de chlore (ClO_2) ou la monochloramine (NH_2Cl) afin de limiter la formation de SPDs indésirables comme les THMs. En pratique, la substitution électrophile sur les fonctions amine est la réaction la plus attendue avec le chlore, mais celui-ci réagit également avec les composés organiques selon d'autres mécanismes (Deborde et Von Gunten, 2008).

4.1. Propriétés et réactivité du chlore en solution aqueuse

4.1.1. Propriétés du chlore en solution aqueuse et définitions

Lorsque le chlore gazeux (Cl_2) est introduit dans l'eau, il se dismute pour donner de l'acide hypochloreux (HOCl) et de l'acide chlorhydrique (Saunier et Selleck, 1979). L'acide hypochloreux ainsi obtenu est un acide faible qui se dissocie alors en hypochlorite (ClO^-). En fonction du pH, le chlore en solution aqueuse est donc toujours un équilibre entre les formes Cl_2 , HOCl et ClO^- .

En raison de sa plus grande capacité à altérer les centres vitaux vulnérables des micro-organismes, HOCl est le composé le plus actif pour la désinfection des eaux. C'est pourquoi on le nomme également « chlore libre actif ». Quant à lui, l'ion hypochlorite est moins réactif et octroie au chlore une certaine rémanence. En fait, grâce à l'équilibre établi entre ClO^- et HOCl, les ions hypochlorite en solution compensent la consommation de l'acide hypochloreux. Pour cette raison, l'ion hypochlorite est également appelé « chlore libre potentiel ». Le « chlore libre » est alors défini comme la somme du « chlore libre actif » et du « chlore libre potentiel ».

Après réaction avec certains composés présents dans le milieu, le chlore peut se combiner à des structures minérales ou organiques. La fraction de chlore pouvant être déplacée par l'iodure (I) à pH 4 est appelée « chlore combiné ». On définit alors le « chlore total » comme la somme du « chlore libre » et du « chlore combiné ».

4.1.2. Réactivité du chlore en solution aqueuse

En solution aqueuse, le chlore est un composé susceptible de réagir avec de nombreuses fonctions et selon divers mécanismes. Néanmoins les réactions les plus attendues sont les substitutions sur des fonctions azotées.

4.1.2.1. Réactivité sur les fonctions azotées

Le chlore réagit avec les amines minérales par substitution des atomes d'hydrogène des chloramines. Le nombre des substitutions augmente avec le ratio molaire $R = [\text{HOCl}]/[\text{NH}_3]$ pour former respectivement la mono, di et trichloramine (Jafvert et Valentine, 1992). En présence d'un excès de chlore, les chloramines minérales sont progressivement transformées en diazote et en ions chlorure.

De la même manière, le chlore libre réagit sur les amines organiques pour former la mono ou dichloramine organique. Cependant, dans le cas des acides aminés, la dichloramine obtenue subit alors une décarboxylation donnant lieu à la formation d'une imine (Hureiki *et al.*, 1994). Selon le mécanisme illustré sur la figure 26, celle-ci est ensuite transformée en aldéhyde ou en nitrile.

Les acides aminés assemblés en peptide semblent moins réactifs que lorsqu'ils sont sous forme individuelle (Hureiki *et al.*, 1994). En effet, l'union de deux acides aminés par une liaison peptidique altère la fonction amine de l'un d'entre eux, inhibant ainsi le mécanisme

classique de réaction avec le chlore présenté sur la figure 26. Toutefois, même si la liaison peptidique résiste à la chloration (Nightingale *et al.*, 2000), les peptides réagissent avec le chlore par l'intermédiaire de la chaîne carbonée des acides aminés qui les composent (Hureiki *et al.*, 1994).

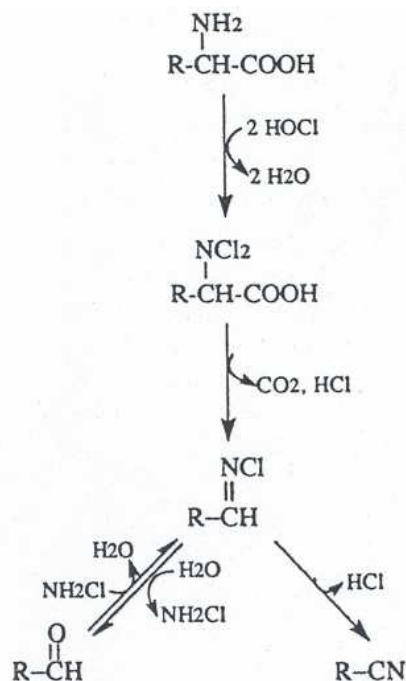


Figure 26 : Mécanisme classique de réaction du chlore avec les acides aminés (Hureiki *et al.*, 1994)

4.1.2.2. Réactivité sur les composés organiques aliphatiques

D'un point de vue mécanistique, des réactions d'addition de chlore peuvent avoir lieu sur les liaisons insaturées C=C via le transfert d'un ion Cl^+ suivi d'une hydroxylation (Morris, 1978). Cependant, en raison des faibles constantes de réaction, ce phénomène ne devrait pas être observé dans des conditions classiques de traitement d'eau, à moins que la double liaison ne soit activée par un groupement donneur d'électrons.

Selon Deborde et Von Gunten (2008), la réactivité du chlore avec les fonctions oxygénées est généralement limitée. Tout d'abord, les acides se révèlent en effet d'une grande stabilité vis-à-vis du chlore. Puis, dans le cas des aldéhydes et des cétones, la chloration se traduit par une réaction de substitution sur le carbone en α du groupement carbonyle conduisant à la formation d'acétate et de chloroforme (Roberts et Caserio, 1968 ; Morris, 1978 ; Doré, 1989). Enfin, la réaction du chlore avec les alcools est très lente mais ceux-ci peuvent néanmoins être oxydés en composés carbonylés, les alcools primaires et secondaires formant respectivement des aldéhydes et des cétones (Roberts et Caserio, 1968).

4.1.2.3. Réactivité sur les composés organiques aromatiques

Le chlore réagit principalement sur les cycles aromatiques par substitution électrophile en position *ortho* ou *para* d'un substituant R (Roberts et Caserio, 1968 ; Deborde et Von Gunten, 2008). La nature de ce dernier influence alors la vitesse de réaction. En effet, un groupement R donneur d'électrons augmente la densité de charge du cycle aromatique conduisant à une réaction de substitution plus rapide.

En revanche, dans le cas de composés aromatiques polycycliques, les liaisons C-C ne possèdent pas toutes une densité d'électron identique. Une réaction avec le chlore au travers de mécanismes de substitution ou d'addition pour former des liaisons C-OH, C=O et C-Cl devra alors être envisagée (Oyler *et al.*, 1983).

Enfin, en raison d'une structure électronique intramoléculaire plus complexe, l'action du chlore sur les composés hétérocycliques est plus difficile à estimer et des réactions de substitution, d'addition ou d'oxydation sont proposées (Doré, 1989 ; Lin et Carlson, 1984).

4.2. Réaction du chlore avec les cyanotoxines

4.2.1. Réaction avec les microcystines et les nodularines

Bien que les MCs et les NODs soient deux familles de cyanotoxines dégradables par le chlore, les travaux de recherche portent majoritairement sur la première et en particulier sur la MC-LR.

4.2.1.1. Réactivité avec les toxines

Plusieurs études rapportent que l'efficacité de la dégradation des MCs et des NODs par le chlore dépend largement des conditions expérimentales (Nicholson *et al.*, 1994 ; Newcombe et Nicholson, 2004 ; Xagorarakis *et al.*, 2006). Ainsi, Hitzfeld *et al.* (2000) indiquent que la nature du composé chloré employé peut affecter la transformation de ces toxines. Par exemple, en traitant un extrait de *Microcystis* pendant 30 minutes avec une dose de chlore de 5 mg/L, Nicholson *et al.* (1994) observent que la concentration en toxines diminue de 95 % avec le chlore gazeux et l'hypochlorite de calcium mais seulement de 80 % avec l'hypochlorite de sodium. Cependant, ces résultats devraient plutôt être attribués à l'effet du pH car les solutions de NaOCl sont très alcalines. Quant à elle, la monochloramine ne montre aucun effet significatif sur les MCs même après plusieurs heures de contact, ce qui

peut être expliqué par son pouvoir oxydant plus faible que celui des composés chlorés déjà mentionnés (Nicholson *et al.*, 1994 ; Acero *et al.*, 2005). De la même manière, le dioxyde de chlore réagit avec la MC-LR mais sa faible constante cinétique le rend inapproprié à l'élimination des cyanotoxines en production d'eau alimentaire (Kull *et al.*, 2004 ; Rodríguez *et al.*, 2007c).

Afin d'être efficace, la chloration des MCs doit être réalisée à un pH inférieur à 8 (Nicholson *et al.*, 1994 ; Acero *et al.*, 2005 ; Xagorarakis *et al.*, 2006). En effet, la vitesse de transformation de la MC-LR diminue très fortement lorsque le pH augmente de 4 à 9, comme le montre la figure 27 (Acero *et al.*, 2005). Cela s'explique en partie par la spéciation du chlore car l'augmentation du pH induit la transformation de HOCl en ClO^- , une espèce moins réactive.

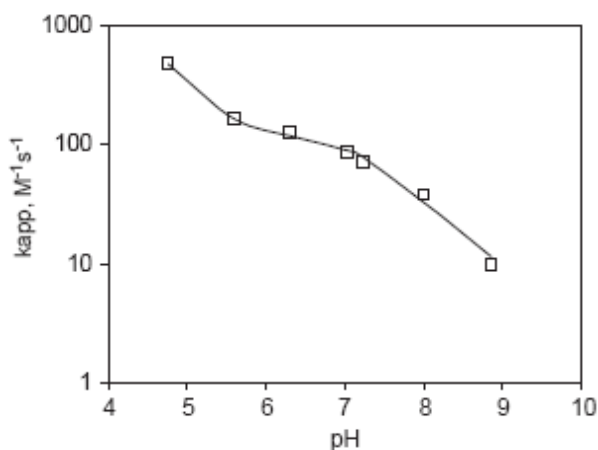


Figure 27 : Influence du pH sur la cinétique de réaction de la MC-LR avec le chlore (Acero *et al.*, 2005)

La dose de chlore est également un paramètre influençant la transformation des MCs. En effet, lors de la chloration de la MC-LR la constante cinétique de pseudo premier ordre k déterminée selon l'équation 1 augmente avec le ratio molaire [chlore]/[toxine] R (Acero *et al.*, 2005 ; Xagorarakis *et al.*, 2006). Par exemple, k augmente de $3,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ à $16,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ lorsque R passe de 21 à 89. De plus, Kull *et al.* (2006) indiquent qu'afin de transformer efficacement les toxines, la dose de chlore appliquée en traitement d'eau doit permettre de satisfaire la consommation de réactif associée à la présence des autres matières organiques naturelles (MON) dans l'échantillon. Pour cette raison, il est généralement admis que la concentration en MCs est efficacement réduite si le pH est maintenu en dessous de 8 et qu'une concentration résiduelle en chlore libre de 0,5 mg/L est assurée après 30 minutes (Nicholson *et al.*, 1994 ; Hitzfeld *et al.*, 2000 ; Newcombe et Nicholson, 2004).

$$\text{Ln} \frac{[\text{toxine}]_t}{[\text{toxine}]_0} = -k \cdot t \quad (1)$$

Où $[\text{toxine}]_t$, $[\text{toxine}]_0$, k et t représentent respectivement la concentration en toxine au temps t (exprimée en M), la concentration initiale en toxine (exprimée en M), la constante cinétique de pseudo premier ordre (exprimée en s^{-1}), le temps de contact (exprimé en s).

D'autre part, Ho *et al.* (2006a) ont mis en évidence que les 4 variants de MCs les plus fréquents possèdent une réactivité différente : MC-YR > MC-RR > MC-LR > MC-LA. Ces résultats impliquent donc que les MCs réagissent avec le chlore selon la réactivité de leurs acides aminés variables. Par conséquent, certains variants encore non étudiés pourraient s'avérer potentiellement résistants à la chloration.

4.2.1.2. Identification des sous-produits formés

La chloration transformant efficacement les MCs et NODs, l'identification des sous-produits formés est d'une grande importance afin de contribuer à l'estimation du danger résiduel pour le consommateur d'eau. Cependant, seul le cas de la MC-LR semble avoir été étudié et deux sous-produits ont été identifiés.

Le premier sous-produit a été caractérisé comme la dihydroxy-microcystine. En chlorant la MC-LR avec un ratio molaire $[\text{chlore}]/[\text{toxine}]$ R égale à 2 et en analysant les échantillons par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), Tsuji *et al.* (1997) observent 4 isomères associés au rapport masse/charge (m/z) 1029, comme illustré sur la figure 28. La différence de 34 unités de masse atomique (u.m.a.) par rapport à la MC-LR (m/z 995) est cohérente avec un composé de formule $\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$. Celui-ci serait alors formé par addition de chlore sur la double liaison du diène conjugué de la toxine suivi d'une hydrolyse. De plus, considérant que le diène conjugué est à l'origine du maximum d'absorbance à 240 nm de la MC-LR, son altération par le mécanisme présenté sur la figure 29 est cohérente avec l'absence du même maximum d'absorbance pour la dihydroxy-microcystine (Tsuji *et al.*, 1997).

Le second sous-produit a été observé pour un rapport m/z de 1047 en plaçant la MC-LR au contact du dioxyde de chlore (Kull *et al.*, 2004). Considérant alors une différence de 18 u.m.a. par rapport au sous-produit précédent, Kull *et al.* (2004) identifient ce composé comme la forme hydratée de la dihydroxy-microcystine.

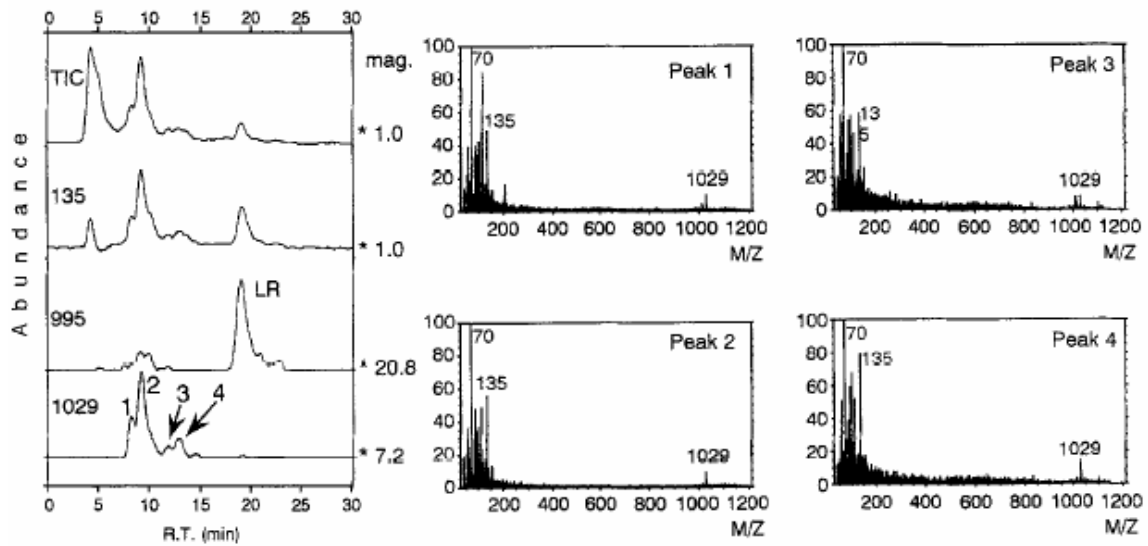


Figure 28 : Observation de 4 isomères associés à m/z 1029 après chloration de la MC-LR (Tsuij *et al.*, 1997)

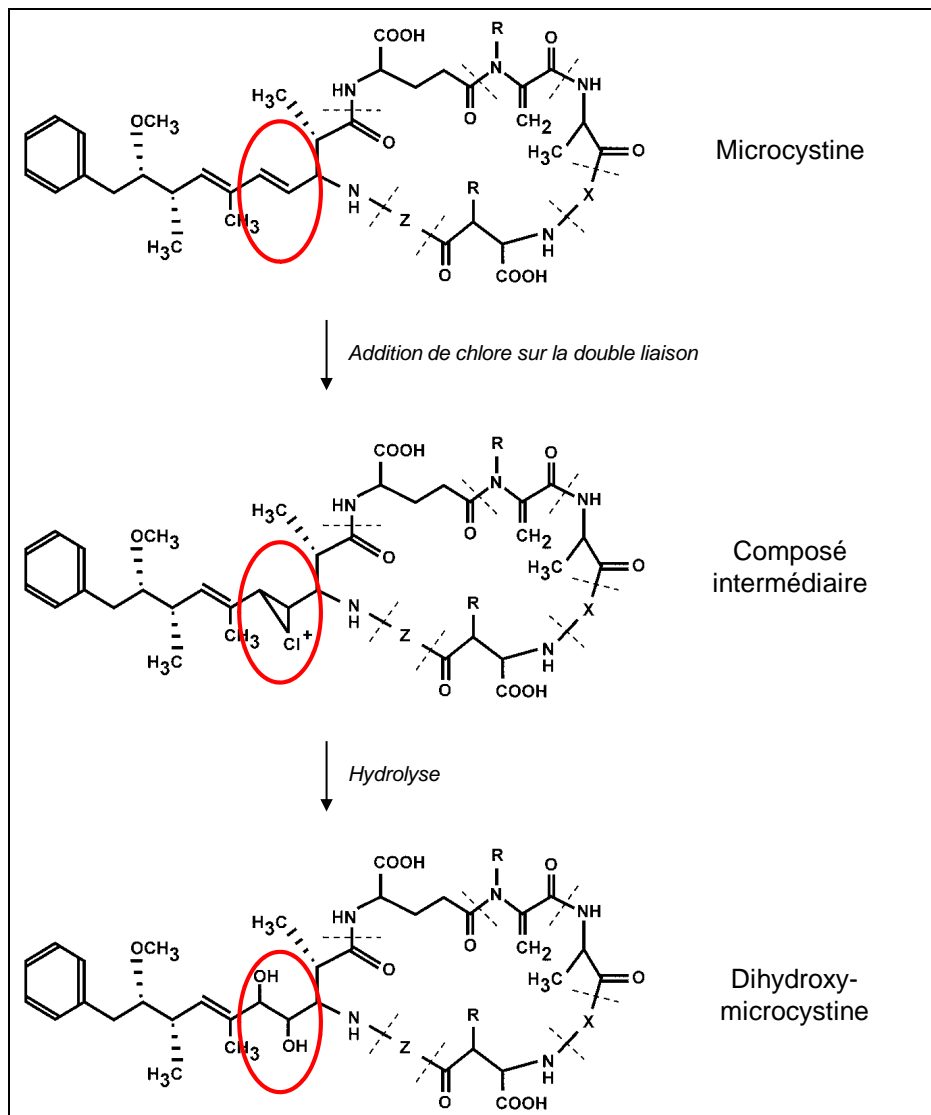


Figure 29 : Formation de la dihydroxy-microcystine (Tsuij *et al.*, 1997 ; Merel *et al.*, 2010)

4.2.2. Réaction avec la cylindrospermopsine

4.2.2.1. Réactivité avec la toxine

Plusieurs études ont établi la vulnérabilité de la CYL vis-à-vis du chlore (Senogles *et al.*, 2000 ; Banker *et al.*, 2001 ; Newcombe et Nicholson, 2004 ; Rodríguez *et al.*, 2007b). Une diminution significative de la concentration en toxine a en effet été rapportée, mais divers facteurs influencent la réaction.

Afin d'augmenter l'efficacité de la chloration, la source de chlore doit être soigneusement choisie car des mécanismes réactionnels différents induisent de fortes disparités dans la cinétique de dégradation de la toxine. Par exemple, la demi-vie de la CYL est de 1,7 minute en présence d'acide hypochloreux contre plus de 14 heures avec le dioxyde de chlore (Rodríguez *et al.*, 2007c). De la même manière, même si la monochloramine réagit avec la CYL (Banker *et al.*, 2001), la constante cinétique de la réaction est 2400 fois plus faible qu'avec HOCl dans les mêmes conditions (Rodríguez *et al.*, 2007b).

Le pH et la température sont également des facteurs à prendre en considération afin de garantir une transformation optimale de la CYL. Après avoir chloré un extrait de *C. raciborskii*, Senogles *et al.* (2000) concluent que la dégradation de la CYL est réduite à pH inférieur à 6. Cependant, d'autres études concluent que le pH doit être maintenu à 7 car des valeurs supérieures diminueraient la transformation de la toxine, comme illustré sur la figure 30 (Rodríguez *et al.*, 2007b et 2007c). De plus, Rodríguez *et al.* (2007b) rapportent également que la cinétique de réaction double lorsque la température augmente de 10°C à 30°C.

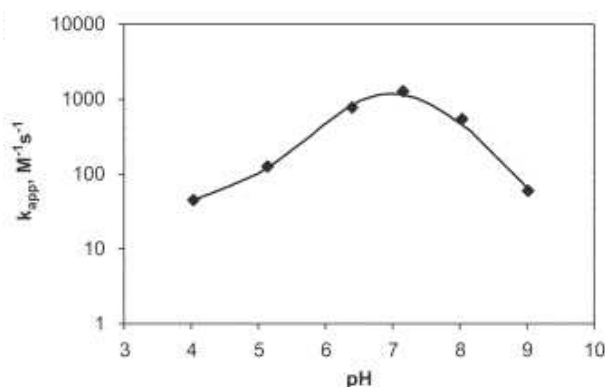


Figure 30 : Influence du pH sur la cinétique de réaction de la CYL avec le chlore (Rodríguez *et al.*, 2007b)

D'autre part, la dose d'oxydant doit également être ajustée de manière à satisfaire la demande en chlore de la MON autre que la CYL (Rodríguez *et al.*, 2007b et 2007c).

4.2.2.2. Identification des sous-produits formés

Les recherches menées sur la CYL ont conduit à l'identification de 2 sous-produits de chloration : la 5-chloro-cylindrospermopsine et l'acide cylindrospermopsique (Banker *et al.*, 2001 ; Senogles-Derham *et al.*, 2003 ; Rodríguez *et al.*, 2007c).

La 5-chloro-cylindrospermopsine est principalement observée pour un ratio molaire [chlore]/[CYL] R égal à 1. Comme le montre la figure 31, ce composé de 449 Da est formé par la substitution d'un atome d'hydrogène par un atome de chlore sur le groupement uracile. Banker *et al.* (2001) ont également établi que le spectre UV de ce premier sous-produit se caractérise par deux maxima d'absorbance à 196 et 277 nm respectivement associés à des coefficients d'extinction molaire de 11600 et 4400 L/mol/cm.

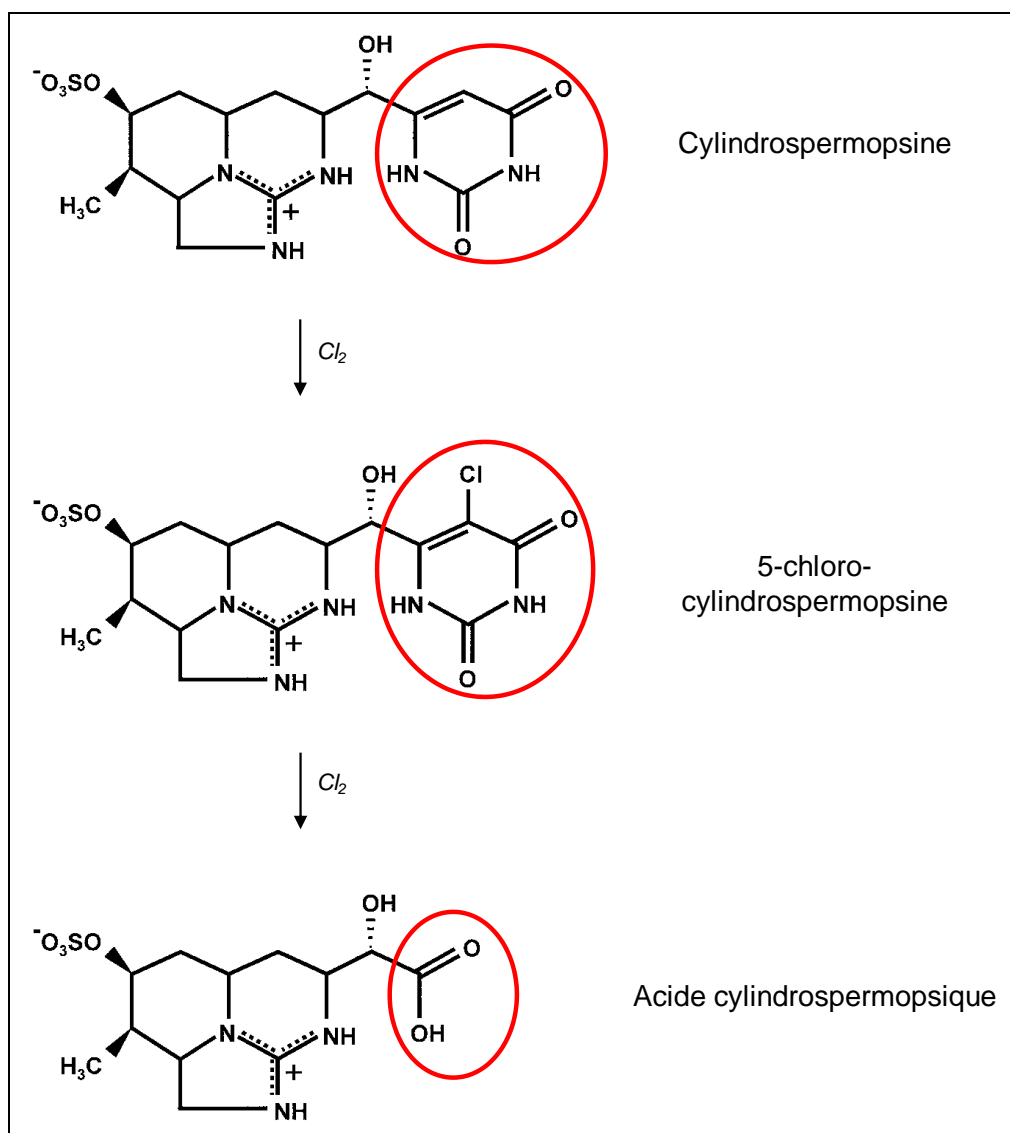


Figure 31 : Formation des sous-produits de chloration de la CYL (Banker *et al.*, 2001 ; Merel *et al.*, 2010)

L'acide cylindrospermopsique, quant à lui, a été identifié pour un ratio molaire R égal à 2 (Banker *et al.*, 2001). Comme le présente la figure 31, ce second sous-produit de 349 Da est probablement formé par fragmentation du groupement uracile lors de la chloration de la 5-chloro-cylindrospermopsine évoquée précédemment. Ce second sous-produit est alors caractérisé par un maximum d'absorbance à 195 nm associé à un coefficient d'extinction molaire de 10500 L/mol/cm (Banker *et al.*, 2001).

Cependant, de nouvelles recherches semblent nécessaires afin d'explorer les sous-produits formés avec un ratio molaire R plus important. En effet, en production d'eau potable, la concentration en CYL dans l'eau brute varie globalement entre 1 et 10 µg/L (Falconer et Humpage, 2006) et la chloration laisse généralement un résiduel de 0,5 mg/L de chlore libre, donc un ratio molaire [chlore]/[CYL] d'au moins 290 peut être attendu. De plus, il est envisageable que les sous-produits de la CYL identifiés précédemment puissent encore être transformés par le chlore au travers de réactions de substitution sur leurs liaisons N-H.

4.2.3. Réaction avec les autres cyanotoxines

Nicholson *et al.* (2003) ont étudié la chloration de quelques variants de STXs et concluent à leur transformation efficace sous certaines conditions de pH. En effet, la transformation des toxines augmente de 20 % à 98 % lorsque le pH passe de 4 à 9, mais la réactivité des STXs varie également selon le variant étudié. Cependant, les sous-produits issus de la réaction n'ont pas été recherchés.

Rodríguez *et al.* (2007b et 2007c) ont montré une faible réactivité de l'ANTX-a vis-à-vis du chlore, ce qui a probablement découragé de plus amples recherches sur cette toxine. Quant à elle, la chloration de l'ANTX-a(s) ne semble pas avoir été étudiée. En conséquence, aucun sous-produit de chloration n'a été rapporté pour la famille des ANTXs.

Enfin, le comportement des autres cyanotoxines, telles que les dermatotoxines, vis-à-vis de chlore ne semble pas avoir fait l'objet d'étude.

4.3. Toxicité du milieu après chloration des cyanotoxines

La transformation d'un composé toxique à travers la chloration ou tout autre procédé n'implique pas nécessairement la perte totale ou partielle de la toxicité du milieu. En effet, si la transformation n'intervient pas sur la partie de la molécule responsable de la toxicité, les

sous-produits peuvent être tout aussi nocifs que le composé initial. Par conséquent, afin de vérifier que la transformation des cyanotoxines par la chloration ne provoque pas d'effets néfastes pour le consommateur d'eau, des tests de toxicité doivent être entrepris sur le milieu chloré.

4.3.1. Cas des microcystines et des nodularines

La toxicité des MCs chlorées a fait l'objet de plusieurs études (Tableau 4) dont une incorporant les NODs (Nicholson *et al.*, 1994). Tandis que les études les plus anciennes examinent le taux de mortalité et les lésions hépatiques chez la souris, les études les plus récentes se basent sur le test enzymatique d'inhibition de la protéine phosphatase.

Tableau 4 : Synthèse des travaux relatifs à la toxicité des cyanotoxines chlorées (Merel *et al.*, 2010)

Toxines	Conditions de chloration	Tests de toxicité employés	Toxicité post-chloration	Références
Microcystines	Extrait de <i>M. aeruginosa</i> traité avec différents ratios molaires [chlore]/[toxine]	Essais sur souris (injection i.p.)	Hépatotoxicité plus faible, corrélée avec la MC-LR résiduelle	Nicholson <i>et al.</i> , 1994
	Ratio molaire [chlore]/[toxine] = 2 dans de l'eau ultra pure	Test d'inhibition de la protéine phosphatase (réalisé sur des sous-produits isolés)	Toxicité 100 fois plus faible qu'avec la MC-LR initiale	Tsuji <i>et al.</i> , 1997
		Essais sur souris (injection i.p. de sous-produits isolés)	Pas d'effet toxique observable	Tsuji <i>et al.</i> , 1997
	Ratio molaire [ClO ₂]/[toxine] = 340 ; 680 dans de l'eau ultra pure	Test d'inhibition de la protéine phosphatase (réalisé sur le mélange de sous-produits)	Toxicité plus faible, corrélée avec la MC-LR résiduelle	Kull <i>et al.</i> , 2004
	Ratio molaire [chlore]/[toxine] proche de 25 dans de l'eau ultra pure et de l'eau de surface	Test d'inhibition de la protéine phosphatase (réalisé sur le mélange de sous-produits)	Toxicité plus faible, corrélée avec la MC-LR résiduelle	Rodríguez <i>et al.</i> , 2008
Cylindrospermopsine	Ratio molaire [chlore]/[toxine] proche de 2 dans de l'eau ultra pure	Essais sur souris (injection i.p. de sous-produits isolés)	Pas d'effet toxique observable	Banker <i>et al.</i> , 2001
	Chloration de toxine purifiée et d'un extrait de <i>C. raciborskii</i> (ratio molaire [chlore]/[toxine] non spécifié)	Essais sur souris (administration orale d'eau contenant le mélange de sous-produits pendant 90 et 170 jours)	Pas d'incidence sur le taux de cancer, mais plus de 40% des souris mâles souffrent d'atteintes hépatiques après ingestion de l'extrait cellulaire chloré	Senogles-Derham <i>et al.</i> , 2003
Saxitoxines	Chloration d'un extrait d' <i>A. circinalis</i> contenant de la STX et ses dérivés (ratio molaire [chlore]/[toxine] non spécifié)	Essais sur souris (injection i.p. du mélange de sous-produits)	Pas de toxicité aiguë observable	Nicholson <i>et al.</i> , 2003

La transformation des MCs et des NODs par la chloration semble induire une diminution de la toxicité du milieu. En effet, Nicholson *et al.* (1994) rapportent que, après chloration, les extraits de *M. aeruginosa* et de *N. spumigena* contenant respectivement des MCs et des NODs (variants non précisés) ne montrent plus de signe d'hépatotoxicité. Par exemple, 6 heures après l'injection du milieu chloré par voie i.p., les souris ne souffrent pas de l'augmentation du volume du foie caractéristique d'une intoxication par ces toxines. De plus, la chloration semble également réduire la capacité du milieu à inhiber la protéine phosphatase (Rodríguez *et al.*, 2008). Enfin, des résultats similaires ont été obtenus à partir du dioxyde de chlore (Kull *et al.*, 2004).

Les résultats présentés dans le tableau 4 sont cohérents avec l'altération du groupement adda, considéré comme étant à l'origine de la toxicité (An et Carmichael, 1994 ; Tsuji *et al.*, 1997 ; Dawson, 1998). Cependant, si les cyanotoxines chlorées ne sont plus hépatotoxiques, elles pourraient néanmoins agir sur un autre organe cible et selon un mécanisme différent. Par conséquent, afin d'apprécier le danger potentiel pour le consommateur d'eau, il semble nécessaire d'entreprendre de nouveaux tests permettant d'appréhender la toxicité du milieu chloré de manière moins spécifique.

4.3.2. Cas de la cylindrospermopsine

Tout comme pour les MCs et les NODs, la chloration de la CYL semble réduire la toxicité du milieu. Banker *et al.* (2001) indiquent que la 5-chloro-cylindrospermopsine et l'acide cylindrospermopsique ne sont pas toxiques. En effet, la DL₅₀ de ces produits estimée 5 jours après injection par voie i.p. sur des souris s'avère supérieure à 10 mg/kg contre 200 µg/kg pour la toxine initiale. Cependant, Senogles-Derham *et al.* (2003) rapportent une augmentation du poids des souris mâles ainsi que des lésions hépatiques après ingestion d'un extrait de *C. raciborskii* chloré.

La diminution de la toxicité observée par Banker *et al.* (2001) est cohérente avec une altération du groupement uracile considéré comme étant à l'origine du potentiel toxique de la CYL. Cependant, les lésions hépatiques révélées par l'autre étude nécessitent la réalisation de tests complémentaires afin de mieux connaître le danger potentiel pour le consommateur d'eau.

4.3.3. Cas des autres cyanotoxines

Selon plusieurs travaux, la chloration des STXs semble réduire la toxicité du milieu (Newcombe et Nicholson, 2002 ; Nicholson *et al.*, 2003 ; Westrick, 2008). Nicholson *et al.* (2003) rapportent en effet qu'une eau naturelle dopée en toxines et chlorée pendant 30 minutes n'induit pas de toxicité aiguë après injection par voie i.p. sur des souris de 20 grammes. En effet, alors que les échantillons non chlorés causent la mort des souris en 8 à 16 heures, aucune mortalité de souris n'a été observée après chloration. Cependant, les données disponibles ne prennent en considération que la mortalité animale après une période relativement courte. Or, les sous-produits de chloration des STXs pourraient agir selon une toxicodynamique différente et plus lente. Par conséquent, d'autres études devraient être envisagées afin de mieux caractériser le danger lié aux STXs chlorées pour le consommateur d'eau.

D'autre part, l'ANTX-a ayant montré une faible réactivité avec le chlore, la toxicité du milieu après la réaction n'a pas été prise en considération. De la même manière, aucune donnée n'est disponible pour les autres cyanotoxines car leur chloration n'a pas été étudiée.

5. SYNTHÈSE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'étude bibliographique de la problématique des cyanobactéries et de leurs toxines dans l'eau indique clairement que de nombreux travaux restent à entreprendre, par exemple sur la répartition géographique des efflorescences. En effet, la majorité des études a été menée dans les pays dits industrialisés mais le climat en Afrique ou en Amérique latine est également propice à la formation de blooms potentiellement toxiques. De plus, le problème de santé publique causé par les cyanotoxines est exacerbé dans ces zones où les traitements d'affinage de l'eau potable permettant de réduire la concentration en métabolites toxiques ne sont pas très développés.

L'identification et la caractérisation de la structure des cyanotoxines restent des champs d'investigation importants car il est probable qu'un certain nombre de composés potentiellement toxiques produits par les cyanophycées demeure inconnu. En effet, avec les progrès technologiques tels que la spectrométrie de masse qui devient plus sensible et plus précise, il est à prévoir que la liste des cyanotoxines identifiées continue de croître. Par exemple, un depsipeptide cyclique nommé hoiamide A vient récemment d'être identifié comme une nouvelle molécule toxique produite par un consortium de deux cyanobactéries (Pereira *et al.*, 2009). De plus, le mécanisme de synthèse et le rôle des cyanotoxines requièrent également de nouvelles études.

Cependant, du point de vue de la santé publique, l'interrogation majeure concernant les cyanotoxines reste leur comportement au sein de la filière de production d'eau de consommation et en particulier face à la chloration. En effet, comme décrit auparavant, plusieurs cyanotoxines ou groupes de cyanotoxines sont vulnérables au chlore. Leur transformation peut alors permettre de satisfaire la réglementation en vigueur selon les pays et de ne pas dépasser la limite de 1 µg/L pour la MC-LR préconisée par l'OMS, mais l'incertitude demeure quant à la structure et la toxicité des sous-produits générés. Peu d'études ont examiné la question et les résidus identifiés aujourd'hui ne permettent pas une réelle compréhension des mécanismes mis en jeu. De plus, il est difficile d'aboutir à une estimation précise du danger pour le consommateur d'eau car les tests de toxicité généralement mis en oeuvre se focalisent sur l'activité du composé initial sans envisager l'hypothèse d'une activité toxique différente après la chloration.

Les travaux de thèse présentés dans ce mémoire ont pour but de contribuer à protéger le consommateur d'eau vis-à-vis du risque lié à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans l'eau brute. Devant l'impossibilité de considérer l'ensemble des cyanotoxines, l'examen de différents critères a permis de focaliser l'étude sur deux hépatotoxines : la microcystine-LR et la cylindrospermopsine. En effet, ces deux molécules font partie des rares cyanotoxines pour lesquelles un standard est disponible. De plus, la microcystine-LR est le métabolite de cyanobactérie le plus répandu dans les eaux de surface et elle sert de base à de nombreuses études ainsi qu'aux recommandations de l'OMS. D'autre part, la cylindrospermopsine est une toxine émergente en Europe et suscite une préoccupation croissante.

En considérant l'état des connaissances et les besoins en terme de recherche, les travaux de cette thèse se fixent trois objectifs :

- Caractériser les réactions de la microcystine-LR et de la cylindrospermopsine avec le chlore par l'évolution de la concentration des réactifs et celle du spectre UV du milieu réactionnel.
- Identifier les sous-produits issus de la chloration de ces deux toxines afin de mieux comprendre les réactions mises en jeu et de connaître les substances auxquelles le consommateur d'eau est exposé.
- Estimer la toxicité du milieu chloré selon divers tests moins spécifiques du mode d'action de la toxine initiale que ceux mis en œuvre au cours d'études antérieures.

De plus, les diverses observations réalisées au cours de ces travaux de recherche pourront être utilisées afin d'améliorer le suivi sanitaire des eaux alimentaires pour le paramètre cyanotoxine.

CHAPITRE II

Matériels et Méthodes

1. MATÉRIELS

La section « matériels » s'articule autour de deux parties présentant respectivement les réactifs utilisés pour les expérimentations et le matériel employé pour l'analyse des échantillons prélevés à divers états d'avancement de la chloration des toxines.

1.1. Réactifs

1.1.1. Préparation des solutions mères de toxines

La MC-LR (N° CAS 101043-37-2) utilisée pour les expérimentations réalisées au cours de cette thèse est un composé standard isolé à partir d'un bloom de *Microcystis aeruginosa* fourni par la société Alexis Biochemicals. La MC-LR certifiée pure à plus de 98 % se présente alors sous forme d'un film solide contenant 1 mg de toxine inséré dans un flacon en verre. Afin de limiter la manipulation du produit, la solution mère de MC-LR à 250 mg/L (soit 250 μ M) est préparée en solubilisant la toxine dans 4 mL de méthanol (la limite de solubilité étant de 2 mg/mL) ajoutés directement dans le flacon commercial. Celle-ci est ensuite stockée à l'obscurité, à 4°C pour une utilisation sous 48 heures ou à -20°C pour une conservation à long terme. Toute manipulation ultérieure de la toxine est alors réalisée exclusivement à l'aide de seringues et de récipients en verre afin d'éviter les pertes par adsorption de la MC-LR sur du plastique (Hyenstrand *et al.*, 2001a et 2001b).

De la même manière, la CYL (N° CAS 143545-90-8) utilisée au cours de cette thèse est un standard isolé à partir de *Cylindrospermopsis raciborskii* et certifié pur à plus de 95 % par la société Alexis Biochemicals. Une solution mère de CYL à 25 mg/L (soit 60 μ M) est alors préparée directement dans le flacon commercial en solubilisant un film solide contenant 100 μ g de toxine dans 4 mL d'eau ultra pure. Avant d'être stockée à -20°C et à l'obscurité, la solution de CYL est préalablement répartie en aliquots de 500 μ L, afin de limiter les cycles de congélation/décongélation susceptibles d'altérer la toxine. De plus, avant toute manipulation ultérieure de la CYL, la solution mère est placée à température ambiante pendant 2 heures afin d'éviter une décongélation trop rapide.

1.1.2. Préparation de la solution mère de chlore

Le composé chloré utilisé au cours de cette thèse est l'hypochlorite de sodium (NaOCl). La solution mère de chlore d'environ 1 g/L (exprimé en Cl₂) est préparée par une simple dilution au 1/50 d'une solution commerciale d'eau de javel. Le pH est ensuite ajusté à 7 par l'ajout d'acide chlorhydrique (fourni par VWR) à 0,01 M puis le mélange est stocké à 4°C et à l'obscurité pour une durée maximale de 7 jours. De cette manière, au début de la réaction du chlore sur la MC-LR et la CYL le pH est égal à 7. La concentration précise de la solution mère de chlore n'est déterminée que quelques minutes avant chaque expérimentation selon la méthode de titration au thiosulfate de sodium.

1.1.3. Réactifs pour le suivi analytique de la chloration

Le nitrite de sodium (NaNO₂) utilisé pour stopper la réaction de chloration provient de la société Merck. Une solution mère à 1,4 g/L est alors préparée par solubilisation du produit en poudre dans de l'eau ultra pure puis stockée à 4°C et à l'obscurité. Sa concentration est contrôlée avant chaque expérimentation en vérifiant sa capacité à réduire le chlore libre en ion chlorure dans des proportions stoechiométriques.

La N,N-diéthyle-p-phénylènediamine (DPD) utilisée pour le suivi de la concentration en chlore au cours de la chloration des toxines est distribuée par la société Permachem Reagents. Le réactif en poudre se présente sous forme de sachet « DPD free chlorine reagent » et « DPD total chlorine reagent » respectivement pour le dosage du chlore libre et total. Chaque sachet permet alors de traiter un échantillon.

L'acétonitrile de qualité HPLC et l'acide formique d'une pureté supérieure à 98 % employés pour la chromatographie liquide proviennent respectivement des sociétés SDS et J.T. Baker. Enfin, les cristaux d'acétate d'ammonium (pureté supérieure à 98 %) mise en solution dans l'eau ultra pure pour la séparation de la cylindrospermopsine est quant à elle distribuée par la société Merck.

1.1.4. Réactifs pour les tests de toxicité

1.1.4.1. Le test Microtox

Les cellules de *Vibrio fischeri* NRRL B 11177 utilisées pour le test Microtox sont fournies sous forme lyophilisée par R-Biopharm et conservées à -20°C. Leur réhydratation est

réalisée dans une solution nommée « solution de reconstitution » commercialisée par Strategic Diagnostics Inc. Les cellules ainsi réhydratées peuvent alors être stockées à 4°C durant un maximum de 4 heures ou être diluées et exploitées immédiatement. La dilution des bactéries s'effectue à l'aide d'une solution appelée SDBR contenant : 20 g/L de NaCl ; 2,035 g/L de MgCl₂, 6H₂O ; et 0,3 g/L de KCl. Afin d'ajuster la pression osmotique du milieu, une solution OAS à 22 % de NaCl est préparée au laboratoire pour être ajoutée aux échantillons avant leur mise en contact avec *Vibrio fischeri*. Enfin, les témoins positifs de Cr VI à 50 mg/L et de Zn²⁺ à 4 mg/L sont obtenus à l'aide de poudre de K₂CrO₄ et de ZnSO₄, 7H₂O distribuées par VWR.

1.1.4.2. Les tests MTT et rouge neutre

➤ Culture cellulaire

Les cellules Caco-2 utilisées pour les tests MTT (bromure de méthylthiazolyldiphényltétrazolium) et rouge neutre ne sont pas des hépatocytes (cibles privilégiées de la MC-LR et de la CYL) mais des cellules adhérentes de carcinome de colon humain plus rarement étudiées bien qu'également exposées aux cyanotoxines lors de l'ingestion d'eau contaminée. Elles ont été fournies par le laboratoire LGC Promochem (ATCC-HTB-37) et sont conservées dans l'azote liquide à -180° C.

Les cellules Caco-2 sont cultivées en flasques de 75 cm² dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) avec sels de Earle et du GlutaMAXTM I (Gibco-Invitrogen), supplémenté avec de la pénicilline (100 UI/mL), de la streptomycine (100 µg/mL) (Gibco-Invitrogen) et 20 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF - Invitrogen) ajouté extemporanément. Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 5 % de CO₂ et à 37° C.

Tous les 3-5 jours, les cellules sont repiquées lorsqu'elles atteignent au moins 80 % de confluence. Le tapis cellulaire est rincé avec du PBS 1X puis recouvert de trypsine – EDTA (0,05 % - Gibco-Invitrogen) pendant 4-5 minutes. Après décollement, les cellules sont remises en suspension avec du milieu complet contenant 20 % de SVF ajouté extemporanément. Les cellules sont centrifugées à 136 g pendant 5 minutes, comptées puisensemencées à raison de 10 × 10³ cellules/cm² dans 25 mL de milieu complet dans une nouvelle flasque de 75 cm².

➤ Réactifs du test MTT

La poudre de MTT est reconstituée dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, sans Ca et sans Mg fourni par Gibco-Invitrogen) pour obtenir une solution de MTT à 0,5 mg/mL. Elle est ensuite diluée dans du milieu de culture pour obtenir une solution contenant 10 % de MTT. La solution pour la solubilisation des cristaux de formazan issus de la métabolisation du MTT par les cellules Caco-2 est composée d'un mélange de 23 volumes d'isopropanol et d'un volume de HCl 1N.

➤ Réactifs du test rouge neutre

La solution de rouge neutre à 0,4 % est préparée par solubilisation de $C_{15}H_{17}ClN_4$ dans l'eau ultra pure. Elle est ensuite diluée au $1/80^{\text{ème}}$ dans du milieu de culture puis filtrée sur 0,22 μm . La solution de fixation des cellules est obtenue par dilution de 10 mL de $CaCl_2$ à 0,9M dans 89 mL d'eau ultra pure et 1 mL de formaldéhyde à 4 %. La solution de solubilisation du rouge neutre est composée de 1 volume d'acide acétique glacial dans 99 volumes d'éthanol à 50 %.

1.2. Chromatographie liquide et spectrométrie de masse

Au cours de cette thèse, deux équipements ont été utilisés afin de réaliser les analyses par couplage HPLC-MS, (i) un système HPLC Finnigan surveyor couplé à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap de Thermo Electron Corporation et, (ii) un système HPLC Waters alliance 2695 couplé à un spectromètre de masse Waters Micromass ZQ.

1.2.1. Conditions chromatographiques

1.2.1.1. Chloration de la microcystine-LR

Lors de l'analyse de la MC-LR ou de ses résidus chlorés, la chromatographie liquide a été réalisée sur un volume d'échantillon variant de 20 à 50 μL suivant le nombre de composés recherchés. Les conditions opératoires ont été adaptées de méthodes communément employées pour la détection des MCs dans l'eau (Kondo *et al.*, 1992 ; Harada *et al.*, 1999). La phase solide consiste en une colonne de type phase inverse greffée C18 (Phenomenex Synergi

4 μ Hydro-RP 80A) à une température de 35°C. La phase mobile est alors constituée d'un gradient d'acétonitrile et d'eau illustré par le tableau 5 et acidifié à 0,1% d'acide formique.

Tableau 5 : Composition de la phase mobile pour l'analyse de la MC-LR sur colonne greffée C18

Temps (min)	Eau	Acétonitrile	Débit (μ L/min)
0	70 %	30 %	500
10	60 %	40 %	500
17	30 %	70 %	500
29	30 %	70 %	500
30	70 %	30 %	500
34	70 %	30 %	500

D'autre part, afin de séparer les composés les plus polaires issus de la chloration de la MC-LR, quelques expérimentations ont également été menées à l'aide d'une colonne de type HILIC (PolyHYDROXYETHYL A 200 x 4,6 mm 5 μ m). Le gradient de phase mobile appliqué est alors présenté dans le tableau 6.

Tableau 6 : Composition de la phase mobile pour l'analyse de la MC-LR sur colonne HILIC

Temps (min)	Eau	Acétonitrile	Débit (μ L/min)
0	10 %	90 %	500
10	10 %	90 %	500
20	20 %	80 %	500
40	20 %	80 %	500
47	10 %	90 %	500
50	50 %	90 %	500

1.2.1.2. Chloration de la cylindrospermopsine

Lors de l'analyse de la CYL ou de ses sous-produits, la séparation chromatographique a été réalisée sur 50 μ L d'échantillon selon le principe d'interaction hydrophile (Kovalova *et al.*, 2009), une méthode adaptée à la séparation de composés très polaires. La phase solide consiste donc en une colonne MODULO-CART QK STRATEGY 5 HILIC SI 250 X 2 mm de la société Interchrom. Alors que la température est fixée à 40°C, l'élution est réalisée à l'aide de 0,2 mL/min d'un mélange isocratique d'acétonitrile (80 %) et d'eau à 10 mM d'acétate d'ammonium (20 %).

1.2.2. Spectromètre de masse LTQ-Orbitrap

Le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap illustré sur la figure 32 est un outil particulièrement adapté à l'identification de composés inconnus (Peterman et Duczak, 2006), notamment grâce à une résolution $m/\Delta m$ de 60 000 pour une masse $m = 400$. Le paramétrage de l'appareil et le traitement des données obtenues sont alors réalisés par l'intermédiaire du logiciel Xcalibur.

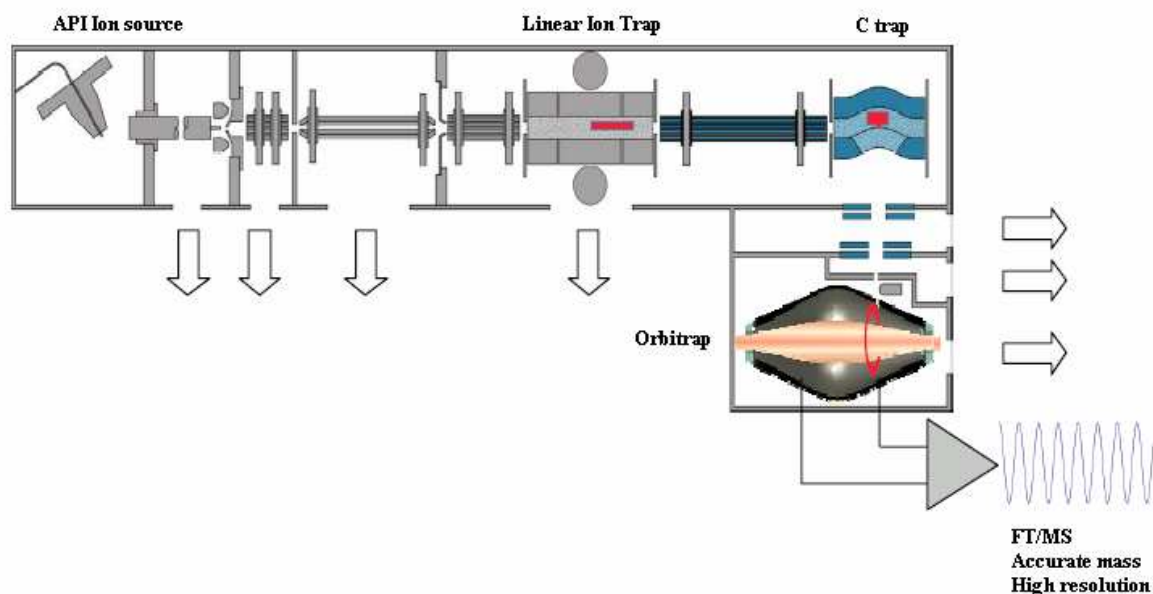


Figure 32 : Représentation du dispositif LTQ-Orbitrap
(<http://www.amcham.dk/dl/events/ESACPresentation8.pdf>)

L'ionisation par électrospray permet généralement aux composés de capter un proton tout en limitant leur fragmentation afin de former majoritairement les ions $[m + H]^+$. La trappe d'ion linéaire permet ensuite d'éliminer les ions non désirés. Les autres sont alors accumulés dans la C-trap avant d'être envoyés simultanément dans l'Orbitrap. Leur rotation autour de l'électrode centrale est ainsi enregistrée puis convertie en spectre de masse par l'intermédiaire de la transformée de Fourier. De ce fait, le LTQ-Orbitrap permet donc de scanner un grand nombre de rapports m/z sans perte de sensibilité.

D'autre part, ce dispositif offre également la possibilité de réaliser de la spectrométrie de masse en tandem (MS^2) par Collision Induced Dissociation (CID). La collision avec des atomes d'hélium provoque la fragmentation des ions parents sélectionnés, puis les ions fils obtenus sont détectés au niveau de la trappe linéaire.

Dans le cadre de cette thèse, le LTQ-Orbitrap a donc été utilisé pour détecter les sous-produits de chloration des toxines en recherchant simultanément un ensemble d'ions, puis pour confirmer leur identité par le recours à la MS².

1.2.3. Spectromètre de masse Waters Micromass ZQ

Le Waters Micromass ZQ est un spectromètre de masse à simple quadrupole (ionisation également réalisée par électrospray) piloté à travers le logiciel Masslynx. Cette appareil a été utilisé pour suivre et quantifier l'abondance des toxines et de leurs sous-produits en fonction du temps de réaction. Afin de limiter la perte de sensibilité, seuls les ions moléculaires $[m + H]^+$ ont été recherchés pour les toxines et leurs résidus. La quantification des composés est alors basée sur l'aire de leurs pics chromatographiques.

1.3. Spectrophotométrie UV-visible

La spectrométrie UV-visible a été employée dans deux cadres différents : le suivi du spectre UV du milieu réactionnel et le dosage du chlore par la méthode DPD. Dans chacun des cas, les échantillons ont été analysés sur un spectrophotomètre Lambda 20 de Perkin Elmer à l'aide d'une cellule en quartz de 10 mm de trajet optique. Le chlore n'étant pas neutralisé lors du suivi du spectre UV de milieu réactionnel, le temps d'acquisition doit être le plus faible possible. Par conséquent la vitesse de balayage entre 200 et 400 nm est fixée à 1920 nm/min.

1.4. Etude de la toxicité post-chloration

D'une part, le test Microtox a été réalisé à l'aide d'un analyseur Microtox 500 comprenant 30 cuves pour l'exposition des bactéries aux composés testés et un luminomètre thermostaté à 15°C (figure 33). D'autre part, les absorbances pour les tests MTT et rouge neutre sont enregistrées à l'aide d'un lecteur Fluostar Optima, puis traitées sur le logiciel Mars (BMG Labtech).

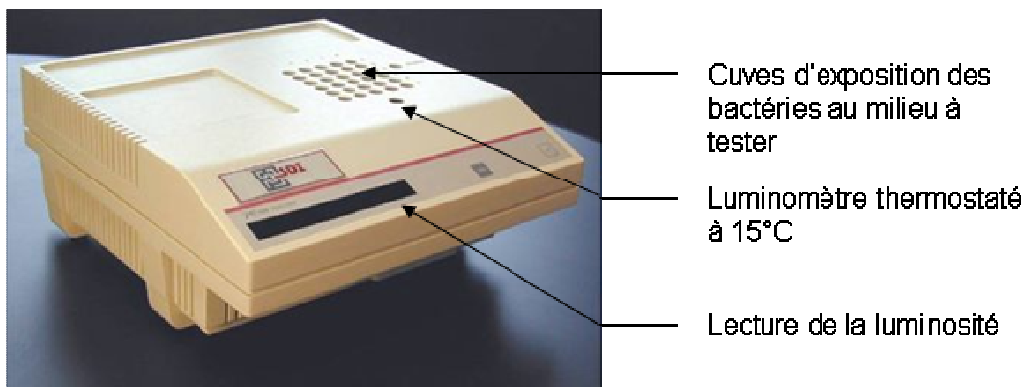


Figure 33 : Dispositif Microtox 500

2. METHODES

L'étude de la chloration de la MC-LR et de la CYL implique la mise en œuvre de multiples méthodes s'articulant comme l'indique le synoptique de la figure 34. Le suivi de la concentration en chlore a constitué la première phase de l'étude, afin de calculer la dose de nitrite nécessaire à stopper la réaction et de déterminer la durée du monitoring. La seconde phase a ensuite permis de connaître l'évolution du spectre UV du milieu réactionnel. Enfin, la troisième phase constituant le cœur de l'étude se divise en 2 étapes : l'identification et le suivi des sous-produits par analyse LC-MS, puis l'examen de leur toxicité à travers divers tests.

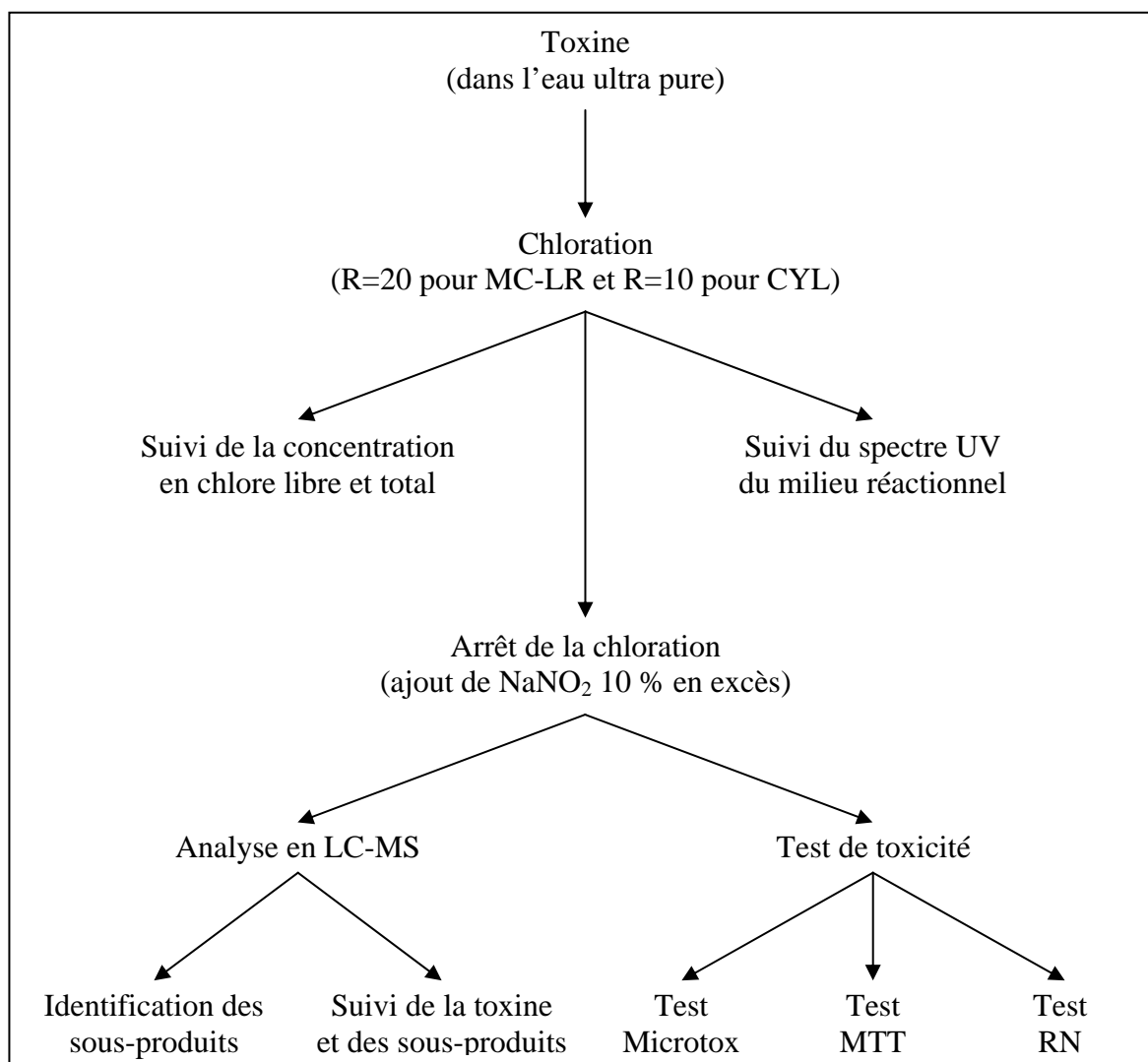


Figure 34 : Synoptique des expérimentations pour l'étude de la chloration des toxines

2.1. Préparation du milieu réactionnel

2.1.1. Préparation d'eau et de verrerie sans demande en chlore

Les divers composés contenus dans l'eau ou à la surface de la verrerie peuvent être à l'origine d'une certaine consommation de chlore. Ce phénomène doit alors être évité afin d'étudier la chloration des toxines avec la plus grande précision possible. Par conséquent, la demande en chlore de l'eau et de la verrerie utilisée pour les expérimentations doit être préalablement satisfaite.

L'eau sans demande en chlore est alors préparée à partir d'une eau ultra pure *milli-Q 185 plus* chlorée à 5 mg/L pendant 24 heures. Ensuite, la recirculation de l'eau sous une lampe UV (modèle 30/3S UV Water Purifier, 37 Watts, UV Systems LTD) pendant 48 heures permet de réduire le chlore résiduel en ion chlorure. Enfin, l'absence de chlore libre est vérifiée à l'aide d'un dosage à la DPD.

Quant à elle, la verrerie sans demande en chlore est obtenue en exposant le matériel à une solution de chlore à 10 mg/L pendant 1 heure (ISO 7393-2). Le chlore résiduel est ensuite éliminé par 3 rinçages successifs à l'eau sans demande en chlore.

2.1.2. Apport de toxine

L'eau sans demande en chlore est dopée à environ 20 μM de toxine par ajout d'un aliquot de solution mère de MC-LR ou de CYL. Cependant, la concentration initiale en toxine est doublée dans les échantillons destinés aux tests de toxicité MTT et rouge neutre, afin de palier à la dilution du milieu réactionnel dans le milieu de culture cellulaire. Dans chacun des cas, la concentration en toxine avant chloration est vérifiée par spectrophotométrie UV selon l'équation 2. En effet, comme le présente la figure 35, la CYL et la MC-LR possèdent respectivement un maximum d'absorbance à 262 et 240 nm associé à un coefficient d'extinction molaire connu (Sano *et al.*, 2008 ; ISO 20179).

$$\rho = \frac{A_{\max} \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot d} \quad (2)$$

Où ρ , A_{\max} , ε et d représentent respectivement la concentration en toxine (exprimée en μM), l'absorbance au maximum, le coefficient d'extinction molaire (9 800 L/mole/cm pour la CYL et 39 800 L/mole/cm pour la MC-LR) et le trajet optique de la cuve (exprimé en cm).

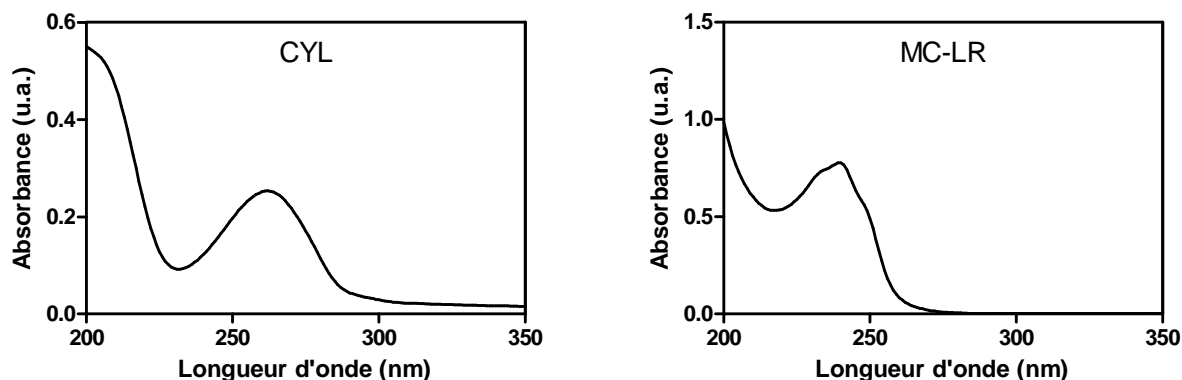
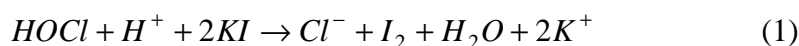


Figure 35 : Spectres UV de la CYL (dans l'eau) et de la MC-LR (dans un mélange méthanol/eau)

2.1.3. Dosage de la solution mère de chlore

La concentration de la solution mère de chlore est déterminée par titration au thiosulfate de sodium, une méthode adaptée pour des concentrations de l'ordre du g/L. En milieu acétique, l'acide hypochloreux oxyde l'iodure de potassium selon la réaction 1. L'iode libéré est ensuite titré par une solution de thiosulfate de sodium 0,1N (réaction 2).



2.1.4. Chloration des toxines

La chloration est réalisée à 20°C et à l'obscurité par ajout d'un aliquot de solution mère de chlore préalablement titrée. Quelles que soient les concentrations initiales en toxines, la dose de chlore est définie de manière à assurer un ratio molaire [chlore]/[toxine] R de 20 pour la MC-LR et de 10 pour la CYL. La réaction est alors suivie pendant 60 minutes par diverses approches déjà présentées sur le synoptique de la figure 34. Lorsque la réaction doit être stoppée à un instant précis pour diverses analyses, le chlore résiduel est réduit en ions chlorure par l'ajout de nitrite de sodium 10 % en excès.

2.2. Suivi du chlore et du spectre UV du milieu

2.2.1. Suivi du chlore libre et total

Lors du suivi de la chloration des cyanotoxines, le chlore est dosé par la DPD, une méthode adaptée pour des concentrations allant de 0 à 5 mg/L. A un pH voisin de la neutralité, la DPD réagit avec le chlore libre pour former un composé donnant à l'échantillon une coloration rose. La concentration en chlore libre est alors directement proportionnelle à l'intensité de la coloration obtenue par la mesure immédiate de l'absorbance à 510 nm.

Le chlore total est mesuré suivant le même principe. Cependant, l'adjonction d'iodeure de potassium est nécessaire au déplacement du chlore combiné qui ne peut réagir directement avec la DPD. Dans ce cas, l'absorbance à 510 nm ne doit être mesurée qu'après un délai de 2 minutes suivant l'ajout des réactifs.

En pratique, les échantillons à analyser sont immédiatement dilués afin que la concentration en chlore soit comprise entre 0 et 5 mg/L puis traités par un sachet de DPD « free chlorine reagent » ou « total chlorine reagent » contenant la quantité nécessaire de KI. L'absorbance mesurée à 510 nm est ensuite reportée sur une droite d'étalonnage.

2.2.2. Suivi du spectre UV du milieu

Afin de suivre la chloration des toxines, le spectre UV du milieu entre 200 et 400 nm a été enregistré à de multiples reprises jusqu'à 60 minutes après le début de la réaction. Les spectres obtenus ont alors été superposés afin d'observer à la fois : la disparition attendue du maximum d'absorbance associé à la toxine et l'apparition éventuelle de nouveaux épaulements attribuables aux sous-produits. De plus, la superposition des enregistrements permet également d'observer de potentiels points isobestiques définis par l'intersection de plusieurs spectres en un même point. De tels points indiqueraient alors la présence dans le milieu de divers composés dont les concentrations sont liées de manière à garantir une conservation de la masse. Plus précisément, il existe une relation fixe et linéaire entre les concentrations explicitée par l'équation 3 (Thomas et Cerda, 2007).

$$\sum_i a_i * C_i = 1 \quad (3)$$

Où C est la concentration du composé i et a est un coefficient indépendant du milieu.

Cependant, certains points isobestiques appelés points isobestiques cachés n'apparaissent pas sur les spectres bruts (Pouët *et al.*, 2004 ; Thomas et Cerda, 2007). Afin de les mettre en évidence, les divers spectres UV du milieu ont été affectés d'un coefficient multiplicateur permettant de normaliser l'aire de chacun d'entre eux à 100 unités d'aire. La présence d'un point isobestique caché ne permet pas de conclure à une conservation de la masse lors de la réaction, mais elle atteste de la conservation qualitative du milieu. En d'autres termes, la présence d'un point isobestique caché indique que le milieu contient les mêmes composés au cours de la réaction mais dans des proportions variables (Pouët *et al.*, 2004 ; Thomas et Cerda, 2007).

2.3. Identification et suivi des sous-produits de chloration

2.3.1. Recherche et identification des sous-produits

Afin de détecter le maximum de composés résultant soit d'une addition de chlore sur la toxine soit de la fragmentation de celle-ci, le LTQ-Orbitrap a été paramétré pour rechercher l'ensemble des ions de m/z compris dans la gamme 150-1500 pour la MC-LR et 60-650 pour la CYL. Les résultats obtenus ont ensuite été analysés par fenêtres de 10 m/z successives.

Pour chaque composé observé, une formule brute est attribuée sur la base du rapport m/z précis fourni par le LTQ-Orbitrap. Cette hypothèse est ensuite soumise à un calcul d'incertitude suivant l'équation 4. Afin que la proposition soit validée, l'incertitude doit alors se révéler inférieure à 5 ppm (Makarov *et al.*, 2006).

$$\text{Incertitude(ppm)} = \frac{m/z_{\text{théorique}} - m/z_{\text{expérimental}}}{m/z_{\text{théorique}}} * 10^6 \quad (4)$$

Afin d'étayer les hypothèses sur l'identité des sous-produits, la MS² a été réalisée sur leur ion moléculaire $[m + H]^+$ à l'aide d'une énergie de collision de 22 % sur l'échelle normalisée 0-400. Pour chaque composé, la cohérence entre la formule brute proposée et les ions fils obtenus est alors examinée.

2.3.2. Examen du massif isotopique

2.3.2.1. Définition du massif isotopique

En spectrométrie de masse, chaque composé peut être observé par l'intermédiaire de son ion $[m + H]^+$. Cependant, en fonction des isotopes des éléments qui le constituent chaque composé forme également les ions $[m + H + n]^+$ dans des proportions spécifiques. Sur le spectre de masse, l'ensemble de ces ions forment un massif au voisinage de l'ion $[m + H]^+$ appelé massif isotopique. La comparaison des massifs isotopiques expérimentaux et théoriques constitue donc un autre moyen d'étayer l'identité des sous-produits de chloration de la MC-LR et de la CYL.

2.3.2.2. Calcul du massif isotopique théorique

Le calcul du massif isotopique d'un composé est réalisé en diverses étapes. La première consiste à établir quels sont les isotopes pouvant être incorporés à la structure du produit afin d'obtenir les ions $[m + H + n]^+$. Par exemple, dans le cas de la MC-LR de formule brute $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$, afin de former l'ion $[m + H + 1]^+$ la toxine doit inclure un des isotopes suivants : ^{13}C , 2H , ^{15}N , ^{17}O .

La seconde étape consiste à calculer l'abondance de chaque composé de masse $m+n$ selon l'équation 5. L'abondance de l'ion $[m + H + n]^+$ est alors égale à la somme des abondances des composés de masse $m+n$.

$$Abondance = \prod A_i * A_{i+n} * C_z^x \quad (5)$$

Avec A_i l'abondance de l'isotope i , A_{i+n} l'abondance de l'isotope $i+n$, et C_z^x le nombre de combinaisons de x isotopes $i+n$ parmi z atomes.

Enfin la troisième étape consiste à normer l'abondance de l'ion majoritaire afin de comparer les massifs isotopiques théoriques et expérimentaux. Dans ce travail, l'abondance de l'ion majoritaire correspond toujours à 100 %.

2.3.3. Suivi des toxines et de leurs sous-produits

Le suivi des toxines et de leurs sous-produits a été réalisé à l'aide du spectromètre de masse Micromass ZQ, comme indiqué auparavant avec une tension de cône fixée à 60 V et 40 V respectivement pour la MC-LR et pour la CYL. Lorsque plusieurs isomères d'un même produit sont détectés, les aires de leurs pics chromatographiques sont sommées puis traitées comme un composé unique.

Cependant, considérant l'absence de standard pour les sous-produits de la chloration, ces derniers ne peuvent être quantifiés de manière absolue. Par conséquent, une approche semi-quantitative est réalisée en formulant l'hypothèse d'une réponse identique du détecteur pour les toxines et leurs sous-produits. Afin de mieux visualiser l'évolution temporelle de chaque composé, les résultats sont exprimés en concentration relative : le pourcentage de l'aire maximale du pic chromatographique atteinte au cours de la chloration.

2.4. Examen de la toxicité du milieu réactionnel

Les premières études portant sur la réaction du chlore avec la MC-LR et la CYL ne prennent en considération que les effets de la chloration sur l'hépatotoxicité du milieu en examinant l'inhibition de la protéine phosphatase ou l'altération du foie chez la souris (Nicholson *et al.*, 1994 ; Tsuji *et al.*, 1997 ; Kull *et al.*, 2004, Banker *et al.*, 2001). Or, si les sous-produits de la réaction ne sont plus hépatotoxiques comme l'étaient les toxines initiales, cela n'implique pas nécessairement qu'ils soient non-toxiques. En effet, l'hypothèse selon laquelle ils pourraient affecter d'autres organes que le foie ne peut être exclue.

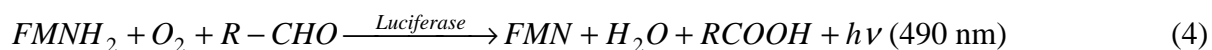
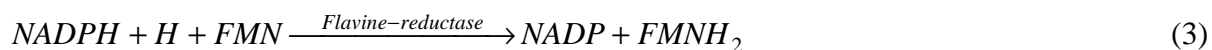
En conséquence, lors de cette étude, la toxicité avant et après chloration de la MC-LR et de la CYL est estimée à travers la mise en œuvre de 3 tests différents (Microtox, MTT et rouge neutre) et non spécifiques aux modes d'action des toxines initiales. D'une part, le test microtox a été envisagé car il est fréquemment mis en œuvre au LERES et représente un moyen simple et rapide (environ 2 heures) d'obtenir une première approche de la toxicité d'une solution. De plus, Microtox a déjà été appliqué à la problématique « cyanobactéries, cyanotoxines et eau alimentaire » lors d'une étude portant sur l'élimination des cyanobactéries par un procédé d'ozoflottation (Benoufella *et al.*, 1995). D'autre part, les tests MTT et rouge neutre ont été envisagés et réalisés dans le cadre d'un accord avec l'unité de toxicologie de l'AFSSA de Fougères qui bénéficie du savoir-faire et du matériel nécessaire. De la même manière que pour Microtox, ces deux tests de réalisation relativement aisée ne

sont pas spécifiques aux modes d'action de la MC-LR ni de la CYL et permettent d'obtenir des résultats en 48 heures. De plus, leur mise en oeuvre sur des cellules Caco-2 (cellules intestinales humaines) permet d'étudier la toxicité du milieu, non pas sur des cellules hépatiques, mais sur d'autres cellules humaines potentiellement exposées aux cyanotoxines chlorées lors de l'ingestion d'eau alimentaire (Puerto *et al.*, 2008).

2.4.1. Le test Microtox

2.4.1.1. Principe

La bioluminescence bactérienne est attribuable au système luciférine-luciférase codé par un groupe de gènes appelé opéron Lux. Chez la bactérie *Vibrio fischeri*, 5 gènes (*LuxCDABE*) sont directement impliqués dans l'émission de lumière visible et deux autres (*LuxRI*) sont impliqués dans la régulation de l'opéron Lux. Au sein de la cellule, la luminescence est produite par le biais des réactions 3 et 4. La flavine mononucléotide (FMN) est réduite en FMNH₂ en présence de NADPH et de flavin reductase. En présence de luciférase, d'oxygène et d'aldéhyde, l'oxydation de la FMNH₂ en FMN s'accompagne d'une émission de lumière à une longueur d'onde de 490 nm (Parvez *et al.*, 2006).



Néanmoins, chez *Vibrio fischeri* la luminescence ne peut être observée qu'à partir d'une certaine taille de population car la transcription des gènes impliqués est induite par « corum sensing » (Dunlap, 1999). De plus, des facteurs externes peuvent également modifier l'intensité de la luminescence. Par exemple, l'accroissement de l'osmolarité ou de la teneur en aldéhyde (substrat de la luciférase) augmente la luminescence de la bactérie (Stabb *et al.*, 2004).

Lorsqu'une substance interfère avec les réactions métaboliques conduisant à l'émission de lumière ou en altère la régulation, la luminescence de *Vibrio fischeri* est modifiée. Par conséquent, après un certain temps de contact avec la bactérie, le calcul d'un facteur d'inhibition de la luminescence permet donc d'apprécier le potentiel toxique d'un composé ou d'une solution (ISO 11348-3).

2.4.1.2. Mise en œuvre

La mise en œuvre du test Microtox est illustrée sur la figure 36. En raison de l'important volume d'échantillon nécessaire (2500 μL), le test Microtox a été réalisé à l'aide d'une solution de toxine à 20 μM diluée au 1/10 et la relation dose-réponse n'a pas été étudiée. De plus, le chlore montrant une forte activité toxique sur *V. fischeri*, chaque échantillon de toxine chlorée a donc été traité au nitrite de sodium. Puis 250 μL de solution OAS, nécessaire pour assurer une pression osmotique compatible avec l'activité métabolique des bactéries utilisées pour le test, ont été ajoutés.

En parallèle, des cellules de *V. fischeri* fraîchement réhydratées et diluées au 1/10 sont réparties dans diverses cuves Microtox. La mesure de la luminescence avant et après exposition des bactéries ainsi qu'un témoin non toxique (solution de dilution des bactéries réhydratées, SDBR) permettent alors de calculer un facteur d'inhibition H reflétant la toxicité du milieu.

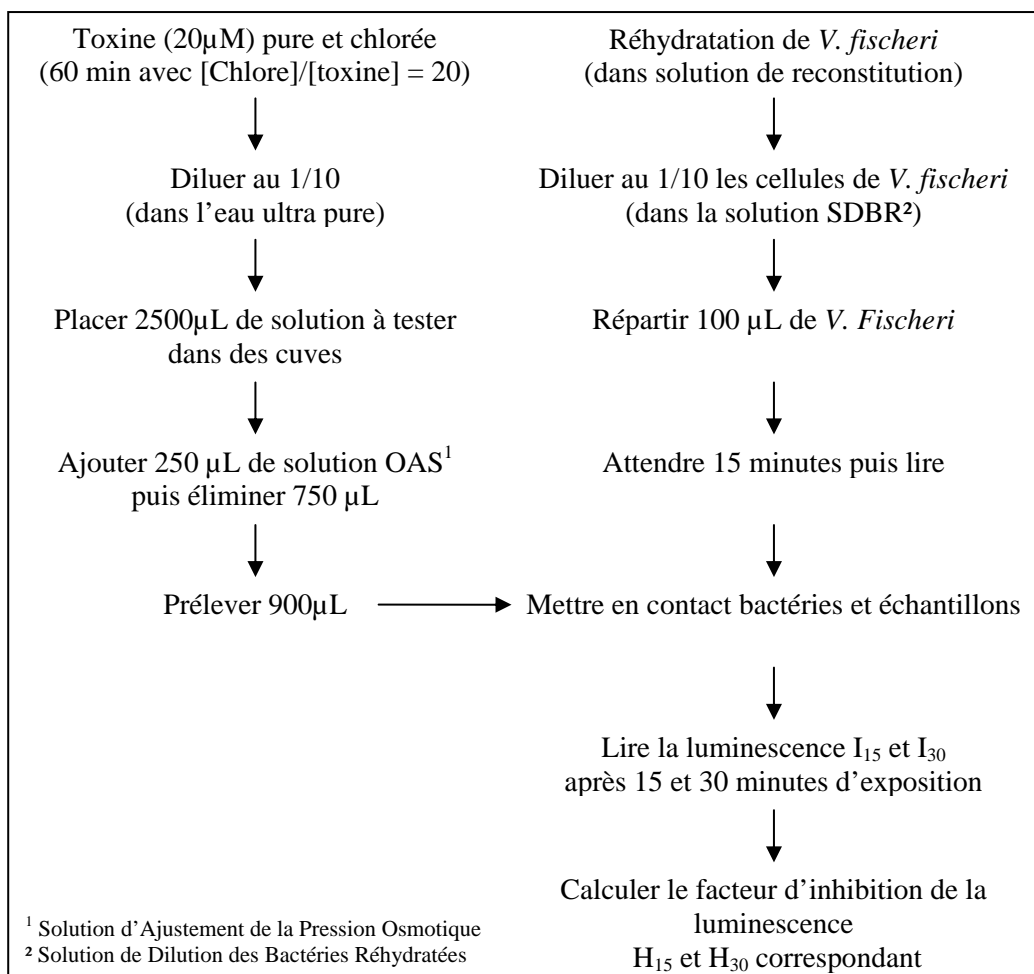


Figure 36 : Synoptique de mise en œuvre du test Microtox

2.4.1.3. Calcul du facteur d'inhibition de la luminescence

Préalablement au calcul du facteur d'inhibition au temps t (H_t), un facteur correctif (f_{kt}) doit être déterminé afin de prendre en compte la variation naturelle de luminescence dans l'échantillon témoin non toxique (solution SDBR). Lorsque l'on nomme I_0 et I_t respectivement l'intensité lumineuse initiale et après un temps d'exposition t , les facteurs f_{kt} et H_t peuvent alors être obtenus grâce aux équations 6 et 7.

$$f_{kt} = I_t \text{ témoin} / I_0 \text{ témoin} \quad (6)$$

$$H_t = [(I_0 \text{ échantillon} * f_{kt}) - I_t \text{ échantillon}] / (I_0 \text{ échantillon} * f_{kt}) \quad (7)$$

Lors de chaque test Microtox, un triplicat est réalisé pour tous les échantillons. De plus, des solutions de contrôle (Zn^{2+} à 4 mg/L et Cr VI à 50mg/L) dont le facteur d'inhibition est connu (60% pour l'ion Zn^{2+} et 80% pour le Cr VI après 30 minutes de contact avec *V. fischeri*) sont également analysées, afin de garantir la fiabilité des manipulations (ISO 11348-3). Enfin, chaque expérimentation est répétée 3 fois.

2.4.2. Le test MTT

2.4.2.1. Principe

La mitochondrie étant impliquée dans la respiration cellulaire et la production d'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule (via le cycle de Kreps et la production d'ATP), l'activité mitochondriale est donc révélatrice de la viabilité cellulaire. En mesurant l'activité mitochondriale de cellules exposées à une molécule donnée, le test MTT permet alors de déterminer la cytotoxicité de celle-ci. En effet, la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes permet la transformation du MTT de couleur jaune en cristaux de formazan violet. L'absorbance du milieu à 570 nm est alors proportionnelle à la quantité de formazan formé et donc au nombre de cellules viables.

2.4.2.2. Mise en œuvre

La mise en œuvre du test MTT est illustrée sur la figure 37. Comme mentionné auparavant, le test MTT est réalisé sur la base d'une solution de toxine à 40 μ M. Une dilution

dans le milieu de culture cellulaire permet alors de tester la cytotoxicité d'un mélange à 5, 10, 15 et 20 μM de toxine pure ou chlorée durant 60 minutes (tableau 7). De plus, différents échantillons témoins sont également testés afin de soustraire la toxicité de la matrice.

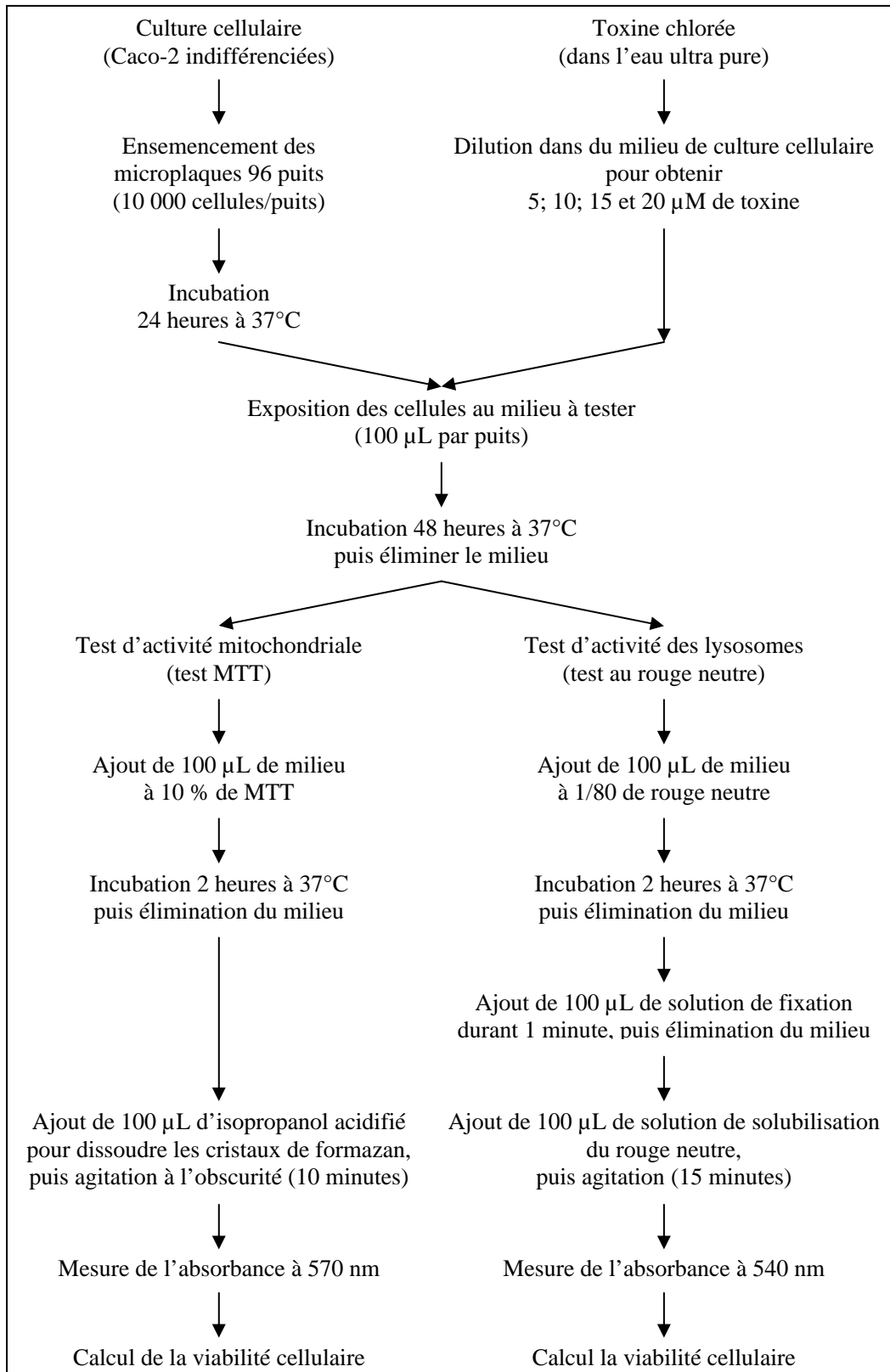


Figure 37 : Synoptique de mise en oeuvre des tests MTT et rouge neutre

Tableau 7 : Echantillons soumis aux tests MTT et rouge neutre

Concentration en toxine testée	Témoins			Toxines			
	Négatif	Effet matrice		MC-LR (40 µM)		CYL (40 µM)	
	Milieu de culture	Mélange ¹ Eau/Méthanol	Mélange ² Chlore/Nitrite	Avant chloration	Après chloration	Avant chloration	Après chloration
5 µM	<i>Dilution N.A.</i>	<i>Dilution au 1/8</i>	<i>Dilution au 1/8</i>	<i>Dilution au 1/8</i>	<i>Dilution au 1/8</i>	<i>Dilution au 1/8</i>	<i>Dilution au 1/8</i>
10 µM	<i>Dilution N.A.</i>	<i>Dilution au 1/4</i>	<i>Dilution au 1/4</i>	<i>Dilution au 1/4</i>	<i>Dilution au 1/4</i>	<i>Dilution au 1/4</i>	<i>Dilution au 1/4</i>
15 µM	<i>Dilution N.A.</i>	<i>Dilution au 3/8</i>	<i>Dilution au 3/8</i>	<i>Dilution au 3/8</i>	<i>Dilution au 3/8</i>	<i>Dilution au 3/8</i>	<i>Dilution au 3/8</i>
20 µM	<i>Dilution N.A.</i>	<i>Dilution au 1/2</i>	<i>Dilution au 1/2</i>	<i>Dilution au 1/2</i>	<i>Dilution au 1/2</i>	<i>Dilution au 1/2</i>	<i>Dilution au 1/2</i>

¹ dans les mêmes proportions que pour la solution de MC-LR à 40 µM

² dans les mêmes proportions que pour les solutions de toxines à 40 µM chlorées

Des microplaques de 96 puits sontensemencées avec des cellules Caco-2 (10 000 cellules/puits) puis placées dans l'incubateur à 5 % de CO₂ et à 37°C pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite exposées à 100 µL de milieu à tester puis replacées dans l'incubateur pendant 48 heures. Après avoir vidé les puits, les cellules Caco-2 sont alors mises au contact du MTT pendant 2 heures à 37°C. Les cristaux de formazan formés sont ensuite dissous et la mesure de l'absorbance à 570 nm permet de calculer la viabilité cellulaire (équation 8). Les résultats sont alors des données relatives obtenues en considérant une viabilité cellulaire de 100 % dans le témoin négatif (milieu de culture cellulaire).

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = [\text{Absorbance échantillon} / \text{Absorbance témoin négatif}] * 100 \quad (8)$$

En formulant l'hypothèse d'additivité des effets toxiques de la matrice et du mélange des autres composés présents dans le milieu testé, il est possible d'estimer la toxicité propre à la MC-LR, à la CYL et à leurs sous-produits. Pour chaque échantillon, il suffit alors de retrancher la toxicité de la matrice. Après chloration, cette méthode ne reflète que la toxicité du mélange de sous-produits et non pas leur toxicité individuelle. Néanmoins, l'objectif de ce travail n'est pas de détailler la toxicité de chaque composé mais bien la toxicité du mélange auquel le consommateur d'eau alimentaire sera exposé.

Enfin, de même que pour le test Microtox, au cours d'une expérimentation chaque échantillon est analysé trois fois. De plus, trois expériences indépendantes ont été réalisées.

2.4.3. Le test rouge neutre

2.4.3.1. Principe

Les lysosomes étant impliqués dans l'élimination des déchets produits lors du fonctionnement de la cellule, l'activité lysosomale est révélatrice de la viabilité cellulaire. De ce fait, en mesurant l'activité lysosomale de cellules exposées à une molécule donnée, le test rouge neutre permet de déterminer la cytotoxicité de cette dernière. En effet, le rouge neutre est un colorant lipophile pouvant traverser librement la membrane cellulaire pour être accumulé et piégé dans les lysosomes. Le degré de fixation du marqueur dépend alors du pH du lysosome et de l'efficacité de sa pompe à protons (Segien, 1983). Afin de connaître la quantité de rouge neutre fixé et donc la viabilité cellulaire, les cellules sont lysées et la coloration du milieu (proportionnelle au nombre de cellules viables) est mesurée par l'intermédiaire de l'absorbance à 540 nm.

2.4.3.2. Mise en œuvre

La mise en œuvre du test rouge neutre est illustrée sur la figure 37. Après une préparation des microplaques et du milieu à tester identique au test MTT, les cellules Caco-2 sont exposées aux toxines et à leurs sous-produits (100 µL de milieu par puits) pendant 48 heures à 37°C. Après avoir vidé les puits, les cellules sont mises au contact de 100 µL de milieu de culture à 1/80 de rouge neutre pendant 2 heures à 37°C puis 100 µL de solution de fixation pendant 1 minute. Elles sont ensuite lysées par la solution de solubilisation du rouge neutre. La viabilité cellulaire est alors déduite de l'absorbance à 540 nm selon la même équation que pour le test MTT.

CHAPITRE III

Chloration de la Microcystine-LR

La chloration de la MC-LR a été abordée à travers une succession d'étapes : suivi des réactifs et du spectre UV du milieu réactionnel, caractérisation des sous-produits, étude de l'effet de la dose de chlore sur la réaction, examen de la toxicité résiduelle. Ce chapitre détaille chronologiquement chacune d'elles.

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication (Annexe II) intitulée « MS identification of microcystin-LR chlorination by-products » parue dans la revue *Chemosphere*.

Les résultats portant sur la toxicité de la MC-LR et de la CYL chlorées seront valorisés conjointement dans une publication actuellement en cours de rédaction.

1. SUIVI DES REACTIFS ET DU SPECTRE UV

Le suivi des réactifs et du spectre UV du milieu constitue la première phase de l'étude de la chloration de la MC-LR. Chacun de ces points permet de mieux cerner le développement des réactions mises en jeu, par exemple grâce au calcul de constantes cinétiques.

1.1. Suivi des réactifs

1.1.1. Suivi des différentes formes de chlore

Le suivi du chlore a deux objectifs principaux : estimer l'échelle de temps sur laquelle se déroule la réaction avec la MC-LR pour un monitoring optimal de la toxine et des sous-produits par LC-MS, et déterminer la quantité de chlore consommé pour une meilleure compréhension des réactions mises en jeu.

Dans un premier temps, un simple suivi du chlore libre réalisé sur 6 heures permet d'établir un intervalle optimal pour le suivi détaillé du chlore libre et total (rappelons qu'au pH de la réaction le chlore libre englobe HOCl et ClO⁻ tandis que le chlore total comprend également le chlore engagé sur diverses structures mais déplaçable par le KI). Comme le présente la figure 38, la concentration en chlore libre diminue fortement durant la première heure et passe de 410 µM à 190 µM. La concentration constante de l'agent oxydant au-delà de ce délai indique que la réaction peut être considérée comme achevée. Par conséquent, lors de la suite des expérimentations le monitoring de la chloration de la MC-LR ne sera réalisé qu'entre 0 et 60 minutes après la mise en contact des réactifs.

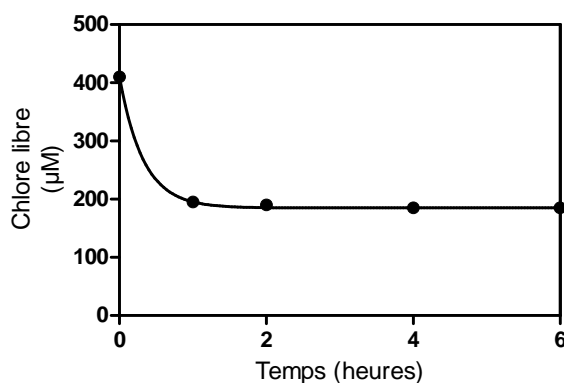


Figure 38 : Suivi du chlore libre entre 0 et 6 heures lors de la chloration de la MC-LR

La consommation du chlore par la MC-LR peut être reflétée directement par l'évolution des concentrations en chlore libre et total mesurées tout au long de la réaction. Cependant, afin de faciliter la lecture et l'interprétation des données, on préfère généralement exprimer les résultats sous forme de demande en chlore et d'évolution du chlore combiné. La demande en chlore exprimée en mole/mole représente alors le nombre de moles de chlore consommées par une mole de toxine en fonction du temps. Quant au chlore combiné (chlore engagé sur des structures organiques ou minérales mais déplaçable par le KI), il peut être calculé par la différence entre le chlore libre et le chlore total.

Dans les conditions expérimentales précisées au chapitre précédent, la MC-LR se caractérise par une demande en chlore de 12,6 mole/mole satisfaite en 30 minutes. Comme le présente la figure 39a, le chlore libre est principalement consommé lors des 15 premières minutes de la réaction. En effet, à ce moment chaque mole de toxine a réagi avec environ 10 moles d'agent désinfectant. La consommation de chlore libre ralentit alors fortement puis s'annule après 30 minutes.

La chloration de la MC-LR induit également la formation de chlore combiné, comme le montre la figure 39b. La concentration de celui-ci augmente immédiatement après le début de la réaction puis atteint un maximum à 53 μM au bout de 10 minutes. La quantité de chlore combiné dans le milieu diminue ensuite progressivement jusqu'à ce qu'il soit mis fin au suivi de la réaction, 60 minutes après la mise en contact des réactifs.

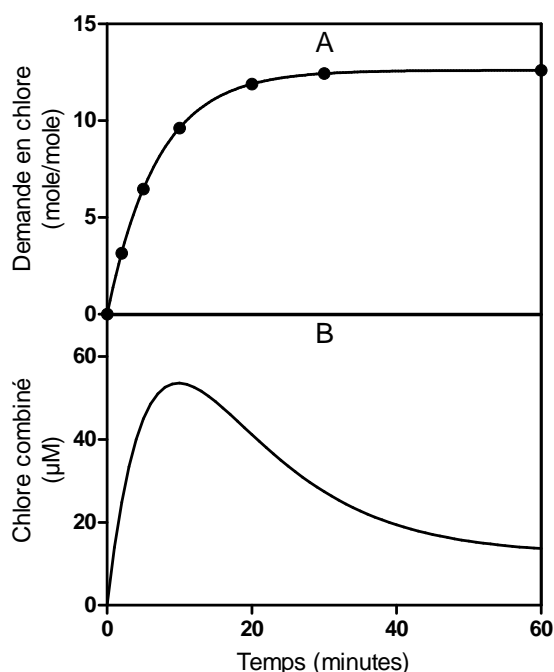


Figure 39 : Demande en chlore de la MC-LR (A), et évolution du chlore combiné (B)

1.1.2. Suivi de la microcystine-LR

Comme le montre la figure 40, en spectrométrie de masse, le suivi de la MC-LR a été réalisé grâce au signal du rapport m/z 995,5. Ce dernier correspond à l'ion moléculaire $[m + H]^+$ de la toxine.

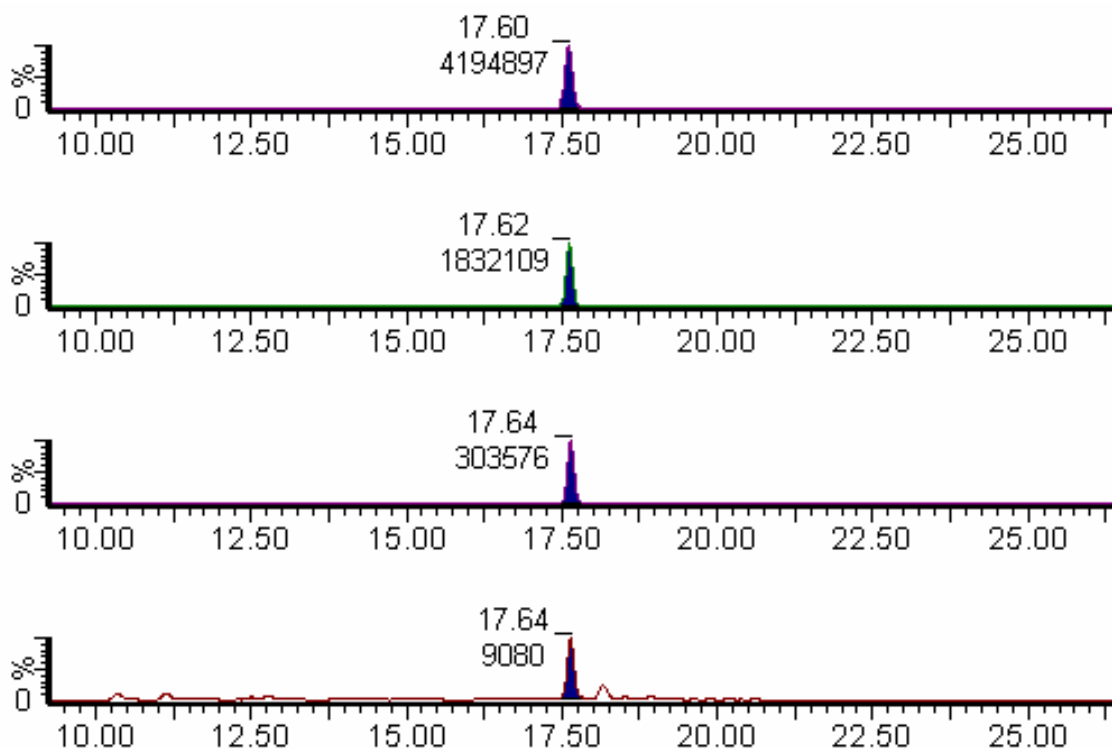


Figure 40 : Chromatogrammes de m/z 995,5 et aire du signal de la MC-LR après 0, 1, 2 et 5 minutes de chloration (respectivement de haut en bas)

La concentration en MC-LR dans le milieu réactionnel diminue très fortement dès l'ajout du chlore, comme le montre la figure 41. En effet, l'aire du signal chromatographique de la toxine (4194897 unités d'aire avant chloration) n'est plus que de 303576 et de 9080 unités d'aire au bout de 2 et 5 minutes après le début de la réaction, ce qui traduit respectivement une quantité de MC-LR résiduelle de seulement 7% et 0,2%. Enfin, après 30 minutes, lorsque la demande en chlore de la solution est satisfaite, la transformation de la toxine est supérieure à 99,9 %.

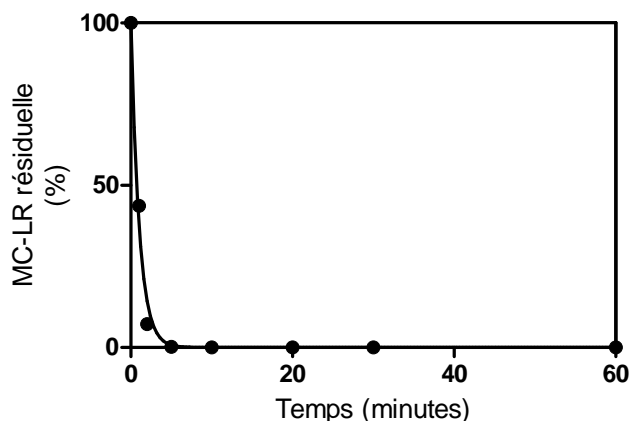


Figure 41 : Evolution de la concentration résiduelle en MC-LR

D'autre part, après 5 minutes de réaction, des signaux proches du bruit de fond apparaissent en plus de l'ion moléculaire de la MC-LR (figure 40). Cela laisse alors entrevoir l'existence de sous-produits de la toxine pouvant être en partie fragmentés en ions de rapport m/z 995,5.

1.1.3. Cinétique de la réaction

Le chlore étant en large excès par rapport à la MC-LR, l'hypothèse peut être faite que la réaction suit une cinétique de premier ordre par rapport à la toxine, telle que l'exprime l'équation 1 rappelée ci-dessous.

$$\text{Ln} \frac{[\text{toxine}]_t}{[\text{toxine}]_0} = -k \cdot t \quad (1)$$

Où $[\text{toxine}]_t$, $[\text{toxine}]_0$, k et t représentent respectivement la concentration en toxine au temps t (exprimée en M), la concentration initiale en toxine (exprimée en M), la constante cinétique de premier ordre (exprimée en s^{-1}), le temps de contact (exprimé en s).

La représentation de l'équation 1 sur la figure 42 se traduit par un ensemble de points alignés sur une droite de pente -0,016. Par conséquent, l'hypothèse d'une cinétique de premier ordre par rapport à la MC-LR est vérifiée et les conditions expérimentales explicitées au chapitre précédent peuvent être associées à une constante cinétique de $1,6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

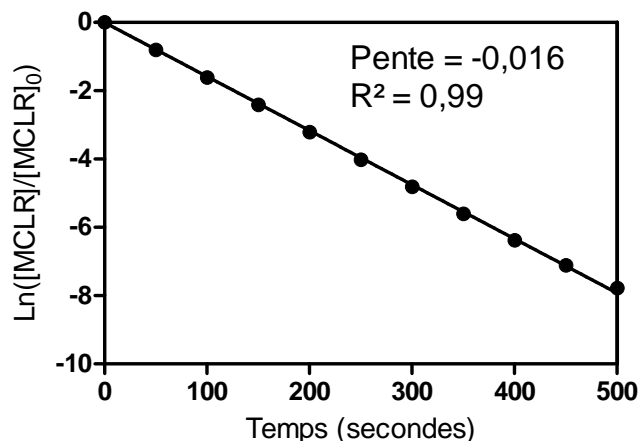


Figure 42 : Représentation de l'équation de cinétique de premier ordre pour la transformation de la MC-LR

1.1.4. Discussion

Conformément aux études antérieures (Nicholson *et al.*, 1994 ; Newcombe et Nicholson, 2004), la MC-LR est efficacement transformée lors de la chloration et sa concentration dans le milieu diminue rapidement. Néanmoins, il est important de noter qu'un délai de 30 minutes est nécessaire afin de satisfaire la demande en chlore de la toxine et d'achever la réaction. De plus, la consommation d'oxydant bien après la transformation totale de la toxine initiale et la demande en chlore élevée (12 mole/mole) semblent indiquer que la transformation de la MC-LR suit un schéma complexe englobant de multiples réactions.

Tout d'abord, la demande en chlore expérimentale d'environ 12 mole/mole est cohérente avec la valeur théorique déterminée selon la méthode explicitée par Hureiki *et al.* (1994). En effet, la demande en chlore d'un peptide peut être estimée selon une méthode simple comportant 2 étapes. La première étape consiste à additionner la demande en chlore individuelle de chaque acide aminé composant le peptide. La seconde étape consiste alors à retrancher 2 pour chaque liaison peptidique de la molécule étudiée car celles-ci sont résistantes à la chloration (Hureiki *et al.*, 1994 ; Nightingale *et al.*, 2000). En appliquant cette méthode (les demandes en chlore des acides aminés communs ont été établies par Hureiki *et al.* (1994)) et en considérant que l'acide aminé Adda réagit avec 4 moles de chlore (en raison du diène conjugué), la MC-LR aurait une demande en chlore théorique de 14 mole/mole. Cette cohérence entre les valeurs théorique et expérimentale suggère que les liaisons peptidiques de la MC-LR ne seraient pas vulnérables au chlore. Par conséquent, celles-ci ne peuvent être envisagées comme des sites propices à une potentielle fragmentation de la toxine.

L'arginine peut être considéré comme le principal site réactif de la MC-LR. En effet, sous forme individuelle, cet acide aminé possède une demande en chlore de 8 mole/mole, soit 6 mole/mole lorsqu'il est incorporé dans un peptide. En d'autres termes, l'arginine pourrait être à l'origine de la moitié de la demande en chlore de la MC-LR car les nombreuses liaisons N-H et doubles liaisons qu'il renferme sont très réactives.

D'autre part, la cinétique de premier ordre vis-à-vis de la transformation de la MC-LR est en accord avec l'étude d'Acero *et al.* (2005). Cependant, la constante cinétique rapportée ici est environ 5 fois supérieure à celle rapportée par Acero *et al.* (2005) dans des conditions similaires de pH, température et de ratio molaire R [chlore]/[toxine]. Cette différence peut s'expliquer en ne considérant non plus le ratio R mais la concentration en chlore environ 10 fois plus élevée dans notre étude.

Enfin, la probabilité d'un fractionnement de la MC-LR étant réduite en raison de la stabilité des liaisons peptidiques, les sous-produits de chloration envisagés consisteraient donc davantage en une fixation de chlore sur la toxine initiale qu'en sa fragmentation. Cette hypothèse semble alors étayée par la formation de chlore combiné et par la détection de signaux autres que celui de la MC-LR pour un ratio m/z 995,5 (figure 40). Ces derniers seraient en effet attribuables à des ions minoritaires issus de la fragmentation (dans la chaîne analytique) des ions moléculaires $[m + H]^+$ de sous-produits de chloration d'une masse supérieure à celle de la toxine.

1.2. Suivi du spectre UV du milieu réactionnel

1.2.1. Examen des spectres UV bruts

L'évolution de la forme du spectre UV du milieu réactionnel au cours du temps est un élément susceptible d'apporter des informations utiles pour mieux appréhender les réactions chimiques entre divers composés. En particulier, la disparition ou l'apparition des maxima d'absorbance à certaines longueurs d'onde renseignent efficacement quant à la consommation des réactifs et à la formation des sous-produits. Le suivi de l'absorbance à ces longueurs d'onde constitue alors un outil efficace pour le monitoring de la réaction.

Comme le présente la figure 43a, la chloration de la MC-LR induit la disparition rapide du maximum d'absorbance à 240 nm, mais aucun autre maximum n'apparaît en contrepartie. Par conséquent, si la formation des sous-produits de chloration ne peut être mise

en évidence directement à travers le spectre UV du milieu réactionnel, l'absorbance à 240 nm est un bon indicateur de la transformation de la toxine. En effet, l'évolution de la MC-LR résiduelle calculée à partir de l'absorbance à 240 nm (figure 44) a un profil similaire à celui obtenu par LC-MS. Dans chacun des cas, la majeure partie de la toxine réagit durant les 5 premières minutes et les constantes cinétiques de premier ordre sont similaires. Néanmoins, l'absorbance à 240 nm ne s'annule pas mais se stabilise à 0,13 unité d'absorbance, ce qui implique une surestimation du reliquat de toxine dans le milieu. A l'issue de la transformation de la MC-LR, l'absorbance résiduelle doit alors être attribuée à la présence d'un mélange de sous-produits dans le milieu réactionnel.

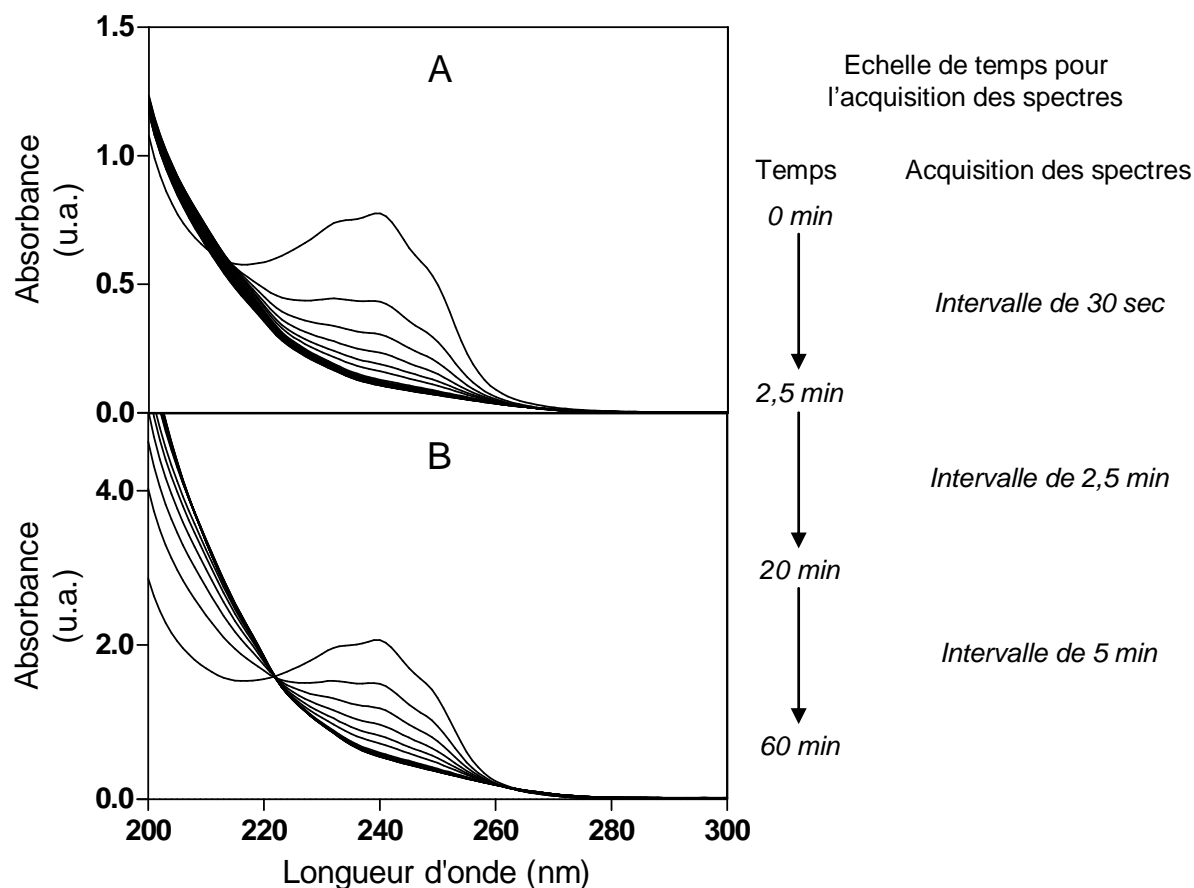


Figure 43 : Spectres UV bruts (A) et normés (B) du milieu réactionnel durant la chloration de la MC-LR (décroissance chronologique du maximum à 240 nm)

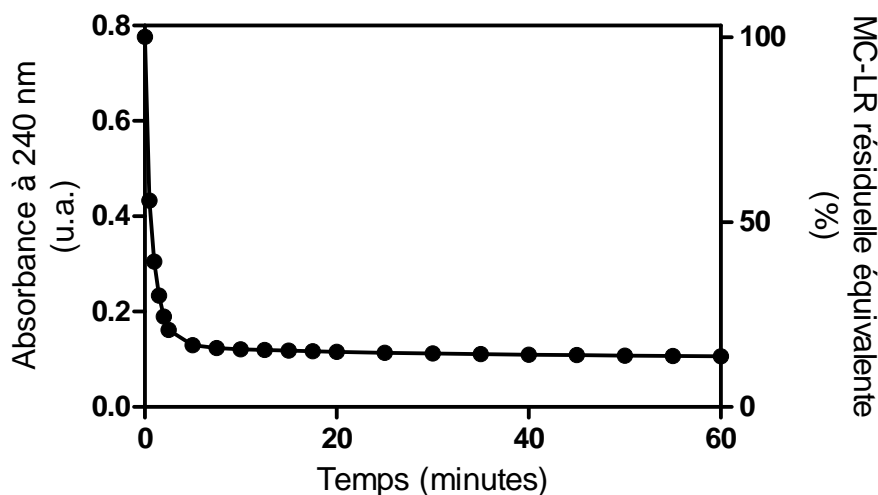


Figure 44 : Evolution de l'absorbance à 240 nm et de la quantité de MC-LR résiduelle équivalente

1.2.2. Recherche des points isobestiques

La superposition des spectres UV bruts ne permet pas précisément l'observation directe de points isobestiques. Par conséquent, il n'est pas possible d'affirmer que la chloration de la MC-LR implique une conservation de la masse dans l'échantillon. Cependant, deux zones particulières peuvent être distinguées sur la figure 43a. En effet, l'ensemble des spectres acquis tout au long de la réaction convergent aux environs de 215 nm et 270 nm sans toutefois s'intercepter (hormis avec le spectre de la toxine initiale autour de 215 nm). Cette observation laisse donc entrevoir l'existence de points isobestiques cachés.

Comme le montre la figure 43b, la normalisation des spectres (aire égale à 100 unités d'aire) met en évidence l'existence de 2 points isobestiques cachés : le premier à 222 nm et le second à 262 nm. On remarque que ces deux points impliquent bien l'ensemble des spectres enregistrés au cours de la réaction, y compris celui de la MC-LR initiale. Par conséquent, l'hypothèse de la conservation qualitative du milieu lors de la chloration de la toxine est validée (Pouët *et al.*, 2004 ; Thomas *et al.*, 2007).

1.2.3. Discussion

L'examen des spectres UV bruts ne donne a priori aucun élément sur la formation des sous-produits de chloration de la MC-LR car aucune variation autre que la disparition du maximum à 240 nm n'est observable. Cependant, la disparition du maximum en elle-même apporte une première information quant à la nature des résidus de la toxine. En effet, ce

maximum et ses 3 épaulements sont caractéristiques d'un diène conjugué (Forbes *et al.*, 1964 ; Denney et Sinclair, 1987 ; Saltiel *et al.*, 2001). La diminution rapide de l'absorbance à 240 nm indique donc que le seul diène conjugué de la MC-LR, situé sur l'acide aminé Adda, semble une cible privilégiée pour l'action du chlore. Cette considération est alors cohérente avec la formation de dihydroxy-microcystine évoquée dans la bibliographie (Tsuji *et al.*, 1997).

De la même manière, la spectrophotométrie UV pourrait permettre de vérifier si le chlore altère également le cycle aromatique de la MC-LR. En effet, les cycles aromatiques génèrent un maximum d'absorbance aux environs de 260 nm mais leur coefficient d'extinction molaire est nettement plus faible que celui des diènes conjugués. Dans ces conditions, la quantité de MC-LR nécessaire à l'observation du maximum lié au cycle benzénique de la toxine est incompatible avec la pratique.

2. ETUDE DES SOUS-PRODUITS DE CHLORATION

L'étude des sous-produits de chloration de la MC-LR se décompose en deux étapes, l'examen des sous-produits déjà identifiés dans la littérature puis l'identification de nouveaux composés.

2.1. Examen des sous-produits identifiés dans la littérature

2.1.1. La dihydroxy-microcystine

Selon les masses atomiques publiées par Audi et Wapstra (1995), la dihydroxy-microcystine de formule brute $C_{49}H_{76}N_{10}O_{14}$ identifiée par Tsuji *et al.* (1997) est caractérisée par un ion moléculaire de rapport m/z théorique 1029,5620694. Après 2 minutes de réaction, le chromatogramme du rapport m/z 1029,5 (figure 45) met en évidence un ensemble de 8 signaux correspondant à autant d'isomères de ce sous-produit, ainsi que 3 autres signaux examinés plus tard. Le spectre de masse en FTMS des isomères de dihydroxy-microcystine (figure 46) présente deux rapports m/z majoritaires : le m/z 1029,560 correspondant à l'ion $[m + H]^+$ avec une erreur de 2 ppm, et le m/z 506,278 correspondant à l'ion $[m + 2H - H_2O]^{2+}$.

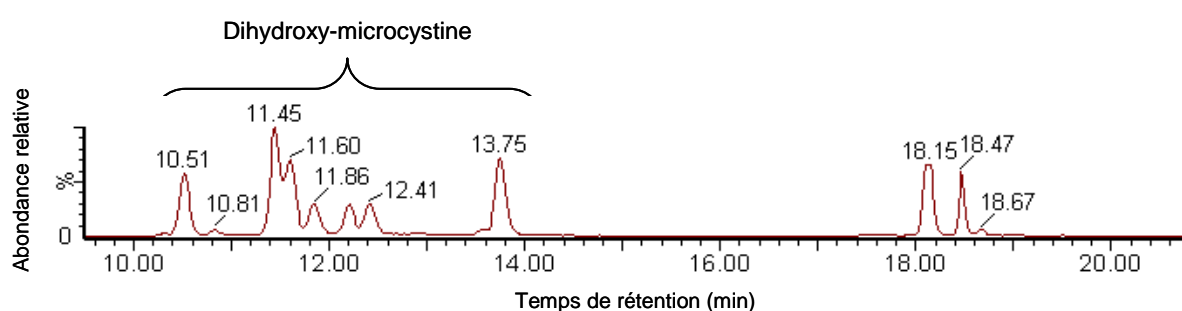


Figure 45 : Chromatogramme du rapport m/z 1029,5 après 2 minutes de chloration (dihydroxy-microcystine)

Les analyses en MS^2 réalisées sur l'ion moléculaire m/z 1029,560 sont également en accord avec la théorie de la dihydroxy-microcystine. En effet, le spectre MS^2 présenté sur la figure 47 met en évidence la formation de 2 ions fils : m/z 1011,6 et m/z 993,6 (les autres décimales ne sont pas considérées car il ne s'agit pas de FTMS) respectivement associés à la perte d'une et deux molécules d'eau, et compatibles avec la présence de 2 groupements hydroxyle sur l'acide aminé Adda.

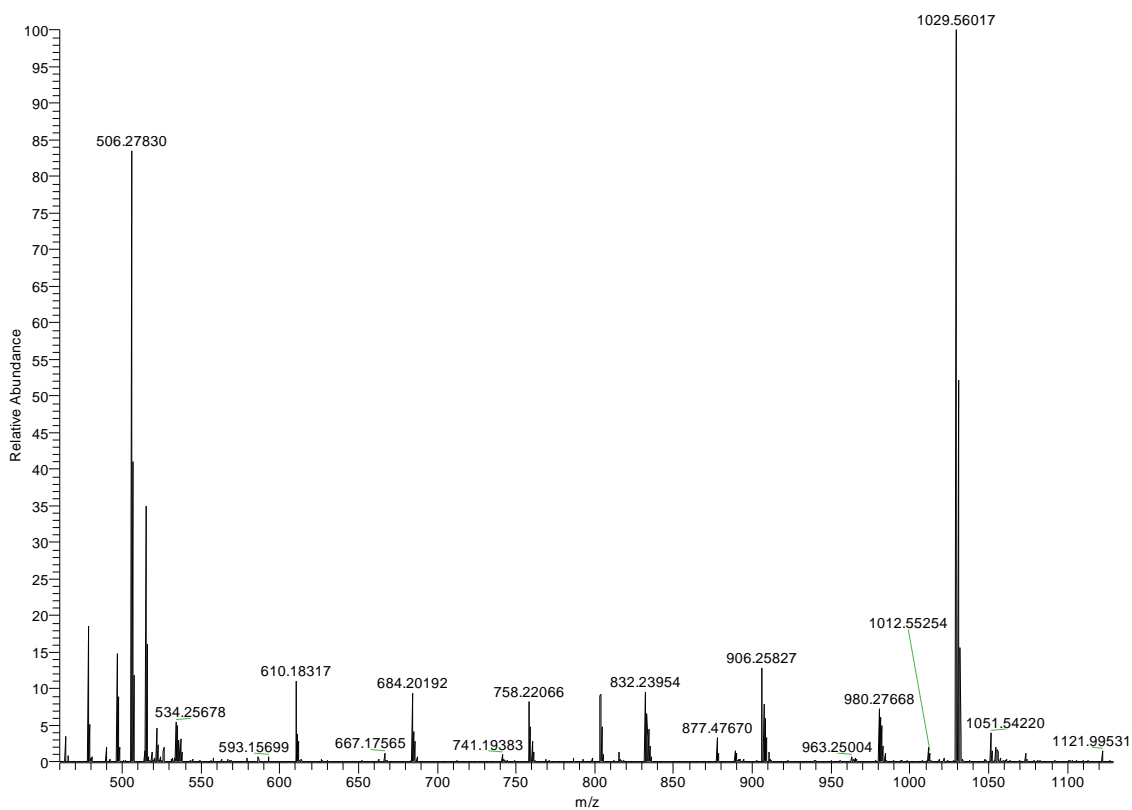


Figure 46 : Spectre de masse en FTMS de la dihydroxy-microcystine

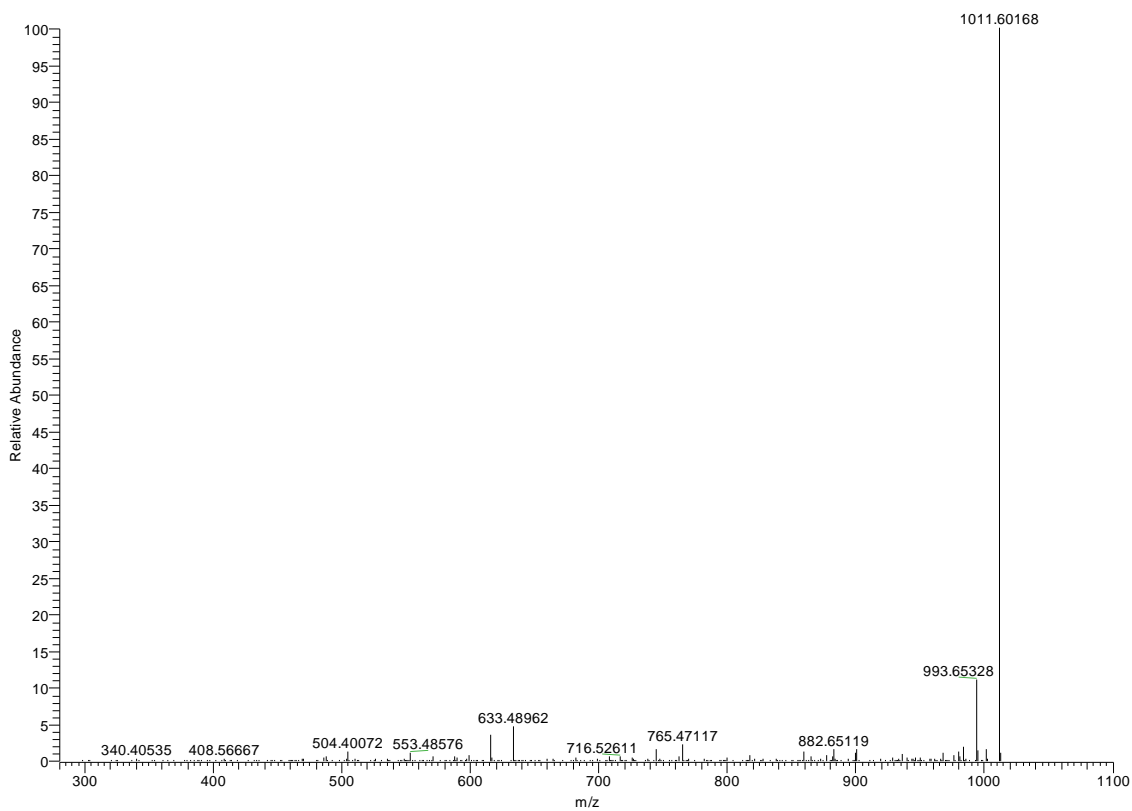


Figure 47 : Spectre MS² de la dihydroxy-microcystine sur le rapport m/z 1029,560

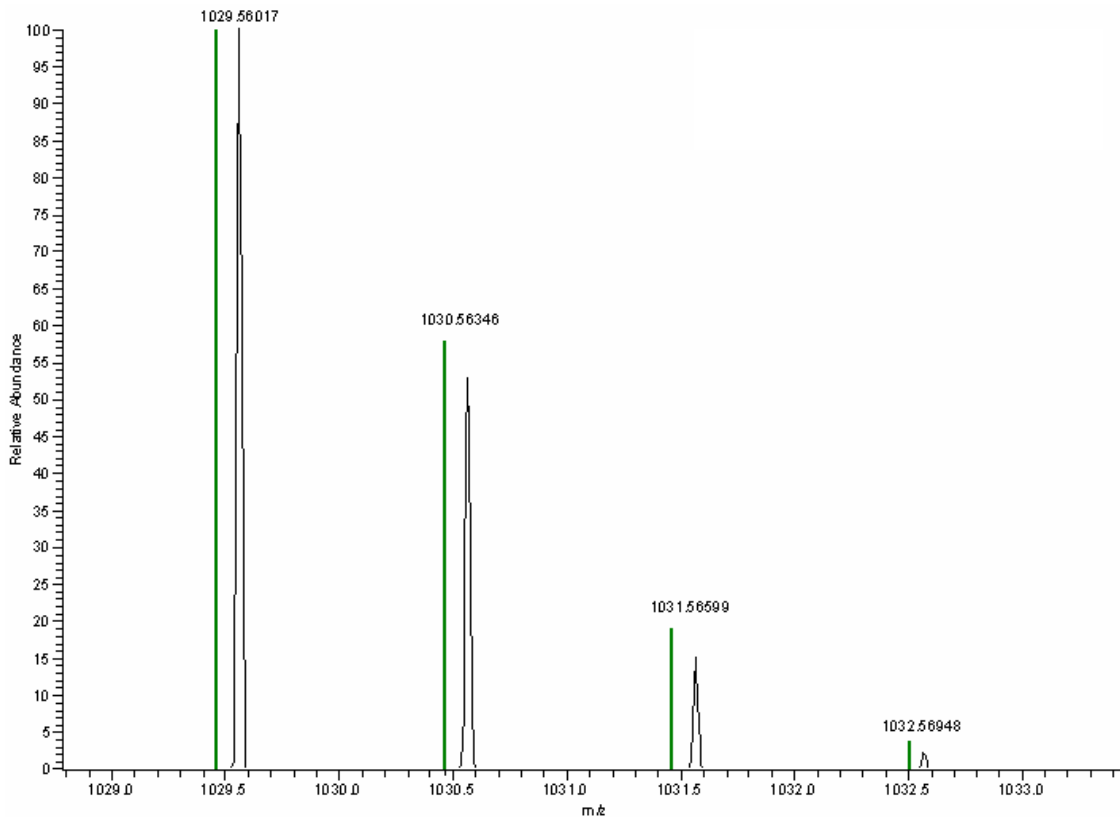


Figure 48 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la dihydroxy-microcystine

Enfin, la correspondance entre le massif isotopique théorique et les résultats expérimentaux (figure 48) tend également à confirmer que les 8 composés observés sur le chromatogramme (figure 45) sont bien des isomères de dihydroxy-microcystine.

2.1.2. La dihydroxy-microcystine hydratée

L'hypothèse de la dihydroxy-microcystine hydratée de formule brute $C_{49}H_{78}N_{10}O_{15}$ a été formulée par Kull *et al.* (2004) après avoir observé un signal correspondant au rapport m/z 1047. Après 2 minutes de chloration, le chromatogramme du rapport m/z 1047 (figure 49) met en évidence 5 signaux clairement définis entre 14 et 17 minutes de temps de rétention.

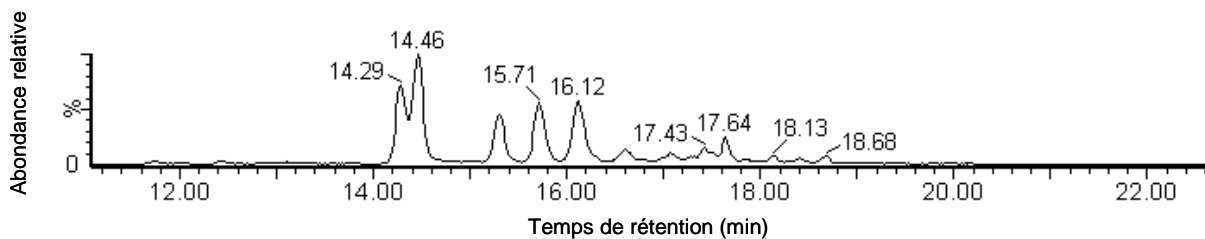


Figure 49 : Chromatogramme du rapport m/z 1047 après 2 minutes de chloration

Le spectre de masse (figure 50) de ces sous-produits obtenu en FTMS indique majoritairement la présence des ions moléculaires dichargé et monochargé : $[m + 2H]^{2+}$ pour m/z 524,267 et $[m + H]^+$ pour m/z 1047,526. Cependant, le calcul de l'erreur par rapport au m/z théorique 1047,572636 (Audi et Wapstra 1995) donne un résultat de 44 ppm. Or, comme mentionné au chapitre matériels et méthodes, l'hypothèse de la dihydroxy-microcystine hydratée est incompatible avec une telle erreur sur la masse du composé.

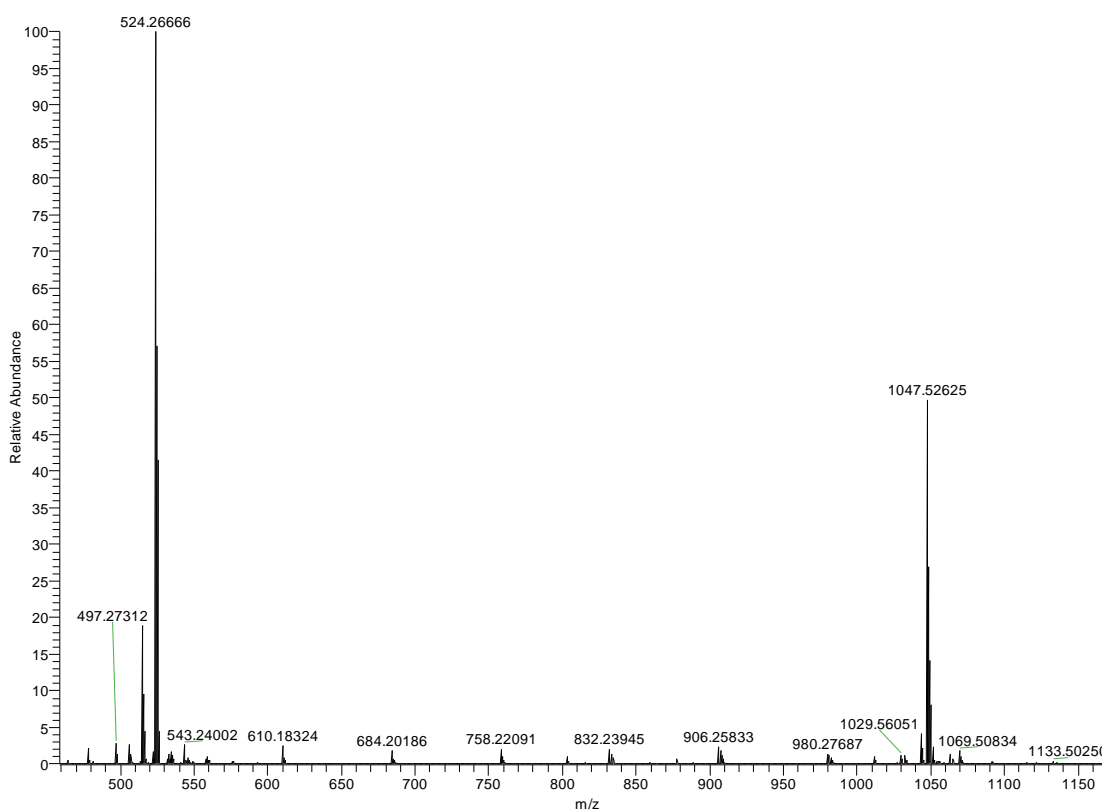


Figure 50 : Spectre de masse en FTMS de la monochloro-hydroxy-microcystine

Par conséquent, une nouvelle hypothèse est proposée : la formation de monochloro-hydroxy-microcystine de formule brute $C_{49}H_{75}N_{10}O_{13}Cl$ et d'ion moléculaire $[m + H]^+$ m/z 1047,5281825. Avec une erreur de 2 ppm sur la masse, ce composé serait alors formé par la perte d'une double liaison de la MC-LR (très probablement sur l'acide aminé Adda) au profit de la fixation d'un atome de chlore et d'un groupement hydroxyle.

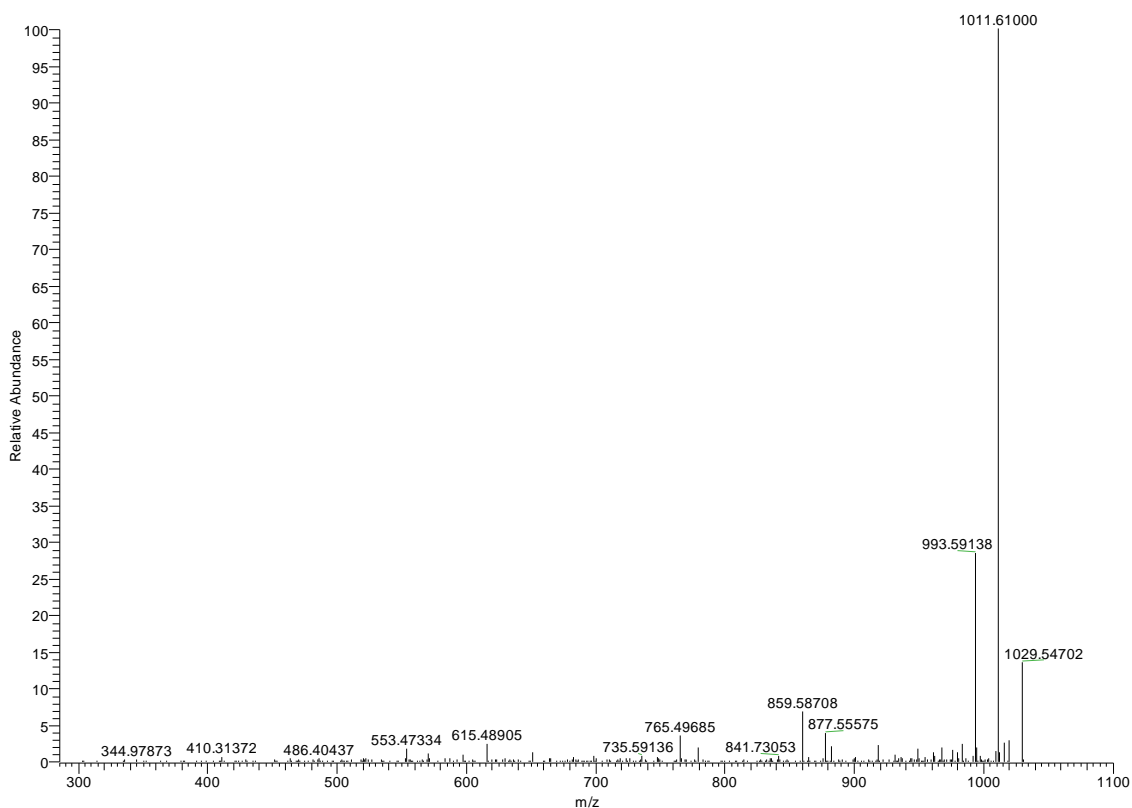


Figure 51 : Spectre MS² de la monochloro-hydroxy-microcystine sur le rapport m/z 1047,560

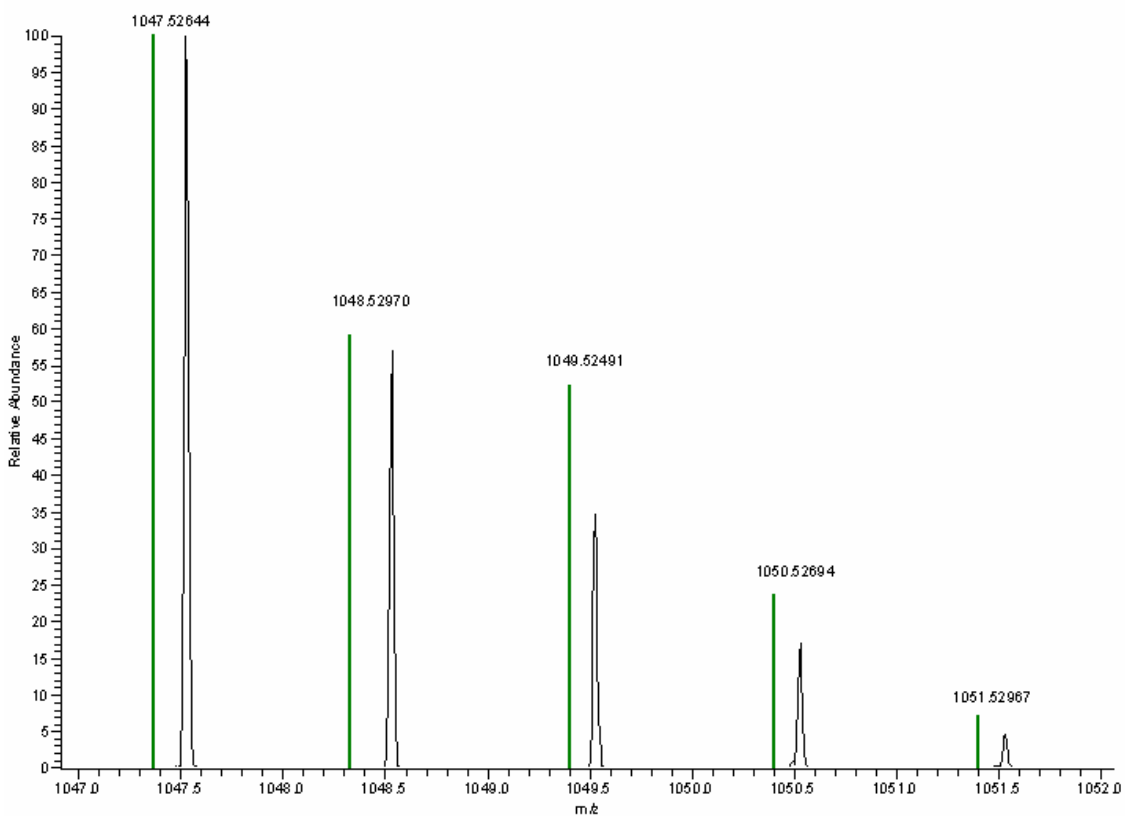


Figure 52 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la monochloro-hydroxy-microcystine

D'autre part, les analyses en MS² réalisées sur l'ion moléculaire m/z 1047,526 tendent à confirmer la théorie de la monochloro-hydroxy-microcystine en corroborant la présence d'un atome de chlore et d'un groupement hydroxyle sur les composés en question. En effet, le spectre MS² présenté sur la figure 51 met en évidence la formation de 3 ions fils : m/z 1029,5 reflétant la perte d'une molécule d'eau, m/z 1011,6 reflétant la perte d'une molécule d'acide chlorhydrique, et m/z 993,6 reflétant la perte combinée de HCl et H₂O. Enfin, la cohérence du massif isotopique théorique avec les données expérimentales (figure 52) soutient également l'hypothèse de la monochloro-hydroxy-microcystine.

2.1.3. Discussion

En accord avec des travaux précédents (Tsuji *et al.*, 1997), la chloration de la MC-LR conduit à la formation rapide de dihydroxy-microcystine, comme le confirme l'évolution du spectre UV mais également les résultats de spectrométrie de masse à transformée de Fourier. Cependant, 8 isomères ont été détectés ici contre seulement 4 lors de l'étude de Tsuji *et al.* (1997). Néanmoins, cette différence peut s'expliquer par des conditions expérimentales distinctes. En effet, dans l'étude de Tsuji *et al.* (1997) le réactif limitant était le chlore, ce qui n'est pas le cas pour les travaux réalisés au cours de cette thèse (R = 20).

D'autre part, la spectrométrie de masse basée sur un appareil à simple quadrupole fait également apparaître un groupe de trois pics chromatographiques pour des temps de rétention plus élevés que la dihydroxy-microcystine. Cependant, la plus haute résolution sur la masse obtenue grâce au LTQ-Orbitrap permet de constater qu'il s'agit d'une autre famille de sous-produits identifiée plus tard comme la monochloro-microcystine.

L'hypothèse de la dihydroxy-microcystine hydratée formulée par Kull *et al.* (2004) repose sur la spectrométrie de masse classique. Cependant, la plus haute résolution fournie par le LTQ-Orbitrap ne corrobore pas la formation de ce composé mais plutôt celle de la monochloro-hydroxy-microcystine. De plus, 5 isomères de ce composé sont répertoriés dans cette thèse alors que l'étude de Kull *et al.* (2004) ne mentionnent pas l'existence de plusieurs pics chromatographiques pour le rapport m/z 1047. Cependant, si l'hypothèse de la dihydroxy-microcystine ne se vérifie pas lors de la chloration par l'acide hypochloreux et l'ion hypochlorite, elle ne s'avère pas fautive pour autant dans le cas de la chloration par le dioxyde de chlore lors de l'étude de Kull *et al.* (2004). En effet, les réactifs étant différents, les sous-produits peuvent l'être également.

2.2. Identification de nouveaux sous-produits de chloration

2.2.1. La monochloro-microcystine

Les 3 isomères de monochloro-microcystine associés à la formule brute $C_{49}H_{73}N_{10}O_{12}Cl$ ne peuvent être distingués de la dihydroxy-microcystine par la spectrométrie de masse sans haute résolution, comme le montre la figure 53.

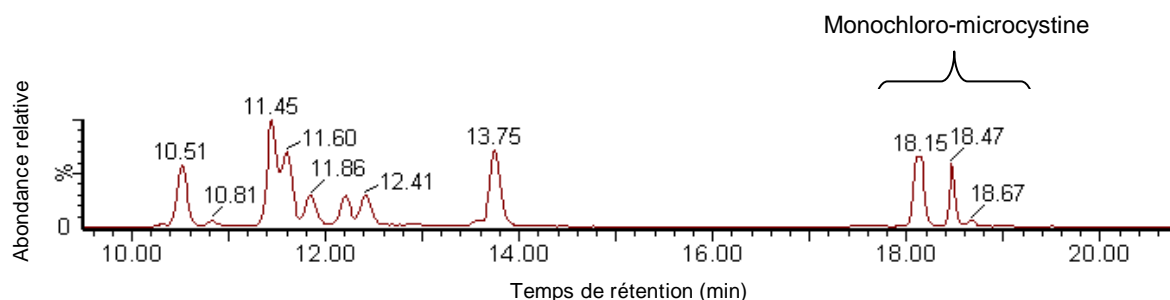


Figure 53 : Chromatogramme du rapport m/z 1029,5 après 2 minutes de chloration (monochloro-microcystine)

La monochloro-microcystine serait formée par la substitution d'un atome d'hydrogène par un atome de chlore, vraisemblablement sur une des liaisons N-H de la MC-LR. Comme le montre la figure 54, pour chacun des 3 isomères, le recours au LTQ-Orbitrap permet de mettre en évidence un ion moléculaire $[m + H]^+$ à m/z 1029,516, soit une erreur sur la masse de 2 ppm par rapport au m/z théorique 1029,5176179 calculé d'après Audi et Wapstra (1995). Néanmoins, l'ion majoritaire lors de la détection en FTMS est l'ion moléculaire dichargé $[m + 2H]^{2+}$ correspondant au m/z 515,262.

Les analyses en MS^2 réalisées sur l'ion moléculaire m/z 1029,516 soutiennent l'hypothèse de la monochloro-microcystine en indiquant la présence d'un atome de chlore sur la molécule. En effet, le spectre MS^2 présenté sur la figure 55 met en évidence la formation de 2 ions fils : m/z 993,6 reflétant la perte d'une molécule de HCl, et m/z 859,6 reflétant la perte de HCl combiné à un fragment bien connu de la MC-LR (Diehnelt *et al.*, 2005 ; Cong *et al.*, 2006). De plus, de la même manière que pour les sous-produits précédents, la correspondance entre le massif isotopique théorique et les données expérimentales (figure 56) conforte également l'identité de la monochloro-microcystine.

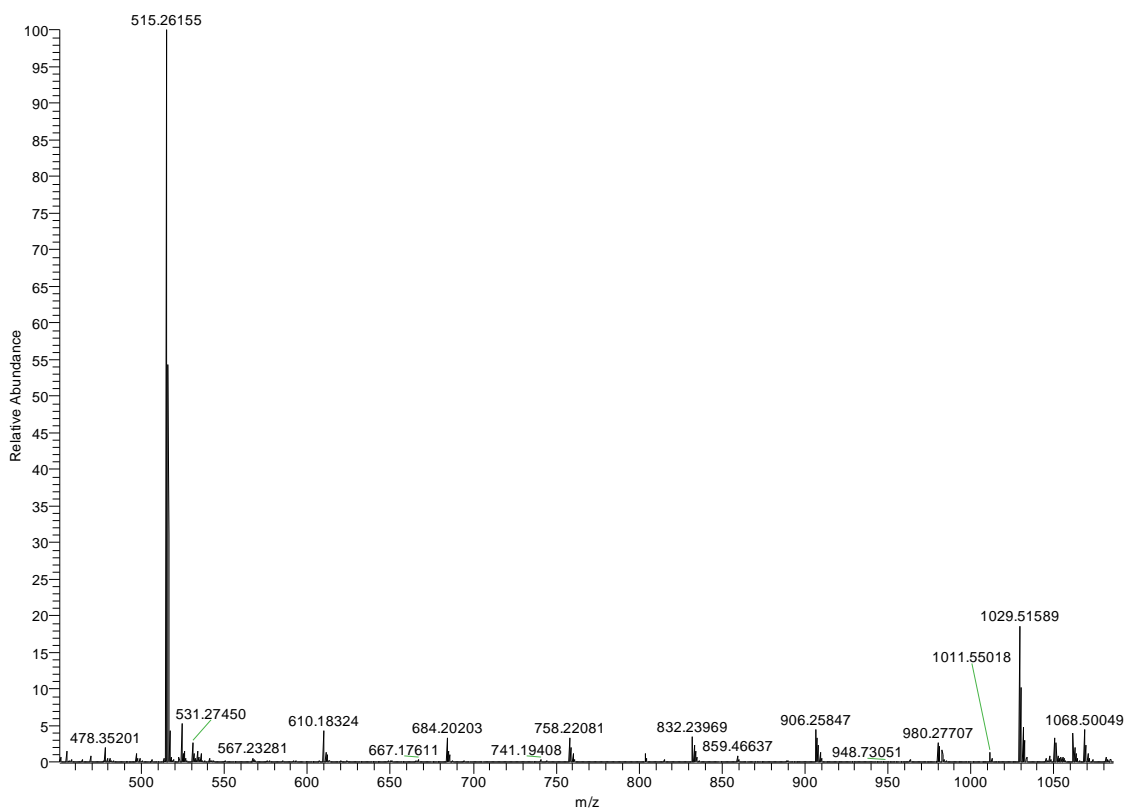


Figure 54 : Spectre de masse en FTMS de la monochloro-microcystine

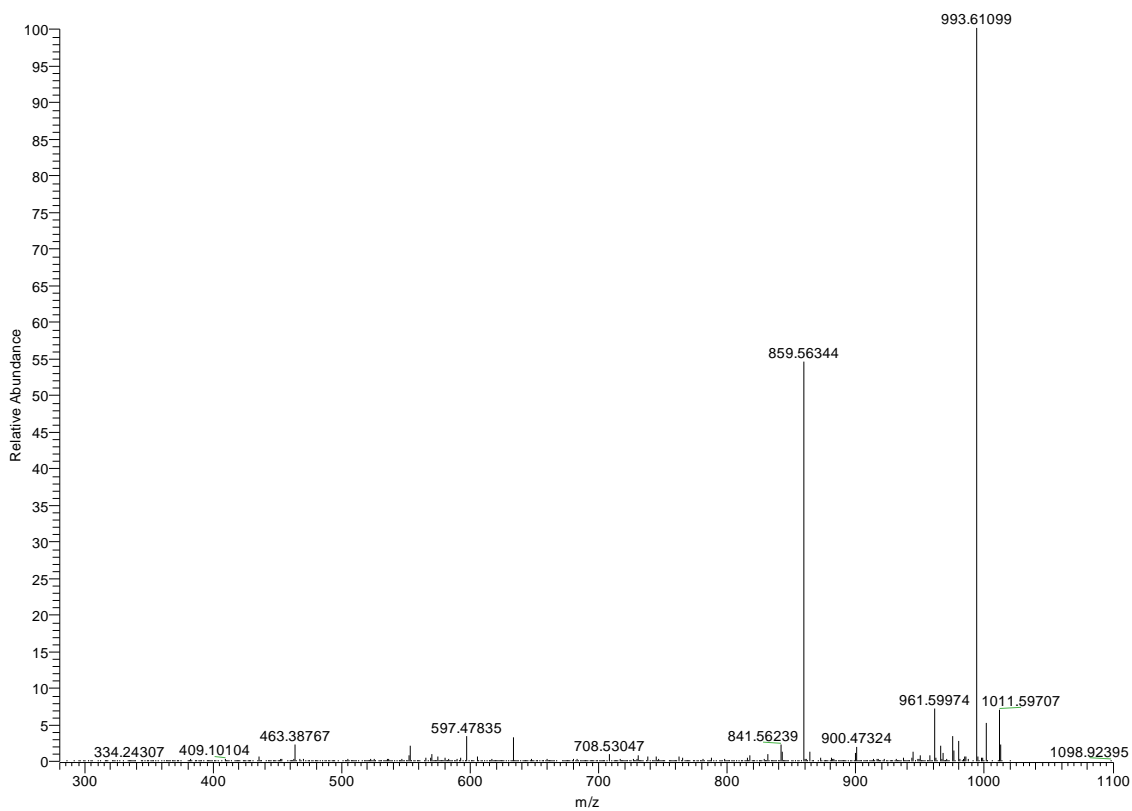


Figure 55 : Spectre MS² de la monochloro-microcystine sur le rapport m/z 1029,516

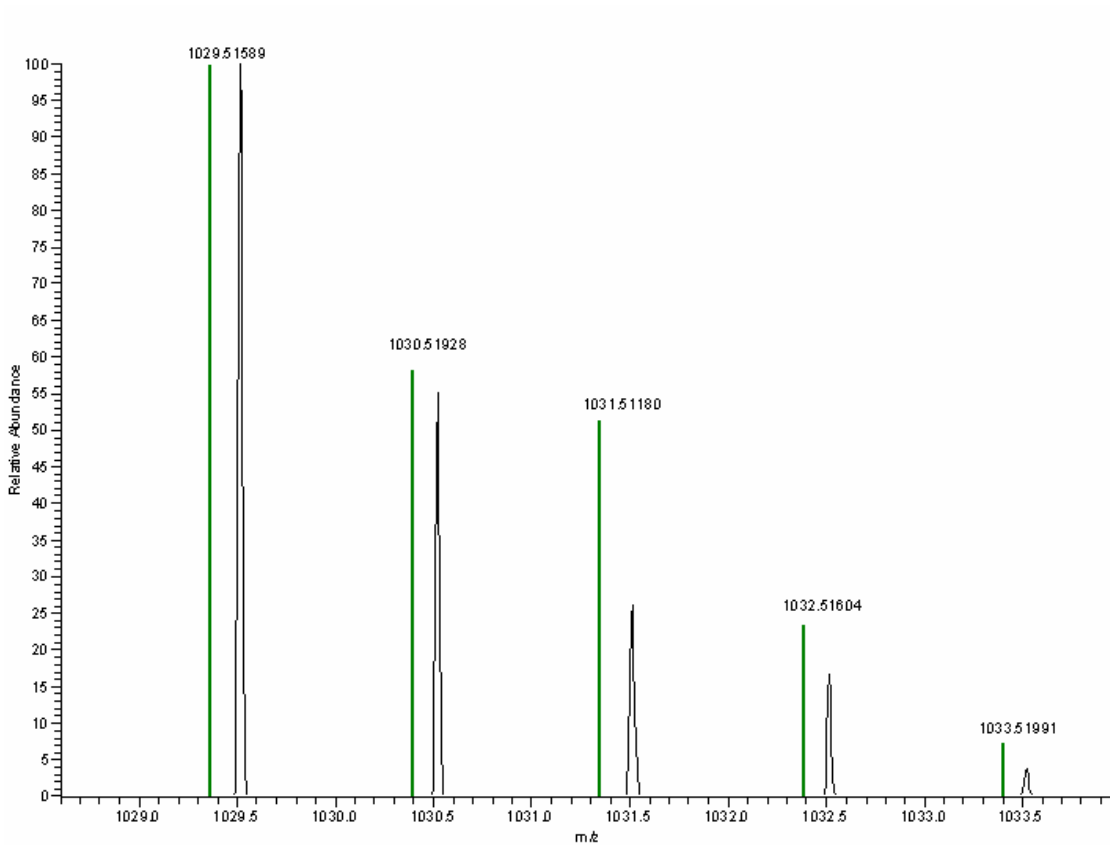


Figure 56 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la monochloro-microcystine

2.2.2. La monochloro-dihydroxy-microcystine

Comme le présente la figure 57, le chromatogramme du rapport m/z 1063,5 met en évidence de nombreux signaux identifiés comme des isomères de monochloro-dihydroxy-microcystine de formule brute $C_{49}H_{75}N_{10}O_{14}Cl$. En effet, le spectre de masse de ces sous-produits obtenu en FTMS (figure 58) indique un ion moléculaire $[m + H]^+$ correspondant au m/z 1063,521, soit une erreur de 2 ppm par rapport au m/z théorique 1063,5230971 calculé selon Audi et Wapstra (1995). Cependant, l'abondance de ces composés est faible et, en raison d'un phénomène de co-élution, les spectres de masse sont généralement dominés par les ions moléculaires des produits précédemment identifiés.

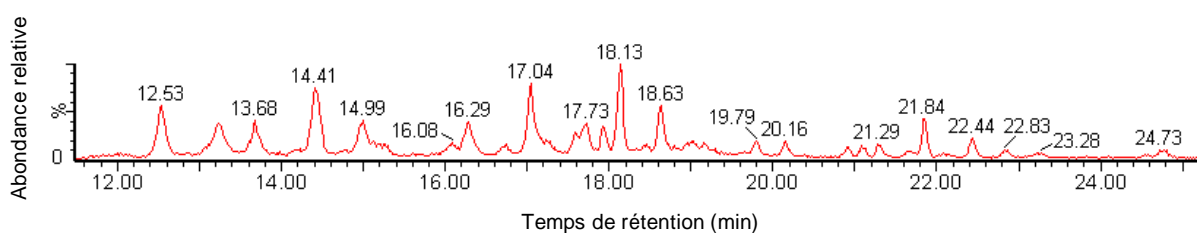


Figure 57 : Chromatogramme du rapport m/z 1063,5 après 2 minutes de chloration

La monochloro-dihydroxy-microcystine serait formée par la substitution d'un atome d'hydrogène par un atome de chlore sur une des liaisons N-H de la dihydroxy-microcystine mentionnée auparavant. Les différentes combinaisons possibles pour la substitution d'une liaison N-H sur chaque isomère de dihydroxy-microcystine expliquent alors la faible intensité et la multitude de signaux observés sur la figure 54.

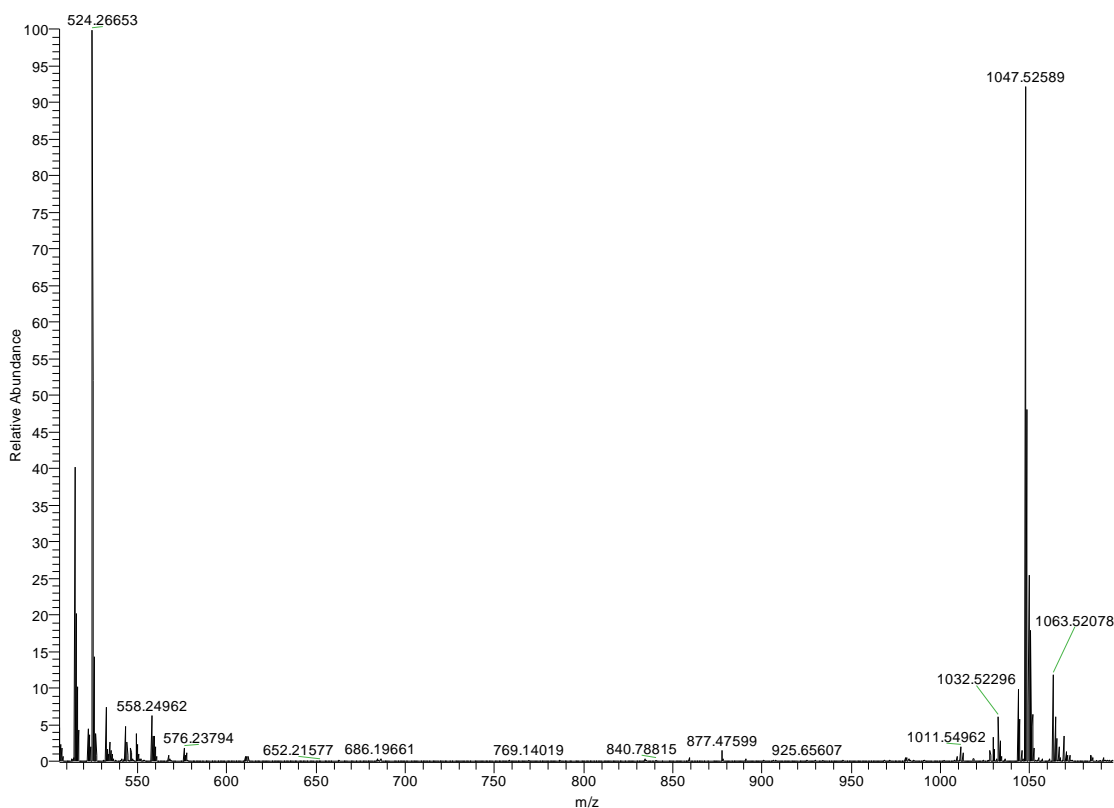


Figure 58 : Spectre de masse en FTMS de la monochloro-dihydroxy-microcystine

Les analyses en MS² réalisées sur l'ion moléculaire m/z 1063,521 supportent l'hypothèse de la monochloro-dihydroxy-microcystine en confirmant la présence d'un atome de chlore et d'au moins un groupement hydroxyle sur la molécule. En effet, le spectre MS² présenté sur la figure 59 révèle la formation de 3 ions fils : m/z 1045,6 reflétant la perte d'une molécule d'eau, m/z 1027,7 reflétant la perte de HCl ou de 2 molécules d'eau, puis m/z 1009,6 reflétant la perte combinée de HCl et H₂O. Enfin, de la même manière que pour les sous-produits identifiés auparavant, la correspondance entre le massif isotopique théorique et les données expérimentales (figure 60) coïncide avec l'identité de la monochloro-microcystine.

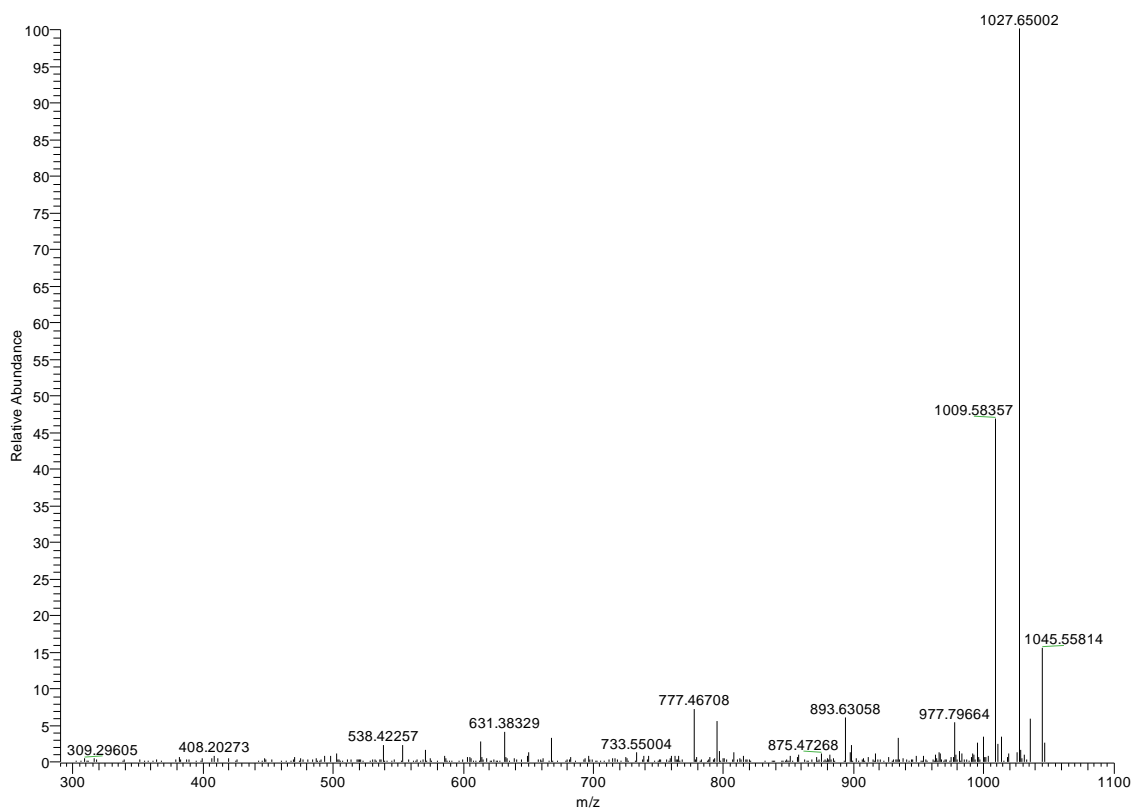


Figure 59 : Spectre MS² de la monochloro-dihydroxy-microcystine sur le rapport m/z 1063,521

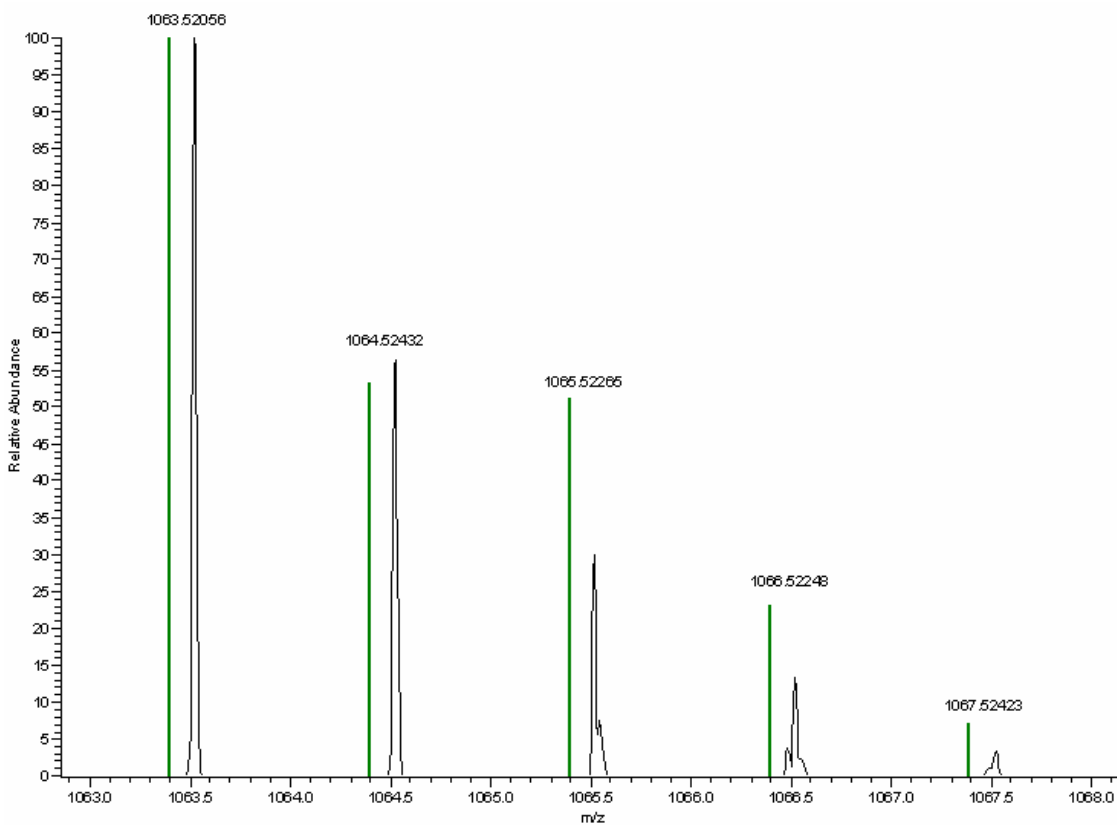


Figure 60 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la monochloro-dihydroxy-microcystine

2.2.3. La dichloro-dihydroxy-microcystine

Avec le spectromètre de masse Micromass ZQ, la dichloro-dihydroxy-microcystine et ses 7 isomères de formule brute $C_{49}H_{74}N_{10}O_{14}Cl_2$ sont observés pour un rapport m/z 1079 correspondant à l'ion $[m + H - H_2O]^+$, comme le montre la figure 61. En effet, le spectre de masse obtenu en FTMS (figure 62) met en avant les ions moléculaires $[m + 2H]^{2+}$ pour m/z 549,244 et $[m + H]^+$ pour m/z 1097,481, soit une erreur de 3 ppm par rapport au m/z théorique 1097,4841248 calculé selon Audi et Wapstra (1995). La dichloro-dihydroxy-microcystine serait alors formée par la substitution de 2 atomes d'hydrogène par 2 atomes de chlore sur la dihydroxy-microcystine déjà identifiée.

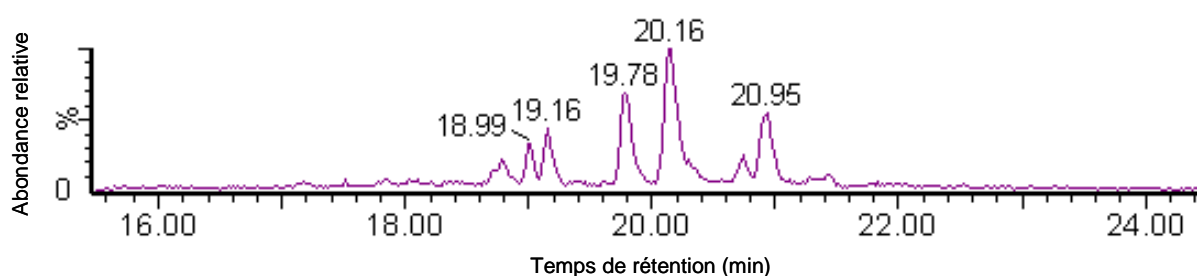


Figure 61 : Chromatogramme du rapport m/z 1079 après 30 minutes de chloration

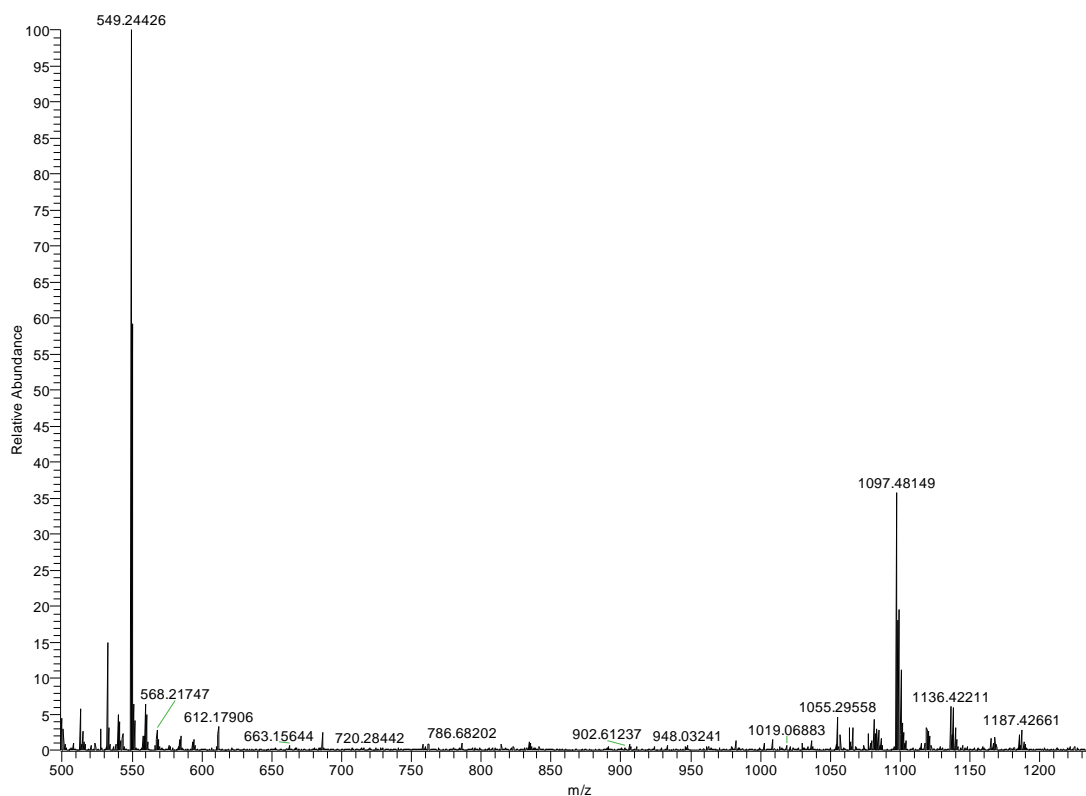


Figure 62 : Spectre de masse en FTMS de la dichloro-dihydroxy-microcystine

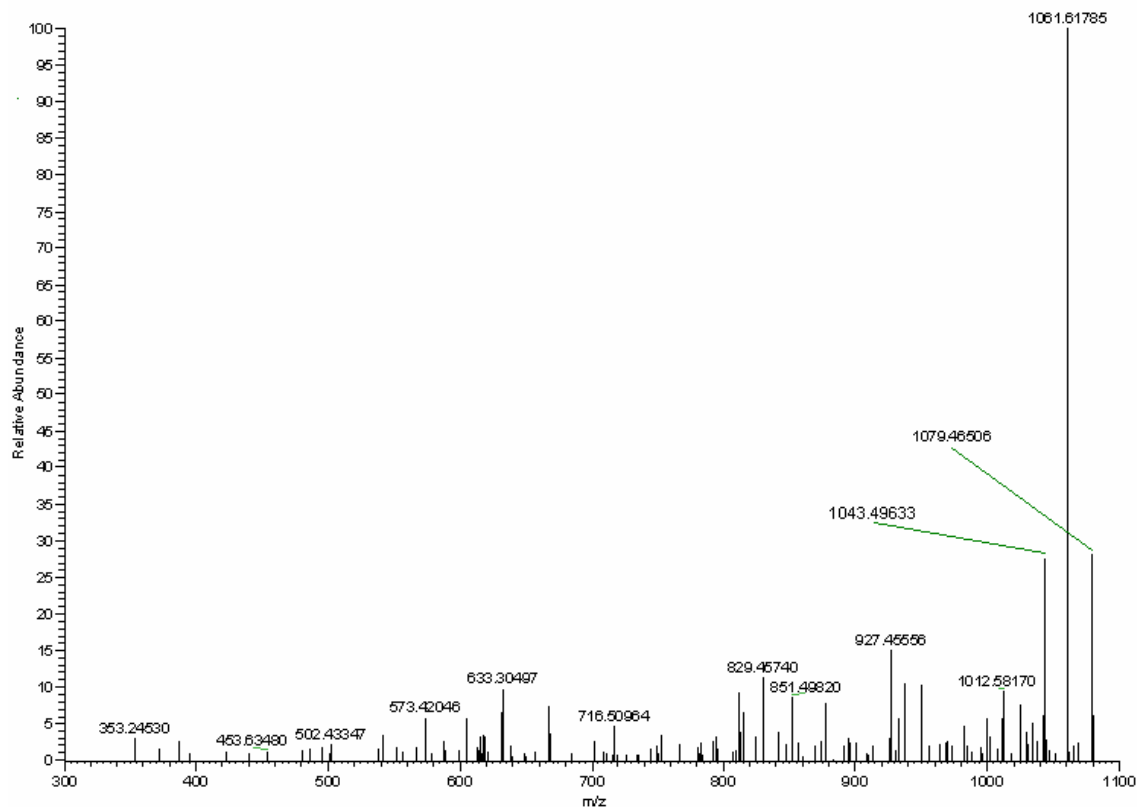


Figure 63 : Spectre MS² de la monochloro-dihydroxy-microcystine sur le rapport m/z 1063,521

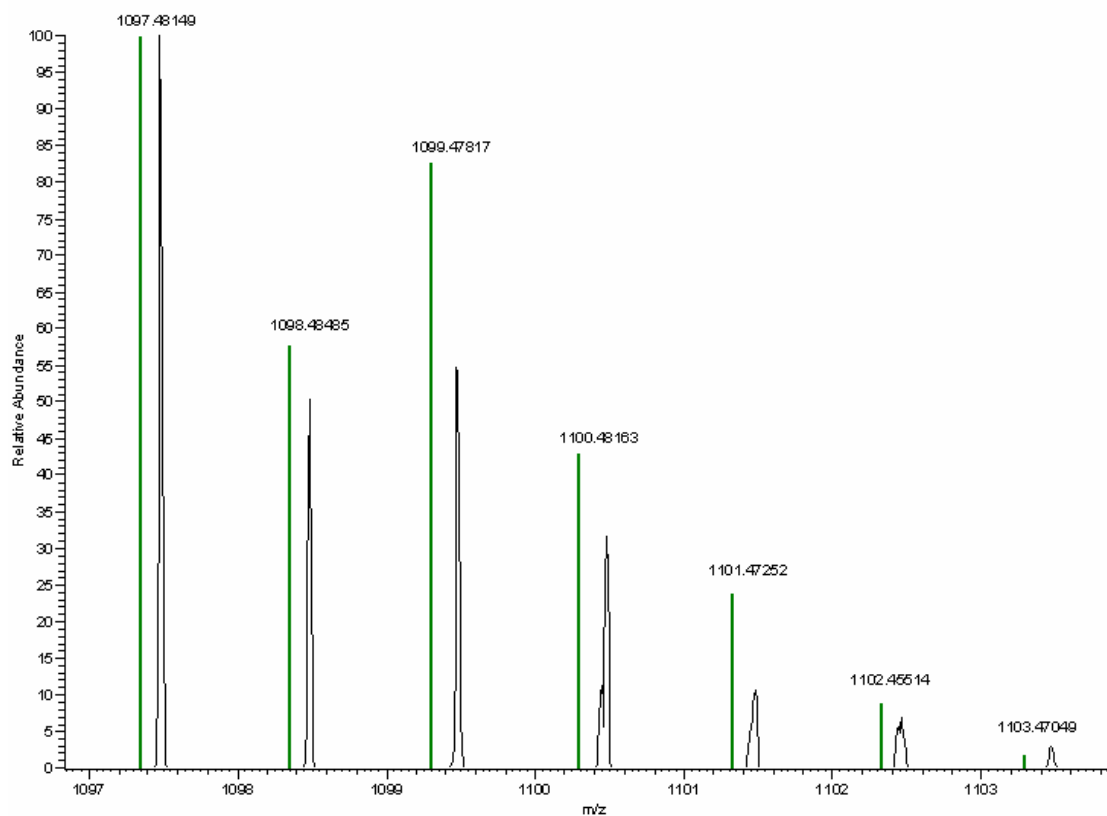


Figure 64 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la dichloro-dihydroxy-microcystine

Les analyses en MS² réalisées sur l'ion moléculaire m/z 1097,481 sont cohérentes avec l'hypothèse de la dichloro-dihydroxy-microcystine et confirment la présence d'au moins 1 atome de chlore et 2 groupements hydroxyle sur la molécule. En effet, le spectre MS² présenté sur la figure 63 révèle la formation de 3 ions fils : m/z 1079,5 reflétant la perte d'une molécule d'eau, m/z 1061,6 reflétant la perte de HCl ou de 2 molécules d'eau, puis m/z 1043,5 reflétant la perte combinée de HCl et H₂O. Enfin, la correspondance entre les massifs isotopiques théoriques et expérimentaux (figure 64) soutient également l'hypothèse de la dichloro-dihydroxy-microcystine.

2.2.4. La trichloro-hydroxy-microcystine

Le dernier sous-produit identifié ainsi que ses divers isomères illustrés sur la figure 65 correspond à la trichloro-hydroxy-microcystine de formule brute C₄₉H₇₃N₁₀O₁₃Cl₃. Le spectre de masse obtenu en FTMS (figure 66) met en évidence un ion moléculaire [m + H]⁺ à m/z 1115,448, soit 2 ppm d'erreur par rapport au m/z théorique 1115,4502379 calculé selon Audi et Wapstra (1995). Cependant, il ne peut être tenu compte des autres ions présents sur le spectre. En effet, ceux-ci font partie du bruit de fond mais ne semblent significatifs qu'en raison de la faible abondance de l'ion m/z 1115,448.

La trichloro-hydroxy-microcystine pourrait être formé par la substitution de 2 atomes d'hydrogène par 2 atomes de chlore sur la monochloro-hydroxy-microcystine identifiée précédemment. Néanmoins, en raison de la faible abondance des sous-produits, les analyses en MS² ne permettent pas de corroborer cette hypothèse. Toutefois, la cohérence entre les massifs isotopiques théoriques et expérimentaux (figure 67) confirme la présence de trois atomes de chlore sur la molécule.

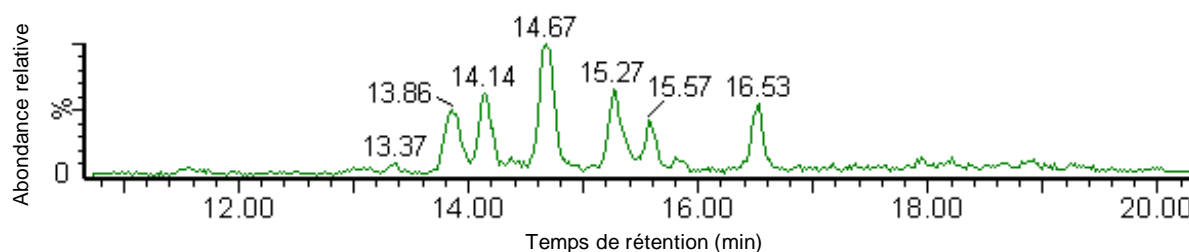


Figure 65 : Chromatogramme du rapport m/z 1115 après 15 minutes de chloration

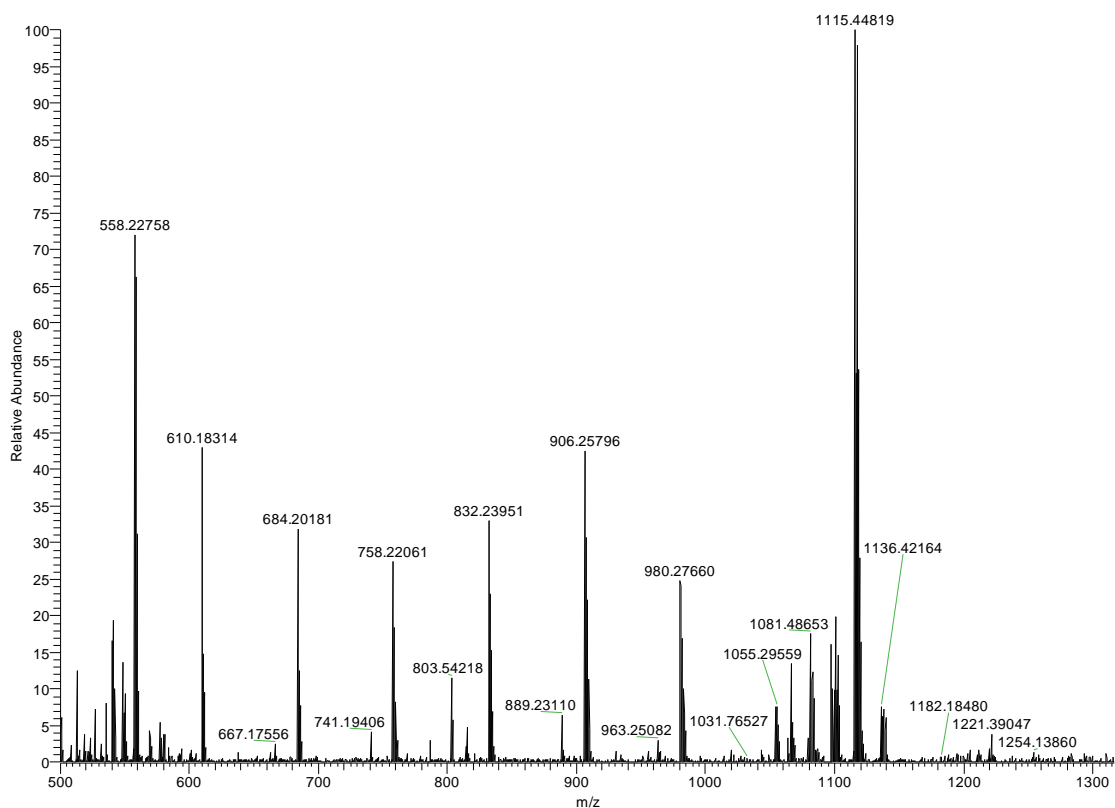


Figure 66 : Spectre de masse en FTMS de la trichloro-hydroxy-microcystine

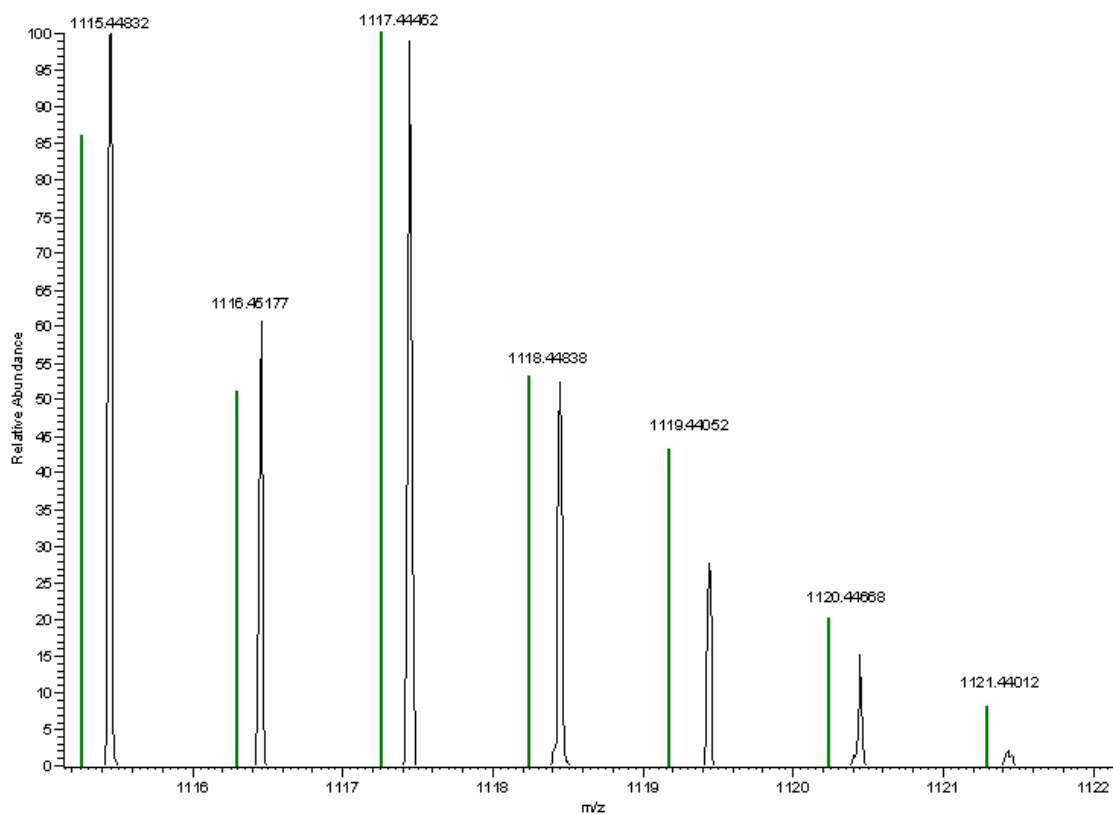


Figure 67 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la trichloro-hydroxy-microcystine

2.2.5. Discussion

L'identification des sous-produits de chloration exige à la fois un dispositif de spectrométrie de masse à semi-haute résolution mais également une quantité importante de MC-LR car la toxine initiale est transformée en une multitude de sous-produits, chacun étant peu abondant. De plus, l'étape classique de concentration des échantillons a dû être supprimée au cours de cette thèse afin d'éviter tout risque de pollution ou de perte de sous-produits. Dans ces conditions, le coût élevé de la MC-LR (265 € pour 1 mg) représente donc une contrainte expérimentale non négligeable. La technologie LTQ-Orbitrap s'avère alors être particulièrement adaptée à l'identification de composés inconnus et en faible quantité dans un échantillon.

Les 4 sous-produits et leurs isomères présentés ici ont été caractérisés à l'aide d'un faisceau de preuves (erreur sur la masse inférieure à 5 ppm, cohérence des analyses en MS², similitude entre le massif isotopique expérimental et les données théoriques) et n'ont été mentionnés dans aucune étude antérieure. Leur identification permet alors de compléter les données existantes afin de mieux comprendre la chloration de la MC-LR.

Tout d'abord, les formules brutes de l'ensemble des sous-produits identifiés, et en particulier le nombre d'atomes de carbone identique à la MC-LR, indiquent que ceux-ci ne proviennent pas d'une fragmentation de la toxine initiale. Ainsi, cette observation étaye l'hypothèse selon laquelle les liaisons peptidiques seraient résistantes à la chloration et peu sujettes à permettre une ouverture du cycle peptidique de la MC-LR. De plus, l'inclusion d'atomes de chlore dans la formule brute de certains sous-produits est cohérente avec la formation de chlore combiné mentionnée auparavant.

Les hypothèses émises quant aux mécanismes de formation des sous-produits observés au cours de cette étude permettent de proposer une nouvelle voie de transformation de la MC-LR par le chlore (figure 68). Après sa mise en contact avec le chlore, la toxine serait immédiatement transformée en trois intermédiaires : la monochloro-hydroxy-microcystine, la dihydroxy-microcystine et la monochloro-microcystine. La monochloro-hydroxy-microcystine serait alors transformée en trichloro-hydroxy-microcystine par une double réaction de substitution ou en dihydroxy-microcystine à la suite d'une hydroxylation. D'autre part, l'action du chlore sur la dihydroxy-microcystine et la monochloro-microcystine conduirait à la formation de monochloro-dihydroxy-microcystine elle-même transformée en dichloro-dihydroxy-microcystine par une réaction de substitution. Par ailleurs, on remarque

également que ce dernier sous-produit pourrait également être formé par une hydroxylation de la trichloro-hydroxy-microcystine.

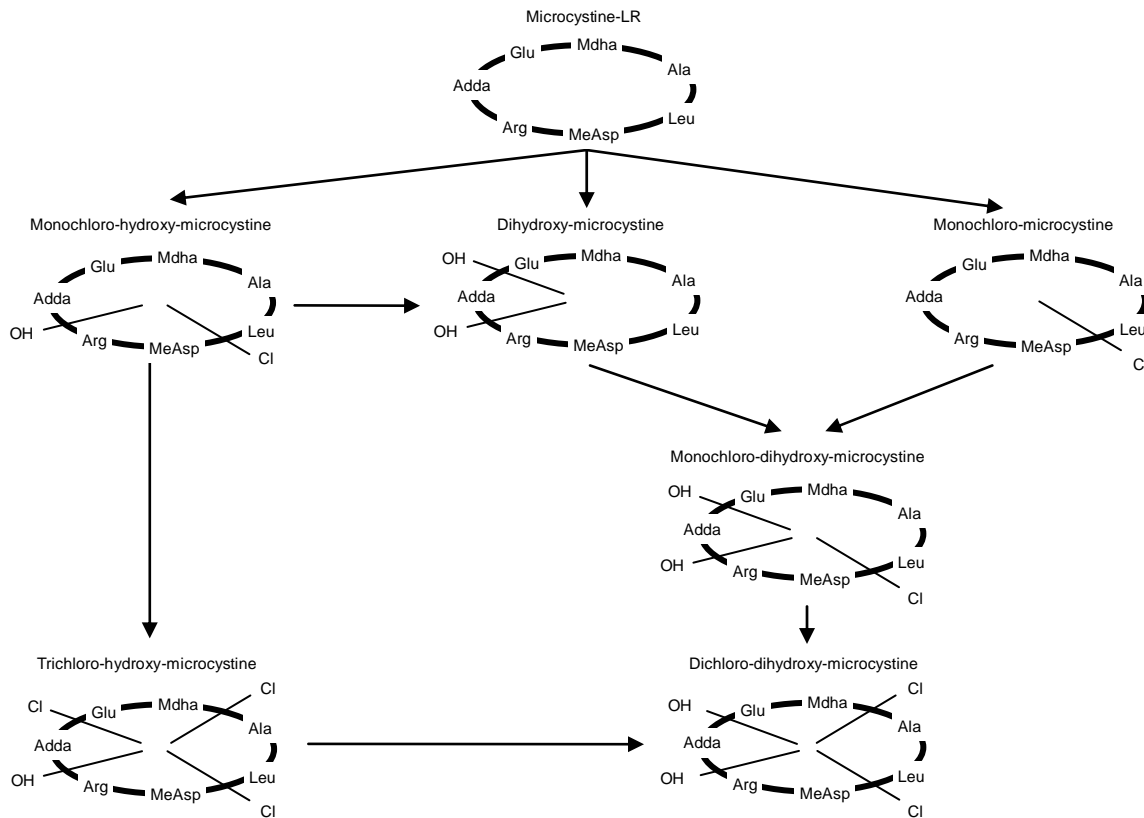


Figure 68 : Proposition de mécanisme de transformation de la MC-LR par le chlore (Merel *et al.*, 2009)

D'autre part, les structures développées des sous-produits identifiés au cours de cette thèse n'ont pu être élucidées. En effet, pour cela, chaque composé devrait être isolé par HPLC préparative puis analysé par résonance magnétique nucléaire (RMN). Or, pour chaque sous-produit, la RMN demande une quantité de matière proche du mg, ce qui n'est absolument pas envisageable à partir d'une solution à 20 mg/L de MC-LR. De plus, la faible abondance des sous-produits et le phénomène de coélution rendraient également très problématique la phase d'isolation des composés.

Enfin, la faible abondance des sous-produits et le fait qu'ils n'expliquent pas à eux seuls l'intégralité de la demande en chlore de la MC-LR semblent indiquer que d'autres résidus de chloration demeurent encore inconnus. En effet, compte tenu de la forte demande en chlore (12 mole/mole) de la toxine, la formation de sous-produits polysubstitués peut être envisagée. Cependant, la recherche de résidus de chloration sur le LTQ-Orbitrap n'a révélé

aucun composé comportant plus de 3 atomes de chlore. Il est alors envisageable que d'autres sous-produits de chloration ne soient pas détectés dans les conditions analytiques utilisées au cours de cette étude (colonne chromatographique ou tension de cône non adaptées). Néanmoins, l'utilisation d'une colonne chromatographique de type HILIC permettant la rétention de composés très polaires, de même que la variation de la tension de cône (15V, 30V, 45V et 60V) n'ont pas permis de mettre en évidence de nouveaux résidus de chloration.

2.3. Suivi des sous-produits de chloration

Après l'identification des produits de la MC-LR à l'aide du LTQ-Orbitrap, leur évolution en fonction du temps de chloration a été examinée avec le spectromètre de masse Micromass ZQ. La figure 69 illustre les résultats obtenus.

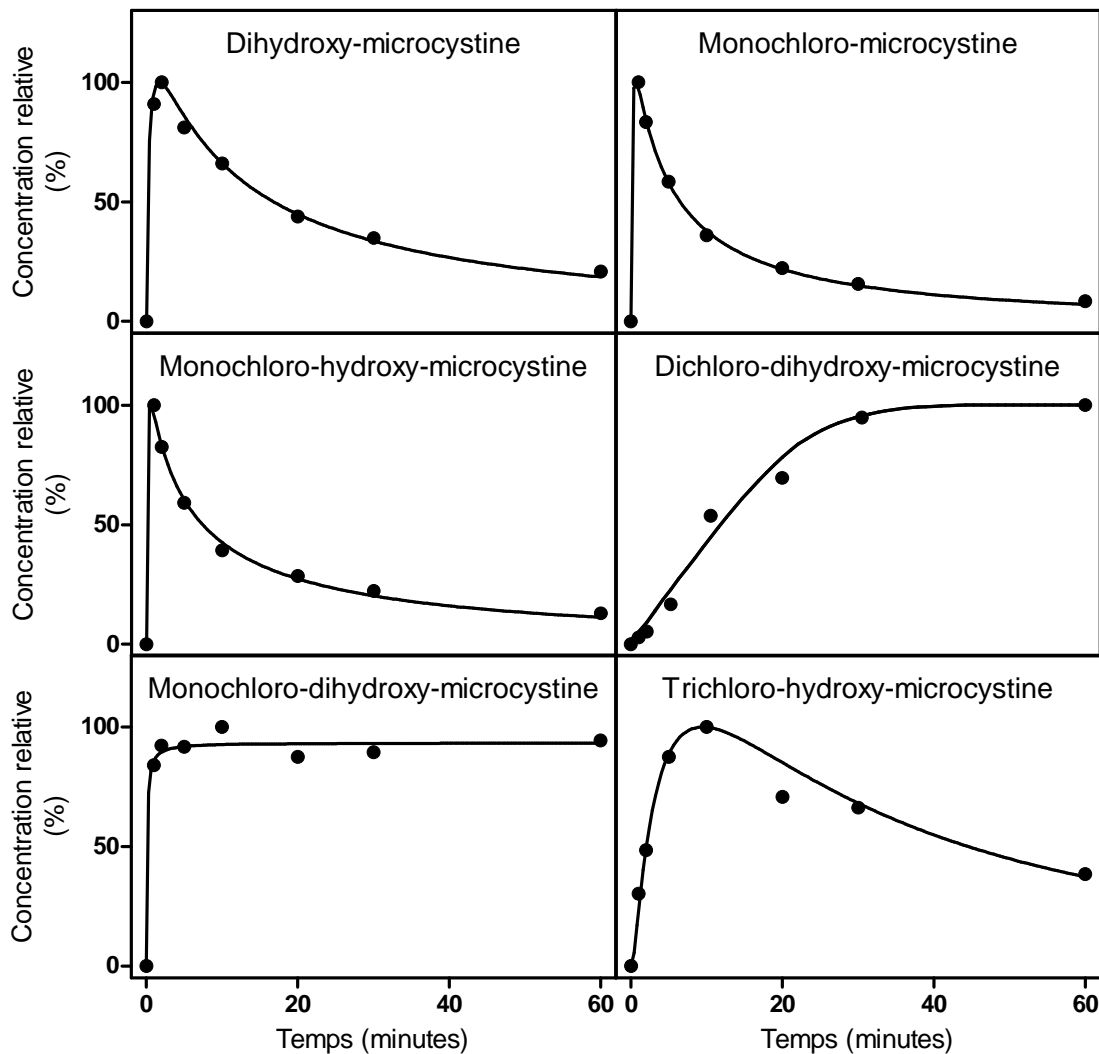


Figure 69 : Evolution temporelle des sous-produits de chloration de la MC-LR (Merel *et al.*, 2009)

Lorsque l'on examine l'évolution des sous-produits de chloration en fonction du temps de réaction avec le chlore, on remarque que 4 profils différents peuvent être identifiés. Le premier inclut 3 composés rapidement formés (entre 1 et 2 minutes après le début de la réaction) puis progressivement transformés : la dihydroxy-microcystine, la monochloro-hydroxy-microcystine et la monochloro-microcystine, comme suggéré par le mécanisme de transformation de la MC-LR proposé sur la figure 68. Le second profil est représenté par la dichloro-dihydroxy-microcystine, progressivement formée durant les 30 premières minutes suivant le début de la réaction, puis stable jusqu'à 60 minutes. La monochloro-dihydroxy-microcystine formée immédiatement après la mise en contact des réactifs et dont la concentration reste stable constitue le troisième profil. Enfin, le dernier profil correspond à la trichloro-hydroxy-microcystine, progressivement formée durant les 10 premières minutes de réaction, puis transformée à son tour.

L'évolution temporelle des sous-produits confirme que d'autres résidus de MC-LR restent à identifier. En effet, d'après l'hypothèse selon laquelle une unité d'aire de pic chromatographique correspond à la même quantité de matière pour la toxine et ses sous-produits, alors la dihydroxy-microcystine, la monochloro-microcystine et la monochloro-hydroxy-microcystine (les composés les plus abondants) à leurs concentrations maximales ne représentent que 15 %, 5 % et 5 % de la MC-LR initiale. De la même manière, les autres sous-produits représentent chacun environ 1% de la MC-LR initiale. Considérant qu'une part de ces composés n'est pas stable, après 60 minutes de chloration l'aire des pics chromatographiques de l'ensemble des sous-produits ne représente qu'environ 5 % de l'aire de la MC-LR initiale.

La faible abondance des sous-produits identifiés après 60 minutes peut s'expliquer de 3 manières. Tout d'abord, le nitrite de sodium utilisé pour stopper la chloration et introduit 10 % en excès pourrait également réduire une fraction des sous-produits en ne laissant intacte que la partie observée dans cette étude. En effet, quelques analyses complémentaires ont montré que l'ajout de nitrite de sodium induit une légère diminution de la quantité des composés chlorés. La seconde explication résiderait dans le fait que la fenêtre de 10 m/z utilisée pour l'analyse des données du LTQ-Orbitrap soit d'une amplitude trop importante, occultant ainsi l'existence de certains sous-produits. Enfin, une troisième explication serait que les conditions chromatographiques optimales pour la MC-LR (colonne, condition d'ionisation...) utilisées au cours de cette étude ne le soient pas pour l'ensemble des sous-produits. Par conséquent, une partie d'entre eux pourrait ne pas être observée.

D'autre part, l'évolution temporelle des sous-produits met en évidence l'intérêt d'étudier la toxicité du milieu, non pas après 5 minutes (lorsque 99 % de la toxine est transformée sans pour autant que la réaction soit achevée) mais après 60 minutes. En effet, la toxicité du milieu après 5 minutes prendrait en considération une quantité importante de composés intermédiaires et n'offrirait pas une estimation du risque pertinente pour le consommateur d'eau potable. En pratique, en tenant compte du temps de séjour de l'eau dans le système de distribution, ces sous-produits intermédiaires seraient déjà transformés avant de parvenir au robinet du consommateur.

2.4. Examen de la chloration par l'intermédiaire de l'ion m/z 135

L'ion de rapport m/z 135 présenté sur la figure 70 est le résultat bien connu (Diehnelt *et al.*, 2005 ; Cong *et al.*, 2006) de la fragmentation de la MC-LR (et de diverses MCs) au sein du dispositif de spectrométrie de masse, lors de l'étape d'ionisation. Le monitoring de cet ion au cours de la chloration permet, non seulement de suivre l'évolution de la MC-LR, mais également d'observer les sous-produits se fragmentant de la même manière au sein de la chaîne analytique. Pareillement, l'ion m/z 77 correspond à une fragmentation de la toxine isolant le cycle aromatique. La figure 71 présente un exemple des chromatogrammes obtenus pour les ions 135 et 77 en comparaison des chromatogrammes des ions moléculaires des sous-produits identifiés auparavant.

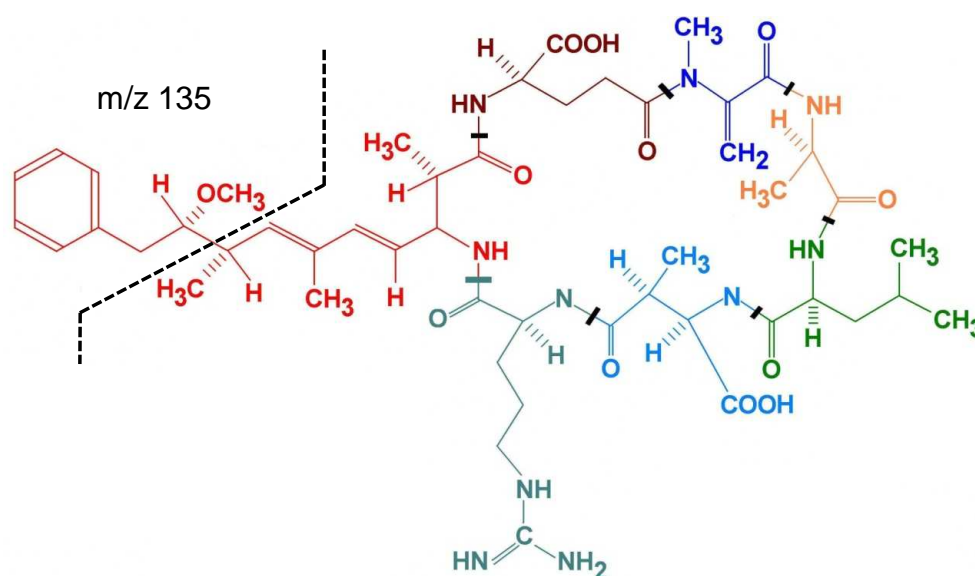


Figure 70 : Fragmentation de la MC-LR pour former l'ion m/z 135

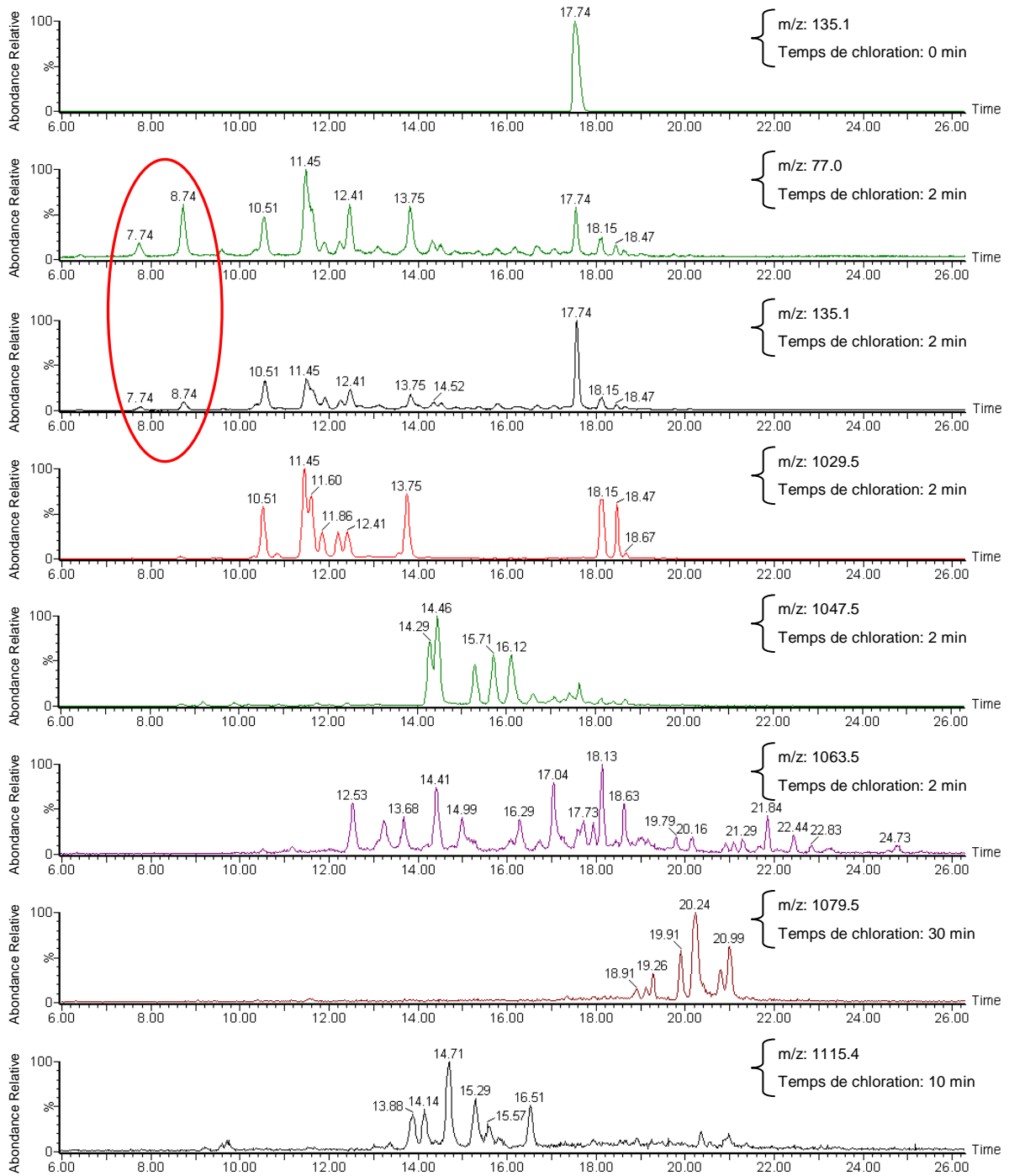


Figure 71 : Chromatogrammes de divers ions après différents temps de chloration

Comme le montre la figure 71, lors de la chloration de la MC-LR, les ions 135 et 77 permettent de visualiser de nombreux sous-produits. Parmi eux se trouvent principalement la monochloro-microcystine et la dihydroxy-microcystine (toutes deux observables sur le chromatogramme m/z 1029,5). Cependant, par l'intermédiaire de 2 pics chromatographiques (temps de rétention 7,74 et 8,74 minutes) n'apparaissant pas sur les autres chromatogrammes, les ions 135 et 77 révèlent l'existence de 2 résidus de MC-LR non identifiés.

Lors de la chloration, l'abondance de l'ion m/z 135 diminue rapidement (figure 72), selon un profil similaire à l'évolution de l'absorbance à 240 nm (figure 44). Cette forte diminution du signal peut avoir deux origines. Une première hypothèse consiste à dire que les sous-produits de la chloration de la MC-LR sont moins susceptibles de se fragmenter pour donner l'ion m/z 135. Une seconde hypothèse considère que les sous-produits de la MC-LR sont tout autant susceptibles de former l'ion m/z 135 que la toxine initiale. Dans ce cas, seule une altération de la masse du fragment m/z 135 (par la fixation de chlore ou une hydroxylation) au cours de la chloration expliquerait que celui-ci ne soit plus détecté. Cependant, la première hypothèse semble la plus probable. En effet, la forte augmentation suivie de la diminution progressive de l'abondance de l'ion m/z 77 témoigne que les sous-produits ne se fragmentent pas dans les mêmes proportions que la MC-LR.

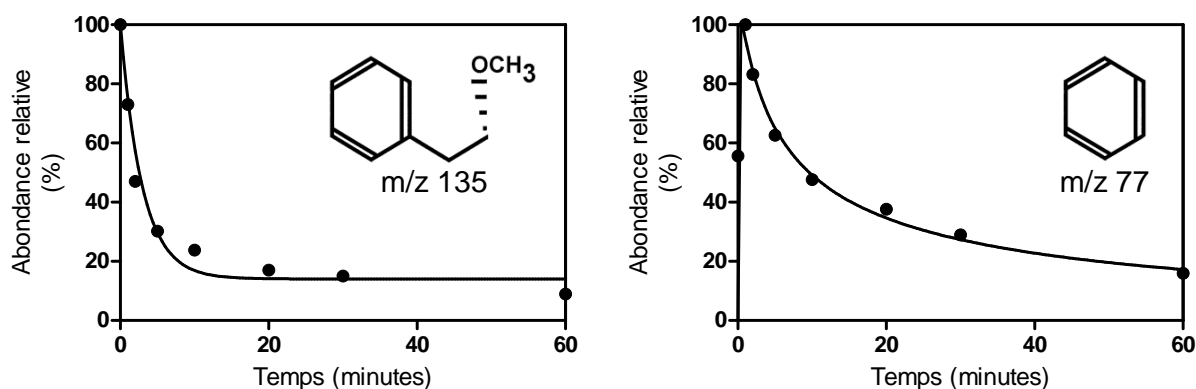


Figure 72 : Evolution temporelle des ions m/z 135 et m/z 77

Dans ces conditions, la détection d'un sous-produit par les ions m/z 135 et 77 atteste de l'intégrité de son cycle aromatique. Cependant, la diminution du signal de ces ions au cours du temps ne prouve pas que le cycle aromatique soit une cible pour le chlore. Afin de vérifier quelles fonctions de la toxine sont altérées par la chloration, la réaction devrait être suivie par RMN. Or, la quantité initiale de toxine nécessaire au suivi de la réaction par RMN et la présence de multiples sous-produits dans le milieu réactionnel rendraient difficile cette manipulation et l'interprétation des résultats.

3. EFFET DU RATIO MOLAIRE [CHLORE]/[TOXINE]

Après avoir étudié la réaction de la MC-LR avec du chlore 20 fois en excès, les travaux de cette thèse ont examiné l'effet du ratio molaire [chlore]/[MC-LR] R sur la demande en chlore, l'évolution du spectre UV, la cinétique de réaction et la formation des sous-produits.

3.1. Effet du ratio molaire sur la demande en chlore

Comme le montre la figure 73, lorsque le ratio R est inférieur à 20, la demande en chlore est égale au chlore introduit. Dans ce cas, l'oxydant est le réactif limitant et la réaction s'arrête faute de réactif. Cependant, on remarque que pour un très large excès de chlore ($R = 100$), la demande en chlore n'augmente que d'une mole/mole environ par rapport à $R = 20$. Cela indique que pour de forts ratios R (par exemple dans le cas de la désinfection de l'eau potable) les réactions développées avec la MC-LR ne seront donc pas significativement différentes que celles observées au cours de cette étude avec $R = 20$.

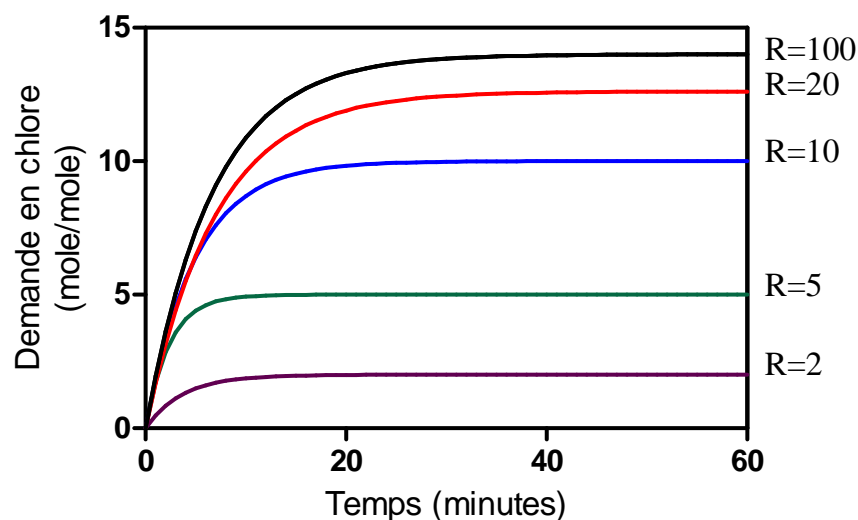


Figure 73 : Effet du ratio molaire [chlore]/[MC-LR] R sur la demande en chlore de la MC-LR

3.2. Effet du ratio molaire sur l'évolution du spectre UV

Les spectres UV du milieu réactionnel ont été enregistrés 0, 1, 2, 5 et 30 minutes après le début de la réaction pour un ratio molaire [chlore]/[MC-LR] R allant de 2 à 100. Les spectres normés sont présentés sur la figure 74. On remarque tout d'abord que, quel que soit le ratio molaire, les deux points isobestiques indiquant la conservation qualitative du milieu sont toujours observables.

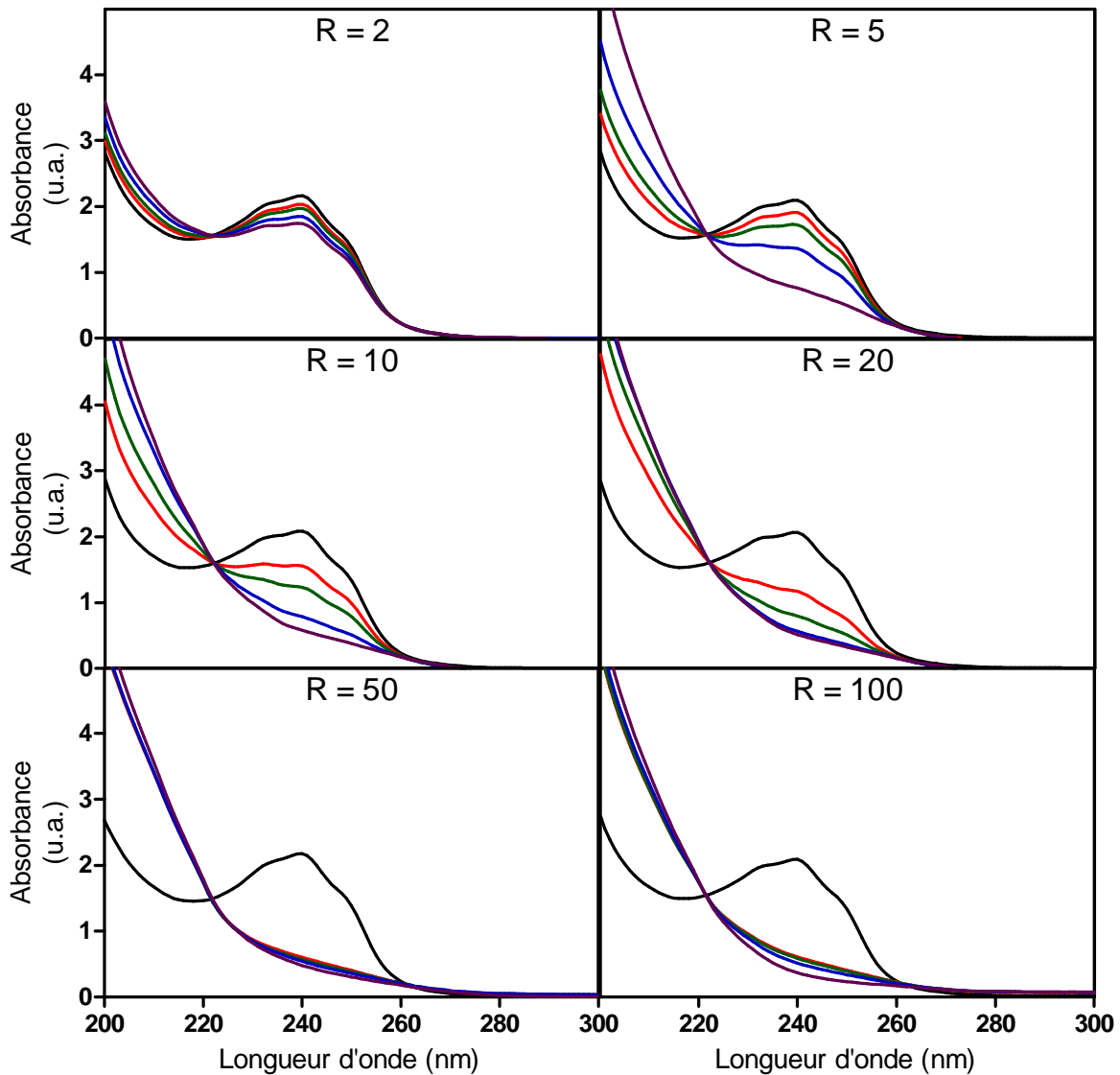


Figure 74 : Influence du ratio [chlore]/[MC-LR] R sur les spectres UV normés enregistrés 0, 1, 2, 5 et 30 minutes (dans l'ordre décroissant d'absorbance à 240 nm) après la mise en contact des réactifs

On remarque ensuite qu'un ajout de chlore trop faible ne permet pas d'assurer la transformation complète de la MC-LR, comme c'est le cas avec un ratio molaire $R = 2$. D'autre part, on observe que plus la valeur de R augmente, plus la diminution du maximum d'absorbance à 240 nm est rapide. On en déduit alors que l'augmentation du ratio molaire R ne semble pas avoir d'influence sur le mécanisme de réaction de la MC-LR mais plutôt sur la cinétique de transformation de la toxine.

3.3. Effet du ratio molaire sur la cinétique de transformation de la toxine

La cinétique de transformation de la MC-LR augmente avec la dose de chlore. En effet, pour des valeurs croissantes de R , la représentation de l'équation de cinétique de premier ordre se traduit par des droites plus pentues (figure 75). Ainsi, lorsque R augmente de 2 à 20, la constante cinétique de premier ordre augmente de $9,68 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ à $15,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. De plus, pour des valeurs de R très supérieures à 20, la transformation de la toxine est trop rapide pour qu'une constante cinétique puisse être calculée.

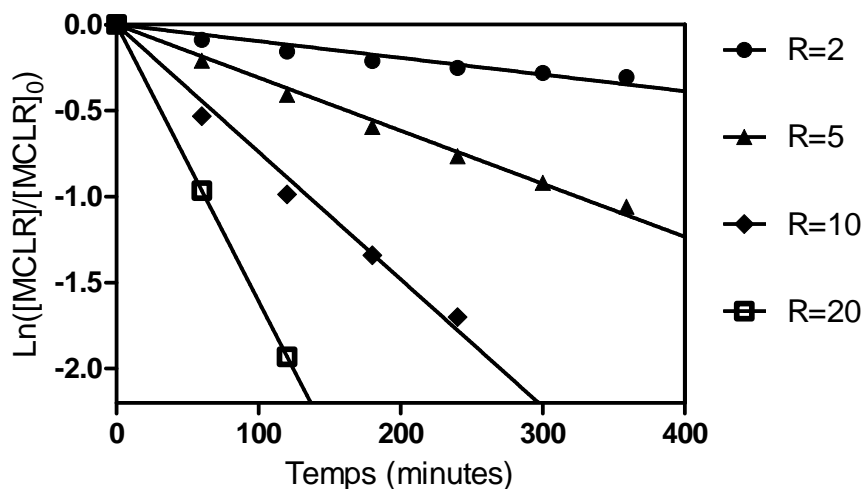


Figure 75 : Représentation de l'équation de cinétique de premier ordre de transformation de la MC-LR pour différents ratios [chlore]/[MC-LR] R

3.4. Effet du ratio molaire sur la formation des sous-produits

L'influence du ratio molaire sur la cinétique de transformation de la MC-LR se retrouve également sur la formation des sous-produits, comme l'illustre la figure 76. En effet, un ratio molaire $R = 2$ ne permet la formation que des trois premiers dérivés de la MC-LR : la

dihydroxy-microcystine, la monochloro-microcystine et la monochloro-hydroxy-microcystine dont la concentration reste stable. Lorsque R atteint 5, la dose de chlore permet alors d’amorcer la transformation de la monochloro-microcystine et de la monochloro-hydroxy-microcystine pour former la monochloro-dihydroxy-microcystine, mais celle-ci ne peut être transformée davantage. Enfin, la dichloro-dihydroxy-microcystine et la trichloro-hydroxy-microcystine ne sont formées que pour des valeurs de R supérieures à 5.

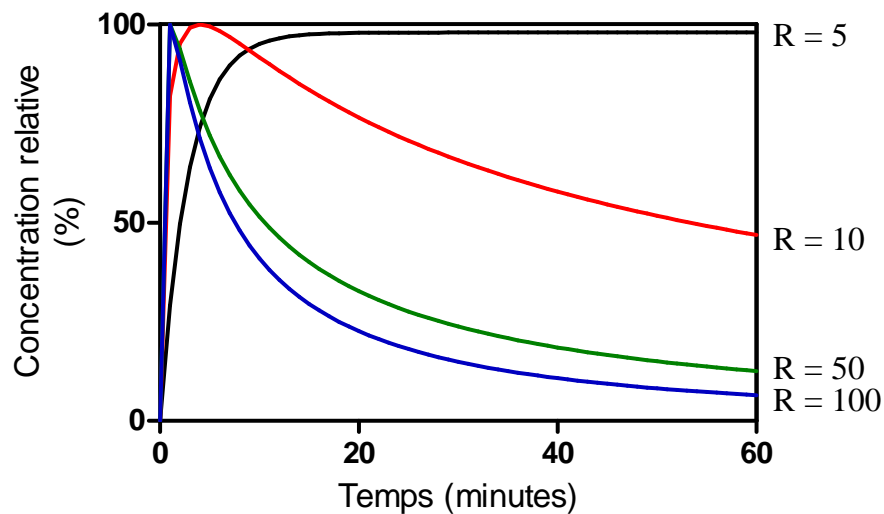


Figure 76 : Influence du ratios [chlore]/[MC-LR] R sur la formation de dihydroxy-microcystine

Comme en atteste l’évolution du spectre UV du milieu et la formation des sous-produits, la dose de chlore n’influence pas le mécanisme réactionnel mais elle définit le degré d’avancement final de la réaction. Par conséquent, en considérant l’ensemble des données obtenues au cours de cette étude, un ratio molaire $R = 20$ semble être le minimum nécessaire pour une transformation optimale de la MC-LR.

4. EFFET DE LA CHLORATION SUR LA TOXICITE

Après avoir vérifié l'efficacité de la chloration pour transformer la MC-LR et avoir caractérisé la réaction à travers diverses approches, les travaux menés au cours de cette étude ont porté sur les conséquences de la transformation de la toxine pour le consommateur d'eau potable. En effet, hormis l'identification des sous-produits de MC-LR, un des objectifs de cette thèse est de contribuer à l'estimation de l'impact de la chloration sur la toxicité du milieu. Pour ce faire, 3 tests de toxicité ont été mis en oeuvre sur le milieu contenant la MC-LR avant et après chloration : le test Microtox, le test MTT et le test rouge neutre.

4.1. Le test Microtox

Avec le test Microtox, la toxicité est exprimée par le facteur d'inhibition (H_{30}) de la luminescence de *V. fischeri* après 30 minutes de contact avec le milieu à analyser. Plus les composés du milieu interfèrent avec le métabolisme de la bactérie, plus le facteur d'inhibition sera élevé. La figure 77 présente les résultats Microtox obtenus pour divers échantillons dont la MC-LR et la MC-LR chlorée.

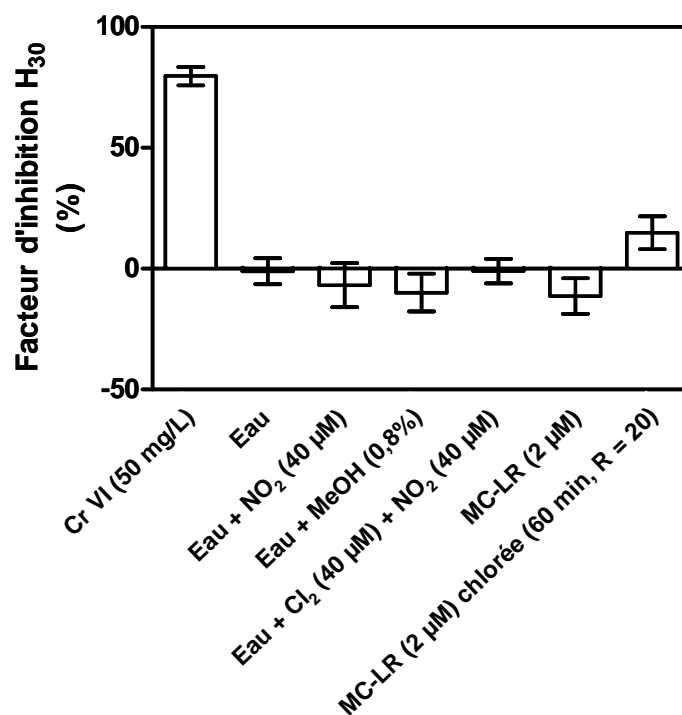


Figure 77 : Estimation de la toxicité du milieu contenant la MC-LR par Microtox (écarts-types calculés avec $n = 3$)

Le facteur d'inhibition de 80 % pour l'échantillon de Cr VI sur la figure 77 témoigne de la validité des tests car cette valeur correspond bien aux attentes. La même figure indique également que la présence de méthanol (en proportion similaire à la solution de MC-LR) dans l'échantillon et que la neutralisation du chlore libre par le nitrite de sodium ne sont pas à l'origine d'une quelconque toxicité sur *V. fischeri* car le facteur d'inhibition négatif indique que la luminescence des bactéries est plus importante après 30 minutes d'exposition. Avec un facteur d'inhibition de -10 %, on remarque que la MC-LR initiale ne semble pas non plus avoir d'effet toxique. Mais, après chloration, la luminescence est inhibée à hauteur de 15 %. La chloration de la MC-LR semble donc avoir un impact négatif sur *V. fischeri*.

4.2. Le test MTT

Après exposition des cellules Caco-2 aux divers milieux, le test MTT permet de déterminer la toxicité de ces derniers grâce à la viabilité cellulaire estimée par l'activité mitochondriale. La figure 78 présente alors les résultats obtenus pour différentes concentrations de MC-LR avant et après chloration.

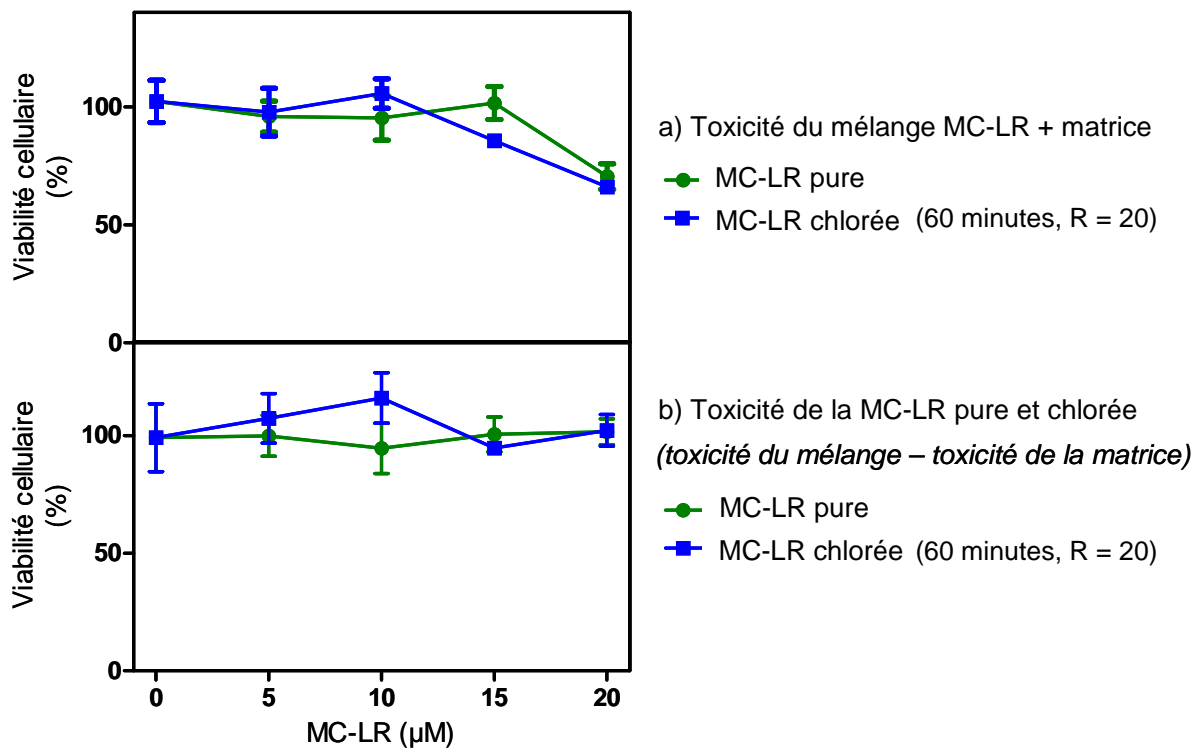


Figure 78 : Résultats du test MTT pour la MC-LR chlorée et non chlorée (écarts-types calculés avec n = 3)

Lorsque l'on retranche l'effet de la matrice, on remarque que la MC-LR ne semble pas avoir d'effet cytotoxique significatif à des concentrations comprises entre 0 et 20 μM car la viabilité cellulaire se maintient entre 95 % et 102 %. Contrairement aux tests réalisés sur Microtox, les résultats ne montrent pas d'augmentation de la toxicité après chloration de la toxine. En fait, les résultats avant et après chloration ne sont pas significativement différents, comme le montre la figure 78. Par conséquent, les données recueillies par le test MTT ne permettent pas d'observer une quelconque tendance à l'augmentation ou à la diminution de la cytotoxicité après chloration de la MC-LR.

4.3. Le test rouge neutre

De la même manière que pour le test MTT, après exposition des cellules Caco-2 à diverses solutions, le test rouge neutre permet de déterminer la toxicité de ces dernières grâce à la viabilité cellulaire estimée par l'activité des lysosomes. La figure 79 présente les résultats obtenus pour différentes concentrations de MC-LR avant et après chloration.

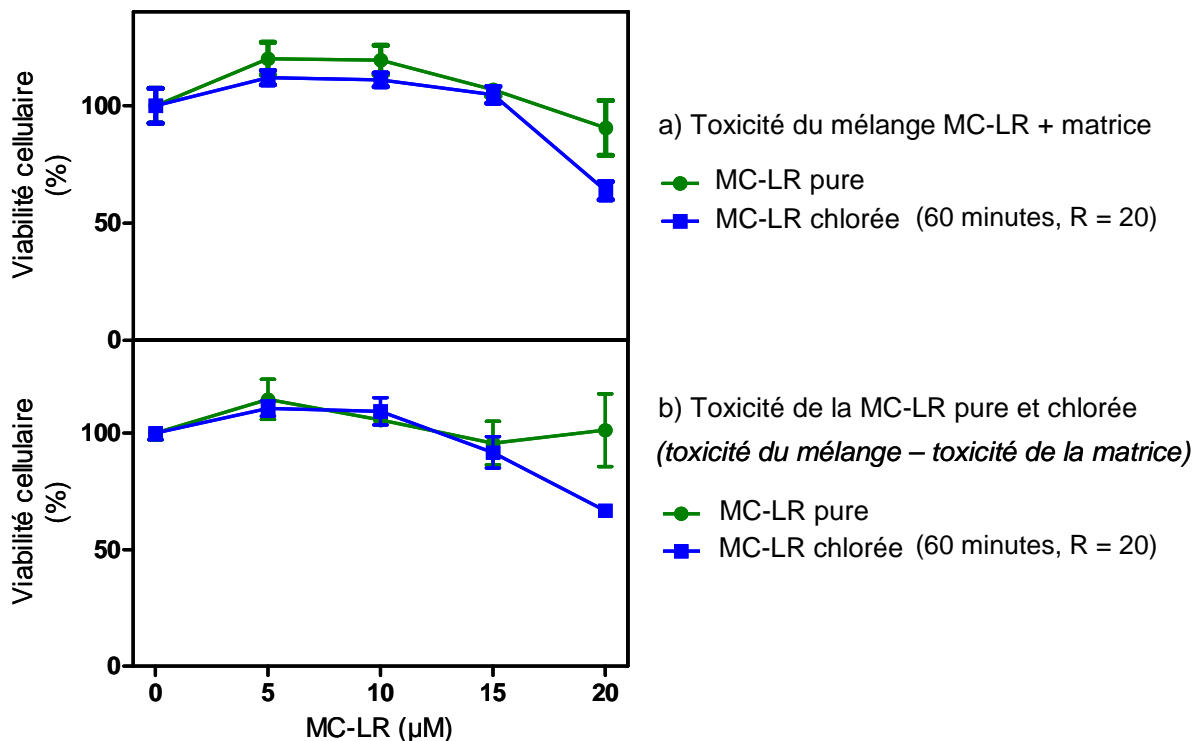


Figure 79 : Résultats du test rouge neutre pour la MC-LR chlorée et non chlorée (écarts-types calculés avec n = 3)

Après déduction de l'effet de la matrice, la MC-LR pure ne montre pas de signe de cytotoxicité pour des concentrations allant jusqu'à 20 μM car la viabilité des cellules varie entre 96 % et 114 %. De la même manière que pour le test MTT, les résultats obtenus avant et après chloration ne montrent pas de différence significative, hormis pour la plus forte concentration de MC-LR. En effet, pour 20 μM de MC-LR la viabilité cellulaire diminue de 101 % à 66 % après la transformation de la toxine. Néanmoins, ces résultats ne suffisent pas à conclure quant à l'effet de la chloration de la MC-LR sur la toxicité du milieu. Aux concentrations de toxines testées, la faible sensibilité du modèle basé sur les cellules Caco-2 pourrait occulter une éventuelle diminution de la toxicité.

4.4. Discussion

Les résidus de chloration de la MC-LR semblent interférer avec le métabolisme de *V. fischeri* à l'origine de sa luminescence. Le test Microtox suggère donc une augmentation de la toxicité après chloration de la MC-LR. En effet, pour chaque expérience, les résultats ont une tendance similaire : pas d'effet inhibiteur significatif pour l'eau chlorée puis déchlorée, une valeur de H_{30} négative pour la MC-LR mais une valeur opposée après chloration. Les écarts types relativement importants observés sur la figure 77 traduisent majoritairement la variabilité des résultats entre 2 séries de manipulations (en comparaison, la variabilité des résultats entre les triplicatas réalisés au cours d'une même expérience est négligeable). Cette variabilité est alors attribuable aux bactéries. En effet, à chaque expérience, une nouvelle souche de *V. fischeri* est réhydratée et la variation de la luminescence initiale se répercute sur le facteur d'inhibition.

D'autre part, le test Microtox n'est qu'une manière parmi d'autres d'estimer la toxicité d'une solution. Les résultats obtenus doivent être interprétés avec précaution car l'altération du métabolisme d'une bactérie n'implique pas nécessairement la même chose chez l'homme, et réciproquement. Par exemple, la MC-LR toxique chez la souris ne présente aucun effet délétère chez *V. fischeri* dans les conditions expérimentales de cette étude. Néanmoins, la possible augmentation de toxicité après chloration révélée par Microtox justifie d'entreprendre des travaux de recherche complémentaires.

Contrairement au test Microtox, les tests MTT et rouge neutre ne révèlent pas d'augmentation de la toxicité du milieu après chloration. Néanmoins, aucune diminution de la toxicité post-chloration ne peut être mise en évidence car la concentration de MC-LR utilisée

n'est pas suffisante pour induire une cytotoxicité significative sur les cellules Caco-2. Afin d'aboutir à de plus fines conclusions, il serait nécessaire de réitérer l'expérience avec une concentration de toxine dans la gamme 10-200 μM , comme le suggère l'étude de Puerto *et al.* (2009). Cependant, pour de si fortes concentrations, la matrice à elle seule pourrait induire une mortalité excessive des cellules.

Enfin, les tests Microtox, MTT et rouge neutre ne constituent qu'une première approche de la toxicité du milieu contenant la MC-LR ou ses produits de chloration. En effet, les résultats obtenus sur un être unicellulaire tel qu'une bactérie ne peuvent être directement extrapolés à l'homme et ceux observés sur une culture cellulaire ne reflètent pas exactement la toxicité d'un milieu sur un organisme vivant complexe. Pour cela, l'étude de la toxicité de la MC-LR chlorée devrait également être menée sur des souris en examinant d'autres organes que le foie (organe cible de la MC-LR mais pas nécessairement de ses sous-produits).

CHAPITRE IV

Chloration de la Cylindrospermopsine

Tout comme pour la MC-LR, la chloration de la CYL a été étudiée à travers une succession d'étapes détaillées dans ce chapitre : suivi des réactifs et du spectre UV du milieu réactionnel, caractérisation des sous-produits, étude de l'effet de la dose de chlore sur la réaction, examen de la toxicité résiduelle.

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication (Annexe III) intitulée « Identification of a new cylindrospermopsin chlorination by-product » soumise à la revue *Science of the Total Environment*.

Les résultats portant sur la toxicité de la CYL et de la MC-LR chlorées seront valorisés conjointement dans une publication actuellement en cours de rédaction.

1. SUIVI DES REACTIFS ET DU SPECTRE UV

Tout comme pour la MC-LR, l'étude de la chloration de la CYL commence par le suivi des réactifs et du spectre UV afin de connaître la cinétique de la transformation de la toxine et de confirmer une éventuelle conservation qualitative de l'échantillon.

1.1. Suivi des réactifs

1.1.1. Suivi des différentes formes de chlore

En considérant que la CYL réagit aussi rapidement que la MC-LR, le suivi du chlore libre et total n'a été réalisé que sur 60 minutes. Les résultats obtenus sont alors exprimés sous forme de demande en chlore et d'évolution du chlore combiné, comme le montre la figure 80.

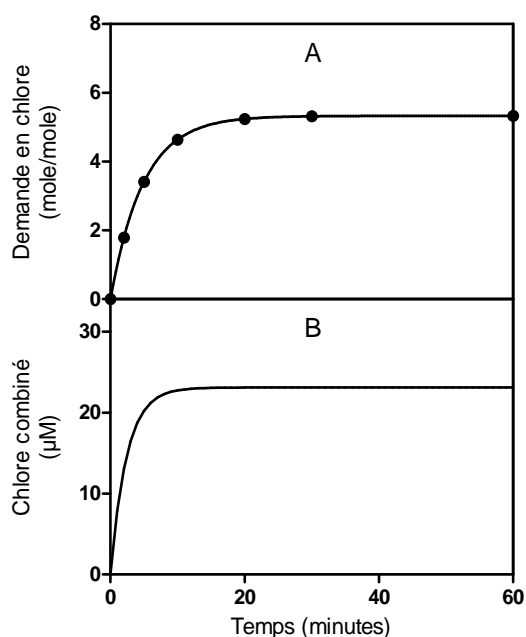


Figure 80 : Demande en chlore de la CYL (A), et évolution du chlore combiné (B)

Dans les conditions expérimentales précisées au chapitre « matériels et méthodes », la CYL présente une demande en chlore de 5,3 mole/mole satisfaite en 20 minutes. Tout comme pour la MC-LR, le chlore libre est principalement consommé lors des 10 premières minutes suivant la mise en contact des réactifs. En effet, après 10 minutes, chaque mole de toxine a réagit avec 4,6 moles de chlore. La consommation de chlore libre diminue ensuite fortement puis cesse après un total de 20 minutes de réaction.

Comme le montre la figure 80, la chloration de la CYL induit également la formation de chlore combiné. La concentration de celui-ci augmente immédiatement après le début de la réaction puis se stabilise à un maximum de 23 μM après 5 minutes environ. La concentration en CYL étant initialement de 20 μM , la quantité de chlore combiné formé est donc d'environ 1 mole par mole de toxine. Par conséquent, on peut alors supposer qu'un des sous-produits ultimes de la CYL comporte un atome de chlore.

1.1.2. Suivi de la cylindrospermopsine

La concentration en CYL dans le milieu réactionnel a été suivie par spectrométrie de masse, grâce au signal de son ion moléculaire $[m + H]^+$ correspondant au rapport m/z 416,1. Comme le montre la figure 81, la CYL standard se répartit en deux isomères : la cylindrospermopsine et la 7-épicylindrospermopsine qui se différencient par l'orientation de la fonction hydroxyle proche du groupement uracile.

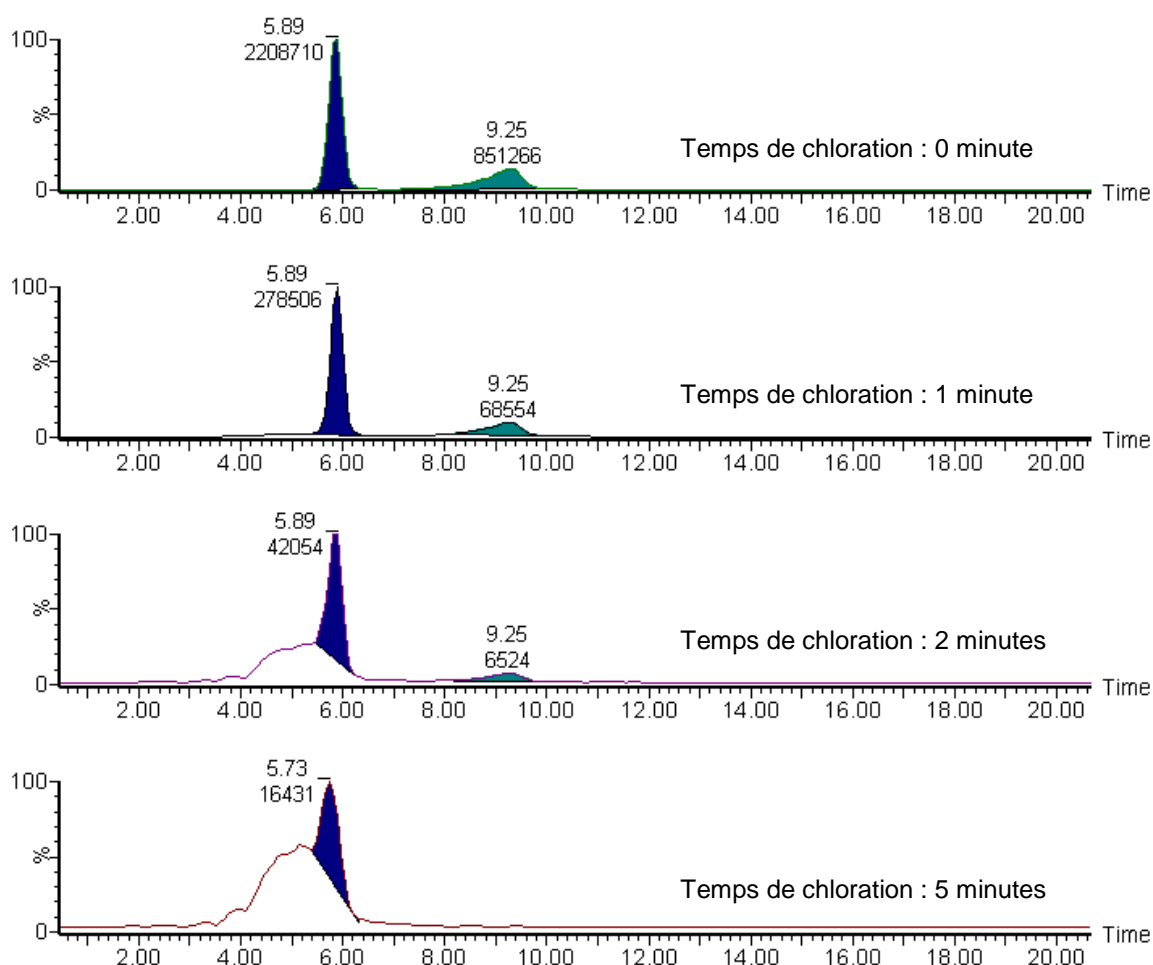


Figure 81 : Chromatogrammes de m/z 416,1 et aire des signaux après différents temps de chloration

Dès l'ajout de chlore, les 2 isomères de CYL sont très rapidement transformés, comme le présentent les figures 81 et 82. En effet, en se basant sur l'aire des signaux chromatographiques, la quantité résiduelle de toxine dans le milieu n'est plus que de 11 % et 1,5 % respectivement après 1 et 2 minutes. Enfin, après 10 minutes, la transformation de la CYL est supérieure à 99,9 %.

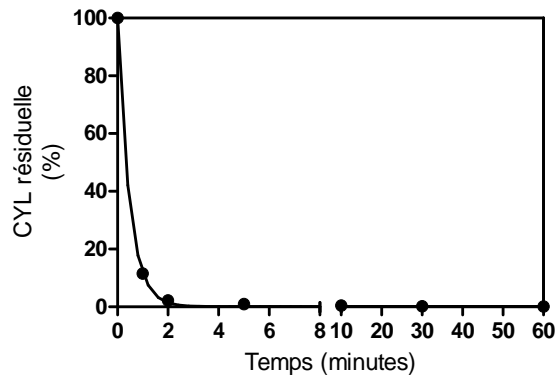


Figure 82 : Evolution de la concentration résiduelle en CYL

D'autre part, la figure 81 révèle que la chloration fait apparaître une forte augmentation du signal (sans former de pic pour autant) avant le pic chromatographique de la CYL. Cela laisse alors entrevoir l'existence de sous-produits au temps de rétention très court.

1.1.3. Cinétique de la réaction

Le chlore étant en large excès par rapport à la CYL, l'hypothèse d'une cinétique de premier ordre par rapport à la toxine peut être formulée. Dans ce cas, la modélisation de l'équation de cinétique se traduit par une droite dont la pente (en valeur absolue) est égale à la constante de premier ordre (k).

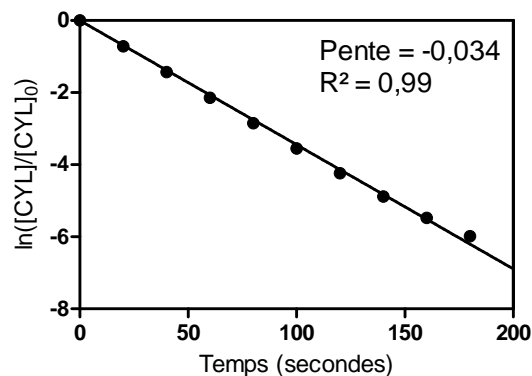


Figure 83 : Représentation de l'équation de cinétique de premier ordre pour la CYL

Comme le montre la figure 83, l'hypothèse d'une réaction de premier ordre par rapport à la CYL est vérifiée et dans les conditions expérimentales explicitées au chapitre « matériels et méthodes » une constante cinétique de $3,4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ peut être calculée.

1.1.4. Discussion

Conformément aux études précédentes (Banker *et al.*, 2001 ; Rodríguez *et al.*, 2007b ; Senogles *et al.*, 2000), la chloration assure une transformation rapide de la CYL avec un rendement pouvant être supérieur à 99 %. La transformation de la CYL est légèrement plus rapide que celle de la MC-LR. Néanmoins, un délai de 20 minutes reste nécessaire afin de satisfaire totalement la demande en chlore de la toxine et d'achever la réaction. De plus, la consommation importante d'oxydant durant les 10 premières minutes, alors que 98,5 % de la toxine est transformée en 2 minutes, semble indiquer un schéma réactionnel complexe impliquant la formation d'un ou plusieurs sous-produits intermédiaires.

La demande en chlore de la CYL est nettement inférieure à celle de la MC-LR mais elle est cohérente avec la structure de la molécule. En effet, la CYL a une masse moléculaire 2 fois plus faible que la MC-LR et elle possède nettement moins de sites potentiellement vulnérables au chlore. On attend alors principalement une altération du groupement uracile pour former la 5-chloro-cylindrospermopsine et l'acide cylindrospermopsique identifiés dans la littérature (Banker *et al.*, 2001). Néanmoins, un nombre limité de substitutions est également envisageable sur les liaisons N-H (au nombre de 4) de la CYL.

D'autre part, la cinétique de premier ordre de $3,4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ est légèrement inférieure mais en accord avec la constante de $4,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ déterminée par Rodríguez *et al.* (2007b) dans des conditions expérimentales similaires (ratio molaire [chlore]/[CYL] = 8,8 et pH 6,4).

1.2. Suivi du spectre UV du milieu réactionnel

1.2.1. Examen des spectres UV bruts

L'évolution de la forme du spectre UV du milieu réactionnel au cours de la chloration a été considérée de la même manière que pour la MC-LR. Comme le montre la figure 84 la chloration entraîne la disparition du maximum d'absorbance à 262 nm puis l'apparition d'un second maximum à 305 nm. En effet, entre 0 et 1 minute après la mise en contact des réactifs,

l'absorbance à 262 nm passe de 0,253 à 0,097 unités d'absorbance, ce qui est cohérent avec la transformation très rapide de la CYL observée en spectrométrie de masse.

D'autre part, l'absorbance à 305 nm augmente fortement après l'ajout du chlore puis décroît progressivement, ce qui suggère la formation d'un sous-produit de chloration intermédiaire. En fait, l'absorbance à cette longueur d'onde augmente brusquement de 0,027 à 1,179 unité d'absorbance en 30 secondes après la mise en contact des réactifs puis elle retombe graduellement à 0,049 après 10 minutes. Au-delà de cet intervalle de temps, plus aucune variation significative du spectre UV n'est observable.

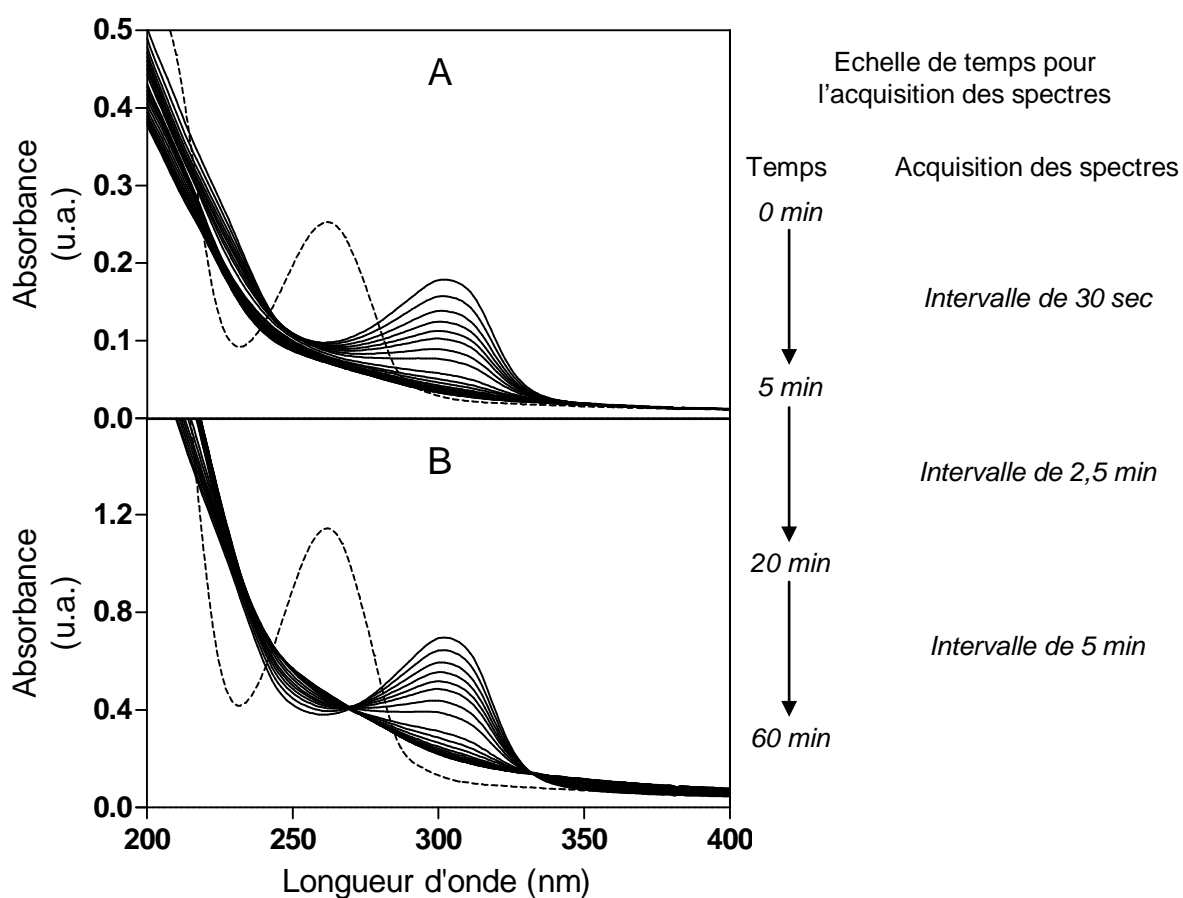


Figure 84 : Spectres UV bruts (A) et normés (B) du milieu réactionnel avant (spectre en pointillé) et durant la chloration de la CYL (décroissance chronologique du maximum à 305 nm)

1.2.2. Recherche des points isobestiques

Tout comme pour la MC-LR, la superposition des spectres UV bruts ne permet pas directement l'observation de points isobestiques. Par conséquent, il n'est pas possible d'affirmer que la chloration de la CYL implique une conservation de la masse.

Toutefois, hormis le spectre UV initial, on remarque que tous les spectres convergent aux environs de 250 nm et 340 nm (figure 84a), laissant alors supposer l'existence de points isobestiques cachés. En effet, la normalisation des spectres (aire égale à 100 unités d'aire) met en évidence l'existence de 2 points isobestiques : le premier à 269 nm et le second à 332 nm. Cependant, le spectre UV du milieu avant chloration ne passe par aucun d'entre eux. Par conséquent, l'hypothèse de la conservation qualitative du milieu ne peut être validée lors de la transformation de la CYL en un composé intermédiaire (Pouët *et al.*, 2004 ; Thomas *et al.*, 2007). En revanche, cette même hypothèse est vérifiée lors de la transformation ultérieure cet intermédiaire.

1.2.3. Discussion

Bien que moins spécifique et moins sensible que la spectrométrie de masse, la spectrophotométrie UV représente un outil important pour étudier l'évolution d'une solution, notamment au cours d'une réaction chimique.

L'ajout de chlore au milieu contenant la CYL s'accompagne en particulier de l'apparition d'un maximum d'absorbance à 305 nm. Cependant, la contribution du chlore ayant été soustraite de chaque spectre UV, ce maximum ne peut être attribuable à l'agent oxydant. Il ne peut également pas s'agir d'un quelconque effet pH lors de l'ajout du chlore car les spectres d'une solution à des pH différents laissent apparaître des points isobestiques. Or, le spectre du milieu avant chloration ne passe par aucun point isobestique. De plus, il ne peut être question d'un effet bathochrome (modification de la position de la bande spectrale dans l'absorption d'une molécule vers les plus grandes longueurs d'onde) translatant le maximum d'absorbance de la CYL de 262 nm à 305 nm car, dans ce cas, la cinétique de disparition du maximum reflétant la transformation de la toxine ne coïnciderait pas avec les données de spectrométrie de masse. Par conséquent, l'apparition puis la disparition du maximum d'absorbance à 305 nm serait attribuable à la formation d'un composé intermédiaire lors de la chloration de la CYL. Cependant, il ne peut être question de la 5-chloro-cylindrospermopsine, intermédiaire de chloration caractérisée dans la littérature et lors des analyses par couplage HPLC/MS/UV par un maximum d'absorbance à 277 nm (Banker *et al.*, 2001 ; Rodríguez *et al.*, 2007b). Le maximum d'absorbance à 305 nm pourrait alors constituer une première indication de la formation d'un nouvel intermédiaire de réaction.

2. ETUDE DES SOUS-PRODUITS DE CHLORATION

2.1. Examen des sous-produits identifiés dans la littérature

2.1.1. La 5-chloro-cylindrospermopsine

La 5-chloro-cylindrospermopsine de formule brute $C_{15}H_{20}N_5O_7SCl$ identifiée par Banker *et al.* (2001) serait le premier sous-produit formé lors de la chloration de la CYL. D'après les masses atomiques publiées par Audi et Wapstra (1995) ce composé pourrait être caractérisé en spectrométrie de masse par son ion moléculaire $[m + H]^+$ répondant au rapport m/z théorique 450,0850206. Après 2 minutes de chloration, le chromatogramme du rapport m/z 450,1 met en évidence 2 signaux associés à la 5-chloro-cylindrospermopsine (1 pour chaque isomère de CYL), comme le montre la figure 85.

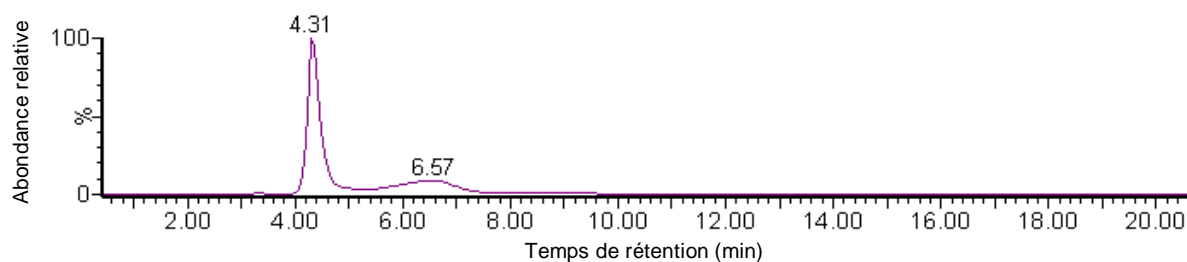


Figure 85 : Chromatogramme du rapport m/z 450,1 après 2 minutes de chloration

Pour chacun des isomères de 5-chloro-cylindrospermopsine, le spectre de masse présenté sur la figure 86 met en évidence un ion moléculaire correspondant au rapport m/z 450,084, soit une erreur de 2 ppm par rapport à la valeur théorique énoncée précédemment. Le signal apparaissant pour un rapport m/z 472,066 correspond alors à un adduit de sodium sur le sous-produit pour former l'ion $[m + Na]^+$.

Les analyses en MS^2 réalisées sur l'ion moléculaire m/z 450,084 révèlent principalement la formation de 3 ions fils : m/z 370,2, m/z 352,2 et m/z 274,2 (figure 87). Alors que les 2 premiers mettent en évidence la perte d'une molécule de SO_3 seule ou accompagnée d'une molécule d'eau, le troisième correspond à l'unité guanidine tricyclique de la CYL et confirme que le chlore engagé sur la 5-chloro-cylindrospermopsine devrait appartenir au groupement uracile, comme le proposent Banker *et al.* (2001).

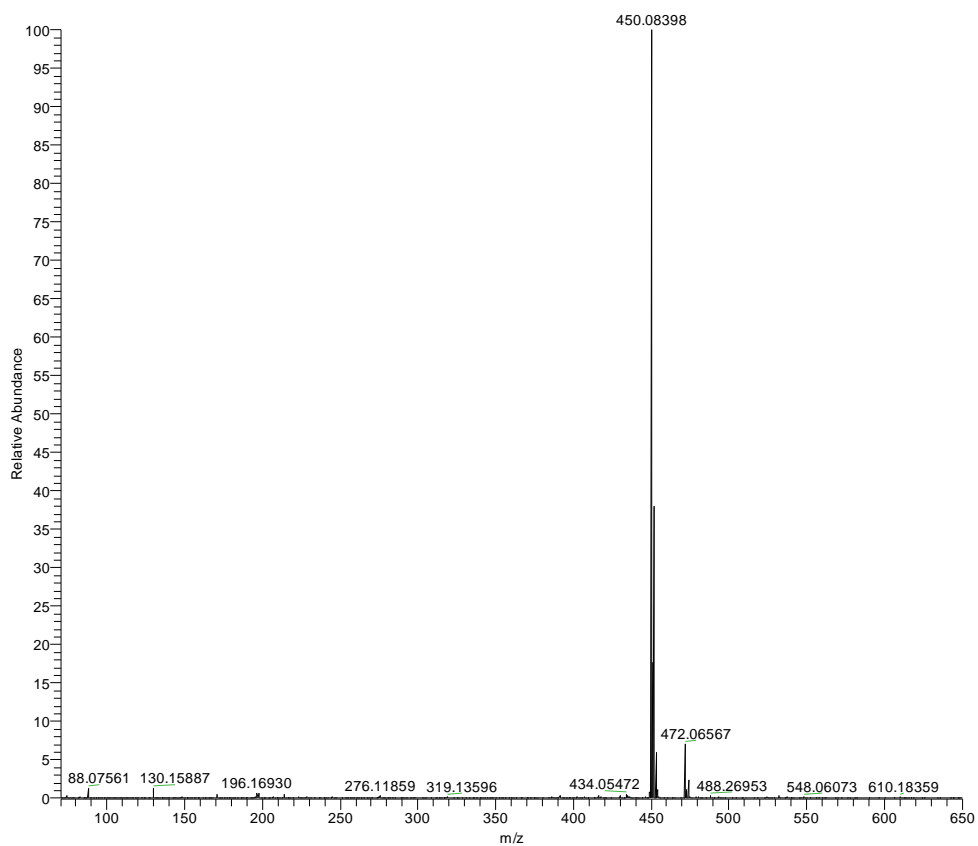


Figure 86 : Spectre de masse en FTMS de la 5-chloro-cylindrospermopsine

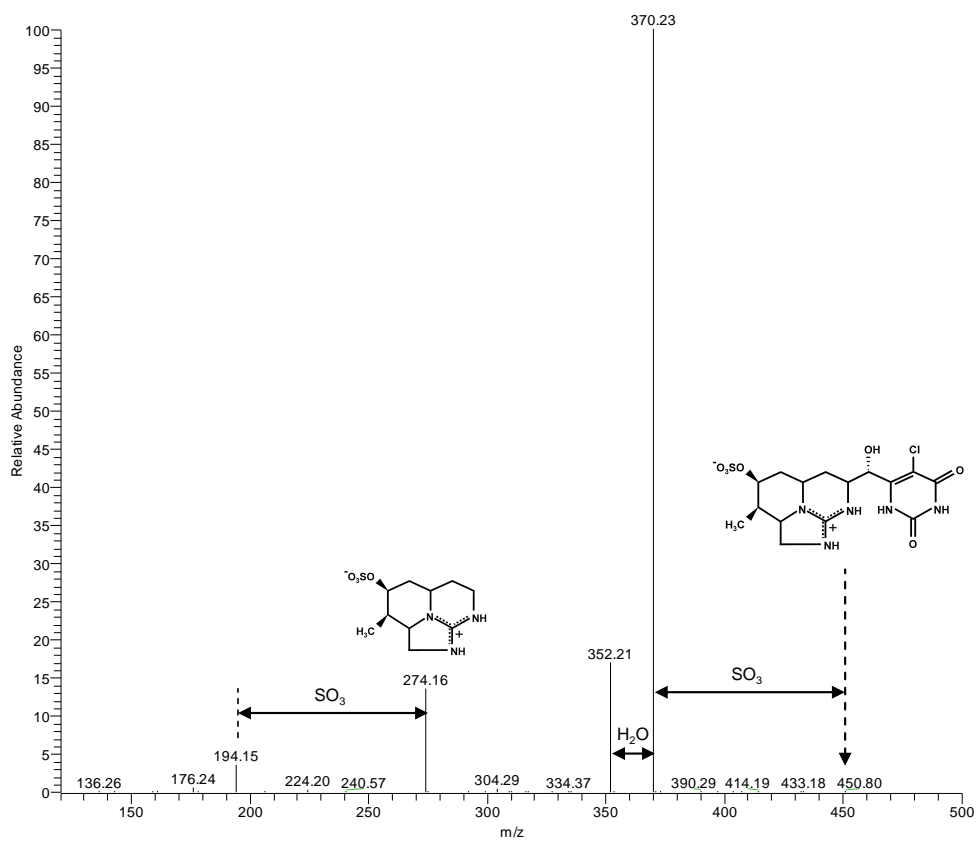


Figure 87 : Spectre MS² de la 5-chloro-cylindrospermopsine sur le rapport m/z 450,084

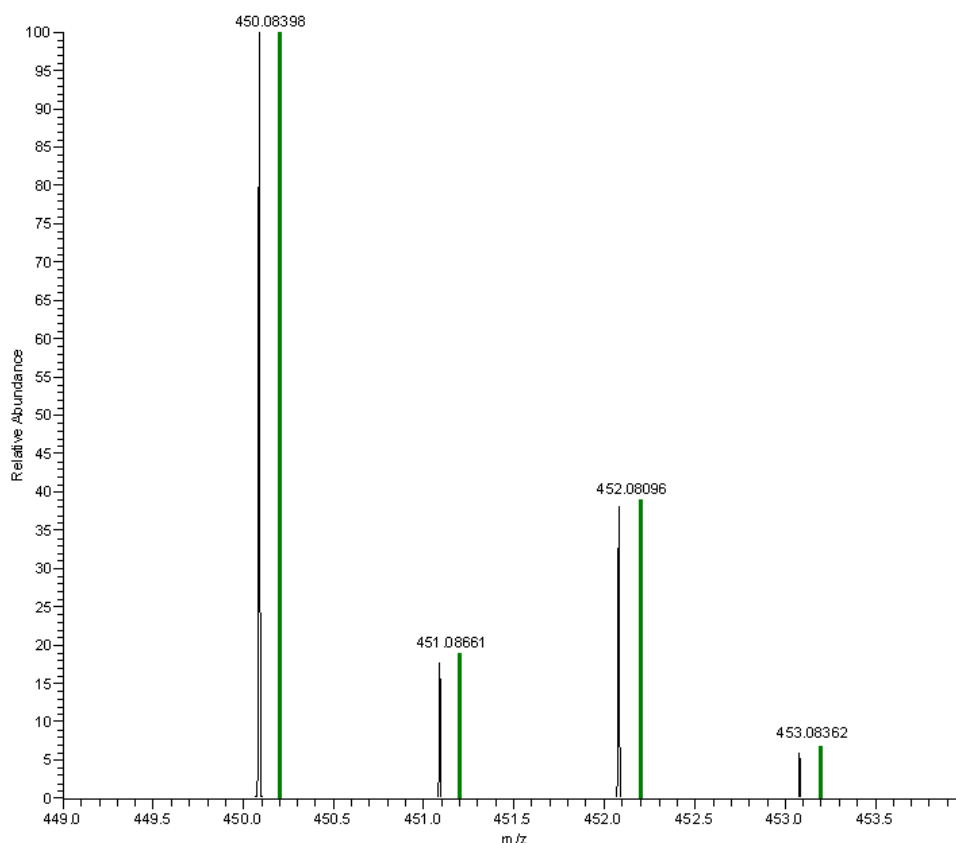


Figure 88 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de la 5-chloro-cylindrospermopsine

Enfin, la parfaite cohérence entre le massif isotopique théorique et les résultats expérimentaux (figure 88) atteste également de la présence d'un atome de chlore sur la molécule en question.

2.1.2. L'acide cylindrospermopsique

L'acide cylindrospermopsique de formule brute $C_{12}H_{19}N_3O_7S$ serait issu de la transformation de la 5-chloro-cylindrospermopsine (Banker *et al.*, 2001). L'ion moléculaire $[m + H]^+$ correspondant devrait alors être détectable en spectrométrie de masse par son rapport m/z théorique de 350,1021949 calculé selon les masses atomiques publiées par Audi et Wapstra (1995). Comme le montre la figure 89, le chromatogramme du rapport m/z 350,1 après 60 minutes de chloration présente en effet deux pics chromatographiques (1 pour chaque isomère de 5-chloro-cylindrospermopsine). Le spectre de masse obtenu en FTMS (figure 90) est en accord avec l'hypothèse de l'acide cylindrospermopsique en révélant un ion moléculaire correspondant au rapport m/z 350,101, soit une erreur de 3 ppm par rapport à la valeur théorique.

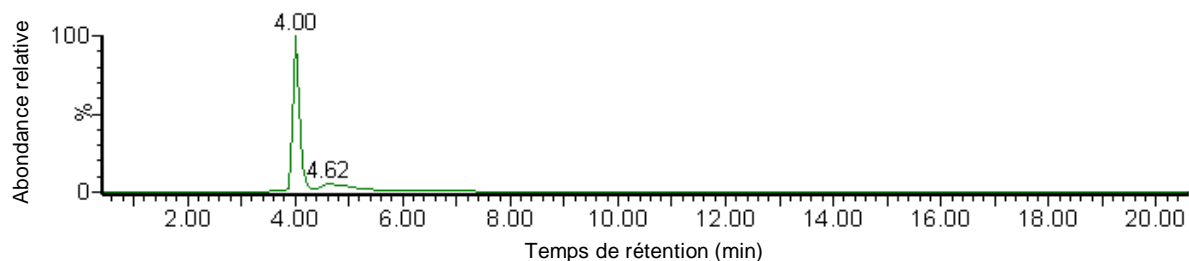


Figure 89 : Chromatogramme du rapport m/z 350,1 après 2 minutes de chloration

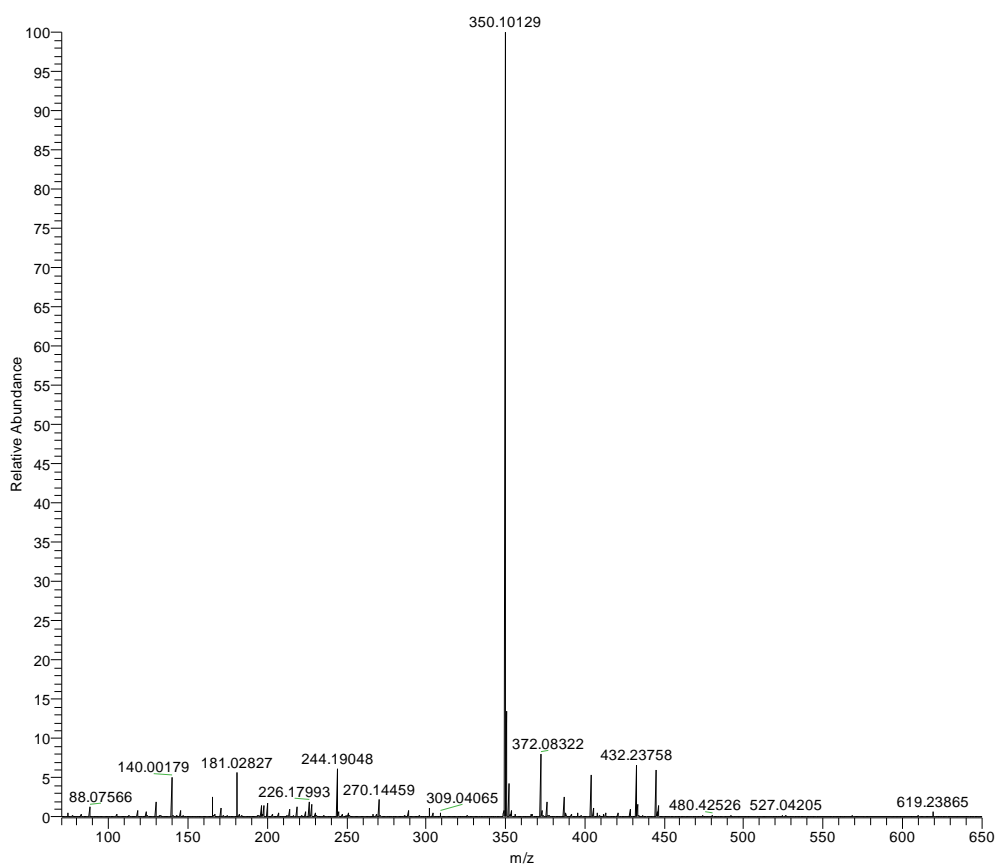


Figure 90 : Spectre de masse en FTMS de l'acide cylindrospermopsique

Les résultats des analyses en MS² sur l'ion moléculaire m/z 350,101 ne donnent guère d'informations supplémentaires quant à la structure des composés en question. En effet, seuls 2 ions fils sont observables sur le spectre MS² présenté sur la figure 91 : m/z 270,2 et m/z 252,2 correspondant respectivement à la perte d'une molécule de SO₃ seule et accompagnée de H₂O. Enfin, la similitude du massif isotopique théorique et des données expérimentales conforte l'hypothèse de la formation de deux isomères d'acide cylindrospermopsique, comme le montre la figure 92.

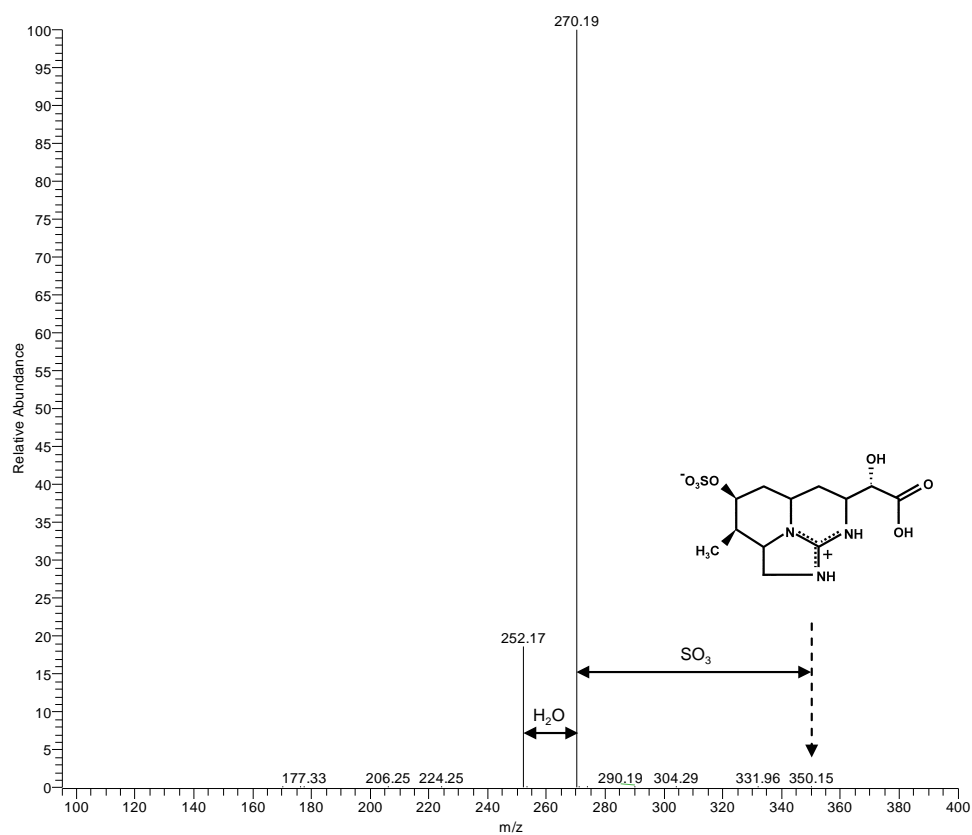


Figure 91 : Spectre MS² de l'acide cylindrospermopsique sur le rapport m/z 350,101

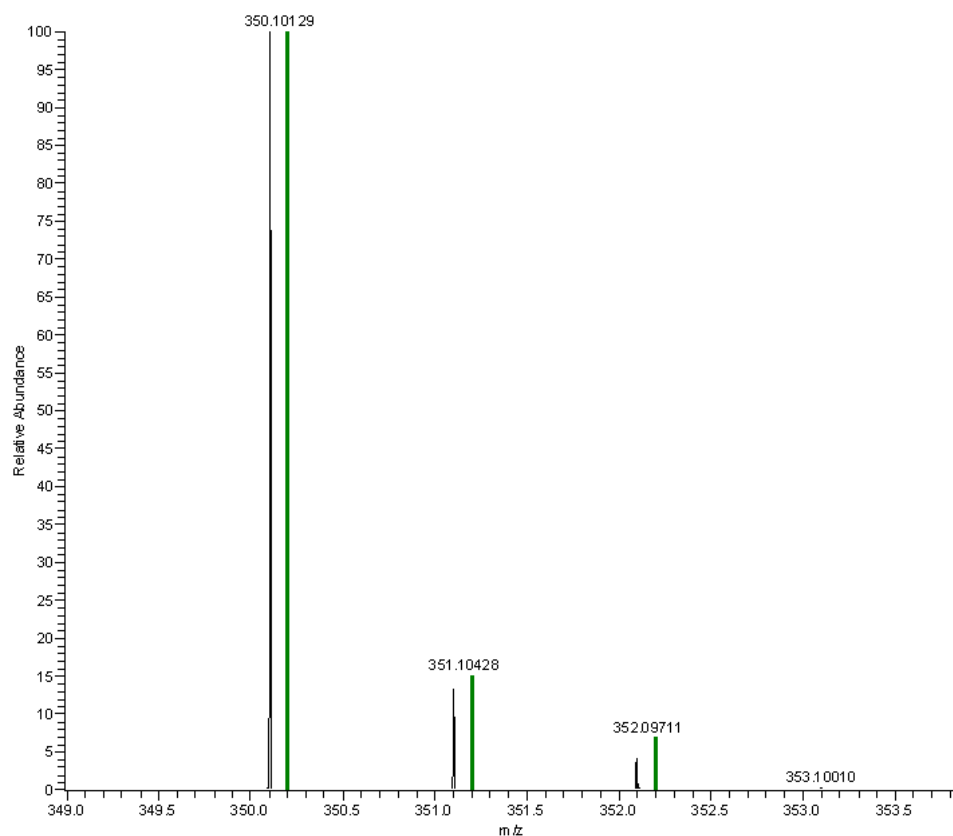


Figure 92 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental de l'acide cylindrospermopsique

2.1.3. Discussion

Les résultats présentés précédemment montrent que la chloration de la CYL conduit à la formation de 5-chloro-cylindrospermopsine et d'acide cylindrospermopsique. En effet, même avec un ratio molaire [chlore]/[toxine] 10 fois supérieur à celui d'études antérieures, les données de spectrométrie de masse sont en accord avec celles de Banker *et al.* (2001).

Ensuite, les expériences réalisées au cours de cette thèse mettent en évidence une réactivité identique de la CYL et de son isomère, la 7-épicylindrospermopsine, car chacun de ces composés donne lieu à la formation d'un isomère de 5-chloro-cylindrospermopsine et d'acide cylindrospermopsique. Néanmoins, de nouveaux résidus de chloration doivent encore être identifiés car les deux sous-produits caractérisés dans la littérature possèdent encore quelques fonctions telles que les liaisons N-H susceptibles de réagir avec le chlore. De plus, la seule formation des 2 produits caractérisés actuellement (Banker *et al.*, 2001) ne peut expliquer la totalité de la demande en chlore (5 mole/mole) renseignée auparavant.

2.2. Identification d'un nouveau sous-produit de chloration

Le recours à la technologie LTQ-Orbitrap a également permis l'identification d'un nouveau sous-produit de chloration de la CYL. Comme le montre le chromatogramme de la figure 93, après 60 minutes de chloration, ce composé peut être observé en spectrométrie de masse classique pour un ratio m/z de 375,1 et un temps de rétention plus faible encore que celui de la 5-chloro-cylindrospermopsine et de l'acide cylindrospermopsique.

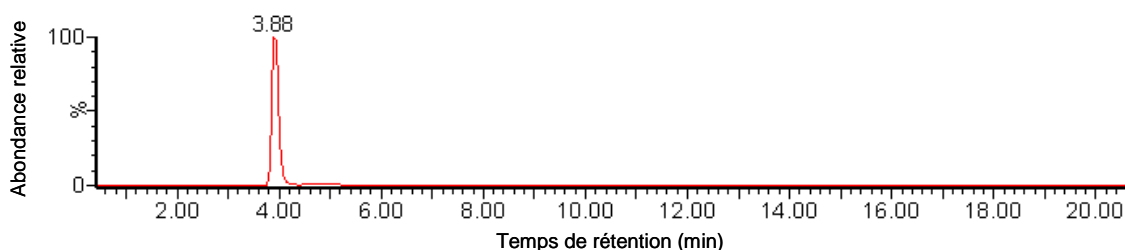


Figure 93 : Chromatogramme du rapport m/z 375,1 après 60 minutes de chloration

Selon les résultats obtenus en FTMS (figure 94), ce nouveau sous-produit de la CYL serait associé à un ion moléculaire $[m + H]^+$ de rapport m/z 375,097. Par conséquent, la formule brute suivante lui est attribuée : $C_{13}H_{18}N_4O_7S$. Selon les masses atomiques publiées par Audi et Wapstra (1995), cette formule brute se traduirait par un ion moléculaire de rapport m/z théorique 375,0974439 soit une erreur de 1 ppm par rapport à la valeur expérimentale.

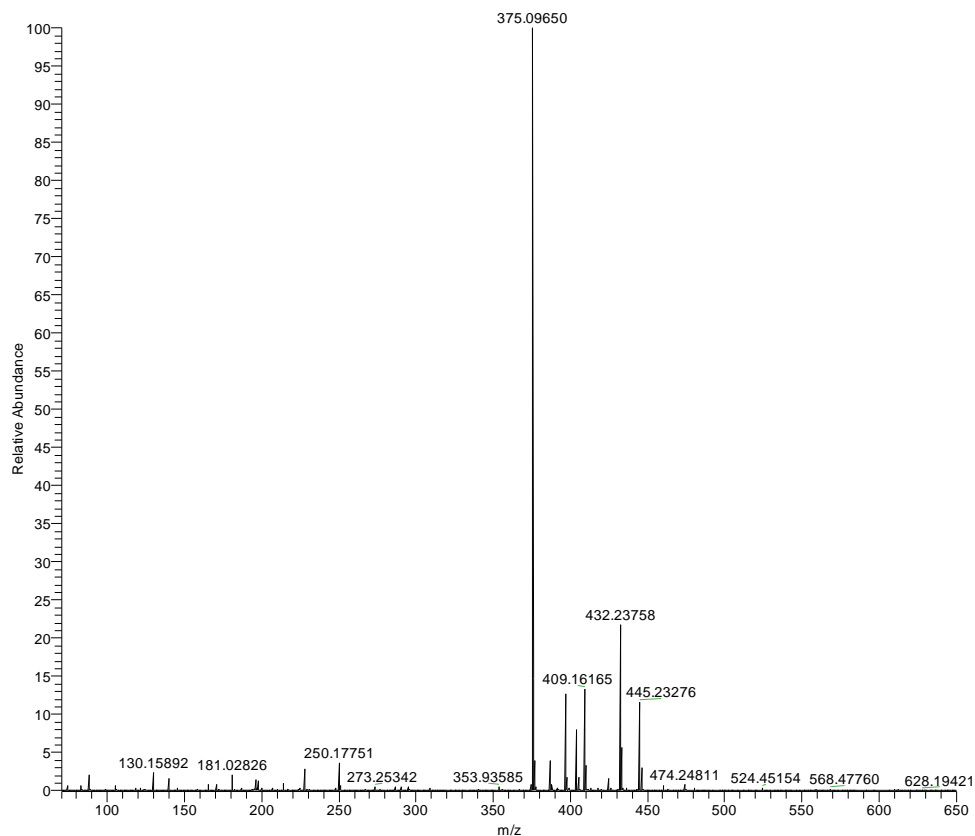


Figure 94 : Spectre de masse en FTMS du nouveau sous-produit de la CYL observé à m/z 375,1

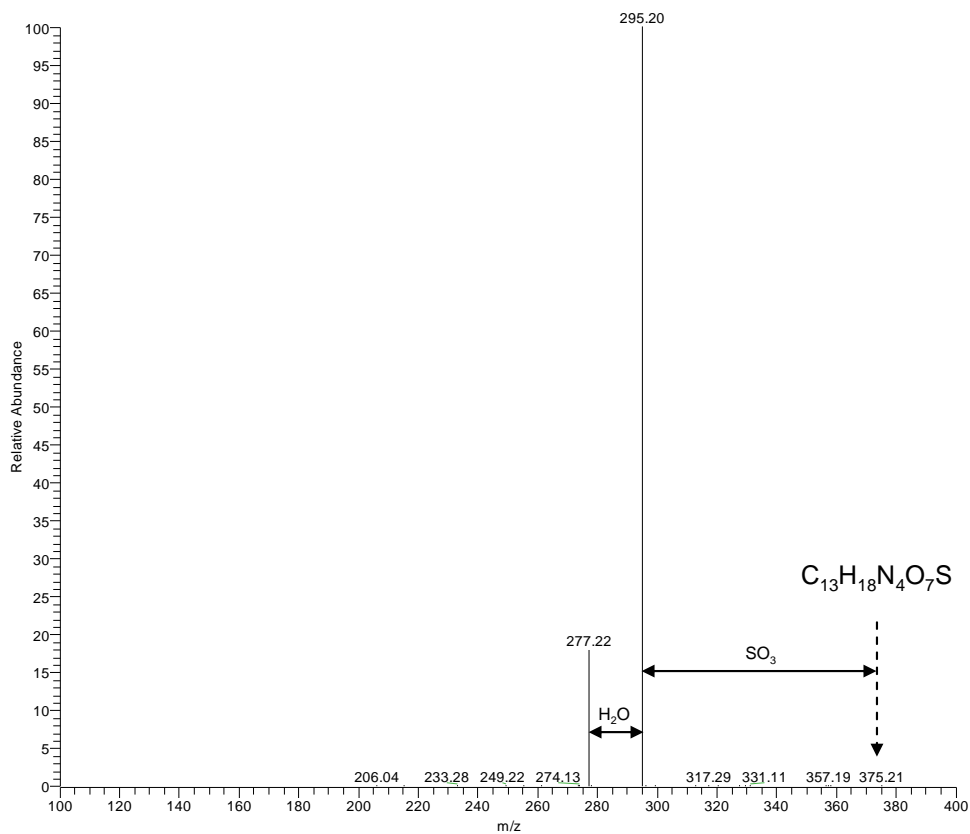


Figure 95 : Spectre MS² du nouveau sous-produit de la CYL sur le rapport m/z 375,097

Les analyses en MS² menées sur l'ion moléculaire m/z 375,097 ne donnent que très peu d'informations sur la structure de ce nouveau résidu de CYL. En effet, le spectre de MS² présenté sur la figure 95 ne montre la formation que de 2 ions fils : m/z 295,2 et m/z 277,2 correspondant respectivement à la perte d'une molécule de SO₃ seule et accompagnée de H₂O. Néanmoins, la présence de SO₃ sur le sous-produit en question indique que celui-ci comporte au moins pour partie l'unité guanidine tricyclique de la toxine initiale.

Enfin, de même que pour les autres sous-produits identifiés antérieurement, la cohérence entre le massif isotopique expérimental et le massif isotopique théorique (figure 96) tend à corroborer l'hypothèse émise quant à la formule brute du composé en question.

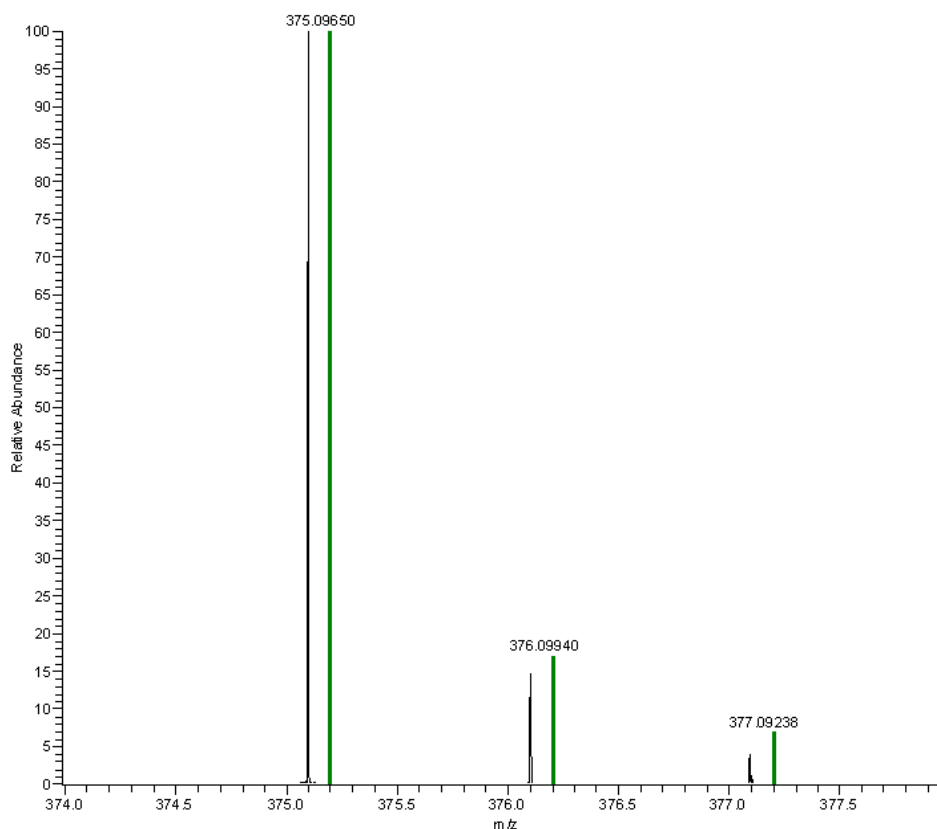


Figure 96 : Massif isotopique théorique (en vert) et expérimental du nouveau sous-produit de la CYL

Le nouveau sous-produit de chloration identifié au cours de cette étude résulte de la fragmentation de la CYL (perte de C₂H₃N). Cependant, aucun nom n'a pu lui être attribué en raison du manque d'informations concernant sa structure et son mécanisme de formation. En effet, bien que l'hypothèse de sa formule brute soit corroborée par un faisceau de preuves, sa structure développée reste à caractériser. Pour cela, la purification du composé par HPLC

préparative afin d'entreprendre une analyse en RMN pourrait être envisagée. Cependant, tout comme pour la MC-LR, le facteur limitant reste la faible quantité de matière disponible, car le coût de la CYL (270 € pour 100 µg) limite très fortement la quantité de toxine raisonnablement utilisable pour chaque manipulation. La réalisation d'une série d'expériences en MSⁿ pourrait être une solution intermédiaire. L'étude détaillée des différents ions fils permettrait alors d'approcher au mieux la structure de la molécule.

Ensuite, il semble que l'identification de ce sous-produit supplémentaire ne permette toujours pas d'expliquer pleinement le devenir de la CYL lors de la chloration. D'une part, l'existence d'autres résidus de toxine doit être considérée afin de justifier la demande en chlore de 5mole/mole. De plus, comme évoqué auparavant, en raison de la formation de chlore combiné au cours de la chloration, au moins un sous-produit ultime doit incorporer un atome de chlore. Or seule la 5-chloro-cylindrospermopsine implique un atome de chlore mais selon Banker *et al.* (2001) il ne s'agit que d'un composé intermédiaire. D'autre part, l'analyse des échantillons par couplage HPLC/MS/UV durant la chloration indique que le maximum d'absorbance à 305 nm mentionné auparavant, et attribué à un intermédiaire de réaction, n'est pas plus associé au composé C₁₃H₁₈N₄O₇S qu'aux autres sous-produits identifiés (Banker *et al.*, 2001).

Le suivi temporel de chaque composé devrait alors permettre de mieux cerner l'origine et la place du nouveau sous-produit caractérisé dans cette étude ainsi que des potentiels résidus de CYL encore non identifiés au sein du schéma réactionnel de la toxine.

2.3. Suivi des sous-produits de chloration

Comme en témoigne la figure 97, le suivi temporel des sous-produits de la CYL révèle 2 profils différents. Le premier d'entre eux est associé à la 5-chloro-cylindrospermopsine, résidu de CYL formé dès la mise en contact des réactifs. Sa concentration est maximale après 1 minute, puis elle diminue rapidement. En accord avec l'étude de Banker *et al.* (2001), ces résultats attestent que la 5-chloro-cylindrospermopsine ne serait qu'un intermédiaire réactionnel.

En revanche, le second profil associé à l'acide cylindrospermopsique et au composé C₁₃H₁₈N₄O₇S indique que ces derniers seraient des résidus ultimes de la CYL. En effet, chacun d'entre eux semble formé dès la mise en contact des réactifs. Leur concentration maximale est atteinte après environ 15 minutes et reste stable par la suite.

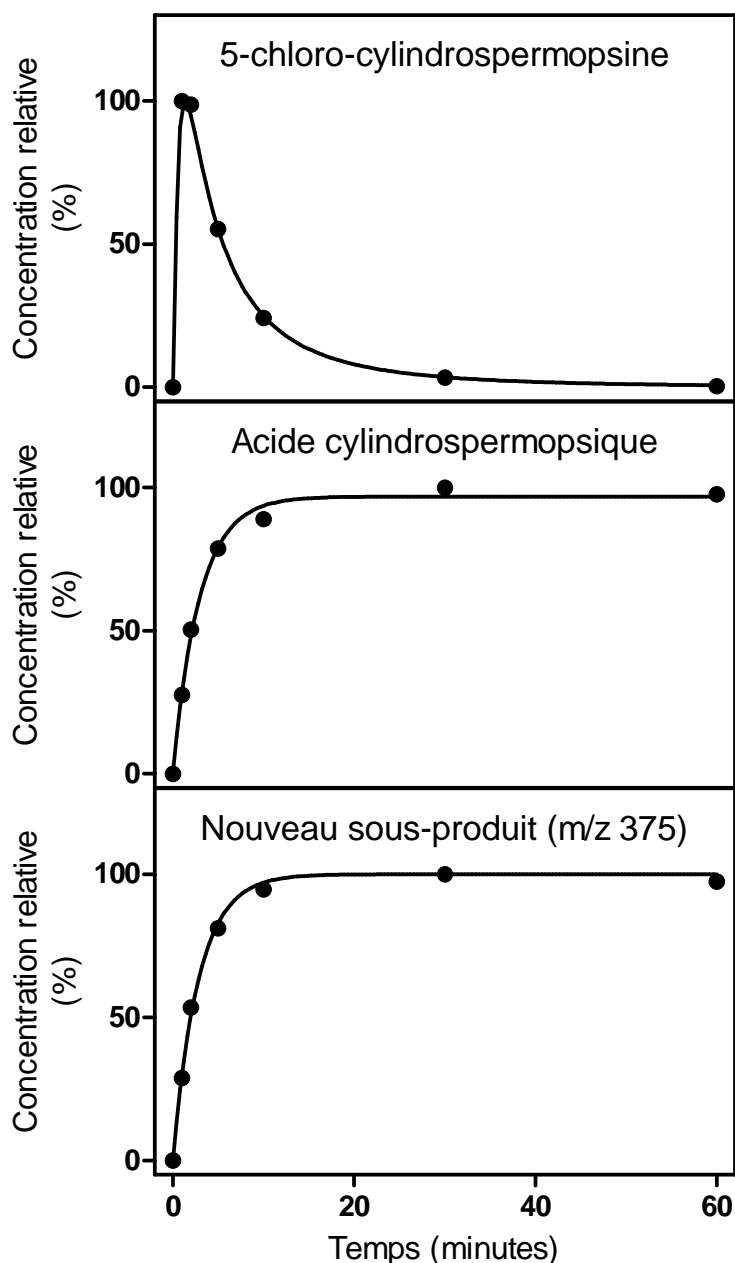


Figure 97 : Evolution temporelle des sous-produits de chloration de la CYL

Néanmoins, en considérant qu'une unité d'aire d'un pic chromatographique représente la même quantité de matière (exprimée en mole) quel que soit le composé, le suivi temporel des 3 produits de chloration précédents indique que ceux-ci n'expliquent le devenir que d'une partie de la CYL initiale. En fait, à leur concentration maximale, la 5-chloro-cylindrospermopsine, l'acide cylindrospermopsique et $C_{13}H_{18}N_4O_7S$ ne représentent respectivement que 35 %, 20 % et 15 % de la toxine initiale. En considérant ces données, la chloration de la CYL peut être envisagée selon un nouveau schéma proposé sur la figure 98.

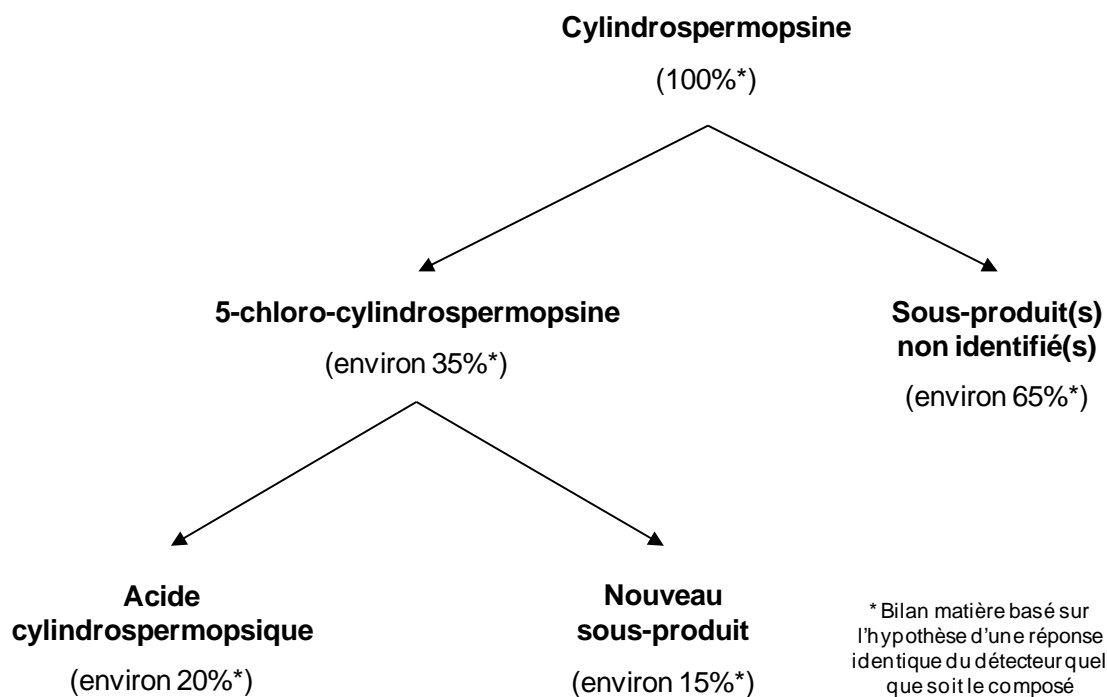


Figure 98 : Proposition de mécanisme de transformation de la CYL par le chlore

Comme le suggèrent Banker *et al.* (2001), la cylindrospermopsine serait premièrement transformée en 5-chloro-cylindrospermopsine à environ 35 %. Les 65 % restant seraient alors des composés non identifiés actuellement, dont un intermédiaire caractérisé par un maximum d'absorbance à 305 nm et un résidu ultime responsable du chlore combiné mentionné auparavant. Enfin, la complémentarité de l'acide cylindrospermopsique (20 %) et de $C_{13}H_{18}N_4O_7S$ (15 %) indique qu'ils seraient issus de la transformation de la 5-chloro-cylindrospermopsine.

3. EFFET DE LA CHLORATION SUR LA TOXICITE

De la même manière que pour la MC-LR, la toxicité post-chloration (après 60 minutes de réaction) a été estimée sur la globalité du milieu réactionnel grâce aux tests Microtox, MTT et rouge neutre.

3.1. Le test Microtox

On rappelle que la toxicité estimée par Microtox est exprimée par le facteur d'inhibition (H_{30}) de la luminescence de *V. fischeri* après 30 minutes de contact avec le milieu à analyser. La figure 99 présente alors les résultats obtenus pour divers échantillons dont la CYL et la CYL chlorée.

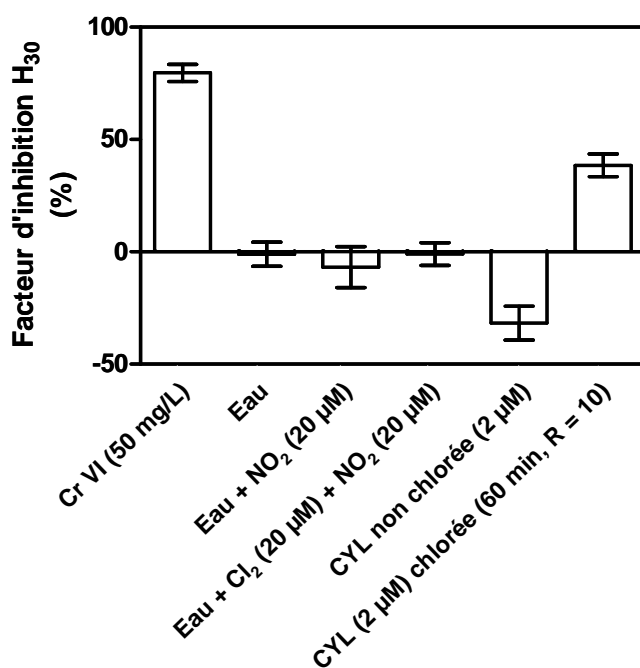


Figure 99 : Estimation de la toxicité du milieu contenant la CYL par Microtox (écarts-types calculés avec $n = 3$)

Tout d'abord, le facteur d'inhibition de 80 % (conforme aux attentes) pour l'échantillon de Cr VI témoigne de la validité des tests. On remarque ensuite que l'eau, ainsi que le chlore libre réduit par le nitrite, ne sont pas à l'origine d'un facteur d'inhibition significativement différent de 0.

D'autre part, on remarque que la CYL ne montre pas de toxicité pour *V. fischeri* comme en témoigne le facteur d'inhibition H_{30} de -30% (la CYL pourrait agir sur le corum sensing ou sur la régulation de l'opéron Lux pour augmenter la luminescence). Néanmoins, la valeur de H_{30} atteint 38 % après la chloration de la toxine. Par conséquent, sur un organisme tel que *V. fischeri*, la chloration de la CYL s'avère avoir un impact négatif du point de vue de la toxicité.

3.2. Le test MTT

On rappelle qu'après exposition des cellules Caco-2 à divers milieux, le test MTT détermine la toxicité de ces derniers par estimation de l'activité mitochondriale globalement représentative de la viabilité cellulaire. La figure 100 présente alors les résultats obtenus pour différentes concentrations de CYL, avant et après chloration.

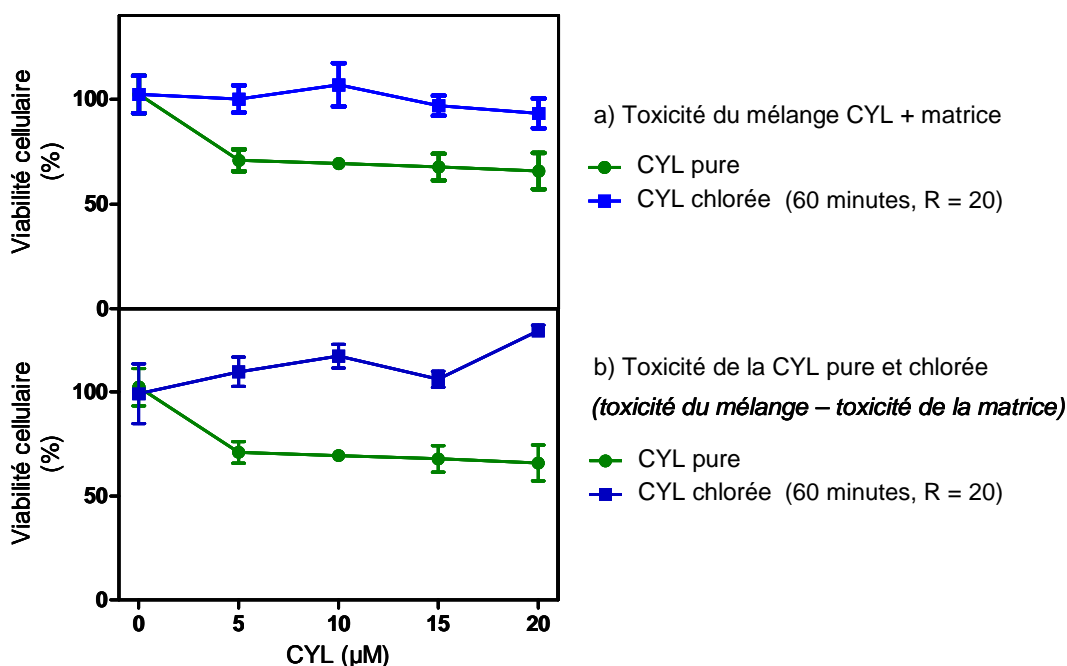


Figure 100 : Résultats du test MTT pour la CYL chlorée et non chlorée (écarts-types calculés avec n = 3)

A la différence de la MC-LR, la CYL est mise en solution dans l'eau. La toxicité observée avant chloration est donc uniquement engendrée par la toxine. Dans ces conditions, la viabilité cellulaire n'est que de 71 % pour 5 µM de CYL. Cependant, on remarque peu d'effet dose dépendant entre 5 et 20 µM car à la plus forte concentration la viabilité cellulaire est encore de 65 %.

Lorsque l'on retranche l'effet de la matrice, on observe alors l'absence de toxicité résiduelle après la chloration. En effet, la viabilité cellulaire est toujours comprise entre 99 % et 129 %. Contrairement aux résultats obtenus avec Microtox, la chloration de la CYL semble donc réduire la toxicité du milieu sur les cellules Caco-2.

3.3. Le test Rouge Neutre

On rappelle qu'après exposition des cellules Caco-2 à diverses solutions, le test au rouge neutre permet de déterminer la toxicité de ces dernières grâce à la viabilité cellulaire estimée par l'activité des lysosomes. La figure 101 illustre alors les résultats obtenus pour différentes concentrations de CYL, avant et après chloration.

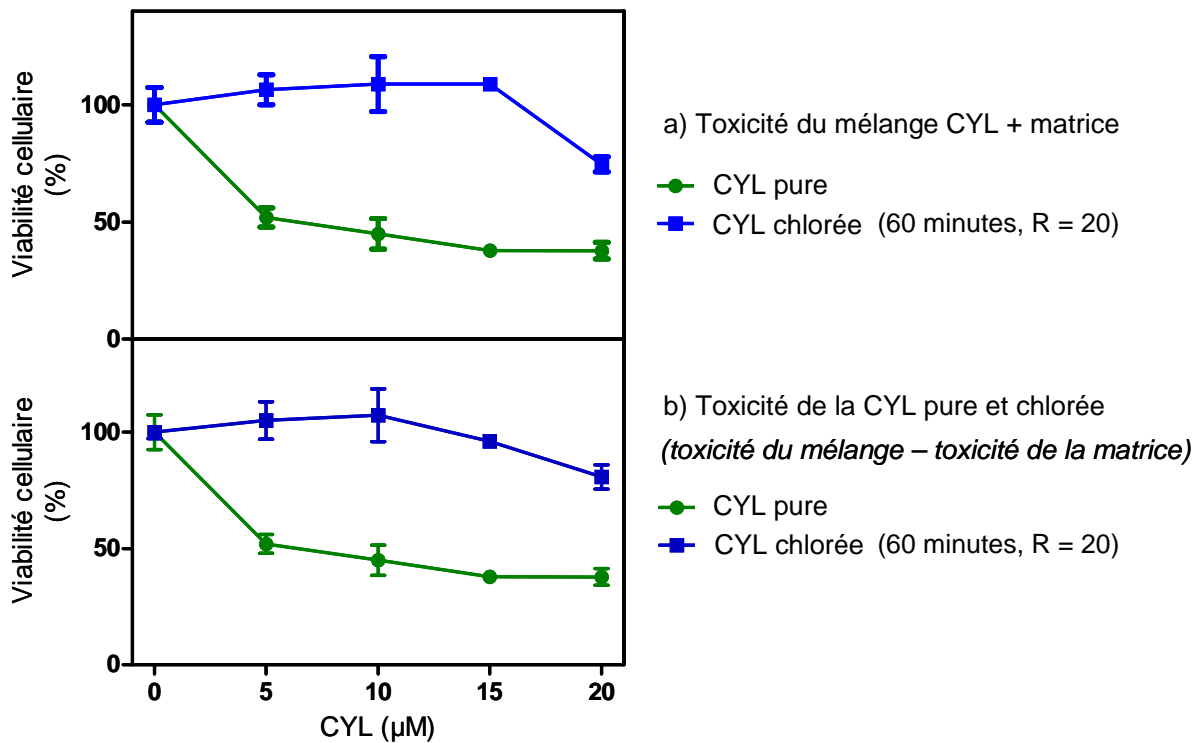


Figure 101 : Résultats du test rouge neutre pour la CYL chlorée et non chlorée (écarts-types calculés avec n = 3)

On remarque que les résultats sont similaires mais plus marqués qu'avec le test MTT. En effet, avant chloration, la viabilité cellulaire n'est que de 52 % pour 5 µM de CYL puis elle diminue progressivement jusqu'à 38% lorsque la concentration en toxine atteint 15 µM.

D'autre part, on note une nette diminution de la toxicité après chloration. En fait, après avoir déduit l'effet de la matrice, pour une concentration de toxine comprise entre 0 et 15 μM , la viabilité cellulaire varie entre 96 % et 107 %. Cependant, pour la plus forte concentration de CYL, on observe une certaine toxicité résiduelle avec une viabilité cellulaire de 81 %. Contrairement aux résultats obtenus avec Microtox, la transformation de la CYL par le chlore s'accompagne donc d'une diminution de la toxicité sur les cellules Caco-2.

3.4. Discussion

De la même manière que pour la MC-LR, les résidus de chloration de la CYL semblent interférer avec le métabolisme de *V. fischeri*. Plusieurs hypothèses peuvent alors être avancées. Tout d'abord, les produits de chloration pourraient agir directement sur la luciférase à l'origine de la luminescence et inhiber son activité ou bien altérer la régulation des gènes responsables de la synthèse de cette enzyme. De plus, les produits de chloration de la CYL pourraient tout aussi bien être responsables d'une mortalité cellulaire importante qui provoquerait une diminution de la luminescence. Le test Microtox suggère donc une augmentation de la toxicité après chloration. Cependant, le phénomène inverse est observé avec les tests MTT et rouge neutre. Les cellules Caco-2 et la bactérie *V. fischeri* présentent donc une vulnérabilité très différente vis-à-vis des toxines et de leurs résidus. De nombreux facteurs tels que la diversité des métabolismes cellulaires ou encore la différence de perméabilité des cellules peuvent expliquer ces résultats contradictoires.

Les cellules Caco-2 étant des cellules humaines (cellules du colon), les résultats des tests MTT et rouge neutre semblent a priori les plus à mêmes de refléter l'impact de la chloration sur la toxicité du milieu pour l'homme. Cependant, les mêmes tests devraient également être entrepris sur d'autres types de cellules telles que les cellules hépatiques HepaRG par exemple. En effet, des cellules humaines aux propriétés distinctes pourraient présenter une vulnérabilité différente aux toxines et à leurs résidus.

Enfin, les résultats obtenus sur une bactérie ou un type de cellule particulier ne reflètent pas nécessairement l'action d'un composé à l'échelle d'un organe ou d'un organisme complexe. Par conséquent, bien que plus difficile à mettre en œuvre, un examen de la toxicité post-chloration par injection i.p. chez la souris pourrait également s'avérer judicieux afin de mieux estimer le risque pour l'homme. De plus, les résultats du test Microtox incitent à réaliser des tests complémentaires.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en évidence l'intérêt de combiner diverses méthodes analytiques pour mieux comprendre le comportement de micropolluants naturels émergents face à la chloration. Les résultats obtenus peuvent alors être analysés selon 3 axes : la compréhension de la transformation des toxines, l'effet de cette transformation sur la toxicité du milieu, et enfin les conséquences pour la production d'eau destinée à la consommation humaine.

1. Transformation des toxines

Tout d'abord, en accord avec les études publiées auparavant (Tsuji *et al.*, 1997 ; Senogles *et al.*, 2000 ; Banker *et al.*, 2001 ; Acero *et al.*, 2005 ; Rodríguez *et al.*, 2007b ; Rodríguez *et al.*, 2007c), le suivi de la MC-LR et de la CYL par spectrométrie de masse lors de chloration montre que chacune des toxines est très rapidement transformée. Mais parallèlement, les sous-produits de la réaction identifiés au cours de cette thèse ne suffisent pas à expliquer la totalité de la demande en chlore enregistrée (12 mol/mol pour la MC-LR et 5 mol/mol pour la CYL). Ils ne représentent donc qu'une partie de l'ensemble des sous-produits formés. Les bilans matière révèlent alors que seulement 10% du devenir de la MC-LR et 35% du devenir de la CYL seraient expliqués. Néanmoins, ces bilans matière ne constituent qu'une première approche car ils sont basés sur l'hypothèse d'une réponse identique du détecteur quel que soit le composé. Or, dans la pratique, cette hypothèse est rarement vérifiée. En effet, les limites de détection et les pentes des droites d'étalonnage sont généralement propres à chaque molécule.

Le bilan matière de la chloration des toxines conduit à s'interroger sur la nature des sous-produits non identifiés. Il peut ainsi être envisagé qu'une partie de la toxine initiale se fragmente en composés de faible taille. Ceux-ci pourraient alors être plus facilement détectés par chromatographie en phase gazeuse que par chromatographie liquide. De plus, il serait également opportun de rechercher la formation de produits de chloration classiques tels que les THMs ou acides haloacétiques par exemple. Cependant, la quantité importante de toxine nécessaire à ces expérimentations rend leur réalisation difficile.

Ensuite, lorsque l'on considère les sous-produits de la MC-LR ou de la CYL identifiés au cours de cette étude, on remarque que seules leurs formules brutes sont présentées. En effet, les analyses en MS² réalisées n'ont pas permis de mieux caractériser leurs structures. Afin d'obtenir les structures développées, il conviendrait d'entreprendre diverses expériences en MSⁿ ou d'avoir recours à l'isolation et à la purification des sous-produits avant de les analyser un à un par RMN. Néanmoins, ces manipulations n'ont pu être réalisées au cours de cette thèse en raison de la quantité trop importante de toxine requise.

Enfin, l'ensemble des résultats de cette thèse a été obtenu en laboratoire, avec des toxines mises en solution dans une eau ultra pure et à une concentration environ 1000 fois supérieure à celle des eaux naturelles. Or, une concentration en toxine plus faible (de l'ordre du nM) pour une dose de chlore restant de l'ordre du µM en production d'eau potable se traduit par un rapport [chlore]/[toxine] plusieurs dizaines de fois supérieur à celui de cette étude. Par conséquent, malgré l'existence d'un phénomène de compétition entre les cyanotoxines et la faible quantité de matière organique présente dans l'eau à désinfecter (COD généralement compris entre 1 et 3 mg/L en Bretagne), on peut alors envisager qu'un si large excès de chlore puisse modifier les proportions respectives des sous-produits de chloration de la MC-LR et de la CYL au détriment des composés intermédiaires. Les résultats de laboratoire devront donc être confirmés par des expériences supplémentaires menées sur une eau prélevée au sein d'une installation de production d'eau alimentaire (avant l'étape de désinfection). De plus, les eaux naturelles peuvent parfois contenir différents variants d'une même toxine voire un mélange de toxines ayant des comportements différents face au chlore (Ho *et al.*, 2006a ; Merel *et al.*, 2010). La méthodologie développée au cours de cette thèse et éprouvée sur la MC-LR et la CYL pourrait alors être appliquée à d'autres toxines dont on connaît la vulnérabilité face au chlore mais dont les sous-produits n'ont pas encore été étudiés, par exemple les STXs (Nicholson *et al.*, 2003).

2. Effet de la chloration sur la toxicité du milieu

L'étude de la toxicité du milieu après chloration des cyanotoxines donne à ce travail de thèse une dimension plus pratique en permettant de faire le lien entre la chloration de la MC-LR et de la CYL et ses conséquences pour le consommateur d'eau.

Les essais menés sur la bactérie *Vibrio fischeri* montrent une diminution de la bioluminescence après chloration de la MC-LR et de la CYL, donc une augmentation de la

toxicité du milieu. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précaution. En effet, certaines études montrent un intérêt limité du test Microtox pour apprécier la toxicité d'un milieu contenant des cyanotoxines (Vezie *et al.*, 1996 ; Harada *et al.*, 1999). De plus, même après neutralisation du chlore libre, une faible quantité de chlore combiné dans l'échantillon pourrait expliquer l'inhibition de la luminescence sans refléter pour autant une réelle toxicité pour l'homme. Par exemple, l'eau alimentaire induit aussi une inhibition importante de la luminescence de *V. fischeri*. Enfin, des résultats obtenus sur une bactérie ne sont pas directement transposables à l'homme car le fonctionnement d'un être unicellulaire n'est en rien comparable avec celui d'un organisme complexe tel que l'être humain.

Les tests effectués sur les cellules humaines Caco-2 ne montrent pas de différence de toxicité après chloration de la MC-LR mais montrent clairement une diminution de la toxicité après chloration de la CYL. Néanmoins, là encore, les résultats doivent être interprétés avec précaution car des données obtenues sur une culture d'un type particulier de cellules humaines ne permettent pas de tirer des conclusions pour l'être humain. En effet, un composé non toxique pour des cellules intestinales pourrait s'avérer toxique pour des cellules hépatiques ou nerveuses. Par conséquent, les résultats obtenus sur les cellules Caco-2, doivent être confirmés par l'utilisation d'autres modèles cellulaires. De plus, des tests supplémentaires tels que le test des comètes ou encore le test d'Ames pourraient également être entrepris afin de rechercher d'éventuels effets mutagènes.

Enfin, pour obtenir des résultats plus facilement transposables à l'homme, des essais de toxicité sur organismes entiers pourraient être envisagés (bien que ces méthodes posent de plus en plus de questions éthiques). Par exemple, la souris est l'animal de référence pour la transposition des données à l'homme mais le poisson medaka est également utilisé avec succès pour étudier la toxicité de la microcystine (Djediat *et al.*, 2010). De plus, les essais sur organismes entiers permettraient de tester la toxicité chronique des toxines chlorées et ainsi de modéliser au mieux l'exposition de l'homme par le biais de la consommation d'eau alimentaire.

3. Conséquences pour la production d'eau alimentaire

En pratique, la désinfection de l'eau potable par le chlore laisse un résiduel de chlore libre proche de 0,5 mg/L (soit 7 µM) en sortie de traitement. Or, une concentration en MC-LR ou en CYL de 20 nM (soit 1000 fois moindre que dans cette étude) dans l'eau à désinfecter

représenterait une très forte contamination en cyanotoxine. Par conséquent, en considérant le seul chlore libre résiduel dans le cas d'une telle contamination (cas le plus défavorable), le ratio molaire [chlore]/[toxine] serait au moins égal à 350. La demande en chlore étant de 12 mole/mole et 5 mole/mole respectivement pour la MC-LR et pour la CYL, une telle dose de chlore permettrait donc une transformation efficace de chacune des toxines. De plus, la faible quantité de matière organique dans l'eau à ce stade du traitement ne devrait pas interférer avec la chloration des cyanotoxines. Les sous-produits observés et identifiés lors de cette étude sont donc effectivement susceptibles d'être formés sur une installation de production d'eau alimentaire.

Les recherches menées au cours de cette thèse peuvent également permettre d'améliorer le contrôle sanitaire de l'eau potable. Par exemple, le chlore résiduel devrait impérativement être neutralisé au moment du prélèvement des échantillons car le reliquat éventuel de toxine risque fort d'être déjà transformé au moment de l'analyse en laboratoire. Ensuite le contrôle du paramètre cyanotoxine ne devrait pas être limité à la seule détection des toxines mais être étendu à leurs sous-produits, si ces derniers révèlent un quelconque effet toxique. Des recherches complémentaires devraient alors être entreprises afin de développer une méthode analytique adaptée.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au regard des préoccupations liées à la présence de prolifération de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux de surface utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine, l'objectif de cette thèse a été de contribuer à la compréhension du comportement des cyanotoxines face à la désinfection par le chlore.

La littérature très abondante sur l'occurrence des cyanobactéries et de leurs toxines se restreint très fortement lorsqu'il s'agit de leur gestion au sein des filières de production d'eau alimentaire. La première partie de ce travail dresse un état des connaissances en la matière et révèle que, parmi les techniques physiques, seules l'adsorption sur charbon actif, la nanofiltration et l'osmose inverse semblent réellement à même de retenir les cyanotoxines. D'autre part, en fin de traitement, les procédés d'oxydation tels que l'ozonation ou la chloration montrent une forte propension à transformer les métabolites de cyanobactéries. Cependant, la littérature n'apporte pas la preuve formelle que la transformation des toxines soit bénéfique pour le consommateur d'eau. En effet, le premier chapitre de ce mémoire met en évidence la méconnaissance des sous-produits formés et la nécessité d'entreprendre des travaux de recherche afin d'y remédier.

Avec la combinaison de techniques analytiques, ce travail de thèse a permis d'examiner le comportement de 2 cyanotoxines vis-à-vis du chlore : la MC-LR et la CYL. Comme en témoignent les constantes cinétiques de premier ordre, respectivement $1,6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ et $3,4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, chacune d'entre elles est rapidement transformée dès la mise en contact avec l'agent oxydant. La demande en chlore importante observée dans cette étude (12 mole/mole pour la MC-LR et 5 mole/mole pour la CYL) laisse alors entrevoir une dégradation des toxines selon un schéma réactionnel complexe mettant en jeu de multiples réactions successives et divers intermédiaires. De plus, le suivi des réactifs conforte cette hypothèse en montrant que la transformation de la MC-LR et de la CYL se poursuit respectivement durant 30 et 20 minutes au delà de la disparition de la molécule initiale.

Le suivi du spectre UV du milieu réactionnel permet alors de préciser quelque peu les conditions de transformation des cyanotoxines. En effet, l'hypothèse de conservation de la

masse au sein du milieu réactionnel durant la chloration n'est vérifiée ni pour la MC-LR ni pour la CYL. Cependant, dans le cas de la MC-LR, la présence de points isobestiques latents permet de conclure à la conservation qualitative de l'échantillon. En revanche, dans le cas de la CYL, l'observation des spectres UV indique que la toxine est rapidement transformée en un intermédiaire, mais la conservation qualitative du milieu n'intervient que lors de la dégradation de ce dernier.

La technologie LTQ-Orbitrap a permis l'identification de 4 nouveaux sous-produits de la MC-LR : la monochloro-microcystine, la monochloro-dihydroxy-microcystine, dichloro-dihydroxy-microcystine et la trichloro-hydroxy-microcystine. Elle a également permis la mise en évidence de 4 nouveaux isomères de la dihydroxy-microcystine et la correction de l'identité d'un sous-produit déjà observé : la monochloro-hydroxy-microcystine. De plus, l'utilisation du LTQ-Orbitrap est aussi à l'origine de la découverte d'un nouveau sous-produit de la CYL ayant pour formule brute $C_{13}H_{18}N_4O_7S$.

L'étude de la toxicité du milieu après chloration permet de faire le lien entre la transformation des toxines et les conséquences potentielles pour le consommateur d'eau. Les tests réalisés sur la bactérie *V. fischeri* semblent mettre en évidence une augmentation de la toxicité du milieu après la chloration de la MC-LR et de la CYL. Néanmoins, les résultats obtenus sur les cellules humaines Caco-2 ne confirment pas cette tendance. En effet, les tests MTT et rouge neutre mettent clairement en avant une diminution de la cytotoxicité après la chloration de la CYL. En revanche, on ne peut conclure efficacement dans le cas de la MC-LR car la toxine initiale elle-même ne montre pas de toxicité aux concentrations testées.

La caractérisation des sous-produits de la chloration de la MC-LR et de la CYL initiée au cours de ce travail de thèse met en évidence de nombreuses perspectives pour de futurs travaux de recherche. Tout d'abord, le devenir des toxines n'est toujours pas totalement élucidé. Le suivi de la réaction par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permettrait probablement d'identifier de nouveaux sous-produits de faible masse moléculaire qui résulteraient de la fragmentation des composés initiaux. Par ailleurs, la production et la purification de cyanotoxines en laboratoire (via la culture de souches toxiques et la réalisation de chromatographie préparative) autoriseraient la conception d'expérimentations nécessitant une quantité importante de MC-LR ou de CYL. Il serait alors possible de mesurer la formation de THMs ou d'acides haloacétiques au cours de la chloration

des toxines. Il serait également envisageable d'isoler et de concentrer chaque sous-produit en quantité suffisante pour réaliser une analyse en RMN et en déduire sa formule développée.

D'autre part, les premiers résultats de toxicité obtenus au cours de ce travail de thèse demandent à être confirmés car les tests réalisés sur une bactérie ou un seul type de cellule humaine ne peuvent être transposés directement à l'homme. De prochaines études devraient envisager de répéter les tests MTT et rouge neutre sur d'autres modèles que les cellules Caco-2 tout en recherchant d'éventuels effets génotoxiques des toxines chlorées par le test des comètes ou le test d'Ames par exemple. De plus, malgré les réticences liées à l'éthique, la mise en œuvre de tests sur des organismes entiers tels que la souris ou le poisson medaka permettrait à la fois d'obtenir des résultats plus facilement transposables à l'être humain mais également d'étudier la toxicité chronique de la MC-LR et de la CYL chlorée.

Enfin, de futurs travaux devront être entrepris afin de confirmer la validité des résultats de laboratoire dans une eau prélevée sur une installation de production d'eau potable, en amont de l'étape de désinfection. Ces recherches devront également prendre en considération le cas de cyanotoxines en mélange. La démarche développée au cours de cette thèse pourrait alors être appliquée aux STXs dont les sous-produits de chloration ne sont pas encore connus, mais également à tout autre polluant émergent, tel que les produits pharmaceutiques, ou tout autre traitement dégradatif, tel que l'ozonation ou l'irradiation UV.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acero, J.L., Rodríguez, E., Meriluoto, J., 2005. Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins, *Water Research* 39, pp. 1628-1638.
- Acero, J.L., Rodríguez, E., Majado, M.E., Sordo, A., Meriluoto, J., 2008. Oxidation of microcystin-LR with chlorine and permanganate during drinking water treatment, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA* 57, pp. 371-380.
- AFSSA/AFSSET, 2006. Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives. pp. 1-230. Rapport réalisé à l'initiative des ministères chargés de l'environnement et de la santé.
- Almeida, V.P.S., Cogo, K., Tsai, S.M., Moon, D.H., 2006. Colorimetric test for the monitoring of microcystins in cyanobacterial culture and environmental samples from southeast - Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology* 37, pp. 192-198.
- An, J., Carmichael, 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, pp. 1495-1507.
- Arheimer, B., Andreasson, J., Fogelberg, S., Johnsson, H., Pers, C.B., Persson, K., 2005. Climate change impact on water quality: model results from southern Sweden, *Ambio* 34, pp. 559-566.
- Audi, G., Wapstra, A.H., 1995. The 1995 update to the atomic mass evaluation, *Nuclear physics A* 595, pp. 409-480.
- Aune, T., Berg, K., 1986. Use of freshly prepared rat hepatocytes to study toxicity of blooms of blue-green algae *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria agardhii*, *Journal of Toxicology and Environmental Health* 19, pp. 325-336.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru--Brazil, *Toxicology* 181-182, pp. 441-446.
- Ballot, A., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Kotut, K., Krienitz, L., 2003. Cyanobacterial toxins in Lake Baringo, Kenya, *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters* 33, pp. 2-9.
- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel, *Journal of Phycology*. 33, pp. 613-616.
- Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A., Carmeli, S., 2000. 7-epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from lake kinneret, Israel, *Journal of Natural Products* 63, pp. 387-389.

- Banker, R., Carmeli, S., Werman, M., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 2001. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin, *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part A* 62, pp. 281-288.
- Bernhardt, H., 1984. Treatment disturbances with water out of eutrophic reservoirs as consequences of extensive algal development, *Water supply* 2, pp. 4-7.
- Benoufella, F., Laplanche, A., Boisdon, V., Bourbigot, M.M., 1995. Elimination de trois espèces d'algues de type cyanobactéries par un procédé d'ozoflottation: approche de la toxicité avant et après traitement, *Techniques Sciences Méthodes* 10, pp.737-742.
- Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.F., Biré, R., Krys, S., Fontaine, J.J., 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain, *Environmental Toxicology* 18, pp. 176-186.
- Bernazeau, F., Baudin, I., Pieronne, P., Bruchet, A., Anselme, C., 1995. Traitement des problèmes des toxines générées par les algues, *Techniques, Sciences, Méthodes* pp. 747-748.
- 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 Chemical Toxicology* 40, pp. 1677-1683.
- Bourke, A.T.C., Hawes, R.B., Neilson, A., Stallman, N.D., 1983. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication, *Toxicon* 21, pp. 45-48.
- Bourne, D.G., Blakeley, R.L., Riddles, P., Jones, G.J., 2006. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters, *Water Research* 40, pp. 1294-1302.
- Briand, J-F., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J-F., 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems, *Veterinary Research* 34, pp. 361-377.
- Brient, L., Vezie, C., Bertru, G., 2001a. Evaluation des efflorescences à cyanobactéries dans des eaux de cours d'eau et de plans d'eau bretons, pp. 1-82. Rapport réalisé pour la DIREN Bretagne.
- Brient, L., Raoult, C., Le Rouzic, B., Vezie, C., Bertru, G., 2001b. Conditions d'utilisation du CuSO₄ pour limiter les proliférations de cyanobactéries et réduire ses effets sur l'environnement, *Techniques, Sciences, Méthodes* 9, pp. 66-74.
- Brient, L., Lengronne, M., Bertrand, E., Rolland, D., Sipel, A., Steinmann, D., Baudin, I., Legeas, M., Le Rouzic, B., Bormans, M., 2008. A phycocyanin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies, *Journal of Environmental Monitoring* 10, pp. 248-255.
- Brient, L., Lengronne, M., Bormans, M., Fastner, J., 2009. First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France, *Environmental Toxicology* 24, pp. 415-420.

- Briley, D.S., Knappe, D.R.U., 2002. Optimizing ferric sulfate coagulation of algae with streaming current measurements, *Journal of American Waterworks Association* 94, pp. 80-90.
- Brooke, S., Newcombe, G., Nicholson, B., Klass, G., 2006. Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation, *Toxicon* 48, pp. 1054-1059.
- Burns, J., 2008. Toxic cyanobacteria in Florida waters. Dans: Hudnell, K.H. (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Springer, New York, pp. 127-137.
- Byth, S., 1980. Palm Island mystery disease, *Medical Journal of Australia* 2, pp. 40-42.
- Cardellina, I.J.H., Marner, F.J., Moore, R.E., 1979. Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A, *Science* 204, pp. 193-195.
- Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins, *Journal of Applied Bacteriology* 72, pp. 445-459.
- Carmichael, W.W., Evans, W.R., Yin, Q.Q., Bell, P., Moczydlowski, E., 1997. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya Wollei* (Farlow ex Gomont) comb. Nov., *Applied and Environmental Microbiology* 63, pp. 3104-3110.
- Carmichael, W.W., An, J., 1999. Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins, *Natural Toxins* 7, pp. 377-385.
- 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, *Environmental Health Perspectives* 109, pp. 663-668.
- Carmichael, W., 2008. A world overview — One-hundred-twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria — Where do we go from here? Dans: Hudnell, K.H. (Eds.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Springer, New York, pp. 105-125.
- Carrasco, D., Moreno, E., Paniagua, T., de Hoyos, C., Wormer, L., Sanchis, D., Cirés, S., Martín del Pozo, D., Codd, G.A., Quesada, A., 2007. Anatoxin-a occurrence and potential cyanobacterial anatoxin-a producers in Spanish reservoirs, *Journal of Phycology*. 43, pp. 1120-1125.
- Castenholz, R.W., 1973. Ecology of blue-green algae in hot springs. Dans: Carr, N.G., Whitton, B.A. (Eds.). *The biology of blue-green algae*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp. 379-414.
- Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R., 1999. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition, *Environmental Toxicology* 14, pp. 155-161.

- Chow, C., Panglisch, S., Mole, J., Drikas, M., Burch, M., Gimbel, R., 1997. A study of membrane filtration for the removal of cyanobacterial cells, *Journal of Water Science Research and Technology-Aqua* 46, pp. 324-334.
- Chow, C.W.K., Drikas, M., House, J., Burch, M.D., Velzeboer, R.M.A., 1999. The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Water Research* 33, pp. 3253-3262.
- Codd, G.A., Edwards, C., Beattie, K.A., Barr, W.M., Gunn, G.J., 1992. Fatal attraction to cyanobacteria?, *Nature* 359, pp. 110-111.
- Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005a. Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. Dans: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (Eds.). Harmful cyanobacteria. Springer, Dordrecht (Pays-Bas), pp. 1-23.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005b. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection, *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, pp. 264-272.
- Cong, L., Huang, B., Chen, Q., Lu, B., Zhang, J., Ren, Y., 2006. Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 569, pp. 157-168.
- Dai, R., Liu, H., Qu, J., Ru, J., Hou, Y., 2008. Cyanobacteria and their toxins in Guanting Reservoir of Beijing, China, *Journal of Hazardous Materials* 153, pp. 470-477.
- Dale, B., Edwards, M., Reid, P.C., 2006. Climate change and harmful algal blooms. Dans: Granéli, E., Turner, J.T. (Eds.). Ecology of harmful algae. Springer, New York, pp. 367-378.
- Daly, R.I., Ho, L., Brookes, J.D., 2007. Effect of chlorination on *Microcystis aeruginosa* cell integrity and subsequent microcystin release and degradation, *Environment Science and Technology* 41, pp. 4447-4453.
- Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins, *Toxicon* 36, pp. 953-962.
- De Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Goncalves, F.J.M., Pereira, M.J., 2004. Microcystin-producing blooms--a serious global public health issue, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59, pp. 151-163.
- Deborde, M., Von Gunten, U., 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment--Kinetics and mechanisms: A critical review, *Water Research* 42, pp. 13-51.
- Denney, R.C., Sinclair, R., 1987. Visible and Ultraviolet Spectroscopy. John Wiley & Sons, Chichester (Angleterre).
- Deppe, T., Ockenfeld, K., Meybohm, A., Opitz, M., Benndorf, J., 1999. Reduction of *Microcystis* blooms in a hypertrophic reservoir by a ecotechnological strategy, *Hydrobiologia* 408/409, pp 31-38.

- Diehnelt, C.W., Peterman, S.M., Budde, W.L., 2005. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry and accurate m/z measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24, pp. 622-634.
- Dietrich, D., Hoeger, S., 2005. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach?, *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, pp. 273-289.
- Dittmann, E., Börner, T., 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment, *Toxicology and Applied Pharmacology* 203, pp. 192-200.
- Dittmann, E., Wiegand, C., 2006. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs, *Molecular. Nutrition & Food Research*. 50, pp. 7-17.
- Djediat, C., Malécot, M., de Luze, A., Bernard, C., Puiseux-Dao, S., Edery, M., 2010. Localization of microcystin-LR in medaka fish tissues after cyanotoxin gavage, *Toxicon* 55, pp. 531-535.
- Donati, C., Drikas, M., Hayes, R., Newcombe, G., 1994. Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon, *Water Research* 28, pp. 1735-1742.
- Done, S.H., Bain, M., 1993. Hepatic necrosis in sheep associated with ingestion of blue-green algae, *Veterinary Record* 133, p. 600.
- Dor, I., Danin, A., 1996. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. *Archiv für Hydrobiologie Suppl.* 117, *Algological Studies* 83, pp. 197-206.
- Doré, M., 1989. Chimie des oxydants et traitements des eaux, Edition Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- Downing, J.A., Watson, S.B., McCauley, E., 2001. Predicting cyanobacteria dominance in lakes, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, pp. 1905-1908.
- Drikas, M., Newcombe, G., Nicholson, B., 2001a. Water treatment options for cyanobacteria and their toxins. American Water Works Association, WQTC proceedings.
- Drikas, M., Chow, C.W.K., House, J., Burch, M.D., 2001b. Using coagulation, flocculation, and settling to remove toxic cyanobacteria, *Journal of American Waterworks Association* 93, pp. 101-111.
- Duguet, J.-P., 2001. Efficacité des traitements de potabilisation des eaux destinées à la consommation humaine vis-à-vis des toxines algales, *Techniques, Sciences, Méthodes* 9, pp. 75-83.
- Dunlap, P.V., 1999. Corum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*, *Journal of Molecular microbiology and Biotechnology* 1, pp. 5-12.
- Edwards, C., Beattie, K.A., Scrimgeour, C.M., Codd, G.A., 1992. Identification of anatoxin-A in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland, *Toxicon* 30, pp. 1165-1175.

- El Herry, S., Fathalli, A., Rejeb, A.J.-B., Bouaïcha, N., 2008. Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis spp.* and *Oscillatoria tenuis* in the Lebna Dam, Tunisia, *Water Research* 42, pp. 1263-1273.
- Ernst, B., Hoeger, S.J., O'Brien, E., Dietrich, D.R., 2009. Abundance and toxicity of *Planktothrix rubescens* in the pre-alpine Lake Ammersee, Germany, *Harmful Algae* 8, pp. 329-342.
- Falconer, I.R., Beresford, A.M., Runnegar, M.T.C., 1983. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*, *Medical Journal of Australia* 1, pp. 511-514.
- Falconer, I.R., 1991. Tumour promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria, *Environmental Toxicology and Water Quality* 6, pp. 177-218.
- Falconer, I.R., 1993. Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. Dans: Falconer, I.R. (Ed). *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press, Londres, pp. 165-175.
- Falconer, I., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M., Codd, G.A., 1999. Safe levels and safe practices. Dans: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, London, pp. 155-178.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2001. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin, *Environmental Toxicology* 16, pp. 192-195.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2006. Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins, *Environmental Toxicology* 21, pp. 299-304.
- Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K., Chorus, I., 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates, *Toxicon* 42, pp. 313-321.
- Fastner, J., Rücker, J., Stüken, A., Preußel, K., Nixdorf, B., Chorus, I., Köhler, A., Wiedner, C., 2007. Occurrence of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in northeast Germany, *Environmental Toxicology* 22, pp. 26-32.
- Fawell, J.K., Mitchell, R.E., Everett, D.J., Hill, R.E., 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR, *Human & Experimental Toxicology* 18, pp. 162-167.
- Fischer, W.J., Hitzfeld, B.C., Tencalla, F., Eriksson, J.E., Mikhailov, A., Dietrich, D.R., 2000. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Toxicological Science* 54, pp. 365-373.
- Forbes, W.F., Shilton, R., Balasubramanian, A., 1964. The ultraviolet absorption spectra of some conjugated dienes, *Journal of Organic Chemistry* 29, pp. 3527-3531.

- Francis, G., 1878. Poisonous australian lake, *Nature* 18, pp. 11-12.
- Fristachi, A., Sinclair, J.L., 2008. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms workgroup report. Dans: Hudnell, K.H. (Ed.). Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Springer, New York, pp. 45-103.
- Fromme, H., Köhler, A., Krause, R., Führling, D., 2000. Occurrence of cyanobacterial toxins - microcystins and anatoxin-a - in Berlin water bodies with implications to human health and regulations, *Environmental Toxicology* 15, pp. 120-130.
- Froschio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2003. Cyindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes, *Environmental Toxicology* 18, pp. 243-251.
- Froschio, S.M., Humpage, A.R., Wickramasinghe, W., Shaw, G., Falconer, I.R., 2008. Interaction of the cyanobacterial toxin cyindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system, *Toxicon* 51, pp. 191-198.
- Gajdek, P., Bober, B., Mej, E., Bialczyk, J., 2004. Sensitised decomposition of microcystin-LR using UV radiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 76, pp. 103-106.
- Galal-Gorchev, H., 1996. Chlorine in water disinfection, *Pure & Applied Chemistry* 68, pp. 1731-1735.
- Gregor, J., Marsalek, B., Sipkova, H., 2007. Detection and estimation of potentially toxic cyanobacteria in raw water at the drinking water treatment plant by in vivo fluorescence method, *Water Research* 41, pp. 228-234.
- Gijsbertsen-Abrahamse, A.J., Schmidt, W., Chorus, I., Heijman, S.G.J., 2006. Removal of cyanotoxins by ultrafiltration and nanofiltration, *Journal of Membrane Science* 276, pp. 252-259.
- Gkelis, S., Harjunpää, V., Lanaras, T., Sivonen, K., 2005. Diversity of hepatotoxic microcystins and bioactive anabaenopeptins in cyanobacterial blooms from Greek freshwaters, *Environmental Toxicology* 20, pp. 249-256.
- Griffiths, D.J., Saker, M.L., 2003. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cyindrospermopsin, *Environmental Toxicology* 18, pp. 78-93.
- Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.C., Humbert, J.F., Guette, C., Bernard, C., 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis, *Toxicon* 45, pp. 919-928.
- 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, pp. 285-296.

- Hall, T., Hart, J., Croll, B., Gregory, R., 2000. Laboratory-scale investigations of algal toxin removal by water treatment, *Journal of the Institution of Water and Environmental Management* 14, pp. 143-149.
- Harada, K.I., Murata, H., Qiang, Z., Suzuki, M., Kondo, F., 1996. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria, *Toxicon* 34, pp. 701-710.
- Harada, K., Kondo, F., Lawton, L., 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. Dans: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, pp. 369-405.
- Hart, J., Fawell, J.K., Croll, B., 1997. The fate of both intra and extracellular toxins during drinking water treatment. Special subject N°18, SS18-1-6, IWSA World Congress, Blackwell Science, Oxford.
- Hawkins, P.R., Novic, S., Cox, P., Neilan, B.A., Burns, B.P., Shaw, G., Wickramasinghe, W., Peerapornpisal, Y., Ruangyuttikarn, W., Itayama, T., Saitou, T., Mizuochi, M., Inamori, Y., 2005. A review of analytical methods for assessing the public health risk from microcystin in the aquatic environment, *Aqua - Journal of Water Supply: Research and Technology* 54, pp. 509-518.
- Heinze, R., 1996. A biotest for hepatotoxins using primary rat hepatocytes, *Phycologia* 35 (supplement), pp. 89-93.
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecker, D.K., Suddleson, M., 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus, *Harmful Algae* 8, pp. 3-13.
- Henriksen, P., Carmichael, W.W., An, J., Moestrup, Ī., 1997. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds, *Toxicon* 35, pp. 901-913.
- Heresztyn, T., Nicholson, B.C., 2001. Determination of cyanobacterial hepatotoxins directly in water using a protein phosphatase inhibition assay, *Water Research* 35, pp. 3049-3056.
- Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Yuan, M., Azevedo, S.M.F.O., 2005. A simple colorimetric method to detect biological evidence of human exposure to microcystins, *Toxicon* 46, pp. 218-221.
- Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K., Börner, T., 2003. PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera, *Archives of Microbiology* 180, pp.402-410.
- Hitzfeld, B.C., Hoeger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment, *Environmental Health Perspectives* 108, pp. 113-122.

- Ho, L., Onstad, G., Gunten, U.v., Rinck-Pfeiffer, S., Craig, K., Newcombe, G., 2006a. Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues, *Water Research* 40, pp. 1200-1209.
- Ho, L., Meyn, T., Keegan, A., Hoefel, D., Brookes, J., Saint, C.P., Newcombe, G., 2006b. Bacterial degradation of microcystin toxins within a biologically active sand filter, *Water Research* 40, pp. 768-774.
- Ho, L., Hoefel, D., Saint, C.P., Newcombe, G., 2007. Isolation and identification of a novel microcystin-degrading bacterium from a biological sand filter, *Water Research* 41, pp. 4685-4695.
- Hoeger, S.J., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B.C., 2002. Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment, *Environmental Health Perspectives* 110, pp. 1127-1132.
- Hoehn, R.C., Barnes, D.B., Thompson, B.C., Randall, C.W., Grizzard, T.J., Shaffer, P.T.B., 1980. Algae as sources of trihalomethane precursors, *Journal of American Waterworks Association* 72, pp. 344-350.
- Hoffman, J.R.H., 1976. Removal of microcystis toxins in water purification processes, *Water SA* 2, pp. 58-60.
- Hoogenhout, H., Amesz, J., 1965. Growth rates of photosynthetic microorganisms in laboratory cultures, *Archives of Microbiology* 50, pp. 10-15.
- Hrudey, S., Burch, M., Drikas, M., Gregory, R., 1999. Remedial measures. Dans: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, London, pp. 275-312.
- Huang, W.J., Cheng, B.L., Cheng, Y.L., 2007. Adsorption of microcystin-LR by three types of activated carbon, *Journal of Hazardous Materials* 141, pp. 115-122.
- Hudnell, K.H., Dortch, Q., 2008. A synopsis of research needs identified at the interagency, international symposium on cyanobacterial harmful algal blooms (ISOC-HAB). Dans: Hudnell, H.H. (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Springer, New York, pp. 17-43.
- Humpage, A.R., Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I.R., 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 472, pp. 155-161.
- 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, *Environmental Toxicology* 18, pp. 94-103.
- Hureiki, L., Croue, J.P., Legube, B., 1994. Chlorination studies of free and combined amino acids, *Water Research* 28, pp. 2521-2531.

- Hyenstrand, P., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Codd, G.A., 2001a. Effects of adsorption to plastics and solvent conditions in the analysis of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by high performance liquid chromatography, *Water Research* 35, pp. 3508-3511.
- Hyenstrand, P., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Codd, G.A., 2001b. Losses of the cyanobacterial toxin microcystin-LR from aqueous solution by adsorption during laboratory manipulations, *Toxicon* 39, pp. 589-594.
- Ibelings, B.W., Chorus, I., 2007. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: a review, *Environmental Pollution* 150, pp. 177-192.
- ISO 7027 Qualité de l'eau -- Détermination de la turbidité. 1999.
- ISO 7393-2. Water quality - Determination free chlorine and total chlorine - Part 2: colorimetric method using N,N-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purposes. 1985.
- ISO 11348-3. Norme relative à la qualité de l'eau: détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri*. 1999.
- ISO 20179. Water quality - Determination of microcystins - Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection. 2005.
- Jafvert, C.T., Valentine, R.L., 1992. Reaction scheme for the chlorination of ammoniacal water, *Environmental Science and Technology* 26, pp.577-586.
- James, K.J., Sherlock, I.R., Stack, M.A., 1997. Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method, *Toxicon* 35, pp. 963-971.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, M.D., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B.d.C., Melo Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.T.S., Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil, *New England Journal of Medicine* 338, pp. 873-878.
- Jöhnk, K.D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P.M., Stroom, J.M., 2008. Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology* 14, pp. 495-512.
- Jones, G.J., Orr, P.T., 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay, *Water Research* 28, pp. 871-876.
- Jones, G.J., Negri, A.P., 1997. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters, *Water Research* 31, pp. 525-533.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production, *FEMS Microbiology Ecology* 35, pp. 1-9.

- Kato, H., Imanishi, S.Y., Tsuji, K., Harada, K.I., 2007. Microbial degradation of cyanobacterial cyclic peptides, *Water Research* 41, pp. 1754-1762.
- Kellmann, R., Mills, T., Neilan, B.A., 2006. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes, *Journal of Molecular Evolution* 62, pp. 267-280.
- Kellmann, R., Mihali, T.K., Jeon, Y.J., Pickford, R., Pomati, F., Neilan, B.A., 2008. Biosynthetic intermediate analysis and functional homology reveal a saxitoxin gene cluster in cyanobacteria, *Applied and Environmental Microbiology* 74, pp. 4044-4053.
- Kenefick, S.L., Hrudey, S.E., Peterson, H.G., Prepas, E.E., 1993. Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment, *Water Science and Technology* 27, pp. 433-440.
- Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Ishikawa, N., Watanabe, M.F., Watanabe, M., Harada, K.I., Suzuki, M., 1992. Separation and identification of microcystins in cyanobacteria by frit-fast atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry, *Toxicon* 30, pp. 227-237.
- Konno, H., 1993. Settling and coagulation of slender type diatoms, *Water Science and Technology* 27, pp. 231-240.
- Kosol, S., Schmidt, J., Kurmayer, T., 2009. Variation in peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp., *European Journal of Phycology* 44, pp. 49-62.
- Kovalova, L., McArdell, C.S., Hollender, J., 2009. Challenge of high polarity and low concentrations in analysis of cytostatics and metabolites in wastewater by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1216, pp. 1100-1108.
- Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Pflugmacher, S., 2003. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya, *FEMS Microbiology Ecology* 43, pp. 141-148.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J., 1999. Human health aspects. Dans: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, pp. 113-153.
- Kull, T.P.J., Backlund, P.H., Karlsson, K.M., Meriluoto, J.A.O., 2004. Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: reaction kinetics, characterization, and toxicity of reaction products, *Environmental Science and Technology* 38, pp. 6025-6031.
- Kull, T.P.J., Sjövall, O.T., Tammenkoski, M.K., Backlund, P.H., Meriluoto, J.A.O., 2006. Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: influence of natural organic matter, *Environmental Science and Technology* 40, pp. 1504-1510.

- Kurmayer, R., Kutzenberger, T., 2003. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp., *Applied and Environmental Microbiology* 69, pp. 6723-6730.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., 2009. The genetic basis of toxin production in Cyanobacteria, *Freshwater Reviews* 2, pp. 31-50.
- Laamanen, M., 1996. Cyanoprokaryotes in the Baltic Sea ice and winter plankton. *Archiv für Hydrobiologie Suppl.* 117, *Algological Studies* 83, pp. 423-433.
- Lambert, T.W., Holmes, C.F.B., Hrudey, S.E., 1996. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment, *Water Research* 30, pp. 1411-1422.
- 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, *Natural Toxins* 3, pp. 50-57.
- Lawton, L., Marsalek, B., Padisak, J., Chorus, I., 1999a. Determination of cyanobacteria in the laboratory. Dans: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.). *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon, London, pp. 347-368.
- Lawton, L.A., Robertson, P.K.J., 1999b. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters, *Chemical Society Reviews* 28, pp. 217-224.
- Lawton, L.A., Edwards, C., 2008. Conventional laboratory methods for cyanotoxins. Dans: Hudnell, K.H. (Ed.). *Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs*. Springer, New York, pp. 513-537.
- Le Jeune, A.H., Charpin, M., Deluchat, V., Briand, J.F., Lenain, J.F., Baudu, M., Amblard, C., 2006. Effect of copper sulphate treatment on natural phytoplanktonic communities, *Aquatic Toxicology* 80, pp. 267-280.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Mahakhant, A., Noparatnaraporn, N., Yongmanitchai, W., Kaya, K., Watanabe, M.M., 2001. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria), *Toxicon* 39, pp. 973-980.
- Lin, S., Carlson, R.M., 1984. Susceptibility of environmentally important heterocycles to chemical disinfection: reactions with aqueous chlorine, chlorine dioxide and chloramine, *Environmental Science and Technology* 18, pp. 743-748.
- Lindner, P., Molz, R., Yacoub-George, E., Durkop, A., Wolf, H., 2004. Development of a highly sensitive inhibition immunoassay for microcystin-LR, *Analytica Chimica Acta* 521, pp. 37-44.
- Lippy, E.C., Erb, J., 1976. Gastrointestinal illness at Sewickley, Pa, *Journal of American Waterworks Association* 68, pp. 606-610.

- Litaker, R.W., Tester, P.A., 2002. Molecular methods for detecting and characterizing harmful phytoplankton. Dans: Hurst, C.J., Crawford, R.L., Khudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. (Eds.). *Manual of environmental microbiology* (2nd edition). ASM Press, Washington DC, pp. 342-353.
- Lorenzen, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12, pp. 343-346.
- 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, *Federation of European Biochemical Societies* 264, pp. 187-192.
- Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., Horning, S., 2006. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17, pp. 977-982.
- Matsunaga, H., Harada, K.I., Senma, M., Ito, Y., Yasuda, N., Ushida, S., Kimura, Y., 1999. Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: sudden appearance of toxic cyanobacteria, *Natural Toxins* 7, pp. 81-84.
- Merel, S., Clément, M., Thomas, O., 2010. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine, *Toxicon* 55, pp 677-691.
- Merel S, Lebot B, Clement M, Seux R, Thomas O., 2009. MS identification of microcystin-LR chlorination by-products. *Chemosphere* 74, pp. 832-839.
- Metcalf, J.S., Barakate, A., Codd, G.A., 2004. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin, *FEMS Microbiology Letters* 235, pp. 125-129.
- Mez, K., Beattie, K.A., Codd, G.A., Hanselmann, K., Hauser, B., Naegeli, H., Preisig, H.R., 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland, *European Journal of Phycology* 32, pp. 111-117.
- Miller, M.J., Fallowfield, H.J., 2001. Degradation of cyanobacterial hepatotoxins in batch experiments, *Water Science and Technology* 43, pp. 229-232.
- Milutinovic, A., Zivin, M., Zorc-Pleskovic, R., Sedmak, B., Suput, D., 2003. Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR, *Toxicon* 42, pp. 281-288.
- Moffitt, M.C., Neilan, B.A., 2004. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins, *Applied and Environmental Microbiology* 70, pp. 6353-6362.
- Mohamed, Z.A., 2008. Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in public hot springs in Saudi Arabia, *Toxicon* 51, pp. 17-27.

- Molica, R., Onodbra, H., Garcia, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S., Lagos, N., 2002. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue, *Phycologia* 41, pp. 606-611.
- Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply, *Harmful Algae* 4, pp. 743-753.
- Morris, J.C., 1978. the chemistry of aqueous chlorine in relation to water chlorination. Dans: Jolleys, R.L. (Ed.). Water chlorination: environmental impact and health effects, Volume 1. Ann Arbor Science Publishers, Michigan, pp. 21-35.
- Mouchet, P., Bonnélye, V., 1998. Solving algae problems: french expertise and world-wide applications, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA* 47, pp. 125-141
- Mur, L.R., Skulberg, M.O., Utkilen, H., 1999. Cyanobacteria in the environment. Dans: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, pp. 15-40.
- Mynderse, J.S., Moore, R.E., Kashiwagi, M., Norton, T.R., 1977. Antileukemia activity in the *Oscillatoriaceae*: isolation of debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*, *Science* 196, pp. 538-540.
- Narayan, L., Nunez, W., 1974. Biological control: isolation and bacterial oxydation of the taste and odor compound geosmin, *Journal of American Waterworks Association* 66, pp. 532-536.
- Newcombe, G., Nicholson, B.C., 2002. Treatment options for the saxitoxins class of cyanotoxins, *Water Science and Technology: Water Supply* 2, pp. 271-275.
- Newcombe, G., Nicholson, B., 2004. Water treatment options for dissolved cyanotoxins, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA* 53, pp. 227-239.
- Nicholson, B.C., Rositano, J., Humpage, A.R., Burch, M.D., 1993. Removal of algal toxins in water treatment processes, *Proceedings of the 15th AWWA Federal Convention* pp. 327-331.
- Nicholson, B.C., Rositano, J., Burch, M.D., 1994. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine, *Water Research* 28, pp. 1297-1303.
- Nicholson, B.C., Rositano, J., 1997. Chemical methods for the destruction of cyanobacterial toxins. Présenté à Cyanoshop 97-Workshop on cyanobacteria (Blue-Green-Algae) and their toxins, Brisbane, Australie.
- Nicholson, B.C., Shaw, G.R., Morrall, J., Senogles, P.-J., Woods, T.A., Papageorgiou, J., Kapralos, C., Wickramasinghe, W., Davis, B.C., Eaglesham, G.K., Moore, M.R., 2003. Chlorination for degrading saxitoxins (paralytic shellfish poisons) in water, *Environmental Technology* 24, pp. 1341-1348.

- Nightingale, Z.D., Lancha, A.H., Handelman, S.K., Dolnikowski, G.G., Busse, S.C., Dratz, E.A., Blumberg, J.B., Handelman, G.J., 2000. Relative reactivity of lysine and other peptide-bound amino acids to oxidation by hypochlorite, *Free Radical Biology and Medicine* 29, pp. 425-433.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W., Fujiki, H., 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 118, pp. 420-424.
- Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seawright, A.A., Moore, M.R., 1999. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Environmental Toxicology* 14, pp. 163-165.
- OMS, 1998. Guidelines for drinking-water quality. Second edition, addendum to volume 2, Health criteria and other supporting information, Organisation Mondiale de la Santé, Genève.
- OMS, 2004. Guidelines for drinking-water quality. Third edition, volume 1, Recommendations, Organisation Mondiale de la Santé, Genève.
- Onodera, H., Oshima, Y., Henriksen, P., Yasumoto, T., 1997. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish Lakes, *Toxicon* 35, pp. 1645-1648.
- Onstad, G.D., Strauch, S., Meriluoto, J., 2007. Selective oxidation of key functional groups in cyanotoxins during drinking water ozonation, *Environmental Science and Technology* 41, pp. 4397-4404.
- Orr, P.T., Jones, G.J., 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures, *Limnology and Oceanography* 43, pp. 1604-1614.
- Ortea, P.M., Allis, O., Healy, B.M., Lehane, M., Ni Shuilleabhain, A., Furey, A., James, K.J., 2004. Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultra-violet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry, *Chemosphere* 55, pp. 1395-1402.
- Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V., 2007. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a, *Environment International* 33, pp. 1070-1089.
- Oyler, A.R., Liukkonen, R.J., Lukasewycz, M.T., Helkkila, K.E., Cox, D.A., Carlson, R.M., 1983. Chlorine disinfection of aromatic compounds. Polynuclear aromatic hydrocarbons: rates, products and mechanisms, *Environmental Science and Technology* 17, pp. 334-342.
- Park, H.-D., Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M., Hayashi, H., 1993. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters, *Natural Toxins* 1, pp. 353-360.

- Park, H.-D., Kim, B., Kim, E., Okino, T., 1998. Hepatotoxic microcystins and neurotoxic anatoxin-a in cyanobacterial blooms from Korean lakes, *Environmental Toxicology and Water Quality* 13, pp. 225-234.
- Parvez, S., Ventakaraman, C., Mukherji, S., 2006. A review of advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International* 32, pp. 265-268.
- Paul, V.J., 2008. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. Dans: Hudnell, K.H. (Ed.). Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Springer, New York, pp. 239-257.
- Pendleton, P., Schumann, R., Wong, S.H., 2001. Microcystin-LR adsorption by activated carbon, *Journal of Colloid and Interface Science* 240, pp. 1-8.
- Pereira, A., Cao, Z., Murray, T.F., Gerwick, W.H., 2009. Hoiamide A, a sodium channel activator of unusual architecture from a consortium of Two Papua New Guinea cyanobacteria, *Chemistry & Biology* 16, pp. 893-906.
- Peterman, S.M., Duczak, N., 2006. Application of a linear ion trap/orbitrap mass spectrometer in metabolite characterization studies: examination of the human liver microsomal metabolism of the non-tricyclic anti-depressant nefazodone using data-dependent accurate mass measurements, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17, pp. 363-375.
- Peterson, H.G., Hrudey, S.E., Cantin, I.A., Perley, T.R., Kenefick, S.L., 1995. Physiological toxicity, cell membrane damage and the release of dissolved organic carbon and geosmin by *Aphanizomenon flos-aquae* after exposure to water treatment chemicals, *Water Research* 29, pp. 1515-1523.
- Pieterse, A.J.H., Cloot, A., 1997. Algal cells and coagulation, flocculation and sedimentation processes, *Water Science and Technology* 36, pp. 111-118.
- Pouët, M.-F., Baures, E., Vaillant, S., Thomas, O., 2004. Hidden isobestic point(s) in ultraviolet spectra, *Society for Applied Spectroscopy* 58, pp. 486-490.
- Pouët, M.-F., Theraulaz, F., Mesnage, V., Thomas, O., 2007. Natural water. Dans: Thomas, O., Burgess, C. (Eds.). UV-visible spectrophotometry of water and wastewater. Elsevier, Oxford (UK), pp. 163-188.
- Pouria, S., Andrade de, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T.S., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H., Codd, G.A., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil, *The Lancet* 352, pp. 21-26.
- Puerto, M., Jos, A., Pichardo, S., Moreno, I.M., Cameán, A.M., 2008. Microcystin-RR induced toxic effects in cell line Caco-2, *Toxicology Letters* 180, p. 112.
- Puerto, M., Pichardo, S., Jos, Á., Cameán, A.M., 2009. Comparison of the toxicity induced by microcystin-RR and microcystin-YR in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells, *Toxicon* 54, pp. 161-169.

- Rapala, J., Erkomaa, K., Kukkonen, J., Sivonen, K., Lahti, K., 2002. Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: comparison of methods, *Analytica Chimica Acta* 466, pp. 213-231.
- Rebhun, M., Fox, M.A., Sless, J.B., 1971. Chlorination of odorants from algal blooms, *Journal of American Waterworks Association* 63, pp. 219-224.
- Roberts, R.D., Zohary, T., 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 21, pp. 391-399.
- Roberts, J.D., Caserio, M.C., 1968. Chimie organique moderne, Ediscience, Paris.
- Rodríguez, E., Majado, M.E., Meriluoto, J., Acero, J.L., 2007a. Oxidation of microcystins by permanganate: reaction kinetics and implications for water treatment, *Water Research* 41, pp. 102-110.
- Rodríguez, E., Sordo, A., Metcalf, J.S., Acero, J.L., 2007b. Kinetics of the oxidation of cylindrospermopsin and anatoxin-a with chlorine, monochloramine and permanganate, *Water Research* 41, pp. 2048-2056.
- Rodríguez, E., Onstad, G.D., Kull, T.P.J., Metcalf, J.S., Acero, J.L., von Gunten, U., 2007c. Oxidative elimination of cyanotoxins: comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate, *Water Research* 41, pp. 3381-3393.
- Rodríguez, E.M., Acero, J.L., Spool, L., Meriluoto, J., 2008. Oxidation of MC-LR and -RR with chlorine and potassium permanganate: toxicity of the reaction products, *Water Research* 42, pp. 1744-1752.
- Rogers, E.H., Zehr, R.D., Gage, M.I., Humpage, A.R., Falconer, I.R., Marr, M., Chernoff, N., 2007. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation, *Toxicol* 49, pp. 855-864.
- Rositano, J., Nicholson, B.C., 1994. Water treatment techniques for the removal of cyanobacterial toxins from water, pp. 1-54. Rapport réalisé pour l'Australian Centre for Water Quality Research.
- Rositano, J., 1996. The destruction of cyanobacterial peptide toxins by oxydants used in water treatment, pp. 1-67. Rapport réalisé pour l'Urban Water Research Association of Australia.
- Rücker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C., 2007. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes, *Toxicol* 50, pp. 800-809.
- Saker, M.L., Thomas, A.D., Norton, J.H., 1999. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of North Queensland, *Environmental Toxicology* 14, pp. 179-182.
- Saltiel, J., Sears, D.F., Turek, A.M., 2001. UV spectrum of the high energy conformer of 1,3-butadiene in the gas phase, *Journal of Physical Chemistry A* 105, pp. 7569-7578.

- Sangolkar, L.N., Maske, S.S., Chakrabarti, T., 2006. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria, *Water Research* 40, pp. 3485-3496.
- Sano, T., Kikuchi, S., Kubo, T., Takagi, H., Hosoya, K., Kaya, K., 2008. New values of molecular extinction coefficient and specific rotation for cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, *Toxicon* 51, pp. 717-719.
- Sarazin, G., Quiblier-Llobéras, C., Bertru, G., Brient, L., Vezie, C., Bernard, C., Couté, A., Hennion, M.C., Robillot, C., Tandeau de Marsac, N., 2002. First assessment of the toxicological risk associated with fresh water cyanobacteria in France: the "EFFLOCYA" research program, *Revue des Sciences de l'Eau* 15, pp. 315-326.
- Saunier, B.M., Selleck, R.E., 1979. The kinetics of breakpoint chlorination in continuous flow systems, *Journal of American Waterworks Association* 71, pp. 164-172.
- Schembri, M.A., Neilan, B.A., Saint, C.P., 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Environmental Toxicology* 16, pp. 413-421.
- Segien, P.O., 1983. Inhibitors of lysosomal function, *Methods in Enzymology* 96, pp. 737-765.
- Senogles, P., Shaw, G., Smith, M., Norris, R., Chiswell, R., Mueller, J., Sadler, R., Eaglesham, G., 2000. Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination, *Toxicon* 38, pp. 1203-1213.
- Senogles-Derham, P.-J., Seawright, A., Shaw, G., Wickramasingh, W., Shahin, M., 2003. Toxicological aspects of treatment to remove cyanobacterial toxins from drinking water determined using the heterozygous P53 transgenic mouse model, *Toxicon* 41, pp. 979-988.
- Sevilla, E., Martin-Luna, B., Vela, L., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L., 2008. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806, *Environmental Microbiology* 10, pp. 2476-2483.
- Shaw, G.R., Sukenik, A., Livne, A., Chiswell, R.K., Smith, M.J., Seawright, A.A., Morris, R.L., Eaglesham, G.K., Moore, M.R., 1999. Blooms of the cylindrospermopsin containing cyanobacterium. *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti), in newly constructed lakes, Queensland, Australia, *Environmental Toxicology* 14, pp. 167-177.
- Shawwa, A.R., Smith, D.W., 2001. Kinetics of microcystin-LR oxidation by ozone, *Ozone Science & Engineering* 23, pp. 161-170.
- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. Dans: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London, pp. 41-111.
- Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Codd, G.A., Skulberg, R., 1993. Taxonomy of toxic cyanophyceae (Cyanobacteria). Dans: Falconer, I.R. (Ed.). Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press, Londres, pp. 145-164.

- Spoof, L., Berg, K.A., Rapala, J., Lahti, K., Lepistö, L., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Meriluoto, J., 2006. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland), *Environmental Toxicology* 21, pp. 552-560.
- Stabb, E.V., Butler, M.S., Adin, D.M., 2004. Correlation between osmolarity and luminescence of symbiotic *Vibrio fischeri* strain ES114, *Journal of Bacteriology* 186, pp. 2906-2908.
- Stewart, I., Seawright, A.A., Shaw, G.R., 2008. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview. Dans: Hudnell, K.H. (Ed.). Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Springer, New York, pp. 613-637.
- Stirling, D.J., Quilliam, M.A., 2001. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in New Zealand, *Toxicon* 39, pp. 1219-1222.
- Svrcek, C., Smith, D.W., 2004. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review, *Journal of Environmental Engineering & Science* 3, pp. 155-185.
- Teixeira, M.R., Costa, M., De Carvalho, V.L., Pereira, M., Hage, E., 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil, *Bulletin of the Pan American Health Organization* 27, pp. 244-253.
- Teixeira, M.R., Rosa, M.J., 2005. Microcystins removal by nanofiltration membranes, *Separation and Purification Technology* 46, pp. 192-201.
- Teixeira, M.R., Rosa, M.J., 2006. Neurotoxic and hepatotoxic cyanotoxins removal by nanofiltration, *Water Research* 40, pp. 2837-2846.
- Thomas, O., Cerda, V., 2007. From spectra to qualitative and quantitative results. Dans : Thomas, O., Burgess, C. (Eds.). UV-visible spectrophotometry of water and wastewater. Elsevier, Oxford (UK), pp. 21-46.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., Neilan, B.A., 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-poliketide synthetase system, *Chemistry and Biology* 7, pp. 753-764.
- Tisdale, E., 1931. Epidemic of intestinal disorders in Charleston, WVa, occurring simultaneously with unprecedented water supply conditions, *American Journal of Public Health* 21, pp. 198-200.
- Tonk, L., Visser, P., Christiansen, G., Dittmann, E., Snerlder, E.D.F.M., Wiedner, C., Mur, L., Huisman, J., 2005. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity, *Applied and Environmental Microbiology* 71, pp. 5177-5181.
- Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M.F., Suzuki, S., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H., Harada, K.I., 1995. Stability of microcystins from cyanobacteria--II. effect of UV light on decomposition and isomerization, *Toxicon* 33, pp. 1619-1631.

- Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M.F., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H., Harada, K.I., 1997. Stability of Microcystins from cyanobacteria--iv. effect of chlorination on decomposition, *Toxicon* 35, pp. 1033-1041.
- Utkilen, H., Gjølme, N., 1994. A simple and rapid method for extraction of toxic peptides from cyanobacteria. Dans Codd, G.A., Jefferies, T.M., Keevil, C.W., Potter, E. (Eds.). Detection methods for cyanobacterial toxins, special publication N° 149. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 168-171.
- Vaitomaa, J., Rantala, A., Halinen, K., Rouhiainen, L., Tallberg, P., Mokolke, L., Sivonen, K., 2003. Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes, *Applied and Environmental Microbiology* 69, pp. 7289-7297.
- Van-Apeldoorn, M.E., van-Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.I., 2007. Toxins of cyanobacteria, *Molecular. Nutrition & Food Research*. 51, pp. 7-60.
- Van Liere, L., Walsby, A.E., 1982. Interactions of cyanobacteria with light. Dans: Carr, N.G., Whitton, B.A. (Eds). The biology of the cyanobacteria. Blackwell Science Publications, Oxford, pp. 9-45.
- Veldee, M.V., 1931. An epidemiological study of suspected water-borne gastroenteritis, *American Journal of Public Health* 21, pp. 1227-1235.
- Velzeboer, R., Drikas, M., Donati, C., Burch, M., Steffensen, D., 1995. Release of geosmin by *Anabaena circinalis* following treatment with aluminium sulphate, *Water Science and Technology* 31, pp. 187-194.
- Vezie, C., Benoufella, F., Sivonen, K., Bertru, G., Laplanche, A., 1996. Detection of toxicity of cyanobacterial strains using *Artemia salina* and Microtox assays compared with mouse bioassay results, *Phycologia* 35 (6, supplement), pp. 198-202.
- Viaggiu, E., Melchiorre, S., Volpi, F., Di Corcia, A., Mancini, R., Garibaldi, L., Crichigno, G., Bruno, M., 2004. Anatoxin-a toxin in the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy, *Environmental Toxicology* 19, pp. 191-197.
- Wang, H., Ho, L., Lewis, D.M., Brookes, J.D., Newcombe, G., 2007. Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins, *Water Research* 41, pp. 4262-4270.
- Westrick, J.A., 2003. Everything a manager should know about algal toxins but was afraid to ask, *Journal of American Waterworks Association* 95, pp. 26-34.
- Westrick, J.A., 2008. Cyanobacterial toxin removal in drinking water treatment processes and recreational waters. Dans: Hudnell, K.H. (Ed.). Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. Springer, New York, pp. 275-290.
- Wiedner, C., Rucker, J., Brüggemann, R., Nixdorf, B., 2007. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions, *Oecologia* 152, pp. 473-484.

- Wiedner, C., Rücker, J., Fastner, J., Chorus, I., Nixdorf, B., 2008. Seasonal dynamics of cylindrospermopsin and cyanobacteria in two German lakes, *Toxicon* 52, pp. 677-686.
- Wood, S.A., Selwood, A.I., Rueckert, A., Holland, P.T., Milne, J.R., Smith, K.F., Smits, B., Watts, L.F., Cary, C.S., 2007. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand, *Toxicon* 50, pp. 292-301.
- Wormer, L., Cire's, S., Carrasco, D., Quesada, A., 2008. Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40-day study, *Harmful Algae* 7, pp. 206-213.
- Xagorarakis, I., Harrington, G.W., Zulliger, K., Zeier, B., Krick, W., Karner, D.A., Standridge, J.H., Westrick, J.A., 2006. Inactivation kinetics of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by free chlorine, *Journal of Environmental Engineering* 132, pp. 818-823.
- Yuan, M., Carmichael, W.W., Hilborn, E.D., 2006. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996, *Toxicon* 48, pp. 627-640.
- Zevenboom, W., Mur, L., 1980. N₂-fixing cyanobacteria, why they do not become dominant in dutch hypertrophic lakes, *Development in Hydrobiology* 2, pp. 123-131.
- Zhang, H., Zhang, J., Zhu, Y., 2009. Identification of microcystins in waters used for daily life by people who live on Tai Lake during a serious cyanobacteria dominated bloom with risk analysis to human health, *Environmental Toxicology* 24, pp. 82-86.
- Zilberg, B., 1966. Gastroenteritis in Salisbury. European children: a five-year study, *Central African Journal of Medicine* 12, pp. 164-168.

LISTE DES VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

LISTE DES VALORISATIONS SCIENTIFIQUES

Les travaux de recherche réalisés au cours de ce travail de thèse ont fait l'objet de diverses valorisations scientifiques à travers les articles et communications énumérés ci-après.

ARTICLES

Merel, S., LeBot, B., Clément, M., Seux, R., Thomas, O., 2009. MS identification of microcystin-LR chlorination by-products, *Chemosphere* 74 (6), 832-839.

Merel, S., Clement, M., Thomas, O., 2010. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine, *Toxicon* 55 (4), 677-691.

Merel, S., Clement, M., Thomas, O., 2010. Identification of a new cylindrospermopsin chlorination by-product, *Science of the Total Environment* (manuscrit soumis le 21 septembre 2009).

COMMUNICATIONS

Merel, S., Clément, M., Thomas, O., 2010. Combined mass spectrometry and UV spectrophotometry for cyanotoxins chlorination understanding.

Poster présenté au « 61st Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Pittcon 2010 » à Orlando (Floride, USA) du 28 février au 5 mars 2010.

Merel S., Clément M., Thomas O., 2009. Identification of new drinking water disinfection by-products from chlorination of cyanobacterial toxins.

Poster présenté à la « Gordon Research Conference on Drinking Water Disinfection By-Products » à South Hadley (Massachusetts, USA), du 9 au 14 août 2009.

Merel, S., LeBot, B., Monteau, F., Thomas, O., Le Bizec, B., Clément, M., 2009. Hyphenated LC-MS / LTQ-Orbitrap analysis for cyanotoxin chlorination by-products identification and monitoring.

Poster présenté au « 60th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Pittcon 2009 » à Chicago (Illinois, USA) du 8 au 13 mars 2009.

Merel, S., Clément, M., Thomas, O., 2009. Comportement de la microcystine, de la cylindrospermopsine et de l'anatoxine-a vis-à-vis du chlore : réactivité, sous-produits générés, évolution de la toxicité.

Communication orale réalisée au « GIS cyanobactéries » à Sète (34) du 19 au 21 janvier 2009.

Merel, S., 2008. Toxine de cyanobactéries et eau de consommation : à quoi le consommateur est-il exposé ?

Poster présenté au « Doctoriales Bretagne 2008 » à Brest (29) du 16 au 19 novembre 2008.

Merel, S., Monteau, F., Lebot, B., Le Bizec, B., Thomas, O., Clément, M., 2008. Chlorination of the cyanotoxin microcystin-LR: reactants consumption and by-products identification.

Communication orale réalisée au « 43rd Central Canadian Symposium on Water Quality Research » à Burlington (Ontario, Canada) du 11 au 12 février 2008.

Merel, S., Monteau, F., Lebot, B., Le Bizec, B., Thomas, O., Clément, M., 2008. Dégradation de la microcystine-LR par l'acide hypochloreux : consommation des réactifs et formation de sous-produits.

Communication orale réalisée au « GIS cyanobactéries » à Saint Malo (35) du 28 au 30 janvier 2008.

Merel, S., Monteau, F., LeBot, B., Le Bizec, B., Clément, M., 2007. Utilisation de la technologie LTQ-Orbitrap pour la recherche et l'identification des produits de chloration d'une cyanotoxine.

Poster présenté aux « Premières Journées aux Interfaces Chimie-Biologie-Biophysique » à Rennes (35) du 11 au 12 décembre 2007.

Merel, S., Mercier, F., Monteau, F., LeBot, B., Clément, M., 2007. Behaviour of microcystin LR towards hypochlorous acid.

Poster présenté au « 23^{ème} Congrès de l'Est du Canada sur la Qualité de l'Eau » à Sherbrooke (Québec) le 26 octobre 2007.

ANNEXES

- Annexe I :** Merel, S., Clement, M., Thomas, O., 2009.
State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine.
Toxicon 55 (4), 677-691.
- Annexe II :** Merel, S., LeBot, B., Clément, M., Seux, R., Thomas, O., 2009.
MS identification of microcystin-LR chlorination by-products.
Chemosphere 74 (6), 832-839.
- Annexe III :** Merel, S., Clement, M., Thomas, O., 2009.
Identification of a new cylindrospermopsin chlorination by-product.
Science of the Total Environment (manuscrit soumis le 21 septembre 2009).

ANNEXE I

Merel, S., Clement, M., Thomas, O., 2009.

State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine

Toxicon 55 (4), 677-691.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicol

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Review

State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine

Sylvain Merel, Michel Clément, Olivier Thomas*

Environment and Health Research Laboratory (LERES), French School of Public Health (EHESP), Avenue du Professeur Léon-Bernard – CS 74312, 35043 Rennes Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2009

Received in revised form 24 June 2009

Accepted 2 October 2009

Available online 27 October 2009

Keywords:

Cyanotoxin

Microcystin

Nodularin

Cylindrospermopsin

Anatoxin

Saxitoxin

Chlorination

Drinking water

Disinfection

By-products

Toxicity

ABSTRACT

The occurrence of cyanobacterial blooms is drastically increasing in temperate countries and drinking water resources are threatened. As a result, cyanotoxins should be considered in water treatment to protect human health. This study presents a state of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorination, a common drinking water disinfection process. Chlorination efficiency on cyanotoxins alteration depends on pH, chlorine dose and oxidant nature. Microcystins and cylindrospermopsin are efficiently transformed by chlorine, with respectively 6 and 2 by-products identified. In addition, chlorination of microcystins and cylindrospermopsin is associated with a loss of acute toxicity. Even though they have been less investigated, saxitoxins and nodularins are also altered by chlorine. For these toxins, no by-products have been identified, but the chlorinated mixture does not show acute toxicity. On the contrary, the fact that anatoxin-a has a very slow reaction kinetics suggests that this toxin resists chlorination.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Because of anthropic pressure, the algae crisis phenomenon is drastically increasing in temperate countries, and climate change may also raise its occurrence and magnitude (Dale et al., 2006; Paul, 2008). Cyanobacterial blooms are a great challenge for drinking water production, for their occurrence in drinking water resource often causes several process disturbances in treatment plant, such as faster filter clogging and reactant consumption increase. In addition, geosmin and 2-methyl isoborneol, potentially released by cyanobacteria, produce water unpleasant taste and odour (Falconer et al., 1999). Over the last two decades research works have progressively emphasized on

cyanobacterial toxins (called cyanotoxins) which are now a major environmental and public health concern.

Cyanotoxins, produced only by certain species of cyanobacteria, have been associated with various animal poisonings (Edwards et al., 1992; Mez et al., 1997; Kuiper-Goodman et al., 1999; Briand et al., 2003). Nowadays, five cyanotoxin groups are considered as priority hazards to human and animal health (Codd et al., 2005a): cylindrospermopsin (CYL), anatoxins (ANTXs), microcystins (MCs), nodularins (NODs), and saxitoxins (STXs).

Humans are potentially exposed to cyanotoxins through drinking water produced from raw water subjected to cyanobacterial blooms. Several poisonings mainly resulting in gastro-enteritis have been reported worldwide (Kuiper-Goodman et al., 1999), but some cases of fatal intoxication are known too (Pouria et al., 1998; Jochimsen et al., 1998; Azevedo et al., 2002; Yuan et al., 2006). In order to protect human health, the World Health Organization (WHO) has

* Corresponding author. Tel.: +33 2 99 02 29 20; fax: +33 2 99 02 29 29.
E-mail address: olivier.thomas@ehesp.fr (O. Thomas).

considered the microcystin-LR (MC-LR), one of the most frequently occurring cyanotoxins, and has proposed a guideline of 1 µg/L as a maximum concentration in drinking water (WHO, 1998).

In this context, different studies on the efficiency of cyanotoxins elimination by a range of processes, such as membrane filtration (Teixeira and Rosa, 2005; Gijbsbertsen-Abrahamse et al., 2006), adsorption on activated carbon (Lambert et al., 1996; Pendleton et al., 2001; Huang et al., 2007), oxidation by permanganate (Rodríguez et al., 2007a), and ozonation (Rositano et al., 2001; Brooke et al., 2006; Onstad et al., 2007) have been carried out. Cyanotoxins chlorination has also been particularly analyzed (Nicholson et al., 1994; Tsuji et al., 1997; Kull et al., 2004; Acero et al., 2005; Xagorarakis et al., 2006; Ho et al., 2006; Rodríguez et al., 2007b; Merel et al., 2009), as chlorine is a strong oxidant widely used to ensure water disinfection. However, each study is usually focused on a single toxin (or group of toxins), considering the chlorination reaction either through toxin removal, by-products, or mixture toxicity. For this reason, the present paper aims to gather knowledge to provide a state of the art on cyanotoxins chlorination.

2. Occurrence, structure and toxicity of cyanotoxins

In 2004, the occurrence of toxic cyanobacteria was reported in more than 60 countries (Svrcek and Smith, 2004), but the list of countries concerned keeps increasing, and now it includes, for example, Spain (Carrasco et al., 2007), Tunisia (El Herry et al., 2008) and Saudi Arabia (Mohamed, 2008). Since the first poisoning case was reported (Francis, 1878), toxic cyanobacterial blooms have been associated with a range of intoxications worldwide. However, as cyanotoxins strongly differ in their structure (Fig. 1a and 1b) and properties, an overview of each one will lead to a better understanding of their respective behaviour towards chlorine.

2.1. Hepatotoxins microcystins and nodularins

2.1.1. Occurrence and synthesis

MCs, which are probably the most frequently occurring cyanotoxins, have been reported in a wide range of regions, such as Scandinavian countries (Fristachi and Sinclair, 2008), North Africa (El Herry et al., 2008; Fristachi and Sinclair, 2008), North America (Fristachi and Sinclair, 2008), Europe (Gkelis et al., 2005; Ernst et al., 2009; Fristachi and Sinclair, 2008), and Asia (Dai et al., 2008; Zhang et al., 2009; Fristachi and Sinclair, 2008). In contrast, NODs have been reported in a more restricted area including New Zealand, Australia and the Baltic Sea (Sivonen and Jones, 1999).

MCs are produced by many genera of cyanobacteria, including *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Anabaena* and *Anabaenopsis* (Kaebnick and Neilan, 2001) while NODs are only produced by *Nodularia spumigena*. Toxin synthesis is a complex process influenced by environmental conditions and varying according to strains present in the sample. In the past decades, advances in biology have raised the understanding of MCs production, indicating that toxin synthesis was controlled by genes. For example, the gene cluster *mcyA-J* codes for a multienzyme complex including peptide

synthetase and polyketide synthase, which allows MCs' components to be fitted together non-ribosomally (Kaebnick and Neilan, 2001; Dittmann and Wiegand, 2006). It is considered that NODs synthesis is a similar process.

2.1.2. Structure and characteristics

MCs and NODs are two different groups of cyanotoxins (chemical structures illustrated in Fig. 1a). MCs and NODs are respectively, cyclic heptapeptides and pentapeptides enclosing the unusual Adda amino acid (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-dienoic acid) whose conjugated diene may be at the origin of the toxicity discussed later (An and Carmichael, 1994; Tsuji et al., 1997; Dawson, 1998). Variable amino acids (X and Z for MCs, and only Z for NODs indicated in Fig. 1a) should also be considered since their multiple combinations make the difference between more than 70 MCs already reported (Sivonen and Jones, 1999; Westrick, 2003; De Figueiredo et al., 2004; Codd et al., 2005a and 2005b; Dietrich and Hoeger, 2005; Sangolkar et al., 2006) and 9 NODs (Codd et al., 2005a). Each toxin variant is clearly identified by the initials of variable amino acids X and Z. For example, the most frequently occurring MC which has leucine (initial L) and arginine (initial R), should be identified as MC-LR. In the same way, NOD having arginine as variable amino acid Z should be identified as NOD-R.

Both MCs and NODs are water-soluble molecules and their cyclic structure provides them a high chemical stability. Indeed, these molecules are known to resist to boiling, chemical hydrolysis and oxidation at pH close to neutrality. In natural samples and darkness, for example, MCs may remain stable for months or years (Sivonen and Jones, 1999). However, these toxins can be degraded by intense UV irradiation (Tsuji et al., 1995; Gajdek et al., 2004) and by strong oxidants, such as ozone (Hoeger et al., 2002; Brooke et al., 2006; Onstad et al., 2007) and chlorine (Nicholson et al., 1994; Tsuji et al., 1997; Kull et al., 2004; Acero et al., 2005; Merel et al., 2009).

2.1.3. Toxicity

Once absorbed by the organism, MCs and NODs are mainly concentrated in the liver (Fischer et al., 2000) where they are fixed on protein phosphatase establishing covalent bonds (Dawson, 1998; Kuiper-Goodman et al., 1999). As a result, protein phosphatase is inhibited and phosphorylated proteins are accumulated in liver cells, thereby causing them necrosis that produces massive haemorrhage and death (MacKintosh et al., 1990; Dawson, 1998; Kuiper-Goodman et al., 1999; Gupta et al., 2003). MCs have also shown a potential tumour promotion activity (Falconer, 1991; Nishiwaki-Matsushima et al., 1992; Kuiper-Goodman et al., 1999).

The toxicity level of a mixture depends on the variant of toxin present in the sample (Sivonen and Jones, 1999), but MC-LR and NOD-R seem to be the reference for MCs and NODs. When administrated per intraperitoneal (i.p.) injection, the lethal dose 50 (LD₅₀) of MC-LR and NOD-R ranges, respectively, from 25 to 150 µg/kg and from 50 to 150 µg/kg (Kuiper-Goodman et al., 1999). The WHO considered the MC-LR no observable adverse effect level (NOAEL) of 40 µg/kg/d obtained after 13 weeks mice oral exposure (Fawell et al., 1999) and applied a 10³ factor of

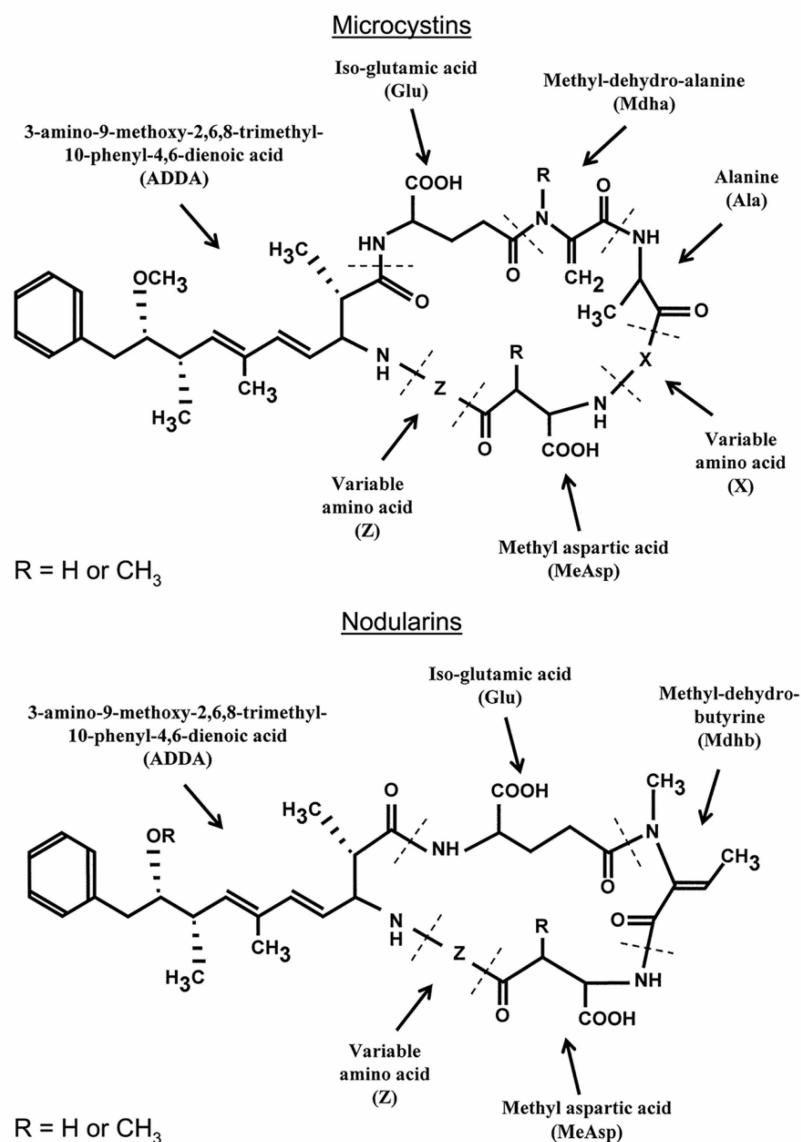


Fig. 1a. Structure of microcystins and nodularins.

uncertainty. In addition, taking into account an average human weight of 60 kg, as well as an average intake of 80% through 2 L of water consumed daily, the WHO proposed a guideline of 1 µg/L as a maximum value for MC-LR in drinking water (WHO, 1998). However, no guideline was determined for NODs.

MCs and NODs have been associated with various animal and human poisonings (Soares et al., 2006; Hilborn et al., 2007; Stewart et al., 2008). Contact and ingestion through bathing in water containing bloom is a classic exposure route for cyanotoxins, but drinking water produced from a contaminated resource should also be considered as a potential source of intoxication. Fortunately, water treatments are generally successful to reduce cyanotoxins concentration and most of human

intoxications reported were limited to gastro-enteritis (Teixeira et al., 1993; Kuiper-Goodman et al., 1999). Nevertheless, MCs were also responsible for a fatal intoxication case, which occurred at the Brazilian dialysis centre of Caruaru in 1996. MCs contained in water used for the hemodialysis process could reach blood, quickly affected the liver and caused the death of 60 patients (Pouria et al., 1998; Jochimsen et al., 1998; Azevedo et al., 2002; Yuan et al., 2006).

2.2. Hepatotoxin cylindrospermopsin

2.2.1. Occurrence and synthesis

CYL has long been considered as a tropical toxin (Rücker et al., 2007), as it was mostly reported in Australia (Saker

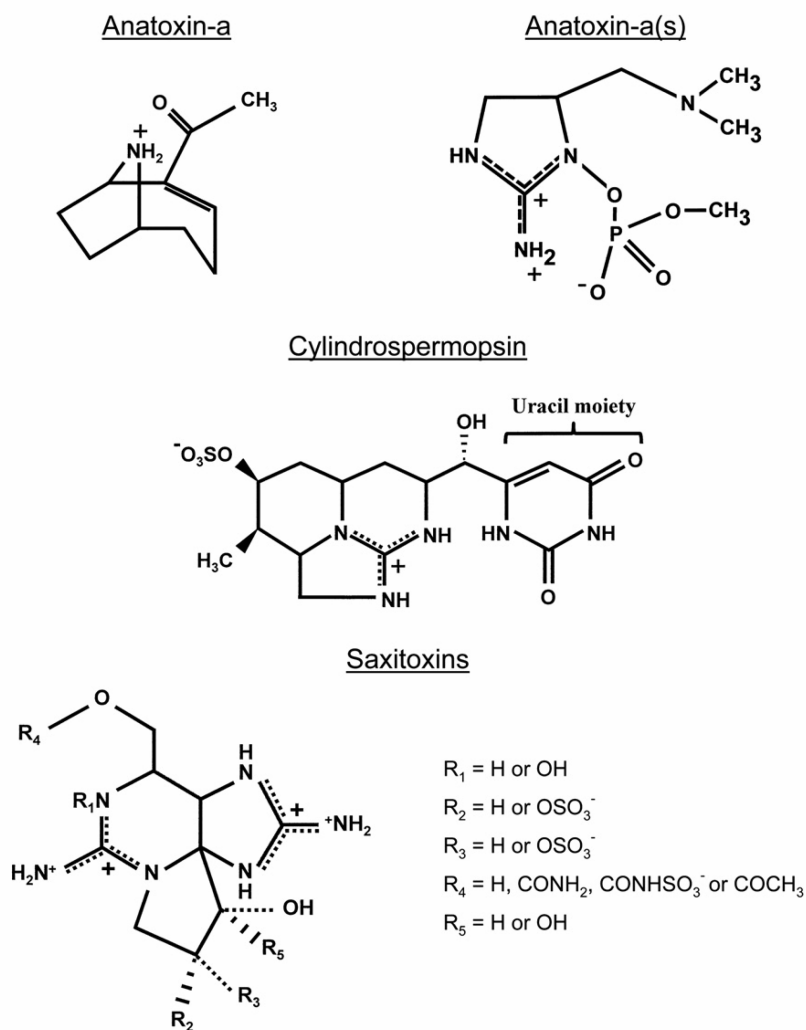


Fig. 1b. Structure of anatoxin-a, anatoxin-a(s), cylindrospermopsin and saxitoxins.

et al., 1999; Griffiths and Saker, 2003; Stewart et al., 2008; Fristachi and Sinclair, 2008), New Zealand (Stirling and Quilliam, 2001), Thailand (Li et al., 2001; Carmichael et al., 2001), and in southern states of the USA, like Florida (Burns, 2008). Nevertheless, since a few years, CYL has been characterized in temperate countries, such as Germany (Fastner et al., 2003 and 2007; Rücker et al., 2007; Wiedner et al., 2008) and France (Bernard et al., 2003; Brient et al., 2009), and even in boreal environments, like in Finland (Spoof et al., 2006).

CYL is mainly synthesized by *Cylindrospermopsis raciborskii*, but other cyanobacteria like *Aphanizomenon ovalisporum*, *Raphidiopsis curvata* and *Umezakia natans* also have this ability (Banker et al., 1997; Fristachi and Sinclair, 2008). However, there is a possibility that toxic and non-toxic strains of CYL-producing cyanobacteria may exist (Schembri et al., 2001). In the same way as MCs, synthesis of CYL seems to be regulated by genes coding for polyketide synthase and peptide synthetase that gather

toxin's components non-ribosomally (Schembri et al., 2001).

2.2.2. Structure and characteristics

CYL, presented in Fig. 1b, is a 415 Da alkaloid with a zwitterionic structure including a tricyclic guanidine unit and a uracil moiety which seems to be linked with toxicity (Banker et al., 2001). Today, 2 other variants of this toxin have been identified. The first one, called 7-epicylindrospermopsin, differs only by the orientation of the hydroxyl group close to the uracil moiety (Banker et al., 2000; Briand et al., 2003). The second one, called deoxy-cylindrospermopsin, seems to be non-toxic (Briand et al., 2003) and is characterized by a missing oxygen atom related to the initial hydroxyl group close to uracil moiety (Norris et al., 1999; Li et al., 2001).

CYL is a highly polar compound whose zwitterionic structure makes it highly water-soluble (Chiswell et al., 1999). This cyanotoxin is not stable in an algal extract, as

90% degradation has been reported within 3 days when exposed to sunlight (Chiswell et al., 1999). However, in high purity water, CYL shows a half-life greater than 10 days and seems to be resistant to degradation by pH and temperature changes (Chiswell et al., 1999).

2.2.3. Toxicity

Mouse bioassays have shown that CYL can affect the kidney, lung, intestine, and like MCs, it mainly attacks the liver (Bernard et al., 2003). However, contrary to MCs, CYL acts through an irreversible inhibition of protein synthesis leading to cell death (Frosio et al., 2003 and 2008; Metcalf et al., 2004). Micronucleus induction, chromosome loss (Humpage et al., 2000), tumour initiation (Falconer and Humpage, 2001) and foetal toxicity (Rogers et al., 2007) are other known effects of CYL exposure.

The LD₅₀ 24 h after i.p. injection of purified CYL in mice was estimated to 2100 µg/kg, but when administrating toxin orally during 11 weeks, a 30 µg/kg/d NOAEL was obtained (Humpage and Falconer, 2003). Based on the WHO's parameters for MC-LR, a potential guideline for CYL's maximum concentration in drinking water would be 0.72 µg/L. However, Humpage and Falconer (2003) assumed a proportion of the total toxin intake in drinking water of 90%, calculated a guideline of 0.81 µg/L, but proposed 1 µg/L for practical reasons.

CYL has been identified as the origin of various human and animal intoxications (Saker et al., 1999; Stewart et al., 2008; Falconer, 2008), such as the famous Palm Island mystery disease (Byth, 1980; Bourke et al., 1983; Griffiths and Saker, 2003). In 1979, since a dense cyanobacterial bloom occurred in the water supply of Palm Island, northern Queensland, Australia, an algicidal treatment was applied to eliminate cyanobacteria, but this one led to a CYL release. Some days later, over 100 children suffering from gastro-enteritis attributed to contaminated drinking water consumption were admitted to the local hospital.

2.3. Neurotoxins anatoxins

Two kinds of ANTXs have been identified: anatoxin-a (ANTX-a) and anatoxin-a(s) (ANTX-a(s)), which differ in structure and pharmacodynamics.

2.3.1. Occurrence and synthesis

ANTX-a occurrence was first reported in the USA in 1951 (Osswald et al., 2007). But ANTX-a has also been identified in Africa (Krienitz et al., 2003; Ballot et al., 2003), in Asia (Park et al., 1993 and 1998; Namikoshi et al., 2003), and recently in Europe (James et al., 1997; Fromme et al., 2000; Viaggiu et al., 2004; Gugger et al., 2005; Carrasco et al., 2007). In contrast, ANTX-a(s) has been found in more restricted areas including the United States, Scotland, Denmark and Brazil (Onodera et al., 1997; Sivonen and Jones, 1999; Molica et al., 2005).

While ANTX-a(s) has only been associated with *Anabaena* strains (Sivonen and Jones, 1999), ANTX-a is mainly produced by *Anabaena*, *Aphanizomenon* or *Planktothrix* (Van Apeldoorn et al., 2007; Osswald et al., 2007), and it has also been attributed to some species of *Microcystis*, *Oscillatoria* or *Cylindrospermum* (Van Apeldoorn et al., 2007; Osswald et al., 2007; Fristachi and Sinclair, 2008). So far, the

biosynthesis of ANTXs has not been entirely explained, but a relation has been established between toxin production and DNA (Osswald et al., 2007).

2.3.2. Structure and characteristics

On the one hand, ANTX-a (Fig. 1b) is a 165 Da alkaloid with a secondary amine moiety. There is also another variant that has been identified as homoanatoxin-a and that only differs in the methylation of the carbon at the extremity of the keton function (James et al., 1998; Sivonen and Jones, 1999; Van Apeldoorn et al., 2007). On the other hand, ANTX-a(s) is a 252 Da phosphate ester of a cyclic N-hydroxyguanine (Sivonen and Jones, 1999; Van Apeldoorn et al., 2007), as presented in Fig. 1b.

ANTX-a is also a highly water-soluble polar compound that cannot be easily extracted from an aqueous solution. When pH reaches 10, ANTX-a has no charge and is unstable. Additionally, with sunlight exposure, the toxin is quickly transformed into a non-toxic form (Duy et al., 2000; Osswald et al., 2007). In the same way, ANTX-a(s) is altered by heat and alkaline pH (Carmichael et al., 1997).

2.3.3. Toxicity

ANTXs are neurotoxins that act on the neuromuscular junction and paralyse muscles including those involved in breathing activity (Osswald et al., 2007). ANTX-a stimulates muscles through fixation on acetylcholine receptors. In addition, ANTX-a, which seems to be more efficient in stimulating muscles than acetylcholine itself, is not degraded by acetylcholinesterase (Osswald et al., 2007). Consequently, muscles undergo overstimulation, thereby leading to death due to respiratory arrest (Osswald et al., 2007). On the contrary, ANTX-a(s) does not directly stimulate muscles, but it blocks acetylcholine degradation through acetylcholinesterase inhibition (Molica et al., 2005). Thus, muscles undergo overstimulation with similar effects of ANTX-a.

When considering acute toxicity in mice, the LD₅₀ of ANTX-a was estimated 375 µg/kg by i.p. injection but higher than 5 mg/kg by oral exposure (Kuiper-Goodman et al., 1999; Falconer, 2008). However, as other studies on subacute toxicity reported dissimilar results, neither a tolerable daily intake value nor a guideline for drinking water could be determined (Kuiper-Goodman et al., 1999). Concerning ANTX-a(s), a few investigations have been conducted, and only the 20 µg/kg LD₅₀ by i.p. injection into mice is available.

ANTX-a and its variants have been associated with different animal poisonings (Edwards et al., 1992; Henriksen et al., 1997; Wood et al., 2007). In various reported cases of cattle, birds or dogs death, symptoms consisted in vomiting, convulsion and breath failure (Krienitz et al., 2003; Gugger et al., 2005; Stewart et al., 2008). In addition, intoxication by ANTX-a(s) can also produce hypersalivation (Duy et al., 2000).

2.4. Neurotoxins saxitoxins

2.4.1. Occurrence and synthesis

In freshwaters, STXs are mainly produced by *Anabaena circinalis* in Australia and *Aphanizomenon flos-aquae* in the USA (Kuiper-Goodman et al., 1999), but they have also been associated with *Lyngbya wollei* and *C. raciborskii*

(Nicholson et al., 2003). In sea water, these toxins are produced by some dinoflagellates. Nevertheless, since genes responsible for STXs production have not been identified, toxin synthesis pathway remains unknown (Neilan et al., 2008).

2.4.2. Structure and characteristics

As presented in Fig. 1b, STXs are a family of tricyclic compounds ranging from 241 to 491 Da. Nowadays, more than 20 variants of these compounds have been characterized and they can be: non-sulphated, singly sulphated or doubly sulphated (Nicholson et al., 2003; Van Apeldoorn et al., 2007). In addition, decarbamoyl derivatives have also been identified (Van Apeldoorn et al., 2007).

STXs are also water-soluble and stable toxins, able to persist for over than 90 days in freshwater (Jones and Negri, 1997). These compounds are progressively degraded into more toxic variants even at high temperatures. Thus, boiling water containing STXs may potentially increase toxicity (Sivonen and Jones, 1999).

2.4.3. Toxicity

STXs are neurotoxins well known for their association with paralytic shellfish poisonings (Kuiper-Goodman et al., 1999). They act on nerve axon membranes by blockage of sodium ion channels which results in nerve dysfunction and leads to paralysis and death due to respiratory failure (Van Apeldoorn et al., 2007). The most toxic STXs derivatives exhibit a LD_{50} of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ after i.p. injection in mice, but no guideline for maximum concentration in drinking water has been established so far (Kuiper-Goodman et al., 1999; Van Apeldoorn et al., 2007).

Since the early 1900s, more than 1000 occurrences of paralytic shellfish poisonings have been reported in North and Central America resulting in minor numbness or complete paralysis and even death like in 109 cases (Kuiper-Goodman et al., 1999). However, no human intoxication through drinking water has been documented.

3. Behaviour of cyanotoxins with regard to chlorine

Since cyanotoxins are hazards to consumer's health, managing these substances is a major concern in drinking water treatment. In particular, chlorine used to perform water disinfection was shown to react with some cyanotoxins. Consequently, their transformation should be carefully considered.

3.1. Chlorination outline

Chlorine is widely used at the end of drinking water treatment to perform disinfection. It ensures destruction of microbiological pathogens, and its persistence in the distribution system helps to prevent outbreaks of water-borne diseases (Galal-Gorchev, 1996). In addition, because of its high oxidizing capability, disinfection by chlorine provides an efficient transformation of micropollutants, such as pesticides and cyanotoxins.

Drinking water chlorination is generally performed by the addition of chlorine gas or sodium hypochlorite leading to equilibrium of Cl_2 , HOCl and ClO^- according to

pH (Deborde and von Gunten, 2008). Nevertheless, weaker oxidants, such as chlorine dioxide or chloramine may be used. Chlorination of organic compounds should consist in oxidation and chlorine addition, but electrophilic substitution on amine moieties is mainly expected (Deborde and von Gunten, 2008). Since chlorination of organic material forms a wide range of substances, including noxious trihalomethanes (Rodríguez et al., 2007), cyanotoxins chlorination should be particularly considered in order to characterize reaction by-products and related toxicity.

3.2. Chlorination of microcystins and nodularins

3.2.1. Reactivity with chlorine

In spite of the fact that both of NODs and MCs are vulnerable to chlorine, most of research has focused on MCs. For example, Merel et al. (2009) reported up to 99% MC-LR transformation. However, chlorination efficiency depends largely on experimental conditions (Nicholson et al., 1994; Newcombe and Nicholson, 2004; Xagorarakis et al., 2006). Based on this idea, Hitzfeld et al. (2000) indicate that chlorination efficiency towards MCs and NODs can be affected by the chlorine compounds that therefore should be carefully considered. For instance, when treating an extract of *Microcystis* for 30 min with a 5 mg/L chlorine dose, Nicholson et al. (1994) observed that the decrease in toxin concentration reached over 95% with aqueous chlorine and calcium hypochlorite, and only 80% with sodium hypochlorite. Nevertheless, these results should be attributed to the effect of pH as sodium hypochlorite solutions are highly alkaline. In the same way, monochloramine did not show significant effect on toxin concentration even after hours of contact time, probably due to its weaker oxidizing capability compared to other chlorine forms (Nicholson et al., 1994; Acero et al., 2005). Similarly, chlorine dioxide was found to react with MC-LR, but its low kinetic constant makes it inappropriate for cyanotoxin removal during drinking water treatment (Kull et al., 2004; Rodríguez et al., 2007c).

In order to be efficient, chlorination of MCs should be performed at pH lower than 8 (Nicholson et al., 1994; Acero et al., 2005; Xagorarakis et al., 2006). Indeed, MC-LR transformation strongly slackens off while pH increases in the range 4–9 (Acero et al., 2005). This can be explained by the speciation of chlorine, considering that rising pH induces transformation of hypochlorous acid into a less reactive hypochlorite ion.

Chlorine dose is also a major variable influencing MCs transformation efficiency. A recent study (Merel et al., 2009) has shown that one mole of MC-LR reacts with 12 moles of chlorine within 30 min. In addition, it has been reported that MC-LR chlorination pseudo first order kinetic constant k determined from Eq. (1) increases with the molar ratio $[\text{chlorine}]/[\text{toxin}]$ R (Acero et al., 2005; Xagorarakis et al., 2006). Namely, k rises from $3.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ to $16.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ when R is set from 21 to 89. Then, it should be noticed that chlorine dose must be sufficient to react with MCs and to satisfy chlorine demand of natural organic material (NOM) which compete with toxins and potentially reduce chlorination efficiency (Kull et al., 2006).

$$\ln \frac{[\text{toxin}]_t}{[\text{toxin}]_0} = -k \cdot t \quad (1)$$

where $[\text{toxin}]_t$ stands for toxin concentration at contact time t (expressed in M), $[\text{toxin}]_0$ is the initial toxin concentration (expressed in M), k is the pseudo first order kinetic constant (expressed in s^{-1}), and t is contact time (expressed in s).

Although there is not extensive knowledge about chlorination of diverse MCs, Ho et al. (2006) have shown that four common MCs variants exhibit different reactivity with chlorine: MC-YR > MC-RR > MC-LR > MC-LA. These results indicate that MCs react with chlorine according to the reactivity of their 2 variable amino acids, and that some rarely occurring MCs may be resistant to chlorination. However, it is admitted that MCs concentration is efficiently reduced if pH is maintained below 8 and if 0.5 mg/L of free chlorine residual is present after 30 min of exposure (Nicholson et al., 1994; Hitzfeld et al., 2000; Newcombe and Nicholson, 2004).

3.2.2. Identification of chlorination by-products

As chlorination efficiently transforms MCs, identifying their related by-products is a great concern to protect human health. So far, only chlorination by-products of MC-LR have been studied in high purity water and 6 compounds have been identified, as well as their respective isomers (Table 1).

The first MC-LR chlorination by-product was identified as dihydroxy-microcystin (Tsuji et al., 1997). Through chlorination of MC-LR with a molar ratio $[\text{chlorine}]/[\text{toxine}]$ R around 2 and analysis of samples by liquid chromatography – mass spectrometry (LC–MS), 4 isomers with a mass/charge ratio (m/z) 1029 were observed. The 34 m/z difference with MC-LR (m/z 995.555) is consistent with both the fixation of 2 hydroxyl groups on the toxin and the chemical formula $\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$. Therefore, as illustrated in Fig. 2, dihydroxy-microcystin would be formed by chlorine addition on the conjugated diene of Adda followed by a hydrolysis leaving two hydroxyl moieties (Tsuji et al., 1997; Lawton and Robertson, 1999). Assuming that the conjugated diene is responsible for the maximum in absorbance of MC-LR at 240 nm (Tsuji et al., 1997), alteration of Adda amino acid is consistent with the significant decrease in absorbance at the same wavelength associated with chlorination (Merel et al., 2009). In addition, a recent study (Merel et al., 2009) provided an accurate m/z measurement (1029.560) of

dihydroxy-microcystin, confirmed the presence of 2 hydroxyl groups by tandem mass spectrometry (MS^2), set R to 20 and brought to light 4 new isomers.

The second by-product was observed at m/z 1047, initially when mixing MC-LR with chlorine dioxide (Kull et al., 2004). Considering the 18 m/z difference with the previous compound, it was first identified as the hydrated form of dihydroxy-microcystin. When mixing MC-LR with hypochlorous acid, a recent study reported 5 isomers of a similar compound, but based on a more accurate m/z measurement (1047.526), a chlorinated structure was found to be more suitable (Merel et al., 2009). Therefore, the chemical formula $\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{Cl}$ corresponding to monochloro-hydroxy-microcystin has been proposed (Merel et al., 2009). This by-product should be formed by the loss of one double bond to fix one chlorine atom and one hydroxyl group, as sustained by MS^2 experiments.

In addition, through an accurate m/z measurement and MS^2 experiments, 4 other MC-LR chlorination by-products and their isomers have been characterized (Merel et al., 2009): monochloro-microcystin, monochloro-dihydroxy-microcystin, dichloro-dihydroxy-microcystin, and trichloro-hydroxy-microcystin. Monochloro-microcystin and its 3 isomers associated with the chemical formula $\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{Cl}$ should be formed by the substitution of one hydrogen atom by a chlorine atom on MC-LR. However its characteristic m/z 1029,516 does not allow distinguishing it from dihydroxy-microcystin through low resolution mass spectrometry. Monochloro-dihydroxy-microcystin and its numerous isomers related to the chemical formula $\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{Cl}$, and m/z 1063.521 may be formed by the substitution of one hydrogen atom by one chlorine atom on the previously presented dihydroxy-microcystin. Dichloro-dihydroxy-microcystin with its 7 isomers corresponding to m/z 1097.481 and to the chemical formula $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{Cl}_2$ may be formed by the substitution of one hydrogen atom by one chlorine atom on the previously reported monochloro-dihydroxy-microcystin. Trichloro-hydroxy-microcystin and its 6 isomers associated with the chemical formula $\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{Cl}_3$ and m/z 1115.448 should be formed by the substitution of 2 hydrogen atoms by 2 chlorine atoms on the previously identified monochloro-hydroxy-microcystin.

Four of the by-products presented previously are intermediates and 2 are final compounds (Merel et al., 2009). Dihydroxy-microcystin, monochloro-microcystin and monochloro-hydroxy-microcystin are intermediates formed within 2 min just after the beginning of the reaction that then are quickly transformed. Trichloro-hydroxy-

Table 1
Characteristics of microcystin-LR and cylindrospermopsin chlorination by-products.

Toxin	By-product	Chemical formula	Isomers observed	[Chlorine]/[toxin]	References
Microcystin-LR	Dihydroxy-microcystin	$\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{N}_{10}\text{O}_{14}$	8	2 and 20	Tsuji et al., 1997; Merel et al., 2009
	Monochloro-microcystin	$\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{Cl}$	3	20	Merel et al., 2009
	Monochloro-hydroxy-microcystin	$\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{Cl}$	5	20	Merel et al., 2009
	Monochloro-dihydroxy-microcystin	$\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{Cl}$	>10	20	Merel et al., 2009
	Dichloro-dihydroxy-microcystin	$\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{Cl}_2$	7	20	Merel et al., 2009
	Trichloro-hydroxy-microcystin	$\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{Cl}_3$	6	20	Merel et al., 2009
Cylindrospermopsin	5-chloro-cylindrospermopsin	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_7\text{SCl}$	Non-specified	1	Banker et al., 2001
	Cylindrospermopsic acid	$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$	Non-specified	2	Banker et al., 2001

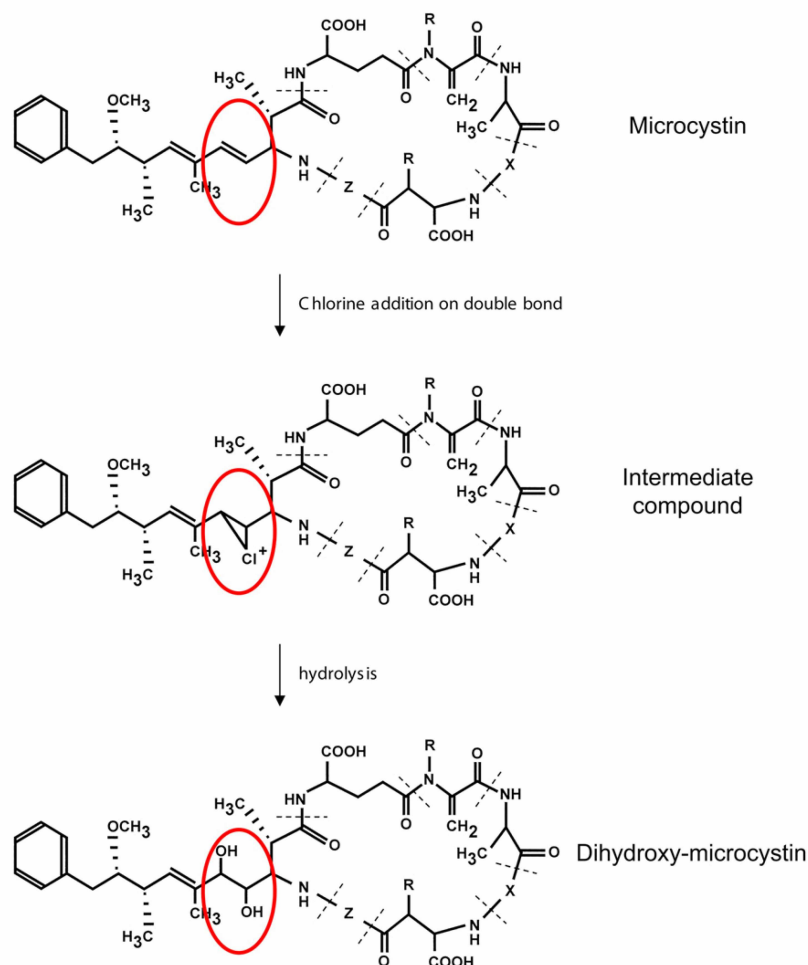


Fig. 2. Formation of dihydroxy-microcystin (adapted from Tsuji et al., 1997).

microcystin is also an intermediate, but it is formed within 10 min. Monochloro-dihydroxy-microcystin, which is the first final by-product, is totally formed within 2 min whereas the second one, dichloro-dihydroxy-microcystin, is progressively formed within 30 min.

By-products named above may represent only a part of the initial toxin (Merel et al., 2009). For example, within 2 min chlorination, the known fate of MC-LR is close to 25%, but once intermediate compounds are further transformed, after 60 min chlorination, the known fate of MC-LR is reduced around 5% only. Therefore, further research should be undertaken to better characterize by-products of MC-LR and those of other MCs variants presenting different chlorine reactivity (Ho et al., 2006).

3.3. Chlorination of cylindrospermopsin

3.3.1. Reactivity with chlorine

CYL was shown to be vulnerable to chlorine (Senogles et al., 2000; Banker et al., 2001; Newcombe and Nicholson, 2004; Rodríguez et al., 2007b and 2007c). As a matter of fact, significant decrease in toxin concentration has been

reported (Senogles et al., 2000; Newcombe and Nicholson, 2004), but diverse factors can influence the reaction.

In order to enhance chlorination efficiency, chlorine source should be carefully selected. For example, CYL has a 1.7 min half-life when exposed to hypochlorous acid and a 14.4 h half-life when exposed to chlorine dioxide (Rodríguez et al., 2007c). In the same way, even if monochloramine potentially reacts with CYL (Banker et al., 2001), the related kinetic constant is 2400-fold lower than with hypochlorous acid in similar conditions (Rodríguez et al., 2007b).

Factors such as pH and temperature should also be considered to guarantee efficient CYL transformation. After chlorinating a cell free extract of *C. raciborskii*, Senogles et al. (2000) concluded that the degradation of CYL is reduced at pH minor than 6. In contrast, other studies suggest that pH should be maintained equal to 7 because higher values would decrease toxin transformation rate (Rodríguez et al., 2007b and 2007c). For example, Rodríguez et al. (2007b) have shown that in high purity water, chlorination second order kinetic constant k' (Eq. (2)) raises from 44.23 to 1265.1 L/mol/s when pH increases from 4 to

7, and then it falls to 53.18 L/mol/s when pH reaches 9. This study also reported that a rise in temperature from 10 °C to 30 °C would increase the chlorination kinetic constant k' from 470.9 to 1174.8 L/mol/s.

$$k' = \frac{k}{[\text{chlorine}]_t} \quad (2)$$

where k' is the apparent second order kinetic constant (expressed in L/mol/s), k is the pseudo first order kinetic constant (expressed in s^{-1}), and $[\text{chlorine}]_t$ stands for the remaining chlorine concentration at contact time t (expressed in M).

Moreover, competition with NOM should be taken into account to achieve a successful CYL transformation. In fact, the occurrence of NOM increases the chlorine dose necessary to CYL transformation (Senogles et al., 2000; Rodríguez et al., 2007b and 2007c) because an additional chlorine demand has to be satisfied. For example, Rodríguez et al. (2007b) reported that at pH 7.3 and 20 °C, only 1.5 mg/L were sufficient to remove more than 98% of the toxin (415 µg/L) in water containing dissolved organic carbon (6.7 mg/L), ammonia (2.3 µM), bicarbonate (0.6 mM). These results suggest that drinking water disinfection through

chlorination may be a potential remedial measure for punctual CYL occurrence in raw water.

3.3.2. Identification of chlorination by-products

Identification of chlorination by-products is of great concern but requires relatively high concentration of toxin and specific detection apparatus. To date only 2 chlorination by-products of CYL have been reported: 5-chloro-cylindrospermopsin and cylindrospermopsic acid (Banker et al., 2001; Senogles-Derham et al., 2003; Rodríguez et al., 2007c).

5-chloro-cylindrospermopsin has been identified in high purity water when treating CYL with a molar ratio $[\text{chlorine}]/[\text{toxin}]$ R of 1 and 2 (Banker et al., 2001). As illustrated in Fig. 3, this 449 Da compound, which is mainly associated with $R=1$, is formed by substitution of a hydrogen atom by a chlorine atom on the uracil moiety. This by-product also has a characteristic UV spectrum showing 2 maximum in absorbance at 196 and 277 nm with respective molar absorption coefficient of 11,600 and 4400 L/mol/cm (Banker et al., 2001).

Cylindrospermopsic acid, which has been identified in high purity water, mainly occurs when $R=2$ (Banker et al., 2001). As illustrated in Fig. 3, this 349 Da compound is

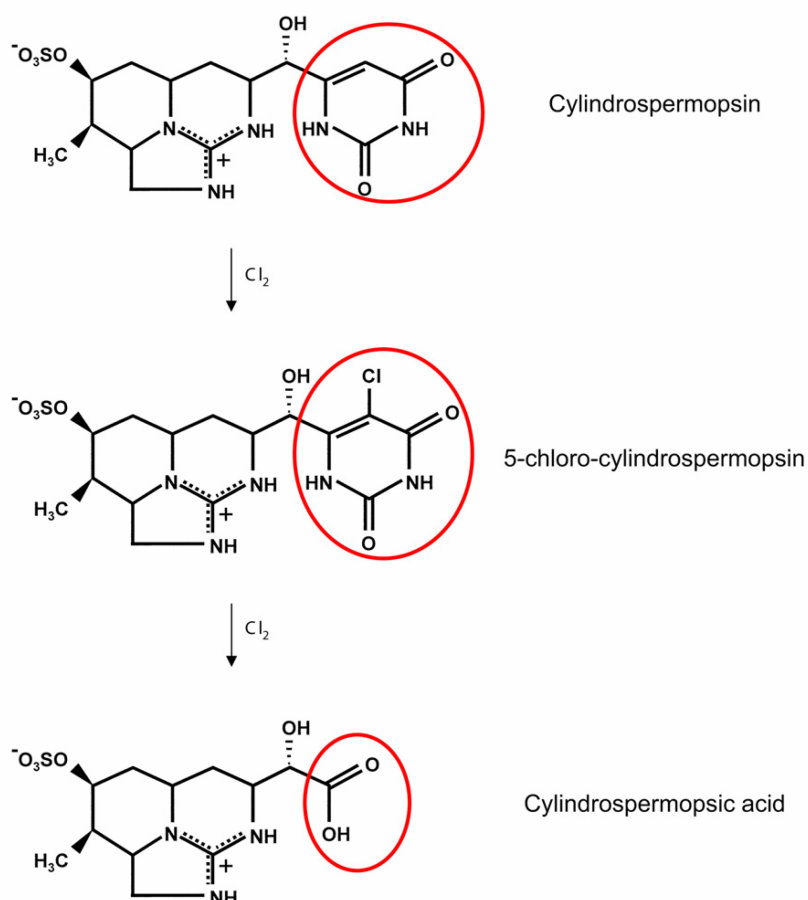


Fig. 3. Formation of 5-chloro-cylindrospermopsin and cylindrospermopsic acid (adapted from Banker et al., 2001).

probably formed by further chlorination of the previous by-product, 5-chloro-cylindrospermopsin, fragmenting the uracil moiety and leaving a carboxylic acid function. In addition, Banker et al. (2001) have characterized this by-product through its UV spectrum, showing a maximum in absorbance at 195 nm with a molar absorption coefficient of 10,500 L/mol/cm.

Further investigation on CYL chlorination by-products is required in order to establish the evolution profile of the previous compounds and to examine greater *R* values that would be consistent with practical situation in drinking water treatment. Indeed, considering that concentration of CYL in raw water commonly ranges from 1 to 10 µg/L (Falconer and Humpage, 2006) and that chlorination usually leads to 0.5 mg/L of free chlorine residual during drinking water treatment, *R* should reach at least 290. With such chlorine dose, new by-products should be formed, for example, through chlorine reaction on N–H bonds of CYL, 5-chloro-cylindrospermopsin or cylindrospermopsin acid.

3.4. Chlorination of anatoxin-a

ANTX-a has shown low reactivity towards chlorine (Rodríguez et al., 2007b and 2007c), which may have discouraged further investigation. For example, when mixing ANTX-a with chlorine 25 fold in excess in high purity water at pH 7, the second order kinetic constant was only 0.71 L/mol/s. In addition, oxidation of the toxin through chloramine was found to be even weaker with a second order kinetic constant lower than 0.1 L/mol/s at pH 7.2. Consequently, neither chlorination by-products nor residual toxicity has been investigated, and chlorination has not been considered as a suitable option for ANTX-a removal during drinking water treatment (Rodríguez et al., 2007c).

3.5. Chlorination of saxitoxins

Although the reaction of chlorine with STXs has not been extensively studied, Nicholson et al. (2003) investigated chlorination of some variants (see Table 2) and reported their efficient transformation under appropriate experimental conditions. In fact, chlorination efficiency highly depends on pH. For example, toxins transformation rises from 20% to 98% when pH increases from 4 to 9 (Nicholson et al., 2003). In addition, if pH is taken into account, chlorinating agent (gaseous chlorine or sodium hypochlorite) does not influence the reaction (Nicholson et al., 2003). However, it should be noticed that STXs reactivity with chlorine differs depending on the variant. In fact, the following vulnerability has been

Table 2
Saxitoxins studied by Nicholson et al. (2003).

Name	R1 ^a	R2 ^a	R3 ^a	R4 ^a	R5 ^a
STX	H	H	H	CONH ₂	OH
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂	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
dcSTX	H	H	H	H	OH

^a See Fig. 1b for chemical structure.

established: GTX5 = dcSTX > STX > GTX3 = C2 > C1 > GTX2 (Nicholson et al., 2003; Westrick, 2008). Nevertheless, further research is required to identify STXs by-products.

4. Toxicity assessment post-chlorination

The transformation of the initial toxin through chlorination or any other process does not necessary lead to a complete or partial loss of toxicity. Indeed, if transformation does not occur on the chemical moiety responsible for toxicity, by-products can be as harmful as the initial compound or even more. Therefore, toxicity tests have to be performed on the chlorinated mixture in order to assess benefits of cyanotoxin chlorination for human health.

4.1. Toxicity assessment of chlorinated microcystins and nodularins

Efficient transformation of MCs and NODs through chlorination has been reported, but the resulting toxicity of the mixture has not been extensively studied. Moreover, first investigations consider liver damage when performing mouse bioassay while recent studies usually measure protein phosphatase inhibition, as indicated in Table 3.

Transformation of MCs and NODs through chlorination seems to be related to a decrease in toxicity. Indeed, after being treated with chlorine, extracts of *Microcystis aeruginosa* and *Nodularia spumigena* containing MCs and NODs could not induce acute hepatotoxicity anymore (Nicholson et al., 1994). For example, some mice injected with the chlorinated mixture did not show characteristic enlarged liver within 6 h. Similar results were also reported by Tsuji et al. (1997). In addition, chlorination seems to reduce protein phosphatase inhibition. For instance, Rodríguez et al. (2008) exposed MC-LR to chlorine about 20 fold in excess in high purity water and concluded that toxicity correlated well with the decreasing toxin residual. Comparable results were also reported in another study performed with chlorine dioxide (Kull et al., 2004).

The previous results are consistent with the formation of chlorination by-products by alteration of the Adda amino acid which is considered to be responsible for toxicity (An and Carmichael, 1994; Tsuji et al., 1997; Dawson, 1998). Nonetheless, it should be emphasized that if compounds in the mixture are not hepatotoxic anymore, they may have another target organ or act through a different pathway. Consequently, further investigation should be undertaken on chlorinated samples to assess global toxicity.

4.2. Toxicity assessment of chlorinated cylindrospermopsin

Similarly to MCs and NODs, chlorination of CYL seems to reduce mixture toxicity. In high purity water, CYL exposed to chlorine twice in excess led to the formation of both 5-chloro-cylindrospermopsin and cylindrospermopsin acid, which were shown to be virtually non-toxic (Banker et al., 2001). DL₅₀ of both purified by-products estimated 5 d after i.p. administration to mice was higher than 10 mg/kg, compared to 200 µg/kg for the initial toxin. In fact, neither death nor pathological signs were reported within 10 days after by-products exposure. Besides, no increased incidence

Table 3
Toxicity of chlorinated cyanotoxins.

Toxin	Chlorination conditions	Toxicity assessment method	Post-chlorination toxicity	References
Microcystins	Extract of <i>M. aeruginosa</i> treated with various molar ratio [chlorine]/[toxin]	Mouse bioassay (i.p. injection of mixture)	Lower hepatotoxicity correlated with residual MC-LR	Nicholson et al., 1994
	Molar ratio [chlorine]/[toxin] of 2 in high purity water	Protein phosphatase inhibition assay (performed on isolated by-products)	100 fold lower than MC-LR	Tsuji et al., 1997
		Mouse bioassay (i.p. injection of isolated by-products)	No toxicity observed	Tsuji et al., 1997
	Molar ratio [ClO ₂]/[toxin] of 340 and 680 in high purity water	Protein phosphatase inhibition assay (performed on global mixture)	Lower and correlated with residual MC-LR	Kull et al., 2004
	Molar ratio [chlorine]/[toxin] around 25 in high purity water and surface water	Protein phosphatase inhibition assay (performed on global mixture)	Lower and correlated with residual MC-LR	Rodríguez et al., 2008
Cylindrospermopsin	Molar ratio [chlorine]/[toxin] around 2 in high purity water	Mouse bioassay (i.p. injection of isolated by-products)	No toxicity observed	Banker et al., 2001
	Chlorination of purified toxin and <i>C. raciborskii</i> cell free extract (molar ratio [chlorine]/[toxin] not specified)	Mouse bioassay (oral administration of the mixture through drinking water for 90 and 170 d)	No cancer incidence on mice, but 40% of male mice suffered liver injuries when feeding with chlorinated cell free extract	Senogles-Derham et al., 2003
Saxitoxins	Chlorination of <i>A. circinalis</i> cell free extract containing STX and its derivatives (molar ratio [chlorine]/[toxin] not specified)	Mouse bioassay (i.p. injection of the chlorinated mixture)	No acute toxicity observed	Nicholson et al., 2003

of cancer was noticed in mice after chlorinated CYL intake through drinking water for 90 and 170 d (Senogles-Derham et al., 2003). However, Senogles-Derham et al. (2003) reported that male mice suffered an increase in body weight and unexplained liver injuries (fatty vacuolation) after ingestion of chlorinated cell free extract of *C. Raciborskii*.

The decrease in toxicity generally observed after chlorination is consistent with the alteration of the uracil moiety considered as the cause of toxin harmful potential (Banker et al., 2001). However, the unexpected liver injuries in mice underline a need of additional investigation on chlorinated CYL toxicity. Furthermore, by-products may be potentially toxic through a new pathway, which suggests that future studies should also implement tools allowing global toxicity assessment of the mixture.

4.3. Toxicity assessment of chlorinated anatoxin-a

Chlorinated ANTX-a toxicity has not been considered as the toxin is not vulnerable to chlorine.

4.4. Toxicity assessment of chlorinated saxitoxins

Chlorination of STXs seems to reduce mixture toxicity (Newcombe and Nicholson, 2002; Nicholson et al., 2003;

Westrick, 2008). Indeed, an experience conducted in natural water spiked with toxin material and then chlorinated for 30 min showed a loss of acute toxicity (Nicholson et al., 2003) in 20 g mice injected (i.p. injection) with a 1 mL sample. Whereas non-chlorinated samples containing approximately twice the lethal dose of STXs led to death within 8–16 min, showing a neurotoxic effect, no mice death was reported with chlorinated samples.

Data available only focused on acute toxicity and considered mice death in a short term period. However, chlorination by-products may be neurotoxic and show either a lower activity or symptoms appearing later than with the initial toxin. STXs chlorination by-products may also have a mechanism of toxicity different from the one of the initial toxin which has not been detected yet. Consequently, there is still a research need to characterize the global toxicity of chlorinated STXs.

5. Critical synthesis

Cyanotoxins are a major environmental and public health concern. The current state of knowledge carries new questions, such as the geographical distribution of harmful cyanobacterial blooms. Today, investigations on cyanotoxins are quite expensive studies mostly conducted in

developed countries. However, the list of countries concerned by this phenomenon should keep increasing through some future studies in Africa and South America. Besides, climate change may modify cyanotoxins distribution through potential change in cyanobacteria habitat.

Some cyanotoxins may remain unidentified, but through technology advances, such as mass spectrometry becoming more accurate and sensible, the number of cyanotoxins characterized might increase in the coming decade. In addition, toxin synthesis remains unclear. Only the case of MCs has been successfully assessed, and regulation of genes involved into this biological process still has to be further studied.

As presented in this study, chlorination can be an efficient remedial measure for most of the cyanotoxins. However, raw water may contain a mixture of toxin which may require different chlorination conditions. Therefore, drinking water disinfection by chlorine should be integrated into a multi-barrier approach, and research should be focused on combined treatments, like activated carbon with chlorination, ozonation and membrane filtration.

Finally, the major question about cyanotoxins chlorination concerns by-products. To date, only a few number of them have been characterized, which is insufficient to understand toxins transformation pathway and to evaluate toxicity post-chlorination accurately. Previous investigations have assessed the toxicity of chlorinated mixtures according to tests designed for the initial toxin and reported that the chlorinated samples do not have the same activity than the initial compound. However, it cannot be concluded that chlorinated toxins are non-biologically active. The considerations mentioned above show that further investigation is required to consider chlorinated toxins according to global toxicity tests.

6. Conclusion

Chlorination efficiently transforms MCs, NODs, CYL, and STXs but ANTX-a. In addition, the optimal transformation of cyanotoxins strongly depends on experimental conditions which should be carefully considered. Even if chlorine dose required and chlorine source may match for each cyanotoxin, there is an opposition between more suitable pH values (below 8 for MCs and NODs, 7 for CYL, 9 for STXs). Therefore, chlorination of a cyanotoxins mixture should not lead to an optimal transformation of each poison, and water disinfection by chlorine should not be considered as a sufficient remedial measure but as an option to reduce concentration of some cyanotoxins. For a better management of cyanotoxins in drinking water treatment, chlorination has to be integrated in a multi-barrier approach including, for example, adsorption on activated carbon.

A final key point is that only 6 and 2 chlorination by-products were respectively identified for MC-LR and CYL. The fate of the entire toxin is not totally explained yet, and it should be noticed that each toxin variant (more than 70 for MCs) may form specific by-products. However, in most cases, chlorination seems to surprisingly reduce mixture acute toxicity. To conclude, the present state of the art on cyanotoxins chlorination points out that further studies are needed

to better characterize reaction by-products and their respective toxicity. Then, the question of cyanotoxins fate should also be considered when applying other common drinking water treatments such as ozonation or UV irradiation.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Acero, J.L., Rodríguez, E., Meriluoto, J., 2005. Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins. *Water Research* 39 (8), 1628–1638.
- An, J., Carmichael, 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 (12), 1495–1507.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology* 181–182, 441–446.
- Ballot, A., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Kotut, K., Krienitz, L., 2003. Cyanobacterial toxins in Lake Baringo, Kenya. *Limnologia – Ecology and Management of Inland Waters* 33 (1), 2–9.
- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology* 33 (4), 613–616.
- Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A., Carmeli, S., 2000. 7-epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from lake kinneret, Israel. *Journal of Natural Products* 63 (3), 387–389.
- Banker, R., Carmeli, S., Werman, M., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 2001. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part A* 62 (4), 281–288.
- Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.F., Biré, R., Krysz, S., Fontaine, J.J., 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environmental Toxicology* 18 (3), 176–186.
- Bourke, A.T.C., Hawes, R.B., Neilson, A., Stallman, N.D., 1983. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon* 21 (Suppl. 3), 45–48.
- Briand, J.F., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J.-F., 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 34 (4), 361–377.
- Brient, L., Lengronne, M., Bormans, M., Fastner, J., 2009. First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. *Environmental Toxicology* 24 (4), 415–420.
- Brooke, S., Newcombe, G., Nicholson, B., Klass, G., 2006. Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. *Toxicon* 48 (8), 1054–1059.
- Burns, J., 2008. Toxic cyanobacteria in florida waters. In: Hudnell, K.H. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, pp. 127–137.
- Byth, S., 1980. Palm Island mystery disease. *Medical Journal of Australia* 2 (1), 40–42.
- Carmichael, W.W., Evans, W.R., Yin, Q.Q., Bell, P., Moczydłowski, E., 1997. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. Nov. *Applied and Environment Microbiology* 63 (8), 3104–3110.
- 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. *Environmental Health Perspectives* 109 (7), 663–668.
- Carrasco, D., Moreno, E., Paniagua, T., de Hoyos, C., Wormer, L., Sanchis, D., Cirés, S., Martín del Pozo, D., Codd, G.A., Quesada, A., 2007. Anatoxin-a occurrence and potential cyanobacterial anatoxin-a producers in Spanish reservoirs. *Journal of Phycology* 43, 1120–1125.
- Chiswell, R.K., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R., 1999. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environmental Toxicology* 14 (1), 155–161.

- Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005a. Harmful cyanobacteria: from mass mortalities to management measures. In: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (Eds.), *Harmful Cyanobacteria*. Springer, Dordrecht (Netherlands), pp. 1–23.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005b. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (3), 264–272.
- Dai, R., Liu, H., Qu, J., Ru, J., Hou, Y., 2008. Cyanobacteria and their toxins in Guanting Reservoir of Beijing, China. *Journal of Hazardous Materials* 153 (1–2), 470–477.
- Dale, B., Edwards, M., Reid, P.C., 2006. Climate change and harmful algal blooms. In: Granéli, E., Turner, J.T. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer, New York, pp. 367–378.
- Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicol* 36 (7), 953–962.
- De Figueiredo, D.R., Azeiteiro, U.M., Esteves, S.M., Goncalves, F.J.M., Pereira, M.J., 2004. Microcystin-producing blooms – a serious global public health issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59 (2), 151–163.
- Deborde, M., von Gunten, U., 2008. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment – kinetics and mechanisms: a critical review. *Water Research* 42 (1–2), 13–51.
- Dietrich, D., Hoeger, S., 2005. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue–green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicology and Applied Pharmacology* 203 (3), 273–289.
- Dittmann, E., Wiegand, C., 2006. Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Molecular Nutrition & Food Research* 50 (1), 7–17.
- Duy, T.M., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Connel, D.W., 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue–green algae) toxins in water. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 163, 113–186.
- Edwards, C., Beattie, K.A., Scrimgeour, C.M., Codd, G.A., 1992. Identification of anatoxin-A in benthic cyanobacteria (blue–green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicol* 30 (10), 1165–1175.
- El Herry, S., Fathalli, A., Rejeb, A.J.-B., Bouaicha, N., 2008. Seasonal occurrence and toxicity of *Microcystis* spp. and *Oscillatoria tenuis* in the Lebna Dam, Tunisia. *Water Research* 42 (4–5), 1263–1273.
- Ernst, B., Hoeger, S.J., O'Brien, E., Dietrich, D.R., 2009. Abundance and toxicity of *Planktothrix rubescens* in the pre-alpine Lake Ammersee, Germany. *Harmful Algae* 8 (2), 329–342.
- Falconer, I.R., 1991. Tumour promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality* 6 (3), 177–218.
- Falconer, I., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M., Codd, G.A., 1999. Safe levels and safe practices. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London, pp. 155–178.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2001. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue–green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 16 (2), 192–195.
- Falconer, I.R., Humpage, A.R., 2006. Cyanobacterial (blue–green algal) toxins in water supplies: cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology* 21 (4), 299–304.
- Falconer, I.R., 2008. Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. In: Hudnell, K.H. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, pp. 607–612.
- Fastner, J., Heinze, R., Humpage, A.R., Mischke, U., Eaglesham, G.K., Chorus, I., 2003. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicol* 42 (3), 313–321.
- Fastner, J., Rücker, J., Stüken, A., Preußel, K., Nixdorf, B., Chorus, I., Köhler, A., Wiedner, C., 2007. Occurrence of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in northeast Germany. *Environmental Toxicology* 22 (1), 26–32.
- Fawell, J.K., Mitchell, R.E., Everett, D.J., Hill, R.E., 1999. The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I microcystin-LR. *Human & Experimental Toxicology* 18 (3), 162–167.
- Fischer, W.J., Hitzfeld, B.C., Tencalla, F., Eriksson, J.E., Mikhailov, A., Dietrich, D.R., 2000. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue–green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicological Science* 54 (2), 365–373.
- Francis, G., 1878. Poisonous Australian Lake. *Nature* 18, 11–12.
- Fristachi, A., Sinclair, J.L., 2008. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms workgroup report. In: Hudnell, K.H. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, pp. 45–103.
- Fromme, H., Köhler, A., Krause, R., Führling, D., 2000. Occurrence of cyanobacterial toxins – microcystins and anatoxin-a – in Berlin water bodies with implications to human health and regulations. *Environmental Toxicology* 15 (2), 120–130.
- Froschio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology* 18 (4), 243–251.
- Froschio, S.M., Humpage, A.R., Wickramasinghe, W., Shaw, G., Falconer, I.R., 2008. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicol* 51 (2), 191–198.
- Gajdek, P., Bober, B., Mej, E., Bialczyk, J., 2004. Sensitised decomposition of microcystin-LR using UV radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 76 (1–3), 103–106.
- Galal-Gorchev, H., 1996. Chlorine in water disinfection. *Pure & Applied Chemistry* 68 (9), 1731–1735.
- Gijsbertsen-Abrahamse, A.J., Schmidt, W., Chorus, I., Heijman, S.G.J., 2006. Removal of cyanotoxins by ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science* 276 (1–2), 252–259.
- Gkelis, S., Harjunpää, V., Lanaras, T., Sivonen, K., 2005. Diversity of hepatotoxic microcystins and bioactive anabaenopeptins in cyanobacterial blooms from Greek freshwaters. *Environmental Toxicology* 20 (3), 249–256.
- Griffiths, D.J., Saker, M.L., 2003. The Palm Island mystery disease 20 years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology* 18 (2), 78–93.
- Gugger, M., Lenoir, S., Berger, C., Ledreux, A., Druart, J.C., Humbert, J.F., Guette, C., Bernard, C., 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicol* 45 (7), 919–928.
- 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.
- Henriksen, P., Carmichael, W.W., An, J., Moestrup, I., 1997. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue–green algae from danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicol* 35 (6), 901–913.
- Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Soares, R.M., Yuan, M., Servaites, J.C., Barton, H.A., Azevedo, S.M.F.O., 2007. Serologic evaluation of human microcystin exposure. *Environmental Toxicology* 22 (5), 459–463.
- Hitzfeld, B.C., Hoeger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 108 (1), 113–122.
- Ho, L., Onstad, G., Gunten, U.V., Rinck-Pfeiffer, S., Craig, K., Newcombe, G., 2006. Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. *Water Research* 40 (6), 1200–1209.
- Hoeger, S.J., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B.C., 2002. Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. *Environmental Health Perspectives* 110 (11), 1127–1132.
- Huang, W.J., Cheng, B.L., Cheng, Y.L., 2007. Adsorption of microcystin-LR by three types of activated carbon. *Journal of Hazardous Materials* 141 (1), 115–122.
- Humpage, A.R., Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I.R., 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 472 (1–2), 155–161.
- 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. *Environmental Toxicology* 18 (2), 94–103.
- James, K.J., Sherlock, I.R., Stack, M.A., 1997. Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method. *Toxicol* 35 (6), 963–971.
- 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, homo-anatoxin-a and their degradation products by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* 798 (1–2), 147–157.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, M.D., Cookson, S.T., Holmes, C.E.M., Antunes, M.B.d.C., Melo Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.T.S., Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine* 338 (13), 873–878.

- Jones, G.J., Negri, A.P., 1997. Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Water Research* 31 (3), 525–533.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A., 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35 (1), 1–9.
- Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J.S., Codd, G. A., Pflugmacher, S., 2003. Contribution of hot spring cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya. *FEMS Microbiology Ecology* 43 (2), 141–148.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J., 1999. Human health aspects. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London, pp. 113–153.
- Kull, T.P.J., Backlund, P.H., Karlsson, K.M., Meriluoto, J.A.O., 2004. Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: reaction kinetics, characterization, and toxicity of reaction products. *Environmental Science and Technology* 38 (22), 6025–6031.
- Kull, T.P.J., Sjövall, O.T., Tammenkoski, M.K., Backlund, P.H., Meriluoto, J.A. O., 2006. Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: influence of natural organic matter. *Environmental Science and Technology* 40 (5), 1504–1510.
- Lambert, T.W., Holmes, C.F.B., Hruvey, S.E., 1996. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Research* 30 (6), 1411–1422.
- Lawton, L.A., Robertson, P.K.J., 1999. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. *Chemical Society Reviews* 28 (4), 217–224.
- Li, R., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Mahakant, A., Noparatnaraporn, N., Yongmanitchai, W., Kaya, K., Watanabe, M.M., 2001. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon* 39 (7), 973–980.
- 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. *Federation of European Biochemical Societies* 264 (2), 187–192.
- Merel, S., Lebot, B., Clement, M., Seux, R., Thomas, O., 2009. MS identification of microcystin-LR chlorination by-products. *Chemosphere* 74 (6), 832–839.
- Metcalf, J.S., Barakate, A., Codd, G.A., 2004. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiology Letters* 235 (1), 125–129.
- Mez, K., Beattie, K.A., Codd, G.A., Hanselmann, K., Hauser, B., Naegeli, H., Preisig, H.R., 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *European Journal of Phycology* 32 (2), 111–117.
- Mohamed, Z.A., 2008. Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in public hot springs in Saudi Arabia. *Toxicon* 51 (1), 17–27.
- Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C. C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. *Harmful Algae* 4 (4), 743–753.
- 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 (5), 533–538.
- Neilan, B.A., Pearson, L.A., Moffitt, M.C., Mihali, K.T., Kaebnick, M., Kellmann, R., Pomati, F., 2008. The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. In: Hudnell, K.H. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, pp. 417–452.
- Newcombe, G., Nicholson, B.C., 2002. Treatment options for the saxitoxins class of cyanotoxins. *Water Science and Technology: Water Supply* 2 (5–6), 271–275.
- Newcombe, G., Nicholson, B., 2004. Water treatment options for dissolved cyanotoxins. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA* 63 (4), 227–239.
- Nicholson, B.C., Rositano, J., Burch, M.D., 1994. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. *Water Research* 28 (6), 1297–1303.
- Nicholson, B.C., Shaw, G.R., Morrall, J., Senogles, P.-J., Woods, T.A., Papageorgiou, J., Kapralos, C., Wickramasinghe, W., Davis, B.C., Eaglesham, G.K., Moore, M.R., 2003. Chlorination for degrading saxitoxins (paralytic shellfish poisons) in water. *Environmental Technology* 24 (11), 1341–1348.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W., Fujiki, H., 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 118 (6), 420–424.
- Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seawright, A.A., Moore, M.R., 1999. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* 14 (1), 163–165.
- Onodera, H., Oshima, Y., Henriksen, P., Yasumoto, T., 1997. Confirmation of anatoxin-a(s), in the cyanobacterium *Anabaena lemmermannii*, as the cause of bird kills in Danish Lakes. *Toxicon* 35 (11), 1645–1648.
- Onstad, G.D., Strauch, S., Meriluoto, J., 2007. Selective oxidation of key functional groups in cyanotoxins during drinking water ozonation. *Environmental Science and Technology* 41 (12), 4397–4404.
- Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V., 2007. Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment International* 33 (8), 1070–1089.
- Park, H.-D., Watanabe, M.F., Harada, K.-I., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M., Hayashi, H., 1993. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Natural Toxins* 1, 353–360.
- Park, H.-D., Kim, B., Kim, E., Okino, T., 1998. Hepatotoxic microcystins and neurotoxic anatoxin-a in cyanobacterial blooms from Korean lakes. *Environmental Toxicology and Water Quality* 13, 225–234.
- Paul, V.J., 2008. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. In: Hudnell, K.H. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, pp. 239–257.
- Pendleton, P., Schumann, R., Wong, S.H., 2001. Microcystin-LR adsorption by activated carbon. *Journal of Colloid and Interface Science* 240 (1), 1–8.
- Pouria, S., Andrade de, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T.S., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H., Codd, G.A., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet* 352 (9121), 21–26.
- Rodríguez, M.J., Sérodes, J.B., Levallois, P., Proulx, X., 2007. Chlorinated DBPs in drinking water according to source, treatment, season and distribution location. *Journal of Environmental Engineering & Science* 6, 355–365.
- Rodríguez, E., Majado, M.E., Meriluoto, J., Acero, J.L., 2007a. Oxidation of microcystins by permanganate: reaction kinetics and implications for water treatment. *Water Research* 41 (1), 102–110.
- Rodríguez, E., Sordo, A., Metcalf, J.S., Acero, J.L., 2007b. Kinetics of the oxidation of cylindrospermopsin and anatoxin-a with chlorine, monochloramine and permanganate. *Water Research* 41 (9), 2048–2056.
- Rodríguez, E., Onstad, G.D., Kull, T.P.J., Metcalf, J.S., Acero, J.L., von Gunten, U., 2007c. Oxidative elimination of cyanotoxins: comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. *Water Research* 41 (15), 3381–3393.
- Rodríguez, E.M., Acero, J.L., Spoof, L., Meriluoto, J., 2008. Oxidation of MC-LR and -RR with chlorine and potassium permanganate: toxicity of the reaction products. *Water Research* 42 (6–7), 1744–1752.
- Rogers, E.H., Zehr, R.D., Gage, M.I., Humpage, A.R., Falconer, I.R., Marr, M., Chernoff, N., 2007. The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicon* 49 (6), 855–864.
- Rositano, J., Newcombe, G., Nicholson, B., Sztajnbock, P., 2001. Ozonation of nom and algal toxins in four treated waters. *Water Research* 35 (1), 23–32.
- Rücker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C., 2007. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenon-dominated temperate lakes. *Toxicon* 50 (6), 800–809.
- Saker, M.L., Thomas, A.D., Norton, J.H., 1999. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of North Queensland. *Environmental Toxicology* 14 (1), 179–182.
- Sangolkar, L.N., Maske, S.S., Chakrabarti, T., 2006. Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. *Water Research* 40 (19), 3485–3496.
- Schembri, M.A., Neilan, B.A., Saint, C.P., 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology* 16 (5), 413–421.
- Senogles, P., Shaw, G., Smith, M., Norris, R., Chiswell, R., Mueller, J., Sadler, R., Eaglesham, G., 2000. Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination. *Toxicon* 38 (9), 1203–1213.
- Senogles-Derham, P.-J., Seawright, A., Shaw, G., Wickramasingh, W., Shahin, M., 2003. Toxicological aspects of treatment to remove cyanobacterial toxins from drinking water determined using the heterozygous P53 transgenic mouse model. *Toxicon* 41 (8), 979–988.

- Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London, pp. 41–111.
- Soares, R.M., Yuan, M., Servaites, J.C., Delgado, A., Magalhães, V.F., Hilborn, E.D., Carmichael, W.W., Azevedo, S.M.F.O., 2006. Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Toxicology* 21 (2), 95–103.
- Spoof, L., Berg, K.A., Rapala, J., Lahti, K., Lepistö, L., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Meriluoto, J., 2006. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environmental Toxicology* 21 (6), 552–560.
- Stewart, I., Seawright, A.A., Shaw, G.R., 2008. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds – an overview. In: Hudnell, K.H. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, pp. 613–637.
- Stirling, D.J., Quilliam, M.A., 2001. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in New Zealand. *Toxicon* 39 (8), 1219–1222.
- Svrček, C., Smith, D.W., 2004. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *Journal of Environmental Engineering & Science* 3 (3), 155–185.
- Teixeira, M.R., Costa, M., De Carvalho, V.L., Pereira, M., Hage, E., 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 27 (3), 244–253.
- Teixeira, M.R., Rosa, M.J., 2005. Microcystins removal by nanofiltration membranes. *Separation and Purification Technology* 46 (3), 192–201.
- Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M.F., Suzuki, S., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H., Harada, K.I., 1995. Stability of microcystins from cyanobacteria – II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon* 33 (12), 1619–1631.
- Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M.F., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H., Harada, K.I., 1997. Stability of Microcystins from cyanobacteria – IV. Effect of chlorination on decomposition. *Toxicon* 35 (7), 1033–1041.
- Van Apeldoorn, M.E., Van-Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., Bakker, G.J.L., 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (1), 7–60.
- Viaggiu, E., Melchiorre, S., Volpi, F., Di Corcia, A., Mancini, R., Garibaldi, L., Crichigno, G., Bruno, M., 2004. Anatoxin-a toxin in the cyanobacterium *Planktothrix rubescens* from a fishing pond in northern Italy. *Environmental Toxicology* 19 (3), 191–197.
- Westrick, J.A., 2003. Everything a manager should know about algal toxins but was afraid to ask. *Journal of American Waterworks Association* 95 (9), 26–34.
- Westrick, J.A., 2008. Cyanobacterial toxin removal in drinking water treatment processes and recreational waters. In: Hudnell, K.H. (Ed.), *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, pp. 275–290.
- WHO, 1998. *Guidelines for Drinking-Water Quality. Addendum to volume 2, Health Criteria and Other Supporting Information*, second ed. World Health Organization, Geneva.
- Wiedner, C., Rücker, J., Fastner, J., Chorus, I., Nixdorf, B., 2008. Seasonal dynamics of cylindrospermopsin and cyanobacteria in two German lakes. *Toxicon* 52 (6), 677–686.
- Wood, S.A., Selwood, A.I., Rueckert, A., Holland, P.T., Milne, J.R., Smith, K.F., Smits, B., Watts, L.F., Cary, C.S., 2007. First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon* 50 (2), 292–301.
- Xagoraki, I., Harrington, G.W., Zulliger, K., Zeier, B., Krick, W., Karner, D. A., Standridge, J.H., Westrick, J.A., 2006. Inactivation kinetics of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by free chlorine. *Journal of Environmental Engineering* 132 (7), 818–823.
- Yuan, M., Carmichael, W.W., Hilborn, E.D., 2006. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. *Toxicon* 48 (6), 627–640.
- Zhang, H., Zhang, J., Zhu, Y., 2009. Identification of microcystins in waters used for daily life by people who live on Tai Lake during a serious cyanobacteria dominated bloom with risk analysis to human health. *Environmental Toxicology* 24 (1), 82–86.

ANNEXE II

Merel, S., LeBot, B., Clément, M., Seux, R., Thomas, O., 2009.

MS identification of microcystin-LR chlorination by-products

Chemosphere 74 (6), 832-839.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Ms identification of microcystin-LR chlorination by-products

Sylvain Merel, Barbara LeBot, Michel Clément*, René Seux, Olivier Thomas

Environment and Health Laboratory (LERES), School of Public Health (EHESP), Avenue Professeur Léon-Bernard, CS 74312, 35043 Rennes Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2008
Received in revised form 2 October 2008
Accepted 3 October 2008
Available online 29 November 2008

Keywords:

Cyanotoxin
Microcystin
Drinking water treatment
Mass spectrometry
LTQ-Orbitrap
Disinfection by chlorine

ABSTRACT

Drinking water disinfection by chlorine is known to reduce concentration of microcystin, but compounds formed are rarely considered. In this work the chlorination of microcystin-LR has been studied by monitoring reactants consumption and reaction products using the linear trap quad-Orbitrap (LTQ-Orbitrap) technology. Microcystin-LR was totally transformed within 2 min, meanwhile chlorine was consumed until 30 min with a rate of 12 mol per mol of toxin. Four new by-products of microcystin-LR were identified as well as their isomers: monochloro-microcystin, monochloro-dihydroxy-microcystin, dichloro-dihydroxy-microcystin and trichloro-hydroxy-microcystin. In addition, four new isomers were also observed, corresponding to the dihydroxy-microcystin already known. Besides, another compound previously observed was identified as monochloro-hydroxy-microcystin.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In temperate countries, occurrence of cyanobacteria blooms in surface waters is a major environmental and public health concern. Indeed, some species of cyanobacteria have the ability to produce toxins responsible of animal poisonings (Edwards et al., 1992; Mez et al., 1997; Kuiper-Goodman et al., 1999).

With about 70 variants reported (Codd et al., 2005; Dietrich and Hoeger, 2005), among which microcystin-LR (MCLR), the cyclic heptapeptide microcystins are the most common cyanotoxins. Their toxicity is usually associated with the conjugated diene on the unusual Adda amino acid (An and Carmichael, 1994; Tsuji et al., 1997; Dawson, 1998). Once absorbed by the organism, they are accumulated in liver and inhibit protein phosphatase activity, able to lead to massive haemorrhage and even death within a few hours (MacKintosh et al., 1990; Dawson, 1998; Kuiper-Goodman et al., 1999; Gupta et al., 2003). In addition, microcystins have also shown a potential tumour promotion activity (Falconer, 1991; Nishiwaki-Matsushima et al., 1992; Kuiper-Goodman et al., 1999).

Humans are potentially exposed to microcystins through drinking water produced using a contaminated resource. Several intoxications generally limited to gastro-enteritis have been reported (Kuiper-Goodman et al., 1999), but more than 50 patients died in the Brazilian dialysis centre of Caruaru (Pouria et al., 1998; Azevedo et al., 2002; Yuan et al., 2006). Therefore, in order to protect consumer's health, the World Health Organization has proposed the

concentration limit of $1 \mu\text{g L}^{-1}$ as a maximum value for MCLR in drinking water (Falconer et al., 1999; Codd et al., 2005). Thus, in order to provide safe drinking water treatment has to remove cyanotoxins below this guideline.

Chlorine is a strong oxidant widely used to ensure water disinfection and its effect on microcystins has been investigated (Nicholson et al., 1994; Tsuji et al., 1997; Kull et al., 2004; Acero et al., 2005; Xagorarakis et al., 2006; Ho et al., 2006; Rodriguez et al., 2007). Some studies have shown that chlorination was not an effective process for cyanotoxins treatment but actually chlorination efficiency depends on the oxidants nature and dosing rate, contact time and pH (Nicholson et al., 1994; Hitzfeld et al., 2000; Newcombe and Nicholson, 2004; Xagorarakis et al., 2006). Nowadays, it is generally admitted that microcystin concentration is efficiently reduced providing pH is maintained below 8 and 0.5 mg L^{-1} of free chlorine residual is present after 30 min exposure (Nicholson et al., 1994; Hitzfeld et al., 2000; Newcombe and Nicholson, 2004).

Nevertheless, cyanotoxins in drinking water being a quite recent concern, chlorination by-products of MCLR have not been extensively studied and only two ones are mentioned in literature. The first one (dihydroxy-microcystin) has been identified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), with 4 isomers corresponding to a mass/charge (m/z) ratio 1029 (Tsuji et al., 1997). These latest would be formed by chlorine addition on the conjugated diene of the toxin, followed by a hydrolysis leaving 2 hydroxyl moieties (Tsuji et al., 1997; Lawton and Robertson, 1999). A second by-product associated with m/z 1047 has been identified as the hydrated form of dihydroxy-microcystin (Kull et al., 2004). However, considering that MCLR has many N-H bonds easily

* Corresponding author. Tel.: +33 299022925; fax: +33 299022929.
E-mail address: Michel.Clement@ehesp.fr (M. Clément).

reacting with chlorine (Alouini and Seux, 1987; Hureiki et al., 1994), other by-products of potential health concern must obviously occur during treatment. Therefore, the first step prior to any toxicity investigation is to identify the potential disinfection by-products in high purity water. This point being the aim of the work, it will allow further studies of MCLR degradation by-products taking into account the interference with other natural organic material (NOM). Indeed, considering the complexity of reactions between MCLR, NOM and chlorine in natural water, also depending of the nature and concentration of NOM, on one hand, and the rare scientific works dealing with MCLR chlorination products in general, the study in high purity water is required first.

2. Materials and methods

2.1. Reactants

MCLR (Fig. 1) with more than 98% purity was purchased from Alexis Biochemicals. A 250 mg L⁻¹ stock solution was prepared making soluble 1 mg toxin in 4 mL methanol and stored in darkness at 4 °C. MCLR was handled with glass manufactured syringes and vials only, in order to avoid any loss of toxin due to plastic adsorption (Hyenstrand et al., 2001).

Hypochlorous acid stock solution (about 1 g Cl₂ L⁻¹) was prepared diluting a commercial bleach solution to 1/50 in high purity water. Then, pH was adjusted to 7 adding 0.01 M hydrochloric acid and mixture was stored in darkness at 4 °C for a maximum duration of 7 d. Chlorine concentration was determined only a few min before experiments by sodium thiosulfate titration.

Diethyl-*p*-phenylen-diamin (DPD) for chlorine concentration monitoring was purchased from Permchem Reagents. Packets of “DPD free chlorine reagent” or “DPD total chlorine reagent” were used, respectively, for free chlorine and total chlorine measurement. Sodium nitrite used to stop the chlorination reaction was purchased from Merck. Stock solution of 1.4 g L⁻¹ was prepared in high purity water and stored in darkness at 4 °C. Acetonitrile and formic acid used for high pressure liquid chromatography

(HPLC) were, respectively, purchased from SDS at HPLC grade, and from J.T. Baker with 98% purity.

2.2. LC–MS analysis

Two equipments were used in order to perform LC–MS analysis, (i) a Finnigan surveyor HPLC system with a LTQ–Orbitrap mass spectrometer from Thermo Electron Corporation and, (ii) a Waters alliance 2695 for HPLC associated with a Waters Micromass ZQ mass spectrometer.

2.2.1. HPLC conditions

The same HPLC method was used on both LC–MS device. HPLC was carried out on 20 µL sample according to a method commonly used for microcystins analysis in water (Kondo et al., 1992; Harada et al., 1999). Solid phase consisted in a C18 reverse phase column (Phenomenex Synergi 4µ Hydro-RP 80A) with a 35 °C thermoregulation. Elution was performed thanks to a gradient of water and acetonitrile acidified with 0.1% formic acid.

2.2.2. The LTQ–Orbitrap mass spectrometer

The LTQ–Orbitrap mass spectrometer with Xcalibur data handling software is a suitable tool for identification of unknown products (Peterman and Duczak, 2006) providing a resolution $m/\Delta m$ of 6×10^4 when m is equal to 400. The LTQ–Orbitrap was used in order to detect MCLR by-products searching ions with a mass/charge ratio (m/z) in the range 100–1500. To do so, after HPLC, compounds were ionised by positive electrospray (source: 4.41 kV and 2.83 µA) which prevents their fragmentation. Each ion with a m/z in the range 100–1500 was accumulated in the C-trap before entering the Orbitrap where their rotation around the central electrode was recorded and converted to mass spectra thanks to Fourier transformed.

The LTQ–Orbitrap was also used to sustain MCLR by-products identity performing tandem mass spectrometry (MS²) experiments with the collision induced dissociation mode. Molecular ions of by-products were submitted to helium atoms bombardment with collision energy of 22%, considering the normalized scale 0–400. Then,

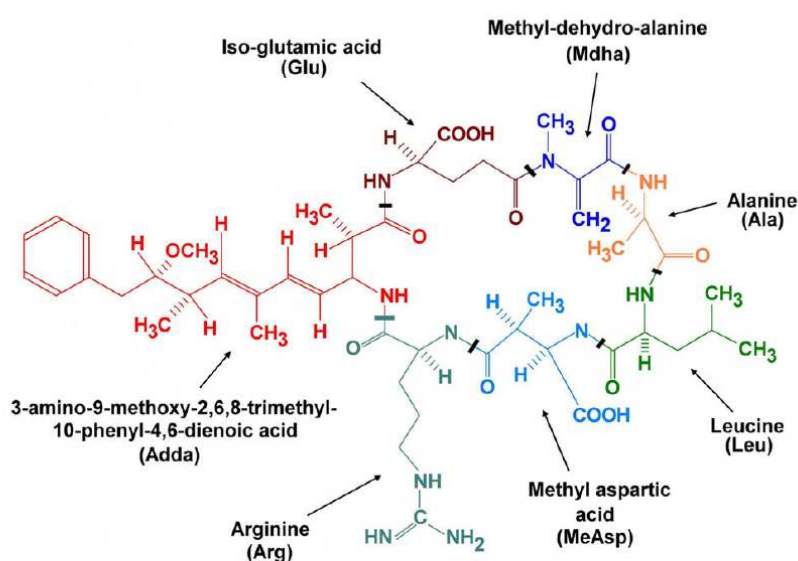


Fig. 1. Structure of microcystin-LR.

generated daughter ions were detected by the low resolution mass spectrometer of the linear ion trap.

2.2.3. The waters micromass ZQ mass spectrometer

Micromass ZQ from Waters is a simple quadrupole mass spectrometer used with Masslynx data handling software in order to monitor and quantify MCLR and its by-products as a function of chlorine exposure. Compounds were ionised at 130 °C by positive electrospray (3.25 kV and 60 V, respectively, for capillary and cone voltage). Only molecular ions of MCLR as well as its by-products were selected for mass detection and quantification was performed considering the area of the corresponding chromatographical peak.

2.3. UV-spectrometry

A spectrophotometer Perkin Elmer Lambda 20 with a 10 mm quartz cell pathlength and a scan speed of 1920 nm min⁻¹ was used to measure the absorbance in the range 200–400 nm before and during the experiments. The maximum reached at 240 nm which is characteristic of microcystins (Tsuji et al., 1997) was used to check the initial toxin concentration and monitor it while chlorination was running. Area of all spectra recorded along the reaction were normalized in order to observe isobestic points, implying that a qualitative conservation occurs (Pouët et al., 2004; Thomas and Cerda, 2007) during chlorination according to Eq. (1)

$$x[\text{MCLR}]_i + \alpha[\text{A}]_i + \beta[\text{B}]_i + \gamma[\text{C}]_i + \dots = 1 \quad (1)$$

where A, B, C are by-products; x , α , β , γ are constants; and i is the reaction time.

2.4. Chlorination of MCLR

Anticipating difficulties to provide accurate identification of MCLR chlorination by-products in surface water due to interferences with NOM, the reaction was undertaken in high purity water spiked with 20 mg L⁻¹ MCLR from the stock solution. The initial concentration of toxin was checked using UV spectrophotometry rather than LC–MS because this is a suitable method for such MCLR level which provides immediate results. Afterwards, the working solution was placed in darkness at 20 °C so as to avoid any photo-degradation phenomenon. Then, chlorination was performed from 0 to 60 min adding the volume of hypochlorous acid stock solution needed to ensure a molar ratio [chlorine]/[toxin] equal to 20.

During chlorination, the reaction has been monitored periodically up to 60 min through the measurement of free and total chlorine concentrations, the acquisition of UV spectra, and LC–MS determination of MCLR and its by-products. For LC–MS analysis, residual free chlorine was reduced adding sodium nitrite 10% in molar excess.

2.5. Monitoring free and total chlorine concentration

After different contact time with chlorine, samples of the reacting mixture were treated with one packet of “DPD free chlorine reagent” or “DPD total chlorine reagent”. Then, respectively, for free and total chlorine the absorbance at 510 nm was measured immediately and after 2 min delay using the same device than for UV-spectrometry, and obtained results were reported on a calibration curve.

2.6. Identification and monitoring of chlorination by-products and MCLR

Chlorination by-products were observed examining m/z recorded in the range 100–1500 by the LTQ-Orbitrap. Based on m/z

accuracy, each compound observed is related to a chemical formula hypothesis. Then, a relative mass error expressed in ppm is calculated, a result lower than 5 ppm being considered as an acceptable value (Makarov et al., 2006).

Chemical formula propositions were then sustained by two different ways, (i) their consistency with daughter ions formed during MS² analysis and, (ii) agreement between theoretical and experimental isotopic massifs.

The relative concentration of by-products was monitored using the Micromass ZQ mass spectrometer as described before. When different isomers were formed for one by-product, areas of their respective signal were added and treated as a unique compound. Without available standards for by-products quantification, results were expressed as relative concentration, i.e. the percentage of the maximum area value reached during the reaction.

3. Results

3.1. Study of the chlorination reaction through consumption of reactants

3.1.1. Consumption of chlorine

Chlorine consumption by MCLR was analyzed through the evolution of both chlorine demand and combined chlorine. The first one (expressed in mol mol⁻¹) represents the amount of free chlorine consumed per one mol of toxin as a function of time. The second one represents the amount of labile chlorine involved in mineral or organic structures and is determined by making the subtraction between total and free chlorine in solution.

MCLR has a chlorine demand of 12.6 mol mol⁻¹ completed within half an hour. As illustrated on Fig. 2a, free chlorine is mainly consumed during the first 15 min of the reaction. At that time each mol of toxin has reacted with about 10 mol of disinfectant. Then, chlorine consumption decreases progressively until 30 min exposure, when the reaction is completed.

Chlorination of MCLR induces formation of combined chlorine. This one is immediately produced after reactants mixing, and reaches a maximum after 10 min contact time. Fig. 2b shows that combined chlorine is gradually degraded until 60 min, when reaction monitoring stopped.

3.1.2. Consumption of MCLR

LC–MS results show that concentration of MCLR quickly decreases after chlorine addition. Indeed, within 2 min exposure only 5% of the initial concentration is measured. Then, after half an hour contact time more than 99.9% of MCLR is transformed.

Ultraviolet spectrum monitoring also shows that MCLR is promptly modified when submitted to chlorination. As illustrated on Fig. 2c, the maximum of absorbance at 240 nm immediately decreases and reach 40–20% of its initial value after 0.5 and 2 min exposure. Notice that free chlorine in solution has no influence on previous results because sodium hypochlorite has an absorbance close to 0 at 240 nm (Spinelli et al., 2007).

3.2. Investigation of chlorination by-products

One first element concerning by-products can be obtained from the UV spectra in Fig. 2c. The presence of isobestic points indicates that the quality of the mixture is globally conserved, or in other words that chlorination of MCLR can be considered as a simple reaction giving various absorbing by-products in mixture (Pouët et al., 2004; Thomas and Cerda, 2007).

For by-products study, the reaction had to be stopped after different contact time. The slight excess of sodium nitrite employed may have also reduced a part of the combined chlorine observed,

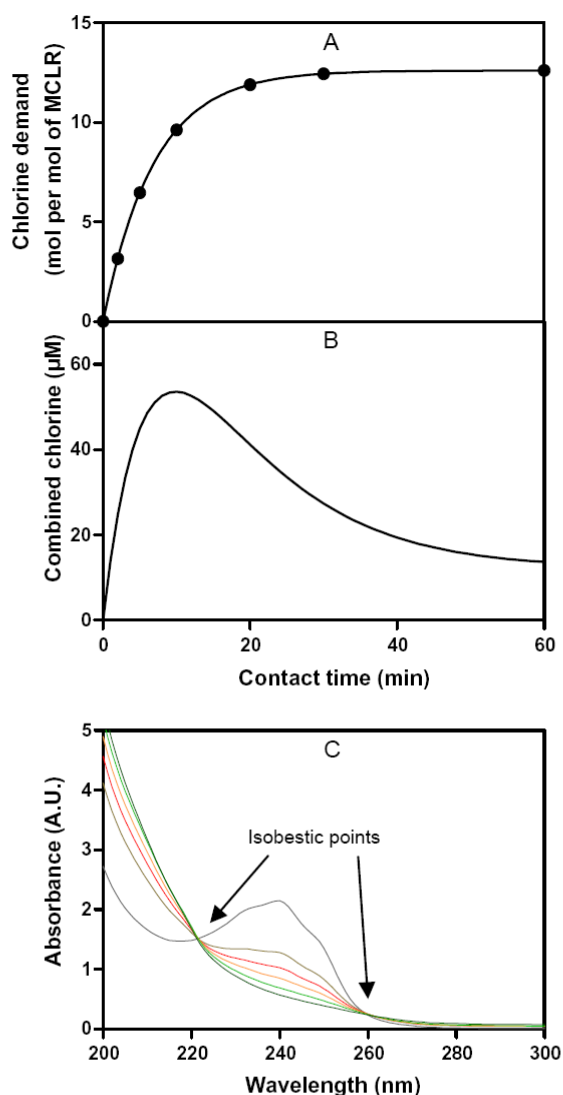


Fig. 2. Evolution of microcystin-LR chlorine demand (A); combined chlorine (B); and mixture normalized UV spectra after 0; 0.5; 1; 1.5; 2.5; and 60 min of chlorine exposure, in decreasing order of absorbance at 240 nm (C).

and therefore some by-products would have been observed and identified in their reduced form.

3.2.1. Identification of reaction by-products

Chlorination by-products are observed on several chromatograms (Fig. 3). From m/z ratios, six different by-products and their isomers can be identified: dihydroxy-microcystin, monochloro-hydroxy-microcystin, monochloro-microcystin, monochloro-dihydroxy-microcystin, dichloro-dihydroxy-microcystin and trichloro-hydroxy-microcystin.

In accordance with data found in literature, MCLR chlorination quickly leads to the production of the $C_{49}H_{76}N_{10}O_{14}$ compound called dihydroxy-microcystin (Tsuji et al., 1997). Eight isomers of this by-product are detected (Fig. 3a) with the characteristic m/z ratio 1029.560, and a relative mass error of 2 ppm (Table 1). In

addition, MS² experiments reveal 2 daughter ions: m/z 1011 and 993, respectively, attributed to a loss of 1 and 2 H₂O. Such fragmentation is consistent with the fixation of both OH moieties on the conjugated diene as reported in previous studies (Tsuji et al., 1997; Lawton and Robertson, 1999). Furthermore, assuming the conjugated diene is responsible of the maximum in absorbance of MCLR at 240 nm (Tsuji et al., 1997), the alteration of Adda amino acid (see Fig. 1) to form dihydroxy-microcystin is also in agreement with the evolution of UV spectrum observed in Fig 2c. Moreover, the identity of dihydroxy-microcystin is also sustained by the concordance between experimental and theoretical isotopic massif (Fig. 4).

Monochloro-microcystin associated with the chemical formula $C_{49}H_{73}N_{10}O_{12}Cl$ cannot be distinguished from the previous by-product with the Micromass ZQ mass spectrometer (Fig. 3a). But, using the LTQ-Orbitrap technology three isomers characterized by the m/z ratio 1029.516 are identified. As presented in Table 1 this represents a relative mass error of 2 ppm. Sustained by a 34 m/z difference with the initial toxin, this second reaction product should be formed by the substitution of one hydrogen atom by a chlorine atom. Then, according to MS² experiments, two daughter ions are formed: m/z 993 and 859. These ones are, respectively, attributed to the loss of HCl lonely or along with a well known part of the Adda moiety (Diehnelt et al., 2005; Cong et al., 2006). Such observations also tend to confirm the presence of a chlorine atom on the considered compound. In addition, the concordance between theoretical and experimental isotopic massif is another way to confirm the presence of monochloro-microcystin.

All the five different compounds (Fig. 3b) are characterized by their m/z ratio equal to 1047.526 and are identified as isomers of monochloro-hydroxy-microcystin. As for the other by-products their mass spectra only reveals the molecular ion with, respectively, 1 and 2 positive charge. Then, considering the chemical formula $C_{49}H_{75}N_{10}O_{13}Cl$ the associated relative mass error is 2 ppm (Table 1). Such reaction products may be formed by the loss of one double bond fixing one chlorine atom and one hydroxyl group. Then, MS² experiments lead to the formation of 3 daughter ions: m/z 1029, 1011 and 993. Each one is, respectively, attributed to the loss of H₂O, HCl, or both at the same time, which corroborate the hypothesis mentioned above. As for previous by-products theoretical and experimental isotopic massifs are also similar.

Numerous isomers of monochloro-dihydroxy-microcystin with the characteristic m/z ratio 1063.521 are observed (Fig. 3c). Considering the chemical formula $C_{49}H_{75}N_{10}O_{14}Cl$ a relative mass error of 2 ppm is calculated (Table 1). These chlorination by-products may be the combination of monochloro-microcystin and dihydroxy-microcystin. By confirming the presence of a chlorine atom and two hydroxyl moieties, MS² experiments tend to sustain this hypothesis. In addition experimental isotopic massifs are consistent with theory.

With the Micromass ZQ mass spectrometer, dichloro-dihydroxy-microcystin and its 7 isomers are observed (Fig. 3d) for a m/z ratio 1079. However, the LTQ-Orbitrap analysis reveals a molecular ion with a characteristic m/z 1097.481. Considering the chemical formula $C_{49}H_{74}N_{10}O_{14}Cl_2$, Table 1 indicates a relative mass error of 3 ppm. These different isomers may be formed by the substitution of 2 hydrogen atoms by 2 chlorine atoms on the identified dihydroxy-microcystin. MS² experiments seem to sustain this hypothesis showing the presence of one chlorine atom and two hydroxyl moieties on the structured considered. Moreover, experimental isotopic massifs correspond to theoretical ones.

The last reaction product is trichloro-hydroxy-microcystin and its 6 isomers (Fig. 3e) with a characteristic m/z ratio 1115.448. Considering a chemical formula $C_{49}H_{73}N_{10}O_{13}Cl_3$ the calculated mass error is 2 ppm (Table 1). This chlorination by-product should be formed by the substitution of 2 hydrogen atoms by 2 chlorine

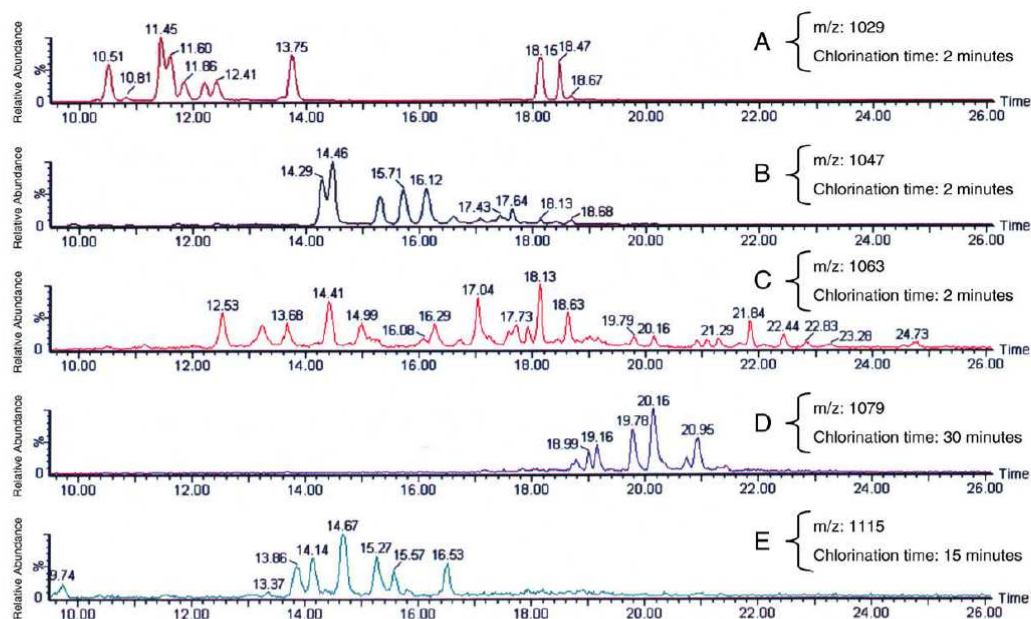


Fig. 3. Chromatograms of chlorinated microcystin-LR by-products: dihydroxy-microcystin (A left); monochloro-microcystin (A right); monochloro-hydroxy-microcystin (B); monochloro-dihydroxy-microcystin (C); dichloro-dihydroxy-microcystin (D); trichloro-hydroxy-microcystin (E) at different contact time by Micromass ZQ mass spectrometer.

Table 1
Characteristics of MCLR and reaction products.

Compound	Proposed formula	Theoretical m/z ratio ^a	Experimental m/z ratio ^b	Mass error (ppm)
Microcystin-LR	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	995.5565902	995.555	2
Dihydroxy-microcystin	C ₄₉ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₄	1029.5620694	1029.560	2
Monochloro-microcystin	C ₄₉ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₂ Cl	1029.5176179	1029.516	2
Monochloro-hydroxy-microcystin	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₃ Cl	1047.5281825	1047.526	2
Monochloro-dihydroxy-microcystin	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₀ O ₁₄ Cl	1063.5230971	1063.521	2
Dichloro-dihydroxy-microcystin	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₄ Cl ₂	1097.4841248	1097.481	3
Trichloro-hydroxy-microcystin	C ₄₉ H ₇₃ N ₁₀ O ₁₃ Cl ₃	1115.4502379	1115.448	2

^a Calculated using data from Audi and Wapstra (1995), considering only significant digits.

^b Considering only significant digits provided by the LTQ-Orbitrap mass spectrometer.

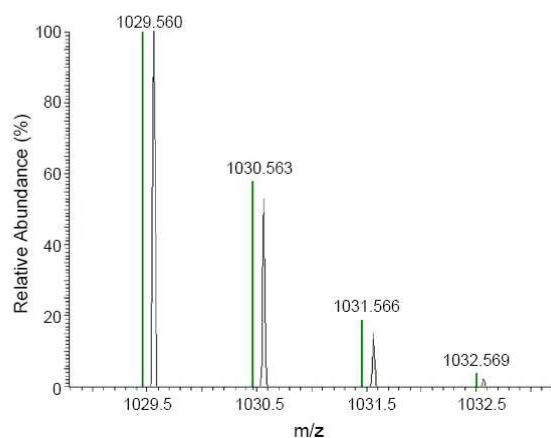


Fig. 4. Comparison of the theoretical isotopic mass of dihydroxy-microcystin (vertical lines) with the experimental one (chromatographical peaks).

atoms on the previously identified monochloro-hydroxy-microcystin. Nevertheless, no additional information to sustain this hypothesis is obtained from MS² experiments because no daughter ion clearly appears from mass spectra noise. However, as for all other products identified, the experimental isotopic mass is in agreement with theory.

3.2.2. Evolution of reaction by-products

When monitoring the evolution of chlorination by-products as a function of exposure time, four different profiles are observed (Fig. 5). The first one includes three compounds quickly produced within 1 or 2 min contact time then progressively degraded: dihydroxy-microcystin, monochloro-hydroxy-microcystin and monochloro-microcystin. The second profile is represented by dichloro-dihydroxy-microcystin which is regularly formed during the first 30 min of chlorine exposure before reaching a constant concentration until 60 min. Monochloro-dihydroxy-microcystin produced during the first min with a stable concentration afterwards constitutes the third profile. The last one is associated with trichloro-hydroxy-microcystin which is gradually formed within the first 10 min of the reaction and then regularly degraded. So,

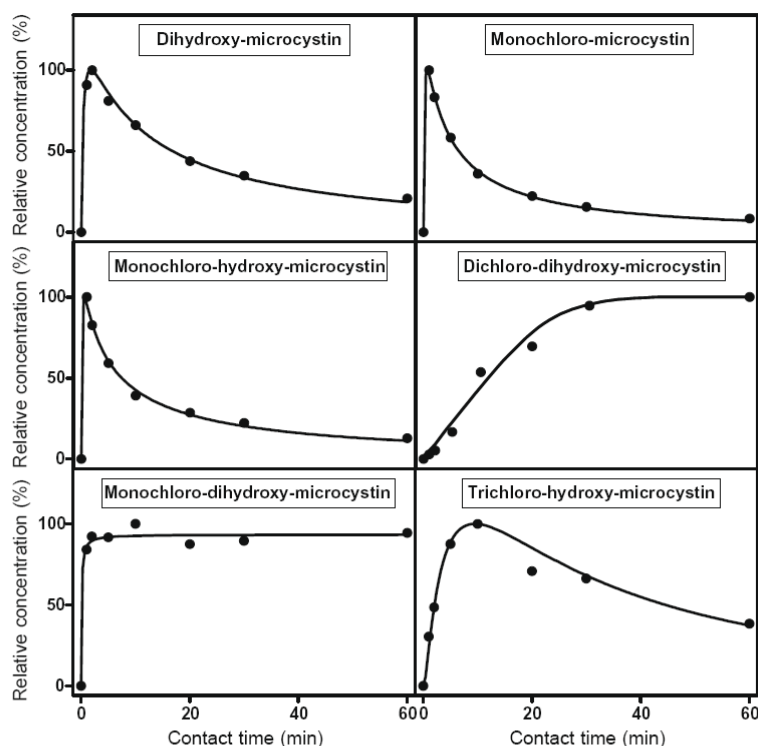


Fig. 5. Evolution of the relative concentrations of microcystin-LR by-products measured by the Micromass ZQ mass spectrometer (with maximum concentration fixed at 100%).

considering Fig. 5, dihydroxy-chlorinated forms appear to be more stable than the others. As a consequence, dichloro-dihydroxy-microcystin and monochloro-dihydroxy-microcystin seems to be final by-products.

By-products identified unfortunately explain only a part of the fate of the initial microcystin during chlorination. Indeed, assuming than one mol of by-product is approximately characterized on chromatograms by the same area than one mol of MCLR, by-products signal show that dihydroxy-microcystin, monochloro-microcystin and monochloro-hydroxy-microcystin are the most abundant compounds but at their maximum they represent only around 15%, 5%, and 5% of the initial MCLR. In the same way, each one of the other by-products identified represents about 1% of the initial MCLR. As part of by-products are not stable, at the end of chlorination the sum of their area on corresponding chromatograms represents around 5% of the area of the initial MCLR.

4. Discussion

4.1. Monitoring consumption of reactants

First, in accordance with previous studies (Nicholson et al., 1994; Newcombe and Nicholson, 2004) results show that concentration of MCLR efficiently decreases during chlorination (giving several intermediates and by-products) but half an hour is necessary to complete the chlorine demand of the toxin. In addition, experimental chlorine demand of MCLR ($12.6 \text{ mol mol}^{-1}$ after 30 min) is consistent with the theoretical value determined as explained below. Chlorine demand of a peptide can be assessed using the following two steps method (Hureiki et al., 1994). During the

first step, chlorine demand of all elementary amino acids involved in the peptide composition should be added. Then, the second step consists in subtracting 2 for each peptide bond of the structure considered because these ones are resistant to chlorination (Hureiki et al., 1994). Applying this method and assuming that the Adda moiety reacts with 4 mol of chlorine (because of the conjugated diene), MCLR would have a subsequent chlorine demand of 14 mol mol^{-1} . This agreement between experimental and theoretical data would tend to prove that, as expected, peptides bonds may not be a target for chlorine. Therefore, such sites may not be considered for a potential microcystin fragmentation during chlorination process, which is in accordance with by-products identified in this study.

Actually, the arginine moiety can be considered as the principal reactive site. Indeed, free arginine has a chlorine demand of 8 mol mol^{-1} , or 6 mol mol^{-1} when incorporated in a peptide (Hureiki et al., 1994). In other words, arginine may be responsible for half the chlorine demand of MCLR. In fact, this amino acid concentrates many N-H bonds and double bonds that are highly reactive with chlorine.

4.2. Identification of reaction by-products

This paper identifies four new by-products of MCLR and brings new elements concerning two other ones already described. On the one hand, four new isomers of the already known dihydroxy-microcystin (Tsuiji et al., 1997; Lawton and Robertson, 1999) are observed, probably related to a higher molar ratio [chlorine]/[toxin] used in this work (up to 10 times higher). On the other hand, the improvement of analytical characteristics (more accurate m/z mea-

surement) shows that the monochloro-hydroxy-microcystin structure is more probable than the hydrated form of dihydroxy-microcystin for m/z ratio 1047 proposed by Kull et al. (2004).

Considering by-products observed in the present study, degradation pathways of MCLR by chlorine are proposed in Fig. 6. With the addition of chlorine, MCLR would be transformed immediately into three forms: monochloro-hydroxy-microcystin, dihydroxy-microcystin, and monochloro-microcystin. After that, monochloro-hydroxy-microcystin would be transformed into trichloro-hydroxy-microcystin whereas chlorine would react on dihydroxy-microcystin and monochloro-microcystin in order to form monochloro-dihydroxy-microcystin. Then, the latest by-product would further react to give dichloro-dihydroxy-microcystin.

After chlorination the relative concentration of by-products identified correspond to only a part of the initial MCLR concentration, meanwhile 99.9% is transformed within 60 min. There could be three explanations for this. First, sodium nitrite used to stop chlorination also reacts with by-products, leaving intact only the small part of them observed in this study. Indeed, further tests have shown that sodium nitrite has a quantitative effect on the analysis, lowering the amount of chlorinated compounds detected. Thus, by-products may be partially reduced by the quenching agent. Next explanation would be analyzing mass spectrometry data from LTQ-Orbitrap (m/z in the range 100–1500) by successive windows of 10 m/z may be the origin of a loss in sensibility and consequently some products may have been occulted. Then, last explanation would be the chromatographic column is adapted for MCLR but nevertheless some other degradation by-products (the polarest ones) may not be retained and could not be observed. To-

tal organic carbon (TOC) and chloride ions monitoring would be another way to obtain elements concerning the fate of both chlorine and MCLR. However, considering that in our experimental conditions, methanol from MCLR stock solution represents more than 99% of TOC, monitoring this parameter is not suitable. In the same way, chloride monitoring is not relevant because of chloride addition through bleach solution and hydrochloric acid for pH adjustment. Thus, chloride concentration increase due to MCLR chlorination would not be detected.

Finally nuclear magnetic resonance experiments could be carried out to confirm developed chemical formula of by-products but the low quantity available for each by-product is a strong limitation (Tsuji et al., 1997).

4.3. Consequences for drinking water disinfection and sanitary control

Practically, $20 \mu\text{g L}^{-1}$ of MCLR (1000 times lower than in the present work) in drinking water before disinfection process would represent a high level of contamination and chlorination usually leads to 0.5 mg L^{-1} of free chlorine residual. Under such bad conditions chlorine residual only would provide a [chlorine]/[MCLR] molar ratio equal to 350. Therefore, assuming that MCLR does not react with more than about 12 mol of chlorine, by-products identified in this work should be expected in a practical situation. In this condition, the large excess of chlorine allows the chlorine demand of both NOM and MCLR to be satisfied.

For sanitary control analysis, it should be taken into account that water has been chlorinated prior to distribution to the consumer. Consequently, quenching chlorine after sampling must be considered. In the future, chlorination by-products should be

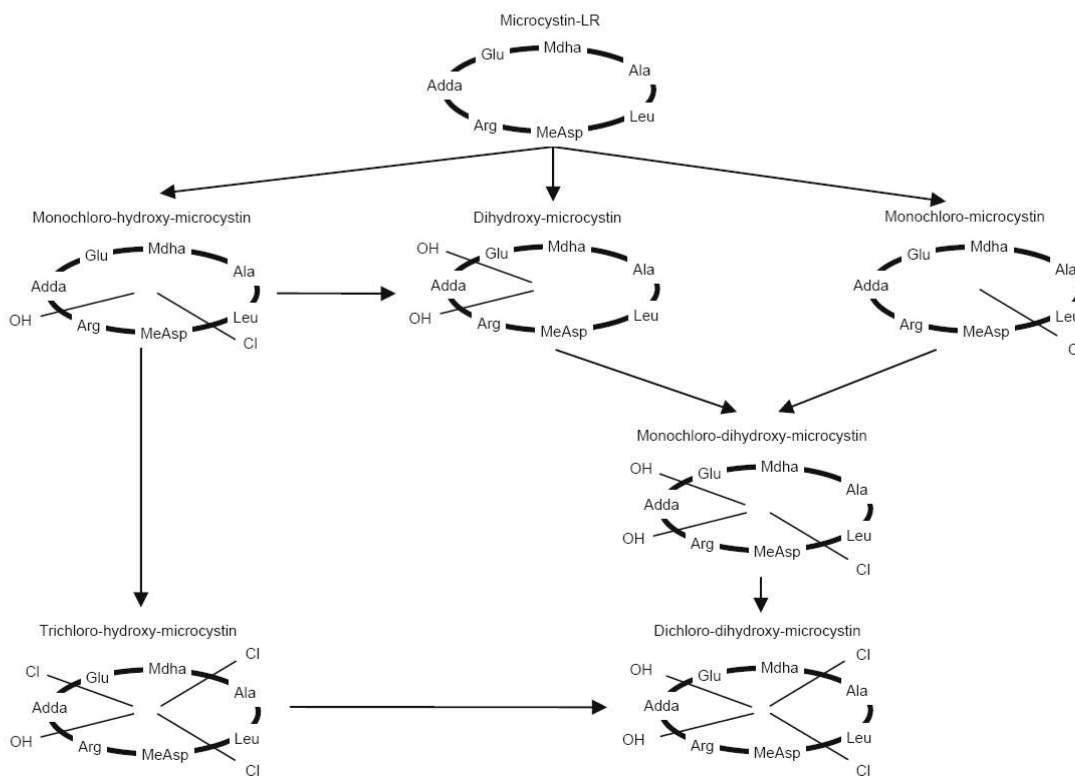


Fig. 6. Proposed chlorination degradation pathways for microcystin-LR (see Fig. 1 for microcystin schematic representation).

considered for cyanotoxins monitoring for the improvement of drinking water sanitary control.

5. Concluding remarks

In conclusion, chlorination efficiently reduces the concentration of MCLR providing a molar ratio [chlorine]/[toxin] equal to 20. However, 30 min are required to complete the reaction and the initial toxin is not eliminated but transformed into a mixture of by-products. Using the LTQ-Orbitrap technology, four new compounds have been identified by a body of evidence: monochloro-microcystin, monochloro-dihydroxy-microcystin, dichloro-dihydroxy-microcystin, and trichloro-hydroxy-microcystin. In addition, the precision on m/z measurement by the same technology also allowed the attribution of a more appropriate identity to a product already observed, the monochloro-hydroxy-microcystin. Then four new isomers of the already characterized dihydroxy-microcystin were revealed.

However, as the fate of the toxin has not totally been elucidated, further research shall be undertaken to complete the MCLR chlorination knowledge. There is also a need to assess toxicity of chlorination by-products and proceed the same way with other drinking water disinfection processes such as UV irradiation or ozonation.

Acknowledgements

The authors sincerely thank Bruno LEBIZEC, Ph.D., head of the laboratory of residues and contaminants in food (LABERCA) of the national veterinary school of Nantes (France) for providing us with an access to the LTQ-Orbitrap technology. We are also grateful to Fabrice MONTEAU for his help in using LTQ-Orbitrap mass spectrometer.

References

- Acero, J.L., Rodriguez, E., Meriluoto, J., 2005. Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins. *Water Res.* 39, 1628–1638.
- Alouini, Z., Seux, R., 1987. Cinétiques et mécanismes de l'action oxydative de l'hypochlorite sur les acides [alpha]-amines lors de la désinfection des eaux. Kinetics and mechanisms of hypochlorite oxidation of [alpha]-amino acids at the time of water disinfection. *Water Res.* 21, 335–343.
- An, J., Carmichael, W.W., 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicol.* 32, 1495–1507.
- Audi, G., Wapstra, A.H., 1995. The 1995 update to the atomic mass evaluation. *Nucl. Phys. A* 595, 409–480.
- Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K., 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology* 181–182, 441–446.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicol. Appl. Pharm.* 203, 264–272.
- Cong, L., Huang, B., Chen, Q., Lu, B., Zhang, J., Ren, Y., 2006. Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 569, 157–168.
- Dawson, R.M., 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicol.* 36, 953–962.
- Diehnelt, C.W., Peterman, S.M., Budde, W.L., 2005. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry and accurate m/z measurements of cyclic peptide cyanobacteria toxins. *TRAC Trend. Anal. Chem.* 24, 622–634.
- Dietrich, D., Hoeger, S., 2005. Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicol. Appl. Pharm.* 203, 273–289.
- Edwards, C., Beattie, K.A., Scrimgeour, C.M., Codd, G.A., 1992. Identification of anatoxin-A in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicol.* 30, 1165–1175.
- Falconer, I.R., 1991. Tumour promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water* 6, 177–218.
- Falconer, I.R., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M., Codd, G.A., 1999. Safe levels and safe practices. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E&FN Spon, London, United Kingdom, pp. 155–178.
- 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, 285–296.
- Harada, K., Kondo, F., Lawton, L., 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E&FN Spon, London, United Kingdom, pp. 369–405.
- Hitzfeld, B.C., Hoeger, S.J., Dietrich, D.R., 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Persp.* 108, 113–122.
- Ho, L., Onstad, G.D., von Gunten, U., Rinck-Pfeiffer, S., Craig, K., Newcombe, G., 2006. Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. *Water Res.* 40, 1200–1209.
- Hureiki, L., Croue, J.P., Legube, B., 1994. Chlorination studies of free and combined amino acids. *Water Res.* 28, 2521–2531.
- Hyenstrand, P., Metcalf, J.S., Beattie, K.A., Codd, G.A., 2001. Effects of adsorption to plastics and solvent conditions in the analysis of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by high performance liquid chromatography. *Water Res.* 35, 3508–3511.
- Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Ishikawa, N., Watanabe, M.F., Watanabe, M., Harada, K.I., Suzuki, M., 1992. Separation and identification of microcystins in cyanobacteria by frit-fast atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicol.* 30, 227–237.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J., 1999. Human health aspects. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E&FN Spon, London, United Kingdom, pp. 113–153.
- Kull, T.P.J., Backlund, P.H., Karlsson, K.M., Meriluoto, J., 2004. Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: reaction kinetics, characterization, and toxicity of reaction products. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6025–6031.
- Lawton, L.A., Robertson, P.K.J., 1999. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. *Chem. Soc. Rev.* 28, 217–224.
- 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 J.* 264, 187–192.
- Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., Horning, S., 2006. Dynamic range of mass accuracy in LTQ orbitrap hybrid mass spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 17, 977–982.
- Mez, K., Beattie, K.A., Codd, G.A., Hanselmann, K., Hauser, B., Naegeli, H., Preisig, H.R., 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Eur. J. Phycol.* 32, 111–117.
- Newcombe, G., Nicholson, B., 2004. Water treatment options for dissolved cyanotoxins. *J. Water Supply Res. T.* 63, 227–239.
- Nicholson, B.C., Rositano, J., Burch, M.D., 1994. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. *Water Res.* 28, 1297–1303.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W., Fujiki, H., 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin.* 118, 420–424.
- Peterman, S.M., Duczak, N., 2006. Application of a linear ion trap/orbitrap mass spectrometer in metabolite characterization studies: examination of the human liver microsomal metabolism of the non-tricyclic anti-depressant nefazodone using data-dependent accurate mass measurements. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 17, 363–375.
- Pouët, M.F., Bures, E., Vaillant, S., Thomas, O., 2004. Hidden isosbestic point(s) in ultraviolet spectra. *Appl. Spectrosc.* 58, 486–490.
- Pouria, S., Andrade de, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R.L., Barreto, V.T.S., Preiser, W., Poon, G.K., Neild, G.H., Codd, G.A., 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352 (9121), 21–26.
- Rodriguez, E., Onstad, G.D., Kull, T.P.J., Metcalf, J.S., Acero, J.L., von Gunten, U., 2007. Oxidative elimination of cyanotoxins: comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. *Water Res.* 41, 3381–3393.
- Spinelli, S., Gonzalez, C., Thomas, O., 2007. UV spectra library. In: Thomas, O., Burgess, C. (Eds.), *UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater*. Elsevier, Oxford, UK, pp. 267–356.
- Thomas, O., Cerda, V., 2007. From spectra to qualitative and quantitative results. In: Thomas, O., Burgess, C. (Eds.), *UV-Visible Spectrophotometry of Water and Wastewater*. Elsevier, Oxford, UK, pp. 21–46.
- Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M.F., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H., Harada, K.I., 1997. Stability of microcystins from cyanobacteria – IV. Effect of chlorination on decomposition. *Toxicol.* 35, 1033–1041.
- Xagorarakis, I., Harrington, G.W., Zulliger, K., Zeier, B., Krick, W., Karner, D.A., Standridge, J.H., Westrick, J.A., 2006. Inactivation kinetics of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by free chlorine. *J. Environ. Eng.-ASCE* 132, 818–823.
- Yuan, M., Carmichael, W.W., Hilborn, E.D., 2006. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. *Toxicol.* 48, 627–640.

ANNEXE III

Merel, S., Clement, M., Thomas, O., 2009.

Identification of a new cylindrospermopsin chlorination by-product

Science of the Total Environment

(manuscrit soumis le 21 septembre 2009)

Identification of a new cylindrospermopsin chlorination by-product

Sylvain Merel, Michel Clément, Olivier Thomas*

Environment and Health Research Laboratory (LERES), French School of Public Health (EHESP), Avenue du Professeur Léon-Bernard – CS 74312, 35043 Rennes Cedex, France

Abstract

In temperate countries, the occurrence of cyanobacterial blooms threatens drinking water resources. Consequently, cyanotoxins are increasingly considered in water treatment, and their reaction with chlorine used to disinfect drinking water is particularly investigated. This study presents new elements for further understanding of cylindrospermopsin chlorination, considering the evolution of mixture UV spectrum and monitoring reactants consumption along with the formation of reaction products. On the one hand, the evolution of mixture UV spectrum indicated that cylindrospermopsin was quickly transformed at least into one intermediate by-product. On the other hand, while mass spectrometry experiments revealed that cylindrospermopsin was almost totally transformed within 5 min, chlorine was consumed up to 20 min after the beginning of the reaction with a rate of 5 mol mol⁻¹ toxin. Then, LC-MS analysis gave rise to the formation of a third cylindrospermopsin residue in addition to 5-chloro-cylindrospermopsin and cylindrospermopsic acid previously identified. Thanks to the accurate mass measurement provided by the LTQ-Orbitrap mass spectrometer, this new and ultimate chlorination by-product was assigned the chemical formula C₁₃H₁₈N₄O₇S.

Keywords: Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, Chlorination, Drinking Water Treatment, Disinfection, By-Products

* Corresponding author. E-mail: Olivier.Thomas@ehesp.fr

Tel: + 33.2.99.02.29.20

Fax: + 33.2.99.02.29.29

1. Introduction

In temperate countries, the occurrence of algae crisis in surface water is a growing environmental and public health concern. In addition, climate change and anthropic pressure may enhance its frequency and magnitude (Dale et al., 2006; Paul, 2008). Among microorganisms forming blooms, cyanobacteria are particularly considered, as some of them can produce harmful metabolites called cyanotoxins that have been associated with various intoxications worldwide (Edwards et al., 1992; Mez et al., 1997; Kuiper-Goodman et al., 1999; Griffiths and Saker, 2003).

Cyanotoxins include a wide range of compounds, such as cylindrospermopsin (CYL), mainly produced by *Cylindrospermopsis raciborskii* and mostly reported in Australia (Saker et al., 1999; Griffiths and Saker, 2003; Fristachi and Sinclair, 2008; Stewart et al., 2008), New Zealand (Stirling and Quilliam, 2001) and Thailand (Carmichael et al., 2001; Li et al., 2001). Although CYL has often been considered as a tropical toxin, recent studies have identified its occurrence in temperate countries, like Germany (Fastner et al., 2003; Rucker et al., 2007; Wiedner et al., 2008) and France (Bernard et al., 2003; Brient et al., 2009). This 415 Da toxin encloses a tricyclic guanidine unit and a uracil moiety which could be the origin of its toxicity (Banker et al., 2001). CYL primarily affects the liver (Bernard et al., 2003) inhibiting protein synthesis, which leads to cell death (Froschio et al., 2003; Metcalf et al., 2004; Froschio et al., 2008), but other effects like tumour initiation are known too (Falconer and Humpage, 2001).

Humans are potentially exposed to cyanotoxins through drinking water produced from contaminated resources. For example, the most famous intoxication by CYL, known as the Palm Island mystery disease, occurred in 1979 in Palm Island, northern Queensland, Australia (Byth, 1980; Bourke et al., 1983; Griffiths and Saker, 2003). The algicidal treatment of a dense cyanobacterial bloom in the water supply of the area led to CYL release, and some days later, over 100 children suffering from gastroenteritis attributed to contaminated drinking water consumption were admitted to the local hospital. Consequently, CYL has to be carefully considered in water treatment, and a guideline of 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for maximum concentration in drinking water has been proposed (Humpage and Falconer, 2003).

Chlorination is a common process to disinfect drinking water whose effect on cyanotoxins has been particularly investigated (Acero et al., 2005; Ho et al., 2006; Xagorarakis et al., 2006; Rodríguez et al., 2007a; Rodríguez et al., 2008; Merel et al., 2009). Although CYL has not been extensively studied, chlorination was shown to provide efficient toxin transformation, and 2 by-products were identified: 5-chloro-cylindrospermopsin and

cylindrospermopsic acid (Banker et al., 2001; Senogles-Derham et al., 2003; Rodríguez et al., 2007b). However, considering that CYL has various chemical functions potentially reactive with chlorine, such as amine moieties, the current state of knowledge on chlorination may not explain the entire reaction mechanism.

The present study aims to complement previous researches on CYL chlorination, considering the reaction through the evolution of chlorine forms, combining conventional LC-MS analysis with UV spectrophotometry, and seeking to identify new toxin residues.

2. Materials and methods

2.1. Reactants

Standard toxin (containing both CYL presented in Fig. 1 and its isomer 7-epiCYL which differs only by the orientation of the hydroxyl group close to uracil moiety) with more than 95% purity isolated from *Cylindrospermopsis raciborskii* was purchased from Alexis Biochemicals. A 60 μM stock solution was prepared making soluble 100 μg glassy solid toxin in 4 mL high-purity water before storage in darkness at -20°C .

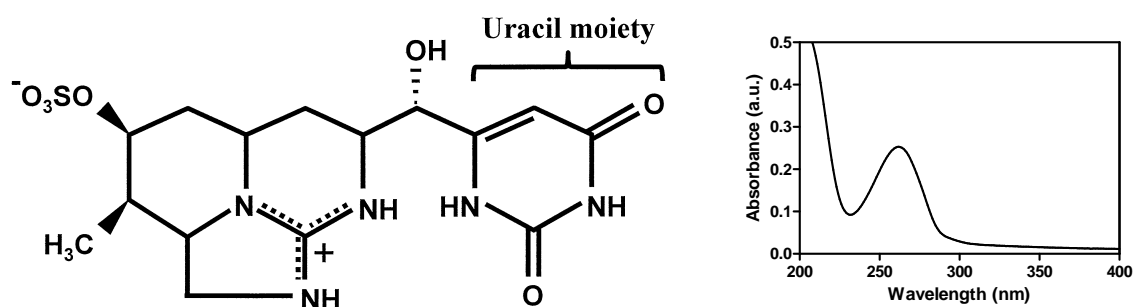


Figure 1: Structure and UV spectrum of the cyanotoxin cylindrospermopsin.

Chlorine stock solution was prepared diluting a commercial bleach solution to 1/50 in high-purity water to obtain approximately 15 mM Cl₂. Then, 0.01 M hydrochloric acid was added to adjust pH to 7, and the mixture was stored in darkness at 4°C for 7 days. The exact chlorine concentration was determined through sodium thiosulfate titration only a few minutes before each experiment.

Sodium nitrite used to stop chlorination through free-chlorine reduction was purchased from Merck and a 20 mM solution was prepared in high-purity water before storage in darkness at 4°C. Diethyl-p-phenylen-diamin (DPD) used to monitor chlorine concentration was purchased from Permachem Reagents in packets of “DPD free chlorine reagent” and “DPD total chlorine reagent”, respectively for free and total chlorine measurement.

Acetonitrile at HPLC grade and over 98% pure ammonium acetate for HPLC were respectively purchased from SDS and Merck.

2.2. LC-MS analysis

Two equipments were used in order to perform LC-MS analysis, i) a Finnigan surveyor HPLC system with a LTQ-Orbitrap mass spectrometer from Thermo Electron Corporation for by-products identification and, ii) a Waters alliance 2695 HPLC device associated with a Waters Micromass ZQ mass spectrometer for by-products monitoring.

2.2.1. HPLC conditions

The same HPLC method was used on both LC-MS device. HPLC was carried out on 50 μ L sample according to the principle of hydrophilic interaction (Kovalova et al., 2009), a suitable method to separate highly polar compounds like CYL (Chiswell et al., 1999). Samples for analysis were injected on a MODULO-CART QK STRATEGY 5 HILIC SI 250 X 2 mm column purchased from Interchrom. Column temperature was set at 40 °C and elution was performed using a 0.2 mL min⁻¹ mobile phase consisting in 80% acetonitrile and 20% water with 10 mM ammonium acetate.

2.2.2. The Thermo Electron LTQ-Orbitrap mass spectrometer

The LTQ-Orbitrap mass spectrometer with Xcalibur data handling software is a suitable tool for identification of unknown products (Peterman and Duczak, 2006) providing a resolution $m/\Delta m$ of 6×10^4 when m is equal to 400. The LTQ-Orbitrap was used in order to detect CYL by-products searching ions with a mass/charge ratio (m/z) in the range 60-650. Compounds were ionised by positive electrospray (source: 4.5 kV and 100 μ A) which prevents their fragmentation. Each ion with a m/z in the range 60-650 was accumulated in the C-trap before entering the Orbitrap where its rotation around the central electrode was recorded and converted to mass spectra thanks to Fourier transformed.

The LTQ-Orbitrap was also used to sustain MC-LR by-products identity performing tandem mass spectrometry (MS^2) experiments with the Collision Induced Dissociation mode. Molecular ions of by-products were submitted to helium atoms bombardment with collision energy of 25%, considering the normalized scale 0-400. Then, generated daughter ions were detected by the low resolution mass spectrometer of the linear ion trap.

2.2.3. The Waters Micromass ZQ mass spectrometer

Micromass ZQ from Waters is a simple quadrupole mass spectrometer used with Masslynx data handling software in order to monitor and quantify CYL and its by-products as a function of chlorine exposure. Compounds were ionised at 130 °C by positive electrospray (3.25 kV and 40 V respectively for capillary and cone voltage). Only molecular ions were selected for mass detection of CYL and its by-products. Then, quantification was performed considering the area of the corresponding chromatographical peak.

2.3. UV spectrophotometry

2.3.1. UV spectra acquisition and calculation of CYL concentration

UV spectra in the range 200-400 nm were acquired on a Perkin Elmer Lambda 20 UV-visible spectrophotometer using a 10 mm quartz cell pathlength and a scan speed set at 1920 nm min⁻¹. As illustrated in Fig. 1, CYL has a characteristic UV spectrum with a typical maximum absorbance at 262 nm (Sano et al., 2008) which was used to calculate toxin concentration according to Eq. 1.

$$\rho = (A_{262} * 10^6) / (\epsilon * d) \quad (1)$$

Where ρ , A_{262} , ϵ and d are, respectively: CYL concentration (expressed in μM), absorbance at 262 nm (expressed in au), CYL molar absorptivity ($9\,800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and cell optical pathlength (expressed in cm).

2.3.2. UV spectra handling

UV spectra were handled using UV WinLab 5.2.0. software from Perkin Elmer. The first step consisted in subtracting the contribution of sodium hypochlorite from all UV spectra recorded along the reaction. Then, these ones were overlaid, in order to show a potential isobestic point (various UV spectra crossing together at the same wavelength form a characteristic spot called isobestic point) indicating that mass conservation can be assumed. Finally respective areas of UV spectra were normalized to observe the appearance of hidden isobestic points (Pouët et al., 2004; Thomas and Cerda, 2007). These ones appear only after normalization of UV spectra and indicate that a qualitative conservation of the sample during the reaction can be assumed, according to Eq. 2.

$$\alpha \cdot C_{Ai} + \beta \cdot C_{Bi} + \gamma \cdot C_{Ci} + \dots = 1 \quad (2)$$

Where C_{Ai} , C_{Bi} and C_{Ci} are the concentrations of products A, B and C at reaction time i , and α , β and γ do not depend on reaction time.

2.4. Chlorination experiments

Anticipating difficulties to accurately determine CYL chlorine demand and to identify reaction products in a complex matrix, chlorination experiments were undertaken in high-purity water spiked with 20-25 μM toxin (suitable concentration for the reaction to be monitored by UV spectrophotometry, and for by-products to be detected by mass spectrometry). The initial CYL concentration was checked by UV spectrophotometry prior chlorine addition, and the mixture was placed in darkness at 20 °C to avoid photodegradation of the toxin. Then, the necessary volume of chlorine stock solution was added to ensure a molar ratio [chlorine]/[CYL] equal to 10.

Afterwards, CYL chlorination was observed up to 60 min through the regular acquisition of mixture UV spectrum and measurement of chlorine concentration. In addition, the reacting solution was regularly sampled for LC-MS determination of CYL and its by-products. However, in order to stop the reaction for LC-MS analysis, free chlorine residual was reduced into chloride ions by addition of sodium nitrite 10% in molar excess at sampling time.

2.5. Monitoring free and total chlorine concentration

The reacting mixture was periodically sampled, and aliquots were treated with the packets of “DPD free chlorine reagent” and “DPD total chlorine reagent”. Using the same device than for UV spectrophotometry, the absorbance at 510 nm was measured immediately and after 2 min delay, respectively for free and total chlorine. Then, chlorine concentration was obtained from a calibration curve.

2.6. Identification and monitoring of CYL by-products

Chlorination by-products were initially observed on the LTQ-Orbitrap mass spectrometer through examination of m/z recorded in the range 60-650. Based on the accurate m/z measurement, each compound observed was associated with a chemical formula hypothesis. Then, a relative mass error expressed in ppm was calculated, a result lower than 5 ppm being considered as an acceptable value (Makarov et al., 2006).

Chemical formula propositions were then sustained by two different ways, i) the agreement between theoretical and experimental isotopic massifs and, ii) the consistency with daughter ions formed during MS² analysis.

The relative concentration of CYL and its by-products was monitored using the Micromass ZQ mass spectrometer as described before (the detection limit for CYL being 7 nm). When 2 isomers were observed, areas of their respective signal were added and treated as a unique compound. However, since no standards to quantify by-products were available, it was assumed that one mol of by-product is approximately characterized on chromatograms by the same area than one mol of CYL. Then, results were expressed as the molar fraction of the initial toxin, i.e. the percentage of CYL area on the chromatogram prior chlorination.

3. Results

CYL chlorination has been considered through three approaches: evolution of mixture UV spectrum, reactants consumption, and MS identification of by-products.

3.1. Reaction monitoring through UV spectrophotometry

3.1.1. Evolution of UV spectra shape

Examination of UV spectra shape while running chlorination reveals the disappearance of the maximum absorbance at 262 nm and the appearance of another maximum absorbance at 305 nm, as illustrated in Fig. 2a. On the one hand, the decrease in absorbance at 262 nm occurs very quickly after mixing reactants, which indicates that CYL should be quickly transformed when mixed with chlorine. Indeed, the absorbance at 262 nm declines from 0.253 a.u. initially to 0.097 a.u. only within 1 min contact time, and then decreases slowly to reach 0.071 a.u.

On the other hand, reacting mixture absorbance at 305 nm strongly increases after mixing CYL with chlorine, and then goes down progressively suggesting the occurrence of an intermediate reaction product. In fact, the absorbance at such wavelength initially rises from 0.027 a.u. to 0.179 a.u. within 30 s contact time, and declines after 10 min to 0.049 a.u. Then, no further evolution is observed until the end of reaction monitoring.

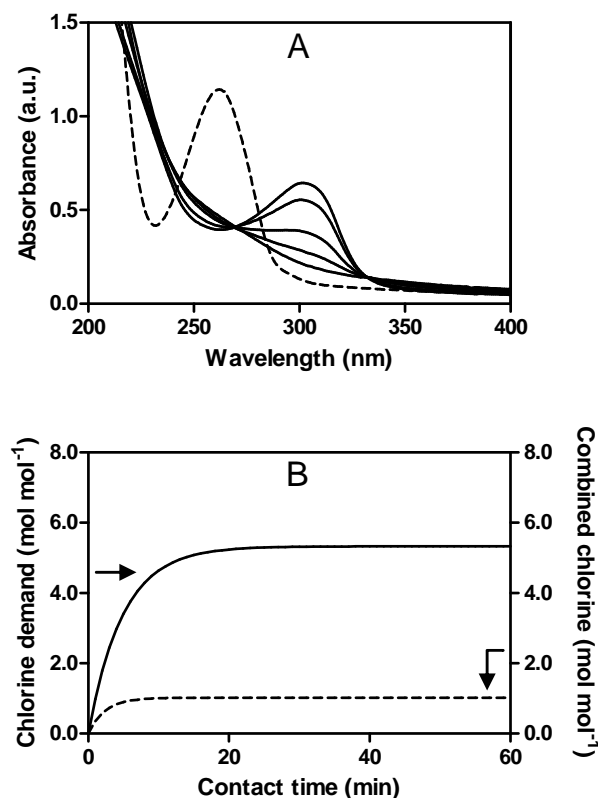


Figure 2: (A) Evolution of normalized UV spectra after 0 min (dotted spectrum); 1; 2; 5; 10; and 60 min of chlorine exposure, by decreasing absorbance values at 305 nm. (B) Evolution of cylindrospermopsin chlorine demand and combined chlorine.

3.1.2. Isobestic points

Regarding CYL chlorination, no direct isobestic points can be observed when overlaying raw UV spectra taken after different contact time. Nevertheless, all spectra converge close to 380 nm but without crossing together, which suggests the existence of at least one hidden isobestic point. In fact, when normalizing spectra area, 2 hidden isobestic points clearly appear as shown in Fig. 2a. The first one occurs at 269 nm while the second one occurs at 332 nm. However, it can be noticed that the initial UV spectrum corresponding to pure CYL mixture does not go through any of them. Consequently, no qualitative conservation occurs when chlorinating the initial CYL solution and it can be assumed that toxin chlorination undergoes a complex pathway. However, further chlorination of CYL by-products can be considered as a simple reaction with qualitative conservation of the sample leading to a mixture containing several absorbing compounds (Pouët et al., 2004; Thomas and Cerda, 2007).

3.2. Reactants consumption

3.2.1. Chlorine consumption

Chlorine consumption by CYL was analyzed taking into account total and free chlorine, but results were converted into the evolution of both chlorine demand and combined chlorine. The former represents the amount of free chlorine consumed per one mol of toxin as a function of time and is expressed in mol mol^{-1} . The latter is determined making the subtraction between total and free chlorine in solution and represents the amount of labile chlorine involved in mineral or organic structures.

On the one hand, CYL has a chlorine demand of 5.3 mol mol^{-1} completed within 20 min. However, chlorine is mainly consumed during the first 10 min of the reaction. At that time, each mol of toxin has reacted with about 4 mol of oxidant, as illustrated in Fig. 2b. Then, another mol of chlorine is consumed until 20 min contact time, when the reaction seems to be completed.

On the other hand, reaction of CYL with chlorine induces formation of combined chlorine. As illustrated in Fig. 2b, combined chlorine occurs immediately after mixing the reactants and reaches a maximum after 5 min contact time. This value corresponding to 1 mol of chlorine fixed per mol of initial CYL remains stable up to 60 min, when reaction monitoring was stopped.

3.2.2. CYL consumption

In accordance with results of previous studies (Senogles et al., 2000; Banker et al., 2001; Rodríguez et al., 2007b), LC-MS analysis indicates that CYL and its isomer are efficiently and quickly transformed when mixed with chlorine. For instance, only 11% and 0.9% of the initial toxin remain in solution, respectively, after 1 and 5 min contact time with chlorine. Then, after 60 min contact time (the end of reaction monitoring), the toxin transformation reaches more than 99.9%.

In addition, LC-MS results also indicate that chlorination follows a first order reaction regarding CYL. In the present experimental conditions a $3.4 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ pseudo first order kinetic constant has been calculated ($R^2 = 0.999$), which is consistent with data published by Rodríguez et al. (2007b).

3.3. Examination of reaction by-products

As presented in Fig. 3, chlorination of CYL and its isomer leads to the formation of 3 by-products, including 1 that has not been previously reported.

3.3.1. MS characterization of CYL residues

In accordance with data found in literature, CYL chlorination leads to the production of the $C_{15}H_{20}N_5O_7SCl$ compound called 5-chloro-cylindrospermopsin. As shown in Fig. 3b, 2 isomers (one for each isomer of the initial CYL) of this toxin residue are identified with the characteristic m/z ratios 450.084 and a relative mass error of 2 ppm (Table 1). This chlorination by-product, firstly identified by Banker et al. (2001) when treating CYL with a molar ratio [chlorine]/[CYL] equal to 1, should be formed by substitution of a hydrogen atom by a chlorine atom on the uracil moiety, as illustrated in Fig. 4. The examination of 5-chloro-cylindrospermopsin isotopic mass in mass spectrum is in accordance with this theory, the greater abundance of $[M+2+H]^+$ ion with respect to $[M+1+H]^+$ ion corroborating the incorporation of a chlorine atom in the chemical structure. In addition MS^2 experiments on $[M+H]^+$ ion also reveals a daughter ion at m/z 274.2 attributed to the loss of a fragment containing the uracil moiety and a chlorine atom.

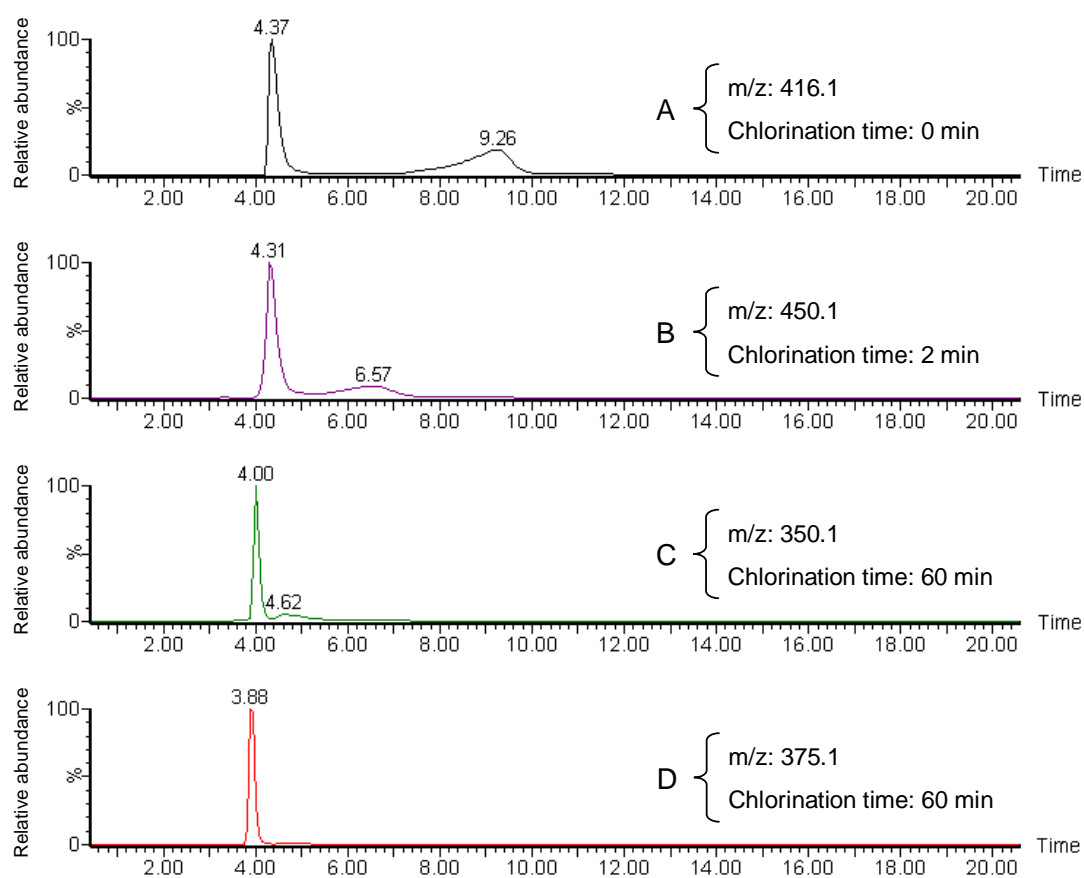


Figure 3: Chromatograms of cylindrospermopsin (A) and its by-products: 5-chloro-cylindrospermopsin (B); cylindrospermopsic acid (C); new characterized residue (D) at different contact time by Micromass ZQ mass spectrometer.

Table 1: Molecular ions of cylindrospermopsin and chlorination by-products

Compound	Chemical formula	Theoretical m/z ratio ^a ([M+H] ⁺ ion)	Experimental m/z ratio ^b ([M+H] ⁺ ion)	Mass error (ppm)
Cylindrospermopsin	C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₇ S	416.1239929	416.124	<1
5-chloro-cylindrospermopsin	C ₁₅ H ₂₀ N ₅ O ₇ SCl	450.0850206	450.084	2
Cylindrospermopsic acid	C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₇ S	350.1021949	350.101	3
New unnamed by-product	C ₁₃ H ₁₈ N ₄ O ₇ S	375.0974439	375.097	1

^a Calculated using data from Audi and Wapstra (1995), considering only significant digits

^b Considering only significant digits provided by the LTQ-Orbitrap mass spectrometer

Cylindrospermopsic acid, previously identified by Banker et al. (2001), associated with the chemical formula C₁₂H₁₉N₃O₇S is also observed (Fig. 3c) through its characteristic m/z 350.101 and a relative mass error of 3 ppm (Table 1). As for the previous compound, 2 isomers occur. This CYL residue should be formed by further chlorination of 5-chloro-cylindrospermopsin, fragmenting the uracil moiety and leaving a carboxylic acid function, as illustrated in Fig. 4. The identity of cylindrospermopsic acid is also sustained by the concordance between the theoretical isotopic mass and the experimental one observed on mass spectrum. However, MS² experiments on [M+H]⁺ ion do not provide much more details on the chemical structure of the compound since only 2 daughter ions are observed: [M+H-SO₃]⁺ and [M+H-SO₃-H₂O]⁺.

The third CYL residue (Fig. 3d) characterized by its m/z ratio equal to 375.097 has not been previously reported in literature. Considering toxin composition and accurate m/z measurement provided by the LTQ-Orbitrap, this new CYL by-product can be related to the chemical formula C₁₃H₁₈N₄O₇S with a relative mass error of only 1 ppm (Table 1). The examination of the isotopic mass on mass spectrum (Fig. 5) sustains that no chlorine atom can be incorporated in the compound formula since ion [M+2+H]⁺ ion is almost negligible towards [M+H]⁺. In addition, experimental data are in agreement with theoretical ones. However, as presented in Fig. 5, MS² experiments on [M+H]⁺ ion do not provide much more details on the chemical structure of the toxin residue since only 2 daughter ions are observed: [M+H-SO₃]⁺ and [M+H-SO₃-H₂O]⁺.

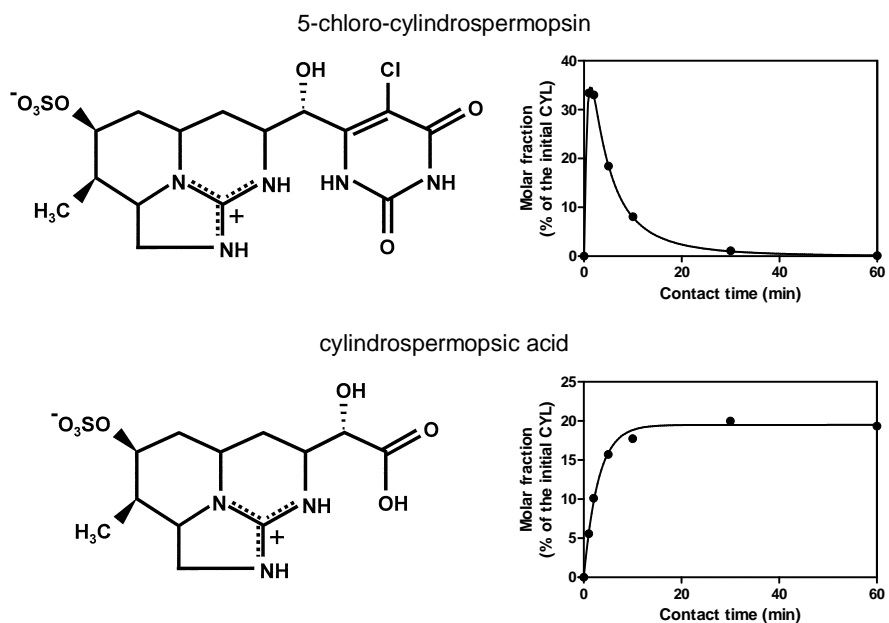


Figure 4: Structure and monitoring of 5-chloro-cylindrospermopsin and cylindrospermopsic acid (estimated molar fraction).

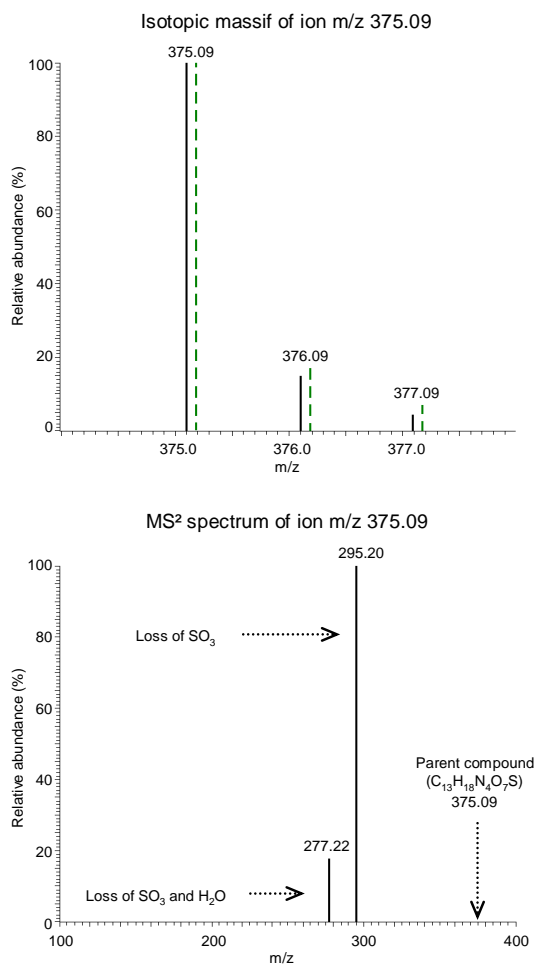


Figure 5: Isotopic mass (experimental and theoretical data respectively in continuous and dotted line) and MS² spectrum of ion m/z 375.09.

3.3.2. Evolution of CYL residues

Monitoring CYL by-products as a function of chlorination time reveals 2 evolution profiles showing the occurrence of an intermediate compound and 2 ultimate residues.

On the one hand, 5-chloro-cylindrospermopsin is formed immediately after mixing CYL with chlorine and reaches a maximum concentration within 1 min contact time. Then, this intermediate compound undergoes further transformation. Indeed, its concentration quickly decreases after 2 min contact time and less than 4% remains after half an hour, as presented in Fig. 4. In addition, LC-MS experiments indicate that 5-chloro-cylindrospermopsin transformation follows a first order reaction. In the present experimental conditions a $2.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ pseudo first order kinetic constant has been calculated ($R^2 = 0.998$), which is consistent with data published by Rodríguez et al. (2007b).

On the other hand, cylindrospermopsic acid and the new by-product identified ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$) are ultimate CYL residues with the same evolution profile illustrated in Fig. 4. Both of them are formed almost immediately after the beginning of the reaction. Their concentration increase progressively until a maximum is reached after 15 min contact time, and then remain stable up to 60 min chlorine exposure, time when reaction monitoring is stopped. However, when cylindrospermopsic acid reaches about 20% of the initial CYL, the new by-product is limited to 15%.

4. Discussion

4.1. Examination of UV spectra set

This study provides a new approach to monitor CYL chlorination through examination of mixture UV spectrum evolution. Although this last method is less specific and sensible than LC-MS analysis, it provides useful and complementary results. Overlaying UV spectra and searching for isobestic points (direct or hidden after normalization) indicates that CYL undergoes chlorination so that neither mass nor qualitative conservation of the initial sample occur. However, examination of UV spectra shows that once CYL is totally transformed, its by-products undergo further chlorination through a simple process for which a qualitative conservation of the mixture can be assumed.

Since the contribution of chlorine has been subtracted from each UV spectrum, the maximum absorbance at 305 nm cannot be attributed to the oxidant, and therefore should be assigned to an intermediate by-product (the maximum decreasing with contact time). However, it cannot be attributed to 5-chloro-cylindrospermopsin whose maximum absorbance

occurs at 277 nm (Banker et al., 2001; Rodríguez et al., 2007b) when detected by diode array detector coupled with LC-MS. Then, a potential explanation for this maximum absorbance at 305 nm may be the formation of a non-polar intermediate that had not been detected with the current chromatographic conditions (hydrophilic interaction chromatography being designed to separate highly polar molecules).

In addition, once a chemical reaction is well characterized and UV spectra of each reactants and by-products are available in spectra library, UV spectrophotometry can provide an accurate monitoring of each compound (Roig et al., 2003). Therefore, once cyanotoxins chlorination will be completely elucidated, UV spectrophotometry could be developed (with on line concentration) for in-situ monitoring of cyanotoxins and by-products during drinking water treatment.

4.2. Monitoring consumption of reactants

First, in accordance with previous studies (Senogles et al., 2000; Banker et al., 2001; Rodríguez et al., 2007a; Rodríguez et al., 2007b), results presented in this article show that CYL concentration efficiently decreases during chlorination, and 20 min are required to complete the chlorine demand of the toxin. However, the consumption of 5 mol of chlorine per mol of CYL may not exactly correspond to by-products previously characterized and one should consider that all the toxin residues are not identified. For example, since amines are highly reactive with chlorine and form chloramines through substitution reaction (Alouini and Seux, 1987; Hureiki et al., 1994; Deborde and von Gunten, 2008; Merel et al., 2009), N-H bonds constituting CYL structure may also be a potential target of chlorination. Besides, formation of combined chlorine and its constant concentration up to 60 min contact time tends to sustain this hypothesis. Nevertheless, the chromatographic conditions used in this study are not adapted to such compounds that therefore could not be observed.

4.3. Monitoring chlorination by-products

Similarly to previous studies (Banker et al., 2001; Senogles-Derham et al., 2003; Rodríguez et al., 2007b), chlorination of CYL leads to the formation of 5-chloro-cylindrospermopsin and cylindrospermopsin which can be reliably monitored by LC-MS through their molecular ions, respectively m/z 450.1 and 350.1 (Table 1). However, the present work gives rise to the occurrence of a new by-product. Therefore, Fig. 6 proposes a new tentative chlorination pathway for CYL. As mentioned in previous studies (Banker et al., 2001; Senogles-Derham et al., 2003; Rodríguez et al., 2007b), the formation of the

intermediate 5-chloro-cylindrospermopsin would be the first chlorination step. Then, this one should be transformed into 2 ultimate toxin residues: the new characterized by-product and cylindrospermopsic acid, both of them having a similar evolution profile.

Nevertheless, by-products identified in this research seem to explain partly the fate of initial CYL during chlorination. Indeed, assuming that one mol of by-product is approximately characterized on chromatograms by the same area than one mol of CYL, at its maximum 5-chloro-cylindrospermopsin represents only around 35% of the initial CYL (Fig. 4). In the same way, at their maximum cylindrospermopsic acid and the new by-product represent, respectively, around 20% and 15% of the initial toxin. Consequently, this last observation sustains the previous hypothesis according to which other potential CYL chlorination residues may have not been observed with the current chromatographic conditions.

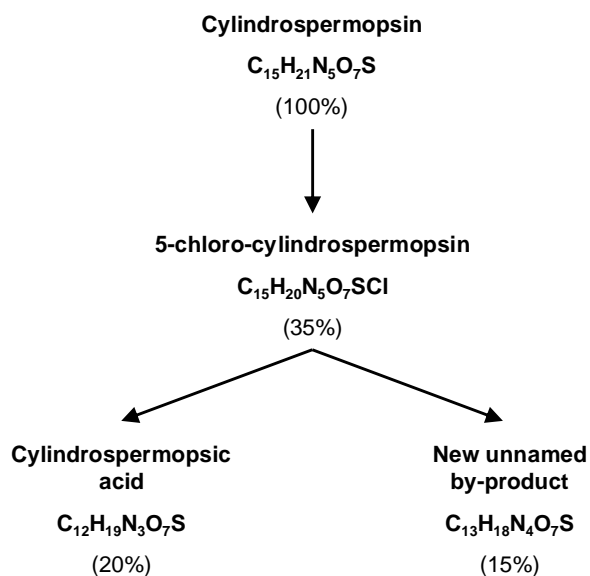


Figure 6: Chlorination degradation pathway (tentative) for cylindrospermopsin with expected molar fraction (expressed as percentage of the initial toxin).

4.4. Consequences for drinking water treatment

In practical terms, 20 nM of CYL (1000 times lower than in the present work) in drinking water prior disinfection would represent a high level of contamination, and chlorination typically leads to 0.5 mg L⁻¹ (about 7 μM) of free chlorine residual. Considering such unfavorable conditions, only chlorine residual would provide a molar ratio [chlorine]/[CYL] equal to 350. Therefore, assuming that CYL reacts with 5 mol of chlorine, drinking water disinfection by chlorine could efficiently transform the toxin even in highly

contaminated raw water. Thus, 5-chloro-cylindrospermopsin, cylindrospermopsic acid and the new characterized by-product are susceptible to occur in treatment plant along with other potential CYL by-products. Then, in order to improve drinking water sanitary control and protect consumers' health, not only the widespread cyanotoxin microcystin-LR should be monitored in drinking water, but also CYL and its by-products. Therefore, additional studies focusing on analytical development should be undertaken to provide a cost-effective simultaneous monitoring of various cyanotoxins and their by-products. In addition, further investigation should be carried out on chemical and toxicological characterization of CYL chlorination by-products.

5. Conclusions

Chlorination efficiently reduces CYL concentration and should represent a potential remedial measure in drinking water treatment. Indeed, only 5 mol of chlorine are required to complete the reaction in approximately 20 min. Then, LC-MS and UV spectrophotometry provide an accurate reaction monitoring and complementary results indicating that CYL may not be totally eliminated but transformed into a mixture of by-product. Using the LTQ-Orbitrap technology, a new ultimate toxin residue has been characterized and included into CYL chlorination pathway. However, chlorination by-products identified may represent only a part of the fate of the initial toxin. Therefore, further research should be undertaken to better explain CYL chlorination from a chemical and a toxicological point of view. In the same way, it is also necessary to study the fate of CYL and other cyanotoxins when using different water disinfection processes, such as ozonation or UV irradiation.

Acknowledgements

The authors would like to sincerely thank Bruno LEBIZEC, head of the laboratory of residues and contaminants in food (LABERCA) of the national veterinary school of Nantes (France) for providing us with an access to his laboratory and Fabrice MONTEAU for his help in using LTQ-Orbitrap mass spectrometer.

References

Acero JL, Rodríguez E, Meriluoto J. Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins. *Water Res* 2005; 39: 1628-1638.

- Alouini Z, Seux R. Kinetics and mechanisms of hypochlorite oxidation of [alpha]-amino acids at the time of water disinfection. *Water Res* 1987; 21: 335-343.
- Audi G, Wapstra AH. The 1995 update to the atomic mass evaluation. *Nucl Phys A* 1995; 595: 409-480.
- Banker R, Carmeli S, Werman M, Teltsch B, Porat R, Sukenik A. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *J Toxicol Env Health Part A* 2001; 62: 281-288.
- Bernard C, Harvey M, Briand JF, Biré R, Krysz S, Fontaine JJ. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: Evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ Toxicol* 2003; 18: 176-186.
- Bourke ATC, Hawes RB, Neilson A, Stallman ND. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon* 1983; 21: 45-48.
- Brient L, Lengronne M, Bormans M, Fastner J. First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. *Environ Toxicol* 2009; 24: 415-420.
- Byth S. Palm Island mystery disease. *Med J Australia* 1980; 2: 40-42.
- Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, Shaw GR, Eaglesham GK. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 663-668.
- Chiswell RK, Shaw GR, Eaglesham GK, Smith MJ, Norris RL, Seawright AA, Moore MR. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environ Toxicol* 1999; 14: 155-161.
- Dale B, Edwards M, Reid PC. In: Granéli E, Turner JT, editors. *Ecology of Harmful Algae*. Springer, New York, 2006, pp. 367-378.
- Deborde M., von Gunten U. Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment--Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Res* 2008; 42: 13-51.
- Edwards C, Beattie KA, Scrimgeour CM, Codd GA. Identification of anatoxin-A in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon* 1992; 30: 1165-1175.
- Falconer IR, Humpage AR. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 2001; 16: 192-195.

- Fastner J, Heinze R, Humpage AR, Mischke U, Eaglesham GK, Chorus I. Cylindrospermopsin occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates. *Toxicon* 2003; 42: 313-321.
- Fristachi A, Sinclair JL. In: Hudnell KH, editor. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, 2008, pp. 45-103.
- Froschio SM, Humpage AR, Burcham PC, Falconer IR. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environ Toxicol* 2003; 18: 243-251.
- Froschio SM, Humpage AR, Wickramasinghe W, Shaw G, Falconer IR. Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon* 2008; 51: 191-198.
- Griffiths DJ, Saker ML. The Palm Island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* 2003; 18: 78-93.
- Ho L, Onstad G, von Gunten U, Rinck-Pfeiffer S, Craig K, Newcombe G. Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. *Water Res* 2006; 40: 1200-1209.
- Humpage AR, Falconer IR. 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* 2003; 18: 94-103.
- Hureiki L, Croue JP, Legube B. Chlorination studies of free and combined amino acids. *Water Res* 1994; 28: 2521-2531.
- Kovalova L, McArdell CS, Hollender J. Challenge of high polarity and low concentrations in analysis of cytostatics and metabolites in wastewater by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 1100-1108.
- Kuiper-Goodman T, Falconer I, Fitzgerald J. In: Chorus I, Bartram J, editors. *Toxic Cyanobacteria in Water: a Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, London, 1999, pp. 113-153.
- Li R, Carmichael WW, Brittain S, Eaglesham GK, Shaw GR, Mahakhant A, Noparatnaraporn N, Yongmanitchai W, Kaya K, Watanabe MM. Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon* 2001; 39: 973-980.
- Makarov A, Denisov E, Lange O, Horning S. Dynamic range of mass accuracy in LTQ orbitrap hybrid mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006; 17: 977-982.

- Merel S, Lebot B, Clement M, Seux R, Thomas O. MS identification of microcystin-LR chlorination by-products. *Chemosphere* 2009; 74: 832-839.
- Metcalf JS, Barakate A, Codd GA. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 235: 125-129.
- Mez K, Beattie KA, Codd GA, Hanselmann K, Hauser B, Naegeli H, Preisig HR. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *Eur J Phycol* 1997; 32: 111-117.
- Paul VJ. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. In: Hudnell KH, editor. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, 2008, pp. 239-257.
- Peterman SM, Duczak N. Application of a linear ion trap/orbitrap mass spectrometer in metabolite characterization studies: examination of the human liver microsomal metabolism of the non-tricyclic anti-depressant nefazodone using data-dependent accurate mass measurements. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006; 17: 363-375.
- Pouët MF, Baures E, Vaillant S, Thomas O. Hidden isobestic point(s) in ultraviolet spectra. *Appl Spectrosc* 2004; 58: 486-490.
- Rodríguez E, Onstad GD, Kull TPJ, Metcalf JS, Acero JL, von Gunten U. Oxidative elimination of cyanotoxins: comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. *Water Res* 2007a; 41: 3381-3393.
- Rodríguez E, Sordo A, Metcalf JS, Acero JL. Kinetics of the oxidation of cylindrospermopsin and anatoxin-a with chlorine, monochloramine and permanganate. *Water Res* 2007b; 41: 2048-2056.
- Rodríguez EM, Acero JL, Spooof L, Meriluoto J. Oxidation of MC-LR and -RR with chlorine and potassium permanganate: toxicity of the reaction products. *Water Res* 2008; 42: 1744-1752.
- Roig B, Gonzalez C, Thomas O. Monitoring of phenol photodegradation by ultraviolet spectroscopy. *Spectrochim Acta Part A* 2003; 59: 303-307.
- Rücker J, Stüken A, Nixdorf B, Fastner J, Chorus I, Wiedner C. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 Aphanizomenon-dominated temperate lakes. *Toxicon* 2007; 50: 800-809.
- Saker ML, Thomas AD, Norton JH. Cattle mortality attributed to the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in an outback region of North Queensland. *Environ Toxicol* 1999; 14: 179-182.

- Sano T, Kikuchi S, Kubo T, Takagi H, Hosoya K, Kaya K. New values of molecular extinction coefficient and specific rotation for cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Toxicon* 2008; 51: 717-719.
- Senogles P, Shaw G, Smith M, Norris R, Chiswell R, Mueller J, Sadler R, Eaglesham G. Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination. *Toxicon* 2000; 38: 1203-1213.
- Senogles-Derham PJ, Seawright A, Shaw G, Wickramasingh W, Shahin M. Toxicological aspects of treatment to remove cyanobacterial toxins from drinking water determined using the heterozygous P53 transgenic mouse model. *Toxicon* 2003; 41: 979-988.
- Stewart I, Seawright AA, Shaw GR. In: Hudnell KH, editor. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer, New York, 2008, pp. 613-637.
- Stirling DJ, Quilliam MA. First report of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in New Zealand. *Toxicon* 2001; 39: 1219-1222.
- Thomas O, Cerda V. In: Thomas O, Burgess C, editors. *UV-visible spectrophotometry of water and wastewater*. Elsevier, Oxford, 2007, pp. 21-46.
- Wiedner C, Rücker J, Fastner J, Chorus I, Nixdorf B. Seasonal dynamics of cylindrospermopsin and cyanobacteria in two German lakes. *Toxicon* 2008; 52: 677-686.
- Xagorarakis I, Harrington GW, Zulliger K, Zeier B, Krick W, Karner DA, Standridge JH, Westrick JA. Inactivation kinetics of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by free chlorine. *J Environ Eng-ASCE* 2006; 132: 818-823.

VU :

**Le Directeur de Thèse
(Michel CLEMENT)**

VU :

**Le Responsable de l'École Doctorale
(Yvan LAGADEUC)**

**VU pour autorisation de soutenance
Rennes, le**

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINÉAU

**VU après soutenance pour autorisation de publication :
Le Président de Jury
(...)**

RESUME

La présence de prolifération de cyanobactéries et des toxines associées dans les eaux de surface utilisées pour la production d'eau potable est une problématique de santé publique majeure car plusieurs cas d'intoxication ont été rapportés. Il s'avère donc nécessaire de comprendre le comportement des cyanotoxines au sein des filières de traitement d'eau et en particulier vis-à-vis de la chloration, procédé de désinfection le plus répandu en France. Les travaux réalisés au cours de cette thèse portent sur la chloration de la cyanotoxine la plus commune et d'une cyanotoxine émergente en Europe : la microcystine-LR et la cylindrospermopsine. La réaction du chlore avec les toxines a été caractérisée et divers sous-produits ont été identifiés grâce à la spectrophotométrie ultraviolet et la spectrométrie de masse à haute résolution. Des tests réalisés sur la bactérie *Vibrio fischeri* et sur des cellules Caco-2 ont ensuite permis de vérifier l'impact de la chloration sur la toxicité du milieu.

SUMMARY

With climate change and anthropic pressure, the occurrence of cyanobacteria blooms and the related toxins in surface water used to produce drinking water is a growing public health concern since various intoxications have been reported worldwide. In order to protect consumers' health, cyanotoxins behaviour towards classical processes like disinfection by chlorine should be examined. The present study investigated chlorination of a common cyanotoxin and an emerging one: microcystin-LR and cylindrospermopsin. The reaction between chlorine and toxins was characterized and various by-products were identified through ultraviolet spectrophotometry and high resolution mass spectrometry. Then tests performed on bacteria *Vibrio fischeri* and on Caco-2 cells allowed to assess the effect of chlorination on mixture toxicity.