

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Données relatives à la toxicité aiguë et chronique de la bêta-méthylamino- L-alanine (BMAA)

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

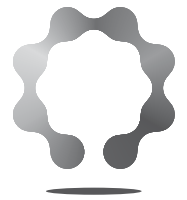
Mai 2017

Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Données relatives à la toxicité aiguë et chronique de la bêta-méthylamino- L-alanine (BMAA)

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Mai 2017

Édition scientifique

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 19 mai 2017

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à la toxicité aiguë et chronique de la BMAA **(bêta-méthylamino-L-alanine)**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L. 1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 11 janvier 2016 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) et la Direction générale de la santé (DGS) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à la toxicité aiguë et chronique de la BMAA (bêta-méthylamino-L-alanine).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La bêta-méthylamino-L-alanine (BMAA) est un acide aminé non protéinogène. Cette neurotoxine est suspectée d'être associée à des maladies neurodégénératives. Au sein de la population autochtone de l'île de Guam (dans l'Océan Pacifique), des cas suspects de syndrome « sclérose latérale amyotrophique/Parkinson/démence » (complexe ALS/PDC selon l'acronyme anglais) observés dans les années 1950 pourraient être imputables à une bioamplification de la BMAA dans la chaîne alimentaire à partir de graines et de fruits d'un arbre local (le cycas), contaminés par des cyanobactéries de son système racinaire. La consommation traditionnelle, par cette population autochtone, de chauves-souris se nourrissant des graines des cycas a été proposée comme principal vecteur d'exposition (Cox et al., 2002, 2003).

En France, de récents travaux menés par l'Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) ont mis en évidence la présence de BMAA dans des mollusques bivalves (moules, huîtres) collectés dans plusieurs zones conchylicoles en 2013 (Réveillon, 2015). Ces travaux complétaient une première étude qui ne s'était intéressée qu'aux coquillages de l'étang de Thau (Réveillon et al., 2014).

Par ailleurs, des zones de sur-incidence de cas de sclérose latérale amyotrophique (SLA) ont été rapportées dans certaines régions françaises, dont une dans laquelle les coquillages marins sont exploités et consommés (Masseret et al., 2013). La question de l'implication éventuelle de coquillages contaminés par la BMAA dans la survenue de maladies neurodégénératives peut se poser.

Depuis, une vaste étude financée par l'Agence Nationale de la Recherche a été conduite entre 2012 et 2016 afin d'investiguer le lien possible en France entre la SLA et l'exposition à la BMAA (projet ANR BMAALS). Les conclusions de cette étude ont été présentées en février 2016 lors de la réunion de clôture.

Dans ce contexte, l'Anses a été saisie le 11 janvier 2016 par la DGAI et la DGS afin de répondre aux questions suivantes :

- 1) Quel est le degré de robustesse du lien épidémiologique suggéré entre l'exposition chronique à la BMAA et des maladies neurodégénératives de type « SLA/Parkinson/démence », à travers une revue bibliographique, qui pourra intégrer, entre autres, les éléments liés à l'île de Guam ?
- 2) Quelles sont les données toxicologiques disponibles sur la BMAA ?
- 3) Au vu des données toxicologiques, compte tenu des niveaux observés par l'Ifremer dans certains coquillages, peut-il exister une préoccupation sanitaire liée à la BMAA en lien avec l'ingestion de produits aquatiques (à relier sans doute à des scénarii réalistes de consommation de coquillages) ?
- 4) L'Agence peut-elle déterminer, en complément des réponses aux questions précédentes, des pistes de recherches et des études à engager prioritairement ?

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA). L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail, le GT « BMAA », constitué par décision du 2 juin 2016 suite à un appel à candidatures public.

Les travaux du groupe de travail ont été présentés au CES ERCA tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques lors des réunions plénières du 23 juin 2016, 15 décembre 2016, 15 février 2017 et 12 avril 2017. L'ensemble des travaux a été adopté par le CES ERCA en réunion plénière du 12 avril 2017. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES ERCA, en particulier par deux experts nommés relecteurs. Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

Afin de réaliser une recherche bibliographique la plus exhaustive possible concernant les articles traitant i) des méthodes analytiques pour la détection et la quantification et ii) de l'occurrence (mesure de la concentration) de la BMAA et de ses isomères dans les produits aquatiques (marins ou d'eau douce) pouvant être consommés par l'Homme, le GT « BMAA » a décidé de suivre la méthodologie d'une revue systématique. Pour les données de toxicité (humaine, animale et mécanistique), le GT « BMAA » a réalisé une analyse approfondie de la littérature.

3. ANALYSE DU GT « BMAA » ET DU CES ERCA

Le Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA) a adopté le rapport d'expertise collective réalisé par le groupe de travail « BMAA » dont une synthèse est présentée ci-après.

3.1. Analyse physico-chimique de la BMAA et de ses isomères

La BMAA est un acide aminé non protéinogène. Trois isomères de cette molécule ont été décrits à ce jour : l'acide 2,4-diaminobutyrique (DAB), la *N*-(2-aminoéthyl)glycine (AEG) et la β -amino-*N*-méthylalanine (BAMA) (figure 1).

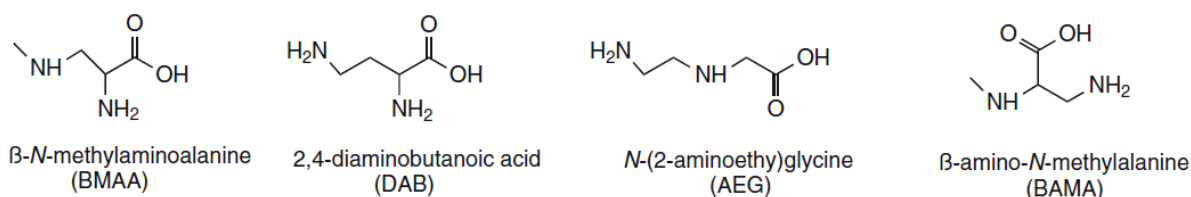


Figure 1 : Structure de la BMAA et ses isomères, le DAB, l'AEG et la BAMA (Jiang et al., 2012).

La BMAA a été mise en évidence pour la première fois en 1967 dans des graines de cycas (Vega et Bell, 1967). A partir de 2003, des travaux de l'équipe de Cox rapportent la production généralisée de BMAA par les cyanobactéries (Cox et al., 2003, 2005). Néanmoins, avec le développement de nouvelles méthodes analytiques, des résultats plus contrastés sur la présence et les concentrations de BMAA apparaissent et sont le sujet d'une forte controverse dans la littérature scientifique (Krüger et al., 2010 ; Banack et al., 2011 ; Faassen, 2014). En particulier, de récents travaux de l'Ifremer rapportent l'absence de production de BMAA en conditions expérimentales par des souches de cyanobactéries pourtant rapportées comme étant productrices (Réveillon et al., 2015).

La question de la fiabilité de la méthode analytique a été identifiée comme une question centrale par le GT « BMAA ». Il a donc été décidé de réaliser un inventaire de l'ensemble des méthodes d'analyse utilisées dans les études d'occurrence et de toxicité citées dans la littérature puis de classer ces méthodes selon le degré de confiance que l'on peut avoir dans les résultats, du point de vue qualitatif (présence) et quantitatif (concentration).

Pour les aspects qualitatifs, les critères retenus ont été :

- La mention du temps de rétention permettant d'attester la séparation de la BMAA et de ses isomères ;
- La mention de la limite de détection ;
- Le suivi en LC-MS/MS des transitions spécifiques de la BMAA et de ses isomères afin de les différencier les unes des autres. Le ratio d'ions est un élément optionnel mais qui permet de conforter l'identification des toxines.

Pour les aspects quantitatifs, les critères retenus ont été :

- En premier lieu, le fait que les critères qualitatifs soient bien respectés ;
- La mention de la limite de quantification dans la matrice ;
- Le calcul du taux de récupération lors de l'extraction avec son écart-type associé ;
- D'autres critères quantitatifs optionnels confortant la confiance dans la démarche analytique tels que l'utilisation d'un étalon interne marqué, la présence d'informations concernant le domaine de linéarité, la fidélité, etc.

Sur la base de l'ensemble de ces critères, un code a été attribué à chacune des publications expertisées :

- Critères qualitatifs et quantitatifs non satisfaisants (NS : non satisfaisant)
- Critères qualitatifs satisfaisants et quantitatifs non satisfaisants (MS : moyennement satisfaisant)
- Critères qualitatifs et quantitatifs satisfaisants (TS : totalement satisfaisant)

Au terme de ce classement, 48% des publications ont été évaluées comme NS, 27% comme MS et 25% comme TS.

Il convient de mentionner que la BMAA peut être présente dans les matrices sous une forme libre ou liée à des protéines. Les protocoles d'extraction varient donc en fonction de la stratégie analytique choisie. La teneur en BMAA totale (libre et liée) peut être déterminée en hydrolysant directement la matrice à analyser. La figure 2 présente les grandes étapes de l'analyse de la BMAA et de ses isomères.

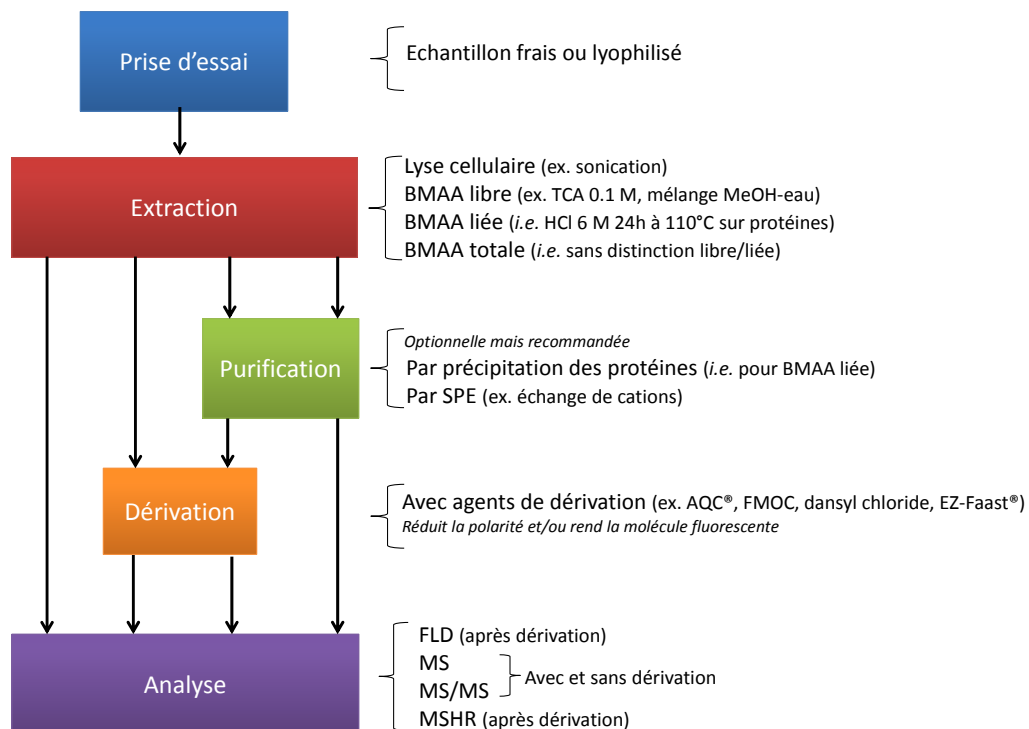


Figure 2 : Schéma global de l'analyse de la BMAA et de ses isomères (d'après Réveillon, 2015, mémoire de thèse). TCA : acide trichloroacétique ; FMOc : 9-fluorenylmethylchloroformate ; SPE : extraction sur phase solide, MSHR : spectrométrie de masse haute résolution.

3.2. Définition de la sclérose latérale amyotrophique (SLA)

Le GT « BMAA » a fait le choix de ne retenir que la SLA dans son analyse car elle est le dénominateur commun à toutes les maladies neurodégénératives suspectées d'être associées à une exposition à la BMAA.

La SLA se définit par l'atteinte à la fois des neurones moteurs centraux (corps cellulaires situés dans le cortex) et des neurones moteurs périphériques (corps cellulaires dans le bulbe rachidien ou la corne antérieure de la moelle épinière). La mort progressive des neurones moteurs, qui innervent les fibres musculaires striées, aboutit à une absence de contraction des muscles, en

périphérie. La maladie peut revêtir deux formes distinctes à son début (i) une forme bulbaire affectant les motoneurones du tronc cérébral, les symptômes sont alors une difficulté à articuler ou déglutir ou (ii) une forme spinale, les neurones moteurs périphériques sont atteints, ce qui se caractérise par une difficulté à mouvoir un membre (Inserm, 2015). Les patients conservent leurs capacités mentales intactes, mais perdent l'usage des muscles à commande volontaire et l'issue est fatale après 3 à 5 ans d'évolution, par atteinte des muscles respiratoires ou liés à la déglutition. La SLA n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. Il n'y a, à ce jour, aucun marqueur biologique spécifique de la maladie. Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments et l'élimination des diagnostics différentiels (myosite à inclusion, neuropathie motrice à blocs de conduction, myélopathie cervicarthrosique, ...) (www.has.fr.)

La SLA est rare avant l'âge de 40 ans et augmente de façon exponentielle avec l'âge par la suite. L'âge moyen d'apparition est de 58-63 ans pour la SLA sporadique et 40-60 ans pour la SLA familiale, avec un pic d'incidence dans la tranche d'âge de 60-69 ans dans les formes sporadiques ; 20 % des formes sont de présentation bulbaire. Les hommes ont un risque de SLA plus élevé que les femmes, avec un ratio homme/femme de 1,2-1,5. L'évolution de la maladie n'est pas linéaire mais curviligne, avec une aggravation en début et fin de maladie. La survie moyenne est de 3 ans. De 5 à 10 % des formes sont familiales avec une résolution génétique pour 70% d'entre elles (35% de formes liées à des mutations du gène C9). L'incidence moyenne standardisée de la SLA au niveau mondial est de 1,68 (1,50 à 1,85) / 100 000. Il existe toutefois une hétérogénéité dans les incidences standardisées de l'Europe du Nord [1,89 (1,46 à 2,32) / 100 000] et l'Asie de l'Est [0,83 (0,42 à 1,24) / 100 000] ou l'Asie du Sud [0,73 (de 0,58 à 0,89)/100 000]. Des taux homogènes ont été signalés dans les populations d'Europe, d'Amérique du Nord et la Nouvelle Zélande [incidence standardisée de 1,81 (1,66 à 1,97) / 100 000].

L'une des hypothèses de travail relatives à la physiopathologie de la SLA est une libération excessive de glutamate au sein des réseaux glutamatergiques, au caractère excitotoxique. Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majeur du système nerveux central, et joue un rôle crucial dans les fonctions cognitives, la plasticité synaptique, la croissance neuronale. Cette surstimulation de neurones post-synaptiques aboutit classiquement à la mort neuronale.

Le rapport du GT « BMAA » détaille les critères de la maladie, les aspects anatomopathologiques, les mécanismes physiopathologiques, les facteurs génétiques, l'incidence et la prévalence de la maladie, les facteurs de risques associés, la cohorte de l'île de Guam, les études épidémiologiques explorant le lien entre la SLA et la BMAA, l'étude BMAALS (financée par l'ANR).

3.3. Données toxicologiques

3.3.1 Données de toxicocinétique et de toxicodynamique

La biodisponibilité orale de la BMAA a été étudiée chez deux espèces animales, le rat (Duncan et al., 1991^{NS}) et le singe (Duncan et al., 1992^{NS}). Bien que réalisées avec des méthodes analytiques classées non satisfaisantes, les données suggèrent une absorption importante et rapide.

Dans le cadre de cette expertise, les données d'une étude de cinétique réalisée par le National Toxicology Program (NTP) ont été transmises à l'Anses sous la forme d'un poster présenté à un congrès scientifique. Ces travaux n'ont pas été valorisés sous forme de publication soumise à comité de lecture. Les résultats, basés sur l'administration orale de BMAA radiomarquée (¹⁴C-BMAA), confirment la forte biodisponibilité orale de la BMAA chez le rat (Garner et al., 2013^{TS}).

Le passage de la barrière hématoencéphalique a été montré chez le rat nouveau-né après administration sous-cutanée de BMAA et chez la souris nouveau-né exposée par le lait de mères ayant reçu de la BMAA par voie intraveineuse (Andersson et al., 2013^{MS} ; Karlsson et al., 2015^{MS}).

La présence de BMAA dans les tissus (dont le cerveau) a été étudiée chez des rats adultes après administration orale, intraveineuse ou sous-cutanée mais selon des méthodes analytiques jugées

non fiables du point de vue quantitatif (Duncan et al., 1991^{NS} ; Andersson et al., 2013^{MS} ; Karlsson et al., 2015^{MS}). Dans l'étude de Garner et al. (2013^{TS}) avec de la ¹⁴C-BMAA administrée par voie orale, en administration unique, la radioactivité a été retrouvée au niveau du foie, du tissu adipeux, des muscles et de la peau. Moins de 0,01% de la dose a été retrouvée dans le cerveau. Après administration unique ou répétée, 50 à 60% de la radioactivité serait présente sous forme liée aux protéines dans les tissus.

Concernant le métabolisme de la BMAA, les données sont très lacunaires et n'ont pas permis d'identifier les produits de dégradation ni leur proportion relative au composé parent.

L'élimination urinaire de BMAA serait faible (Duncan et al., 1992^{NS} ; Andersson et al., 2013^{MS} ; Garner et al., 2013^{TS}).

Une excrétion importante par le lait de femelles allaitantes est rapportée chez la souris avec de la ¹⁴C-BMAA (Andersson et al., 2013^{MS}).

3.3.2 Données de toxicité chez l'animal de laboratoire

Par voie orale, cinq études ont été identifiées et analysées par le GT « BMAA », deux chez la souris et trois chez le singe.

- Chez la souris adulte CD-1, les 2 études ne montrent aucune anomalie comportementale, ni aucun symptôme caractéristique d'une pathologie neurodégénérative de type SLA. Dans l'une des études (Perry et al., 1989^{NS}), des souris femelles ont été exposées par gavage pendant 11 semaines à de très fortes doses de BMAA (500 à 1000 mg/kg p.c./j), dans l'autre (Cruz-Agado et al., 2006), des souris mâles ont été exposées par voie alimentaire à une dose de BMAA de 28 mg/kg p.c./j pendant un mois.
- Chez le singe cynomolgus (macaque) adulte mâle, différentes doses de BMAA (de 100 à 350 mg/kg p.c./j) ont été administrées dans le cadre d'un protocole complexe et avec des durées d'exposition allant jusqu'à 12 semaines mais de manière séquentielle. Selon les cas, certains animaux ont développé des faiblesses musculaires, des dysfonctionnements des neurones cortico-moteurs à caractère parkinsonien ainsi que des anomalies du comportement avec des changements dégénératifs au niveau du cortex cérébral et de la moelle épinière. Ces déficits moteurs ont pu être atténués par l'administration de L-DOPA, précurseur de la dopamine (Spencer, 1987 ; Spencer et al., 1987).
- Chez de jeunes singes vervets nourris 140 jours avec de la BMAA (210 ou 21 mg/kg p.c./j) administrée dans de la banane, il a été observé le développement d'une maladie neurofibrillaire avec des dépôts neuroamyloïdes et de la protéine Tau hyperphosphorylée dans le cerveau. L'administration conjointe par voie orale de sérine (210 mg/kg/j) diminue de manière significative la densité des enchevêtrements neurofibrillaires. Les vervets sont moins sensibles que les macaques à développer le tableau clinique (Cox et al., 2016^{MS}).

Par voie intrapéritonéale, trois études ont été identifiées et analysées par le GT « BMAA », une chez la souris et deux chez le rat.

- Chez la souris adulte NIH Suisse outbred, 5 doses de BMAA ont été testées par administration unique (30, 300, 1000, 2000, 3000 mg/kg p.c. et un groupe témoin) à des groupes de mâles et de femelles avec une période d'observation de 14 jours. De manière qualitative (sans analyse statistique de l'ensemble de la dose-réponse), les auteurs ont défini une DL₅₀ de 3000 mg/kg p.c. sur la base des symptômes suivants ayant conduit à l'euthanasie des animaux : myoclonie¹, convulsions, miction/défécation incontrôlées dans les 20 min post-injection. La dose minimale avec effet (LOAEL aiguë) est de 2000 mg/kg p.c. (1/6 femelle moribonde). L'examen histologique sur 6 organes (cerveau, foie, poumon, cœur,

¹ Myoclonie : contractions musculaires rapides involontaires

rate, rein) d'un seul animal par groupe n'a montré aucune lésion (Al Sammak et al., 2015^{NS}). La BMAA a été détectée dans le cerveau et le foie de souris traitées et pas dans ceux des témoins, mais selon une méthode jugée non fiable par le GT « BMAA ».

- Chez le rat Wistar adulte, des signes de neurotoxicité aiguë (mouvements circulaires, balancements puis dans un second temps ataxie) ont été observés quelques heures après l'administration unique ou répétée jusqu'à 21 jours de BMAA sous forme L-BMAA (à des doses entre 500 et 2000 mg/kg p.c.) ou en mélange racémique de D- et L-BMAA (jusqu'à 4000 mg/kg p.c.) à des mâles et des femelles. Des altérations histologiques sont rapportées uniquement au niveau du cervelet, de type excitotoxique (Seawright et al., 1990).
- Dans une autre étude, de jeunes rats mâles Wistar ont reçu une dose de 300 mg/kg p.c. de BMAA pendant 5 jours consécutifs. Des tests comportementaux ont été pratiqués toutes les semaines pendant 14 mois. Des examens biologiques et histologiques ont également été réalisés sur le cerveau. Il a été observé une perte du volume musculaire unilatérale (gauche) jusqu'à 17%, devenant bilatérale après 8 mois. Au niveau du cerveau, le volume du cortex cérébral a également été diminué de manière bilatérale de 10 à 18%. Il a aussi été observé un élargissement des ventricules latéraux. Les analyses neurochimiques ont montré une élévation du glutamate et de la taurine ainsi qu'une baisse de l'acide γ-aminobutyrique (GABA) au niveau du cortex moteur. Les auteurs estiment que le rat se révèle être un bon modèle reproduisant les symptômes observés lors de la SLA (de Munck et al., 2015 ; Munoz-Saez et al., 2015).

Par voie sous-cutanée, trois études ont été identifiées et analysées par le GT « BMAA », toutes chez le rat nouveau-né ou très jeune.

- Dawson et al. (1998) ont étudié trois groupes de rats nouveau-nés Sprague Dawley mâles et femelles. Le groupe A a reçu une dose de 500 mg/kg p.c. au 5^{ème} jour post-natal, le groupe B une dose de 500 mg/kg p.c. au 2^{ème} et au 5^{ème} jour post-natal et le groupe C une dose de 100 mg/kg p.c. au 2^{ème} et au 5^{ème} jour post-natal. Des tests psychomoteurs ont été pratiqués entre le 6^{ème} et le 84^{ème} jour post-natal ainsi que des dosages hormonaux et neurochimiques. Les tests usuels comportementaux n'ont montré que de faibles variations en limite de significativité. Aucun dysfonctionnement des fonctions motrices n'a été observé à l'exception des membres postérieurs écartés et d'une activité locomotrice augmentée. Au niveau du poids des organes, seul celui des ovaires était plus élevé (groupes A et B) et celui du cervelet diminué (groupes A mâle et B femelle). Au niveau hormonal, la TSH était plus élevée (groupe A mâle), ainsi que l'IGF1 (groupe B mâle) et la T4 libre diminuée (groupe B femelle). Concernant l'aspect neurochimique, les seuls changements observés étaient au niveau de la moelle épinière, l'aspartate et le glutamate étant augmentés (groupe C femelle) au niveau du cervelet, l'aspartate étant diminué (groupe A mâle) au niveau de l'hippocampe, la sérotonine augmentée (groupes A et B femelle, groupes A, B, C mâle) et diminuée (groupe C femelle).
- Karlsson et al. (2009a^{MS}, b^{MS}) ont administré de la BMAA à la dose de 200 ou 600 mg/kg p.c./j à des rats Wistar mâles au 9^{ème} et 10^{ème} jour post-natal. A la forte dose, les rats ont manifesté de sévères troubles neurologiques moteurs. Après sevrage, des tests comportementaux ont été pratiqués entre le 13^{ème} et le 27^{ème} jour post-natal. Les résultats ont montré une hyperactivité avec une difficulté à la locomotion et une perte du réflexe de redressement sans grand effet sur la performance musculaire. Les fonctions cognitives semblaient être altérées. Dans les tests pratiqués en semaine 1 à 22 d'âge post-natal (afin d'évaluer les effets à long terme chez l'animal adulte), l'apprentissage spatial mais pas de la mémoire spatiale à long terme testée 2 semaines après la phase d'acquisition étaient perturbés sans lien avec les altérations des capacités motrices.
- La même équipe (Karlsson et al., 2011^{MS}) a complété son protocole d'étude par un volet comportemental chez des animaux exposés à des doses moindres de 50 et 200 mg/kg p.c. au 9^{ème} et 10^{ème} jour post-natal (ainsi qu'à la dose forte de 600 mg/kg p.c.). Des observations

ont été faites périodiquement chez les animaux âgés de 13 à 26 semaines. Les deux plus faibles doses testées ont entraîné une altération de la mémoire spatiale mais pas d'altération des autres types de mémoire, aucune anomalie histologique y compris au niveau de l'hippocampe n'a été mise en évidence. A la forte dose, des pertes neuronales ont été observées au niveau du cortex cingulaire et de l'hippocampe. Les auteurs estiment que ces changements observés chez le rat ne coïncident pas avec les observations *post-mortem* sur des tissus de patients décédés de la SLA.

En conclusion, les points suivants peuvent être dégagés d'un point de vue toxicologique :

- Il est difficile de faire le bilan des données issues des études disponibles dans la littérature : les concentrations en BMAA testées sont très élevées, beaucoup ont utilisé une voie d'administration non orale, le nombre d'animaux par groupe est faible, la période d'administration ciblée sur la période de grande sensibilité de développement du cerveau ne reflète pas la réalité d'exposition du consommateur.
- La neurotoxicité de la BMAA est démontrée chez le rat et chez le singe mais les données toxicologiques actuellement disponibles ne permettent pas d'identifier une dose sans effet applicable à l'Homme.
- Il semble exister une grande différence de sensibilité entre espèces, la souris adulte paraissant résistante à la neurotoxicité induite par la BMAA même pour des doses très élevées. L'origine de cette particularité mériterait d'être élucidée.

3.3.3 Données mécanistiques

Excitotoxicité et dépendance au bicarbonate

La neurotoxicité de la BMAA a également été observée *in vitro* sur des cellules issues de rongeurs, de sangsue, et des lignées humaines. Son caractère excitotoxique, c'est-à-dire le processus de mort cellulaire se produisant suite à l'activation d'acides aminés excitateurs (glutamate) est le mécanisme le plus souvent proposé (Chiu et al., 2013). L'interaction de la BMAA avec le bicarbonate est susceptible de conduire à une molécule « ressemblant » au glutamate, et jouant le rôle d'agoniste des récepteurs glutamatergiques, en particulier les récepteurs ionotropiques de type NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) (Weiss et al., 1989). Ces études ont mis en évidence le rôle central des ions bicarbonates dans le mécanisme d'action de la BMAA.

Des injections intracrâniennes (striatum) de BMAA à des souris ont montré que la toxine induit la mort de neurones hippocampiques *in situ*. Ces résultats ont été confirmés *in vitro*, car la BMAA exerce un effet cytotoxique dose-dépendant (50 μ M à 1 mM) sur une lignée cellulaire spinale proche des motoneurons (Buenz & Howe, 2007). D'autres résultats *in vitro* ont montré que la BMAA à des concentrations plus faibles (10 μ M) potentialise la mort neuronale induite par d'autres molécules neurotoxiques (NMDA, kaïnate, amyloïde- β , MPP+). Cette observation suggère que la BMAA est susceptible d'agir à faibles concentrations comme co-acteur d'un phénomène neurodégénératif impliquant d'autres molécules. Cette neurotoxicité implique les récepteurs glutamatergiques ionotropiques (NMDA) et métabotropiques (mGluR5), ce qui suggère que la BMAA est excitotoxique via différentes cibles moléculaires (Lobner et al., 2007).

Hyperphosphorylation de Tau²

Différentes études ont montré que la BMAA joue un rôle sur le niveau de phosphorylation de la protéine Tau, soit en inhibant l'activité de sa principale phosphatase, PP2A, soit en augmentant l'activité de la kinase GSK3 β . Ainsi, la BMAA agit comme un agoniste de certains récepteurs métabotropiques du glutamate comme mGluR5 (Liu et al., 2009 ; Arif et al., 2014).

² Tau (Tubulin-Associated Unit) est une protéine neuronale associée aux microtubules qui a été identifiée comme étant le composant majeur des paires de filaments en hélice (Paired Helical Filaments, PHF) qui constituent les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), supposées à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Les protéines Tau de la DNF sont agrégées et anormalement phosphorylées.

Surexpression de TDP-43³

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que la BMAA entraîne une surexpression de TDP-43 ainsi que la formation d'agrégats de cette protéine (de Munck et al., 2013 ; Munoz-Saez et al., 2013, 2015 ; Karlsson et al., 2015 ; Yin et al., 2014).

Incorporation protéique

Un mécanisme par lequel la BMAA exercerait ses effets neurotoxiques est sa capacité à être incorporée dans les protéines au cours de la synthèse protéique (Glover et al., 2014 ; Karlsson et al., 2014). Cette incorporation aurait lieu uniquement à la place des résidus alanine et sérine (Glover et al., 2014 ; Dunlop et al., 2013).

Ce phénomène d'incorporation protéique de la BMAA entraînerait ainsi des défauts de structure de ces protéines (« misfolding ») et donc une accumulation de protéines au niveau lysosomal (Dunlop et al., 2013). Cette anomalie de synthèse protéique associée à une entrée massive de Ca²⁺ conduit également à des phénomènes de stress au niveau du réticulum endoplasmique, à des dérégulations des systèmes de réduction/oxydation (« redox »), ainsi qu'à une activation de certaines caspases pro-apoptotiques comme la caspase-12 et donc à la mort cellulaire (Perry et al., 1989 ; Buenz & Howe, 2007 ; Lobner et al., 2007 ; Santucci et al., 2009 ; Liu et al., 2010 ; Karlsson et al., 2012 ; Chiu et al., 2013 ; de Munck et al., 2013 ; Karlsson et al., 2013 ; Okle et al., 2013).

Il serait intéressant de connaître la nature des protéines dans lesquelles la BMAA pourrait s'incorporer et d'étudier le rôle de ce « misfolding » dans la physiopathologie de la SLA.

Interaction avec la neuromélanine

La voie de synthèse de la neuromélanine est commune avec celle des catécholamines dont la dopamine, un neurotransmetteur essentiel dans le contrôle du striatum. Une accumulation de neuromélanine modifiée par la BMAA pourrait perturber le fonctionnement des neurones à dopamine (Krone et al., 2016). La BMAA pourrait induire une accumulation de produits intermédiaires du catabolisme des catécholamines impliqués dans des processus d'oxydation regroupant un dysfonctionnement mitochondrial, une accumulation de radicaux libres, une peroxydation lipidique, une agrégation protéique et une activation microgliale, conduisant à un vieillissement neuronal précoce commun à de nombreuses pathologies neurodégénératives (McManus et al., 2011 ; Heitz et al., 2012 ; Lastres-Becker et al., 2012 ; Dariani et al., 2013 ; An et al., 2014 ; Eleuteri et al., 2015 ; Tan et al., 2015). Enfin, en interagissant avec ce pigment mais sans y être incorporée, la BMAA pourrait être stockée de nombreuses années avec la possibilité d'un relargage tout au cours de la vie, pouvant conduire à des atteintes chroniques au niveau cérébral notamment un état inflammatoire permanent et une gliose réactionnelle contribuant au développement de pathologies neurodégénératives (Krone et al., 2016).

Il a été montré que la BMAA avait la capacité de se lier à la mélanine dans divers tissus dont le système nerveux central et de s'accumuler dans les cellules riches en ce pigment (Karlsson et al., 2009c). L'accumulation de BMAA dans des structures cérébrales précises pourrait induire une neurotoxicité ciblée, uniquement dans les neurones riches en neuromélanine et les tissus proches lors d'un relargage de la BMAA. Ce phénomène aurait lieu sur de nombreuses années. Cette hypothèse pourrait expliquer (i) la difficulté de corrélation entre les taux plasmatiques et cérébraux de BMAA, de nombreuses études ayant été faites sur des zones cérébrales largement dépourvues en neuromélanine, (ii) la neurotoxicité originale de la BMAA – telle que décrite dans le syndrome de l'île de Guam – regroupant un syndrome parkinsonien, une SLA, la maladie d'Alzheimer et une

³ TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43, protéine de liaison d'ADN de réponse transactionnelle de 43 kDa) est une protéine localisée dans le noyau cellulaire dans la plupart des tissus qui se lie à l'ADN et participe à la régulation de la transcription. Cette protéine peut également se lier à l'ARN pour assurer sa stabilité. En coupant et en réarrangeant les ARNm par épissage alternatif, TDP-43 contrôle la production de différentes versions de certaines protéines. Au moins 60 mutations dans le gène TARDBP ont été trouvées chez des patients atteints de SLA.

rétinopathie pigmentaire rare, (iii) l'impact à très long terme de la BMAA sur les populations exposées.

Dans le cadre de cette hypothèse, il pourrait donc être intéressant (i) de se focaliser sur les structures riches en mélanine et neuromélanine pour les dosages de BMAA dans le système nerveux central incluant le *locus caeruleus*, la substance noire et le tissu rétinien, (ii) d'utiliser préférentiellement lors d'expérimentation animales, des espèces riches en neuromélanine (Marsden, 1961) et d'éviter le modèle murin, quasi dépourvu de cette substance au niveau cérébral (Barden & Levine, 1983). Ces différences inter-espèces importantes dans leur expression régionale de neuromélanine pourraient ainsi apporter un début d'explication à des études contradictoires pour l'effet de la BMAA sur le cerveau lorsqu'elles comparent modèle souris (pauvre en neuromélanine) et modèle simien (riche en neuromélanine), (iii) de suivre les fonctions rétiniennes des personnes ou animaux exposées à la BMAA.

3.3.4 Génotoxicité

Un test d'Ames réalisé sur 5 souches de *Salmonella* Typhimurium (TA97a, TA98, TA100, TA102 et TA1535) avec 5 concentrations comprises entre 11 et 900 µg de BMAA/boîte, avec et sans activation métabolique, n'a montré aucune élévation significative du nombre de révertants. Un autre test (SOS/umuC assay) a été réalisé avec 6 concentrations comprises entre 0,32 et 1000 µg de BMAA/ml sur la souche de *Salmonella* Typhimurium TA1535/pSK1002, avec et sans activation métabolique, donnant également un résultat négatif (Novak et al., 2016).

3.4. Evaluation du poids des preuves du lien entre l'exposition chronique à la BMAA et la SLA

Dans son avis du 25 juillet 2016, basé sur les recommandations du Groupe de Travail « Méthodologie de l'Évaluation des Risques » (GT MER), l'Anses définit le concept du poids des preuves comme étant « une synthèse formalisée de lignes de preuves, éventuellement de qualités hétérogènes, dans le but de déterminer le niveau de plausibilité d'hypothèses ». La ligne de preuves est « un ensemble d'informations de même nature, intégrées pour évaluer une hypothèse ». L'intégration des lignes de preuves permettrait alors d'exprimer le poids des preuves. Cette intégration peut se faire selon une méthode qualitative ou quantitative.

Le GT « BMAA » a choisi de suivre une méthode qualitative sans notation en prenant soin de détailler autant que possible les critères utilisés. Les critères retenus pour cette analyse ont été ceux de Hill (1965) car ce sont les plus largement reconnus et utilisés dans le domaine épidémiologique. Les neuf critères constituant un argumentaire en faveur de l'inférence causale de la relation étudiée sont : la temporalité, la force de l'association, la reproductibilité des résultats, la relation dose-réponse, les preuves expérimentales du type de parallélisme de la cause et de l'effet (notamment l'effet de la suppression de l'exposition), la spécificité, la plausibilité mécanistique, la cohérence biologique, l'analogie.

La temporalité : ce critère est difficile à renseigner considérant les éléments suivants :

- Le délai entre l'exposition à la BMAA et l'apparition de symptômes neurotoxiques chez l'être humain pourrait être long (analogie avec les maladies à prions, le neuroleptylisme) ;
- Il n'existe évidemment pas de modèle humain et il n'y a pas d'études de cas ;
- Les seules données disponibles chez l'animal de laboratoire sont issues d'un modèle aigu ou subaigu (administration sur une période courte).

La force de l'association entre le facteur de risque environnemental et l'apparition de SLA : même dans l'exemple historique de l'île de Guam et sa population chamorro où l'incidence de SLA était 50 à 100 fois supérieure au niveau moyen mondial dans les années 1950, l'association avec l'exposition à la BMAA ne peut pas être estimée car les analyses réalisées dans des graines de cycas, des chauves-souris et des cerveaux humains ont suivi une

méthodologie jugée non satisfaisante par le GT, en termes de détection (confirmation de présence) et de quantification (concentration)⁴.

La reproductibilité des résultats de l'association : des cas de SLA potentiellement associés à la BMAA ont été rapportés dans plusieurs régions du monde (Guam, Japon, Indonésie), mais le lien avec une exposition à la BMAA pourrait être dû à des facteurs de confusion (tels que les facteurs génétiques ou d'autres facteurs environnementaux).

La relation dose-effet chez l'Homme : ni les données épidémiologiques des cas historiques de l'île de Guam ni les données expérimentales chez l'animal de laboratoire ne permettent d'étayer ce critère.

L'effet de la suppression de l'exposition : les exemples historiques (Guam, Japon, Indonésie) montrent qu'une modification dans les habitudes de vie (en particulier le régime alimentaire) a diminué l'incidence de la SLA à un niveau comparable au niveau moyen mondial pour les générations suivantes. Il n'est toutefois pas certain que cette modification soit associée à une diminution ou à la suppression de l'exposition à la BMAA.

La spécificité de l'effet : pas de spécificité de l'effet, la BMAA n'est pas le seul facteur potentiel qui expliquerait l'apparition de la SLA, qui est une maladie multifactorielle.

Analogie : d'autres toxines proches de la BMAA (par exemple la β -N-oxalylamino-L-alanine, désignée par les 2 acronymes BOAA et β -ODAP) sont connues comme responsables de pathologies neurologiques des voies motrices, comme le neurolathyrisme.

Plausibilité et cohérence biologique : du point de vue mécanistique, les données expérimentales *in vivo* et *in vitro* confirment la neurotoxicité de la BMAA et suggèrent plusieurs mécanismes d'action possibles voire complémentaires (excitotoxicité, incorporation protéique, interaction avec la neuromélanine) et la présence de marqueurs de maladies neurodégénératives (hyperphosphorylation de la protéine Tau, forme agrégée de TDP-43).

Au-delà des critères de Hill, le GT « BMAA » constate que la SLA, bien que multifactorielle, a une composante génétique bien documentée qui permet l'exclusion de ces cas et donc l'identification d'un lien avec des facteurs environnementaux. La présence de cas groupés de SLA, notamment la présence de cas familiaux non génétiques, conforte l'hypothèse d'une exposition liée aux habitudes de vie (ex. habitudes alimentaires) et à l'environnement. Toutefois, il n'a pas été possible, jusqu'à ce jour, d'identifier un lien de causalité entre les cas groupés et l'exposition à la BMAA.

Au vu de ces critères, le GT « BMAA » conclut que le lien de causalité entre l'exposition à la BMAA et la survenue de SLA n'est pas démontré, en l'état actuel des connaissances.

De manière générale, dans le cas des maladies neurodégénératives, multifactorielles, établir un lien épidémiologique selon les critères de Hill s'avère difficile.

Néanmoins, l'hypothèse que l'exposition à la BMAA soit un facteur favorisant des phénomènes neurotoxiques est hautement probable, principalement par sa capacité à activer des mécanismes de neurodégénérescence.

⁴ Il est regrettable que ces analyses n'aient pas été réactualisées avec les nouvelles méthodologies retenues par le GT. Cela est également le cas pour l'étude de Pablo et al. (2009)^{NS} qui suggère la détection de BMAA dans des cerveaux de patients américains (hors Guam) atteints de SLA, sans corrélation avec l'environnement. De manière générale, il existe une controverse sur la présence de BMAA liée intracérébrale (à la fois chez l'Homme et l'animal).

3.5. Sources et occurrence de la BMAA

3.5.1 Organismes producteurs de la BMAA

Au sein des milieux aquatiques, il est considéré à ce jour que la présence de BMAA trouve son origine dans la prolifération de certaines espèces phytoplanctoniques ou phytobenthiques. Tandis que les cyanobactéries ont été d'abord considérées comme étant les principaux producteurs de BMAA en eau douce (Cox et al., 2005^{NS}), une étude plus récente a montré que peu d'espèces de cyanobactéries en produisent en conditions expérimentales (Réveillon et al., 2015^{TS}). En revanche, divers diatomées et dinoflagellés d'origine marine ou présents dans les milieux salins ont récemment été décrits comme producteurs de BMAA et de ses isomères (Jiang et al., 2014^{TS} ; Lage et al., 2014^{MS} ; Réveillon et al., 2015^{TS}).

3.5.2 Contamination des milieux aquatiques et d'autres milieux

Le rapport du GT « BMAA » présente des informations détaillées sur la contamination des ressources en eau, des animaux aquatiques (dulcicoles et marins), des plantes et des aérosols par la BMAA et ses isomères, le DAB, l'AEG et la BAMA.

Les informations relatives aux animaux aquatiques (dulcicoles et marins) susceptibles d'être consommés par l'Homme ont été renseignées dans une base de données, en rapportant les résultats d'analyse pour chaque échantillon et en prenant en compte uniquement ceux obtenus par des méthodes analytiques jugées satisfaisantes pour la détection et pour la quantification.

Le tableau 1 présente le nombre de résultats recueillis par catégorie d'aliment qui ont permis d'estimer l'exposition du consommateur à la BMAA totale selon divers scénarios.

Tableau 1 : Liste des espèces de produits de la mer ou d'eau douce et les catégories d'aliment auxquelles ils correspondent

Produit	Nombre de résultats	Nombre de résultats inférieurs à la limite de détection*	Catégorie d'aliment
Brème	2	2 ^a	Produits d'eau douce
Corégone	2	2 ^a	Produits d'eau douce
Crabe	2	1 ^a	Crustacés, mollusques et coquillages
Crevette	9	3 ^a	Crustacés, mollusques et coquillages
Ecrevisse	7	7 ^{a, b}	Produits d'eau douce
Hareng	3	2 ^a	Poissons de mer
Huître	35	0	Crustacés, mollusques et coquillages
Loup de mer	2	2 ^a	Poissons de mer
Morue	4	4 ^a	Poissons de mer
Moule	138	0	Crustacés, mollusques et coquillages
Omble chevalier	4	3 ^a	Produits d'eau douce
Perche	4	4 ^a	Produits d'eau douce
Pétoncle	3	0	Crustacés, mollusques et coquillages
Plie	3	0	Poissons de mer
Sandre	2	2 ^a	Produits d'eau douce
Saumon	6	6 ^{a, b}	Poissons de mer
TOTAL	226		

* la valeur de la limite de détection est variable selon les études

^a limite de détection = 0,10 mg/kg de poids frais ; ^b limite de détection = 0,01 mg/kg de poids frais.

3.6. Estimation de l'exposition alimentaire pour l'Homme

A partir des données de consommation individuelle pour la population générale (INCA2, Afssa, 2009) et pour les forts consommateurs de produits de la mer (CALIPSO, Afssa, 2006) ainsi que des données de contamination, l'exposition a été calculée selon l'équation suivante :

$$E_i = \sum_{k=1}^n \frac{C_{i,k} \times L_k}{PC_i}$$

Où :

- E_i est l'exposition journalière totale de l'individu i (μg par kg de poids corporel par jour),
- $C_{i,k}$ est la consommation moyenne journalière de l'aliment k par l'individu i (g par jour),
- L_k est la teneur pour le contaminant étudié estimée dans l'aliment k (mg par kg de poids frais),
- PC_i est le poids corporel de l'individu i (kg)
- et n est le nombre total d'aliments consommés par l'individu i .

Par ailleurs, deux types d'exposition ont été calculés :

- D'une part, **l'exposition chronique** : en prenant comme paramètre de contamination la concentration moyenne. L'exposition chronique correspond à la quantité de substance qu'un individu peut ingérer quotidiennement sur une longue période de sa vie, en relation avec un effet toxicologique se manifestant tardivement.
- D'autre part, **l'exposition aiguë** : en prenant comme paramètre de contamination le 95^{ème} percentile lorsque le nombre de données de la catégorie est supérieur à 30 ; ou la concentration maximale lorsque le nombre de données de la catégorie est inférieur à 30. L'exposition aiguë correspond à un effet toxicologique se manifestant rapidement, dès la première ingestion.

Ces deux types d'exposition ont été calculés d'une part, avec l'ensemble des données disponibles et d'autre part, avec les données françaises uniquement, au nombre de 138. A noter que les données françaises ne portent que sur les moules et les huîtres.

Les résultats détaillés figurent dans le rapport du GT « BMAA » et ne sont pas repris ici. Les estimations de l'exposition alimentaire (tous produits confondus : mollusques, crustacés, poissons) se situent dans les gammes suivantes :

Pour l'exposition aiguë à la BMAA totale chez l'adulte :

- en moyenne de 0,295 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./j pour la population générale à 2,149 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./j pour les forts consommateurs ;
- au 95^{ème} percentile de 1,352 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./j pour la population générale à 5,124 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./j pour les forts consommateurs.

Pour l'exposition chronique à la BMAA totale chez l'adulte :

- en moyenne de 0,069 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./j pour la population générale à 0,52 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./j pour les forts consommateurs ;
- au 95^{ème} percentile de 0,319 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./j pour la population générale à 1,224 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./j pour les forts consommateurs.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DU CES ERCA

Les données toxicologiques (*in vivo* et *in vitro*) montrent la neurotoxicité de la BMAA, qui de ce fait constitue un danger pour l'Homme.

Ces données ne permettent cependant pas d'établir une relation dose-effet ni une valeur toxicologique de référence (aiguë ou chronique).

Le danger de la BMAA ne peut donc pas être caractérisé.

A l'issue de leur analyse, le GT « BMAA » et le CES ERCA ont conclu que le lien de causalité entre l'exposition à la BMAA et la survenue de SLA n'était pas démontré, en l'état actuel des connaissances. Cette pathologie, à l'instar des autres maladies neurodégénératives, est multifactorielle et de cinétique lente.

Les données de l'Ifremer ont montré que la BMAA était quantifiée dans l'ensemble des échantillons d'huîtres et de moules du littoral français (n = 138). A partir de ces données et d'autres données disponibles dans la littérature, l'exposition des consommateurs français a pu être estimée selon plusieurs scénarios mais elle n'a pas pu être comparée à des expositions de consommateurs d'autres pays, le GT « BMAA » n'ayant identifié aucune information publiée.

Compte tenu de ces éléments, le CES ERCA n'est pas en mesure de se prononcer sur le niveau de préoccupation sanitaire à l'égard de la BMAA dans les produits de la mer et d'eau douce.

Piste de recherche à envisager en priorité

- Analyser la BMAA sous forme libre et sous forme liée dans des échantillons de cerveaux de patients atteints de SLA ainsi que des échantillons témoins selon une méthode analytique fiable.
- Acquérir des données métaboliques et toxicologiques pour caractériser le danger et définir une valeur toxicologique de référence (pour la BMAA et pour ses isomères, l'AEG, le DAB et la BAMA).
- Obtenir des données de contamination des produits de la mer et d'eau douce (coquillages, poissons, crustacés) selon une méthode analytique fiable et permettant de prendre en compte la variabilité temporelle et spatiale. La recherche de la BMAA pourrait faire partie de la liste des toxines incluses dans le cadre de la veille d'urgence des biotoxines marines dans les coquillages, pilotée par la DGAI.
- Mener une étude épidémiologique cas-témoin pour investiguer le possible lien de causalité entre l'exposition à la BMAA et la survenue de SLA.

De manière plus détaillée, il conviendrait de :

- Produire un matériel de référence pour permettre à la communauté scientifique de caractériser les méthodes analytiques mises en œuvre et comparer les résultats, sans *a priori* sur les méthodes (*i.e.* dérivation vs. sans dérivation).
- Clarifier la production de BMAA par les cyanobactéries (quelles souches en produisent, de façon constitutive ou induite, à quelles concentrations).
- Réévaluer les voies de bioaccumulation de la BMAA dans les produits de la mer et d'eau douce. En effet, de récents travaux montrent la production de BMAA par certaines espèces de diatomées (telles que *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp, *Thalassiosira pseudonana*).
- Mieux prendre en compte les informations relatives aux habitudes alimentaires dans les études épidémiologiques visant à établir le lien entre l'exposition à la BMAA et la survenue de SLA.
- Définir un marqueur fiable d'exposition (BMAA, métabolite ou autre biomarqueur).
- Investiguer l'origine de la faible susceptibilité de la souris à la neurotoxicité de la BMAA.
- Etudier les mécanismes de liaison, d'incorporation ou d'interaction de la BMAA et de ses isomères aux protéines dans les matrices biologiques.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments (CES ERCA) ».

Les données épidémiologiques disponibles ne permettent pas de proposer un niveau de preuve entre l'exposition à la BMAA et la survenue de SLA. Selon la classification utilisée par le CIRC (Centre international de Recherche sur le Cancer), cela correspondrait à un groupe 3 (l'agent n'est pas classifiable) en raison d'absence de données confirmant une exposition à la BMAA dans les populations où des excès d'incidence de SLA ont été observés. Plus spécifiquement, des études dans l'île de Guam ont montré une sur-incidence de cas de SLA dans le passé que l'on ne retrouve plus aujourd'hui, sans pouvoir déterminer si cette situation a un lien avec l'exposition alimentaire à la BMAA. Aucune étude cas-témoin n'ayant exploré ce lien, l'hypothèse reste posée sans que l'on ait les moyens d'apporter des éléments de réponse.

L'Anses souligne donc l'importance d'engager des travaux de recherche visant à compléter les connaissances sur la BMAA, en particulier des études épidémiologiques de type cas-témoin investiguant les habitudes de vie et l'exposition alimentaire à la BMAA.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Bêta-méthylamino-L-alanine ; BMAA ; maladies neurodégénératives ; SLA ; sclérose latérale amyotrophique

Beta-methylamino-L-alanine ; BMAA ; ALS ; amyotrophic lateral sclerosis ; neurodegenerative diseases

BIBLIOGRAPHIE

- Afssa (2009). INCA2. Étude individuelle nationale des consommations alimentaires. Coordinateur L. Lafay.
- Afssa (2006). CALIPSO. Etude des consommations alimentaires de produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, polluants et oméga 3, Coordinateur JC Leblanc.
- Al-Sammak MA, Rogers DG, Hoagland KD (2015). Acute β -N-methylamino-L-alanine toxicity in a mouse model. *J Toxicol* 2015: 739-746.
- An T, Shi P, Duan W, Zhang S, Yuan P, Li Z, Wu D, Xu Z, Li C, Guo Y (2014). Oxidative stress and autophagic alteration in brainstem of SOD1-G93A mouse model of ALS. *Mol Neurobiol* 49: 1435-1448.
- Andersson M, Karlsson O, Bergström U, Brittebo EB, Brandt I (2013). Maternal transfer of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) via milk to suckling offspring. *PLoS ONE* 8(10): e78133.
- Anses (2016). Évaluation du poids des preuves à l'Anses : revue critique de la littérature et recommandations à l'étape d'identification des dangers, juillet 2016, 116 p.
- Arif M, Kazim SF, Grundke-Iqbal I, Garruto RM, Iqbal K (2014). Tau pathology involves protein phosphatase 2A in parkinsonism-dementia of Guam. *PNAS* 111: 1144-1149.
- Banack SA, Metcalf JS, Spacil Z, Downing TG, Downing S, Long A, Nunn PB, Cox PA (2011). Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from other diamino acids. *Toxicon* 57(5) : 730-738.
- Barden H and Levine S (1983). Histochemical observations on rodent brain melanin. *Brain Res Bull* 10: 847-851.

- Buenz EJ, Howe CL (2007). β -methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons *in vivo*. *Neurotoxicology* 28: 702-704.
- Chiu AS, Gehringer MM, Braidly N, Guillemin GJ, Welch JH, Neilan BA (2013). Gliotoxicity of the cyanotoxin, β -methyl-amino-L-alanine (BMAA). *Sci Rep.* 3:1482.
- Cox PA and Sacks OW (2002). Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 58: 956-959.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ (2003). Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *PNAS* 100(23): 13380-3.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *PNAS* 102, 5074–5078.
- Cox PA, Davis DA, Mash DC, Metcalf JS, Banack SA (2016). Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc. R. Soc. B* 283: 20152397.
- Cruz-Aguado R, Winkler D, Shaw CA (2006). Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary [beta]-methylamino-L-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 84: 294-299.
- Dariani S, Baluchnejadmojarad T, Roghani M (2013). Thymoquinone attenuates astrogliosis, neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in a model of temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci* 51: 679-686.
- Dawson R Jr, Marschall EG, Chan KC, Millard WJ, Eppler B, Patterson TA (1998). Neurochemical and neurobehavioral effects of neonatal administration of beta-N-methylamino-L-alanine and 3,3'-iminodipropionitrile. *Neurotoxicol Teratol.* 20(2): 181-192.
- de Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Ojeda I, Martínez A, Gil C, Arahuetes RM (2013). β -N-methylamino-L-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): the first step towards an experimental model for sporadic ALS. *Environ Toxicol Pharmacol* 36: 243-255.
- de Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Martínez A, Arahuetes RM (2015). Morphometric and neurochemical alterations found in L-BMAA treated rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 39: 1232-1245.
- Duncan MW, Villacreses NE, Pearson PG, Wyatt L, Rapoport SI, Kopin IJ, Markey SP, Smith QR (1991). 2-amino-3-(methylamino)propanoic acid (BMAA) pharmacokinetics and blood-brain barrier permeability in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 27-35.
- Duncan MW, Markey SP, Weick BG, Pearson PG, Ziffer H, Hu Y, Kopin IJ (1992). 2-Amino-3-(methylamino)propanoic acid (BMAA) bioavailability in the primate. *Neurobiol aging* 13: 333-337.
- Dunlop RA, Cox PA, Banack SA, Rodgers, KJ (2013). The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation. *Plos One* 8 (9):e75376.
- Eleuteri S, Di Giovanni S, Rockenstein E, Mante M, Adame A, Trejo M, Wrasidlo W, Wu F, Fraering PC, Masliah E, Lashuel HA (2015). Novel therapeutic strategy for neurodegeneration by blocking A β seeding mediated aggregation in models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 74: 144-1457.
- Faassen EJ (2014). Presence of the neurotoxin BMAA in aquatic ecosystems: What do we really know? *Toxins*, 6: 1109-1138.
- Garner CE, Wegerski CJ, Doyle-Eisele M, Lucak J, Waidyanatha S, McDonald JD, Sanders JM (2013). Accumulation of β -N-methylamino-L-alanine in tissues following repeat oral administration to Harlan Sprague-Dawley rats. Society of Toxicology 52nd Annual Meeting, March 10–14, 2013, San Antonio, Texas (poster #500). *The Toxicologist, Supplement to Toxicological Sciences Volume 132, Issue 1.*
- Glover WB, Mash DC, Murch SJ (2014). The natural non-protein amino acid N- β -methylamino-L-alanine (BMAA) is incorporated into protein during synthesis. *Amino Acids* 46: 2553-2559.
- Heitz FD, Erb M, Anklin C, Robay D, Pernet V, Gueven N (2012). Idebenone protects against retinal damage and loss of vision in a mouse model of Leber's hereditary optic neuropathy. *PLoS One* 7(9): e45182.
- Inserm (2015). Sclérose latérale amyotrophique. <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/sclerose-laterale-amyotrophique>
- Jiang L, Kiselova N, Rosen J, Ilag LL (2014). Quantification of neurotoxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in seafood from Swedish markets. *Sci. Rep.* 4: 6931.
- Karlsson O, Lindquist NG, Brittebo EB, Roman E (2009a). Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicol Sci.* 109(2):286-95.

- Karlsson O, Roman E, Brittebo EB (2009b). Long-term cognitive impairments in adult rats treated neonatally with beta-N-Methylamino-L-Alanine. *Toxicol Sci.* 112(1): 185-195.
- Karlsson O, Berg C, Brittebo EB, Lindquist NG (2009c). Retention of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine in melanin and neuromelanin-containing cells - a possible link between Parkinson-dementia complex and pigmentary retinopathy. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 120-130
- Karlsson O, Roman E, Berg AL, Brittebo EB (2011). Early hippocampal cell death, and late learning and memory deficits in rats exposed to the environmental toxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) during the neonatal period. *Behav Brain Res.* 219(2): 310-320.
- Karlsson O, Berg AL, Lindström AK, Hanrieder J, Arnerup G, Roman E, Bergquist J, Lindquist NG, Brittebo EB, Andersson M (2012). Neonatal exposure to the cyanobacterial toxin BMAA induces changes in protein expression and neurodegeneration in adult hippocampus. *Toxicol Sci* 130: 391-404.
- Karlsson O, Kultima K, Wadensten H, Nilsson A, Roman E, Andrén PE, Brittebo EB (2013). Neurotoxin-induced neuropeptide perturbations in striatum of neonatal rats. *J Proteome Res* 12: 1678-1690.
- Karlsson O, Jiang L, Andersson M, Ilag LL, Brittebo EB (2014). Protein association of the neurotoxin and non-protein amino acid BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in the liver and brain following neonatal administration in rats. *Toxicol Lett* 226: 1-5.
- Karlsson O, Jiang L, Ersson L, Malmström T, Ilag LL, Brittebo EB (2015). Environmental neurotoxin interaction with proteins: Dose-dependent increase of free and protein-associated BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in neonatal rat brain. *Sci Rep* 5: 15570.
- Krone B (2016). The why of sporadic motor neuron disease – many factors, still a mystery? *J Neurol Neuromed* 1: 1-5.
- Krüger T, Mönch B, Oppenhäuser S, Luckas B (2010). LC-MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revoluta* and *Lathyrus latifolius*. *Toxicon* 55: 547-557.
- Lage S, Costa PR, Moita T, Eriksson J, Rasmussen U, Rydberg SJ (2014). BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a potential BMAA source. *Aquat Toxicol* 152: 131-138.
- Lastres-Becker I, Ulusoy A, Innamorato NG, Sahin G, Rábano A, Kirik D, Cuadrado A (2012). α -Synuclein expression and Nrf2 deficiency cooperate to aggravate protein aggregation, neuronal death and inflammation in early-stage Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 21: 3173-3192.
- Liu X, Rush T, Zapata J, Lobner D (2009). β -N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc(-). *Exp Neurol* 217: 429-433.
- Liu XQ, Rush T, Ciske J, Lobner D (2010). Selective death of cholinergic neurons induced by beta-methylamino-L-alanine. *Neuroreport* 21: 55-58.
- Lobner D, Piana PM, Salous AK, Peoples RW (2007). Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Dis* 25: 360-366.
- Marsden CD (1961). Pigmentation in the nucleus *substantiae nigrae* of mammals. *J Anat* 95:256-261.
- Masseret E, Banack S, Boumédiène F, Abadie E, Brient L, Pernet F, Juntas-Morales R, Pageot N, Metcalf J, Cox P, Camu W; French Network on ALS Clusters Detection and Investigation (2013). Dietary BMAA exposure in an amyotrophic lateral sclerosis cluster from southern France. *PLoS One.* 8(12):e83406.
- McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL (2011). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31: 15703-15715.
- Muñoz-Saez E, de Munck E, Arahetes RM, Solas MT, Martínez AM, Miguel BG (2013). β -N-methylamino-L-alanine induces changes in both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma. *J Toxicol Sci* 38: 425-430.
- Muñoz-Sáez E, de Munck García E, Arahetes Portero RM, Martínez A, Solas Alados MT, Miguel BG (2015). Analysis of β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) neurotoxicity in rat cerebellum. *Neurotoxicology* 48: 192-205.
- Novak M, Hercog K, Žegura B (2016). Assessment of the mutagenic and genotoxic activity of cyanobacterial toxin beta-N-methyl-amino-L-alanine in *Salmonella typhimurium*. *Toxicon.* 118: 134-140.
- Okle O, Stemmer K, Deschl U, Dietrich DR (2013). L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low nonexcitotoxic concentrations. *Toxicol Sci* 131: 217-224.
- Perry TL, Bergeron C, Biro AJ, Hansen S (1989). β -N-methylamino-L-alanine. Chronic oral administration is not neurotoxic to mice. *J Neurol Sci* 94: 173-180.

- Réveillon D, Abadie E, Séchet V, Brient L, Savar V, Bardouil M, Hess P, Amzil Z (2014). Beta-N-methylamino-L-alanine: LC-MS/MS optimization, screening of cyanobacterial strains and occurrence in shellfish from Thau, a French Mediterranean Lagoon. *Mar. Drugs* 12, 5441–5467.
- Réveillon D, Abadie E, Séchet V, Masseret E, Hess P, Amzil Z (2015). β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. *Mar. Environ. Res.* 110: 8–18.
- Réveillon D 2015. BMAA et cyanotoxines : microalgues productrices et niveaux d'accumulation dans les organismes marins. Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes, 334 pages.
- Santucci S, Zsürger N, Chabry J (2009). β -N-methylamino-L-alanine induced *in vivo* retinal cell death. *J Neurochem* 109: 819-825.
- Seawright AA, Brown AW, Nolan CC, Cavanagh JB (1990). Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, L-beta-methylaminoalanine (L-BMAA), in rats. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 16(2): 153-169.
- Spencer PS (1987). Guam ALS/Parkinsonism-dementia: A long-latency neurotoxic disorder caused by “slow toxin(s)” in food? *Can. J. Neurol. Sci.* 14: 347-357.
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, Robertson RC (1987). Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237: 517-522.
- Tan SM, Deliyanti D, Figgett WA, Talia DM, de Haan JB, Wilkinson-Berka JL (2015). Ebselen by modulating oxidative stress improves hypoxia-induced macroglial Müller cell and vascular injury in the retina. *Exp Eye Res.* 136:1-8.
- Vega A and Bell EA (1967). α -Amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* 6 (5), 759-762.
- Weiss JH, Christine CW, Choi DW (1989). Bicarbonate dependence of glutamate receptor activation by beta-N-methylamino-L-alanine: channel recording and study with related compounds. *Neuron* 3: 321-326.
- Yin HZ, Yu S, Hsu CI, Liu J, Acab A, Wu R, Tao A, Chiang BJ, Weiss JH (2014). Intrathecal infusion of BMAA induces selective motor neuron damage and astrogliosis in the ventral horn of the spinal cord. *Exp Neurol.* 261: 1-9.



Données relatives à la toxicité aiguë et chronique de la BMAA (bêta-méthylamino-L-alanine)

Saisine « 2016-SA-0012 »

RAPPORT d'expertise collective

Groupe de travail « BMAA »

Comité d'experts spécialisé

« Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments »

Avril 2017

Mots clés

BMAA ; Bêta-méthylamino-L-alanine ; Toxicité aiguë ; Toxicité chronique ; SLA ; Sclérose latérale amyotrophique

BMAA ; Beta-methylamino-L-alanine ; Acute toxicity ; Chronic toxicity ; ALS ; Amyotrophic lateral sclerosis

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Jean-Marc FREMY – Chercheur analyste retraité – compétences en chimie analytique, toxicologie, cyanotoxines

Membres

M. Zouher AMZIL – Directeur de recherche – Compétences en chimie analytique des toxines

M. Jacques BELEGAUD - Professeur honoraire – Compétences en toxicologie

M. Ronel BIRÉ – Chef de projets – Compétences en chimie analytique

Mme Claude CASELLAS – Professeur – Compétences en épidémiologie, pharmacie

M. Thomas CLAUDEPIERRE – Professeur des universités – Compétences en neurotoxicologie, neurobiologie

M. Nicolas DELCOURT – Maître de conférence des universités, Centre antipoison et de toxicovigilance – Compétences en pharmacie, neurosciences

Mme Emmeline LAGRANGE-GUILLON – Neurologue, Chef de service des maladies rares et centre SLA – Compétences en médecine humaine, neurologie, connaissances en BMAA, membre du projet ANR BMAALS

Mme Emilie LANCE – Maître de conférence des universités – Compétences en écotoxicologie et cyanotoxines

M. César MATTEI – Maître de conférence des universités – Compétences en toxicologie

Mme Valérie PICHON – Professeur, Directeur de département de chimie analytique – Etude de la BMAA, membre du projet ANR BMAALS

M. Jean-Paul VERNOUX – Professeur émérite – Compétences en toxicologie

RAPPORTEURS (RELECTEURS)

Mme Sakina MHAOUTY-KODJA – Directeur de recherche – Compétences en toxicologie

M. Eric VERDON – Responsable de laboratoire – Compétences en chimie analytique

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (mandat 2015-2018)
- Dates de réunion : 23 mars 2016, 24 mai 2016, 23 juin 2016, 15 décembre 2016, 15 février 2017, 12 avril 2017

Président

M. Cyril FEIDT – Professeur des universités – Compétences en transfert des contaminants

Membres

- M. Claude ATGIE – Professeur des universités – Compétences en toxicologie
- M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des universités – Compétences en transfert des contaminants
- M. Jacques BELEGAUD – Professeur honoraire – Compétences en toxicologie
- Mme Valérie CAMEL – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique
- Mme Martine CLAUW – Professeur des universités – Compétences en toxicologie
- M. Guillaume DUFLOS – Responsable de laboratoire – Compétences en chimie analytique
- Mme Camille DUMAT – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique
- M. Jérôme GAY–QUEHEILLARD – Maître de conférence des universités – Compétences en impacts digestifs et métabolisme
- M. Thierry GUERIN – Directeur de recherche – Compétences en chimie analytique
- Mme Nicole HAGEN–PICARD – Professeur des universités – Compétences en toxicologie
- Mme Laila LAKHAL – Ingénieur animateur de projets – Compétences en toxicologie
- M. Claude LAMBRE – Retraité – Compétences en toxicologie
- M. Bruno LE BIZEC – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique
- Mme Raphaële LE GARREC – Maître de conférences des universités – Compétences en toxicologie
- M. Eric MARCHIONI – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique
- M. César MATTEI – Maître de conférence des universités – Compétences en toxicologie
- Mme Sakina MHAOUTY–KODJA – Directeur de recherche – Compétences en toxicologie
- M. Fabrice NESSLANY – Directeur de laboratoire – Compétences en toxicologie
- M. Alain–Claude ROUDOT – Professeur des universités – Compétences en modélisation mathématique
- Mme Karine TACK – Responsable de laboratoire – Compétences en chimie analytique
- Mme Paule VASSEUR – Professeur émérite – Compétences en toxicologie
- M. Eric VERDON – Responsable de laboratoire – Compétences en chimie analytique
- M. Jean–Paul VERNOUX – Professeur émérite – Compétences en toxicologie

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. Thomas MAIGNIEN – Chargé de projets – Unité d'évaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Evaluation des Risques

Mme Nathalie ARNICH – adjointe au chef de l'Unité d'évaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Evaluation des Risques

Contribution scientifique

Mme Nawel BEMRAH – Chef de projets – Unité d'évaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Evaluation des Risques

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Service Appui à l'expertise – Direction de l'Evaluation des Risques

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Pr. William CAMU, Centre National de Ressource et de Compétence pour les maladies du motoneurone/SLA, Inserm 1051

Dr. Alexis ELBAZ, UMR 1018, Centre de recherche en Épidémiologie et Santé des Populations Inserm

Pr. Benoît MARIN, Institut d'Epidémiologie et de Neurologie Tropicale, UMR 1094 Inserm Neuroépidémiologie Tropicale

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	9
Liste des tableaux.....	10
Liste des figures.....	10
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise.....	11
1.1 Contexte.....	11
1.2 Objet de la saisine.....	11
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	12
1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts	12
2 Méthode d'expertise	13
3 Analyse physico-chimique de la BMAA et de ses isomères	14
3.1 Mise à jour et propriétés structurales	14
3.2 Méthodologie suivie pour la sélection des articles	15
3.2.1 Première étape de sélection.....	15
3.2.2 Seconde étape de sélection	15
3.3 Inventaire des méthodes de dosage utilisées pour les études d'occurrence citées dans la littérature	15
3.3.1 Traitement de l'échantillon.....	16
3.3.2 Méthodes d'analyse physico-chimiques de la BMAA et ses isomères	18
3.4 Critères de fiabilité et classement des méthodes utilisées dans la littérature relative à l'occurrence de la BMAA.....	21
3.5 Conclusions.....	22
4 Données cliniques et épidémiologiques	24
4.1 Définition de la sclérose latérale amyotrophique (SLA).....	24
4.1.1 Les critères de la maladie.....	25
4.1.2 Anatomopathologie de la SLA.....	25
4.2 Mécanismes physiopathologiques de la SLA	26
4.2.1 Fonction du glutamate	26
4.2.2 Rôle de la transmission glutamatergique dans l'excitotoxicité	28
4.3 Les facteurs génétiques, les formes familiales et les formes héréditaires	29
4.4 Incidence et prévalence de la maladie	30

4.5 Etudes des facteurs de risque associés à la SLA (gène-environnement, susceptibilité, hypothèse prion et « misfolding » des protéines)	31
4.6 Facteurs de risque spécifique à la BMAA	33
4.6.1 L'île de GUAM, la cohorte la plus caractéristique	33
4.6.2 Etudes explorant un lien entre SLA et BMAA.....	35
4.6.3 Etude BMAALS.....	36
5 Données toxicologiques	38
5.1 Données sur la toxicocinétique et la toxicodynamique de la BMAA	38
5.1.1 Absorption.....	38
5.1.2 Distribution.....	38
5.1.3 Métabolisme	39
5.1.4 Elimination	40
5.1.5 Conclusion	40
5.2 Toxicité chez l'animal de laboratoire	41
5.2.1. Voie orale.....	41
5.2.2. Voie intra-péritonéale	42
5.2.3. Voie sous-cutanée	42
5.2.4. Autres voies d'administration.....	43
5.2.5. Limites des études de toxicité chez l'animal	43
5.2.6 Conclusions sur la toxicité chronique et aiguë	44
5.3 Génotoxicité	45
5.4 Aspects mécanistiques : hypothèses sur le mode d'action de la BMAA	45
5.4.1 Neurotoxicité de la BMAA.....	45
5.4.2 Incorporation protéique de la BMAA	49
5.4.3 Conclusion	50
5.5 Inventaire des analogues structuraux proches de la BMAA et comparaison de leurs effets pharmacologiques et toxicologiques avec ceux de la BMAA	51
5.5.1 Les analogues structuraux de la BMAA et leurs effets.....	51
5.5.2 Autres analogues structuraux : les composés isomères de la BMAA et leurs effets	53
6 Evaluation du poids des preuves du lien entre l'exposition chronique à la BMAA et la SLA	55
7 Sources et occurrence de la BMAA	57
7.1 Organismes producteurs de BMAA (et ses isomères)	57
7.2 Contamination des milieux aquatiques	57
7.2.1 Lacs et réservoirs	59
7.2.2 Lagune.....	59
7.2.3 Milieu marin	59
7.2.4 Conclusion.....	60
7.3 Données préliminaires sur la contamination des sols et aérosols	61
7.4 Contamination des produits aquatiques consommés par l'Homme	61
7.4.1 Méthodologie suivie pour la sélection des articles	62
7.4.2 Synthèse des grilles de lecture des articles classés vert	62

Conclusion	65
7.4.3 Synthèse des grilles de lecture des articles classés orange, informations additionnelles	66
8 Estimation de l'exposition alimentaire pour l'Homme	71
8.1 Matériel et Méthodes.....	71
8.1.1 Données de consommation alimentaire	71
8.1.2 Données de contamination.....	72
8.1.3 Traitement des données censurées	73
8.1.4 Hypothèses de calculs de l'exposition.....	74
8.2 Résultats	74
9 Conclusions générales et recommandations du groupe de travail.....	83
10 Bibliographie	85
Annexe 1 : Sélection des articles relatifs aux aspects méthodologiques.....	97
Annexe 2 : Classement des méthodes utilisées dans la littérature relative à l'occurrence de la BMAA	98
Annexe 3 : Les critères des Hill.....	135
Annexe 4 : Grilles de lecture des 8 publications retenues.....	136

Sigles et abréviations

AEG : N-(2-aminoéthyl) glycine

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate

AQC : aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate

BAMA : β -amino-N-méthylalanine

BMAA : bêta-méthylamino-L-alanine

Ca²⁺ : calcium

CG-MS : chromatographe en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse

CL/FLD : chromatographie en phase liquide associée à un détecteur fluorimétrique

CL-SM/SM : chromatographie en phase liquide associée à une spectrométrie de masse en tandem

DAB : acide 2,4-diaminobutyrique

DFT : démence fronto-temporale

DNF : dégénérescences neurofibrillaires

DOPA : dihydroxyphénylalanine

Fmoc : 9-fluorenylméthylchloroformate

GABA : acide γ -aminobutyrique

GSK : glycogène synthase kinase

LCR : liquide céphalo-rachidien

MA : maladie d'Alzheimer

MAM : méthylazoxyméthanol

MP : maladie de Parkinson

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

PP2A : phosphatase 2A

SN : substance noire

SOD : superoxyde dismutase

SNC : système nerveux central

SLA : sclérose latérale amyotrophique

SMHR : spectrométrie de masse haute résolution

SPE : extraction sur phase solide

Tau : Tubulin-Associated Unit

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères diagnostiques définis par Airlie House, ou critères El Escorial révisés (1998)	25
Tableau 2 : Les critères de SLA familiale (adaptés de Byrne et al., 2011)	29
Tableau 3. Synthèse des données relatives à la contamination des milieux aquatiques par la BMAA et ses isomères.....	58
Tableau 4 : Tableau de synthèse des données relatives à la contamination de l'air et du sol par la BMAA et ses isomères.....	61
Tableau 5 : Synthèse des articles éligibles relatifs aux concentrations de BMAA chez des organismes aquatiques consommés par l'Homme.	63
Tableau 6 : Synthèse des articles classés orange relatifs aux concentrations de BMAA chez des organismes aquatiques consommés par l'Homme	66
Tableau 7. Données de contamination selon le pays d'origine.....	72
Tableau 8 : Liste des espèces de produits de la mer ou d'eau douce et les catégories d'aliment auxquelles ils correspondent.....	73
Tableau 9 : Exposition aiguë à la BMAA totale en $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ chez les adultes, population générale.....	75
Tableau 10 : Exposition aiguë à la BMAA, au DAB et à l'AEG en $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ chez les adultes, population générale	76
Tableau 11 : Exposition aiguë à la BMAA, au DAB et à l'AEG en $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ chez les adultes, forts consommateurs	77
Tableau 12 : Exposition aiguë à la BMAA, au DAB et à l'AEG en $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ chez les enfants, population générale	78
Tableau 13 : Exposition chronique à la BMAA, au DAB et à l'AEG en $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ chez les adultes, population générale.....	79
Tableau 14 : Exposition chronique à la BMAA, au DAB et à l'AEG en $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ chez les adultes, forts consommateurs	80
Tableau 15 : Exposition chronique à la BMAA, au DAB et à l'AEG en $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ chez les enfants, population générale	81

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la BMAA et ses isomères naturels, le DAB, l'AEG et la BAMA.....	14
Figure 2 : Schéma global des procédures analytiques proposées pour l'analyse de la BMAA et ses isomères	16
Figure 3 : Organisation du système moteur	24
Figure 4 : Synapse glutamatergique dans le SNC.	27
Figure 5 : Structures du NMDA, de la BMAA et de l'acide glutamique	51
Figure 6 : Structures de la BOAA, de l'acide glutamique et de la BMAA.....	52
Figure 7 ; Structures de l'acide domoïque et de l'acide kaïnique.....	53
Figure 8 : Structures de la BMAA, du DAB, de l'AEG et du BAMA.....	53

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

La bêta-méthylamino-L-alanine (BMAA) est un acide aminé non protéinogène. Cette neurotoxine est suspectée d'être associée à des maladies neurodégénératives. Au sein de la population autochtone de l'île de Guam (dans l'Océan Pacifique), des cas suspects de syndrome « sclérose latérale amyotrophique/Parkinson/démence » (complexe ALS/PDC selon l'acronyme anglais) observés dans les années 1950 pourraient être imputables à une bioamplification de la BMAA dans la chaîne alimentaire à partir de graines et de fruits d'un arbre local (le cycas), contaminés par des cyanobactéries de son système racinaire. La consommation traditionnelle, par cette population autochtone, de chauves-souris se nourrissant des graines de cycas a été proposée comme principal vecteur d'exposition (Cox et al., 2002, 2003).

En France, de récents travaux menés par l'Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) ont mis en évidence la présence de BMAA dans des mollusques bivalves (moules, huîtres) collectés dans plusieurs zones conchylicoles en 2013 (Réveillon, 2015). Ces travaux complétaient une première étude qui ne s'était intéressée qu'aux coquillages de l'étang de Thau (Réveillon et al., 2014).

Par ailleurs, des zones de sur-incidence de cas de sclérose latérale amyotrophique (SLA) ont été rapportées dans certaines régions françaises, dont une dans laquelle les coquillages marins sont exploités et consommés (Masseret et al., 2013). La question de l'implication éventuelle de coquillages contaminés par la BMAA dans la survenue de maladies neurodégénératives peut se poser.

Depuis, une vaste étude financée par l'Agence Nationale de la Recherche a été conduite entre 2012 et 2016 afin d'investiguer le lien possible en France entre la SLA et l'exposition à la BMAA (projet ANR BMAALS). Les conclusions de cette étude ont été présentées en février 2016 lors de la réunion de clôture.

1.2 Objet de la saisine

Dans ce contexte, l'Anses a été saisie le 11 janvier 2016 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) et la Direction générale de la santé (DGS) afin de répondre aux questions suivantes :

- 1) Quel est le degré de robustesse du lien épidémiologique suggéré entre l'exposition chronique à la BMAA et le syndrome de maladies neurodégénératives « SLA/Parkinson/démence », à travers une revue bibliographique, qui pourra intégrer, entre autres, les éléments liés à l'île de Guam ?
- 2) Quelles sont les données toxicologiques disponibles sur la BMAA ?
- 3) Au vu des données toxicologiques, compte tenu des niveaux observés par l'Ifremer dans certains coquillages, peut-il exister une préoccupation sanitaire liée à la BMAA en lien avec l'ingestion de produits aquatiques (à relier sans doute à des scénarii réalistes de consommation de coquillages) ?
- 4) L'Agence peut-elle déterminer, en complément des réponses aux questions précédentes, des pistes de recherches et des études à engager prioritairement ?

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA). L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « BMAA », constitué par décision du 2 juin 2016 suite à un appel à candidatures public.

Les travaux du groupe de travail ont été présentés au CES ERCA tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques lors des réunions plénières du 23 juin 2016, 15 décembre 2016, 15 février 2017 et 12 avril 2017. L'ensemble des travaux a été adopté par le CES ERCA en réunion plénière du 12 avril 2017. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES ERCA, en particulier par deux experts nommés relecteurs. Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'agence (www.anses.fr).

2 Méthode d'expertise

Afin de réaliser une recherche bibliographique la plus exhaustive possible concernant les articles traitant i) des méthodes analytiques pour la détection et la quantification et ii) de l'occurrence de la BMAA et de ses isomères dans les produits aquatiques (marins ou d'eau douce) pouvant être consommés par l'Homme, le GT « BMAA » a décidé de suivre la méthodologie d'une revue systématique. Pour les données de toxicité (humaine, animale et mécanistique), le GT « BMAA » a réalisé une analyse approfondie de la littérature.

Le détail de la méthodologie de sélection des articles scientifiques est présenté dans les sections correspondantes de ce rapport.

3 Analyse physico-chimique de la BMAA et de ses isomères

3.1 Mise à jour et propriétés structurales

La β -*N*-méthylamino-L-alanine (BMAA) est un acide aminé non protéinogène (figure 1). Trois isomères de cette molécule ont été décrits à ce jour : l'acide 2,4-diaminobutyrique (DAB), la *N*-(2-aminoéthyl)glycine (AEG) et la β -amino-*N*-méthylalanine (BAMA).

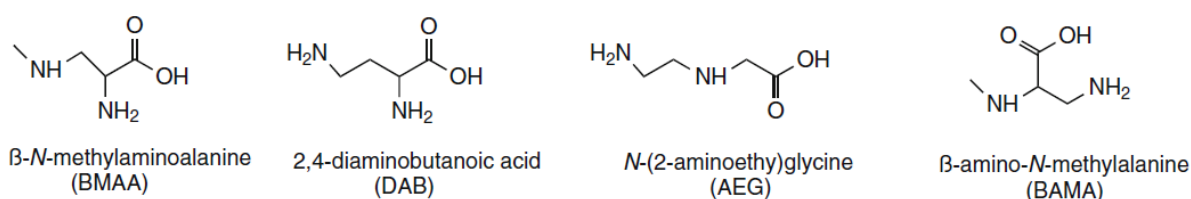


Figure 1 : Structure de la BMAA et ses isomères naturels, le DAB, l'AEG et la BAMA (Jiang et al., 2012)

La BMAA a été mise en évidence en 1967 pour la première fois dans des graines de cycas (Vega et Bell, 1967). A partir de 2003, des travaux de l'équipe de Cox rapportent la production généralisée de BMAA par les cyanobactéries (Cox et al., 2003 ; 2005). A partir de 2008, des résultats plus contrastés sur la présence et les concentrations de BMAA apparaissent, et notamment l'absence de la BMAA dans des souches de cyanobactéries considérées comme productrices de BMAA. Ces résultats contradictoires se sont traduits par une controverse analytique relative à la détection de la BMAA et de ses isomères (Krüger et al., 2010 ; Banack et al., 2011 ; Faassen, 2014). De plus, il existe une sorte de bimodalité quant à l'absence/présence de BMAA dans les cyanobactéries, en fonction de la méthode analytique. Par exemple, certaines méthodes de chromatographie en phase liquide (LC) utilisant une détection par fluorescence (FLD) rapportent systématiquement de la BMAA contrairement aux autres méthodes plus sélectives utilisant une détection par spectrométrie de masse (MS) (Combes et al., 2013 ; Jiang et al., 2013 ; Réveillon et al., 2014, 2016b ; Faassen, 2014 ; Jiang et al., 2014a).

Du fait de cette controverse, dans le cadre de cette saisine, les membres du GT « BMAA » ont commencé leurs travaux par une expertise de la fiabilité des méthodes d'analyse de la BMAA et de ses isomères. Ils ont pour cela réalisé dans un premier temps un inventaire de l'ensemble des méthodes d'analyse utilisées pour les études d'occurrence citées dans la littérature. L'objectif était d'évaluer les méthodes utilisées du point de vue de la confiance que l'on peut avoir dans les résultats d'analyse. Pour ce faire, chacune des méthodes a été évaluée selon des critères qualitatifs et quantitatifs. Sur la base de l'ensemble de ces critères, chacune de ces publications a été expertisée afin de renseigner, dans un second temps, les autres membres du GT « BMAA » chargés de la collecte des données de présence sur la possibilité de considérer ou non les résultats issus de chacune de ces publications. Ces informations ont également été prises en compte dans l'interprétation des études de toxicité.

3.2 Méthodologie suivie pour la sélection des articles

Afin de réaliser une recherche bibliographique la plus exhaustive possible concernant les articles traitant de l'analyse de la BMAA et de ses isomères, une revue systématique de trois bases de données a été réalisée : Scopus, Pubmed et Web of Science. La méthodologie suivie comportait deux phases, une première phase d'identification basée sur l'utilisation d'une phrase de recherche, une seconde qui consistait à classer les publications sur la base du titre et du résumé.

3.2.1 Première étape de sélection

Chacune de ces trois bases de données a été interrogée en utilisant la même phrase de recherche, afin d'harmoniser le processus de recherche bibliographique ; les champs interrogés sont les titres, résumés et mots clés. La phrase de recherche choisie est présentée dans l'annexe 1. Elle comprend différentes orthographes de « BMAA » afin d'être exhaustif. Partant du postulat que tous les articles faisant référence à la présence d'isomères de la BMAA (DAB, AEG, BAMA) mentionnent également celle de la molécule originelle, la BMAA, il n'a pas été jugé opportun d'inclure le nom des isomères dans la phrase de recherche. De plus, pour se focaliser sur les aspects analytiques et éviter d'avoir trop de « bruit de fond » dans les résultats de cette revue systématique, le terme « analysis » a été associé à la phrase de recherche.

Les résultats trouvés ont ensuite été compilés dans le logiciel EndNote afin de retirer tous les doublons. Une recherche manuelle de doublons a également été réalisée.

3.2.2 Seconde étape de sélection

L'ensemble des publications trouvées a ensuite été trié et classé sur la base des titres et résumés. Les quatre catégories retenues sont les suivantes :

- Organismes aquatiques
- Autres organismes
- Articles de revue
- Articles non pertinents.

Les articles correspondant aux deux premières catégories ont été lus en entier afin d'en extraire les informations relatives aux méthodes d'analyse et les compiler dans un document Excel (Annexe 2), les articles de revues ayant permis de compléter les recherches d'articles.

3.3 Inventaire des méthodes de dosage utilisées pour les études d'occurrence citées dans la littérature

La figure 2 (page suivante) présente le schéma global de l'analyse de la BMAA et de ses isomères selon les différentes procédures décrites dans la littérature.

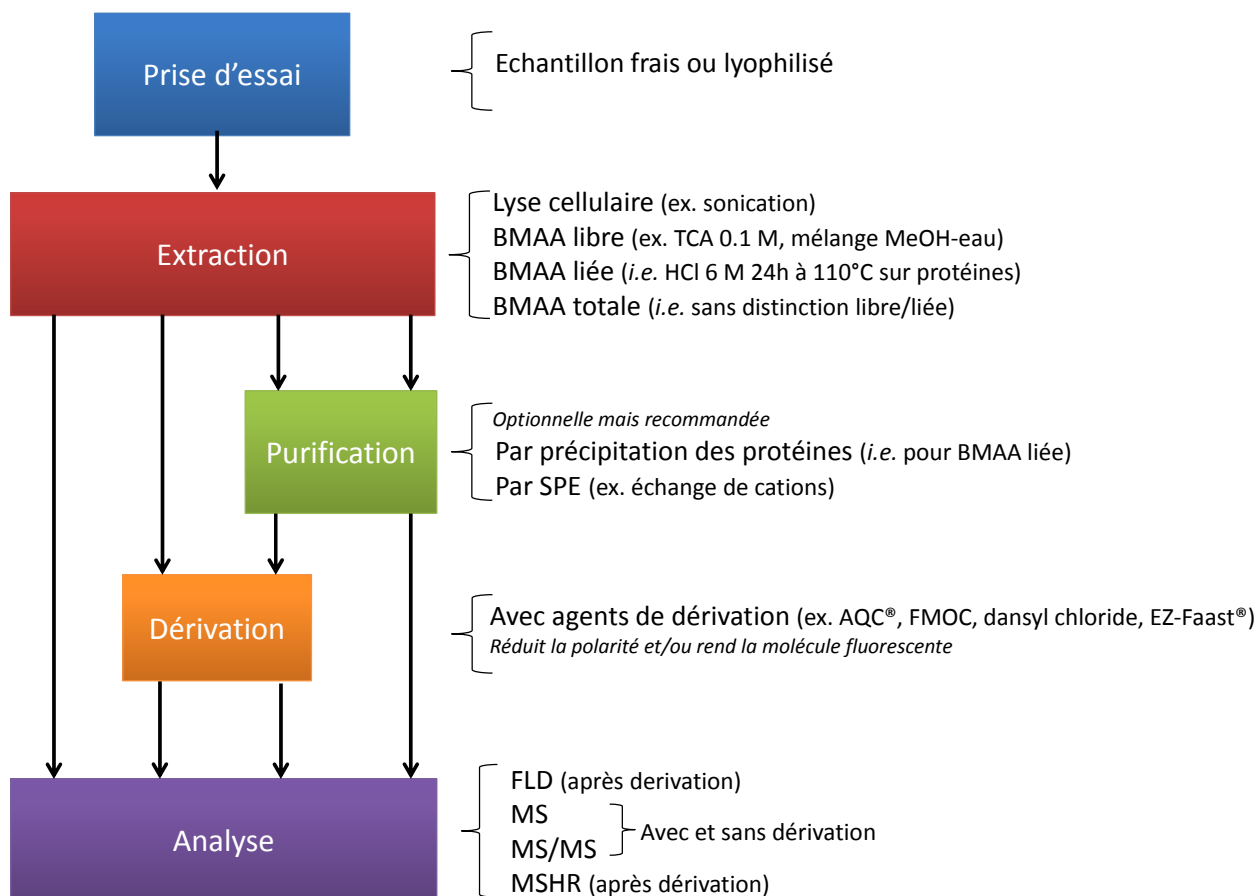


Figure 2 : Schéma global des procédures analytiques proposées pour l'analyse de la BMAA et ses isomères (d'après Réveillon et al., 2015b, mémoire de thèse). TCA : acide trichloroacétique ; FMOC : 9-fluorenylméthylchloroformate ; SPE : extraction sur phase solide, MSHR : spectrométrie de masse haute résolution

3.3.1 Traitement de l'échantillon

La BMAA peut être extraite de différentes matrices sous une forme libre ou liée à des protéines contenues dans certains échantillons. Les protocoles d'extraction varient donc en fonction de la stratégie analytique choisie. Ainsi, la toxine libre peut être extraite en premier de la matrice, puis ce même échantillon est traité une nouvelle fois de manière à hydrolyser la matrice, permettant ainsi la libération de la forme liée de la BMAA. Cette approche permet d'obtenir deux fractions distinctes contenant respectivement les formes libre et liée de la BMAA. La teneur en BMAA totale (libre + liée) peut être déterminée en hydrolysant directement la matrice. Après ces premières étapes d'extraction/hydrolyse associées à des étapes de filtration et de centrifugation, certains auteurs préconisent une étape de purification, de manière à éliminer en partie les substances protéiques solubles extraites de la matrice biologique et pouvant interférer lors de l'analyse quantitative de la BMAA.

3.3.1.1 Extraction de la BMAA sous forme libre, liée ou totale

L'extraction de la BMAA sous forme libre est majoritairement effectuée par l'ajout d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 0,1 M. Cette opération est réalisée une seconde fois sur le culot protéique. Ce dernier est ensuite hydrolysé par une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 6 M pendant une nuit à plus de 100°C de manière à récupérer la fraction de BMAA liée.

Organismes aquatiques

La BMAA et ses isomères ont été analysés dans un grand nombre de matrices organiques parmi lesquelles des poissons, des crustacés et des mollusques. La forme libre de la toxine est extraite de la matrice avec une solution de TCA dont la concentration est généralement de 0,1 M (Cox et al., 2003). Cette technique permet de séparer la forme libre de la forme liée par précipitation des protéines (Cohen et al., 2012). Toutefois, certains auteurs rapportent avoir utilisé une concentration supérieure : 0,3 M (Scott et al., 2009a ; Niedzwiadek et al., 2012).

Dans certains cas, l'extraction de la fraction libre se fait en deux étapes, avec une réextraction utilisant la même solution d'extraction. La première étape d'extraction se fait à froid (4°C pendant 12 à 16h) (Al-Sammak et al., 2013 ; Banack et al., 2014, 2015). Certains auteurs rapportent extraire la fraction libre de la toxine avec une solution hydro-organique constituée de 20% (Lage et al., 2014) à 80% de méthanol (Spacil et al., 2010).

La forme liée de la toxine est ensuite extraite du culot obtenu après centrifugation, en procédant à une hydrolyse acide par une solution de HCl de concentration 6 M. Andrys et al. (2015a) ont utilisé une solution plus concentrée (12 M) pour l'extraction des toxines à partir de moules. L'hydrolyse est un processus long (16 à 24h) qui nécessite une température élevée (110°C). L'hydrolysate est ensuite évaporé à sec puis repris dans une solution de HCl à 20 mM pour pouvoir être analysé (Murch et al., 2004a ; Dunlop et al., 2013).

Autres matrices

Les conditions d'extraction des autres matrices (plantes, cyanobactéries, diatomées) sont similaires à celles évoquées pour les organismes aquatiques (Johnson et al., 2008 ; Jiang et al., 2014a). Le principe est le même, avec une extraction de la fraction libre (TCA 0,1 – 0,3 M) puis de la fraction liée par hydrolyse acide (HCl 6 M) à 110°C pendant 16 à 24h.

Rosen et Hellenas (2008) rapportent avoir utilisé d'autres solutions organiques pour l'extraction de la fraction libre : 50% MeOH aqueux et 70% acétonitrile (ACN) aqueux. De la même manière, Li et al. (2012) décrivent l'utilisation d'un mélange méthanol/eau (75/25) pour extraire la BMAA libre des cyanobactéries et renouvellent ce traitement sur le culot après hydrolyse pour être certain de récupérer toute la fraction liée. De l'acétone (Berntzon et al., 2015) ou un mélange méthanol/acétone (Cervantes Cianca et al., 2012) ont également été proposés. Cependant, cette étude a montré que les quantités de BMAA extraite par le TCA étaient supérieures à celles extraites en solvant organique (Cervantes Cianca et al., 2012). Récemment, Lage et al., (2016) ont testé trois méthodes de préparation d'échantillons de microalgues (cyanobactérie, diatomée) : i) 80% HCl 6 M, ii) MeOH 20% / précipitation de protéines avec et sans hydrolyse ; iii) TCA avec et sans hydrolyse. C'est cette dernière qui s'est révélée meilleure en matière de rendement, qui a été ensuite validée.

3.3.1.2 Purification

Sur l'ensemble des travaux pris en compte, 60% d'entre eux témoignent de l'analyse directe de l'extrait sans étape de purification et pour la grande majorité de ces travaux, l'analyse après dérivation a été privilégiée. Concernant le choix des supports de purification, si les supports de type C18 ont tout d'abord été préconisés très ponctuellement par Murch et al. en 2004 pour fractionner l'extrait et isoler la BMAA par des lavages séquentiels (Murch et al., 2004a, 2004b), des supports mixtes permettant de combiner des interactions hydrophobes et électrostatiques ont été proposés par Kubo et al. (2008) puis repris par Spacil et al. (2010) sans une réelle optimisation de la procédure. L'optimisation de l'utilisation de supports mixtes a été rapportée par Li et al., (2012) qui ont comparé plusieurs supports et introduit une étape intermédiaire de lavage acide pour améliorer la sélectivité, ce lavage favorisant l'établissement des interactions électrostatiques entre la BMAA et le support pour le traitement d'extraits de cyanobactéries et permettant l'obtention de taux de récupération après extraction supérieur à 66% pour la BMAA et le DAB sur matrice hydrolysée ou non. Ces procédures ont ensuite été reprises, améliorées et validées par Combes et al. (2013) pour analyser la BMAA libre d'extraits de cyanobactéries puis adaptées à de nouvelles matrices (Combes et al., 2014). Par la suite, Réveillon et al. (Ifremer) ont optimisé et caractérisé la procédure

analytique qui a été appliquée à différentes matrices (cyanobactéries, diatomées, dinoflagellés, mollusques bivalves, biofilms) (Réveillon et al., 2014, 2015a, b, 2016a, b) pour la recherche de la BMAA libre et liée.

Organismes aquatiques

La fraction contenant la BMAA libre a été purifiée par extraction sur phase solide (SPE) sur cartouche échangeuse de cations (SCX) tandis que la fraction contenant la BMAA liée a d'abord été traitée sur C18 puis sur SCX (Scott et al., 2009b; Niedzwiadek et al., 2012). Réveillon et al., (2014) ont testé deux types de cartouches polymériques mixtes, Bond Elut® Plexa PCX et Oasis® MCX, pour la purification d'extraits de moules et d'huîtres contenant la forme libre ou liée de la BMAA. Ces auteurs rapportent que la Bond Elut® Plexa PCX est la plus indiquée puisqu'elle permet d'obtenir de meilleurs taux de récupération.

Certains auteurs ont utilisé des cartouches Isolute HXC-3 SPE conduisant également à un mode de rétention mixte mais sur une base de silice greffée par des motifs C18 et échangeurs de cations et non pas une base polymérique pour purifier des extraits avant l'analyse de la teneur en BMAA totale (Spácil et al., 2010 ; Andrys et al., 2015a).

Autres matrices

Pour l'analyse de la BMAA liée aux protéines des matrices de microalgues marines (diatomées, dinoflagellés), la technique de précipitation des protéines par l'action du TCA peut être considérée comme une étape de « purification » (Jiang et al., 2014a ; Lage et al., 2014). Les cartouches Isolute HXC-3 ont également été utilisées pour purifier des extraits obtenus à partir de cyanobactéries (Spácil et al., 2010 ; Jiang et al., 2013), de comprimés de spiruline (Jiang et al., 2013) ou encore de graines de cycas (Spácil et al., 2010). Combes et al. (2013) et Li et al. (2012) ont utilisé des cartouches MCX pour purifier la BMAA d'extraits de biofilms et de cyanobactéries puis de cerveaux après introduction d'une étape de lavage supplémentaire pour limiter la présence de lipides dans les extraits (Combes et al., 2014). Quant à Moura et al. (2009), ils ont eu recours à des cartouches mixte également à base de silice (Bond Elut Certify) afin d'extraire les toxines d'échantillons aqueux.

Pour l'extraction de la BMAA libre d'échantillons de cerveau, l'introduction d'une étape intermédiaire de lavage au cyclohexane durant la purification sur cartouche SPE (support mixte) permet l'élimination de la matière grasse (issue du cerveau) et conduisant à des rendements d'extraction supérieur à 97,8 % pour la BMAA et le DAB (Combes et al., 2014). De la même manière un partage liquide/liquide (HCl/chloroforme) a été proposé pour concentrer la BMAA à partir de matrice de tissu de cerveau humain et de souris (Snyder et al., 2009 ; 2010).

L'étape de purification par adsorbants mixtes est recommandée car elle permet une grande sélectivité et elle permet de réduire les effets matrices par différents lavages avec des solvants. Si cette purification est efficace, en particulier lors de l'utilisation de la méthode d'analyse par HILIC-MS/MS, les rendements d'extraction sont généralement plus faibles que lors de l'utilisation de phases SPE moins sélectives et dépendent également des matrices. Par conséquent, il conviendrait de prendre en compte ces rendements d'extraction dans l'expression des résultats quantitatifs des échantillons traités (Combes et al., 2013, 2014 ; Réveillon et al., 2014 ; 2015a,b).

3.3.2 Méthodes d'analyse physico-chimiques de la BMAA et ses isomères

Les premières méthodes d'analyse de la BMAA sont issues des méthodes classiquement utilisées pour l'analyse des acides aminés après dérivation suivie d'une détection par fluorescence en chromatographie liquide couplée à un détecteur fluorimétrique (LC-FLD). En effet, la BMAA ne possédant pas de chromophores ni de fluorophore, son analyse implique de procéder après extraction (et éventuellement purification) à une dérivation pour la rendre fluorescente ou d'avoir

recours à la spectrométrie de masse qui a également été utilisée pour identifier les formes dérivées de la BMAA après dérivation.

3.3.2.1 Analyse en Chromatographie Liquide / Fluorescence (CL-FLD) après dérivation

Il est possible d'analyser la BMAA en LC-FLD mais cela nécessite une étape préalable de dérivation afin de la rendre fluorescente. Cette dérivation permet aussi de la rendre plus hydrophobe ce qui facilite sa rétention sur des colonnes de silice greffée C18 (mode phase inverse) lors de l'analyse en LC.

Différentes procédures de dérivation ont été rapportées dans la littérature, elles reposent sur l'utilisation de réactifs distincts, le 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (ACQ) (Cox et al., 2005 ; Banack et al., 2006, 2007 ; Cervantes Cianca et al., 2012; Eriksson et al., 2009; Metcalf et al., 2008 ; Faassen et al., 2012 ; Al-Sammak et al., 2013, 2014 ; Chatziefthimiou et al., 2016), le 9-Fluorenylméthyl chloroformate (FMOc) (Scott et al., 2009b) ou un réactif commercialisé sous le terme EZ:faast préconisé pour la dérivation des acides aminés (Esterhuizen et al., 2011a). Il est important de mentionner que l'ensemble de ces réactifs sont aussi capables de dériver tous les acides aminés présents dans les échantillons pouvant induire des risques de faux positifs si cela n'a pas été pris en compte lors du développement de la méthode chromatographique.

La littérature mentionne fréquemment une reprise de l'extrait hydrolysé par 20 mM HCl pour que la dérivation par l'AQC soit efficace (Banack et al., 2006, 2007 ; Eriksson et al., 2009). Il est aussi nécessaire de réaliser un ajustement du pH avant une dérivation par le réactif EZ:faast (Esterhuizen et al., 2011b). Cependant si ces méthodes de dérivation sont appliquées depuis au moins 2003 par les groupes de Banack et de Cox, il faut attendre 2009 pour que Eriksson et al. montrent l'influence de la teneur en protéines des échantillons sur les taux de dérivation et témoignent de la nécessité d'ajuster la teneur en réactif par rapport à cette teneur en protéines qu'il est alors nécessaire d'étudier préalablement (Eriksson et al., 2009). Cet aspect a été totalement négligé lors des précédentes études.

L'étape de séparation chromatographique est cruciale en cas d'analyse en LC-FLD car elle doit permettre de séparer la BMAA de ses isomères et d'autres acides aminés, sachant qu'en dehors d'éventuelles différences en matière de temps de rétention, il n'est pas possible de différencier ces molécules.

Dans sa synthèse, Faassen (2014) a constaté des problèmes méthodologiques affirmant que dans de nombreuses études, il n'était pas possible de savoir si la BMAA avait été correctement identifiée, en particulier par les méthodes non spécifiques telles que la LC-FLD. Ces problèmes méthodologiques ont conduit à la remise en cause l'étude de Cox et al. (2005) qui affirmait en utilisant une détection par LC-FLD que 95 % des cyanobactéries produisaient de la BMAA, aucune méthode très spécifique récente n'ayant pu confirmer ces résultats.

3.3.2.2 Analyse Chromatographie Liquide / Spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est de plus en plus utilisée pour l'analyse de la BMAA et de ses isomères (DAB, AEG et BAMA) pouvant être présents dans des échantillons environnementaux (Rosen and Hellenas, 2008 ; Combes et al., 2013 ; Jiang et al., 2013 ; Réveillon et al., 2014, 2015, 2016a, b). La LC-MS/MS peut être utilisée directement ou après dérivation de la BMAA et de ses isomères présents dans l'extrait de l'échantillon analysé. L'avantage de la LC-MS/MS est qu'elle permet une analyse spécifique dans des matrices biologiques pouvant contenir des composés interférents qui possèdent un temps de rétention très proche de celui de la BMAA et/ou de ses isomères et qui pourraient générer de faux-positifs ou des surestimations de concentrations. En effet, à partir de 2012, de plus en plus de méthodes en LC-MS/MS ultra spécifiques sont utilisées puisqu'elles prennent en compte des transitions spécifiques des ions fragments propres à chaque molécule, ainsi que les ratios d'ions. C'est ce qui a conduit à la remise en cause des résultats d'occurrence des composés identifiés auparavant comme étant de la BMAA.

Sous forme dérivée

L'analyse de la BMAA sous forme dérivée peut aussi être réalisée par LC-MS/MS via l'utilisation d'AQC (Christensen et al., 2012 ; Faassen et al., 2012 ; Lage et al., 2014 ; McCarron et al., 2014 ; Andrys et al., 2015b) ou d'ester N-hydroxysuccinimide d'acide N-butylnicotinique (C₄-NA-NHS) (Andrys et al., 2015b) comme réactif de dérivation. L'avantage des agents de dérivation, comme AQC, est qu'ils sont commercialisés en kit, et doivent donc permettre l'obtention de procédures de dérivation plus robustes et reproductibles. C'est d'ailleurs la dérivation par AQC qui a le plus été utilisée dans l'analyse de la BMAA (Brand et al., 2010 ; Jonasson et al., 2010 ; McCarron et al., 2014 ; Jiang et al., 2014a, b ; Mondo et al., 2014 ; Berntzon et al., 2015). D'autres réactifs de dérivation ont également été utilisés avec succès, tel que le DNS et le C₄-NA-NHS, puisque la méthode présente une meilleure sélectivité (Salomonsson et al., 2013 ; Andrys et al., 2015).

Ces agents dérivant conduisant à une forme dérivée moins polaire de la BMAA, celle-ci est alors analysable par chromatographie en mode phase inverse sur silice greffée C18 ou sur des colonnes développées spécifiquement pour l'analyse d'acides aminés dérivés sous l'appellation « AAA » (Esterhuizen et al., 2011b ; Faassen et al., 2012 ; Chatziefthimiou et al., 2016). L'ion parent de la BMAA suivi en mode d'ionisation positif a un rapport masse sur charge m/z 119 pour la forme non dérivée ou m/z 221 (BMAA-C₄-NA), 585 (BMAA-DNS) et m/z 459 (BMAA-AQC) pour les formes dérivées de la BMAA, selon le réactif utilisé. La BMAA et ses isomères dérivés partagent de nombreux ions fils mais peuvent être différenciés grâce à certaines transitions qui leur sont spécifiques.

Une des contraintes de la dérivation est que les protocoles de dérivation doivent être optimisés afin d'assurer l'obtention de rendements élevés et constants. Or cette optimisation n'est que rarement décrite. Les agents réagissent avec les amines primaires et secondaires et par conséquent avec un nombre de composés théoriquement important et de nature chimique variable d'un échantillon à l'autre au sein d'un échantillon. Il faut donc que l'agent soit en quantité suffisante pour réagir avec tous les acides aminés, incluant la BMAA et ses isomères (Kruger et al., 2010).

Comme la BMAA dérivée a une masse moléculaire plus grande que celle de la molécule non dérivée (458 contre 118 sans dérivation avec AQC), l'accroissement de signal engendré permet de réduire le bruit de fond. Aussi, la méthode la plus sensible rapportée à ce jour comporte une étape de dérivation par AQC (Jiang et al., 2013).

D'autres équipes ont opté pour des méthodes sans dérivation, nécessitant l'utilisation de colonnes adaptées à la nature polaire de la BMAA, à savoir la chromatographie liquide à interaction hydrophile HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography).

Sous forme native

Comme démontré dès les années 2008 par différents auteurs (Kubo et al., 2008 ; Rosen et Hellenas, 2008), l'analyse de la BMAA sans dérivation est réalisable mais implique l'utilisation d'un mode de rétention chromatographique adapté aux molécules polaires et compatible avec la spectrométrie de masse à savoir le mode HILIC. Son principe correspond à une chromatographie en phase stationnaire polaire en utilisant un mélange de phases mobiles comprenant une grande proportion de solvant organique. Cette technologie permet donc la rétention et la séparation de la BMAA et de ses isomères sans avoir recours à une étape de dérivation. Les molécules sont ainsi directement analysées. Différentes colonnes peuvent alors être utilisées à savoir des phases zwitterionique ZIC-HILIC (Rosen and Hellenas, 2008 ; Faassen et al., 2012 ; Combes et al., 2013, 2014 ; Reveillon et al. 2014) ou des phases amides TSK gel amide-80 (Li et al., 2012 ; McCarron et al., 2014). Ces colonnes ont permis d'obtenir des résolutions intéressantes entre la BMAA et ses isomères.

Par ailleurs, des travaux portant sur l'utilisation de l'électrophorèse capillaire qui permet également l'analyse de la BMAA sous forme native ont été rapportés. Le mode de détection était alors de l'UV indirect (Baptista et al., 2011).

L'association de colonnes HILIC avec la spectrométrie de masse en tandem peut donc s'appliquer à l'analyse de la BMAA et de ses isomères sans dérivation, permettant une grande spécificité ainsi qu'une bonne sensibilité. Plusieurs ions caractéristiques de la BMAA et du DAB ont été identifiés, dont certains spécifiques (m/z 88 et 76 pour la BMAA, m/z 101 et 74 pour le DAB) malgré la petite taille des molécules (Rosen and Hellenas, 2008 ; Krüger et al., 2010 ; Li et al., 2012 ; Réveillon et al, 2014, 2015b). A l'inverse, aucun ion caractéristique n'a été rapporté pour l'AEG. Il est aussi important de souligner que cette méthode sans dérivation permet aussi de distinguer la BMAA et ses isomères des acides aminés susceptibles d'être présents en grande quantité dans les échantillons (Combes et al., 2014).

3.4 Critères de fiabilité et classement des méthodes utilisées dans la littérature relative à l'occurrence de la BMAA




Pour les aspects qualitatifs, les critères retenus sont :

- La mention de temps de rétention permettant d'attester la séparation de la BMAA et de ses isomères ;
- La mention de la limite de détection ;
- Le suivi en LC-MS/MS des transitions spécifiques de la BMAA et de ses isomères afin de les différencier les unes des autres. Le ratio d'ions est un élément optionnel mais qui permet de conforter l'identification des toxines.

Pour les aspects quantitatifs, les critères retenus sont :

- En premier lieu, le fait que les critères qualitatifs soient bien respectés ;
- La mention de la limite de quantification dans la matrice ;
- Le calcul du taux de récupération lors de l'extraction avec son écart-type associé ;
- D'autres critères quantitatifs optionnels confortant la confiance dans la démarche analytique tels que l'utilisation d'un étalon interne marqué, la présence d'informations concernant le domaine de linéarité, la fidélité, etc.

Sur la base de l'ensemble de ces critères, un code couleur a été attribué à chacune des publications expertisées par le GT « BMAA » :

	Critères qualitatifs et quantitatifs non satisfaisants
	Critères qualitatifs satisfaisants et quantitatifs non satisfaisants
	Critères qualitatifs et quantitatifs satisfaisants

L'ensemble du classement des publications figure en Annexe 2.

En complément, dans la suite du rapport, les publications relatant une détection ou un dosage de la molécule BMAA seront affectées d'un exposant :

NS : non satisfaisant

MS : moyennement satisfaisant (critères qualitatifs)

TS : totalement satisfaisant (critères qualitatifs et quantitatifs)

Au terme de ce classement, 48% des publications ont été évaluées comme NS, 27% comme MS et 25% comme TS.

Remarque : Ces critères ont conduit à considérer comme non satisfaisants des travaux pour lesquels, compte tenu de la rigueur du travail de développement analytique (visible par une description rigoureuse des conditions analytiques et des paramètres d'optimisation étudiés), du

serieux de l'étude menée sur le plan quantitatif (validation en matrice, ajouts dosés...), il aurait été très tentant, de manière subjective, de les classer TS. Cependant, dans ces travaux, la transition spécifique de la BMAA n'a pas été suivie ce qui ne permet pas d'affirmer avec certitude qu'il s'agit bien de la BMAA. Il s'agit notamment de Pablo et al (2009) et très récemment de Meneely et al (2016). Concernant les travaux de Combes et al (2013, 2014), même si le suivi de la transition de confirmation n'est pas décrit puisque la BMAA n'a pas été retrouvée (via la transition de quantification) dans des échantillons réels, ce travail a aussi été indiqué comme non satisfaisant par soucis d'équité.

3.5 Conclusions

La BMAA et ses isomères ont été retrouvés dans des organismes aquatiques et dans d'autres matrices (plantes, cerveaux humains). La méthode d'analyse débute par la préparation des extraits de matrice à analyser pouvant contenir de la BMAA et ses isomères sous forme libre, liée ou totale. Pour la recherche de la forme libre, le TCA à 0,1 M est recommandé. La BMAA sous forme liée est quantifiable indirectement via une hydrolyse acide avec du HCl 6 M, pendant 24h à 110°C, qui libère la BMAA qui est ensuite dosée.

Après l'étape d'extraction et d'hydrolyse, une purification par SPE (Solid Phase Extraction) est recommandée. Plusieurs adsorbants peuvent être utilisés, notamment des phases mixtes avec échanges cationiques (Bond Elut® Plexa PCX, Oasis® MCX, Isolute HCX-3). L'avantage de la purification par adsorbants mixtes est sa grande sélectivité par la possibilité de réduire les effets matrices par différents lavages avant élution. Cette procédure est recommandée, surtout lors de l'utilisation de méthodes de détection directe de la BMAA sans l'étape de dérivation. Par contre, les taux de récupération après extraction sont généralement plus faibles et dépendent des matrices. Ils doivent donc être évalués et pris en compte lors de la quantification de la BMAA dans des échantillons. L'extrait obtenu fait ensuite l'objet d'une analyse en LC-MS/MS, soit directement, soit après une étape de dérivation. En effet, il est fortement recommandé d'utiliser des méthodes spécifiques basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (SM/SM), afin d'éviter les risques d'interférences soit avec les isomères de la BMAA (DAB, AEG, BAMA) ou d'autres composés présents naturellement dans les matrices biologiques. De plus, l'identification formelle de la BMAA et de ses isomères doit passer absolument par la prise en compte des ions fragments spécifiques ainsi que de leurs ratios.

Pour les méthodes employant la dérivation de la BMAA et de ses isomères, l'avantage des réactifs de dérivation comme l'AQC est qu'il est commercialisé en kit, donc plus reproductible. Une des contraintes de la dérivation est que les protocoles doivent être optimisés car les agents réagissent avec les amines primaires et secondaires et par conséquent avec un nombre de composés théoriquement important au sein d'un échantillon, surtout après hydrolyse pour l'analyse de la BMAA liée. Il faut donc que l'agent soit en quantité suffisante pour réagir avec tous les acides aminés, incluant la BMAA et ses isomères. Aujourd'hui, la dérivation demeure une méthode importante pour l'analyse de la BMAA et de ses isomères par LC-MS/MS, analyse qui doit aussi prendre en compte les ions fragments spécifiques des molécules recherchées. D'autres équipes ont opté pour des méthodes sans dérivation, permettant une détection directe des composés d'intérêt. Pour l'identification formelle des composés recherchés, plusieurs ions fragments caractéristiques de la BMAA et du DAB ont été utilisés dont certains sont spécifiques (e.g. m/z 88 et 76 pour la BMAA, m/z 101 et 74 pour le DAB).

Aujourd'hui, des méthodes avec et sans dérivation sont validées (Combes et al., 2013, 2014 ; Jiang et al., 2013 ; Réveillon et al., 2014) avec des sensibilités satisfaisantes. Ces méthodes sont également très sélectives puisqu'elles utilisent tout ou partie des points suivants :

- i) des transitions spécifiques de la molécule BMAA pour l'identification formelle (m/z 119 > 88, 76 ou 459 > 258 pour la BMAA sans et après dérivation avec AQC) et pas seulement des transitions communes aux isomères connus (e.g. m/z 119 > 102 ou 459 > 289) ;

ii) des ratios d'ions stables pour identifier formellement chaque molécule (e.g. 88/102, 76/102 pour la BMAA ; 101/102 et 74/102 pour le DAB ou 258/119, 188/119 et 214/119 pour la BMAA, le DAB et l'AEG après dérivation par AQC).

Lors de l'analyse d'échantillons environnementaux marins (plancton, périphyton et mollusques) hydrolysés pour la détection de la BMAA totale, une interférence a été observée correspondant à un composé qui répond seulement à la transition utilisée pour la quantification de la BMAA (m/z 119 > 102) (Réveillon et al., 2015b). Aussi, il est recommandé, pour les extraits hydrolysés, l'utilisation du ratio d'ions 76/88 pour l'identification formelle et la transition m/z 119 > 88 pour la quantification de la BMAA dans ces matrices. Toutefois, cette interférence peut correspondre à la BAMA, un isomère de la BMAA rapporté seulement dans les moules de mer Baltique (Jiang et al., 2013).

Par ailleurs, des étalons internes (D_3 BMAA, D_3 DAB,) sont de plus en plus utilisés pour améliorer l'identification et la quantification de la BMAA et du DAB (Combes et al., 2013, 2014 ; Jiang et al., 2013, 2014a,b ; Berntzon et al., 2015 ; Glover et al., 2015 ; Réveillon et al., 2015, 2016a,b ; Rosen et al., 2016).

A partir de 2008, bien que pas toujours prises en compte, les méthodes de confirmation sont disponibles et permettent d'obtenir des données robustes qualitativement et /ou quantitativement.

A retenir : exigences « minimales » du GT « BMAA » pour considérer une méthode d'analyse comme fiable

Si la dérivation des composés d'intérêts est utilisée, les informations suivantes doivent être rapportées :

- l'optimisation de l'étape de dérivation qui doit tenir compte des variations liées à la quantité de protéine de la matrice analysée, ou des ajouts dosés doivent être effectués.

Si la séparation-détection de la BMAA et ses isomères sont effectuées directement ou après dérivation en LC-MS/MS, les informations suivantes doivent être rapportées :

- le temps de rétention de la BMAA et de ses isomères (DAB, AEG, BAMA),
- le suivi des transitions de masse des ions fragments de la BMAA et de ses isomères, en contrôlant les rapports d'intensité des ions fragments entre étalon et composés identifiés dans la matrice,
- validation de la méthode ou à défaut la quantification des effets de matrice par ajouts dosés.

4 Données cliniques et épidémiologiques

Le GT « BMAA » a fait le choix de ne retenir que la sclérose latérale amyotrophique (SLA) dans son analyse car elle est le dénominateur commun à toutes les maladies neurodégénératives suspectées d'être associées à une exposition à la BMAA.

4.1 Définition de la sclérose latérale amyotrophique (SLA)

La SLA se définit par l'atteinte à la fois des neurones moteurs centraux (corps cellulaires situés dans le cortex) et des neurones moteurs périphériques (corps cellulaires dans le bulbe rachidien ou la corne antérieure de la moelle épinière). La mort progressive des neurones moteurs, qui innervent les fibres musculaires striées, aboutit à une absence de contraction des muscles, en périphérie. La maladie peut revêtir deux formes distinctes à son début : (i) une forme bulbaire affectant les motoneurons du tronc cérébral, les symptômes sont alors une difficulté à articuler ou déglutir ou (ii) une forme spinale, les neurones moteurs périphériques sont atteints, ce qui se caractérise par une difficulté à mouvoir un membre (Inserm, 2015). Les patients conservent leurs capacités mentales intactes, mais perdent l'usage des muscles à commande volontaire et l'issue est fatale après 3 à 5 ans d'évolution, par atteinte des muscles respiratoires ou liés à la déglutition (Holtcamp, 2012). La SLA n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. Il n'y a, à ce jour, aucun marqueur biologique spécifique de la maladie. Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments et l'élimination des diagnostics différentiels (myosite à inclusion, neuropathie motrice à blocs de conduction, myélopathie cervicarthrosique ...) (www.has.fr.) Un seul traitement validé existe : le Riluzole (antiglutamaergique) qui permet de ralentir la progression de la maladie. La SLA peut être sporadique ou familiale (Gordon et al., 1994 ; Traynor et al., 2000 ; Bensimon et al., 2014).

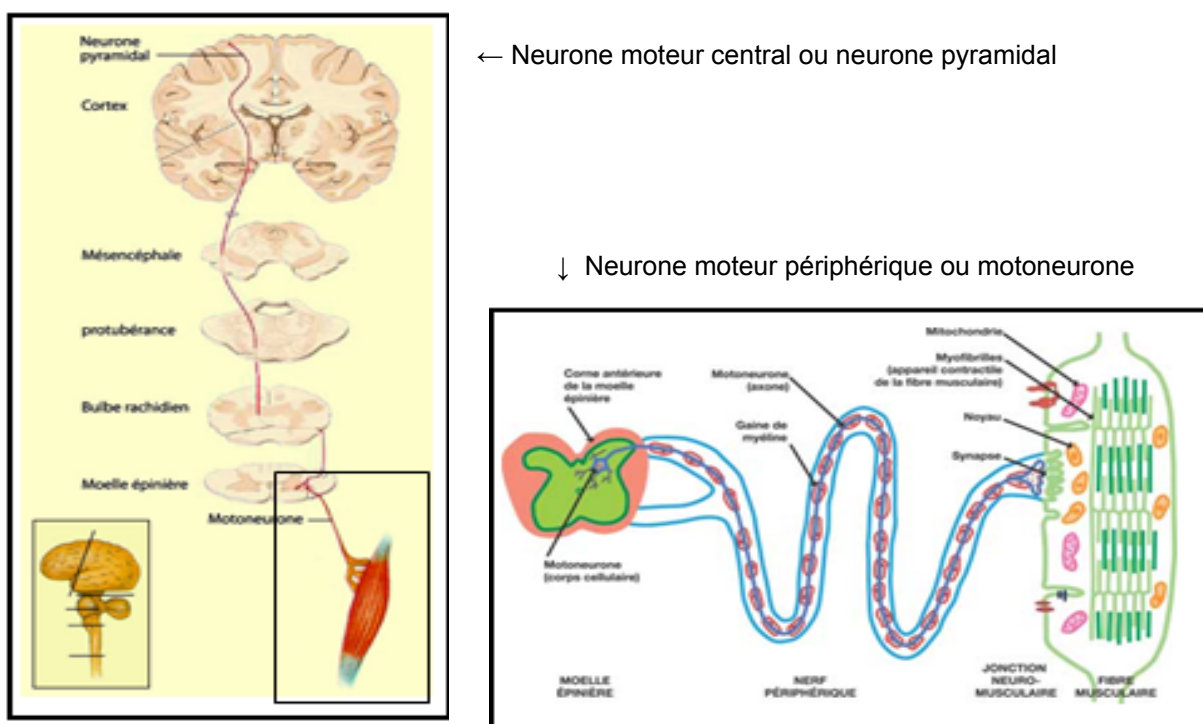


Figure 3 : Organisation du système moteur

http://lecerveau.mcgill.ca/flash/d/d_06/d_06_cl/d_06_cl_mou/d_06_cl_mou.html#1

<https://www.arsla.org/wp-content/uploads/2015/11/motoneurone-et-jonction-neuro-musculaire.jpg>

4.1.1 Les critères de la maladie

Les critères diagnostiques de la maladie ont été revus à plusieurs reprises afin de pouvoir adapter plus finement le diagnostic, d'inclure les patients dans des essais thérapeutiques et de faire des études épidémiologiques. Les critères d'El Escorial ont été définis et validés en 1995, puis révisés en 1998 (Brooks et al., 2000 ; Traynor et al., 2000 ; Costa et al., 2012).

Tableau 1 : Critères diagnostiques définis par Airlie House, ou critères El Escorial révisés (1998)

Définition El Escorial ou Airlie House	Définition clinique
SLA cliniquement certaine	Atteinte du NMC et du NMP dans 3 régions spinales ou 2 régions spinales et 1 bulbaire
SLA cliniquement probable	Atteinte du NMC et du NMP dans 2 régions au moins avec une atteinte du NMC rostral / NMP
SLA cliniquement probable étayée par des examens paracliniques	Atteinte du NMC + NMP dans 1 région étayée par des examens paracliniques ou NMC dans 1 région et NMP détectée par électroneuromyogramme dans au moins 2 membres
SLA cliniquement possible	Atteinte du NMC et NMP dans 1 région ou atteinte du NMC dans 2 régions ou atteinte du NMP rostral/NMC SLA suspectée exclue
SLA suspectée	SLA exclue

NMC = atteinte du neurone moteur central

NMP = atteinte du neurone moteur périphérique

En 2010 et 2012, les critères « el Awaji » ont été définis, prenant en compte les résultats de l'électroneuromyogramme pour la définition de la SLA « probable » (Carvalho et al., 2008 ; Costa et al., 2012).

Ces critères opérationnels, même s'ils représentent un cadre clair, sont parfois longs à établir. En effet, l'évolution du diagnostic de « SLA possible » à « SLA probable », ou de « SLA probable » à « SLA certaine » va être variable d'un patient à un autre. En outre, l'établissement d'un diagnostic certain correspond à un temps de survie de la maladie relativement court (généralement de 18 mois à 3 ans).

Les études épidémiologiques antérieures à 1995 ne tiennent pas compte de ces critères de diagnostic et ne peuvent pas être considérées avec un degré de fiabilité suffisante.

4.1.2 Anatomopathologie de la SLA

Les lésions macroscopiques

L'atteinte des cornes antérieures de la moelle épinière est constante mais d'intensité et de répartition variable selon les patients. La dépopulation neuronale est massive à tous les niveaux bulbaires cervicaux lombaires. La dépopulation neuronale s'accompagne d'une gliose astrocytaire. Les noyaux antérieurs de la moelle épinière sont majoritairement affectés et coexistent avec des neurones survivants. Les neurones bulbaires sont constamment affectés, l'atteinte de la voie pyramidale est variable selon les niveaux mais prédomine au niveau du renflement cervical au niveau médullaire. L'atteinte corticale prédomine sur la frontale ascendante, ou le gyrus précentral.

Les lésions microscopiques

L'atrophie du neurone est la lésion la plus fréquemment rencontrée avec la dépopulation neuronale.

La SLA fait partie des tauopathies. Le terme tauopathie regroupe une vingtaine de pathologies qui ont en commun l'existence de dépôts intracrâniens de protéine Tau et qui partagent des similitudes cliniques, pathologiques, biochimiques et génétiques (CHU Rouen John Libbey).

La principale caractéristique pathologique, centrale, de la SLA est la présence d'inclusions ou d'agrégats cytoplasmiques dans les neurones moteurs atteints et les oligodendrocytes environnants. Les inclusions ne sont pas limitées à la moelle épinière, mais sont aussi observées dans d'autres régions cérébrales telles que le cortex frontal et temporal, l'hippocampe et le cervelet. Les agrégats prédominants trouvés chez les patients atteints de SLA sont ubiquitinés.

Ces agrégats sont classés comme :

- des corps de Lewy,
- des inclusions hyalines,
- des inclusions skein-like.

D'autres anomalies cellulaires comprennent :

- la présence de vacuoles,
- des anomalies de la mitochondrie,
- la fragmentation de l'appareil de Golgi,
- des anomalies de la jonction neuro-musculaire.

A retenir

Le modèle lésionnel de la SLA est celui d'une dépopulation neuronale de la corne antérieure de la moelle épinière, de la voie pyramidale et de la région précentrale avec des lésions de tauopathie en microscopie. Ces lésions de tauopathie s'étendent au-delà des zones de la dépopulation neuronale.

4.2 Mécanismes physiopathologiques de la SLA

L'une des hypothèses de travail relatives à la physiopathologie de la SLA est une libération excessive de glutamate au sein des réseaux glutamatergiques, au caractère excitotoxique. Cette sur-stimulation de neurones post-synaptiques aboutit classiquement à la mort neuronale.

La cascade d'évènements cellulaires et moléculaires mises en œuvre dans la SLA est imparfaitement caractérisée. L'excitotoxicité induite par le glutamate semble au cœur des mécanismes à l'œuvre dans les dysfonctionnements cellulaires conduisant à la mort neuronale.

4.2.1 Fonction du glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majeur du système nerveux central, et joue un rôle crucial dans les fonctions cognitives, la plasticité synaptique, la croissance neuronale. La libération de glutamate se fait, comme pour les autres neurotransmetteurs, par dépolarisation membranaire et exocytose vésiculaire dans la fente synaptique. Ses effets rapides impliquent principalement les récepteurs ionotropiques (AMPA, kaïnate et NMDA), c'est-à-dire des récepteurs-canaux ioniques, mais il existe également des récepteurs métabotropiques (mGluR) à cinétique lente (Figure 4). Les récepteurs AMPA et kaïnate sont activés uniquement par le glutamate ; les récepteurs NMDA sont activés par le glutamate et un co-agoniste (la D-sérine ou la glycine), et inhibés par le Mg^{2+} . Les récepteurs NMDA sont des récepteurs hétérotétramériques comportant deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2A-D (Paul & de Belleruche, 2015). Ils sont cationiques non-spécifiques,

c'est-à-dire qu'ils sont perméants aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} . L'élimination du glutamate est assurée par des transporteurs spécifiques présents dans la membrane des cellules neuronales et gliales.

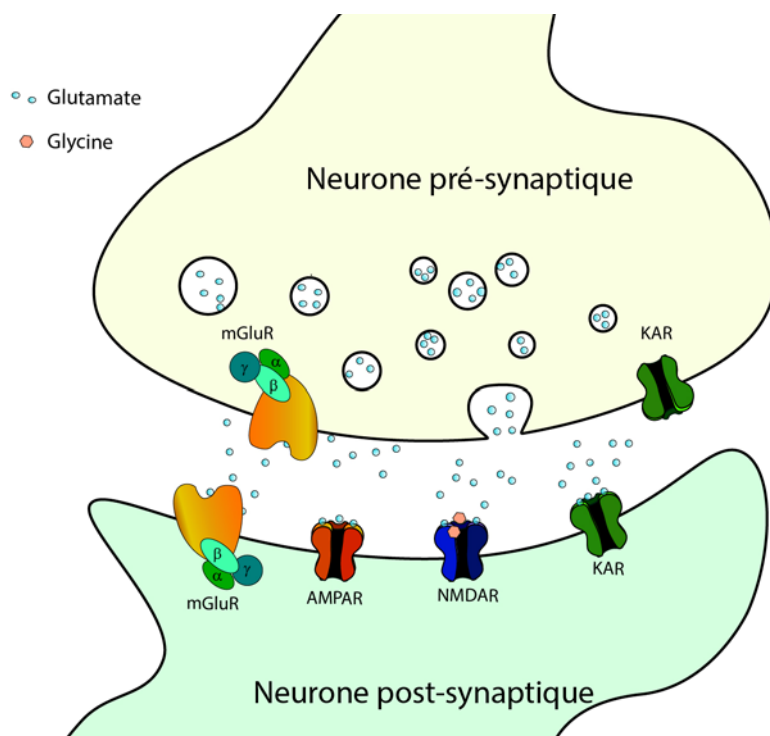


Figure 4 : Synapse glutamatergique dans le SNC. Le glutamate libéré à partir des vésicules pré-synaptiques diffuse dans la fente synaptique pour agir sur deux types fonctionnels de récepteurs: les récepteurs ionotropiques (AMPA, NMDA, Kaïnate) et les récepteurs métabotropiques de glutamate (mGluR), qui sont couplés à des protéines G (d'après Kalia et al., 2008).

La concentration intracellulaire de glutamate du cerveau est de l'ordre du millimolaire, en revanche la concentration de glutamate extracellulaire est beaucoup plus basse, quelques micromolaires, grâce aux transporteurs d'acides aminés excitateurs qui importent le glutamate et l'aspartate dans les astrocytes et les neurones (Lewerenz & Maher, 2015). Des taux anormaux de glutamate ont été mesurés dans le plasma de patients atteints de SLA (Plaitakis & Carosco, 1987 ; Rothstein et al., 1992). Des concentrations importantes de glutamate ont été relevées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients atteints de SLA (Boillee et al., 2006), qui s'avère toxiques pour des neurones *in vitro* (Roisen et al., 1982). Ces concentrations élevées de glutamate dans le LCR sont encore une source de débat.

Les motoneurones sont particulièrement sensibles à l'excitotoxicité du glutamate, en raison (i) de leur grande taille, (ii) d'une expression élevée de récepteurs de glutamate et (iii) de leur pouvoir tampon vis-à-vis du calcium. Ces taux élevés de glutamate sont dus, entre autres, à l'expression altérée du transporteur glial de glutamate EAAT2 (excitatory amino acid transporter 2) normalement responsable de l'élimination du glutamate à partir de la synapse (Rothstein, 1995). Ce mécanisme permet d'établir un lien de causalité entre les niveaux importants de glutamate synaptique, l'excitotoxicité et la mort neuronale. Le glutamate, en excès, se lie aux récepteurs NMDA et favorise un influx d'ions Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique : l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} active des enzymes, particulièrement des protéases, des phospholipases, des nucléases qui altèrent la membrane cellulaire, le cytosquelette, l'ADN, la fonction mitochondriale et conduisent à l'apoptose neuronale (Van Den Bosch et al., 2006).

4.2.2 Rôle de la transmission glutamatergique dans l'excitotoxicité

De nombreuses études ont mis en évidence des liens entre des altérations de la transmission glutamatergique et la physiopathologie de la SLA (Blasco et al., 2014). Par exemple, des mécanismes d'édition de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA sont altérés chez certains patients atteints de SLA ; une diminution du transport de glutamate et de l'expression du transporteur EAAT2 ont été décrits dans les tissus de patients décédés atteints de SLA ; la déplétion de ce transporteur dans des souris transgéniques conduit directement à la mort neuronale (Rothstein et al., 1995). Expérimentalement, des anomalies d'EAAT2 conduisant à sa perte de fonction sont retrouvées dans des animaux transgéniques portant une mutation de la SOD1 (superoxyde dismutase 1), qui est une mutation autosomique dominante héréditaire conduisant à des formes familiales de la SLA (Guo et al., 2003). La SOD1 est une enzyme antioxydante qui métabolise les radicaux superoxydes. Chez le rat surexprimant la SOD1, la recapture de glutamate est réduite et les concentrations de glutamate extracellulaires élevées (Dunlop et al., 2003). Réciproquement, la surexpression d'EAAT2 s'avère neuroprotectrice chez des souris transgéniques exprimant la SOD1 mutée ou *in vitro*, retardant l'apparition de déficits moteurs et la mort cellulaire, respectivement (Guo et al., 2003). La co-activation des récepteurs NMDA par le glutamate et la D-sérine a fait émerger celle-ci comme un biomarqueur possible de SLA. Des études ont par exemple montré que des taux élevés de cet acide aminé peuvent être observés chez des patients atteints de SLA et des animaux modèles (Paul & de Belleruche, 2012). L'excitotoxicité du glutamate se verrait ainsi renforcée par la D-sérine surproduite par les cellules gliales, favorisant la mort des motoneurons dans la SLA (Sasabe et al., 2007). Enfin, des mutations affectant le gène de la D-amino-acide oxydase (DAAO), une enzyme chargée de réduire la D-sérine, sont impliquées dans certaines formes familiales de SLA (Mitchell et al., 2010).

Le glutamate libéré par les neurones présynaptiques s'accumule dans la fente synaptique et active les récepteurs du neurone post-synaptique, notamment les motoneurons. Cette suractivation constitue le premier événement d'une cascade toxique aboutissant à la mort neuronale. L'ouverture des récepteurs ionotropiques du glutamate (Figure 4) induit un afflux d'ions Ca^{2+} dans les neurones post-synaptiques. L'augmentation élevée de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} est toxique pour les cellules neuronales via différents mécanismes. L'influx de cations à travers les récepteurs glutamatergiques dépolarise la cellule et induit l'ouverture de canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, ce qui aboutit à une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et favorise la génération de dérivés réactifs de l'oxygène, qui altèrent la structure de la cellule (Lipton & Rosenberg, 1994), en particulier les mitochondries, ce qui entraîne des perturbations dans le fonctionnement normal de la chaîne respiratoire, conduisant à l'épuisement des réserves énergétiques de la cellule et à la production de radicaux libres (Tapia et al., 1999). La déplétion des réserves calciques du réticulum endoplasmique est susceptible d'induire des défauts de repliement protéiques dans le réticulum et de contribuer à l'accumulation de protéines dans la cellule, tel qu'observé dans la SLA (Grosskreutz et al., 2010). Lorsque les systèmes-tampons du Ca^{2+} sont dépassés, le Ca^{2+} intracellulaire en excès suractive des enzymes intracellulaires Ca^{2+} -dépendantes, notamment des lipases, des phospholipases, des protéases, des endonucléases, des phosphatases de protéines, la protéine kinase C, de la xanthine oxydase et de l'oxyde nitrique synthase, qui perturbent davantage les fonctions neuronales. Cette cascade d'événements conduit à l'épuisement énergétique de la cellule, des dommages irréparables et l'activation d'enzymes pro-apoptotiques qui induisent la mort cellulaire. L'excès de glutamate extracellulaire peut conduire à une excitotoxicité aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* avec des conséquences rapides (accident vasculaire cérébral) via l'excès d'activation des récepteurs ionotropiques du glutamate. En outre, l'excitotoxicité chronique est supposée jouer un rôle moteur dans de nombreuses maladies neurodégénératives, comme la SLA (Lewerenz & Maher, 2015).

4.3 Les facteurs génétiques, les formes familiales et les formes héréditaires

Les formes familiales de la SLA représentent 5 à 10 % des cas (Boillée et al., 2006 ; Inserm, 2015).

Les caractéristiques cliniques, en général, ne séparent pas de façon fiable la SLA familiale de la SLA sporadique chez des patients individuels en raison d'un chevauchement phénotypique. Les antécédents familiaux, y compris l'histoire de la démence frontotemporale, aident à reconnaître une histoire familiale pour un patient atteint de SLA (Byrne et al., 2011).

La SLA est génétiquement hétérogène avec plus de 50 gènes potentiels ou modificateurs de la maladie identifiés, mais les gènes C9ORF72, SOD1, TARDBP et FUS représentent actuellement plus de 50% des variants de gènes liés à la SLA chez les patients atteints de SLA. Les autres variants sont rares. Les variants de gènes liés à la SLA peuvent être actuellement identifiés dans environ 60 à 70% des patients atteints de SLA familiale, une proportion susceptible de croître et un variant de gène SLA pathogène peut être trouvé chez une minorité croissante de patients atteints de SLA sporadique.

Le risque génétique pour la SLA représente probablement des effets combinés de multiples gènes, qui établissent la susceptibilité génétique globale d'une personne, agissant avec des effets environnementaux et aléatoires conduisant à l'apparition de la maladie (Hanby et al., 2011).

Dans une étude portant sur des jumeaux homozygotes qui incluaient des jumeaux avec ou sans antécédent de SLA chez d'autres parents, l'hérédité était estimée à environ 76% pour les jumeaux ayant des antécédents familiaux de SLA et environ 61% pour les jumeaux sans autre antécédent familial de SLA (Al-Chalabi et al., 2010).

Tableau 2 : Les critères de SLA familiale (adaptés de Byrne et al., 2011)

Classification ou degré de certitude	Histoire familiale
Définie	Plus de deux apparentés du 1° ou du deuxième degré atteints de SLA
	1 apparenté atteint de SLA avec un gène de coségrégation de la maladie
Probable	1 apparenté du premier ou deuxième degré atteint de SLA
Possible	1 apparenté du 3° degré ou au delà, atteint d'une SLA
	1 patient SLA sporadique mais porteur d'un gène pouvant donner la SLA
	1 apparenté du premier ou du deuxième degré avec une histoire de démence fronto-temporale DFT

Definitions : apparentés du premier degré = parents ; deuxième degré = grand-parents ; troisième degré = oncles, tantes

A retenir

La SLA est rare avant l'âge de 40 ans et augmente de façon exponentielle avec l'âge par la suite. L'âge moyen d'apparition est de 58-63 ans pour la SLA sporadique et 40-60 ans pour la SLA familiale, avec un pic d'incidence dans la tranche d'âge de 60-69 ans dans les formes sporadiques. 20 % des formes sont de présentation bulbaire. Les hommes ont un risque de SLA plus élevé que les femmes, avec un ratio homme/femme de 1,2-1,5 d'autant plus s'ils sont caucasiens. L'évolution de la maladie n'est pas linéaire mais curviligne, avec une aggravation en début et fin de maladie.

La survie moyenne est de 3 ans. De 5 à 10 % des formes sont familiales avec une résolution génétique pour 70% d'entre elles (35% de formes liées à des mutations du gène C9).

4.4 Incidence et prévalence de la maladie

Parce que l'homogénéité des critères de diagnostic est essentielle pour des comparaisons entre les différentes études, celles menées avant la publication des critères EI Escorial (avant 1995) ont été exclues. Certaines études tiennent compte des critères revisités EI Escorial 2000 et EL Awaji 2010. Quatre études récentes de synthèse tenant compte de cette méthodologie ont été retenues pour l'évaluation de l'importance de la maladie dans le monde (Chio et al., 2013 ; Marin et al., 2016 ; Mehta et al., 2016 ; Wagner et al., 2016).

Dans l'étude de Chio et al. (2013), une revue systématique a été menée pour identifier les études d'observation sur l'épidémiologie de la SLA publiées entre 1995 et 2011, en particulier celles qui évaluent l'incidence et la prévalence. Plus de 1700 articles ont été identifiés, seules 37 études ont été retenues pour leur robustesse méthodologique. L'incidence et la prévalence varient considérablement. Des taux d'incidence faibles déclarés pour l'Iran et la Chine pourraient être liés au caractère rétrospectif basé sur des dossiers hospitaliers comme seule source de données (biais de sélection). En revanche, le taux d'incidence élevé rapporté pour les îles Féroé reflète probablement une population à faible effectif, ce taux d'incidence plus élevé dans les îles Féroé peut également être due à un effet génétique basé sur la proximité des îles de la Scandinavie et de l'histoire de la colonisation par les Vikings. Les effets de minorité ne sont pas retrouvés en Europe/USA. Parmi les études européennes incluses dans cette analyse, il semble y avoir une tendance à une augmentation des taux d'incidence dans les pays de latitude plus élevée. Bien que le nombre d'études soit faible, le résultat est cohérent avec des preuves génétiques suggérant que le risque pour la SLA est le plus élevé dans les pays scandinaves et suit un gradient nord-sud. L'immigration et la migration ont également été citées comme des facteurs contribuant à l'évolution des taux d'incidence. Il apparaît également que la prévalence de la SLA soit plus élevée dans les zones à forte densité de population.

La prévalence de SLA aux Etats-Unis est de 4,3 pour 100 000, basée sur le registre de la maladie entre 2012 et 2013 (Mehta et al., 2016). La SLA touche les personnes de toutes les ethnies. Plusieurs facteurs de risque potentiels pour la SLA ont été identifiés. Les hommes caucasiens, non-Hispaniques, âgés de plus de 60 ans, et ceux avec des antécédents familiaux de la maladie seraient plus susceptibles de développer la SLA. L'exposition aux métaux (par exemple, le plomb et le chrome), les pesticides et la BMAA ont également été associés à une augmentation de risque pour la SLA. Le service militaire continue d'être un facteur de risque possible pour la SLA, cependant, aucune preuve solide n'a été trouvée reliant l'étiologie avec le service militaire. D'autres facteurs de risque possibles ont été proposés tels que l'apport nutritionnel, l'utilisation de statines, l'exposition à des agents viraux, une activité physique intense, et les traumatismes (Mehta et al., 2016).

Cette étude américaine a été complétée par une étude limitée à trois Etats et sept grandes villes (Wagner et al., 2016) représentant environ 27% de la population des Etats-Unis. La répartition ethnique combinée de ces zones est de 64,4% de type caucasiens, 16,0% d'Afro-américains, 6,7% d'asiatiques et 28,3% d'origine hispanique. La plupart des neurologues inclus dans l'étude ne diagnostiquent ou ne fournissent pas de soins aux patients atteints de SLA (étude réalisée avec des neurologues sans *a priori* sur le diagnostic de la maladie). Le taux moyen brut annuel d'incidence était de 1,52 pour 100 000 personnes-années, avec un intervalle de confiance (IC) entre 1,44 et 1,61, et le taux de prévalence 2009 était de 3,84 pour 100 000 habitants, IC 3,70 à 3,97. En conclusion, cette étude représente le plus grand nombre de patients atteints de SLA diagnostiqués cliniquement, rapportés par les neurologues, aux Etats-Unis, qui complète les données du Registre national de la SLA, permettant d'aider à évaluer l'exhaustivité des bases de données administratives. Il n'y a pas de différence significative de prévalence ni de représentativité de la population par rapport à l'étude globale de Mehta et al. (2016).

Une meta-analyse a été menée par Marin et al. (2016) qui a permis de calculer l'incidence standardisée sur l'âge et le sexe dans 45 régions du monde. Parmi les 3216 études, 44 publications

ont été retenues, couvrant 45 zones géographiques. L'incidence brute de la SLA au niveau mondial était de 1,75 (IC= 1,55 à 1,96) / 100 000 et de 1,68 (1,50 à 1,85) / 100 000 après standardisation.

Il existe toutefois une hétérogénéité dans les incidences standardisées de l'Europe du Nord [1,89 (1,46 à 2,32) / 100 000] et l'Asie de l'Est [0,83 (0,42 à 1,24) / 100 000] ou l'Asie du Sud [0,73 (de 0,58 à 0,89)/100 000). Inversement, des taux homogènes ont été signalés dans les populations d'Europe, d'Amérique du Nord et la Nouvelle Zélande [incidence standardisée de 1,81 (1,66 à 1,97) / 100 000).

4.5 Etudes des facteurs de risque associés à la SLA (gène-environnement, susceptibilité, hypothèse prion et « misfolding » des protéines)

Une étude réalisée par Factor-Litvak et al. (2013) analyse les résultats d'études épidémiologiques réalisées sur des populations à grande échelle basée sur des études prospectives et des études cas-témoins sur la base du registre de la maladie aux Etats-Unis. Cette étude synthétise les différentes avancées en termes d'identification de facteurs de risque. La recherche sur PubMed a permis d'identifier plus de 1000 publications avec les mots clés SLA et épidémiologie. Ces études ont fourni des informations sur les caractéristiques sociodémographiques, le phénotype de la maladie et la variation géographique des cas de SLA. Des études cas-témoins ont examiné les facteurs de risque tels que l'exposition au plomb, le tabagisme et l'exposition aux pesticides. Plusieurs études de cohortes prospectives ont également identifié des risques et les facteurs de protection. Mais toutes ces études comportent des limites et des biais pour cette maladie relativement rare et rapidement fatale. Les biais de sélection sont importants dans les études cas-témoins avec une tendance à sélectionner des cas avec un temps de survie long. Une autre limite est la définition exacte de la maladie (phénotype). Une analyse des échantillons biologiques dans les études cas-témoins exige une grande prudence dans l'interprétation des résultats, car le temps d'exposition est long avant l'apparition de la maladie, et la cinétique concernant la biodisponibilité des contaminants et leur métabolisation rend l'évaluation des expositions complexe (Taylor et al., 2016).

Plusieurs facteurs de risque semblent associés au développement de la maladie (Inge et al., 2015 ; Bryan et al., 2015). Ceux pour lesquels des études ont pu évaluer le risque relatif sont présentés ci-dessous.

L'activité physique intense est documentée à travers plusieurs études dont deux (Chio et al., 2008 ; Behgi et al., 2010), l'une sur des marathoniens en Irlande (Hardiman, Dublin) et l'autre sur des footballeurs professionnels en Italie, évaluent un risque relatif 20 fois plus élevé dans ces cohortes par rapport à la population générale. Plusieurs hypothèses sont avancées notamment concernant les compléments alimentaires. Bien que l'hypothèse selon laquelle le sport contribue à la SLA soit basée sur des risques relatifs forts, il faut être prudent dans l'interprétation de ces résultats, car la grande majorité des études est basée sur un petit nombre de cas de SLA.

Les métaux. Une revue systématique récente a analysé 50 études traitant de la relation entre les métaux et la SLA ; seulement 3 études ont suggéré une association significative dont une concernant l'exposition au sélénium avec une estimation du risque relatif à 5,72, (IC à 95% 1,46 à 15,57). Par ailleurs, des hypothèses de facteurs génétiques de susceptibilité par rapport à l'exposition à des métaux lourds sont proposées (Vinceti et al., 2012).

Les métiers. Certaines professions impliquent potentiellement les expositions à des produits chimiques, des pesticides, des métaux, et les champs électromagnétiques, par exemple la population militaire (Umbach et al., 2009).

Les pesticides sont largement utilisés dans le monde entier et peuvent être mesurés dans diverses concentrations dans l'air, la nourriture et l'eau. Une association entre l'utilisation de pesticides et la

SLA a été explicitement suggérée dans des études, dont deux études récentes en Inde et aux Etats-Unis (composés organochlorés, pyréthroïdes, herbicides et fumigants spécifiquement). Dans la méta-analyse, l'utilisation des pesticides a été montrée comme étant significativement associée à un risque plus élevé de SLA (risque relatif estimé par des études cas-témoins de 1,88, IC=1.36–2.61), bien que cette dernière étude suggère une association spécifiquement masculine (Goutman et al., 2016).

Les études de conjoint. Une seule étude décrit l'existence de 9 couples atteints de SLA vivant depuis plus de 10 ans ensemble, dont 2 dans la même ville et 3 dans le même département (Corcia et al., 2003) laissant suggérer un rôle des habitudes de vie.

La transmission selon un processus de type prion, l'attribut infectieux du « misfolding » des protéines

Les maladies à prions ou encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) sont un groupe de troubles neurodégénératifs mortels affectant plusieurs espèces de mammifères. Son agent causal, la protéine prion associée à la maladie (PrPd), est une conformation aberrante riche en feuillets β de la protéine prion cellulaire (PrPc) avec des propriétés d'auto-propagation (transconformation autocatalysée PrPc \rightarrow PrPd) propices à l'agrégation, capables d'induire un mauvais pliage de molécules PrPC et une neurotoxicité par accumulation de ces agrégats au niveau intraneuronal.

PrPd est le principal constituant des prions et, surtout, est le premier exemple connu d'une protéine avec des attributs infectieux.

Il a été suggéré que des mécanismes moléculaires similaires pourraient être partagés par d'autres protéines impliquées dans des maladies neurodégénératives telles que la SLA.

Deux protéines de liaison à l'ARN, TDP-43 et FUS, agrégées dans les neurones moteurs dégénératifs de patients atteints de SLA, et des mutations dans les gènes codant pour ces protéines, sont impliquées dans certaines formes de SLA. TDP-43 et FUS, et plusieurs protéines de liaison à l'ARN apparentées, abritent des domaines de type prion favorisant l'agrégation et qui leur permettent de s'auto-associer rapidement (Udan & Baloh, 2011). Ces propriétés seraient nécessaires à la formation de granules de stress cellulaires (Li et al., 2013). La forme normale de TDP-43 s'associerait en oligomères spécifiques, mais de façon réversible et uniquement dans certaines conditions. Les mutations du gène de TDP-43 associées à la SLA pourraient favoriser l'agrégation de cette protéine de façon irréversible et/ou son accumulation sous forme amyloïde (Lim et al., 2016). *In vitro*, la forme agrégée et pathologique de la protéine TDP-43 isolée de cerveau de patients atteints de SLA semble capable de se propager en changeant la conformation des molécules natives de TDP-43 au sein de cultures de cellules. Ce phénomène semble être transmissible de cellule à cellule, rappelant les phénomènes de type prion (Nonaka et al., 2013).

De même, la protéine SOD mal repliée (« misfolding ») ou mal conformée par mutation génétique peut propager le repliement erroné et l'agrégation de la SOD1 endogène de type sauvage. Les SOD1 de type sauvage et mutantes mal repliées peuvent se transmettre de cellule à cellule, soit sous forme d'agrégats protéiques qui sont libérés des cellules mourantes et absorbés par des cellules voisines par macropinocytose, soit en association avec des vésicules qui sont libérées dans l'environnement extracellulaire. Une fois que le mauvais repliement de la SOD1 de type sauvage a été initié dans une culture de cellules humaines, il peut induire un mauvais repliement dans des cultures de cellules naïves, même après de nombreux passages (Silverman et al., 2016).

A retenir

Aucun facteur de risque environnemental ne ressort clairement identifié pour la SLA par opposition à d'autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson. Il se peut que des facteurs multiples soient intriqués. La difficulté d'identification des facteurs externes vient des études sur de faibles cohortes, l'absence de questionnaire sur les habitudes de vie de valeur internationale étudié à grande échelle. Le rôle des transmissions de type prion n'est pas récusé mais paraît être intriqué parmi d'autres facteurs.

4.6 Facteurs de risque spécifique à la BMAA

4.6.1 L'île de GUAM, la cohorte la plus caractéristique

L'île de Guam montre l'isolat historique de la SLA le plus sévère avec une incidence de 200/100 000 dans les années 1950, que l'on retrouve chez les Kii et les Papous (Waring et al., 2004 ; Kuzuhara et al., 2005 ; Spencer et al., 1987, 1991, 2005), soit une incidence 50 à 100 fois supérieure au niveau moyen mondial. Les travaux sur cet exemple sont nombreux, il en ressort les points suivants.

La forme de SLA associée au complexe Parkinson-démence (ALS-PDC en anglais ou SLA syndrome parkinsonien) a été décrite comme une pierre de Rosette qui porte la clé essentielle pour comprendre l'étiopathogénie des trois maladies neurodégénératives liées. Les trois formes cliniques (SLA, syndrome parkinsonien atypique avec démence et la démence seule) ont une seule pathologie (tauopathie), tout comme la pierre de Rosette est inscrite avec trois scripts distincts portant un message commun. Comme discuté dans la littérature (Spencer et al., 1981, 1987, 1991 ; Kisby & Spencer, 2011), les études de la SLA-syndrome parkinsonien dans les trois populations géographiquement isolées et génétiquement distinctes insulaires (Chamorro de Guam, Japonais dans la péninsule de Kii de l'île de Honshu, et Papous de Nouvelle-Guinée en Irian Jaya, Indonésie) montrent que :

La SLA-syndrome parkinsonien SLA-PDC est principalement, sinon exclusivement, une maladie environnementale : aucune mutation de gènes identifiée dans les troubles neurodégénératifs apparentés n'est rapportée dans les cas de Guam et Kii-Japon, et les taux de maladie ont diminué de façon constante dans les trois populations touchées. Les émigrants de Guam peuvent développer la SLA-syndrome parkinsonien des années ou des décennies plus tard, mais le risque de développer la maladie est absent dans leur progéniture née et vivant à l'étranger. A l'inverse, les Philippins et les autres immigrants qui adoptent le mode de vie Chamorro à Guam peuvent acquérir la maladie.

Comme l'incidence de la SLA-syndrome parkinsonien SLA-PDC a diminué au cours du XXe siècle, la maladie a changé son tableau clinique au cours du temps : SLA dans le premier tiers de la vie, à syndrome parkinsonien dans le deuxième, et démence dans le troisième, un modèle compatible avec un modèle de réponse clinique liée à un effet dose/exposition environnementale, en déclin avec le changement de vie vers la modernisation. Avec cette hypothèse, les patients qui ont la plus forte exposition au facteur environnemental vont développer la SLA mortelle (avec des dommages nigro sub-clinique) relativement peu de temps après l'exposition. Ceux exposés à des doses intermédiaires survivent assez longtemps pour développer un syndrome parkinsonien atypique avec une amyotrophie. Ceux exposés à de faibles doses peuvent atteindre la vieillesse avec le développement de démence, tandis que d'autres avec la plus faible exposition ont une maladie subclinique neurofibrillaire qui pourrait rappeler le vieillissement précoce. D'autres caractéristiques de la SLA-syndrome parkinsonien comprennent la perte de l'olfaction, une rétinite pigmentaire épithéliopathie, et des modifications cutanées.

Le facteur déclenchant selon les auteurs serait l'exposition à la BMAA ou autres neurotoxines dérivées de plantes dans les aliments ou l'application d'onguents, ou les deux. La graine brute de cycas a été utilisée pour guérir les lésions cutanées (Guam, Irian Jaya) et comme tonique (Kii). A Guam, les graines de cycas étaient un aliment de base de la population Chamorro, et la chauve-souris (*Pteropus sp*), qui selon les auteurs accumulerait la BMAA issue de cycas, était un mets particulièrement apprécié (Banack et Cox, 2003^{NS}). Le GT « BMAA » souligne que ces données ont été obtenues à l'aide de méthodes analytiques classées NS au regard des critères strictes de sélection des méthodes. Il est regrettable que les dosages n'aient pas été corroborés par une analyse plus récente. En effet, la présence de BMAA dans des graines de cycas achetées en France a été récemment mise en évidence selon une méthode analytique plus satisfaisante (Communication personnelle de V. Pichon) ainsi que dans des feuilles de *Cycas debaoensis* achetés au Canada (McCarron et al., 2014^{MS}).

Parmi les nombreux produits chimiques bioactifs dans les graines de cycas, deux possèdent des propriétés neurotoxiques qui peuvent être considérés comme déclencheurs potentiels de la SLA-PDC. Il s'agit :

(a) de la méthylazoxyméthanol (MAM), un cancérigène et neurotoxique du développement stocké dans la plante. La concentration dans la farine de cycas serait en corrélation significative avec les taux d'incidence de la SLA-PD chez les hommes et les femmes à Guam comme le suggère certaines études (Zhang et al 1996 ; Roman 1996 repris dans Spencer et al., 2016) Le GT « BMAA » n'a toutefois pas évalué si la détection de cette toxine présentait les mêmes difficultés que celles soulevées par la BMAA et développé dans le chapitre 3.

(b) de la BMAA.

Les patients de l'île de Guam pourraient avoir un ou plusieurs gènes de susceptibilité à l'action de la BMAA. Un polymorphisme dans la séquence de deux gènes codant pour des canaux ioniques (TRPM7 et TRPM2) a été évoqué chez certains patients de l'île de Guam (Hermosura et al., 2005, 2008) et ayant une influence sur le degré d'activation de ces canaux. Pour l'un de ces variants (TRPM2), ce phénomène serait légèrement amplifié en présence de BMAA (Hermosura et al., 2008).

Dans les cerveaux des patients de l'île de Guam, la BMAA a été déclarée présente sous forme libre et liée à la fraction protéique (moyenne de 627 +/- 141 mg/kg sous forme liée sur 5 patients de Guam atteints du syndrome parkinsonien et un patient de Guam atteint de SLA) dans les travaux de Murch et al., (2004)^{NS} cités dans Pablo et al., (2009)^{NS}. Là encore, il est regrettable que les dosages aient été réalisés selon une méthodologie jugée non fiable par le GT « BMAA » du point de vue qualitatif et quantitatif et n'aient pas été confirmés par des analyses plus récentes.

Les études des cerveaux (cortex frontal et hippocampe) et des cordons médullaires des patients des cas historiques de Guam, Kii et Rota.

Les caractéristiques cliniques et neuropathologiques de cette maladie sont les mieux étudiées chez les populations Chamorros des îles Mariannes de Guam et Rota et parmi les Japonais vivant dans la péninsule de Kii de l'île de Honshu, au Japon. Les moins étudiées et sans confirmation par autopsie concernent un troisième isolat, de l'ouest du Pacifique, de complexe SLA syndrome parkinsonien parmi les groupes linguistiques Auyu et Jaqai, des basses terres du sud de la Papouasie occidentale (partie indonésienne de l'île de Nouvelle-Guinée). Les études sont très controversées depuis 1992, avec un postulat de base : la SLA ou ALS/PDC de Guam serait une maladie neurodégénérative progressive caractérisée par des enchevêtrements neurofibrillaires abondants (NFTS) et des filaments hélicoïdaux agrégés appariés (PHF). Le cerveau affecté accumule de nombreux types de dépôts intracellulaires anormaux (synucléine, β -amyloïdes, TDP-43), mais il est dominé par des dépôts de protéine Tau associée aux microtubules (MAPT), et donc inscrit dans la classe neuropathologique moléculaire de tauopathies. Ces filaments anormaux ressemblent aux PHF dans les lésions neurofibrillaires de la maladie classique d'Alzheimer, et des études récentes ont démontré que la protéine Tau des patients de SLA-PDC de l'île de Guam est phosphorylée et biochimiquement semblable aux protéines Tau anormales (PHFtau) de la maladie d'Alzheimer classique.

Les lésions histologiques et ultrastructurales caractéristiques des organismes de Bunina retrouvés chez les patients atteints de SLA et de SLA syndrome parkinsonien dans l'île de Guam étaient similaires à ceux rapportés dans la forme classique de la SLA. La répartition des inclusions des cas de SLA de Guam et des patients SLA-PDC était similaire à celle rapportée à ce jour dans la SLA classique. Enfin, les corps d'inclusion en écheveau « skein-like » ont été observés dans les cellules de la corne antérieure de la moelle épinière des cas de SLA de l'île de Guam ainsi que chez les cas de SLA-PDC. Ces résultats indiquent que la SLA de l'île de Guam est la forme classique de la SLA d'un point de vue autopsique.

A retenir

Le modèle lésionnel de la SLA de la forme de Guam est similaire à celui de la SLA classique. La cohorte de Guam est rapportée liée à des toxines alimentaires. Le comportement reproduit la maladie, la modification du comportement alimentaire supprime la maladie, la BMAA est retrouvée comme liée à cette alimentation. Il persiste une ambiguïté par son dosage décrit dans des études de méthodologie non améliorée aux vues des méthodes analytiques qui répondent aux critères développés dans le chapitre 3. Il persiste une controverse sur son dosage en intracérébral.

4.6.2 Etudes explorant un lien entre SLA et BMAA

La BMAA a été analysée dans des échantillons de cerveaux de patients américains décédés et diagnostiqués comme étant atteints de maladie d'Alzheimer, de sclérose latérale amyotrophique (SLA), de maladie de Huntington, et des contrôles sans maladie neurologiques (Pablo et al. 2009^{NS}). Cette étude a été jugée NS par le GT « BMAA » en raison de l'absence de suivi de la transition spécifique pour la BMAA en LC-MS/MS, le GT « BMAA » estime néanmoins que le faisceau de présomption va dans le sens de la présence de BMAA liée (ou un analogue DAB, BAMA ou AEG) dans les cerveaux SLA et de maladie d'Alzheimer. Des échantillons de cerveau *postmortem* ont été prélevés sur des cas confirmés par examen neuropathologique de 13 patients atteints de SLA, 12 patients atteints de maladie d'Alzheimer, 8 atteint de maladie de Huntington et 12 contrôles non neurologiques de même âge. La BMAA aurait été détectée dans les neuroprotéines provenant du tissu cérébral (cortex frontal et temporal, moelle épinière) de patients qui sont morts de maladie d'Alzheimer (111+/- 15 mg/kg) et SLA sporadiques (134 mg/kg) mais pas de maladie de Huntington. Pour les auteurs, la détection de BMAA dans la SLA et la maladie d'Alzheimer pourrait suggérer une interaction gène/environnement. La BMAA aurait, dans ce cas, un rôle déclenchant de la neurodégénérescence chez les personnes vulnérables. Toutefois, une étude récente réalisée à l'aide d'une méthode plus satisfaisante relate l'absence de BMAA dans des cerveaux de patients décédés de maladie d'Alzheimer (Meneely et al, 2016^{NS}, cf paragraphe 3.4). Cette hypothèse est donc à relativiser au moins pour la maladie d'Alzheimer.

Une étude récente a montré la présence de BMAA dans le liquide céphalorachidien prélevé *antemortem* chez un patient atteint de SLA (Berntzon et al., 2015^{TS}). La toxine a été dosée par HPLC/MS/MS : elle n'a pas été détectée dans le sang mais détectée dans le LCR d'un patient SLA et deux personnes sans SLA (soit au total 12% des échantillons testés). Ces données montrent la capacité de la BMAA à franchir la BHE (voir aussi paragraphe 5.1).

Deux études menées sur un nombre limité de patients atteints de SLA (3 patients à Annapolis (USA) (Field et al., 2013^{MS}) et un patient en Floride (Banack et al., 2014^{MS}) ont mis en évidence la présence de BMAA dans les crabes bleus et les homards consommés par ces patients. Ces résultats ont permis aux auteurs de conclure que la présence de BMAA dans la chaîne alimentaire et la consommation fréquente et régulière de crustacés peut être un facteur de risque commun pour la SLA sporadique.

L'association éventuelle entre la prolifération de cyanobactéries et le développement de la SLA a été étudiée dans le New Hampshire (Caller et al., 2009^{NS}). A partir de bases de données sur la maladie et les données démographiques, il est apparu que neuf patients diagnostiqués avec SLA vivaient près d'un lac, et que l'incidence de SLA sporadique y est de 10 à 25 fois supérieure à l'incidence prévue de 2/100 000 / an. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'incidence élevée de la SLA dans cette zone pourrait être directement liée à l'exposition chronique aux neurotoxines des cyanobactéries telles que la BMAA (mais selon une méthode jugée non fiable du point de vue qualitatif et quantitatif). Les voies hypothétiques d'exposition aux toxines seraient selon les auteurs l'inhalation de toxines en aérosol, la consommation de poisson ou l'ingestion d'eau du lac.

Une analyse d'un ensemble d'études épidémiologiques pour documenter le développement de la SLA et les facteurs de risque environnementaux (métaux lourds, traumatismes, pesticides, chocs électriques, rayonnement électromagnétique et la BMAA) a été réalisée par Caller et al. (2009^{NS}).

Certaines de ces études utilisent des techniques d'analyse spatiale qui examinent des cas groupés de la SLA et peuvent aider à orienter la recherche sur l'identification des expositions environnementales. Malgré l'identification des disparités géographiques dans la distribution des cas de SLA, ces études n'ont pas fourni d'associations claires avec les facteurs environnementaux.

Des cas groupés de SLA ont été décrits dans l'Hérault autour d'un étang conchylicole de Thau à partir de la base de données du centre de référence de la maladie entre 1994 et 2009 (zone de surincidence de SLA de 5,1/100000). La BMAA a été quantifiée dans des prélèvements réalisés à Thau en 2009 d'huîtres (0,6 mg/kg à 1,6 mg/kg) et de moules (1,8 mg/kg à 6,0 mg/kg) par Masseret et al. (2013^{NS}) selon une technique jugée non fiable. Toutefois, ces résultats ont été corroborés par une technique classée fiable (Reveillon et al, 2014^{TS}). Néanmoins, il n'est pas possible d'établir un lien direct entre la présence de BMAA dans des coquillages consommables prélevés en 2009 et les cas de SLA dépistés entre 1994 et 2009 dans la même zone géographique. D'ailleurs l'étude ne fournit pas d'estimation de l'exposition des patients atteints de SLA à la BMAA.

4.6.3 Etude BMAALS

L'étude BMAALS financé par l'ANR visait à explorer l'hypothèse d'une exposition à la BMAA comme l'origine de la survenue de cas groupés de SLA en France. Comme mentionné dans le rapport final BMAALS rendu à l'ANR (été 2016) il est indiqué que :

Les problèmes posés par cette recherche étaient (i) d'identifier de façon exhaustive les cas incidents de SLA (forme sporadique et familiale) dans une zone géographique (10 départements Français) et une période temporelle définie (2003-2011), (ii) de réaliser des prélèvements environnementaux à proximité des lieux de résidence des patients atteints de SLA, (iii) de mettre au point une méthode d'analyse et de quantification de la L-BMAA au niveau de différentes matrices et en particulier dans le cerveau de patients décédés de SLA.

Les solutions recherchées étaient (i) d'identifier tous les cas incidents de SLA entre 2003 et 2011 dans 10 départements Français au travers d'un système multiple source, (ii) de les localiser sur le plan géographique, (iii) de rechercher la présence éventuelle de cas groupés de la maladie (iv) de réaliser des prélèvements environnementaux (eaux, aliments) (v) de réaliser la quantification de L-BMAA dans les différents prélèvements environnementaux et de cerveaux de patients SLA.

Les retombées étaient de disposer en France d'une méthode de dosage de la L-BMAA et de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse de l'implication de la L-BMAA dans le développement de la SLA et donc de clarifier le risque potentiel pour l'homme de l'exposition à cette toxine.

Approches épidémiologique, géoépidémiologique, microbiologique et de chimie analytique

Plusieurs sources d'identification des cas de SLA ont été utilisées: base de données nationale des Centres SLA Français, données médico-administratives relatives aux séjours hospitaliers (données du Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information des établissements de santé), données d'assurance maladie (Affection de longue durée n°9 avec code G12).

Des analyses géo-épidémiologiques ont permis d'identifier des zones éventuelles de sur-incidence de la maladie, non expliquées par le hasard ni par un facteur génétique. Des entretiens de patients atteints de SLA et de témoins sains appariés, à l'aide de questionnaires ont permis de guider la phase des prélèvements environnementaux.

En raison de la description, dans la littérature, de plusieurs méthodes de dosage de la BMAA et d'une controverse sur ces dernières, une méthode reproductible et sensible de dosage par LC/MS/MS a été mise au point par l'équipe de l'ESPCI à Paris. Celle-ci repose sur une approche qui évite la dérivation et élimine donc le risque de faux positifs. Des étapes de traitement de l'échantillon ont aussi été développées et adaptées aux différents types d'échantillons à traiter. Cette longue phase était rendue complexe en raison de la multiplicité des matrices à analyser. De façon parallèle, l'approche microbiologique avait pour objectif d'identifier des souches de cyanobactéries productrices de BMAA et si possible, déterminer la voie de biosynthèse de cette molécule

Résultats majeurs du projet

Le nombre de cas incidents atteints de SLA sur un nombre total de personnes-années de 47 millions était de 1199. L'incidence standardisée de la SLA sur la population européenne était de 2,46 (2,31-2,63)/100 00 PA.

L'analyse géo-épidémiologique a identifié un cluster certain avec 100 cas de SLA (pour 54.1 attendus), 5 zones de sur-incidence probable et 7 zones de sur-incidence possible. Peu de ces espaces de sur-incidence sont restés stables à l'issue du test de robustesse qui excluait les cas de SLA avec antécédents familiaux.

Les travaux de chimie analytique ont mis au point une méthode de dosage sans étape supplémentaire de dérivation. Une approche basée sur l'utilisation des polymères à empreintes moléculaires pour le traitement sélectif des échantillons a également été mise en place. La recherche de L-BMAA, par LC/MS/MS a abouti à des résultats négatifs pour l'eau de consommation et l'eau à usage domestique, les fruits et légumes. Des traces ont été retrouvées dans 2 champignons et dans 8 des 20 cultures de souches pures de cyanobactéries testées.

La recherche dans 10 cerveaux de patients décédés de SLA (ayant donné de leur vivant leur consentement pour les prélèvements et leur analyse) était négative. La 2,4-DAB, un composé présent dans la membrane des bactéries était présente dans quelques échantillons (la 2,4 DAB est considérée comme la cause d'une quantification erronée de L-BMAA dans les études ayant réalisé une dérivation au cours de l'étape analytique). Le 2,4-DAB a été retrouvé en concentration significative dans plusieurs cultures de souches de cyanobactéries. »

Selon les auteurs du rapport (été 216), « les résultats ne sont globalement pas en faveur d'un risque cyanotoxine L-BMAA au regard de la survenue de SLA, en raison:

- (i) de la faiblesse du risque d'exposition humaine (153 échantillons environnementaux négatifs, 2 prélèvements positifs (traces),
- (ii) de l'absence de lien identifié entre zones de sur-incidence de SLA et la présence de L-BMAA dans l'environnement,
- (iii) de l'absence de L-BMAA dans les prélèvements humains (10 cerveaux de patients décédés de la SLA). »

Toutefois le GT « BMAA » identifie des limites aux conclusions énoncées ci-dessus :

- i) la liste des matrices (eau de boisson, eaux de sources, biofilm, potager, champignon, châtaignes, pissenlits) n'est pas représentative des contributeurs supposés majoritaires (notamment pour l'étang de Thau, zone de production d'huîtres et de moules).
- ii) cette conclusion ne prend pas en compte les résultats d'études scientifiques publiées au cours de l'ANR et ayant montré la présence de BMAA (libre et liée) dans les coquillages de l'étang de Thau (huîtres et moules) au voisinage d'une zone de surincidence de SLA dans l'Hérault de 5,1/100000 (Masseret et al., 2013^{NS}, Réveillon et al. 2014^{TS})
- iii) l'absence de BMAA dans les prélèvements de cerveau correspond à la forme libre uniquement (les analyses n'ont pas porté sur la BMAA liée).

5 Données toxicologiques

5.1 Données sur la toxicocinétique et la toxicodynamique de la BMAA

5.1.1 Absorption

L'absorption orale a été étudiée chez deux espèces, le rat (Duncan et al., 1991^{NS}; Garner et al., 2013^{TS} données NTP non publiées transmises à l'Anses sous forme de poster) et le singe (Duncan et al., 1992^{NS}).

Dans l'étude de Duncan et al. (1991^{NS}), des rats Sprague-Dawley (SD) mâles adultes ont été répartis en 3 groupes (de 1 à 18 animaux par groupe) :

- Le premier groupe a reçu par voie intraveineuse (i.v.) une dose unique de 25, 100 ou 400 mg/kg p.c. de BMAA avec des dosages dans le plasma (25 minutes à 3 jours post-administration), dans les urines et les fèces (pendant 1 à 7 jours post-administration).
- Le deuxième groupe a reçu par voie orale (gavage) 100 mg/kg p.c. de BMAA avec des déterminations cinétiques de 0,25 min à 3 jours.
- Le troisième groupe a reçu en sous cutané (s.c.) 100 mg/kg de p.c. de BMAA pendant 7 jours avec détermination de l'état d'équilibre au niveau du plasma et des tissus.

La BMAA a été dosée par GC/MS avec dérivation, l'étalon interne étant la ³H-BMAA selon une méthode qualifiée MS par le GT « BMAA ». Après administration i.v., la BMAA serait rapidement éliminée du sang et la concentration plasmatique diminuerait à moins de 5% des valeurs initiales en 30 min. Une relation linéaire est rapportée entre la concentration plasmatique en BMAA et celle dans le cerveau (cortex, hippocampe, thalamus, moelle épinière) en fonction de la dose administrée i.v. Par voie orale, à la dose de 100 mg/kg p.c., la biodisponibilité serait proche de 80%, la C_{max} serait atteinte 5 min après administration. La demi-vie plasmatique comme celle des autres tissus serait comprise entre 0,45 et 0,70 jours. Par voie s.c, la concentration moyenne plasmatique après 7 jours d'exposition serait de 9,5 mg/L (Duncan et al., 1991^{NS}).

Dans l'étude de Garner et al. (2013^{TS}) chez le rat SD par voie orale, une biodisponibilité supérieure à 70% est également observée à l'aide de BMAA radiomarquée (¹⁴C-BMAA) après une administration par gavage d'une dose de 1 mg/kg p.c./jour pendant 1, 5 ou 10 jours (nombre de rats par groupe non précisé). Les urines et les fèces ont été collectés pendant 72h après la dernière administration puis les rats ont été euthanasiés et les tissus prélevés.

Dans la l'étude de Duncan et al. (1992^{NS}), des singes cynomolgus (macaques) ont reçu par gavage soit 2 mg/kg p.c. (3 animaux) soit 90 mg/kg (1 animal) de BMAA. Parallèlement, une injection i.v de ¹⁵N-BMAA a été pratiquée (1 mg/kg p.c.). La biodisponibilité orale a été estimée de 72 à 83% à la faible dose et à 100% pour la forte dose. Environ 20% de la dose subirait un effet de premier passage hépatique (Duncan et al., 1992^{NS}).

5.1.2 Distribution

Dans l'étude de Duncan et al. (1991^{NS}) chez le rat SD, 8h après administration par voie orale d'une dose unique de 100 mg/kg p.c. de BMAA, la concentration moyenne dans le cerveau (cortex) serait de 3,6 mg/kg. Après administration unique i.v. de la même dose, il est rapporté une concentration dans les tissus périphériques (foie/rein/muscle) entre 20 à 500 mg/kg dépassant rapidement les concentrations plasmatiques d'un facteur 3 à 50. Les concentrations dans le cerveau seraient plus limitées (entre 4 et 10 mg/kg) 2h après injection et assez hétérogènes. Le tronc cérébral au niveau du pont, le thalamus et le cervelet auraient les concentrations les plus élevées tandis que la moelle

épine, le cortex et le liquide céphalo-rachidien auraient les concentrations les plus faibles. Après administration s.c. d'une dose identique pendant 14 jours, la distribution cérébrale serait plus élevée (10 à 30 mg/kg) soit 2 à 3 fois supérieures aux valeurs observées après administration unique en i.v, le thalamus et l'hippocampe montrant les concentrations les plus élevées.

Dans l'étude de Garner et al. (2013^{TS}) chez le rat SD avec de la ¹⁴C-BMAA administrée par voie orale, en administration unique, la radioactivité est retrouvée au niveau du foie, du tissu adipeux, des muscles et de la peau. Moins de 0,01% de la dose est retrouvée dans le cerveau. Après administration unique ou répétée, 50 à 60% de la radioactivité serait présente sous forme liée aux protéines dans les tissus.

Le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) a fait l'objet de plusieurs études. Chez le rat Wistar mâle, l'administration s.c. de BMAA à une dose de 40 et 150 mg/kg p.c. au 9^{ème} et au 10^{ème} jour post-natal (2 administrations) ou de 40 mg/kg du 9^{ème} au 13^{ème} jour post-natal (5 administrations), un passage élevé de cette barrière est noté (Karlsson et al., 2015^{MS}). La même observation est rapportée chez la souris C57BL/6 allaitante recevant par voie i.v de la ¹⁴C-BMAA (0,7 mg/kg p.c.). Après 24h, les niveaux de radioactivité des cerveaux des nouveau-nés allaités seraient supérieurs à ceux des mères (Andersson et al., 2013^{MS}).

Une localisation importante de radioactivité au niveau des tissus riches en mélanine comme l'œil est également observée après autohistoradiographie chez la souris (Karlsson et al., 2009a^{MS}).

La BMAA peut se trouver à l'état libre ou lié à des protéines. Dans l'étude de Karlsson et al., (2015^{MS}) chez le rat recevant par voie s.c. 2 x 40 ou 2 x 150 mg/kg p.c. (au 9^{ème} et au 10^{ème} jour post-natal), la BMAA libre est mise en évidence pour le faible dosage dans tous les tissus étudiés. Les concentrations les plus élevées seraient dans le foie et les muscles du squelette. Dans le cerveau, les concentrations seraient très proches dans toutes les zones (cortex, hippocampe, striatum, cervelet) à l'exception de l'hypothalamus qui présenterait une concentration plus élevée. Les tissus à prolifération cellulaire élevée (thymus, rate, pancréas) présenteraient au contraire de faibles concentrations. Un effet dose-dépendant serait observé dans tous les tissus analysés. Concernant la BMAA liée aux protéines, elle est retrouvée dans tous les tissus sauf le striatum, le cervelet, le cortex et le thymus. La fraction de BMAA liée/totale varie selon les organes, la valeur la plus élevée serait dans le foie (3,6%) et ne dépendrait pas de la dose (Karlsson et al., 2015^{MS}).

Chez la souris C57BL/6J gestante (n = 3), un passage foeto-placentaire est démontré après injection i.v de ³H-BMAA au 14^{ème} jour de la gestation. L'autoradiographie montre que le niveau de radioactivité dans le cerveau de la mère serait inférieur à celui dans le sang 30 min après injection. Le niveau de radioactivité des tissus fœtaux serait supérieur à celui du sang maternel après 30 min. L'efficacité du passage de la BHE serait dépendante de l'âge, faible chez l'animal adulte et nettement plus élevé chez le nouveau-né (Karlsson et al., 2009^{MS}).

Selon une étude réalisée par perfusion *in situ* de la carotide chez le rat SD adulte (n = 4), la BMAA entrerait dans le cerveau par des transporteurs d'acides aminés présents dans la BHE (Smith et al., 1992^{NS}).

5.1.3 Métabolisme

Aucune biotransformation *in vitro* n'est observée sur homogénats de tissus hépatiques, rénaux, musculaires et cérébral (Duncan et al., 1991^{NS}).

Dans l'étude de Garner et al. (2013^{NS}) chez le rat SD avec administration orale unique de ¹⁴C-BMAA (1 mg/kg p.c.), l'analyse HPLC d'homogénats de cerveau après hydrolyse acide *in vitro* mettrait en évidence, selon les auteurs, la présence de plusieurs composés radiomarqués en plus de la ¹⁴C-BMAA (mais selon une méthode jugée non fiable par le GT « BMAA »).

Il a été observé *in vitro* que des homogénats de foie et de rein de rats SD incubés avec de la BMAA donnent formation à de la méthylamine et à de l'acide 2,3 diaminopropanoïque, non observés avec des homogénats de cortex (Nunn & Ponnusamy, 2009).

Des groupes de rat Wistar mâles ont reçu au 9^{ème} et au 10^{ème} jour post-natal par administration s.c. une dose de 40, 150 ou 460 mg/kg p.c. de BMAA puis sacrifiés 24h après la dernière administration. Les groupes comportaient respectivement 12, 13 et 13 animaux. L'analyse multivariée des profils RMN du sérum des rats traités comparés aux rats témoins (n = 12) a permis d'identifier des différences de concentrations pour 5 métabolites : D-glucose, lactate, 3 hydroxybutyrate, créatine et acétate. Ces composés sont associés au métabolisme énergétique et à celui des acides aminés (Engskog *et al.*, 2013).

Chez le singe, 13 à 31% de la BMAA serait présente dans les urines sous forme de conjugués (après hydrolyse d'échantillons d'urines) (Duncan *et al.*, 1992^{NS}).

5.1.4 Elimination

Chez le rat SD, la voie urinaire serait une voie mineure d'élimination (Duncan *et al.*, 1991^{NS}), notamment moins de 10% de la radioactivité est retrouvée dans l'urine après administration orale de ¹⁴C-BMAA à la dose de 1 mg/kg p.c. (Garner *et al.*, 2013^{TS}).

Chez le singe recevant 2 mg/kg p.c. par voie orale accompagnés de ³H-BMAA, le taux de récupération urinaire sur 48h de la molécule marquée est très faible. Les voies biliaire et fécale peuvent être considérées comme des voies significatives (Duncan *et al.*, 1992^{NS}).

Une excrétion importante dans le lait a été rapportée chez des souris C57BL/6 allaitantes traitées i.v. avec du ¹⁴C-BMAA à la dose de 0,7 mg/kg p.c. (n = 5). La radiographie de ces femelles montre également la présence de radioactivité dans les canaux à lait (Andersson *et al.*, 2013^{MS}).

5.1.5 Conclusion

La biodisponibilité orale de la BMAA a été étudiée chez deux espèces animales : le rat et le singe. Bien que réalisées avec des méthodes analytiques classées non satisfaisantes, les données suggèrent une absorption importante et rapide.

Le passage de la barrière hématoencéphalique a été montré chez le rat nouveau-né après administration sous-cutanée de BMAA et chez la souris nouveau-né exposée par le lait de mères ayant reçu de la BMAA i.v.

La présence de BMAA dans les tissus (dont le cerveau) a été étudiée chez des rats adultes après administration orale, i.v. ou s.c. mais selon une méthode analytique jugée non fiable du point de vue quantitatif.

Concernant le métabolisme de la BMAA, les données sont très lacunaires et n'ont pas permis d'identifier les produits de dégradation ni leur proportion relative au composé parent.

L'élimination urinaire de BMAA serait faible.

Une excrétion importante par le lait de femelles allaitantes est rapportée chez la souris avec de la ¹⁴C-BMAA.

5.2 Toxicité chez l'animal de laboratoire

5.2.1 Voie orale

Cinq études ont été identifiées et analysées, deux chez la souris et trois chez le singe.

Chez la souris

Des souris femelles CD1 (n = 12) ont reçu par gavage une dose très élevée d'un mélange de D- et L-BMAA (15,5 g/kg p.c. de L-BMAA) sur une période de 11 semaines (500 mg/kg p.c./j pendant 18 jours, puis 500 mg/kg p.c./j pendant les 28 jours suivants, et enfin 1000 mg/kg p.c./j pendant encore 30 jours). Un groupe témoin comportait 8 souris. Les souris n'ont montré aucune anomalie comportementale, et symptômes caractéristiques d'une pathologie neurodégénérative type SLA ou Parkinson (Perry et al., 1989^{NS}). Les teneurs cérébrales en glutamate, aspartate (cortex) et dopamine (striatum) étaient normales, à l'inverse de ce qui peut être observé dans certaines formes de SLA humaine. Les analyses histologiques du cerveau (cortex, hippocampe, striatum, substance noire) et de la moelle épinière n'ont montré aucune altération. Les auteurs rapportent la présence de BMAA dans le cerveau des souris, mais selon une méthode jugée non fiable par le GT « BMAA ».

Des souris males CD-1 (n = 7) recevant une dose 28 mg/kg p.c./j de BMAA dans l'alimentation pendant 30 jours n'ont montré aucune anomalie comportementale (coordination motrice, réflexes moto-neuronaux, locomotion, force musculaire et mémoire) comparé à un groupe témoin (n = 7) (Cruz-Agado et al., 2006). Selon les auteurs, la dose testée serait représentative d'une consommation humaine de 2 chauves-souris de l'île de Guam. Dans la même étude, la BMAA n'a induit aucune baisse de la densité cellulaire neuronale ou de réponse gliale. Les arguments avancés par Karamyan & Speth, (2008) pour remettre en cause l'absence d'effets de la BMAA concernant notamment les concentrations utilisées (trop basses dans cette étude), la fiabilité des techniques employées, notamment sur le comportement animal, ainsi que le fossé entre la SLA humaine et les modèles expérimentaux de SLA, notamment murins.

Chez le singe

Des singes cynomolgus adultes mâles ont reçu par gavage quotidien différentes doses de BMAA (100 à 350 mg/kg p.c./j) pendant plusieurs semaines (jusqu'à 12 semaines) selon un protocole complexe. Le nombre de singes traités étaient de 13 et le groupe témoin comportait 5 animaux. Selon les cas, certains animaux ont développé des faiblesses musculaires, des dysfonctionnements des neurones cortico-moteurs à caractère parkinsonien ainsi que des anomalies du comportement avec des changements dégénératifs au niveau du cortex cérébral et de la moelle épinière. Ces déficits moteurs ont pu être atténués par l'administration de L-DOPA, précurseur de la dopamine (Spencer et al., 1987a,b).

Plus récemment, des singes vervets juvéniles ont été nourris durant 140 jours avec de la BMAA administrée dans de la banane à la dose de 210 mg/kg p.c./j (2 groupes, n = 6 et n = 8) ou 21 mg/kg p.c./jour (n = 8) (Cox et al., 2016^{MS}). Ils ont développé une maladie neurofibrillaire (NFT) avec des dépôts neuroamyloïdes et de la protéine Tau hyperphosphorylée dans le cerveau. Un effet dose-dépendant a été observé pour la densité des enchevêtrements neurofibrillaires. L'administration conjointe par voie orale de sérine (également 210 mg/kg p.c./j) a diminué de manière significative la densité des enchevêtrements neurofibrillaires. Les vervets sont moins sensibles que les macaques à développer le tableau clinique. Toutefois, les protocoles d'administration de la BMAA par voie orale des singes n'étaient pas les mêmes : des ions bicarbonates ont été ajoutés dans la solution de BMAA utilisée pour le gavage des macaques contrairement aux singes vervets, pour lesquels la BMAA a été administré sous forme solide (sans bicarbonate). D'autre part, les vervets sont porteurs d'une mutation du gène *TTR* codant pour la protéine transthyrétine qui conduit, chez l'Homme, à développer une amylose. Les vervets pourraient ainsi présenter une sensibilité génétique à l'action de la BMAA à l'origine des nombreuses lésions histopathologiques observées (Spencer et al., 1987, 2015, 2016). La BMAA n'a pas été détectée chez les animaux du lot témoin. En revanche, elle a été dosée sous forme liée à des concentrations de 0,24 et 2,2 mg/kg dans le cerveau de singes exposés à la BMAA, ainsi que dans le sang et le LCR. Cette étude n'a toutefois pas tenté de

corrélait la présence de dépôts neurofibrillaires et amyloïdes avec des déficits cognitifs de ces animaux. Ceci aurait permis d'attester que la BMAA, en plus d'induire des altérations de la matière grise cérébrale, est bien la cause de symptômes que l'on retrouve dans les maladies neurodégénératives, notamment sur les fonctions motoneuronales de contraction musculaire (voir paragraphe sur la physiopathologie de la SLA).

5.2.2 Voie intra-péritonéale

Trois études ont été identifiées et analysées, une chez la souris et deux chez le rat.

Chez la souris NIH Suisse Outbred, 5 doses de BMAA ont été testées par administration unique (30, 300, 1000, 2000, 3000 mg/kg p.c.) respectivement à des groupes de femelles et de mâles comportant 7, 7, 6, 6 et 6 animaux, avec une période d'observation de 14 jours. Le groupe témoin comportait 3 animaux de chaque sexe. De manière qualitative (sans analyse statistique de l'ensemble de la dose-réponse), les auteurs ont défini une DL₅₀ de 3000 mg/kg p.c. sur la base des symptômes suivants ayant conduit à l'euthanasie des animaux : myoclonie, convulsions, miction/défécation incontrôlées dans les 20 min post-injection. La dose minimale avec effet (LOAEL aiguë) est de 2000 mg/kg p.c. (1/6 femelle moribonde). L'examen histologique sur 6 organes (cerveau, foie, poumon, cœur, rate, rein) d'un seul animal par groupe n'a montré aucune lésion (Al-Sammak et al., 2015^{NS}). La BMAA a été détectée dans le cerveau et le foie de souris traitées et pas dans ceux des témoins, mais selon une méthode jugée non fiable du point de vue quantitatif par le GT « BMAA ».

Des groupes de 4 rats Wistar des 2 sexes ont reçu des doses uniques ou répétées jusqu'à 21 jours de L-BMAA comprises entre 500 et 2000 mg/kg p.c. ou d'un mélange racémique de D- et L-BMAA jusqu'à 4 000 mg/kg p.c. (Seawright et al., 1990). Les rats ont montré des signes aigus de neurotoxicité (mouvements circulaires, balancements puis dans un second temps ataxie) quelques heures après l'administration. Avec la L-BMAA, des altérations histologiques de type excitotoxique sont rapportées uniquement au niveau du cervelet (pas dans le reste du cerveau ni dans la moelle épinière).

De jeunes rats mâles Wistar sont traités au sevrage par 300 mg/kg p.c. de BMAA pendant 5 jours (de Munck et al., 2015 ; Munoz-Saez et al., 2015). Des tests comportementaux ont été pratiqués toutes les semaines pendant 14 mois. Des examens biologiques et histologiques ont été réalisés sur le cerveau. Il a été observé une perte du volume musculaire unilatérale (gauche) jusqu'à 17%, devenant bilatérale après 8 mois. Au niveau du cerveau, le volume du cortex cérébral est également diminué de manière bilatérale de 10 à 18%. Il est également observé un élargissement des ventricules latéraux. Les observations neurochimiques montrent une élévation du glutamate et de la taurine et une baisse de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) au niveau du cortex moteur. Les auteurs estiment que le rat se révèle être un bon modèle reproduisant les symptômes observés lors de la SLA (de Munck et al., 2015).

5.2.3 Voie sous-cutanée

Trois études ont été identifiées et analysées, toutes chez le rat nouveau-né ou très jeune.

Des groupes de rats SD nouveau-nés des 2 sexes ont reçu des doses de BMAA pour le groupe A (n = 12) : 500 mg/kg au 5^{ème} jour post-natal, B (n = 24) : 500 mg/kg au 2^{ème} et au 5^{ème} jour post-natal et C (n = 12) : 100 mg/kg au 2^{ème} et au 5^{ème} jour post-natal (Dawson et al., 1998). Le groupe contrôle comportait 24 animaux. Des tests psychomoteurs ont été pratiqués entre le 6^{ème} et le 84^{ème} jour post-natal sur 5 à 14 animaux/groupe ainsi que des dosages hormonaux et neurochimiques. Il est observé quelques cas de mortalité dans le groupe B. Les tests usuels comportementaux utilisés n'ont montré que de faibles variations en limite de significativité. Aucun dysfonctionnement des fonctions motrices n'a été observé à l'exception des membres postérieurs écartés et d'une activité locomotrice augmentée. Au niveau du poids des organes, seul celui des ovaires est plus élevé (groupes A et B) et celui du cervelet diminué (groupes A mâle et B femelle). Au niveau hormonal, la TSH est plus élevée (groupe A mâle), ainsi que l'IGF1 (groupe B mâle) et la T4 libre diminuée

(groupe B femelle). Concernant l'aspect neurochimique, les seuls changements observés étaient au niveau de la moelle épinière, l'aspartate et le glutamate étant augmentés (groupe C femelle) au niveau du cervelet, l'aspartate étant diminué (groupe A mâle) au niveau de l'hippocampe, la sérotonine augmentée (groupes A et B femelle, groupes A, B et C mâles) et diminuée (groupe C femelle).

Des groupes de rat Wistar mâles ont reçu 200 ou 600 mg/kg p.c./j de BMAA au 9^{ème} et au 10^{ème} jour post-natal (respectivement n = 8 et n = 11) (Karlsson et al., 2009a^{MS}). Le groupe témoin comportait 8 animaux. Les animaux du groupe recevant la forte dose ont manifesté de sévères troubles neurologiques moteurs. Après sevrage, des tests comportementaux ont été pratiqués entre le 13^{ème} et le 27^{ème} jour post-natal. Les résultats ont montré une hyperactivité avec une difficulté à la locomotion et une perte du réflexe de redressement sans grand effet sur la performance musculaire. Les fonctions cognitives semblent être altérées. Certains animaux de la forte dose ont dû être sacrifiés. Dans une autre publication (Karlsson et al., 2009b^{MS}), les auteurs présentent les résultats d'observations des rats âgés de 10 à 22 semaines afin d'évaluer les effets à long terme chez l'animal adulte. Dans les tests pratiqués, les fonctions d'apprentissage spatial mais pas de la mémoire spatiale à long terme testée 2 semaines après la phase d'acquisition étaient perturbés sans lien avec les altérations des capacités motrices.

La même équipe (Karlsson et al., 2011^{MS}) a complété son protocole d'étude par un volet comportemental chez des animaux exposés (n = 12) à des doses moindres de 50 et 200 mg/kg p.c./j (ainsi qu'à la dose forte de 600 mg/kg p.c./j) au 9^{ème} et au 10^{ème} jour post-natal et un groupe témoin de 12 animaux. Des observations ont été faites périodiquement chez les rats âgés entre 13 et 26 semaines. Les deux plus faibles doses testées ont entraîné une altération de la mémoire spatiale mais pas d'altération des autres types de mémoire, aucune anomalie histologique y compris au niveau de l'hippocampe n'a été mise en évidence. A la forte dose, des pertes neuronales ont été observées au niveau du cortex cingulaire et de l'hippocampe. Les auteurs estiment que ces changements observés chez le rat ne coïncident pas avec les observations post-mortem sur des tissus de patients décédés de la SLA.

5.2.4 Autres voies d'administration

La toxicité de la BMAA a été étudiée par administration intracrânienne, intracérébrale, intracérébroventriculaire. Ces études ne sont pas décrites dans ce chapitre du rapport car elles ont été jugées trop éloignées des conditions d'exposition de l'Homme mais dans le chapitre relatif aux aspects mécanistiques de la neurotoxicité de la BMAA.

5.2.5 Limites des études de toxicité chez l'animal

La question des modèles animaux pour étudier des maladies humaines se pose dans le cas de pathologies neurodégénératives non existantes chez les animaux. La majorité des études *in vivo* menées avec la BMAA a montré sa neurotoxicité, qui se traduit par des effets moteurs centraux et fonctionnels. Cependant, cette neurotoxicité est difficile à corrélérer avec les symptômes observés chez des patients atteints de SLA, dont la cinétique d'apparition est lente et complexe, et dont les mécanismes physiopathologiques sont encore mal déterminés. Le modèle souris transgénique SOD1 (mutations du gène de la superoxyde dismutase 1) est aujourd'hui considéré comme le plus adapté pour étudier la SLA.

La plupart des travaux *in vivo* réalisés dans les années 80 ont utilisé des concentrations relativement élevées de toxine (Spencer et al., 1987), incompatibles avec la consommation humaine de végétaux contenant de la BMAA (Garruto et al., 1988 ; Duncan et al., 1990). Cette hypothèse a cependant été remise en cause, notamment en supposant une bioamplification de la BMAA par des chauves-souris se nourrissant de graines de cycas, elles-mêmes consommées par les habitants de l'île de Guam (Cox & Sachs, 2002). Les quantités de BMAA effectivement ingérées par les Chamorros seraient donc beaucoup plus élevées qu'on ne le pensait initialement.

La plupart des études de toxicité *in vivo* a investigué les effets aigus de la BMAA. Relativement peu d'études se sont intéressées aux effets chroniques, ce qui serait pourtant nécessaire pour comprendre l'installation d'une maladie neurodégénérative à cinétique lente.

La majorité des études *in vivo* sur la BMAA a été réalisée chez des rongeurs, et plus rarement chez des primates. Il faut bien appréhender le parallèle scientifique qui est réalisé entre d'un côté la neurotoxicité d'un acide aminé sur des modèles mammifères assez éloignés de l'espèce humaine, et de l'autre une pathologie neurodégénérative exclusivement observée chez l'Homme (Karayman & Speth, 2008). Cette limite doit conduire à la plus grande réserve quant à l'interprétation des données disponibles sur la BMAA et son rôle putatif comme contributeur à la SLA. A cet égard, il faut même pouvoir envisager que les symptômes engendrés par cette toxine chez des rongeurs puissent être différents de ceux qu'ils induiraient chez l'Homme, et qu'on ne retrouve pas l'équivalent de la SLA expérimentalement. Même s'il existe des similitudes fonctionnelles entre rongeurs et humains, les différences à prendre en compte sont nombreuses : organisation du système nerveux central, nombre de neurones, capacité de métabolisation de la BMAA, de distribution.

Les études réalisées chez les primates sont à cet égard riches en enseignement car elles permettent d'envisager une exposition longue, plus proche de la réalité d'une exposition chronique pour l'Homme (Cox et al., 2016^{MS}) :

- Bien qu'une biodisponibilité orale élevée ait été clairement démontrée chez deux espèces animales, il serait très hasardeux de transposer les observations vues après administration s.c. ou i.p. à celles de la voie orale. Sans mesure de la concentration plasmatique ou d'un autre biomarqueur, il est impossible de pouvoir comparer les expositions animales ayant reçu la BMAA par différentes voies physiologiques. La BMAA étant un contaminant alimentaire, la voie orale doit être prioritairement prise en considération.
- Les études chez l'animal nouveau-né ont toutes comporté une administration ciblée se situant dans la période de grande sensibilité de développement du cerveau. Elle n'est pas identique selon les auteurs (2^{ème} et 5^{ème} jour post-natal pour Dawson et al., 1998, 9^{ème} et 10^{ème} jour post-natal pour Karlsson et al., 2009a^{MS}, b^{MS}). Ces choix ne reflètent pas la réalité d'exposition du consommateur
- Pour certaines études, le choix des doses a été effectué sans la moindre logique ni justification. Les résultats des études obtenus avec des dosées élevées sont difficilement interprétables : Spencer et al. (singe) Perry et al. (souris) Dawson et al. (rat), Karlsson et al. (rat), Seawright et al. (rat).
- L'étude de Dawson et al. (1998) est assez complète d'un point de vue toxicologique par les nombreux paramètres mesurés mais certains ont été réalisés sur un nombre d'animaux très faible (n=4) ne permettant pas de se prononcer de manière significative.

5.2.6 Conclusions sur la toxicité chronique et aiguë

Il est difficile de faire le bilan des données issues des études disponibles dans la littérature : les concentrations en BMAA testées sont très élevées, beaucoup ont utilisé une voie d'administration non orale, le nombre d'animaux par groupe est faible, la période d'administration ciblée sur la période de grande sensibilité de développement du cerveau ne reflète pas la réalité d'exposition du consommateur.

La neurotoxicité de la BMAA est démontrée chez le rat et chez le singe mais les données toxicologiques actuellement disponibles ne permettent pas d'identifier une dose sans effet applicable à l'Homme.

Il semble exister une grande différence de sensibilité entre espèces, la souris adulte paraissant résistante à la neurotoxicité induite par le BMAA même pour des doses très élevées. L'origine de cette particularité mériterait d'être élucidée.

5.3 Génotoxicité

Un test d'Ames réalisé sur 5 souches de *Salmonella typhimurium* (TA97a, TA98, TA100, TA102 et TA1535) avec 5 concentrations comprises entre 11 et 900 µg de BMAA/boîte, avec et sans activation métabolique, n'a montré aucune élévation significative du nombre de révertants. Un autre test (SOS/umuC assay) a été réalisé avec 6 concentrations comprises entre 0,32 et 1000 µg de BMAA/ml sur la souche de *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, avec et sans activation métabolique, donnant également un résultat négatif (Novak et al., 2016).

5.4 Aspects mécanistiques : hypothèses sur le mode d'action de la BMAA

Pour comprendre les effets de la BMAA observés *in vivo*, de nombreuses études ont cherché à caractériser à l'échelle cellulaire le mode d'action de cette toxine, en la testant notamment sur des cellules neuronales.

5.4.1 Neurotoxicité de la BMAA

Les principales hypothèses sur le mode d'action de la BMAA telles qu'elles se dégagent des travaux de toxicologie *in vitro* menés sur différents modèles cellulaires sont présentées ci-dessous.

5.4.1.1 Excitotoxicité et mort neuronale

Interaction avec les récepteurs glutamatergiques et dépendance au bicarbonate

Des études *in vitro* se sont attachées à caractériser le mode d'action de la BMAA sur des modèles cellulaires spécifiques. De nombreuses études *in vitro* menées sur des cellules issues de rongeurs, sangsue, et des lignées humaines, ont révélé les effets neurotoxiques de la BMAA. Son caractère excitotoxique, c'est-à-dire le processus de mort cellulaire se produisant suite à l'activation d'acides aminés excitateurs (glutamate) est le mécanisme le plus souvent proposé (Chiu et al., 2013).

La BMAA a tout d'abord été testée à des concentrations relativement importantes (1 à 3 mM) sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris (Weiss & Choi, 1988). Dans ces travaux, la BMAA induit des effets neurotoxiques et neuroexcitateurs si l'on ajoute dans le milieu extracellulaire des concentrations physiologiques (10 mM) de bicarbonate HCO_3^- . Le bicarbonate est supposé interagir avec la toxine pour lui fournir le substrat nécessaire (un groupe carboxylique) à l'interaction avec les récepteurs glutamatergiques (Weiss & Choi, 1988). Cette dépendance au bicarbonate a été constatée dans d'autres études *in vitro*, y compris dans des cellules non neuronales comme les cellules gliales, mais là-encore à des concentrations élevées de toxine, de 0,5 à 3 mM (Chiu et al., 2013). La conjugaison de la BMAA au bicarbonate est susceptible de conduire à une molécule structurellement apparentée au glutamate, jouant le rôle d'agoniste des récepteurs glutamatergiques, en particulier les récepteurs ionotropiques de type NMDA (Weiss et al., 1989a).

La liaison du glutamate à des jonctions synaptiques de cerveaux de rats est inhibée par la BMAA (CI_{50} 1 mM), mais seulement en présence d'ions bicarbonate (20 mM) (Richter & Mena, 1989). Les ions HCO_3^- semblent donc indispensables à l'activité *in vitro* ou *ex vivo* de la BMAA. Cette découverte a permis de faire sauter un verrou mécanistique, et de rendre compte de résultats négatifs, générés sur des tissus fraîchement isolés, baignés dans un milieu dépourvu de bicarbonate. La présence d'ions bicarbonate à pH physiologique a donc créé des conditions idéales pour la formation d'adduits de carbamate, et a été utilisée par la suite pour caractériser le mode d'action de la toxine. La BMAA réagit *in vitro* avec du CO_2 pour former ces composés carbamates, en condition de $[\text{HCO}_3^-]$ physiologique. À 37°C et pH 7,4, la BMAA donne deux adduits, α -N-carboxyanhydride et β -N-carboxyanhydride. Ces deux adduits sont susceptibles d'être impliqués dans la neurotoxicité de la BMAA, par leur homologie structurale avec le glutamate (Myers &

Nelson, 1990). D'autres expériences de neurotoxicité cellulaire sur neurones corticaux ont montré que la BMAA se lie à des récepteurs glutamatergiques de type NMDA et non-NMDA (Weiss et al., 1989).

Des injections intracérébrales de BMAA (400 µg) à des rats, au niveau de la substance noire (contrôle moteur), ont également été réalisées. Ils aboutissent, après une semaine, à une diminution des teneurs en noradrénaline hypothalamique, sans affecter les niveaux de dopamine ou de sérotonine (Lindström et al. 1990). Cet effet pourrait être consécutif à l'interaction de la BMAA sur les récepteurs NMDA. Des études de liaison spécifique *in vitro* montrent que la toxine agit, à 1 mM et toujours en présence de concentrations physiologiques de bicarbonate (25 mM), en ciblant des récepteurs ionotropiques (NMDA) et métabotropiques du glutamate de tranches d'hippocampe prélevées sur des cerveaux de rats (Copani et al., 1991). La spécificité de la BMAA à l'égard d'un sous-type de récepteurs glutamatergiques est donc assez relative, et d'autres études ont proposé que son activité agoniste pouvait s'exercer simultanément sur des récepteurs différents du glutamate, après injections intracérébroventriculaire de BMAA (500 µg/jour), pendant 60 jours (Rakonczay et al., 1991). Les effets de la BMAA sur l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire ont également été évalués, dans des cellules de cerveau de rats nouveaux-nés : la toxine (5 mM) induit une très faible augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , qui devient importante lorsque l'on ajoute du HCO_3^- dans le milieu extracellulaire (Brownson et al., 2002). Ces données confirment le rôle central des ions HCO_3^- dans le mécanisme d'action de la BMAA, et sa métabolisation, ainsi que la déstabilisation de l'homéostasie calcique, prélude à des phénomènes pro-apoptiques.

La SLA se caractérisant par une mortalité des motoneurones, la toxicité de la BMAA a été testée sur des motoneurones *in vivo* et *in vitro*. Des injections intracrâniennes (striatum) (10 µl à une concentration de 100 mM) chez des souris montrent que la toxine induit la mort de neurones hippocampiques *in situ*. Ces résultats sont confirmés *in vitro*, car la BMAA exerce un effet cytotoxique dose-dépendant (50 µM à 1 mM) sur une lignée cellulaire spinale proche des motoneurones (Buenz & Howe, 2007). Plus récemment, des injections intrathécales prolongées de BMAA (5 mM) aboutissent, chez le rat sauvage, et d'une manière comparable à des rats SOD1 non intoxiqués, à une dégénérescence des motoneurones (Yin et al., 2014). *In vitro*, la BMAA à des concentrations relativement faibles (10 µM) potentialise la mort neuronale induite par d'autres molécules neurotoxiques (NMDA, kaïnate, amyloïde-β, MPP+). Cette observation suggère que la BMAA est susceptible d'agir à faibles concentrations comme co-acteur d'un phénomène neurodégénératif impliquant d'autres molécules. Cette neurotoxicité implique les récepteurs glutamatergiques ionotropiques (NMDA) et métabotropiques (mGluR5) (Figure 4), ce qui suggère que la BMAA est excitotoxique via différentes cibles moléculaires (Lobner et al., 2007). Enfin, à concentrations moyennes à fortes (30 µM à 1 mM), la BMAA a induit la mort des motoneurones *in vitro*. Cet effet est inhibé par l'addition d'un antagoniste des récepteurs ionotropiques AMPA/kainate. La toxine induit une augmentation de la concentration en Ca^{2+} et la génération d'espèces réactives de l'oxygène, autant d'effets réduits sur des neurones spinaux (Rao et al., 2006). Cette interaction de la BMAA avec la transmission glutamatergique a été également testée sur des neurones d'invertébrés (la sangsue *Haemopsis sanguisuga*). La toxine (0,1 à 1 mM) induit une dépolarisation membranaire dose-dépendante des cellules de ganglions nerveux. Cet effet implique une action sur les récepteurs ionotropiques non-NMDA. Consécutivement, une augmentation de la concentration intracellulaire en Na^+ et une diminution de la concentration intracellulaire en K^+ se produisent. Ces résultats suggèrent que la BMAA pourrait initier des mécanismes excitotoxiques par l'activation d'autres récepteurs ionotropiques non-NMDA (Lopicic et al., 2009).

Bien que le rôle de la BMAA dans la survenue de maladies neurodégénératives humaines soit encore largement débattu, la toxine agit *in vitro* sur des neurones en culture par des mécanismes impliquant une suractivation des récepteurs glutamatergiques. D'un point de vue chimique, il manque à la BMAA le groupe carboxylé du glutamate, caractéristique des acides aminés excitateurs, et un groupe amine.

Interaction avec la neuromélanine

S'il est bien lié à une exposition à la BMAA, la spécificité du syndrome de l'île de Guam suppose d'une part que la BMAA elle-même ou l'un de ses métabolites ait la capacité à franchir la BHE et d'autre part, qu'il existe un mécanisme neurotoxique ciblant spécifiquement les structures impliquées dans le contrôle des mouvements volontaires, notamment la substance noire (SN), une zone cérébrale qui tire son nom du pigment sombre qu'elle contient : la neuromélanine. La biodisponibilité de la BMAA dans le SNC est encore sujette à discussion (Karlsson *et al.*, 2015^{MS} ; Anderson *et al.* 2016^{MS}) et les travaux portant sur les mesures de BMAA dans le cerveau de patients sont contradictoires (Murch *et al.* 2004^{NS} ; Montine *et al.*, 2005 ; Bertzon *et al.*, 2015^{TS}). La mélanine et la neuromélanine se retrouvent concentrées dans quelques rares structures du SNC humain dont le *locus coeruleus*, la SN et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Dans la SN, elle sert notamment de biomarqueur pour suivre, en imagerie médicale, l'évolution de pertes en neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson (Isaias *et al.*, 2016). De plus, une atteinte de la neuromélanine de la SN est une des hypothèses actuelles du développement de la maladie de Parkinson chez les patients (Zecca *et al.*, 2003). Il a ainsi été montré que certains composés chimiques connus pour induire un syndrome parkinsonien comme le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) se lie effectivement à la neuromélanine et que le complexe formé est neurotoxique. Les mêmes auteurs ont également montré que la chloroquine, un antipaludique, entre en compétition avec le MPTP pour la liaison à la neuromélanine et protège les singes traités de l'apparition de troubles parkinsoniens (D'amato *et al.*, 1987). Comme le MPTP, la BMAA aurait la capacité de lier la mélanine dans divers tissus dont le SNC (Karlsson *et al.*, 2009c). 12 jours après l'injection de BMAA radiomarquée (0,91 µg/kg), une accumulation importante est détectable dans l'EPR indiquant un passage de la barrière hémato-rétinienne chez la souris C57/bl6. Ces zones d'accumulation dans les tissus pigmentés ne sont pas observées avec des souris albinos, indiquant une possible interaction avec la mélanine présente dans les cellules de l'EPR. La courbe de liaison BMAA/mélanine est biphasique suggérant deux sites de liaison à affinités différentes, avec une capacité de liaison maximale de 0,34 et de 60,8 nmoles/mg respectivement. Comme la souris est dépourvue de neuromélanine dans la SN, les auteurs ont utilisé en parallèle le modèle amphibien. Des expériences d'injection de BMAA tritiée ont été menées sur des grenouilles (7,3 µg/kg poids corporel ; s.c) et des souris (7,3 µg/kg poids corporel; i.v), euthanasiées 30 min, 1h, 3 h, 24h et 12 jours après l'injection. Dans l'ensemble des tissus étudiés, l'accumulation de BMAA est corrélée à la présence de neuromélanine néoformée, suggérant une capacité de stockage élevée de la BMAA dans les cellules riches en pigment. Cette propriété de la BMAA permettrait de corrélérer les divers aspects cliniques, type maladie de Parkinson et rétinopathie pigmentaire, observés chez les patients de Guam (Karlsson *et al.*, 2009c).

La liaison de la BMAA à la mélanine néosynthétisée pourrait conduire à une altération du polymère de mélanine néoformée, la rendant moins efficace pour piéger les métaux lourds ou plus sensible à la dégradation comme observé avec le MPTP (Jimbow, 1995 ; Mars & Larsson, 1999 ; Zecca *et al.*, 2003). De plus, la voie de synthèse de la neuromélanine est commune avec celle des catécholamines, dont la dopamine, un neurotransmetteur essentiel dans le contrôle du striatum (Krone *et al.*, 2016). Il a été suggéré que la synthèse de neuromélanine à partir des catécholamines pourrait permettre d'éviter l'accumulation de produits d'oxydation de la dopamine tels que les quinones qui sont connues pour être hautement neurotoxiques. La BMAA pourrait perturber cette voie de synthèse et induire une accumulation de produits intermédiaires du catabolisme des catécholamines impliqués dans des processus d'oxydation regroupant un dysfonctionnement mitochondrial, une accumulation de radicaux libres, une peroxydation lipidique, une agrégation protéique et une activation microgliale, conduisant à un vieillissement neuronal précoce communs à de nombreuses pathologies neurodégénératives (McManus *et al.*, 2011 ; Heitz *et al.*, 2012 ; Lastres-Becker *et al.*, 2012 ; Dariani *et al.*, 2013 ; An *et al.*, 2014 ; Eleuteri *et al.*, 2015 ; Tan *et al.*, 2015). Enfin, en interagissant avec ce pigment mais sans y être incorporée, la BMAA pourrait être stockée de nombreuses années avec la possibilité d'un relargage tout au cours de la vie, pouvant conduire à des atteintes chroniques au niveau cérébral notamment un état inflammatoire permanent et une gliose réactionnelle contribuant au développement de pathologies neurodégénératives.

La neuromélanine permettrait le stockage de la BMAA dans des structures cérébrales précises et les concentrations atteintes au niveau local pourraient induire une neurotoxicité ciblée, uniquement dans les neurones riches en neuromélanine et les tissus proches lors d'un relargage de la BMAA. Ce phénomène s'établirait sur de nombreuses années. Cette hypothèse pourrait expliquer (i) la difficulté de corrélation entre les taux plasmatique et cérébraux de BMAA, de nombreuses études ayant été réalisées sur des zones cérébrales largement dépourvues en neuromélanine, (ii) la neurotoxicité originale de la BMAA – telle que décrite dans le syndrome de l'île de Guam – regroupant un syndrome parkinsonien, une SLA, la maladie d'Alzheimer et une rétinopathie pigmentaire rare, (iii) l'impact à très long terme de la BMAA sur les populations exposées.

Dans le cadre de cette hypothèse, il pourrait donc être intéressant (i) de se focaliser sur les structures riches en mélanine et neuromélanine pour les dosages de BMAA dans le SNC incluant le *locus caeruleus*, la substance noire et le tissu rétinien, (ii) d'utiliser préférentiellement lors d'expérimentation animales, des espèces riches en neuromélanine (Marsden, 1961) et d'éviter le modèle murin, quasi dépourvu de cette substance au niveau cérébral (Barden & Levine, 1983). Ces différences inter-espèces importantes dans leur expression régionale de neuromélanine pourraient ainsi apporter un début d'explication à des études contradictoires sur l'effet de la BMAA dans le cerveau lorsqu'elles comparent modèle souris (pauvre en neuromélanine) et modèle simien (riche en neuromélanine), (iii) de suivre les fonctions rétiniennes des personnes ou animaux exposées à la BMAA. En effet, les travaux sur divers modèles animaux indiquent que la rétine semble être une cible de la BMAA (Zeevalk *et al.*, 1989 ; 1994 ; Santucci *et al.* 2009). Chez l'humain, une rétinopathie pigmentaire a été identifiée chez 50% des patients de l'île de Guam présentant également des troubles de type maladie de Parkinson/maladie d'Alzheimer (Cox *et al.*, 1989 ; Campbell *et al.*, 1993 ; Hanlon et Steele, 1993 ; Steele *et al.*, 2015). Cette affection rare présente de plus des similarités avec celle observée en cas de surdosage à la chloroquine, un antipaludique qui se lie à la mélanine et à la neuromélanine (Dayhaw-Barker, 2002). Les tests classiques d'exploration fonctionnelle de la vision (électrorétinogramme, tomographie à cohérence optique, fond d'œil, angiographie...) permettent de détecter avec précision des atteintes physiologiques ce qui pourrait constituer un moyen rapide et non-invasif de tester des populations exposées à la BMAA (McGeere & Steele, 2011). La co-occurrence de deux pathologies rares chez le même patient (SLA et rétinopathie) pourrait donc constituer une signature caractéristique de l'exposition à la BMAA et permettre de discriminer ces cas des autres SLA sporadiques observées dans la population globale.

5.4.1.2 Caractérisation des acteurs intracellulaires impliqués dans la neurodégénérescence induite par la BMAA

Hyperphosphorylation de Tau

La protéine neuronale Tau (Tubulin-Associated Unit) est associée aux microtubules et a été identifiée comme étant le composant majeur des paires de filaments en hélice (Paired Helical Filaments, PHF) qui constituent les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), supposées à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Les protéines Tau de la DNF sont agrégées et anormalement phosphorylées. Différentes études ont montré que la BMAA joue un rôle sur le niveau de phosphorylation de cette protéine Tau, soit en inhibant l'activité de sa principale phosphatase, PP2A, soit en augmentant l'activité de la kinase GSK3 β . Ainsi, la BMAA agit comme un agoniste de certains récepteurs métabotropiques du glutamate comme mGluR5 (Liu *et al.*, 2009 ; Arif *et al.*, 2014). L'activation de ce récepteur dans des cultures primaires de neurones corticaux entraîne une forte diminution de l'activité de la PP2A. En effet, l'activation de mGluR5 par la BMAA provoque une dissociation entre PP2A et mGluR5, suivie d'une phosphorylation de PP2A sur un résidu tyrosine en position 307 par une kinase de la famille Src. La diminution de l'activité phosphatase de la PP2A aboutit à une hyperphosphorylation de Tau. Il a été montré que dans les cerveaux des indiens Chamorros de l'île de Guam atteints de SLA/maladie de Parkinson, l'activité catalytique de PP2A est significativement réduite (Arif *et al.*, 2014).

D'autres études ont également montré que la BMAA peut entraîner une augmentation de la synthèse et de l'activité kinase de la GSK3 β dont l'une des cibles est la protéine Tau (de Munck et al., 2013 ; Munoz-Saez et al., 2013, 2015). Il a également été montré que l'inhibition de l'activité de GSK3 inhibe les effets toxiques de la BMAA. Ces résultats ont été retrouvés à la fois lors de l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de GSK3 et de molécules naturelles comme la sphingosine-1 phosphate ou encore l'acide isolecaronique (Munoz-Saez et al., 2015 ; de Munck et al., 2016 ; de Pedro et al., 2016).

Rôle de TDP-43

TDP-43 (protéine de liaison d'ADN de réponse transactionnelle 43 kDa) est une protéine codée par le gène TARDBP, localisée dans le noyau cellulaire de la plupart des tissus. Elle se lie à l'ADN et participe à la régulation de la transcription. Cette protéine peut également se lier à l'ARN pour assurer sa stabilité. En coupant et en réarrangeant les ARNm par épissage alternatif, TDP-43 contrôle la production de différentes versions de certaines protéines. Au moins 60 mutations dans le gène TARDBP ont été identifiées chez des patients atteints de SLA. La majorité de ces mutations affecte la région de la protéine impliquée dans le traitement de l'ARNm, ce qui perturbe la production d'autres protéines. Les modifications de la protéine TDP-43 entraînent des anomalies de repliement qui conduisent à la formation d'agrégats protéiques, qui ont été trouvés dans les motoneurones chez certains patients atteints de SLA. Il n'est pas clairement établi si ces agrégats causent la mort des cellules neuronales aboutissant à la SLA, ou s'ils sont un sous-produit d'une cellule mourante. Certains patients atteints de SLA causée par des mutations du gène TARDBP développent également une affection appelée démence fronto-temporale (DFT), qui est un trouble cérébral progressif affectant la personnalité, le comportement et le langage. Les individus qui développent les deux conditions sont diagnostiqués comme ayant une SLA-DFT.

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que la BMAA entraîne une surexpression de TDP-43 ainsi que la formation d'agrégats protéiques (de Munck et al., 2013 ; Munoz-Saez et al., 2013 ; Karlsson et al., 2015 ; Yin et al., 2014 ; Munoz-Saez et al., 2015). Munoz-Saez et al. (2013) ont montré une accumulation de formes tronquées (fragment C-terminal), phosphorylées et de haut poids moléculaire dans des neuroblastomes humains en culture en présence de BMAA. Ces formes particulières de TDP-43 sont présentes chez les patients atteints de SLA et de DFT (Munoz-Saez et al., 2013). Ces résultats ont également été retrouvés dans le cerveau (cervelet et hippocampe) de rats traités par de la BMAA, ainsi que dans la moelle épinière où elles s'accumulent dans les motoneurones.

5.4.2 Incorporation protéique de la BMAA

Un mécanisme par lequel la BMAA exercerait ses effets neurotoxiques est sa capacité à être incorporée dans les protéines au cours de la synthèse protéique (Glover et al., 2014 ; Karlsson et al., 2014). Cette incorporation aurait lieu uniquement à la place des résidus alanine et sérine (Glover et al., 2014, Dunlop et al., 2013).

Une étude *in vivo* avec injection sous-cutanée de BMAA marquée au ^{14}C a mis en évidence la présence de la toxine dans les tissus hépatiques et nerveux après 24h (Karlsson et al., 2014). Les concentrations en BMAA retrouvées dans les tissus sont comparables entre le foie et l'hypothalamus mais sensiblement plus faibles dans l'hypophyse. Si une partie du composé se retrouve sous forme protéique au niveau du foie, ce phénomène semble être plus faible dans l'hypothalamus et l'hypophyse (1 à 10% des taux hépatiques en fonction des doses injectées). En revanche, après 28 semaines, aucune trace de BMAA n'a pu être détectée chez le rat adulte tant au niveau du foie que des diverses structures du SNC testées (hypothalamus, hippocampe, hypophyse, putamen), suggérant une clairance dans ces structures au cours du temps.

Ce phénomène d'incorporation protéique de la BMAA entraînerait des défauts de repliement de ces protéines (« misfolding » en anglais), et donc une accumulation de protéines au niveau lysosomal (Dunlop et al., 2013). Cette anomalie de synthèse protéique associée à une entrée massive de Ca^{2+}

conduit également à des phénomènes de stress au niveau du réticulum endoplasmique, à des dérégulations des systèmes de réduction/oxydation (« redox »), ainsi qu'à une activation de certaines caspases pro-apoptotiques comme la caspase-12 et donc à la mort cellulaire (Perry et al., 1989, Buenz et al., 2007, Lobner et al., 2007, Santucci et al., 2009, Liu et al., 2010, Karlsson et al., 2012, Chiu et al., 2013, Karlsson et al., 2013, de Munck et al., 2013, Okle et al., 2013,). Une étude a très récemment montré que la protéine SOD1 (dont des mutations sont responsables de formes familiales de la SLA, voir chapitre 4.3), même dépourvue de son activité dismutase, prévient les effets neurotoxiques de la BMAA sur des cultures primaires de motoneurones en activant une voie Ca^{2+} /Akt/Erk dépendante (Petrozziello et al., 2017).

Enfin, une récente étude protéomique a montré que l'exposition d'embryons de poisson-zèbre à la BMAA induit une augmentation de la synthèse de protéines associées à la signalisation des récepteurs du glutamate ainsi que dans l'homéostasie protéique, le métabolisme oxydatif et la mort neuronale (Froyset et al., 2016). Une hypothèse envisagée pourrait donc être que cette incorporation protéique anormale de BMAA à la place de résidus sérine affecte plusieurs voies de signalisations cellulaires régulées par des mécanismes de phosphorylation.

Il serait intéressant de connaître la nature des protéines dans lesquelles la BMAA pourrait s'incorporer à la place des résidus sérine et d'étudier le rôle de cette « misincorporation protéique » dans la physiopathologie de la SLA.

Sous l'hypothèse de mécanismes de type prion (évoqué au paragraphe 4.5), la BMAA pourrait favoriser ou initier l'acquisition d'une conformation pathologique (« misfolding ») de certaines protéines qui l'auraient intégrée. Cette mauvaise conformation serait ensuite susceptible de se propager au sein des protéines natives et de cellule à cellule, sans que l'agent qui a initié ce phénomène soit encore présent. Ce type d'hypothèse mériterait d'être exploré.

5.4.3 Conclusion

Si le mode d'action complet de la BMAA reste à établir, il est clair que cette molécule a la capacité d'induire des effets neurotoxiques. Plusieurs voies semblent impliquées dans cette activité. La BMAA a la capacité de traverser la BHE, pour atteindre le SNC. A de faibles concentrations *in vitro*, la BMAA peut agir comme agoniste de récepteurs ionotropiques et métabotropiques du glutamate, ce qui entraîne une stimulation accrue des motoneurones, conduisant progressivement à des mécanismes Ca^{2+} -dépendants d'apoptose cellulaire. Cette hypothèse excitotoxique, largement revendiquée *in vitro*, trouve sa limitation dans les concentrations importantes nécessaires à reproduire des effets *in vivo* (Duncan et al., 1991^{NS}). L'interaction de la BMAA avec la neuromélanine, un pigment présent dans les zones dopaminergiques du cerveau et dans la rétine, pourrait être à l'origine d'une activité neurotoxique s'établissant sur des temps longs, compatibles avec l'installation d'une pathologie neurodégénérative. Mais elle est également susceptible de s'incorporer à certaines protéines neuronales, à la place de résidus alanine ou sérine, induisant un mauvais repliement protéique, des mécanismes d'agrégation et l'apoptose cellulaire (Glover et al., 2014). Cette incorporation protéique de BMAA est compatible avec une bioaccumulation toxique dans les cellules couplée à une libération progressive de BMAA dans le SNC au cours des années en fonction du turn-over protéique. Il est bien établi qu'une incorporation d'acides aminés canoniques à une fréquence aussi faible que 1/10 000 peut entraîner une neurodégénérescence expérimentale chez les animaux de laboratoire (Lee et al., 2006). L'incorporation de la BMAA dans les protéines des organismes eucaryotes a été montrée dans diverses lignées cellulaires humaines (fibroblastes, neuroblastomes, cellules endothéliales) (Dunlop et al., 2013). Mais cette hypothèse est controversée *in vivo*, car des expériences ont montré, au bout de plusieurs semaines, l'incorporation minoritaire et précoce de la toxine dans des protéines hépatiques et cérébrales puis son absence à long terme dans les mêmes tissus (Karlsson et al., 2014). La BMAA semble également induire une augmentation de la présence de biomarqueurs de plusieurs maladies neurodégénératives, comme la protéine Tau hyperphosphorylée et la présence de plaques neurofibrillaires (syndrome parkinsonien), ou encore la forme agrégée de TDP-43 (SLA). La toxine induit en effet une

augmentation de la protéine Tau hyperphosphorylée, via la diminution de la phosphatase 2, consécutivement à l'activation du récepteur glutamatergique mGluR5.

En conclusion, si la BMAA ne peut être considérée comme une cause de la SLA, l'hypothèse qu'elle soit un facteur favorisant des phénomènes neurotoxiques est haute, principalement par son caractère versatile à activer des mécanismes à l'œuvre dans plusieurs pathologies neurodégénératives.

5.5 Inventaire des analogues structuraux proches de la BMAA et comparaison de leurs effets pharmacologiques et toxicologiques avec ceux de la BMAA

Cette section mentionne les spécificités pharmacologiques et toxicologiques de substances connues comme analogues structuraux proches et isomères de position de la BMAA en relation avec les récepteurs du glutamate (Köles et al., 2016).

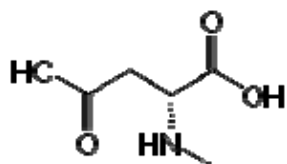
5.5.1 Les analogues structuraux de la BMAA et leurs effets

a) Acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA)

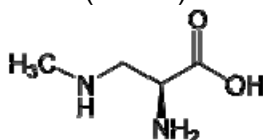
Le NMDA est une substance hydrosoluble de synthèse qui n'est pas retrouvée normalement au niveau biologique. Il est utilisé pour caractériser un type de récepteurs du glutamate, appelés alors «récepteurs NMDA ». Par ailleurs, la forme neutre de l'acide kynurénique, le kynurenate, est un antagoniste non compétitif de ces récepteurs (et des autres du glutamate et donc un neuro protecteur potentiel) (Stone, 2001).

Du point de vue structural, le NMDA est très proche de la structure de la BMAA, avec pour seule différence, un $-COOH$ qui remplace le $-NH_2$. Le NMDA est plus proche du glutamate que la molécule de BMAA qui ne possède qu'une seule fonction acide.

Acide N-méthyl-D-aspartique
(NMDA)



β -N-méthylamino-L-alanine
(BMAA)



Acide glutamique

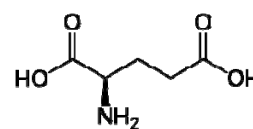


Figure 5 : Structures du NMDA, de la BMAA et de l'acide glutamique

Cette analogie structurale permet d'expliquer le même mode d'action du NMDA et du glutamate sur certains récepteurs du glutamate (le NMDA est un agoniste spécifique des récepteurs du glutamate de type NMDA). A la différence du glutamate, le NMDA ne se lie et n'agit que sur les récepteurs NMDA et n'a aucun effet sur les autres récepteurs du glutamate.

Au point de vue toxicologique : le NMDA agit comme un excitotoxique, c'est-à-dire une substance qui excite en permanence des neurones (ceux qui sont ciblés par le tropisme propre à cette substance) sans que ceux-ci ne puissent la dégrader, ce qui entraîne leur mort. Le NMDA n'est pas connu comme pouvant s'incorporer par erreur dans les protéines. Un syndrome rare est associé à une maladie auto-immune bloquant les récepteurs du NMDA au niveau du cerveau ce qui se traduit par une encéphalite réversible après suppression des autoanticorps (Dalmau et al., 2008). Köles et al., (2016) rappellent que les récepteurs NMDA jouent un rôle central dans les pathologies neurodégénératives.

b) β -N-Oxalylamino-L-alanine (BOAA ou β -ODAP)

Ce composé est un analogue structural du glutamate. La BOAA est retrouvée dans *Lathyrus sativus* (Gesse).

Du point de vue structural, la similarité de la BMAA avec la BOAA est forte. La seule différence est que le radical CH_3 - est remplacé par un radical oxalyl COOH-CO- . La partie commune entre ces deux neurotoxines est donc $-\text{NH-CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})\text{-NH}_2$. La similarité de structure de la BOAA avec le glutamate est encore grande, avec ses deux fonctions $-\text{COOH}$.

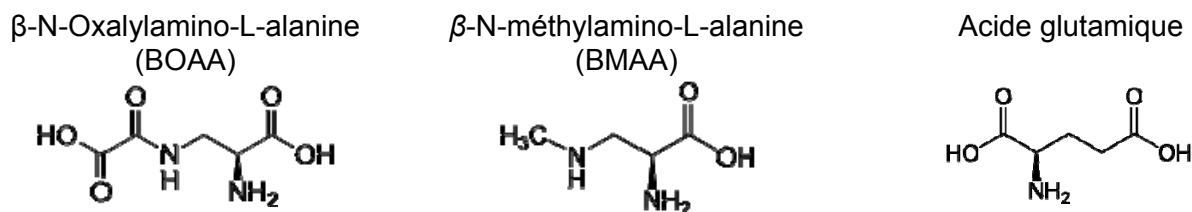


Figure 6 : Structures de la BOAA, de l'acide glutamique et de la BMAA

Au niveau pharmacologique, la BOAA agit sur les récepteurs du glutamate de type NMDA au niveau post synaptique (Koenig et al., 2015) aussi bien que sur ceux non NMDA (Weiss et al., 1989; Allen et al., 1993; Olney, 1994; Goto et al., 2012), par un mécanisme d'excitotoxicité (Chang et al., 1993; Olney, 1994). Sur coupes fines de cerveaux de souris, la neurotoxicité de la BOAA semblerait 1 million de fois plus forte que celle de la BMAA selon Paï et al., (1993). La stéréospécificité fait aussi partie des conditions d'action de la BOAA (Kisby and Spencer, 2011). Très souvent les études sur neurones *in vitro* ont été faites à la fois avec la BMAA et le BOAA ce qui montre bien la proximité d'action de ces deux types de molécules du point de vue pharmacologique et toxicologique (Weiss et al., 1989; Chang et al., 1993; Kisby and Spencer, 2011). Dans ces publications, ces deux toxines sont présentées comme des excitotoxines structurellement proches et seraient impliquées dans la pathogénèse de deux maladies invalidantes sur le plan moteur : ALS-PDC de l'île de Guam et le Lathyrisme. Malgré ces similitudes (structurales et l'action invalidante motrice) leurs symptômes sont néanmoins différents.

Au niveau toxicologique, la BOAA est une neurotoxine responsable d'un syndrome de dégénération des motoneurones appelé « neurolathyrisme » dû à la surconsommation des graines de *Lathyrus sativus*, contenant jusqu'à 1% de BOAA / β -ODAP (Tan et al., 2017). Les symptômes montrent divers degrés d'incapacité à marcher (paraparésies spastiques) jusqu'à une paralysie complète et dans les cas extrêmes à la mort. C'est un syndrome non progressif : si l'ingestion de *Lathyrus sativus* est arrêtée, les atteintes restent en l'état. De telles intoxications ont été décrites en période de famine dans différents pays (Chine, Inde, Ethiopie) et en Espagne au 19^{ème} et 20^{ème} siècle (Gimenez-Roldan et Spencer, 2016).

Au niveau du mode d'action, l'étude de Tan et al., (2017) indique que la BOAA/ β -ODAP peut se combiner avec les récepteurs AMPA présents sur la surface des cellules gliales et active anormalement ces récepteurs, favorisant l'entrée d'ions Ca^{2+} dans le cytoplasme. Ces derniers seraient absorbés par les mitochondries entraînant leur disfonctionnement (diminution du potentiel de membrane et interférence avec la production d'ATP). Par ailleurs, la sur-activation des récepteurs AMPA entraînerait des réactions en cascade ayant pour finalité l'inhibition de la polymérisation des filaments d'actine entraînant des lésions du cytosquelette. Les auteurs de cette étude évoquent certaines étapes communes de cette réaction en cascade avec certains mécanismes observés pour la maladie d'Alzheimer.

c) Acide domoïque (AD)

Du point de vue structural, même s'il semble éloigné de l'acide glutamique, l'acide domoïque présente la séquence $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH-CHNH}(\text{R}_2)\text{-COOH}$ dans une configuration particulière

contrainte qui est celle de l'acide kaïnique. L'acide domoïque est un agoniste excitotoxique des récepteurs du glutamate, l'acide kaïnique étant une substance de référence qui détermine un sous-type des récepteurs de l'acide glutamique, celui des récepteurs de type kaïnique.

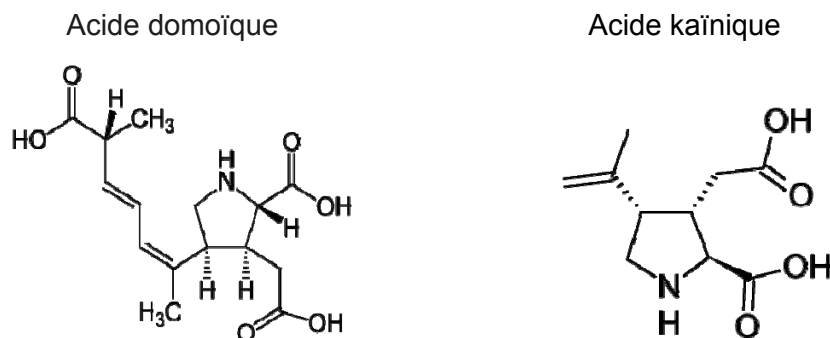


Figure 7 : Structures de l'acide domoïque et de l'acide kaïnique

Au niveau toxicologique, l'acide domoïque est une phycotoxine marine produite par certaines diatomées (phylum des diatomées qui produit aussi la BMAA) qui agit de manière prédominante comme agoniste excitotoxique des récepteurs AMPA/kainate du glutamate avec une prédilection pour l'hippocampe et le noyau amygdaloïde. Cette action induit rapidement de désordres mentaux incluant une perte de mémoire et une désorientation importante dans les 24 à 48h après l'ingestion de fortes doses. De plus, l'ingestion périnatale de faibles doses peut avoir des conséquences neurotératogènes (Doucette et Tasker, 2016).

d) Comparaison des effets BMAA, BOAA et de l'acide domoïque

La publication de Kisby and Spencer (2011) met en exergue un mécanisme similaire d'excitotoxicité *in vitro* pour la BMAA et le BOAA. De plus, ces auteurs font aussi le rapprochement avec l'acide domoïque qui a lui aussi un effet limité différé et contraint par un tropisme sélectif conduisant à un désordre neurologique (self-limiting neurodegenerative disorder) très localisé au niveau de l'hippocampe.

En considérant l'action de ces deux substances, le BOAA et l'acide domoïque, sur les récepteurs du glutamate et l'excitotoxicité concomitante comme cause des effets neurodégénératifs limités observés, la BMAA pourrait avoir le même type d'effets limités, bien différent d'un syndrome de sclérose latérale amyotrophique, chronique, progressif et plus général. En d'autres termes, pour Kisby and Spencer (2011), si la BMAA a un rôle dans l'étiologie du syndrome du Pacifique de l'Ouest ALS-PDC, alors un mécanisme autre que l'excitotoxicité au niveau des récepteurs du glutamate est plus probable. Les données récentes sur l'explication moléculaire du neurolathyrisme (Tan et al., 2017) avec description d'un mécanisme de toxicité plausible renseignent aussi sur les mécanismes de neurodégénération par excitotoxicité observés et un lien avec la maladie d'Alzheimer pourrait alors être envisagé.

5.5.2 Autres analogues structuraux : les composés isomères de la BMAA et leurs effets

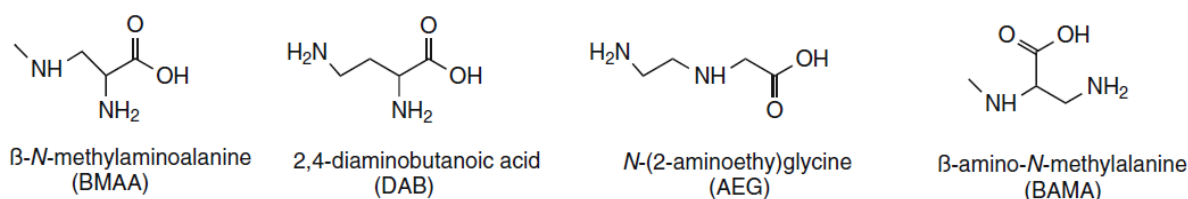


Figure 8 : Structures de la BMAA, du DAB, de l'AEG et du BAMA

Le DAB ou DABA est un acide aminé non protéinogène, isomère de la BMAA. Chimiquement c'est l'acide 2,4-diaminobutyrique, de formule moléculaire $C_4H_{10}N_2O$, et de masse molaire 191,06 g/mol. Il pourrait avoir le même profil toxicologique que la BMAA mais les études à ce sujet sont insuffisantes (Banack et al., 2010, 2011 ; Al-Sammak et al., 2014). La présence de ce produit toxique dans les *Lathyrus sp* (et les *Vicia sp* c'est-à-dire les fèves) fait qu'il est aussi associé à la BOAA et présenté comme impliqué dans le neuropathisme avec une neurotoxicité décrite comme étant secondaire à l'hépatotoxicité (O'Neal et al., 1968). Le DABA renforcerait l'action du glutamate de manière indirecte et donc les effets excitateurs de celui-ci. Il a en effet une grande affinité pour le système de transport du GABA et les sites récepteurs correspondants post synaptiques inhibiteurs de l'action du glutamate (Johnston and Twitchin, 1977).

La découverte des deux autres isomères AEG et BAMA provient de la réflexion de certains groupes sur l'existence de molécules qui pourraient interférer avec l'analyse de la BMAA. Il n'y a pas de données sur la toxicité de ces produits.

5.5.3 Conclusions

Ainsi, le mode d'intoxication par voie orale est rapporté dans la littérature pour des analogues structuraux de la BMAA mais en général pour des fortes doses avec des actions lentes ou différées sur le long terme et donc avec une certaine chronicité mais non progressive c'est-à-dire que l'absence de prise de la toxine n'entraîne pas de progression de la maladie. Le mode d'action des analogues structuraux de la BMAA est assez similaire au niveau de la neuro-excitotoxicité mais avec des cibles différents. Les effets neurodégénératifs sont certains et peuvent rappeler la maladie d'Alzheimer ou parfois l'ALS mais ils sont non progressifs.

Néanmoins, il faut rappeler que les graines de cycas contiennent, à côté de la BMAA, d'autres substances neurotoxiques que la BMAA, comme la et la cycasine (hétéroside) et son aglycone le MAM (méthylazoxyméthanol) proche des nitrosamines comme souligné par Kisby and Spencer (2011). Ainsi le MAM est un inhibiteur de la synthèse protéique actif au niveau cellulaire ; il endommage l'ADN neuronal et entraîne l'apoptose et une hépatotoxicité. Chez la souris, il cause des lésions dans l'épithélium nasal et a un effet cancérigène. Chez le rat, il entraîne une activité électroencéphalographique typique d'un statut épileptique ; il réduit la coordination motrice et réduit aussi le nombre de neurones dans la Corne d'Ammon de l'hippocampe (Rivadeneira-Domínguez et Rodríguez-Landa, 2014); c'est donc aussi un agent neurotoxique.

Tous ces points ci-dessus suggèrent une action coordonnée avec effets potentialisateurs des différentes toxines retrouvées dans les graines de cycas.

A retenir

D'autres composés proches de la BMAA (BOAA, également présent dans les graines de cycas ainsi que le DAB) sont connues comme responsables de pathologies neurologiques des voies motrices, comme le neuropathisme, proche du syndrome SLA. Elles agiraient toutes sur les récepteurs du glutamate et pourraient entraîner diverses neurodégénérescences (tauopathie de type Alzheimer ou parfois SLA-PDC au niveau mécanistique) motrices sur le court ou le long terme mais l'adressage ou le tropisme de ces molécules pour une zone cérébrale particulière comme par exemple, le système pyramidal, semble plus spécifique de l'action de la BMAA.

6 Evaluation du poids des preuves du lien entre l'exposition chronique à la BMAA et la SLA

Dans son avis du 25 juillet 2016, basé sur les recommandations du Groupe de Travail « Méthodologie de l'Évaluation des Risques » (GT MER), l'Anses définit le concept du poids des preuves comme étant « une synthèse formalisée de lignes de preuves, éventuellement de qualités hétérogènes, dans le but de déterminer le niveau de plausibilité d'hypothèses ». La ligne de preuves est « un ensemble d'informations de même nature, intégrées pour évaluer une hypothèse ». L'intégration des lignes de preuves permettrait alors d'exprimer le poids des preuves. Cette intégration peut se faire selon une méthode qualitative ou quantitative.

Le GT « BMAA » a choisi de suivre une méthode qualitative sans notation en prenant soin de détailler autant que possible les critères utilisés. Les critères retenus pour cette analyse ont été ceux de Hill (1965) car ce sont les plus largement reconnus et utilisés dans le domaine épidémiologique. Neuf critères tiennent compte d'un ensemble de preuves épidémiologiques statistiquement significatives et de certaines preuves (biologiques) obtenues en laboratoire. Ils constituent un argumentaire en faveur de l'inférence causale de la relation étudiée.

Ces critères (définis plus en détails en annexe 4) sont : la temporalité, la force de l'association, la reproductibilité des résultats, la relation dose-réponse, les preuves expérimentales du type de parallélisme de la cause et de l'effet (notamment l'effet de la suppression de l'exposition), la spécificité, la plausibilité mécanistique, la cohérence biologique, l'analogie.

Dans cette analyse, il est présumé de l'existence d'une association statistique entre l'exposition et la maladie, avant d'appliquer la liste de considérations à l'ensemble des preuves scientifiques disponibles.

La temporalité : ce critère est difficile à renseigner considérant les éléments suivants :

- Le délai entre l'exposition à la BMAA et l'apparition de symptômes neurotoxiques chez l'être humain pourrait être long (analogie avec les maladies à prions, neuropathyrisme) ;
- Il n'existe évidemment pas de modèle humain et il n'y a pas d'études de cas ;
- Les seules données disponibles chez l'animal de laboratoire sont issues d'un modèle aigu ou subaigu (administration sur une période courte).

La force de l'association entre le facteur de risque environnemental et l'apparition de SLA : même dans l'exemple historique de l'île de Guam et sa population chamorro où l'incidence de SLA était 50 à 100 fois supérieure au niveau moyen mondial dans les années 1950, l'association avec l'exposition à la BMAA ne peut pas être estimée car les analyses réalisées dans des graines de cycas, des chauves-souris et des cerveaux humains ont suivi une méthodologie jugée non satisfaisante par le GT, en termes de détection (confirmation de présence) et de quantification (concentration)¹.

La reproductibilité des résultats de l'association : des cas de SLA potentiellement associés à la BMAA ont été rapportés dans plusieurs régions du monde (Guam, Japon, Indonésie), mais le lien avec une exposition à la BMAA pourrait être dû à des facteurs de confusion (tels que les facteurs génétiques ou d'autres facteurs environnementaux).

¹ Il est regrettable que ces analyses n'aient pas été réactualisées avec les nouvelles méthodologies retenues par le GT. Cela est également le cas pour l'étude de Pablo et al. (2009)NS qui suggère la détection de BMAA dans des cerveaux de patients américains (hors Guam) atteints de SLA, sans corrélation avec l'environnement. De manière générale, il existe une controverse sur la présence de BMAA liée intracérébrale (à la fois chez l'Homme et l'animal).

La relation dose-effet chez l'Homme : ni les données épidémiologiques des cas historiques de l'Île de Guam ni les données expérimentales chez l'animal de laboratoire ne permettent d'étayer ce critère.

L'effet de la suppression de l'exposition : les exemples historiques (Guam, Japon, Indonésie) montrent qu'une modification dans les habitudes de vie (en particulier le régime alimentaire) a diminué l'incidence de la SLA à un niveau comparable au niveau moyen mondial pour les générations suivantes. Il n'est toutefois pas certain que cette modification soit associée à une diminution ou à la suppression de l'exposition à la BMAA.

La spécificité de l'effet : pas de spécificité de l'effet, la BMAA n'est pas le seul facteur potentiel qui expliquerait l'apparition de la SLA, qui est une maladie multifactorielle.

Analogie : d'autres toxines proches de la BMAA (par exemple la β -N-oxalylamino-L-alanine, désignée par les 2 acronymes BOAA et β -ODAP) sont connues comme responsables de pathologies neurologiques des voies motrices, comme le neuropathisme.

Plausibilité et cohérence biologique : du point de vue mécanistique, les données expérimentales *in vivo* et *in vitro* confirment la neurotoxicité de la BMAA et suggèrent plusieurs mécanismes d'action possibles voire complémentaires (excitotoxicité, incorporation protéique, interaction avec la neuromélanine) et la présence de marqueurs de maladies neurodégénératives (hyperphosphorylation de la protéine Tau, forme agrégée de TDP-43).

Au-delà des critères de Hill, le GT « BMAA » constate que la SLA, bien que multifactorielle, a une composante génétique bien documentée qui permet l'exclusion de ces cas et d'identifier ainsi un lien avec des facteurs environnementaux. La présence de cas groupés de SLA, notamment la présence de cas familiaux non génétiques, conforte l'hypothèse d'une exposition liée aux habitudes de vie (ex. habitudes alimentaires) et à l'environnement. Toutefois, il n'a pas été possible, jusqu'à ce jour, d'identifier un lien de causalité entre les cas groupés et l'exposition à la BMAA.

Au vu de ces critères, le GT « BMAA » conclut que le lien de causalité entre l'exposition à la BMAA et la survenue de SLA n'est pas démontré, en l'état actuel des connaissances.

De manière générale, dans le cas des maladies neurodégénératives, multifactorielles, établir un lien épidémiologique selon les critères de Hill s'avère difficile.

Néanmoins, l'hypothèse que l'exposition à la BMAA soit un facteur favorisant des phénomènes neurotoxiques est hautement probable, principalement par sa capacité à activer des mécanismes de neurodégénérescence.

7 Sources et occurrence de la BMAA

7.1 Organismes producteurs de BMAA (et ses isomères)

Au sein des milieux aquatiques, il est considéré à ce jour que la présence de BMAA trouve son origine dans la prolifération de certaines espèces phytoplanctoniques ou phytobenthiques. Tandis que les cyanobactéries ont été d'abord considérées comme étant les principaux producteurs de BMAA en eau douce (par exemple par Cox et al., 2005^{NS}), une étude plus récente a démontré que peu d'espèces de cyanobactéries en produisent en conditions expérimentales (Reveillon et al., 2015^{TS}). En revanche, divers diatomées et dinoflagellés d'origine marine ou présents dans les milieux salins ont récemment été décrits comme producteurs de BMAA et de ses isomères (Jiang et al., 2014^{TS} ; Lage et al., 2014^{MS}, Réveillon et al., 2015^{TS}).

Le DAB (appelé aussi DABA) est un constituant de la paroi de certaines bactéries comme les corynaebacteries (Perkins & Cummins, 1964), les Actinomycètes chez *Agrococcus jenensis* (Groth et al., 1996). Il a aussi été rapporté pour la première fois en 2008 dans la cyanobactérie *Calothrix* sp. PCC7103 (Rosen & Hellenas, 2008^{TS}).

Comme mentionné au chapitre 3, la BMAA a été découverte dans les années 60 dans des graines de *Cycas circinalis* (Gymnospermes). D'autres espèces de cycas seraient capables de les produire comme *Cycas debaoensis* (McCarron et al., 2014^{MS}) et *Cycas revoluta* (Spáčil et al., 2010^{MS} ; Fan et al., 2014^{MS}). Certains angiospermes comme le genre *Gunnera* ont également été évoqués (Al-Sammak et al., 2014^{NS}).

La BMAA serait présente dans certaines plantes aquatiques du genre *Myriophyllum* ou de type *Azolla* avec implication d'une endosymbiose avec des cyanobactéries productrices de BMAA (*Nostoc*) (Al-Sammak et al., 2014^{NS}).

Le DAB a spécifiquement été rapporté dans plusieurs espèces d'angiospermes (e.g. *Lathyrus latifolius* ou *Brassica oleracea*, respectivement pois vivace et chou) (Banack et al., 2010 ; Krüger et al., 2010^{TS} ; Spáčil et al., 2010^{MS}) ainsi que dans certaines plantes aquatiques (Al-Sammak et al., 2014^{NS}) et d'autres prélevées dans des champs (McGorum et al., 2015). La DABA a été décrite dans plusieurs espèces de plantes herbacées du genre *Lathyrus* (Bell et Al., 1962) dans les feuilles de gesse des bois (*Lathyrus sylvestris*), les teneurs de DABA atteignent 2 à 3% du poids ou plus dans les tissus reproductifs (Foster et al., 1986).

7.2 Contamination des milieux aquatiques

Le tableau 3 ci-dessous présente des données obtenues à partir d'échantillons environnementaux (lacs, lagunes, réservoirs, etc.). Les articles reportant ce type de données sont peu nombreux. Ainsi, sont d'abord présentées les données issues d'articles classés vert (TS) ou orange (MS), puis celles issues d'articles classés rouge (NS) comme complément d'information, bien que criticables.

Tableau 3. Synthèse des données relatives à la contamination des milieux aquatiques par la BMAA et ses isomères

Echantillon	Ecosystèmes	Pays	Toxine	Fraction	Concentration	Reference
Périphyton	Lagune	Etang de Thau (France)	BMAA AEG DAB	Totale Totale Totale	1.3 – 4.3 µg/g DW n.d. – 0.8 µg/g DW 1.3 – 4.8 µg/g DW	Réveillon et al., 2015
Eau brute	Lacs (n = 12)	Canada	BMAA AEG DAB	Libre ? ² Libre ? ² Libre ? ²	n.d. – 0.3 µg/L n.d. – 0.04 µg/L n.d. – 0.08 µg/L	Roy-Lachapelle et al., 2016
Eau (<i>Dolichospermum</i> sp.)	N.A.	N.A.	BMAA	Totale	n.d.	Faasen et al., 2016
Efflorescences, écumes biofilms cyanobactéries	Lacs (n = 12)	Royaume-Uni	BMAA	Libre Liée	n.d. – 276 µg/g DW 6 – 48 µg/g DW	Metcalfe et al., 2008
Écumes de cyanobactéries	Plans d'eau urbains (n = 21)	Pays-Bas	BMAA DAB	Totale Totale	n.d. – 42 µg/g DW n.d. – 4 µg/g DW	Faasen et al., 2009
Eau brute	Mer Baltique (2 stations)	Ile d'Askö (Suède)	BMAA	Totale	2.3 – 15 ng/g DW	Jonasson et al., 2010
Eau brute	Lac (n = 1)	Lac Finjasjön (Suède)	BMAA	Totale	n.d. – 6 ng/g DW	Lage et al., 2015
Eau brute	Lacs (n = 3)	Chine	BMAA DAB	Libre Liée Libre Liée	n.d. n.d. 0.4 – 3.8 ng/g WW n.d.	Fan et al., 2014
Eau brute	Lacs (n = 4)	New Hampshire (USA)	BMAA DAB	Totale Totale	< LQ < LQ	Callier et al., 2009
Eau brute	Sources	Désert de Gobi (Mongolie)	BMAA	Totale	n.q.	Craighead et al., 2009
Eau brute	Réservoir (n= 1)	HartbeespoortDam (Afrique du Sud)	BMAA	Totale	n.d. – 0.25 µg/g DW	Scott et al., 2014
Eau brute	Etangs, réservoirs urbains et ruraux (n = 19)	Qatar	BMAA (rural) BMAA (urbain) AEG (rural) AEG (urbain) DAB (rural) DAB (urbain)	Totale Totale Totale Totale Totale Totale Totale Libre T.S.	n.d. n.d. 1 – 3.5 ng/L n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d.	Chatziefthimiou et al., 2016
Eau brute	Lac Winnipeg	Canada	BMAA	Libre	n.d. – c.a. 2 µg/L	Pip et al., 2016
Eau brute	Lacs (n = 3)	Afrique du Sud	BMAA	Totale	n.d – 25 µg/L	Esterhuizen-Londt 2011
Eau brute	Réservoirs (n = 12) NA	Nebraska (USA)	BMAA DAB BMAA DAB	Totale Totale Totale Totale	n.d. – 24.5 µg/L n.d. – 21.1 µg/L n.d. – 39.6 µg/L n.d. – 37.0 µg/L	Al-Sammak et al., 2014
Phytoplancton	Lac (n = 1)	Lac Taihu (Chine)	BMAA	Totale	2.0 – 7.1 µg/g DW	Jiao et al., 2014

NA : donnée non disponible

n.q. : non quantifié

n.d. : non détecté

DW : dry weight (poids sec)

WW : wet weight (poids humide)

T.S. : fraction soluble totale

L'essentiel des données disponibles dans la littérature a été produite à partir de prélèvements provenant de lacs et de réservoirs d'eau douce. La majorité des études expriment les données de concentration en BMAA (et isomères) par unité de poids sec (µg/g DW) ou de poids frais (µg/g FW) de matière phytoplanctonique ou phytobenthique. Or, il est impossible d'exprimer les concentrations en BMAA par unité de volume, ce qui limite l'utilisation de telles données pour évaluer les risques d'exposition humaine. Les concentrations maximales reportées atteignent respectivement 0,3 µg/L (lacs au Canada, seule étude considérée exprimant les données par unité de volume, article vert) et 276 µg/g DW (lacs du Royaume-Uni, par unité de poids sec, article orange).

7.2.1 Lacs et réservoirs

- **Royaume-Uni** : Des échantillons d'efflorescences, d'écumes et de biofilms à cyanobactéries provenant de 12 lacs (Angleterre, Ecosse et Pays de Galle) ont été collectés entre 1990 et 2004 et ont fait l'objet d'une quantification des fractions libres et liées de BMAA (Metcalf et al., 2008^{NS}). La BMAA serait détectée dans 83 et 100% des échantillons correspondant respectivement à la fraction libre et liée. Des concentrations en BMAA libres supérieures à la fraction liée (jusqu'à 20x) auraient été mesurées dans 50% des échantillons de phytoplancton. Cette étude reporte également les concentrations en BMAA par unité de poids sec les plus élevées rencontrées dans le cadre de l'analyse. L'échantillon concerné correspond à un lac écossais présentant une efflorescence à cyanobactérie filamenteuse *Planktothrix sp.* (BMAA libre : 276 µg/g D.W., BMAA liée : 11 µg/g D.W., BMAA totale : 287 µg/g D.W.).

- **Canada** : Des échantillons d'efflorescences à cyanobactéries provenant de 12 lacs de la région de Québec ont été collectés sur la période 2009-2013 (Roy-Lachapelle et al., 2016^{TS}). Cette étude n'indique pas clairement quelle fraction a été analysée mais l'absence d'extraction acide dans le matériel et méthode suggère une analyse de la fraction libre. La BMAA a été identifiée dans 33% des échantillons avec des concentrations maximales de 0,3 µg/L. Des traces (< 0,1 µg/L) d'AEG et de DAB ont été détectées dans respectivement 42 et 50% des échantillons.

- **Pays-Bas** : 21 plans d'eau urbains ont été étudiés. La BMAA a été retrouvée dans 43% des échantillons à des concentrations atteignant 42 µg/g D.W. (Faassen et al., 2009^{MS}). Le DAB a été détecté dans 10% des échantillons, cependant les concentrations reportées (max : 4 µg/g D.W.) sont inférieures à la limite de détection indiquée par les auteurs de l'étude (8 µg/g D.W.).

- **Chine** : Des prélèvements provenant de trois lacs chinois présentant des communautés dominées par des cyanobactéries (*Microcystis spp.* et *Dolichospermum flos-aquae*) n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de BMAA que ce soit dans la fraction libre ou liée. Des traces de DAB (0,4 -3,8 ng/g D.W.) ont cependant été détectées seulement sous forme libre, et ce dans 100% des échantillons (Fan et al., 2014^{MS}).

- **Suède** : Une seule étude (Lage et al., 2015^{MS}) a été publiée à ce jour et concerne le Lac Finjasjön. Des traces de BMAA y ont été détectées dans 75% des échantillons collectés (jusqu'à 6 ng/g D.W.).

7.2.2 Lagune

Dans une étude (Reveillon et al., 2015^{TS}) de l'étang de Thau (France), la BMAA et le DAB ont été détectés dans la totalité des échantillons de périphyton analysés à des concentrations maximales atteignant respectivement 4,3 et 4,8 µg/g D.W. Des traces d'AEG ont également été mises en évidence dans 66% des échantillons.

7.2.3 Milieu marin

Une seule étude en milieu marin (Jonasson et al., 2010^{MS}) a été identifiée. Elle porte sur des échantillons collectés au niveau de l'île d'Askö en Mer Baltique. De la BMAA a pu être détectée dans 100% des échantillons dans des concentrations allant de 2,3 à 15 ng/g D.W. Les prélèvements analysés étaient associés à la présence de cyanobactérie des genres *Nodularia* et *Aphanizomenon*.

Informations supplémentaires apportées par les articles classés rouge (NS)

Une étude menée sur les lacs du Nebraska aux Etats Unis (Al-Sammak et al., 2014^{NS}) montre que la BMAA et le DAB seraient rencontrés dans 12,5% des échantillons d'eau brute (méthode : dérivation AQC, détection/quantification par HPLC-MS/MS). La présence de ces métabolites (et leur

quantification) dans les échantillons positifs a par la suite été confirmée par HPLC-MS/MS et des concentrations de 39,6 et 37,0 µg/L ont été mesurées, respectivement pour le BMAA et le DAB. Bien que 10 des lacs du Nebraska soient connus pour présenter des efflorescences estivales à cyanobactéries, ces données suggèrent une présence sporadique de ces métabolites. Le lien entre efflorescences à cyanobactéries et présence de BMAA/DAB ne peut cependant pas être évalué en raison de l'absence de données relatives à la composition phytoplanctonique des échantillons. Une autre étude (Callier et al., 2009^{NS}) menée aux Etats-Unis et concernant 4 lacs situés dans le New Hampshire montre la présence de BMAA et de DAB dans l'eau brute d'un seul lac à des concentrations inférieures aux limites de quantification.

Pip et al. (2016^{NS}) ont déterminé les concentrations en BMAA libre (mesurées par test ELISA) dans l'eau brute du lac Winnipeg au Canada tous les 4 jours sur une période de 7 mois (mai-novembre). Bien que la méthode utilisée présente une fiabilité moindre que les méthodes basées sur la spectrométrie de masse, les données présentées dans cette étude suggèrent une corrélation positive entre la turbidité (essentiellement contrôlé par les niveaux de biomasse phytoplanctonique) et les concentrations en BMAA libre. Les auteurs ont également observés une corrélation positive entre les concentrations en phaeophytine (un produit de dégradation de pigments photosynthétiques) et les concentrations en BMAA, ce qui suggère un relargage de BMAA libre en période de sénescence des proliférations phytoplanctoniques. Les concentrations maximales mesurées par test ELISA atteignaient environ 2 µg/L de BMAA libre (97% d'échantillons positifs). Cette étude ne présente pas de données relatives à la composition des communautés phytoplanctoniques.

Une étude du Lac Taihu en Chine (Jiao et al., 2014^{NS}) reporte des concentrations en BMAA totale allant de 2,0 à 7,1 µg/g D.W. dans le phytoplancton. La BMAA aurait été détectée dans 100% des échantillons.

Des échantillons d'eau provenant de trois plans d'eau d'Afrique du Sud ont été étudiés, dont deux présentaient des proliférations de cyanobactéries (une efflorescence à *Dolichospermum* et une efflorescence à *Microcystis*). Les deux échantillons correspondant aux efflorescences à cyanobactéries présentaient des concentrations en BMAA intracellulaire pouvant atteindre 25 µg/L (Esterhuizen-Londt & Downing, 2011^{NS}).

Une étude menée au Qatar sur 19 plans d'eau urbains et ruraux (Chatziefthimiou et al., 2016^{NS}) reporte une absence de DAB et de BMAA dans l'eau brute. De l'AEG (fraction totale) aurait été détectée dans la quasi-totalité des plans d'eau ruraux. Cependant, les concentrations reportées sont inférieures à la limite de détection indiquée par les auteurs. Ce résultat n'apparaît donc pas comme étant exploitable.

Une étude (Craighead et al., 2009^{NS}) des sources d'eau douce du désert de Gobi (Mongolie) utilisée comme source d'eau potable a permis de détecter la BMAA et le DAB dans respectivement 56 et 100% des échantillons. La présence de cyanobactéries, en association à des chlorophycées et des diatomées, a été observée dans les échantillons analysés. Aucune quantification n'a été possible considérant les faibles teneurs en BMAA et DAB des échantillons d'eau.

Enfin, en Afrique du Sud, une étude du réservoir Hartbeespoort (Scott et al., 2014^{NS}), présentant des efflorescences récurrentes à cyanobactéries, a également permis de détecter de la BMAA (fraction totale) dans 70% des échantillons d'eau brute à des concentrations jusqu'à 0,25 µg/g D.W.

7.2.4 Conclusion

Du fait des premières informations disponibles en 2005 rapportant la production de BMAA par des cyanobactéries, informations remises en question par la suite, les études présentées dans le cadre de cette section sont essentiellement focalisées sur des sites présentant des proliférations de cyanobactéries. Bien qu'il existe de fortes disparités en termes de méthodologies utilisées pour la quantification de la BMAA et de ses isomères, les données suggèrent que les cyanobactéries d'eau douce sont susceptibles de produire ce type de métabolites. La comparaison des valeurs

quantitatives reste cependant extrêmement difficile. En effet, les valeurs reportées couvrent plus de 5 log et vont de l'ordre du ng/L à près de 40 µg/L (une variabilité similaire est observée pour les données exprimées par unité de masse). Ces différences peuvent trouver leur origine dans l'abondance variable de producteurs de BMAA (et isomères), de capacités variables à produire ces métabolites mais également de différences méthodologiques. Sur ce dernier point, il faut noter que la grande majorité des études ne présentent pas les données nécessaires pour qualifier la validité des méthodes utilisées (classées oranges ou rouge). Bien que ces études se focalisent sur les proliférations de cyanobactéries, aucune étude ne présente de données quantitatives relatives à la composition phytoplanctonique des échantillons analysés. De plus, bien que des diatomées et des dinoflagellés aient été décrits comme potentiellement producteurs de BMAA en eaux douces et en milieu salin/marin, la détection de BMAA chez ces organismes proliférant en milieu naturel n'a été que très peu reportée. Une étude systématique d'une diversité d'échantillons présentant des compositions phytoplanctoniques contrastées pourrait permettre d'évaluer de manière plus précise la diversité des producteurs potentiels de BMAA. Enfin, une seule étude ciblant le milieu marin est disponible à ce jour, ce qui limite la possibilité de caractériser la contamination des eaux marines.

7.3 Données préliminaires sur la contamination des sols et aérosols

Une analyse préliminaire des données de contamination des sols et de l'air a été réalisée par le GT « BMAA ». La méthode utilisée pour sélectionner les articles n'a cependant, à ce stade, pas suivie une approche de type revue systématique. Seule deux études ont pu être identifiées (Tableau 4).

Tableau 4 : Tableau de synthèse des données relatives à la contamination de l'air et du sol par la BMAA et ses isomères

Echantillon	Ecosystèmes	Pays	Toxine	Fraction	Concentration	Référence
Echantillon d'air	Proximité de lacs (n=3)	New Hampshire (USA)	BMAA AEG DAB	Totale Totale Totale	n.d. < LQ n.d. < LQ n.d. 5 ng/cm ²	Banack et al., 2015 ^{MS}
Echantillon de sol	Sol en milieu désertique	Al Kharrara, Qatar	BMAA AEG DAB	Totale Totale Totale	n.d. 2,8-7,0 µg/g DW 0,7-4,4 µg/g DW	Richer et al, 2015

Une hypothèse formulée dans les travaux de Stommel et al., (2013) suggère que la BMAA et ses isomères peuvent être transportés par des aérosols contenant des cyanobactéries. Cette vision est complétée par les travaux de Banack et al. (2015^{MS}) qui associent cette transmission par aerosolisation à un cluster de SLA (incidence 25 fois supérieure à celle attendue normalement) situé en bordure du lac Mascoma à Enfield (New Hampshire (USA)).

Par ailleurs, le passage de la BMAA dans des plantes via les eaux d'arrosage contaminées ou bien l'irrigation est décrit pour le blé tendre *Triticum aestivum*, (Contardo-Jara et al., 2014).

7.4 Contamination des produits aquatiques consommés par l'Homme

Cette partie vise à évaluer la possibilité d'une bioaccumulation de la BMAA dans les organismes aquatiques, dulcicoles et marins, consommés par l'Homme. Sont rapportées les concentrations moyennes en BMAA (et ses isomères) dans les parties consommées de différentes espèces, ainsi que les concentrations maximales, exprimées en mg/kg de poids frais.

7.4.1 Méthodologie suivie pour la sélection des articles

La recherche bibliographique a été réalisée avec PubMed et Scopus. Une première étape de sélection des articles pertinents a été effectuée selon ces critères : l'étude (hors revue) doit concerner une espèce aquatique potentiellement consommée par l'Homme et prélevée en milieu naturel (pas de contamination en laboratoire), elle doit reporter des résultats de concentration de BMAA ou des isomères naturels DAB, AEG et BAMA. L'existence de ses isomères rend nécessaire l'utilisation d'une méthode analytique très sélective, qui a constitué la seconde étape de sélection des articles. Ainsi, une grande partie des études n'ont pas été incluses dans ce rapport en raison d'une méthodologie analytique inappropriée ou jugée non suffisamment fiable (cf chapitre 3).

7.4.2 Synthèse des grilles de lecture des articles classés vert

Le tableau 5 présente les données issues des articles remplissant l'ensemble des critères d'inclusion, en particulier une méthode analytique fiable du point de vue qualitatif et quantitatif (articles classés vert, n = 7). Les grilles de lecture de ces différents articles sont présentées en annexe 4. Lorsque les concentrations sont rapportées en mg/kg de poids sec (DW), elles ont été estimées en mg/kg de poids frais (FW) sous l'hypothèse de tissus composés à 83% d'eau pour les huîtres, 83,2% pour les moules, 78,4% dans la chair de crabe et 83% chez l'écrevisse (d'après Souci et al., 1994). En l'absence de données pour la teneur en eau du cartilage de requin, les valeurs ont été conservées en mg/kg de poids sec.

7.4.2.1 Contamination des organismes issus des écosystèmes aquatiques dulcicoles

Crustacés

Jiang et al. (2014^{TS}) ne reportent aucune accumulation de BMAA totale chez des écrevisses en provenance de lacs en Suède et en Turquie (concentrations inférieures à la limite de détection).

Poissons

Pas de données disponibles dans les publications sélectionnées.

7.4.2.2 Contamination des organismes issus des écosystèmes aquatiques marins

Bivalves et crustacés

France

En 2013, dans l'étang de Thau, de la BMAA, du DAB et de l'AEG sous forme totale (= BMAA libre + BMAA liée) ont été détectés dans tous les échantillons de moules (*Mytilus galloprovincialis*) et d'huîtres (*Crassostrea gigas*) à des concentrations allant de 0,1 à 2,45 mg/kg FW (Reveillon et al., 2014^{TS}). Les formes libres sont détectées de manière beaucoup plus sporadique. D'après Reveillon et al. (2014^{TS}), chez les moules, la BMAA libre et l'AEG libre sont retrouvés à des concentrations plus faibles (respectivement < 0,34 et < 0,08 mg/kg FW) et moins souvent (dans respectivement 4 et 3 échantillons sur 19), que la BMAA totale et l'AEG total (respectivement 0,64-2,45 et 0,1-0,2 mg/kg FW) retrouvés dans tous les échantillons. Il en est de même chez les huîtres : BMAA libre et AEG libre à respectivement <0,08 et <0,01 mg/kg FW et dans 1 échantillon sur 19, contre des concentrations de respectivement 0,5-1,8 et 0,1-0,3 mg/kg FW de BMAA totale et AEG total retrouvés dans tous les échantillons. La BMAA totale et l'AEG total dans les moules suivent une cinétique temporelle avec une augmentation graduelle de juin à début septembre 2009, période d'activité accrue de filtration des bivalves et période de prolifération phytoplanctonique. Le DAB est présent dans tous les échantillons de moules et d'huître de la saison, sans variation temporelle, à la fois sous forme libre (respectivement 0,08-1,2 et 0,03-0,6 mg/kg FW) et totale (respectivement 0,6-1,6 et 0,6-1,5 mg/kg FW).

Tableau 5 : Synthèse des articles éligibles (classés TS) relatifs aux concentrations de BMAA chez des organismes aquatiques consommés par l'Homme.

Références	Isomères et fraction	Espèces, nombre échantillons total	Origine	Concentrations reportée en mg/kg poids frais (FW) ou estimées du poids sec (DW)
Christensen et al 2012	BMAA Totale	Bivalves : huîtres (<i>Crassostrea virginic</i>), n = 15, 83% eau dans tissus	Louisiane (n=12), Mississippi (n =3)	1,5-8 mg/kg FW Louisiane, 1,2 -1,7 mg/kg DW Mississippi
		Crustacés : crabe bleu (<i>Callinectes sapidus</i>), n = 5, 78% eau dans tissus	Floride	1,08-3,02 mg/kg FW
Salomonsson et al 2013	BMAA Totale	Bivalves : moules (<i>Mytilus sp</i>), n = 4	Atlantique	0,27-1,6 mg/kg FW
Jiang et al 2014	BMAA Totale	Bivalves : moule (<i>Mytilus edulis</i>), huîtres (<i>Ostrea edulis</i> , <i>Crassostrea gigas</i>), n = 12	Atlantique Nord, Suède, Grèce, Atlantique France	BMAA totale moules : de 0,08 à 0,9 mg/kg FW BMAA totale huîtres : de 0,1 à 0,66 mg/kg FW
		Crustacés : crevette (<i>Caridea sp</i>), écrevisse (<i>Astacus leptodactylus</i>), n = 6	Turquie et Suède (eau douce)	BMAA totale crevette : de 0,11 à 0,46 mg/kg FW, ND écrevisses
		Poissons : plie (<i>Pleuronectes platessa</i>), hareng (<i>Clupea harengus</i>), saumon (<i>Salmo salar</i>), omble chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>), morue (<i>Gadus morhua</i>), perche (<i>Perca fluviatilis</i>), n = 21	Mer Baltique, Atlantique Nord, Norvège, Suède	BMAA totale plie : de ND à 0,02 mg/kg FW, hareng : de ND à 0,01 mg/kg FW
Reveillon et al 2014	BMAA, DAB, AEG, fraction totale et libre	Bivalves : moule (<i>Mytilus galloprovincialis</i>), n = 19	Etang de Thau, France	BMAA libre < 0,34 mg/kg FW, BMAA totale 0,64-2,45 mg/kg FW AEG libre < 0,08 mg/kg FW AEG total 0,1-0,2 mg/kg FW DAB libre 0,08-1,2 mg/kg FW DAB total 0,6-1,6 mg/kg FW
		Bivalves : huître (<i>Crassostrea gigas</i>), n = 14		BMAA libre <0,08 mg/kg FW BMAA totale 0,5-1,8 mg/kg FW AEG libre (ND) AEG total 0,1-0,3 mg/kg FW DAB libre 0,03-0,6 mg/kg FW DAB total 0,6-1,5 mg/kg FW
Reveillon et al 2015	BMAA, DAB, AEG, fraction totale et libre	Bivalves : moule (<i>Mytilus galloprovincialis</i>), n = 17	Etang de Thau, France	BMAA libre max 0,2 mg/kg FW, BMAA totale max 1,65 mg/kg FW, moy 0,68 mg/kg FW AEG libre max 0,05 mg/kg FW AEG total max 0,2 mg/kg FW, DAB libre max 1,05 mg/kg FW, DAB total max 1,8 mg/kg FW, moy 1,22 mg/kg FW
Salomonsson et al 2015	BMAA Totale et libre	Bivalves : moule (<i>Mytilus edulis</i> n = 6, <i>Mytilus edulis platensis</i> n = 12, <i>Perna Canaliculus</i> n =3), coquille St Jacques (<i>Placopecten magellanicus</i> n = 3)	Scandinavie, Amérique du Sud, Australie, Etats Unis	BMAA libre moules de < 0,15 à 0,38 mg/kg FW BMAA totale moules de 0,28 à 7,08 mg/kg FW BMAA libre coquille St Jacques : de 0.18-0,46 mg/kg FW BMAA totale coquille St Jacques : de 1,12 à 1,46 mg/kg FW
		Crustacés : crevette (<i>Pandalus borealis</i> n = 3), crabe (<i>Cancer pagarus</i> n = 1, <i>Portunus haani</i> n = 1), écrevisse (<i>Procambrus claarki</i> n = 1)	Irlande, Chine, Atlantique Nord-Est	BMAA crabe (pinces) détectée mais non quantifiée ND dans crevettes et écrevisses
		Poissons : saumon Atlantique (<i>Salmo salar</i> n = 1), loup de mer (<i>Dicentrarchus labrax</i> n = 1), brème (<i>Sparus aurata</i> n = 1), corégone (<i>Coregonus sp</i> n = 1), sandre (<i>Sander lucioperca</i> n = 1), truite de mer (<i>Salmo truttae</i> n = 2)	Norvège, Italie, Grèce, Suède	ND
Mondo et al 2014	BMAA, DAB et AEG fraction totale	Requins cartilage, espèces diverses non précisées, n = 16, teneurs en poids sec : % eau tissus?	Compléments disponibles dans commerce, origines multiples	En poids sec : BMAA : 1 échant = nd, 15 échant/16 : 86-265 mg/kg DW, moy 169 mg/kg DW DAB : 16 échant/16, de 69 à 1483 mg/kg DW, moy 318 mg/kg DW AEG : 16 échant/16, de 1300 à 1730 mg/kg DW, moy 1627 mg/kg DW

Reveillon et al. (2015^{TS}) ont également mené sur l'étang de Thau une investigation de plusieurs mois avec des prélèvements au minimum mensuel de moules (n = 17), du biofilm de leur coquille (n = 13) et de plancton (n = 17) entre juillet 2013 et août 2014, révélant une contamination de tous les échantillons prélevés sur cette période par la BMAA, le DAB et l'AEG. Chez les moules, la BMAA libre est retrouvée moins souvent (16 échantillons/34) et toujours à des concentrations plus faibles (max 0,2 mg/kg FW) que la BMAA totale (max 1,65 mg/kg FW). La concentration de BMAA des moules montre des variations saisonnières avec une augmentation en été et en automne 2013 et 2014. L'AEG est retrouvé dans les tissus des bivalves sous forme totale dans 31 des 34 échantillons (max 0,2 mg/kg FW) mais sous forme libre dans seulement 5 échantillons et à des concentrations maximales de 0,05 mg/kg FW. Par contre, le DAB est retrouvé dans tous les échantillons et à des concentrations constantes entre organes et pendant l'année (moyenne de 1,2 mg/kg FW), à la fois sous forme libre (max 1,05 mg/kg FW) et totale (max 1,8 mg/kg FW).

Par ailleurs, Jiang et al. (2014^{TS}) reportent des concentrations de BMAA totale de 0,66 mg/kg FW dans des huîtres en provenance de France (Atlantique).

Etats Unis

Christensen et al. (2012^{TS}) reportent des concentrations en BMAA totale entre 1,5 et 8 mg/kg FW dans les huîtres de Louisiane, et entre 1,2 et 1,7 mg/kg FW dans les huîtres du Mississippi. D'après ces auteurs, les muscles de crabe bleu (Floride) présentent des concentrations en BMAA totale entre 1,08 et 3,02 mg/kg FW.

Suède

Selon Salomsson et al. (2013^{TS}), les concentrations en BMAA totale chez des moules prélevées en Suède sur la côte Atlantique oscillent entre 0,27 et 1,6 mg/kg FW. Ces mêmes auteurs n'ont pas détecté de BMAA chez des moules prélevées en Mer Baltique.

Jiang et al. (2012^{TS}) reportent une accumulation de BMAA libres chez des moules et huîtres prélevés en Suède, côte Ouest Atlantique, mais sans donner de quantification. En 2014, les mêmes auteurs indiquent que de la BMAA totale est retrouvée à des concentrations allant de 0,08 à 0,9 mg/kg FW dans les moules et les huîtres, et de 0,11 à 0,46 mg/kg FW dans des crevettes en provenance de Suède. Aucune BMAA n'est détectée chez les écrevisses.

Origines diverses

Salomonsson et al. (2015^{TS}) ont déterminé la concentration en BMAA libre et totale dans des fruits de mer du commerce en Suède, sous divers conditionnements (frais, cuisinés et en conserve) et de diverses provenances géographiques (de 4 continents). Aucune BMAA, libre ou totale, n'a été détectée dans les crevettes et les écrevisses. Par contre, d'autres fruits de mer (moules, noix de St Jacques et crabes) importés et vendus en Suède contiennent des teneurs non négligeables en BMAA totale (entre 0,28 et 7,08 mg/kg FW). L'origine des produits contaminés est variée : Amérique de Sud et Australie pour les moules, Amérique du Nord pour les noix de St Jacques, et Europe pour le crabe. La plus forte concentration de BMAA totale (7,08 mg/kg FW) est retrouvée chez des moules importées en conserve (déjà cuites) d'Amérique du Sud qui contiennent des concentrations en BMAA totale jusqu'à 10 fois supérieures aux moules achetées fraîches en provenance de Scandinavie puis cuites ou congelées. Remarque : dans cette étude, la BMAA libre représente une part négligeable (environ 6,5%) de la BMAA totale mesurée chez les fruits de mer.

Jiang et al. (2014^{TS}), ont déterminé des concentrations en BMAA totale de 0,32 mg/kg FW dans des huîtres en provenance de Grèce, et de 0,11 à 0,46 mg/kg FW dans des crevettes en provenance d'Atlantique Nord (sans autre précision).

Poissons

Origines diverses

Aucune BMAA totale n'est retrouvée dans les muscles ainsi que dans différents tissus (cerveau, foie, et reins) de poissons importés ou en provenance de Suède (Salomonsson et al., 2015^{TS}). Jiang et al. (2014^{TS}) ne reportent également aucune BMAA totale dans la chair de saumon, morue, et perche du commerce. Cependant, la BMAA est détectée chez la plie (dans 3 échantillons/3) prélevée en Suède et du hareng (dans 1 échantillon/3) de la mer Baltique, mais à des concentrations beaucoup plus faibles et proches de la limite de détection/quantification (de ND à 0,02 mg/kg FW) que celles retrouvées dans des moules (jusqu'à 0,9 mg/kg FW) étudiées conjointement. Remarque : les auteurs mettent en relation le mode de vie benthique et la longévité (jusqu'à 50 ans) de la plie avec une contamination chronique potentielle via des diatomées productrices de BMAA.

Mondo et al. (2014^{TS}) reportent la présence de BMAA dans 15 des 16 compléments alimentaires de cartilage de requin analysés, et composés de diverses espèces et de provenances variées (non mentionnées). Les concentrations en BMAA sont comprises entre 75 et 352 mg/kg poids sec (moyenne de 169 mg/kg DW). Les 16 échantillons analysés contiennent du DAB (de 69 à 1483 mg/kg DW, moy 318 mg/kg DW) et de l'AEG (de 1300 à 1730 mg/kg DW, moy 1627 mg/kg DW).

7.4.3 Conclusion

Les 5 études considérant les moules marines et/ou les huîtres reportent toutes une détection positive de BMAA avec des concentrations en BMAA totale allant de 0,08 à 8 mg/kg FW. Seules les études menées par Reveillon et al (2014^{TS} et 2015^{TS}, 2016b^{TS}) reportent une accumulation de DAB et d'AEG dans les tissus des moules et huîtres marines ainsi que la production de ces composés par les diatomées. Les concentrations en DAB total sont du même ordre de grandeur que celles en BMAA chez les bivalves (de 0,6 à 2,4 mg/kg FW).

Les crustacés pris en compte dans seulement 2 études présentent des concentrations en BMAA inférieures ou supérieures aux limites de détection selon les taxons. Cependant, les concentrations reportées chez les crustacés sont légèrement plus faibles que chez les bivalves : de 1,08 à 3,8 mg/kg FW chez le crabe, de 0,11 à 0,46 mg/kg FW chez les crevettes et négligeables chez les écrevisses.

Les muscles de poissons sont les matrices présentant les plus faibles concentrations en BMAA, avec un maximum de 0,02 mg/kg FW chez deux espèces contenant de la BMAA parmi 12 analysées dans 2 études. Cependant, le très faible nombre d'étude les ayant considérés rend difficile toute analyse.

Toutes les études ayant considéré à la fois les fractions libres et totales (libre + liée aux protéines) de BMAA montrent que la fraction totale est plus importante que la fraction libre dans les matrices biologiques (e.g., max 2,45 mg/kg FW BMAA totale vs max 0,2 mg/kg FW BMAA libre chez les moules d'après Reveillon et al, 2014^{TS}, 2015^{TS}).

La bioamplification potentielle de BMAA, suggérée par certains auteurs du fait qu'une accumulation soit retrouvée à des niveaux trophiques intermédiaires (e.g., crabe) et supérieurs (e.g., requin), nécessite d'être étudiée de manière plus approfondie.

Les concentrations en BMAA totale dans les fruits de mer et dans les muscles de poissons varient donc entre 0,02 et 8 mg/kg FW selon les espèces étudiées.

Commentaires :

- Les variants DAB, AEG et BAMA sont rarement pris en compte dans les études. Lorsque la concentration en DAB est reportée, elle est généralement similaire à celle de la BMAA.
- La liaison de la BMAA aux protéines ou son incorporation n'a pas été clairement démontrée à ce jour. Rosen et al. (2016^{TS}) suggèrent que la BMAA ne soit ni libre ni liée aux protéines dans

les tissus mais liée à des acides aminés et formant un composé de faible poids moléculaire. Ces auteurs reportent aussi la possibilité d'une chélation avec des métaux ou la formation de carbamates. Li et al. (2016^{TS}) reportent que la quantité d'acides aminés (Arg, Asp, Glu, Leu, Lys, Ser, Thr, Ile et Met) mesurée dans les muscles d'un gastéropode marin diminue avec l'augmentation de l'accumulation de BMAA libre dans ces mêmes tissus, et suggèrent que la BMAA ne s'incorpore pas dans les protéines (ils n'ont détecté que de la BMAA libre) mais affecte leur synthèse.

- Données d'organotropisme : Andrys et al. (2015^{MS}), article non sélectionné, reporte une accumulation de BMAA à la fois dans les viscères et dans les autres tissus chez *Mytilus edulis*. Selon Reveillon et al. (2015^{TS}), les moules présentent des concentrations en BMAA libre et totale inférieures dans la glande digestive comparé au reste du corps (respectivement $69,3 \pm 17\%$ et $59,5 \pm 6\%$). L'inverse est observé pour les concentrations d'AEG libre et totale. Concernant le DAB, les formes liées et libres prédominent respectivement dans la glande digestive et dans le reste du corps.
- Les données d'accumulation de BMAA chez des espèces dulcicoles demeurent très parcellaires.

7.4.4 Synthèse des grilles de lecture des articles classés orange, informations additionnelles

Le tableau 6 présente les données issues des articles pour lesquels la méthode analytique est jugée fiable du point de vue qualitatif mais pas du point de vue quantitatif (articles classés orange, n = 11).

Tableau 6 : Synthèse des articles classés orange (MS) relatifs aux concentrations de BMAA chez des organismes aquatiques consommés par l'Homme

Référence	Isomères et fraction	Espèces, nombre échantillons total	Origine	Concentrations mg/kg poids frais FW ou estimées du poids sec DW
Andrys et al., 2015	Totale	Moule <i>Mytilus edulis</i>	non précisée	Présence de BMAA démontrée mais non quantifiée
Banack et al., 2014	BMAA Libre / liée DAB	Chair de langouste (<i>Panulirus sp</i>)	Floride	BMAA : 0,86-5,83 mg/kg FW et DAB : 0,09-7,99 mg/kg FW
Banack et al., 2015	BMAA totale	Carpe (<i>Cyprinus carpio</i>), n=?, organes muscles, foie, cerveau	New Hampshire	BMAA : 0,0086-0,26 mg/kg FW
Beach et al., 2015	BMAA, BAMA, DAB, fractions totale	Moules (<i>Mytilus edulis</i>), n=9, collection pour analyses phycotoxines	Canada	Présence de BAMA, DAB, AEG, BMAA sans quantification quantification de BMAA : 0,19-0,24 mg/kg FW
Field et al., 2013	Libre / liée ou totale	Pinces de crabes bleus (<i>Callinectes sapidus</i>), n = 3	Atlantique Est	BMAA de 9,85 à 24,8 mg/kg FW et DAB de 11,57 à 15,66 mg/kg FW
Hammerschlag et al., 2016	BMAA Totale	Requins (ailerons ou muscles), 10 espèces, n=55 dont 7 < LD	Atlantique et Pacifique	Tous les échantillons évalués en LC-FD : BMAA de 34 à 2011 mg/kg FW 4 échantillons évalués en LC-FD et en LC-MS-MS : BMAA de 31,5 à 38,9 mg/kg FW en LC-FD et de 19,20 à 33,15 mg/kg FW en LC-MS-MS
Jonasson et al., 2010	BMAA totale	Poissons (éperlan <i>Osmerus eperlanus</i> , turbot <i>Scophthalmus maximus</i> , hareng <i>Clupea harengus</i> , sandre <i>Sander lucioperca</i> , saumon <i>Salmo salar</i>) moules (<i>Mytilus edulis</i>) et huîtres (<i>Ostrea edulis</i>)	Mer Baltique	Moules BMAA de 0,02 à 0,03 mg/kg FW Huîtres BMAA de ND à 0,02 mg/kg FW Muscles d'éperlan, turbot, hareng, corégone : BMAA de 0,002 à 0,014 mg/kg FW

Référence	Isomères et fraction	Espèces, nombre échantillons total	Origine	Concentrations mg/kg poids frais FW ou estimées du poids sec DW
Lage et al., 2014	BMAA, DAB et AEG liés	Coque blanche (<i>Cerastoderma edule</i>), n = 19	Atlantique, Portugal	BMAA de ND à 0,10 mg/kg FW
Lage et al., 2015	BMAA totale	Poissons (brème <i>Abramis brama</i> n=32, perche <i>Perca fluviatilis</i> n=29, brochet <i>Esox lucius</i> n=22, sandre <i>Sander lucioperca</i> n=29, gardon <i>Rutilus rutilus</i> n=48, grémille <i>Gymnocephalus cernua</i> n=4, tanche <i>Tinca tinca</i> n=1), organes cerveau, muscle, foie, rein.	Suède, eau douce	BMAA dans le cerveau chez 14 à 50% des individus selon les espèces, de 0,0001 à 0,007 mg/kg FW BMAA dans les muscles de 16% des poissons (22/136) de 0,00002 à 0,0016 mg/kg FW Pas de BMAA dans le foie ni dans les reins
Li et al., 2016	BMAA, DAB et AEG fraction libre et totale	Mollusques, 29 espèces, n = 68 (<i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Mytilus coruscus</i> , <i>Crassostrea</i> sp, <i>Atrina pectinata</i> , <i>Perna viridis</i> , <i>Antigona lamellaris</i> , <i>Meretrix lusoria</i> , <i>Periglypta petechialis</i> , <i>Chlamys farreri</i> , <i>Solen strictus</i> , <i>Macra chinensis</i> , <i>Ruditapes philippinarum</i> , <i>Neverita didyma</i> , <i>Sinonovacula constricta</i> , <i>Tegillarca granosa</i> , <i>Haliotis discus hannai</i> , <i>Turritella bacillum</i> , <i>Natica maculosa</i> , <i>Batillaria zonalis</i> , <i>Moerella iridescens</i> , <i>Scapharca subcrenata</i> , <i>Macra chinensis</i> , <i>Volutharpa ampullacea</i> , <i>Neptunea cumingii</i> , <i>Arca inflata</i> , <i>Merceneria merceneria</i> , <i>Rapana venosa</i> , <i>Argopecten irradians</i> , <i>Mimachlamys nobilis</i> , <i>Gafrarium tumidum</i>).	Chine, prélèvement en aquacultures et sur marchés, + prélèvement de 2 gastéropodes en milieu naturel	BMAA libre (5 échant/68) chez 3 espèces marines: moule (1/9) <i>M. coruscus</i> 0,45 mg/kg FW, couteau (1/1) <i>S. strictus</i> 0,66 mg/kg FW, et gastéropode (5/5) <i>N. didyma</i> 0,99 ; 2,15 et 3,97 mg/kg FW. DAB libre (53 échant/68) chez 23 espèces marines : de 0,05 à 2,65 mg/kg FW. Ex : 0,23 ; 0,31 ; 0,45 ; 0,53 ; 0,61 ; 0,70 et 0,83 mg/kg FW chez huîtres <i>Crassostrea</i> sp, et 0,29 ; 0,41 ; 0,50 ; 0,58 ; 0,60 ; 0,63 ; 0,71 ; 0,74 ; 1,61 mg/kg FW chez moules <i>M. galloprovincialis</i> et <i>M. coruscus</i> . Pas de BMAA ou de DAB liées aux protéines. Pas d'AEG libre ni lié.
Mondo et al., 2012	BMAA totale	Requins (ailerons), 7 espèces, n=29	Baie de Floride	BMAA dans 23 échantillons/29, chez les 7 espèces de requins, de 144 à 1836 mg/kg FW Chez requin marteau BMAA dans reins, foie et muscles, de 58 à 1450 mg/kg FW
Spacil et al., 2010	BMAA totale	Poisson Corégone <i>Coregonus lavaretus</i> , Huîtres <i>Ostrea edulis</i> provenant d'un marché	Suède	Accumulation de BMAA et de DAB chez les huîtres (respectivement 47,9 et 201,7 µg/L) et les poissons (respectivement 49,4 et ND µg/L). Les résultats ne sont pas exploitables car non exprimés en mg/g

7.4.4.1 Contamination des organismes issus des écosystèmes aquatiques dulcicoles

Poissons

Une étude menée sur des carpes du lac Mascoma aux Etats-Unis montre la présence de BMAA et de DAB dans le cerveau à des concentrations respectives de 0,009 et 0,002 mg/kg FW. La BMAA totale est également retrouvée dans le foie (0,26 mg/kg FW) et les muscles (0,25 mg/kg FW), organes qui ne présentent aucune accumulation de DAB (Banack et al., 2015^{MS}). Ces valeurs ne sont pas comparables car aucun article classé vert ne reporte une accumulation chez des poissons d'eau douce mais elles sont très similaires à celles reportées chez les poissons marins (max 0,02 mg/kg FW) dans les deux études retenues.

En Suède, une étude menée sur des poissons du lac Finjasjön reporte une accumulation de BMAA dans le cerveau chez 14 à 50% des individus selon les espèces, à des concentrations allant de

0,0001 à 0,007 mg/kg FW (Lage et al., 2015^{MS}). L'accumulation de BMAA est également montrée dans les muscles de 16% des poissons (brème, perche, brochet, sandre, gardon, grémille, tanche, 22/136) avec des concentrations allant de 0,00002 à 0,0016 mg/kg FW. L'étude montre que l'accumulation de BMAA est plus importante chez les poissons plus âgés et chez les poissons ayant un mode de nutrition benthique *versus* pélagique, suggérant les producteurs primaires benthiques comme source de BMAA.

7.4.4.2 Contamination des organismes issus des écosystèmes aquatiques marins

Bivalves et crustacés

Canada et USA

Des concentrations de BMAA totale allant jusqu'à 24,8 mg/kg FW et 5,8 mg/kg FW ont été reportées respectivement dans la chair de crabes bleus provenant de Chesapeake Bay (Field et al., 2013^{MS}) et dans la chair de homards provenant de la baie de Floride (Banack et al., 2014^{MS}). Les concentrations reportées chez ces crustacés sont supérieures à celles reportées dans les articles classés vert (de 1,08 à 3,8 mg/kg FW chez le crabe). Du DAB a également été quantifié dans les pinces de crabes bleus (de 11,6 à 15,8 mg/kg FW) et dans la chair de homards (de 0,09 à 7,99 mg/kg FW).

Au Canada, la présence de DAB, AEG et BAMA est reportée dans les tissus de moules issues du commerce (Beach et al., 2015^{MS}). Seule la BMAA totale est quantifiée avec des teneurs comprises entre 0,1 et 0,24 mg/kg FW, valeurs similaires à celles issues des articles classés vert (de 0,08 à 8 mg/kg FW chez les bivalves).

Portugal

Sur les côtes portugaises, Lage et al. (2014^{MS}) reportent des concentrations en BMAA allant jusqu'à 0,10 mg/kg FW dans des coques prélevés dans deux sites sur une période de 3 mois (n=19), valeurs inférieures à celles reportées pour les bivalves issues des articles classés vert (de 0,08 à 8 mg/kg FW). Les coques accumulent également du DAB et de l'AEG (pas de quantification).

Mer Baltique

Les données de bioaccumulation chez des moules (de 0,02 et 0,03 mg/kg FW) et des huîtres (de ND et 0,02 mg/kg FW) de la mer Baltique reportées dans l'étude de Jonasson et al. (2010^{MS}) sont largement inférieures à celle présentées dans les autres études. Ce fait est très probablement dû à une efficacité d'extraction de BMAA des tissus assez faible (non reportée), ce qui pour ce rapport aura tendance à sous-estimer le risque plutôt que de le surestimer. Andrys et al. (2015^{MS}) montrent une accumulation de BMAA à la fois dans les viscères et dans les autres tissus chez *Mytilus edulis* mais sans quantification. Spacil et al. (2010^{MS}) reportent la présence de BMAA dans des huîtres achetées sur un marché en Suède mais les résultats ne sont pas exploitables car non exprimés en mg/kg.

Chine

Li et al. (2016^{MS}) ont analysé des mollusques issus d'aquaculture et achetés sur les marchés de plusieurs villes chinoises (68 échantillons, 29 espèces). Ils reportent la présence de BMAA libre dans 5 échantillons sur 68, appartenant à 3 espèces marines, une moule (1 échantillon positif/9), un couteau (1/1) et un gastéropode (3/3) (respectivement *Mytilus coruscus* 0,45 mg/kg FW, *Solen strictus* 0,66 mg/kg FW, *Neverita didyma* 0,99 ; 2,15 et 3,97 mg/kg FW). Huit autres échantillons de moules (*Mytilus galloprovincialis*) et 10 d'huîtres (*Crassostrea sp*) collectés sur les côtes chinoises ne contiennent pas de BMAA. Le DAB libre est détecté dans 53 échantillons sur 68, appartenant à 23 espèces marines, à des concentrations allant de 0,05 à 2,65 mg/kg FW (par exemple 0,23 ; 0,31 ; 0,45 ; 0,53 ; 0,61 ; 0,70 et 0,83 mg/kg poids frais chez les huîtres *Crassostrea*, et 0,29 ; 0,41 ; 0,50 ; 0,58 ; 0,60 ; 0,63 ; 0,71 ; 0,74 ; 1,61 mg/kg poids frais chez les moules *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus coruscus*). Les concentrations de DAB sont proches entre les espèces et les régions prospectées. Les auteurs reportent une absence de BMAA ou de DAB liées aux protéines, ainsi qu'une absence d'AEG quelle que soit la forme (libre ou totale).

Poissons

Hammerschlag et al. (2016^{MS}) rapportent de fortes concentrations (de 19,2 à 33,15 mg/kg FW) chez le requin (seule la quantification par UPLC-MS/MS est ici considérée, la plupart des autres espèces ayant été seulement dosées par HPLC-FD).

Mondo et al. (2012^{MS}) rapportent une accumulation de BMAA, de 144 à 1836 mg/kg FW, dans les ailerons de 7 espèces de requins (23 échantillons/29). Chez le requin marteau, la BMAA est retrouvée dans les reins, le foie et les muscles, de 58 à 1450 mg/kg FW. Ces valeurs dans les ailerons de requins sont cohérentes et de même grandeur que les valeurs reportées en poids sec dans la poudre de cartilage de requins (de 86 à 265 mg/kg DW) par le même auteur, Mondo et al. (2014^{TS}), article classé vert.

Jonasson et al., (2010^{MS}) relatent que plusieurs espèces de poissons de la Mer Baltique (éperlan, turbot, hareng, corégone) semblent contenir de la BMAA à des concentrations faibles allant de 0,002 à 0,014 mg/kg FW dans les muscles et de ND à 0,25 mg/kg FW dans le cerveau. La bioaccumulation dans cet écosystème ne suivrait pas un schéma de bioamplification avec des concentrations plus importantes chez les grands prédateurs, comme évoqué chez Brand et al. (2010^{NS}).

Spacil et al. (2010^{MS}) reportent la présence de BMAA dans des poissons (corégone) achetés sur un marché en Suède mais les résultats ne sont pas exploitables car non exprimés en mg/kg.

Remarque : informations additionnelles, issues d'articles non retenus classés rouge

Les données issues des articles classés rouge ont été obtenues avec une méthode analytique jugée non fiable du point de vue qualitatif et quantitatif.

En 2009, dans l'étang de Thau (France), de la BMAA, du DAB et de l'AEG sous forme liée ont été détectés dans tous les échantillons de moules (*Mytilus galloprovincialis*) et d'huîtres (*Crassostrea gigas*) à des concentrations de 0,6 à 14,4 mg/kg DW par deux auteurs utilisant (Masseret et al., 2013^{NS}, classée rouge) ou non (Reveillon et al., 2014^{TS}, classée verte) une méthode de dérivation avant l'analyse des composés en LC-MS/MS. La concentration de BMAA chez les moules montre des variations saisonnières avec une augmentation des teneurs en été et automne 2013 et 2014, phénomène déjà observé sur le même site lors de l'été 2009 (Masseret et al., 2013^{NS} ; Reveillon et al., 2014^{TS}). Les données de Masseret et al. (2013^{NS}) sont présentées ici malgré son classement en rouge car les résultats (concentrations et cinétique temporelle de BMAA chez les bivalves) sont très similaires à ceux de Reveillon et al. (2014^{TS}) et concernent le même site (étang de Thau) présentant un cluster significatif de sur-incidence de SLA. Au sein de l'étang de Thau, les moules et les huîtres contiennent des concentrations en BMAA de respectivement 1,8-6 et 0,6-1,6 mg/kg DW d'après Masseret et al (2013^{NS}). Les moules collectées entre 1995 et 2008 contiennent de plus fortes concentrations en BMAA ($3,3 \pm 1,4$ mg/kg DW) que les huîtres ($0,3 \pm 0,19$ mg/kg DW) collectées en 2009, alors que les teneurs en DAB ne varient pas entre les deux bivalves (moules $1,1 \pm 0,3$ mg/kg DW vs huîtres $1,3 \pm 0,2$ mg/kg DW). La plus forte accumulation de BMAA reportée concerne des échantillons prélevés en période estivale de forte prolifération phytoplanctonique : moules $4,4 \pm 1,5$ mg/kg DW en été vs $2,5 \pm 0,5$ mg/kg DW en automne/hiver, et huîtres $1,5 \pm 0,1$ mg/kg DW en été vs $0,6$ mg/kg DW au printemps. Aucune variation saisonnière des concentrations en DAB n'est observée chez les deux bivalves.

L'étude de Jiao et al. (2014^{NS}) rapporte des concentrations allant jusqu'à 8,97 mg/kg FW dans des muscles de poissons d'eau douce (espèce carnivore, *Erythroculter ilishaeformis*, cyprinidé, hypothèse 75% eau dans les muscles). Ces valeurs ne sont pas comparables car aucun article classé vert ne reporte une accumulation chez des poissons d'eau douce mais elles sont plus fortes que celles reportées chez les poissons marins (max 0,02 mg/kg FW) dans les deux études retenues.

Au Canada, des poissons (doré jaune et noir, corégone) ont été prélevés dans le lac Winnipeg et mixés de manière à former deux échantillons dans lesquels aucune BMAA n'a été détectée. Les

auteurs (Scott et al., 2009^{NS}) ne donnent pas de précision sur les organes étudiés, la période ou le site de prélèvement.

Brand et al. (2010^{NS}), dans une étude menée en baie de Floride aux Etats-Unis, montreraient la présence de fortes concentrations de BMAA dans les muscles de poissons marins (ex : daurade de 484 à 2349 mg/kg FW). La bioaccumulation dans cet écosystème ne suivrait pas un schéma de bioamplification avec des concentrations plus importantes chez les grands prédateurs, mais plutôt une tendance à une accumulation plus forte de BMAA chez les espèces benthiques (crevettes et crabes) que les espèces pélagiques (anchois, barracuda), suggérant l'implication du phytoplancton benthique (diatomées, cyanobactéries) comme source de BMAA. La même étude montrerait la présence de BMAA chez des crevettes roses (de 55 à 3042 mg/kg FW), et des crabes bleus (212 à 6976 mg/kg FW), à des concentrations largement supérieures à celles reportées dans les articles classés vert. Les mêmes auteurs ont également étudié la rivière Caloosahatchee aux Etats-Unis (Floride) recevant les effluents du lac Okeechobee où prolifèrent régulièrement et intensément des cyanobactéries. Les résultats montrent la présence de BMAA en concentration importante chez les mollusques filtreurs (huîtres et moules de 251 à 305 mg/kg FW) mais surtout dans les muscles de poissons (amie, garpique alligator ou archigan à grande bouche de 857 à 2559 mg/kg FW).

Niedzwiadek et al. (2012^{NS}) n'ont pas retrouvé de BMAA libre ou totale dans 61 échantillons de crevettes d'élevage et 32 échantillons de chair de poissons d'élevage (tilapia, poisson chat, truite, saumon, omble chevalier) vendus au Canada et d'origines diverses (Thaïlande, Chine, Vietnam, Indonésie, Afrique du Sud, Honduras, Costa Rica, EU, Canada).

8 Estimation de l'exposition alimentaire pour l'Homme

8.1 Matériel et Méthodes

8.1.1 Données de consommation alimentaire

8.1.1.1 Population générale

Les données de consommation utilisées proviennent d'une étude individuelle et nationale sur les consommations alimentaires INCA2 (Anses, 2009).

Cette étude s'est déroulée en trois vagues entre fin 2005 et avril 2007 afin de tenir compte des variations saisonnières. Deux populations distinctes ont été incluses dans l'étude : les enfants de 3 à 17 ans et les adultes de 18 à 79 ans. Le recueil des consommations alimentaires a été réalisé avec un carnet de consommation de 7 jours consécutifs. Cette méthodologie était nécessaire pour réaliser des évaluations de risque, chronique sur longue période et aiguë sur courte période. Chaque journée était décomposée en 3 repas et 3 prises inter-repas.

Pour chaque prise ou repas, le participant devait décrire le détail de tous les aliments et boissons consommés, estimer la quantité consommée à l'aide d'un manuel de photographies de portions, ou de mesures ménagères ou encore de grammages ou volumes unitaires, et indiquer les informations sur le type de produit (industriel/fait maison, frais/boîtes de conserve/surgelé, enrichi/allégé/ou non).

Les informations recueillies sur les carnets de consommation alimentaire et de compléments ont été vérifiées et harmonisées par des diététiciennes. La codification des aliments a reposé sur la nomenclature INCA2 en 43 groupes créée spécifiquement pour l'étude et enrichie par rapport à la version précédente utilisée dans l'étude INCA1. Cette nomenclature est compatible avec celle de la composition nutritionnelle des aliments du Centre d'information sur la qualité des aliments (CIQUAL) de l'Afssa.

8.1.1.2 Forts consommateurs de produits de la mer

Les calculs d'exposition ont été effectués pour la population des forts consommateurs des produits de la mer en prenant en compte les données de consommation issues de l'étude CALIPSO (2006).

L'étude CALIPSO (2006) a été réalisée auprès de 1011 individus de plus de 18 ans forts consommateurs de produits de la mer (au moins 2 fois par semaine) et résidant dans l'un des 4 sites côtiers et ses environs (sur un rayon de 20-25 km) sélectionnés pour l'enquête : Le Havre, Toulon-Hyères, La Rochelle et Lorient. Cette étude est basée sur un questionnaire de fréquence de consommation validé lors de l'enquête pilote par un carnet de consommation de 7 jours. Les tailles de portion habituellement consommées ont été estimées par un cahier photographique (Manuel photos de l'Etude SU.VI.MAX). Les consommations sont décrites uniquement pour 996 individus (exclusion de 15 sujets pour données aberrantes concernant les consommations).

8.1.2 Données de contamination

Les 226 données de contamination proviennent de différentes publications, toutes jugées fiables du point de vue qualitatif et quantitatif (Jiang et al., 2014^{TS}, Reveillon et al., 2014^{TS}, 2015^{TS}, 2016^{TS}, Salomonsson et al., 2013^{TS}, 2015^{TS}) et de différents pays (Tableau 7).

Tableau 7. Données de contamination selon le pays d'origine

Pays	Fréquence
Amérique nord	3
Amérique Sud	12
Atlantique	4
Atlantique Nord-Est	3
Atlantique Nord	2
Australie	3
Chine	2
Europe Scandinavie	3
France	139
Grèce	3
Irlande	1
Italie	2
Mer Baltique	3
Norvège	10
Scandinavie	6
Suède	27
Turquie	3

Les données de contamination concernent plusieurs espèces de produits de la mer ou d'eau douce (Tableau 8).

Concernant ces produits, comme ils étaient en nombre réduit par rapport aux données de consommation, ils ont été regroupés en plusieurs catégories :

- Produits de la mer incluant les deux catégories suivantes
 - o Poissons de mer
 - o Crustacés et mollusques (dont moules et huîtres)
- Produits d'eau douce

Les contaminants pour lesquels les données sont disponibles et qui sont concernés par cette analyse sont : BMAA totale, BMAA libre, DBA total, DBA libre, AEG total, AEG libre.

Tableau 8 : Liste des espèces de produits de la mer ou d'eau douce et les catégories d'aliment auxquelles ils correspondent

Produit	Nombre de résultats	Nombre de résultats inférieurs à la limite de détection*	Catégorie d'aliment
Brème	2	2 ^a	Produits d'eau douce
Corégone	2	2 ^a	Produits d'eau douce
Crabe	2	1 ^a	Crustacés, mollusques et coquillages
Crevette	9	3 ^a	Crustacés, mollusques et coquillages
Ecrevisse	7	7 ^{a, b}	Produits d'eau douce
Hareng	3	2 ^a	Poissons de mer
Huître	35	0	Crustacés, mollusques et coquillages
Loup de mer	2	2 ^a	Poissons de mer
Morue	4	4 ^a	Poissons de mer
Moule	138	0	Crustacés, mollusques et coquillages
Ombre chevalier	4	3 ^a	Produits d'eau douce
Perche	4	4 ^a	Produits d'eau douce
Pétoncle	3	0	Crustacés, mollusques et coquillages
Plie	3	0	Poissons de mer
Sandre	2	2 ^a	Produits d'eau douce
Saumon	6	6 ^{a, b}	Poissons de mer
TOTAL	226		

* la valeur de la limite de détection est variable selon les études²

^a limite de détection = 0,10 mg/kg de poids frais ; ^b limite de détection = 0,01 mg/kg de poids frais.

8.1.3 Traitement des données censurées

Généralement, les données censurées² sont traitées en suivant les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (WHO, 2013). La « méthode de substitution » est utilisée. Elle consiste à encadrer la teneur réelle en utilisant les valeurs les plus basses (hypothèse basse ou lower-bound, LB) et les plus hautes (hypothèse haute ou upper-bound, UB) possibles : l'hypothèse basse est alors calculée en considérant que toutes les valeurs en-dessous de la LD sont égales à 0 et celles situées entre la LD et la LQ sont égales à la LD, tandis que l'hypothèse haute est calculée en considérant que toutes les valeurs en-dessous de la LD sont égales à la LD et celles situées entre la LD et la LQ sont égales à la LQ.

Dans la présente expertise, étaient disponibles dans les publications soit les LD soit les LQ mais jamais les deux en même temps. Par conséquent, les règles suivantes ont été appliquées :

- l'hypothèse basse (LB) est calculée en considérant que toutes les valeurs en-dessous de la LD sont égales à 0 et celles en-dessous de la LQ sont égales à 0
- l'hypothèse haute (UB) est calculée en considérant que toutes les valeurs en-dessous de la LD sont égales à la LD et celles en-dessous de la LQ sont égales à la LQ.

² On appelle données censurées les résultats inférieurs aux limites de détection (LD) ou de quantification (LQ).

8.1.4 Hypothèses de calculs de l'exposition

A partir des données de consommation individuelle et des données de contamination, l'exposition a été calculée selon l'équation suivante :

$$E_i = \sum_{k=1}^n \frac{C_{i,k} \times L_k}{PC_i}$$

Où :

- E_i est l'exposition journalière totale de l'individu i ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel/j),
- $C_{i,k}$ est la consommation moyenne journalière de l'aliment k par l'individu i (g/j),
- L_k est la teneur pour le contaminant étudié estimée dans l'aliment k (mg/kg de poids frais),
- PC_i est le poids corporel de l'individu i (kg)
- et n est le nombre total d'aliments consommés par l'individu i .

Dans un premier temps, la contamination (moyenne, 95^{ème} percentile, maximum) a été calculée pour chaque catégorie et a été appliquée à la consommation individuelle de l'ensemble des produits de la catégorie correspondante.

Exemple :

La contamination moyenne a été calculée pour le groupe (Hareng+Morue+Plie+Saumon+Loup de mer) qui correspond à la catégorie poissons de la mer.

Cette contamination a ensuite été appliquée à la consommation de l'ensemble des poissons de mer, même si les données de consommation comportaient plus d'espèces ou même si l'une de ces espèces (parmi les 5 sus-citées) n'était pas présente dans les données de consommation.

Ainsi, nous avons fait l'hypothèse que l'ensemble des produits de la catégorie poissons de mer consommés étaient contaminés au même niveau de contamination.

Par ailleurs, deux types d'exposition ont été calculés :

- D'une part, **l'exposition chronique** : en prenant comme paramètre de contamination la concentration moyenne. L'exposition chronique correspond à la quantité de substance qu'un individu peut ingérer quotidiennement sur une longue période de sa vie, en relation avec un effet toxicologique se manifestant tardivement.
- D'autre part, **l'exposition aiguë** : en prenant comme paramètre de contamination le 95^{ème} percentile lorsque le nombre de données de la catégorie est supérieur à 30 ; ou la concentration maximale lorsque le nombre de données de la catégorie est inférieur à 30. L'exposition aiguë correspond à un effet toxicologique se manifestant rapidement, dès la première ingestion.

Ces deux types d'exposition ont été calculés d'une part, avec l'ensemble des données disponibles et d'autre part, avec les données françaises uniquement, au nombre de 138 (en excluant Jiang et al., 2014). A noter que les données françaises ne portent que sur les moules et les huîtres.

8.2 Résultats

Les résultats des expositions sont présentés dans les tableaux 9 à 15. Tous les tableaux ont la même structure, avec des résultats selon les deux hypothèses LB (hypothèse basse) et UB (hypothèse haute). Les tableaux 10, 11 et 12 présentent les expositions aiguës et les tableaux 13, 14, 15 présentent les expositions chroniques.

n : nombre total d'individus adultes dans la population générale et suivis pendant l'enquête (cette population inclut les consommateurs et les non consommateurs des produits de la 1^{ère} colonne).

n_cons : nombre d'individus adultes consommateurs du produit de la 1^{ère} colonne (seuls consommateurs).

Moy_pop : exposition moyenne dans la population générale (qu'ils soient consommateurs ou non).

P95_pop : exposition au 95^{ème} percentile calculée dans la population générale.

Moy_cons : exposition moyenne dans la population des seuls consommateurs.

P95_cons : exposition au 95^{ème} percentile calculée dans la population des seuls consommateurs.

BMAA totale LB : exposition au composé calculée selon l'hypothèse basse (exemple pour la BMAA totale)

BMAA totale UB : exposition au composé calculée selon l'hypothèse haute (exemple pour la BMAA totale)

Tableau 9 : Exposition aiguë à la BMAA totale en µg/kg pc/j chez les adultes, population générale

			BMAA totale LB				BMAA totale UB			
	n	n_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	2597	751	0,202	1,144	0,698	1,908	0,202	1,144	0,698	1,908
dont										
<i>Huîtres</i>	2597	123	0,022	0	0,456	1,153	0,022	0	0,456	1,153
<i>Moules</i>	2597	173	0,043	0,346	0,649	1,54	0,043	0,346	0,649	1,54
Poissons de mer	2597	1609	0,005	0,017	0,008	0,02	0,024	0,086	0,038	0,102
Produits de la mer	2597	1817	0,207	1,15	0,295	1,352	0,226	1,173	0,323	1,36
Produits eau douce	2597	17	0	0	0	0	0	0	0,02	0,071
Données Françaises uniquement										
<i>Huîtres</i>	2597	123	0,022	0	0,456	1,153	0,022	0	0,456	1,153
<i>Moules</i>	2597	173	0,017	0,133	0,249	0,59	0,017	0,133	0,249	0,59

Grille de lecture (exemples surlignés) : Dans la population générale adulte (soit 2597 individus), l'exposition moyenne (*moy_pop*) à la BMAA totale, calculée selon l'hypothèse basse (LB) et liée à la consommation de produits de la mer est de 0,207 µg/kg pc/j et le 95^{ème} percentile (*P95_pop*) de 1,15 µg/kg pc/j. Chez les adultes seuls consommateurs de produits de la mer (1817 individus), la moyenne (*moy_cons*) est de 0,295 µg/kg pc/j et le 95^{ème} percentile (*P95_cons*) de 1,352 µg/kg pc/j.

Lorsque seules les données françaises sont utilisées, l'exposition moyenne à la BMAA totale liée à la consommation de moules est de 0,017 et le 95^{ème} percentile de 0,133 µg/kg pc/j. Chez les seuls consommateurs de moules (173 individus), la moyenne est de 0,249 et le 95^{ème} percentile de 0,59 µg/kg pc/j.

Tableau 10 : Exposition aiguë à la BMAA, au DAB et à l'AEG en µg/kg pc/j chez les adultes, population générale

	n	n_cons	BMAA totale LB				BMAA totale UB				BMAA libre LB				BMAA libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	2597	751	0,202	1,144	0,698	1,908	0,202	1,144	0,698	1,908	0,019	0,106	0,065	0,177	0,019	0,106	0,065	0,177
dont																		
<i>Huitres</i>	2597	123	0,022	0	0,456	1,153	0,022	0	0,456	1,153								
<i>Moules</i>	2597	173	0,043	0,346	0,649	1,54	0,043	0,346	0,649	1,54	0,003	0,023	0,043	0,102	0,003	0,023	0,043	0,102
Poissons de mer	2597	1609	0,005	0,017	0,008	0,02	0,024	0,086	0,038	0,102								
Produits de la mer	2597	1817	0,207	1,15	0,295	1,352	0,226	1,173	0,323	1,36	0,019	0,106	0,027	0,125	0,019	0,106	0,027	0,125
Produits eau douce	2597	17	0	0	0	0	0	0	0,02	0,071								

Données Françaises uniquement

<i>Huitres</i>	2597	123	0,022	0	0,456	1,153	0,022	0	0,456	1,153								
<i>Moules</i>	2597	173	0,017	0,133	0,249	0,59	0,017	0,133	0,249	0,59	0,003	0,023	0,043	0,102	0,003	0,023	0,043	0,102

	n	n_cons	DBA total				DBA libre			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	2597	751	0,087	0,494	0,302	0,824	0,085	0,481	0,293	0,802
dont										
<i>Huitres</i>	2597	123	0,013	0	0,273	0,69	0,007	0	0,156	0,393
<i>Moules</i>	2597	173	0,013	0,104	0,195	0,463	0,014	0,112	0,21	0,498
Poissons de mer	2597	1609								
Produits de la mer	2597	1817	0,087	0,494	0,125	0,581	0,085	0,481	0,121	0,565
Produits eau douce	2597	17								

Données Françaises uniquement

<i>Huitres</i>	2597	123	0,013	0	0,273	0,69	0,007	0	0,156	0,393
<i>Moules</i>	2597	173	0,013	0,104	0,195	0,463	0,014	0,112	0,21	0,498

	n	n_cons	AEG total LB				AEG total UB				AEG libre LB				AEG libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	2597	751	0,01	0,056	0,034	0,094	0,01	0,056	0,034	0,094	0,006	0,033	0,02	0,055	0,006	0,033	0,02	0,055
dont																		
<i>Huitres</i>	2597	123	0,001	0	0,011	0,028	0,001	0	0,011	0,028								
<i>Moules</i>	2597	173	0,015	0,119	0,222	0,527	0,015	0,119	0,222	0,527	0,001	0,007	0,013	0,03	0,001	0,007	0,013	0,03
Poissons de mer	2597	1609																
Produits de la mer	2597	1817	0,01	0,056	0,014	0,066	0,01	0,056	0,014	0,066	0,006	0,033	0,008	0,039	0,006	0,033	0,008	0,039
Produits eau douce	2597	17																

Données Françaises uniquement

<i>Huitres</i>	2597	123	0,001	0	0,011	0,028	0,001	0	0,011	0,028								
<i>Moules</i>	2597	173	0,015	0,119	0,222	0,527	0,015	0,119	0,222	0,527	0,001	0,007	0,013	0,03	0,001	0,007	0,013	0,03

Tableau 11 : Exposition aiguë à la BMAA, au DAB et à l'AEG en µg/kg pc/j chez les adultes, forts consommateurs

	n n_cons		BMAA totale LB				BMAA totale UB				BMAA libre LB				BMAA libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	978	972	2,004	4,929	2,017	4,929	2,004	4,929	2,017	4,929	0,186	0,457	0,187	0,457	0,186	0,457	0,187	0,457
dont																		
<i>Huitres</i>	978	625	1,247	4,788	1,951	5,783	1,247	4,788	1,951	5,783								
<i>Moules</i>	978	845	1,707	4,993	1,976	5,067	1,707	4,993	1,976	5,067	0,113	0,329	0,13	0,334	0,113	0,329	0,13	0,334
Poissons de mer	978	977	0,029	0,07	0,029	0,07	0,145	0,35	0,145	0,35								
Produits de la mer	978	978	2,033	4,987	2,033	4,987	2,149	5,124	2,149	5,124	0,186	0,457	0,186	0,457	0,186	0,457	0,186	0,457
Produits eau douce (Ecrevisse)	978	122	0	0	0	0	0,002	0,017	0,019	0,054								

Données françaises uniquement

<i>Huitres</i>	978	625	1,247	4,788	1,951	5,783	1,247	4,788	1,951	5,783								
<i>Moules</i>	978	845	0,655	1,915	0,758	1,943	0,655	1,915	0,758	1,943	0,113	0,329	0,13	0,334	0,113	0,329	0,13	0,334

	n n_cons		DBA total				DBA libre											
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons								
Crustacés/Mollusques/Coquillages	978	972	0,866	2,129	0,871	2,129	0,842	2,072	0,848	2,072								
dont																		
<i>Huitres</i>	978	625	0,746	2,865	1,167	3,461	0,426	1,635	0,666	1,974								
<i>Moules</i>	978	845	0,514	1,503	0,595	1,525	0,553	1,616	0,64	1,64								
Poissons de mer	978	977																
Produits de la mer	978	978	0,866	2,129	0,866	2,129	0,842	2,072	0,842	2,072								
Produits eau douce (Ecrevisse)	978	122																

Données françaises uniquement

<i>Huitres</i>	978	625	0,746	2,865	1,167	3,461	0,426	1,635	0,666	1,974								
<i>Moules</i>	978	845	0,514	1,503	0,595	1,525	0,553	1,616	0,64	1,64								

	n n_cons		AEG total LB				AEG total UB				AEG libre LB				AEG libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	978	972	0,099	0,243	0,099	0,243	0,099	0,243	0,099	0,243	0,058	0,143	0,058	0,143	0,058	0,143	0,058	0,143
dont																		
<i>Huitres</i>	978	625	0,03	0,115	0,047	0,139	0,03	0,115	0,047	0,139								
<i>Moules</i>	978	845	0,584	1,709	0,676	1,734	0,584	1,709	0,676	1,734	0,033	0,098	0,039	0,099	0,033	0,098	0,039	0,099
Poissons de mer	978	977																
Produits de la mer	978	978	0,099	0,243	0,099	0,243	0,099	0,243	0,099	0,243	0,058	0,143	0,058	0,143	0,058	0,143	0,058	0,143
Produits eau douce (Ecrevisse)	978	122																

Données françaises uniquement

<i>Huitres</i>	978	625	0,03	0,115	0,047	0,139	0,03	0,115	0,047	0,139								
<i>Moules</i>	978	845	0,584	1,709	0,676	1,734	0,584	1,709	0,676	1,734	0,033	0,098	0,039	0,099	0,033	0,098	0,039	0,099

Tableau 12 : Exposition aiguë à la BMAA, au DAB et à l'AEG en µg/kg pc/j chez les enfants, population générale

	n n_cons		BMAA totale LB				BMAA totale UB				BMAA libre LB				BMAA libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	1450	260	0,143	0,87	0,8	2,336	0,143	0,87	0,8	2,336	0,013	0,081	0,074	0,217	0,013	0,081	0,074	0,217
dont																		
Huitres	1450	14	0,008	0	0,787	2,91	0,008	0	0,787	2,91								
Moules	1450	56	0,032	0	0,832	1,617	0,032	0	0,832	1,617	0,002	0	0,055	0,107	0,002	0	0,055	0,107
Poissons de mer	1450	665	0,004	0,019	0,01	0,027	0,022	0,097	0,048	0,136								
Produits de la mer	1450	765	0,148	0,89	0,28	1,332	0,166	0,896	0,314	1,386	0,013	0,081	0,025	0,124	0,013	0,081	0,025	0,124
Produits eau douce	1450	3	0	0	0	0	0	0	0,017	0,026								

Données françaises uniquement

Huitres	1450	14	0,008	0	0,787	2,91	0,008	0	0,787	2,91								
Moules	1450	56	0,012	0	0,319	0,62	0,012	0	0,319	0,62	0,002	0	0,055	0,107	0,002	0	0,055	0,107

	n n_cons		DBA total				DBA libre			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	1450	260	0,062	0,376	0,346	1,009	0,06	0,366	0,336	0,982
dont										
Huitres	1450	14	0,005	0	0,471	1,742	0,003	0	0,269	0,994
Moules	1450	56	0,01	0	0,25	0,487	0,01	0	0,269	0,523
Poissons de mer	1450	665								
Produits de la mer	1450	765	0,062	0,376	0,117	0,575	0,06	0,366	0,114	0,56
Produits eau douce	1450	3								

Données françaises uniquement

Huitres	1450	14	0,005	0	0,471	1,742	0,003	0	0,269	0,994
Moules	1450	56	0,01	0	0,25	0,487	0,01	0	0,269	0,523

	n n_cons		AEG total LB				AEG total UB				AEG libre LB				AEG libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	1450	260	0,007	0,043	0,039	0,115	0,007	0,043	0,039	0,115	0,004	0,025	0,023	0,068	0,004	0,025	0,023	0,068
dont																		
Huitres	1450	14	0	0	0,019	0,07	0	0	0,019	0,07								
Moules	1450	56	0,011	0	0,285	0,553	0,011	0	0,285	0,553	0,001	0	0,016	0,032	0,001	0	0,016	0,032
Poissons de mer	1450	665																
Produits de la mer	1450	765	0,007	0,043	0,013	0,066	0,007	0,043	0,013	0,066	0,004	0,025	0,008	0,039	0,004	0,025	0,008	0,039
Produits eau douce	1450	3																

Données françaises uniquement

Huitres	1450	14	0	0	0,019	0,07	0	0	0,019	0,07								
Moules	1450	56	0,011	0	0,285	0,553	0,011	0	0,285	0,553	0,001	0	0,016	0,032	0,001	0	0,016	0,032

Tableau 13 : Exposition chronique à la BMAA, au DAB et à l'AEG en µg/kg pc/j chez les adultes, population générale

	n n_cons		BMAA totale LB				BMAA totale UB				BMAA libre LB				BMAA libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	2597	751	0,048	0,272	0,166	0,453	0,048	0,272	0,166	0,453	0,004	0,023	0,014	0,039	0,006	0,033	0,02	0,055
dont																		
Huitres	2597	123	0,004	0	0,084	0,213	0,004	0	0,084	0,213								
Moules	2597	173	0,009	0,07	0,131	0,311	0,009	0,07	0,131	0,311	0,001	0,005	0,009	0,022	0,001	0,007	0,013	0,032
Poissons de mer	2597	1609	0	0	0	0	0,007	0,026	0,012	0,031								
Produits de la mer	2597	1817	0,048	0,272	0,069	0,319	0,055	0,28	0,079	0,327	0,004	0,023	0,006	0,027	0,006	0,033	0,008	0,039
Produits eau douce	2597	17	0	0	0	0	0	0	0,01	0,035								

Données Françaises uniquement

Huitres	2597	123	0,004	0	0,088	0,222	0,004	0	0,088	0,222								
Moules	2597	173	0,005	0,043	0,08	0,19	0,005	0,043	0,08	0,19	0	0,003	0,005	0,013	0,001	0,005	0,009	0,022

	n n_cons		DBA total				DBA libre											
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons								
Crustacés/Mollusques/Coquillages	2597	751	0,051	0,292	0,178	0,487	0,035	0,196	0,119	0,326								
dont																		
Huitres	2597	123	0,009	0	0,189	0,477	0,003	0	0,066	0,167								
Moules	2597	173	0,007	0,059	0,111	0,263	0,006	0,046	0,087	0,206								
Poissons de mer	2597	1609																
Produits de la mer	2597	1817	0,051	0,292	0,074	0,343	0,035	0,196	0,049	0,23								
Produits eau douce	2597	17																

Données Françaises uniquement

Huitres	2597	123	0,009	0	0,189	0,477	0,003	0	0,066	0,167								
Moules	2597	173	0,007	0,059	0,111	0,263	0,006	0,046	0,087	0,206								

	n n_cons		AEG total LB				AEG total UB				AEG libre LB				AEG libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	2597	751	0,004	0,023	0,014	0,039	0,004	0,023	0,014	0,039	0,001	0,003	0,002	0,006	0,002	0,013	0,008	0,022
dont																		
Huitres	2597	123	0	0	0,006	0,015	0	0	0,006	0,015								
Moules	2597	173	0,001	0,005	0,009	0,022	0,001	0,005	0,009	0,022	0	0,001	0,001	0,003	0	0,003	0,005	0,013
Poissons de mer	2597	1609																
Produits de la mer	2597	1817	0,004	0,023	0,006	0,027	0,004	0,023	0,006	0,027	0,001	0,003	0,001	0,004	0,002	0,013	0,003	0,016
Produits eau douce	2597	17																

Données Françaises uniquement

Huitres	2597	123	0	0	0,006	0,015	0	0	0,006	0,015								
Moules	2597	173	0,001	0,005	0,009	0,022	0,001	0,005	0,009	0,022	0	0,001	0,001	0,003	0	0,003	0,005	0,013

Tableau 14 : Exposition chronique à la BMAA, au DAB et à l'AEG en µg/kg pc/j chez les adultes, forts consommateurs

	n n_cons		BMAA totale LB				BMAA totale UB				BMAA libre LB				BMAA libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	978	972	0,476	1,172	0,479	1,172	0,476	1,172	0,479	1,172	0,041	0,1	0,041	0,1	0,058	0,143	0,058	0,143
dont																		
Huitres	978	625	0,23	0,885	0,36	1,068	0,23	0,885	0,36	1,068								
Moules	978	845	0,345	1,009	0,399	1,024	0,345	1,009	0,399	1,024	0,025	0,072	0,029	0,073	0,035	0,103	0,041	0,104
Poissons de mer	978	977	0	0	0	0	0,043	0,105	0,043	0,105								
Produits de la mer	978	978	0,476	1,172	0,476	1,172	0,52	1,224	0,52	1,224	0,041	0,1	0,041	0,1	0,058	0,143	0,058	0,143
Produits eau douce (Ecrevisse)	978	122	0	0	0	0	0,001	0,008	0,009	0,027								

Données françaises uniquement

Huitres	978	625	0,24	0,923	0,376	1,115	0,24	0,923	0,376	1,115								
Moules	978	845	0,211	0,618	0,244	0,627	0,211	0,618	0,244	0,627	0,014	0,041	0,016	0,042	0,025	0,072	0,029	0,073

	n n_cons		DBA total				DBA libre											
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons								
Crustacés/Mollusques/Coquillages	978	972	0,511	1,257	0,514	1,257	0,343	0,843	0,345	0,843								
dont																		
Huitres	978	625	0,516	1,981	0,807	2,392	0,18	0,692	0,282	0,836								
Moules	978	845	0,292	0,854	0,338	0,867	0,229	0,669	0,265	0,679								
Poissons de mer	978	977																
Produits de la mer	978	978	0,511	1,257	0,511	1,257	0,343	0,843	0,343	0,843								
Produits eau douce (Ecrevisse)	978	122																

Données françaises uniquement

Huitres	978	625	0,516	1,981	0,807	2,392	0,18	0,692	0,282	0,836								
Moules	978	845	0,292	0,854	0,338	0,867	0,229	0,669	0,265	0,679								

	n n_cons		AEG total LB				AEG total UB				AEG libre LB				AEG libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	978	972	0,041	0,1	0,041	0,1	0,041	0,1	0,041	0,1	0,006	0,014	0,006	0,014	0,023	0,057	0,023	0,057
dont																		
Huitres	978	625	0,016	0,062	0,025	0,074	0,016	0,062	0,025	0,074								
Moules	978	845	0,025	0,072	0,029	0,073	0,025	0,072	0,029	0,073	0,004	0,01	0,004	0,01	0,014	0,041	0,016	0,042
Poissons de mer	978	977																
Produits de la mer	978	978	0,041	0,1	0,041	0,1	0,041	0,1	0,041	0,1	0,006	0,014	0,006	0,014	0,023	0,057	0,023	0,057
Produits eau douce (Ecrevisse)	978	122																

Données françaises uniquement

Huitres	978	625	0,016	0,062	0,025	0,074	0,016	0,062	0,025	0,074								
Moules	978	845	0,025	0,072	0,029	0,073	0,025	0,072	0,029	0,073	0,004	0,01	0,004	0,01	0,014	0,041	0,016	0,042

Tableau 15 : Exposition chronique à la BMAA, au DAB et à l'AEG en µg/kg pc/j chez les enfants, population générale

	n	n_cons	BMAA totale LB				BMAA totale UB				BMAA libre LB				BMAA libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	1450	260	0,034	0,207	0,19	0,555	0,034	0,207	0,19	0,555	0,003	0,018	0,016	0,047	0,004	0,025	0,023	0,068
dont																		
Huitres	1450	14	0,001	0	0,145	0,538	0,001	0	0,145	0,538								
Moules	1450	56	0,006	0	0,168	0,327	0,006	0	0,168	0,327	0	0	0,012	0,023	0,001	0	0,017	0,033
Poissons de mer	1450	665	0	0	0	0	0,007	0,029	0,015	0,041								
Produits de la mer	1450	765	0,034	0,207	0,065	0,317	0,041	0,217	0,077	0,329	0,003	0,018	0,006	0,027	0,004	0,025	0,008	0,039
Produits eau douce	1450	3	0	0	0	0	0	0	0,008	0,013								

Données Françaises uniquement

Huitres	1450	14	0,001	0	0,152	0,561	0,001	0	0,152	0,561								
Moules	1450	56	0,004	0	0,103	0,2	0,004	0	0,103	0,2	0	0	0,007	0,013	0	0	0,012	0,023

	n	n_cons	DBA total				DBA libre			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	1450	260	0,037	0,222	0,204	0,596	0,025	0,149	0,137	0,399
dont										
Huitres	1450	14	0,003	0	0,326	1,204	0,001	0	0,114	0,421
Moules	1450	56	0,005	0	0,142	0,277	0,004	0	0,111	0,217
Poissons de mer	1450	665								
Produits de la mer	1450	765	0,037	0,222	0,069	0,34	0,025	0,149	0,047	0,228
Produits eau douce	1450	3								

Données Françaises uniquement

Huitres	1450	14	0,003	0	0,326	1,204	0,001	0	0,114	0,421
Moules	1450	56	0,005	0	0,142	0,277	0,004	0	0,111	0,217

	n	n_cons	AEG total LB				AEG total UB				AEG libre LB				AEG libre UB			
			Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons	Moy_pop	P95_pop	Moy_cons	P95_cons
Crustacés/Mollusques/Coquillages	1450	260	0,003	0,018	0,016	0,047	0,003	0,018	0,016	0,047	0	0,003	0,002	0,007	0,002	0,01	0,009	0,027
dont																		
Huitres	1450	14	0	0	0,01	0,037	0	0	0,01	0,037								
Moules	1450	56	0	0	0,012	0,023	0	0	0,012	0,023	0	0	0,002	0,003	0	0	0,007	0,013
Poissons de mer	1450	665																
Produits de la mer	1450	765	0,003	0,018	0,006	0,027	0,003	0,018	0,006	0,027	0	0,003	0,001	0,004	0,002	0,01	0,003	0,015
Produits eau douce	1450	3																

Données Françaises uniquement

Huitres	1450	14	0	0	0,01	0,037	0	0	0,01	0,037								
Moules	1450	56	0	0	0,012	0,023	0	0	0,012	0,023	0	0	0,002	0,003	0	0	0,007	0,013

Les estimations de l'exposition alimentaire (tous produits confondus : mollusques, crustacés, poissons) se situent donc dans les gammes suivantes :

Pour l'exposition aiguë à la BMAA totale chez l'adulte :

- en moyenne de 0,295 µg/kg pc/j pour la population générale (LB) à 2,149 µg/kg pc/j pour les forts consommateurs (UB).
- au 95^{ème} percentile de 1,352 µg/kg pc/j pour la population générale (LB) à 5,124 µg/kg pc/j pour les forts consommateurs (UB).

Pour l'exposition chronique à la BMAA totale chez l'adulte :

- en moyenne de 0,069 µg/kg pc/j pour la population générale (LB) à 0,52 µg/kg pc/j pour les forts consommateurs (UB).
- au 95^{ème} percentile de 0,319 µg/kg pc/j pour la population générale (LB) à 1,224 µg/kg pc/j pour les forts consommateurs (UB).

9 Conclusions générales et recommandations du groupe de travail

Les données toxicologiques (*in vivo* et *in vitro*) montrent la neurotoxicité de la BMAA, qui de ce fait constitue un danger pour l'Homme.

Ces données ne permettent cependant pas d'identifier une relation dose-effet ni une valeur toxicologique de référence (aiguë ou chronique).

Le danger de la BMAA ne peut donc pas être caractérisé.

A l'issue de son analyse, le GT « BMAA » a conclu que le lien de causalité entre l'exposition à la BMAA et la survenue de SLA n'était pas démontré, en l'état actuel des connaissances. Cette pathologie, à l'instar des autres maladies neurodégénératives, est multifactorielle et de cinétique lente.

Les données de l'Ifremer ont montré que la BMAA était quantifiée dans l'ensemble des échantillons d'huîtres et de moules du littoral français (n = 138). A partir de ces données et d'autres données disponibles dans la littérature, l'exposition des consommateurs français a pu être estimée selon plusieurs scénarios mais elle n'a pas pu être comparée à des expositions de consommateurs d'autres pays, le GT « BMAA » n'ayant identifié aucune information publiée.

Compte tenu de ces éléments, le GT BMAA n'est pas en mesure de se prononcer sur le niveau de préoccupation sanitaire à l'égard de la BMAA dans les produits de la mer et d'eau douce.

Piste de recherche à envisager en priorité.

- Analyser la BMAA sous forme libre et sous forme liée dans des échantillons de cerveaux de patients atteints de SLA ainsi que des échantillons témoins selon une méthode analytique fiable.
- Acquérir des données métaboliques et toxicologiques pour caractériser le danger et définir une valeur toxicologique de référence (pour la BMAA et pour ses isomères, l'AEG, le DAB et la BAMA).
- Obtenir des données de contamination des produits de la mer et d'eau douce (coquillages, poissons, crustacés) selon une méthode analytique fiable et permettant de prendre en compte la variabilité temporelle et spatiale. La recherche de la BMAA pourrait faire partie de la liste des toxines incluses dans le cadre de la veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages, pilotée par la DGAI.
- Mener une étude épidémiologique cas-témoin pour investiguer le possible lien de causalité entre l'exposition à la BMAA et la survenue de SLA.

De manière plus détaillé, il conviendrait de :

- Produire un matériel de référence pour permettre à la communauté scientifique de caractériser les méthodes analytiques mises en œuvre et comparer les résultats, sans *a priori* sur les méthodes (*i.e.* dérivation vs. sans dérivation).
- Clarifier la production de BMAA par les cyanobactéries (quelles souches en produisent, de façon constitutive ou induite, à quelles concentrations).
- Réévaluer les voies de bioaccumulation de la BMAA dans les produits de la mer et d'eau douce. En effet, de récents travaux montrent la production de BMAA par certaines espèces de diatomées (telles que *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp, *Thalassiosira pseudonana*).

- Mieux prendre en compte les informations relatives aux habitudes alimentaires dans les études épidémiologiques visant à établir le lien entre l'exposition à la BMAA et la survenue de SLA.
- Définir un marqueur fiable d'exposition (BMAA, métabolite ou autre biomarqueur).
- Investiguer l'origine de la faible susceptibilité de la souris à la neurotoxicité de la BMAA.
- Etudier les mécanismes de liaison, d'incorporation ou d'interaction de la BMAA et de ses isomères aux protéines dans les matrices biologiques.

Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail

Le 10 mars 2017, révisé en avril 2017 suite à l'adoption par le CES ERCA le 12 avril 2017.

10 Bibliographie

- Afssa (2009). INCA2. Étude individuelle nationale des consommations alimentaires. Coordinateur L. Lafay.
- Afssa (2006). CALIPSO. Etude des consommations alimentaires de produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, polluants et oméga 3, Coordinateur JC Leblanc.
- Abrahams S, Goldstein LH, Suckling J, Ng V, Simmons A, Chitnis X, Atkins L, Williams SC, Leigh PN (2005). Frontotemporal white matter changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 252: 321-331
- Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, van den Berg LH (2012). The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis *Acta Neuropathol.* 124: 339-352
- Al-Chalabi A, Fang F, Hanby MF, Leigh PN, Shaw CE, Ye W, et al. (2010). An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 81: 1324-1326
- Al-Sammak MA, Hoagland KD, Snow DD, Cassada D (2013) Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin- A in environmental samples. *Toxicon* 76: 316-325
- Al-Sammak MA, Hoagland KD, Cassada D, Snow DD (2014) Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. *Toxins* 6: 488-508
- Al-Sammak MA, Rogers DG, Hoagland KD (2015). Acute β -N-Methylamino-L-alanine toxicity in a mouse model. *J Toxicol* 2015: 739-746
- Allen CN, Spencer PS, Carpenter DO (1993). Beta-N-methylamino-L-alanine in the presence of bicarbonate is an agonist at non-N-methyl-D-aspartate-type receptors. *Neuroscience.* 54(3):567-74.
- Allen CN, Omelchenko I, Ross SM, Spencer P (1995). The neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) interacts with the strychnine-insensitive glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuropharmacology* 34: 651-658
- An T, Shi P, Duan W, Zhang S, Yuan P, Li Z, Wu D, Xu Z, Li C, Guo Y (2014). Oxidative stress and autophagic alteration in brainstem of SOD1-G93A mouse model of ALS. *Mol Neurobiol* 49: 1435-1448
- Andersson M, Karlsson O, Banack SA, Brandt I (2016). Transfer of developmental neurotoxin β -N-methylamino-l-alanine (BMAA) via milk to nursed offspring: Studies by mass spectrometry and image analysis. *Toxicol Lett* 258: 108-114
- Andrés R, Zurita J, Zguna N, Verschueren K, De Borggraeve W, Ilag L (2015). Improved detection of β -N-methylamino-l-alanine using N-hydroxysuccinimide ester of N-butylnicotinic acid for the localization of BMAA in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 407: 3743-3750
- Anses (2016). Évaluation du poids des preuves à l'Anses : revue critique de la littérature et recommandations à l'étape d'identification des dangers, juillet 2016, 116 p.
- Arif M, Kazim SF, Grundke-Iqbal I, Garruto RM, Iqbal K (2014). Tau pathology involves protein phosphatase 2A in parkinsonism-dementia of Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 1144-1149
- Ayers JI, Fromholt SE, O'Neal VM, Diamond JH, Borchelt DR (2016). Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta Neuropathol.* 131: 103-114
- Banack, SA, Cox, PA (2003). Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology* 61, 387-389
- Banack, SA, Murch, SJ, Cox, PA (2006). Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *J. Ethnopharmacol.* 106: 97-104
- Banack S, Johnson HE, Cheng R, and Cox PA (2007). Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Mar. Drugs* 5: 180-196
- Banack, S.A., Downing, T.G., Spáčil, Z., Purdie, E.L., Metcalf, J.S., Downing, S., Esterhuizen, M., Codd, G.A., Cox, P.A., 2010. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-l-alanine (BMAA) from its structural isomer 2,4-diaminobutyric acid (2,4-DAB). *Toxicon* 56 (6), 868-879.
- Banack, SA, Metcalf, JS, Spacil, Z, Downing, TG, Downing, S, Long, A, Nunn, PB, Cox, PA (2011). Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from other diamino acids. *Toxicon* 57: 730-738
- Banack SA, Metcalf JS, Bradley WG, Cox PA (2014) Detection of cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-l-alanine within shellfish in the diet of an ALS patient in Florida. *Toxicon* 90: 167-173
- Banack SA, Caller T, Henegan P, Haney J, Murby A, Metcalf JS, Powell J, Alan P, Stommel E (2015) Detection of cyanotoxins, β -N-methylamino-L-alanine and microcystins, from a lake surrounded by cases of amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins* 7: 322-336

- Baptista MS, Cianca RCC, Lopes VR, Almeida CMR, Vasconcelos, VM (2011). Determination of the non protein amino acid β -N-methylamino-L-alanine in estuarine cyanobacteria by capillary electrophoresis. *Toxicon* 58: 410–414
- Barden H, Levine S (1983). Histochemical observations on rodent brain melanin. *Brain Res Bull.* 10: 847-851
- Beach DG, Kerrin ES, Quilliam MA (2015). Selective quantitation of the neurotoxin BMAA by use of hydrophilic-interaction liquid chromatography-differential mobility spectrometry-tandem mass spectrometry (HILIC-DMS-MS/MS). *Anal Bioanal Chem* 407: 8397-8409
- Berntzon, L., Ronnevi, L.O., Bergman, B., and Eriksson, J. (2015). Detection of BMAA in the human central nervous system. *Neuroscience* 292, 137–147.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 330: 585-591
- Blasco H, Mavel S, Corcia P, Gordon PH (2014). The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr Med Chem* 21: 3551-3575
- Beghi E, Logroscino G, Chiò A, Hardiman O, Millul A, Mitchell D, Swingler R, Traynor BJ (2010). Amyotrophic lateral sclerosis, physical exercise, trauma and sports: results of a population-based pilot case-control study. *Amyotroph Lateral Scler* 11: 289-292
- Berntzon L, Ronnevi LO, Bergman B, Eriksson J (2015). Detection of BMAA in the human central nervous system. *Neuroscience* 292: 137-147
- Blasco H, Mavel S, Corcia P, Gordon PH (2014). The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr Med Chem* 21: 3551-3575
- Blokhuis AM, Groen EJ, Koppers M, van den Berg LH, Pasterkamp RJ (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 125: 777-794
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia *Science* 312: 1389-1392
- Bozzoni V, Pansarasa O, Diamanti L, Nosari G, Cereda C, Ceroni M (2016). Amyotrophic lateral sclerosis and environmental factors. *Funct Neurol* 31: 7-19
- Brand LE, Pablo J, Compton A, Hammerschlag N, Mash DC (2010). Cyanobacterial Blooms and the Occurrence of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in South Florida Aquatic Food Webs. *Harmful Algae* 9: 620-635
- Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 1: 293-299
- Brownson DM, Mabry TJ, Leslie SW (2002). The cycad neurotoxic amino acid, β -N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *J Ethnopharmacol.* 82: 159-167
- Bryan L, Kaye W, Antao V, Mehta P, Muravov O, Horton DK (2016). Preliminary results of national amyotrophic lateral sclerosis (ALS) registry risk factor survey data. *PLoS One.* 11(4):e0153683
- Buenz EJ, Howe CL (2007). β -methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo. *Neurotoxicology* 28: 702-704
- Byrne S, Bede P, Elamin M, Kenna K, Lynch C, McLaughlin R, et al. (2011). Proposed criteria for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 12: 157-159
- Campbell RJ, Steele JC, Cox TA, Loerzel AJ, Belli M, Belli DD, Kurland LT (1993). Pathologic findings in the retinal pigment epitheliopathy associated with the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam. *Ophthalmology* 100: 37-42
- de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H, Shefner J, Swash M (2008). Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol.* 119: 497-503
- Cervantes Cianca RC, Baptista MS, Lopes VR, Vasconcelos VM (2012). The non-protein amino acid β -N-methylamino-L-alanine in Portuguese cyanobacterial isolates. *Amino Acids* 42: 2473-2479
- Chatziefthimiou AD, Metcalf JS, Glover WB, Banack SA, Dargham SR, Richer, RA (2016). Cyanobacteria and cyanotoxins are present in drinking water impoundments and groundwater wells in desert environments. *Toxicon* 114, 75-84
- Castaigne P, Lhermitte F, Cambier J, Escourolle R, Le Bigot P. Neuropathological study of 61 cases of amyotrophic lateral sclerosis. Nosological discussion. *Rev Neurol (Paris).* 1972 Oct;127(4):401-14.
- Chang YC, Chiu SJ, Kao KP. beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) decreases brain glutamate receptor number and induces behavioral changes in rats. *Chin J Physiol.* 1993;36(2):79-84.
- Christensen SJ, Hemscheidt TK, Trapido-Rosenthal H, Laws EA, Bidigare RR (2012) Detection and quantification of β -methylamino-L-alanine in aquatic invertebrates. *Limnol Oceanogr Methods* 10: 891-898
- Chiò A, Logroscino G, Traynor BJ, et al (2013). Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology* 41: 118-130
- Chiu AS, Gehringer MM, Braidy N, Guillemin GJ, Welch JH, Neilan BA (2013). Gliotoxicity of the cyanotoxin, β -methyl-amino-L-alanine (BMAA). *Sci Rep.* 3:1482

- Cohen, S.A., 2012. Analytical techniques for the detection of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. *Analyst* 137: 1991-2005
- Combes, A., El Abdellaoui, S., Sarazin, C., Vial, J., Mejean, A., Ploux, O., and Pichon, V. (2013). Validation of the analytical procedure for the determination of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine in complex environmental samples. *Anal. Chim. Acta* 771: 42-49
- Combes A, El Abdellaoui S, Vial J, Lagrange E, Pichon V (2014). Development of an analytical procedure for quantifying the underivatized neurotoxin β -N-methylamino-l-alanine in brain tissues. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 4627-4636
- Copani A, Canonico PL, Catania MV, Aronica E, Bruno V, Ratti E, van Amsterdam FT, Gaviraghi G, Nicoletti F (1991). Interaction between beta-N-methylamino-L-alanine and excitatory amino acid receptors in brain slices and neuronal cultures. *Brain Res* 558: 79-86
- Corcia P, Jafari-Schlupe HF, Lardillier D, Mazyad H, Giraud P, Clavelou P, Pouget J, Camu W (2003). A clustering of conjugal amyotrophic lateral sclerosis in southeastern France. *Arch Neurol.* 60: 553-557
- Costa J, Swash M, de Carvalho M (2012). Awaji criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review. *Arch Neurol* 69: 1410-1416
- Cox TA, McDarby JV, Lavine L, Steele JC, Calne DB (1989). A retinopathy on Guam with high prevalence in Lytico-Bodig. *Ophthalmology* 96: 1731-1735
- Cox PA, Sacks OW (2002). Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology*, 58, 956-959
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ (2003). Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 13380-13383
- Cox PA., Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, Metcalf JS, Morrison LF, Codd GA, Bergman B (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-l-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5074-5078
- Cox PA, Davis DA, Mash DC, Metcalf JS, Banack SA (2016). Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc. R. Soc. B* 283: 20152397
- Cruz-Aguado R, Winkler D, Shaw CA (2006). Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary [β]-methylamino-L-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 84: 294-299
- D'Amato RJ, Alexander GM, Schwartzman RJ, Kitt CA, Price DL, Snyder SH (1987). Evidence for neuromelanin involvement in MPTP-induced neurotoxicity. *Nature* 327: 324-326
- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Lynch DR (2008). Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 7(12):1091-8. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70224-2. Epub 2008 Oct 11.
- Dariani S, Baluchnejadmojarad T, Roghani M (2013). Thymoquinone attenuates astrogliosis, neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in a model of temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci* 51: 679-686
- Dayhaw-Barker P (2002). Retinal pigment epithelium melanin and ocular toxicity. *Int J Toxicol* 21: 451-454
- Doucette TA, Tasker R.A (2016). Perinatal Domoic Acid as a Neuroteratogen. *Curr Top Behav Neurosci.* 2016;29:87-110. doi: 10.1007/7854_2015_417.
- Downing S, Contardo-Jara V, Pflugmacher S, Downing TG (2014) The fate of the cyanobacterial toxin β -N-methylamino-l-alanine in freshwater mussels. *Ecotoxicol Environ Saf* 101: 51-58.
- Dunlop RA, Cox PA, Banack, SA, Rodgers, KJ, (2013). The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of L-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. *Plos One* 8 (9)
- Duncan MW, Steele JC, Kopin, IJ, Markey SP (1990). 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology* 40: 767-772
- Duncan MW, Villacreses NE, Pearson PG, Wyatt L, Rapoport SI, Kopin IJ, Markey SP, Smith QR (1991). 2-amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) pharmacokinetics and blood-brain barrier permeability in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 27-35
- Duncan MW, Markey SP, Weick BG, Pearson PG, Ziffer H, Hu Y, Kopin IJ (1992). 2-Amino-3-(methylamino)propanoic acid (BMAA) bioavailability in the primate. *Neurobiol aging* 13: 333-337
- Dunlop J, Beal Mcllvain H, She Y, Howland DS (2003). Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 23: 1688-1696
- Dunlop RA, Cox PA, Banack SA, Rodgers KJ (2013). The non-protein amino acid BMAA is misincorporated into human proteins in place of L-serine causing protein misfolding and aggregation. *PLoS One* 8(9): e75376
- El-Assaad I, Di Bari JA, Yasuda K, Divers TJ, Summers BA, de Lahunta A, Mohammed H (2012). Differential expression of TAR DNA-binding protein (TDP-43) in the central nervous system of horses afflicted with

- equine motor neuron disease (EMND): a preliminary study of a potential pathologic marker. *Vet Res Commun* 36: 221-226
- Eleuteri S, Di Giovanni S, Rockenstein E, Mante M, Adame A, Trejo M, Wrasidlo W, Wu F, Fraering PC, Masliah E, Lashuel HA (2015). Novel therapeutic strategy for neurodegeneration by blocking A β seeding mediated aggregation in models of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 74: 144-1457
- Eraña H, Venegas V, Moreno J, Castilla J. Prion-like disorders and Transmissible Spongiform Encephalopathies: An overview of the mechanistic features that are shared by the various disease-related misfolded proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Feb 19;483(4):1125-1136. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.166. Epub 2016 Aug 30. Review
- Eriksson J, Jonasson S, Papaefthimiou D., Rasmussen, U., and Bergman, B. (2009). Improving derivatization efficiency of BMAA utilizing AccQ-Tag in a complex cyanobacterial matrix. *Amino Acids* 36, 43–48
- Esterhuizen M, Downing TG (2008). Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71: 309-313
- Esterhuizen M, Pflugmacher S, Downing TG (2011). β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) uptake by the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 74-77
- Faassen EJ, Gillissen F, Lüring M (2012). A comparative study on three analytical methods for the determination of the neurotoxin BMAA in cyanobacteria. *PLoS One* 7(5): e36667
- Faassen EJ, Beekman W, Lüring M (2013). Evaluation of a Commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Determination of the Neurotoxin BMAA in Surface Waters. *PLoS ONE* 8, e65260.
- Faassen EJ (2014). Presence of the neurotoxin BMAA in aquatic ecosystems: what do we really know? *Toxins* 6: 1109-1138
- Faassen, E.J., Antoniou, M.G., Beekman-Lukassen, W., Blahova, L., Chernova, E., Christophoridis, C., Combes, A., Edwards, C., Fastner, J., Harmsen, J., et al. (2016a). A collaborative evaluation of LC-MS/MS based methods for BMAA analysis: Soluble bound BMAA found to be an important fraction. *Mar. Drugs* 14(3) : 45
- Faassen, E.J., Antoniou, M.G., Beekman-Lukassen, W., Blahova, L., Chernova, E., Christophoridis, C., Combès, A., Edwards, C., Fastner, J., Harmsen, J., et al. (2016b). A Collaborative Evaluation of LC-MS/MS Based Methods for BMAA Analysis: Soluble Bound BMAA Found to Be an Important Fraction. *Mar. Drugs* 45.
- Factor-Litvak P, Al-Chalabi A, Ascherio A, Bradley W, Chío A, Garruto R, Hardiman O, Kamel F, Kasarskis E, McKee A, Nakano I, Nelson LM, Eisen A. Current pathways for epidemiological research in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2013 May;14 Suppl 1:33-43.
- Fang F, Quinlan P, Ye W, Barber MK, Umbach DM, Sandler DP, Kamel F (2009). Workplace exposures and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Environ Health Perspect* 117: 1387-1392
- Field NC, Metcalf JS, Caller TA, Banack SA, Cox PA, Stommel EW. Linking β -methylamino-L-alanine exposure to sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Annapolis, MD. *Toxicon.* 2013 Aug;70:179-83. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.04.010. Epub 2013 May 6.
- Foster JG, Cress WD, Wright SF, Hess JL, (1986). Intracellular Localization of the Neurotoxin 2,4 Diaminobutyric Acid in *Lathyrus sylvestris* L. Leaf Tissue. *Plant Physiol.*(1987) 83, 900-904 ; 0032-0889/87/83/0900/05/\$01.00/0
- Frøyset AK, Khan EA, Fladmark KE (2016). Quantitative proteomics analysis of zebrafish exposed to sub-lethal dosages of β -methyl-amino-L-alanine (BMAA). *Sci Rep* 6: 29631
- Garner CE, Wegerski CJ, Doyle-Eisele M, Lucak J, Waidyanatha S, McDonald JD, Sanders JM (2013). Accumulation of β -N-methylamino-L-alanine in tissues following repeat oral administration to Harlan Sprague-Dawley rats. Society of Toxicology 52nd Annual Meeting, March 10–14, 2013, San Antonio, Texas (poster #500). *The Toxicologist, Supplement to Toxicological Sciences Volume 132, Issue 1*
- Garruto R, Yanagihara R, Gajdusek DC (1988). Cycads and amyotrophic lateral sclerosis/Parkinsonism dementia. *Lancet* 332: 1079-1079
- Gimenez-Roldan S, Spencer PS (2016). Azanon's disease. A 19th century epidemic of neurolathyrism in Spain. *Revue neurologique* 172, 748-755.
- Glover WB, Mash DC, Murch SJ (2014). The natural non-protein amino acid N- β -methylamino-L-alanine (BMAA) is incorporated into protein during synthesis. *Amino Acids* 46: 2553-2559
- Glover WB, Baker TC, Murch SJ, Brown PN (2015). Determination of β -N-methylamino-L-alanine, N-(2-aminoethyl)glycine, and 2,4-diaminobutyric acid in Food Products Containing Cyanobacteria by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry: Single-Laboratory Validation. *J AOAC Int.* 98: 1559-1565
- Goto JJ, Koenig JH, Ikeda K (2012). The physiological effect of ingested β -N-methylamino-L-alanine on a glutamatergic synapse in an in vivo preparation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*156(3-4):171-7. doi: 10.1016/j.cbpc.2012.07.004. Epub 2012 Jul 25.

- Gordon PH, Cheng B, Salachas F, Pradat PF, Bruneteau G, Corcia P, Lacomblez L, Meininger V (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med*. 330: 585-591
- Grosskreutz J, Van Den Bosch L, Keller BU (2010). Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Calcium* 47: 165-174
- Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin CL (2003). Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Hum Mol Genet* 12: 2519-2532
- Cucchiaroni ML, Viscomi MT, Bernardi G, Molinari M, Guatteo E, Mercuri NB (2010). Metabotropic Glutamate Receptor 1 Mediates the Electrophysiological and Toxic Actions of the Cycad Derivative β -N-Methylamino-L-Alanine on Substantia Nigra Pars Compacta DAergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, April 14, 2010 • 30(15):5176–5188
- Hanby MF, Scott KM, Scotton W, Wijesekera L, Mole T, Ellis CE, et al. (2011). The risk to relatives of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 134: 3454-3457
- Hanlon SD, Steele JC (1993). An unusual retinal pigment epitheliopathy endemic to the island of Guam. *Optom Vis Sci*. 70: 854-859
- Heitz FD, Erb M, Anklin C, Robay D, Pernet V, Gueven N (2012). Idebenone protects against retinal damage and loss of vision in a mouse model of Leber's hereditary optic neuropathy. *PLoS One* 7(9): e45182
- Henkel JS, Engelhardt JI, Siklos L, Simpson EP, Kim SH, Pan T, Goodman JC, Siddique T, Beers DR, Appel SH (2004). Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol*. 55: 221-235
- Holtcamp W. (2012). The emerging science of BMAA: do cyanobacteria contribute to neurodegenerative disease? *Environ Health Perspect* 120: A110-A116
- Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol* 7: 181-193
- Isaias IU, Trujillo P, Summers P, Marotta G, Mainardi L, Pezzoli G, Zecca L, Costa A (2016). Neuromelanin imaging and dopaminergic loss in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 8:196
- Inserm (2015). Sclérose latérale amyotrophique. <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/sclerose-laterale-amyotrophique>
- Jiang L, Aigret B, Borggraeve W, Spacil Z., Ilag L (2012). Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. *Anal Bioanal Chem* 403: 1719-1730
- Jiang L, Johnston E, Aberg KM, Nilsson U, Ilag LL (2013). Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 405: 1283-1292
- Jiang L, Eriksson J, Lage S, Jonasson S, Shams S, Mehine M, Ilag LL, Rasmussen U (2014a). Diatoms: A Novel Source for the Neurotoxin BMAA in Aquatic Environments. *PLoS One* 9(1): e84578.
- Jiang L, Kiselova N, Rosen J, Ilag LL (2014b). Quantification of neurotoxin BMAA ([bgr]-N-methylamino-L-alanine) in seafood from Swedish markets. *Sci. Rep.* 4
- Jimbow K (1995). Current update and trends in melanin pigmentation and melanin biology. *Keio J Med* 44: 9-18
- Johnston GAR and Twitchin B (1977). Stereospecificity of 2,4-Diaminobutyric acid with respect to inhibition of 4-Aminobutyric acid uptake and binding. *British J. Pharmac.* (1977), 59, 218-219
- Johnson HE, King SR, Banack SA, Webster C, Callanaupa WJ, Cox PA (2008). Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA. *J. Ethnopharmacol.* 118: 159-65
- Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spáčil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.-O., Rasmussen, U., Bergman, B., (2010). Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 9252-9257
- Kalia LV, Kalia SK, Salter MW (2008). NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. Author manuscript available in PMC 2013 Mar 5. PMC3589564 Published in final edited form as *Lancet Neurol* 7(8): 742-755
- Karamyan VT, Speth RC (2008). Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci* 82: 233-246
- Karlsson O, Lindquist NG, Brittebo EB, Roman E (2009a). Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicol Sci.* 109(2):286-95.
- Karlsson O, Roman E, Brittebo EB (2009b). Long-term cognitive impairments in adult rats treated neonatally with beta-N-Methylamino-L-Alanine. *Toxicol Sci.* 112(1): 185-195.
- Karlsson O, Berg C, Brittebo EB, Lindquist NG (2009c). Retention of the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-l-alanine in melanin and neuromelanin-containing cells - a possible link between Parkinson-dementia complex and pigmentary retinopathy. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 120-130

- Karlsson O, Kultima K, Wadensten H, Nilsson A, Roman E, Andrén PE, Brittebo EB (2013). Neurotoxin-induced neuropeptide perturbations in striatum of neonatal rats. *J Proteome Res* 12: 1678-1690
- Karlsson O, Berg AL, Lindström AK, Hanrieder J, Arnerup G, Roman E, Bergquist J, Lindquist NG, Brittebo EB, Andersson M (2012). Neonatal exposure to the cyanobacterial toxin BMAA induces changes in protein expression and neurodegeneration in adult hippocampus. *Toxicol Sci* 130: 391-404
- Karlsson O, Jiang L, Andersson M, Ilag LL, Brittebo EB (2014). Protein association of the neurotoxin and non-protein amino acid BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in the liver and brain following neonatal administration in rats. *Toxicol Lett* 226: 1-5
- Karlsson O, Berg AL, Hanrieder J, Arnerup G, Lindström AK, Brittebo EB (2015). Intracellular fibril formation, calcification, and enrichment of chaperones, cytoskeletal, and intermediate filament proteins in the adult hippocampus CA1 following neonatal exposure to the nonprotein amino acid BMAA. *Arch Toxicol* 89: 423-436
- Karlsson O, Jiang L, Ersson L, Malmström T, Ilag LL, Brittebo EB (2015). Environmental neurotoxin interaction with proteins: Dose-dependent increase of free and protein-associated BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in neonatal rat brain. *Sci Rep* 5: 15570
- Karlsson O, Lindquist NG (2016). Melanin and neuromelanin binding of drugs and chemicals: toxicological implications. *Arch Toxicol* 90: 1883-1891
- Kassubek J, Unrath A, Huppertz HJ, Lule D, Ethofer T, Sperfeld AD, Ludolph AC (2005). Global brain atrophy and corticospinal tract alterations in ALS, as investigated by voxel-based morphometry of 3-D MRI. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 6: 213-220
- Kisby GE, Roy DN, Spencer PS (1988). Determination of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in plant (*Cycas circinalis* L.) and animal tissue by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc) and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Neurosci Methods* 26: 45-54
- Kisby GE, Spencer PS (2011). Is neurodegenerative disease a long-latency response to early-life genotoxin exposure? *Int J Environ Res Public Health* 8: 3889-3921
- Krone B (2016) The why of sporadic motor neuron disease – many factors, still a mystery? *J Neurol Neuromed* 1: 1-5
- Koenig JH, Goto JJ, Ikeda K (2015). Novel NMDA receptor-specific desensitization/inactivation produced by ingestion of the neurotoxins, β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) or β -N-oxalylamino-L-alanine (BOAA/ β -ODAP). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 167: 43-50. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.08.006. Epub 2014 Sep 3.
- Köles L, Kató E, Hanuska A, Zádori ZS, Al-Khrasani M, Zelles T, Rubini P, Illes P. Modulation of excitatory neurotransmission by neuronal/glia signalling molecules: interplay between purinergic and glutamatergic systems. *Purinergic Signal*. 2016 Mar;12(1):1-24. doi: 10.1007/s11302-015-9480-5. Epub 2015 Nov 6. Review.
- Krüger T, Mönch B, Oppenhäuser S, Luckas B (2010). LC-MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revoluta* and *Lathyrus latifolius*. *Toxicon* 55: 547-557
- Kubo T, Kato N, Hosoya K, Kaya K (2008). Effective determination method for a cyanobacterial neurotoxin, β -N-methylamino-L-alanine. *Toxicon* 51: 1264-1268
- Kuzuhara S, Kokubo Y (2005). Atypical parkinsonism of Japan: amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan (Muro disease): an update. *Mov Disord* 20 Suppl 12:S108-S113
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. (1996). Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 347: 1425-1431
- Lage S, Costa PR, Moita T, Eriksson J, Rasmussen U, Rydberg SJ (2014). BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a potential BMAA source. *Aquat Toxicol* 152: 131-138
- Lage S, Burian A, Rasmussen U, Costa PR, Annadotter H, Godhe A, Rydberg S (2016). BMAA extraction of cyanobacteria samples: which method to choose? *Environ Sci Pollut Res Int*. 23: 338-350
- Lastres-Becker I, Ulusoy A, Innamorato NG, Sahin G, Rábano A, Kirik D, Cuadrado A (2012). α -Synuclein expression and Nrf2 deficiency cooperate to aggravate protein aggregation, neuronal death and inflammation in early-stage Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 21: 3173-3192
- Lee JW, Beebe K, Nangle LA, Jang J, Longo-Guess CM, Cook SA, Davison MT, Sundberg JP, Schimmel P, Ackerman SL (2006). Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* 443: 50-55
- Lewerenz J, Maher P. (2015). Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-what is the evidence? *Front Neurosci*. 9: 469

- Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. J Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *Cell Biol.* 2013 Apr 29;201(3):361-72. doi: 10.1083/jcb.201302044. Review
- Li A, Fan H, Ma F, McCarron P, Thomas K, Tang X, Quilliam MA (2012). Elucidation of matrix effects and performance of solid-phase extraction for LC-MS/MS analysis of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and 2,4-diaminobutyric acid (DAB) neurotoxins in cyanobacteria. *The Analyst* 137: 1210-1219
- Lim L, Wei Y, Lu Y, Song J (2016). ALS-Causing Mutations Significantly Perturb the Self-Assembly and Interaction with Nucleic Acid of the Intrinsically Disordered Prion-Like Domain of TDP-43. *PLoS Biol* 14: e1002338
- Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis *J Cell Biol.* 2013 Apr 29;201(3):361-72. doi: 10.1083/jcb.201302044.
- Lin WL, Dickson DW (2008). Ultrastructural localization of TDP-43 in filamentous neuronal inclusions in various neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol* 116: 205-213
- Lindström H, Luthman J, Mouton P, Spencer P, Olson L (1990). Plant-derived neurotoxic amino acids (beta-N-oxalylamino-L-alanine and beta-N-methylamino-L-alanine): effects on central monoamine neurons. *J Neurochem* 55: 941-949
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330: 613-622
- Liu X, Rush T, Zapata J, Lobner D (2009). β -N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc(-). *Exp Neurol* 217: 429-433
- Liu XQ, Rush T, Ciske J, Lobner D (2010). Selective death of cholinergic neurons induced by beta-methylamino-L-alanine. *Neuroreport* 21: 55-58
- Lobner D, Piana PM, Salous AK, Peoples RW (2007). Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Dis* 25: 360-366
- Lopicic S, Nedeljkov V, Cemerikic D (2009). Augmentation and ionic mechanism of effect of β -N-methylamino-L-alanine in presence of bicarbonate on membrane potential of Retzius nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 153: 284-292
- Ludolph AC, Brettschneider J (2015). TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis - is it a prion disease? *Eur J Neurol* 22: 753-761
- Mårs U, Larsson BS (1999). Pheomelanin as a binding site for drugs and chemicals. *Pigment Cell Res* 12: 266-274
- Marsden CD (1961) Pigmentation in the nucleus substantiae nigrae of mammals. *J Anat* 95:256-261
- Masseret E, Banack S, Boumédiène F, Abadie E, Brient L, Pernet F, Juntas-Morales R, Pageot N, Metcalf J, Cox P, Camu W; French Network on ALS Clusters Detection and Investigation. Dietary BMAA exposure in an amyotrophic lateral sclerosis cluster from southern France. *PLoS One.* 2013 Dec 13;8(12):e83406. doi: 10.1371/journal.pone.0083406. eCollection 2013
- McCarron P, Logan AC, Giddings SD, Quilliam MA (2014). Analysis of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in spirulina-containing supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Aquatic biosystems* 10: 5
- McGeer PL, Steele JC (2011). The ALS/PDC syndrome of Guam: potential biomarkers for an enigmatic disorder. *Prog Neurobiol* 95: 663-669
- McGorum BC, Pirie RS, Glendinning L, McLachlan G, Metcalf JS, Banack SA, Cox PA, Codd GA. Grazing livestock are exposed to terrestrial cyanobacteria. *Vet Res.* 2015 Feb 25;46:16. doi: 10.1186/s13567-015-0143-x.
- McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL (2011). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31: 15703-15715
- Metcalf, J.S., Banack, S.A., Lindsay, J., Morrison, L.F., Cox, P.A., and Codd, G.A. (2008). Co-occurrence of beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990-2004. *Environ. Microbiol.* 10: 702-708
- Miklossy J, Steele JC, Yu S, McCall S, Sandberg G, McGeer EG, McGeer PL (2008). Enduring involvement of tau, beta-amyloid, alpha-synuclein, ubiquitin and TDP-43 pathology in the amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam ALS/PDC) *Acta Neuropathol* 116: 625-637
- Mitchell J, Paul P, Chen HJ, Morris A, Payling M, Falchi M et al. (2010). Familial amyotrophic lateral sclerosis is associated with a mutation in D-amino acid oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 7556-7561
- Moura S, Ultramari MdA, de Paula DML, Yonamine M, Pinto E (2009). ¹H NMR determination of β -N-methylamino-L-alanine (l-BMAA) in environmental and biological samples. *Toxicon* 53: 578-583
- Mondo K, Hammerschlag N, Basile M, Pablo J, Banack SA, Mash DC (2012). Cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in shark fins. *Mar Drugs* 10: 509-520

- Mondo K, Broc Glover W, Murch SJ, Liu G, Cai Y, Davis DA, Mash DC (2014). Environmental neurotoxins β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and mercury in shark cartilage dietary supplements. *Food Chem Toxicol* 70: 26-32
- Montine TJ, Li K, Perl DP, Galasko D (2005). Lack of β -methylamino-L-alanine in brain from controls, AD, or Chamorro with PDC. *Neurology* 65: 768-769
- de Munck E, Muñoz-Sáez E, Antonio MT, Pineda J, Herrera A, Miguel BG, Arahuetes RM (2013). Effect of β -N-methylamino-L-alanine on oxidative stress of liver and kidney in rat. *Environ Toxicol Pharmacol* 35: 193-199
- de Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Ojeda I, Martínez A, Gil C, Arahuetes RM (2013). β -N-methylamino-L-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): the first step towards an experimental model for sporadic ALS. *Environ Toxicol Pharmacol* 36: 243-255
- de Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Martínez A, Arahuetes RM (2015). Morphometric and neurochemical alterations found in L-BMAA treated rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 39: 1232-1245
- de Munck E, Palomo V, Muñoz-Sáez E, Perez DI, Gómez-Miguel B, Solas MT, Gil C, Martínez A, Arahuetes RM (2016). Small GSK-3 inhibitor shows efficacy in a motor neuron disease murine model modulating autophagy. *PLoS One* 11(9): e0162723
- Lim L, Wei Y, Lu Y, Song J. ALS-Causing Mutations Significantly Perturb the Self-Assembly and interaction with Nucleic Acid of the Intrinsically Disordered Prion-Like Domain of TDP-43. *PLoS Biol* 2016 Jan 6;14(1)
- Muñoz-Sáez E, de Munck E, Arahuetes RM, Solas MT, Martínez AM, Miguel BG (2013). β -N-methylamino-L-alanine induces changes in both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma. *J Toxicol Sci* 38: 425-430
- Muñoz-Sáez E, de Munck García E, Arahuetes Portero RM, Martínez A, Solas Alados MT, Miguel BG (2015). Analysis of β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) neurotoxicity in rat cerebellum. *Neurotoxicology* 48: 192-205
- Muñoz-Sáez E, de Munck García E, Arahuetes Portero RM, Vicente F, Ortiz-López FJ, Cantizani J, Gómez Miguel B (2015). Neuroprotective role of sphingosine-1-phosphate in L-BMAA treated neuroblastoma cells (SH-SY5Y). *Neurosci Lett* 593: 83-89
- Murch, S.J., Cox, P.A., and Banack, S.A. (2004a). A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 12228–12231
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., and Sacks, O.W. (2004b). Occurrence of beta-methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol. Scand.* 110: 267-269
- Myers TG, Nelson SD (1990). Neuroactive carbamate adducts of beta-N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine. Detection and quantitation under physiological conditions by ^{13}C NMR. *J Biol Chem* 265: 10193-10195
- Napolitano A, Manini P, d'Ischia M (2011). Oxidation chemistry of catecholamines and neuronal degeneration: an update. *Curr Med Chem* 18: 1832-1845
- Niedzwiadek B, Scott PM, Lau BPY (2012) Monitoring of shrimp and farmed fish sold in Canada for cyanobacterial toxins. *J Food Protection* 75: 160-163
- Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep.* 2013 Jul 11;4(1):124-34. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.007. Epub 2013 Jul 3.
- Novak M, Hercog K, Žegura B. Assessment of the mutagenic and genotoxic activity of cyanobacterial toxin beta-N-methyl-amino-L-alanine in *Salmonella typhimurium*. *Toxicon.* 2016 Aug;118:134-40. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.04.047. Epub 2016 Apr 29.
- Okamoto K, Mizuno Y, Fujita Y (2008). Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology.* 28:109-115
- Okamoto K, Hirai S, Amari M, Watanabe M, Sakurai A. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis immunostained with rabbit anti-cystatin C serum. *Neurosci Lett.* 1993 Nov 12;162(1-2):125-8.
- Okle O, Stemmer K, Deschl U, Dietrich DR (2013). L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low nonexcitotoxic concentrations. *Toxicol Sci* 131: 217-224
- Okle O, Rath L, Galizia CG, Dietrich DR (2013). The cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) induces neuronal and behavioral changes in honeybees. *Toxicology and Applied Pharmacology* 270 (2013) 9–15
- Olney JW. Excitotoxins in foods. *Neurotoxicology.* 1994 Fall;15(3):535-44. Review
- O'Neal RM, Chung-Hochen, Reynolds C, Meghal SK and Koeppe RE (1968) The 'Neurotoxicity' of L-2,4-Diaminobutyric Acid *Biochem. J.*(1968)106, 699-706

- Oyanagi K, Makifuchi T, Ohtoh T, Chen KM, van der Schaaf T, Gajdusek DC, Chase TN, Ikuta F (1994). Amyotrophic lateral sclerosis of Guam: the nature of the neuropathological findings. *Acta Neuropathol* 88: 405-412
- Paï KS, Shankar SK, Ravindranath V (1993). Billion-fold difference in the toxic potencies of two excitatory plant amino acids, L-BOAA and L-BMAA: biochemical and morphological studies using mouse brain slices. *Neurosci Res.* 17(3):241-8.
- Paul P, de Belleruche J (2012). The role of D-amino acids in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a review. *Amino Acids* 43: 1823-1831
- Paul P, de Belleruche J (2015). Experimental approaches for elucidating co-agonist regulation of NMDA receptor in motor neurons: therapeutic implications for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Pharm Biomed Anal* 116: 2-6
- de Pedro N, Cantizani J, Ortiz-López FJ, González-Menéndez V, Cautain B, Rodríguez L, Bills GF, Reyes F, Genilloud O, Vicente F (2016). Protective effects of isoleucanonic acid on neurodegenerative in vitro models. *Neuropharmacology* 101: 538-548
- Petit-Paitel A (2016) Anses • Bulletin de veille scientifique n° 30 • Santé / Environnement / Travail •
- Perry TL1, Bergeron C, Biro AJ, Hansen S (1989). β -N-methylamino-L-alanine. Chronic oral administration is not neurotoxic to mice. *J Neurol Sci* 94: 173-180
- Petrozziello T, Secondo A, Tedeschi V, Esposito A, Sisalli M, Scorziello A, Di Renzo G, Annunziato L ApoSOD1 lacking dismutase activity neuroprotects motor neurons exposed to beta-methylamino-L-alanine through the Ca^{2+} /Akt/ERK1/2 prosurvival pathway. *Cell Death Differ.* 2017 Mar;24(3):511-522
- Plaitakis A, Carosco JT (1987). Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 22: 575-579
- Prusiner SB. *Prions Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13363-83. Review.
- Rakonczay Z, Matsuoka Y, Giacobini E (1991). Effects of L-beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) on the cortical cholinergic and glutamatergic systems of the rat. *J Neurosci Res* 29: 121-126
- Rao SD, Banack SA, Cox PA, Weiss JH (2006). BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Exp Neurol* 201: 244-252
- Réveillon D, Abadie E, Séchet V, Brient L, Savar V, Bardouil M, Hess P, Amzil Z (2014). Beta-N-methylamino-L-alanine: LC-MS/MS optimization, screening of cyanobacterial strains and occurrence in shellfish from Thau, a French Mediterranean Lagoon. *Mar. Drugs* 12: 5441-5467
- Réveillon, D., Abadie, E., Séchet, V., Masseret, E., Hess, P., and Amzil, Z. (2015a). β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. *Mar. Environ. Res.* 110: 8-18
- Réveillon 2015b. BMAA et cyanotoxines : microalgues productrices et niveaux d'accumulation dans les organismes marins. Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes, 334 pages
- Réveillon D, Séchet V, Hess P, Amzil Z (2016a). Systematic detection of BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in mollusks collected in shellfish production areas along the French coasts. *Toxicon* 110: 35-46
- Réveillon D, Séchet V, Hess P, Amzil Z. (2016b). Production of BMAA and DAB by diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros calcitrans* and *Thalassiosira pseudonana*) and bacteria isolated from a diatom culture. *Harmful Algae* 58: 45-50
- Richter KE, Mena EE (1989). L-beta-methylaminoalanine inhibits $[3H]$ glutamate binding in the presence of bicarbonate ions. *Brain Res* 492: 385-388.
- Rivadeneira-Domínguez E, Rodríguez-Landa JF. Cycads and their association with certain neurodegenerative diseases. *Neurologia* 2014 Nov-Dec;29(9):517-22.
- Roisen FJ, Bartfeld H, Donnenfeld H, Baxter J (1982). Neuron specific in vitro cytotoxicity of sera from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 5: 48-53
- Rosen J, Hellenas K-E (2008) Determination of the neurotoxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). *Analyst* 133: 1785-1789
- Rosen J, Westerberg E, Hellenas KE, Salomonsson ML (2016). A new method for analysis of underivatized free beta-methylamino-alanine: validation and method comparison. *Toxicon* 121: 105-108
- Rothstein JD, Martin, LJ, Kuncl RW (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326: 1464-1468
- Rothstein JD (1995). Excitotoxicity and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurosci.* 3: 348-359
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38: 73-84

- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16: 675-686
- Rouleau GA, Clark AW, Rooke K, Pramatarova A, Krizus A, Suchowersky O, Julien JP, Figlewicz D. SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1996 Jan;39(1):128-31
- Salomonsson ML, Fredriksson E, Alfjorden A, Hedeland M, Bondesson U (2015). Seafood sold in Sweden contains BMAA: A study of free and total concentrations with UHPLC-MS/MS and dansyl chloride derivatization. *Toxicol Rep* 2: 1473-1481.
- Santucci S, Zsürger N, Chabry J (2009). β -N-methylamino-L-alanine induced in vivo retinal cell death. *J Neurochem* 109: 819-825
- Sasabe J, Chiba T, Yamada M, Okamoto K, Nishimoto I, Matsuoka M, Aiso S (2007). D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 26: 4149-4159
- Stone TW. Kynurenic acid antagonists and kynurenine pathway inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001 Apr;10(4):633-45. Review.
- Scott PM, Niedziwadek B, Rawn DFK, Lau BPY (2009). Liquid chromatographic determination of the cyanobacterial toxin β -N-methylamino-L-alanine in algae Food supplements, freshwater Fish, and Bottled Water. *J Food Protection* 72: 1769-1773
- Silverman JM, Fernando SM, Grad LI, Hill AF, Turner BJ, Yerbury JJ, Cashman NR (2016). Disease Mechanisms in ALS: Misfolded SOD1 Transferred Through Exosome-Dependent and Exosome-Independent Pathways. *Cell Mol Neurobiol* 36: 377-381
- Smethurst P, Newcombe J, Troakes C, Simone R, Chen YR, Patani R, Sidle K. In vitro prion-like behaviour of TDP-43 in ALS. *Neurobiol Dis*. 2016 Dec;96:236-24
- Smith QR, Nagura H, Takada Y, Duncan MW (1992). Facilitated transport of the neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine, across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 58: 1330-1337
- Snyder LR, Hoggard JC, Montine TJ, Synovec RE (2010). Development and application of a comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry method for the analysis of l- β -methylamino-alanine in human tissue. *Journal of Chromatography A* 1217: 4639-464
- Snyder LR, Cruz-Aguado R, Sadilek M, Galasko D, Shaw CA, Montine TJ (2009). Parkinson-dementia complex and development of a new stable isotope dilution assay for BMAA detection in tissue. *Toxicol Appl Pharmacol*. 240: 180-188
- Spáčil Z, Eriksson J, Jonasson S, Rasmussen U, Ilag LL, Bergman B (2010). Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples. *The Analyst* 135: 127-132
- Spencer PS (1987). Guam ALS/Parkinsonism-dementia: A long-latency neurotoxic disorder caused by "slow toxin(s)" in food? *Can. J. Neurol. Sci.* 14: 347-357
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, Robertson RC (1987). Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237: 517-522
- Spencer PS, Kisby GE, Ludolph AC (1991). Slow toxins, biologic markers, and long-latency neurodegenerative disease in the western Pacific region. *Neurology* 41: 62-66
- Spencer PS, Palmer VS, Ludolph AC (2005). On the decline and etiology of high-incidence motor system disease in West Papua (southwest New Guinea). *Mov Disord*. 20 Suppl 12: S119-S126
- Spencer PS, Fry RC, Palmer VS, Kisby GE (2012). Western Pacific ALS-PDC: a prototypical neurodegenerative disorder linked to DNA damage and aberrant proteogenesis? *Front Neurol* 3: 180
- Spencer PS, Garner CE, Palmer VS, Kisby GE (2016). Vervets and macaques: Similarities and differences in their responses to l-BMAA. *Neurotoxicology* 56:284-286.
- Sta M, Sylva-Steenland RM, Casula M, de Jong JM, Troost D, Aronica E, Baas F (2011). Innate and adaptive immunity in amyotrophic lateral sclerosis: evidence of complement activation. *Neurobiol Dis* 42: 211-220
- Steele JC, Wresch R, Hanlon SD, Keystone J, Ben-Shlomo Y (2015). A unique retinal epitheliopathy is associated with amyotrophic lateral sclerosis/Parkinsonism-Dementia complex of Guam. *Mov Disord* 30: 1271-1275
- Souci S.W., Fachmann W. and Kraut H. (1994). Food composition and nutrition tables, 5th Edition. Medpharm scientific publishers, Stuttgart. 1091 pages
- Su FC, Goutman SA, Chernyak S, Mukherjee B, Callaghan BC, Batterman S, Feldman EL (2016). Association of Environmental Toxins With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol* 73: 803-811
- Tan SM, Deliyanti D, Figgitt WA, Talia DM, de Haan JB, Wilkinson-Berka JL (2015). Ebselen by modulating oxidative stress improves hypoxia-induced macroglial Müller cell and vascular injury in the retina. *Exp Eye Res*. 136:1-8
- Tan RY, Xing GY, Zhou GM, Li FM, Hu WT, Lambein F, Xiong JL, Zhang SX, Kong HY, Zhu H, Li ZX, Xiong YC (2017). Plant toxin β -ODAP activates integrin β 1 and focal adhesion: A critical pathway to cause neurolathyrism. *Scientific Reports* | 7:40677 | DOI: 10.1038/srep40677 1

- Tanaka Y, Hasegawa M. Profilin 1 mutants form aggregates that induce accumulation of prion-like TDP-43. *Prion*. 2016 Jul 3;10(4):283-9
- Tapia R, Medina-Ceja L, Peña F (1999). On the relationship between extracellular glutamate, hyperexcitation and neurodegeneration, in vivo. *Neurochem Int* 34: 23-31
- Turner MR, Cagnin A, Turkheimer FE, Miller CC, Shaw CE, Brooks DJ, Leigh PN, Banati RB (2004). Evidence of widespread cerebral microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis: an [11C](R)-PK11195 positron emission tomography study. *Neurobiol Dis*.15: 601-609
- Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman OM (2000). Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. *Arch Neurol*.;57: 1171-1176
- Udan M, Baloh RH. Implications of the prion-related Q/N domains in TDP-43 and FUS. *Prion*. 2011 Jan-Mar;5(1):1-5. Epub 2011 Jan 1
- Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762: 1068-1082
- Vega A, Bell EA (1967). α -Amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* 6: 759-762
- Vega A, Bell EA, Nunn PB (1968). The preparation of L- and D- α -amino- β -methylaminopropionic acids and the identification of the compound isolated from *Cycas circinalis* as the L-isomer. *Phytochemistry* 7, 1885-1887
- Vinceti M, Bottecchi I, Fan A, Finkelstein Y, Mandrioli J (2012). Are environmental exposures to selenium, heavy metals, and pesticides risk factors for amyotrophic lateral sclerosis? *Rev Environ Health*; 27: 19-41
- Wagner KN, Nagaraja H, Allain DC, Quick A, Kolb S, Roggenbuck J. Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis Have High Interest in and Limited Access to Genetic Testing. *J Genet Couns*. 2016 Oct 20.
- Waring SC, Esteban-Santillan C, Reed DM, Craig UK, Labarthe DR, Petersen RC, Kurland LT (2004). Incidence of amyotrophic lateral sclerosis and of the parkinsonism-dementia complex of Guam, 1950-1989. *Neuroepidemiology* 23: 192-200
- Weiss JH, Choi DW (1988). Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor. *Science* 241: 973-975
- Weiss JH, Christine CW, Choi DW (1989a). Bicarbonate dependence of glutamate receptor activation by beta-N-methylamino-L-alanine: channel recording and study with related compounds. *Neuron* 3: 321-326
- Weiss JH, Koh JY, Choi DW (1989b) Neurotoxicity of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and beta-N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain Res*. 497: 64-71
- Winton MJ, Joyce S, Zhukareva V, Practico D, Perl DP, Galasko D, Craig U, Trojanowski JQ, Lee VM (2006). Characterization of tau pathologies in gray and white matter of Guam parkinsonism-dementia complex. *Acta Neuropathol* 111: 401-412
- Yin HZ, Yu S, Hsu CI, Liu J, Acab A, Wu R, Tao A, Chiang BJ, Weiss JH (2014). Intrathecal infusion of BMAA induces selective motor neuron damage and astrogliosis in the ventral horn of the spinal cord. *Exp Neurol*. 261: 1-9
- Zecca L, Zucca FA, Wilms H, Sulzer D (2003). Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* 26: 578-580
- Zeevalk GD, Nicklas WJ (1994). Nitric oxide in retina: relation to excitatory amino acids and excitotoxicity. *Exp Eye Res* 58: 343-350
- Zeevalk GD, Nicklas WJ (1989). Acute excitotoxicity in chick retina caused by the unusual amino acids BOAA and BMAA: effects of MK-801 and kynurenate. *Neurosci Lett* 102: 284-290

ANNEXES

Annexe 1 : Sélection des articles relatifs aux aspects méthodologiques

Revue systématique	Données bibliographiques relatives à l'analyse des cyanotoxines
Reference saisine Anses	2016-SA-0012
Thème	Méthodes d'analyse de la BMAA
Nom des contributeurs	Amzil Zouher, Biré Ronel, Pichon Valérie
Recherche n°1	
Base de données n°1	SCOPUS
Phrase de recherche	TITLE-ABS-KEY ((BMAA OR beta-N-methylamino-L-alanine OR β -N-methylamino-L-alanine) AND (analysis))
Date	Août 2016
Nombre de références trouvées	127
Recherche n°2	
Base de données n°2	PUBMED
Phrase de recherche	TITLE-ABS ((BMAA OR beta-N-methylamino-L-alanine OR β -N-methylamino-L-alanine) AND (analysis))
Date	Août 2016
Nombre de références trouvées	68
Recherche n°3	
Base de données n°3	Web of Science
Phrase de recherche	TITLE-ABS-KEY ((BMAA OR beta-N-methylamino-L-alanine OR β -N-methylamino-L-alanine) AND (analysis))
Date	Août 2016
Nombre de références trouvées	82
Elimination des références en double	
Nombre total de références (somme des bases de données)	277
Nombre de références en double	121 dont 65 retirées manuellement
Nombre final sans les références en double	156
Date	09/09/16
Première étape de sélection (titre et résumé)	
Articles en rapport avec l'analyse d'organismes aquatiques	29
Articles en rapport avec l'analyse d'autres matrices (eau, cyanobactéries, plantes, tissus biologiques etc.)	41
Articles de revue	4
Articles non pertinents (toxicologie, mode d'action...)	82
Date	09/09/16

Annexe 2 : Classement des méthodes utilisées dans la littérature relative à l'occurrence de la BMAA

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Al Sammak et al., 2013	Eau, poissons, plantes aquatiques	Matrices lyophilisées Poissons, plantes : 1 mL TCA 0,1 N (16h 4°C) puis ré-extraction avec TCA 0,1 N à 25°C (libres) ou 2 mL 6 M HCl (16h, 110°C) (liées) Eau : cartouches Oasis MCX 6cc (150 mg)	Aucune	AQC	LC-FLD : Kromasil Thermohypersil C8 (4.6 × 250 mm) LC-MS/MS : Hypurity C18 (2.1 × 250 mm, 5 µm)	LC-FLD LC-MS/MS	acide α-aminobutyrique	tr FLD : λ exc 250 nm, λ em 395 nm BMAA MH+ m/z 459 -> 289 DAB MH+ m/z 459 -> 171		LD LC-FLD BMAA 5 µg/L, DABA 7 µg/L LD LC-MS 0,8-3,2 µg/L	Linéarité LC-MS : DABA : 0,01 - 1 mg/L BMAA : 0,01 - 0,7 mg/L	NON Transitions non spécifiques	NON	
Al Sammak et al., 2014	Eau, poissons, plantes aquatiques	Eau : cartouches Oasis MCX 6cc (150 mg) Poissons, plantes : TCA 0,1 N (libres) ou HCl 6 M (liées)	Aucune	AQC	Cond. 1 : Kromasil-Thermohypersil C8 (4.6 × 250 mm) Cond. 2 : Hypurity C18 HPLC (2.1 mm × 250 mm, 5 µm)	LC-FLD (Cond. 1) LC-MS/MS (Cond. 2)	acide α-aminobutyrique	tr FLD : λ exc 250 nm, λ em 395 nm Transitions suivies en LC-MS/MS ? BMAA, DAB m/z 459, ions fils m/z 171 et 289 (infos figure 3)		eau : 5-7 µg/L (LC-FLD), < 0,5 µg/L (LC-MS/MS) poissons : 0,8-3,2 ng/g	Méthode validée par Al Sammak et al. (2013)	NON	NON	
Al Sammak et al., 2015	Foies et cerveaux de rats	50 mg de foie ou cerveau extrait avec 500µL HCl 6M (16h à 110°C), puis évaporation à sec avant reprise		Cond. 1 : AQC	Cond. 1 : colonne Ultra AccQ-Tag (2.1 × 100mm)	Cond. 1 : LC-UV-MS Cond. 2 : LC-MS/MS	Aucun	Cond. 1 : tr λ UV ? BMAA m/z ? 459 ? Cond. 2 : tr BMAA m/z 459 > 119, 171 et 289 Ratios d'ions				NON Transitions non spécifiques	NON Pas étalon interne, aucune info concernant les LD et LQ ni les rendements d'extraction	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Anderson et al., 2016	Milk	300 mg cerveau/foie + 20% TCA (w/v), sonication 3x 20 s. BMAA libre dans le lait issu de l'estomac (120–450 mg) extrait par 20% TCA, sonication; filtration, centrifugation, ajout de TCA, sonication, centrifugation, dérivation du surnageant et hydrolyse du culot par un volume double de l'échantillon de 6 M HCl (110°C, nuit), filtration, centrifugation, dilution 1:50 eau pure	Aucune	extrait filtré dilué par de l'eau ou 20 mM HCl puis dérivation ACQ	Phenomenex Kinetex column (150x 2.1 mm, 1.7 mm, C18, 100A), 5 µl, isocratique (62% MeOH)	MS: BMAA 459>119	aucun	BMAA: m/z 459 > 119, 459 > 188, 459 > 214, 459 > 258, 459 > 289; 459 > 171. Additional ions were also monitored, m/z 230 > 171 (double protonated BMAA), m/z 317 (single derivatized lysine), m/z 487 (double derivatized lysine), m/z 302 (leucine), and m/z 276 (serine).	104+- 8%?	LOD : 3.2 ng/ml; LOQ :9.6 ng/ml. (étalon milieu pur?)	aucune	OUI	NON	pas d'info sur les rapports des différents ions des transitions suivies
Andrys et al., 2015	Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	50-100 mg d'homogénat extraits dans 600 µL eau (sonication). Aliquots of d'homogénats (10 mg) hydrolysés avec HCl 12M (110 °C pdt 20 h)	Isolute HXC-3, 100 mg	ACQ ou C4-NA-NHS	Hypersil Gold C18 column (100 x 2,1 mm, 3 µm)	LC-MS/MS	Aucun	tr BMAA-C4-NA m/z 221.3 --> 137.0 m/z 221.3 --> 193.0 m/z 221.3 --> 249.0 BMAA-ACQ m/z 459.3 --> 119.1 m/z 459.3 --> 258.1				OUI	NON	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Banack et al., 2003	cycads, cycad flour, and flying foxes	échantillon réhydraté 30 min avec eau ou (?) TCA (80 ± 32 mg/mL), macération, filtration (pas plus de détails)	Aucune	AQC	Nova-Pak C18 column, gradient bien décrit	Fluo 250/395 nm	aucun	resultats "confirmés par TLC"; "MS of HPLC-identified peaks confirmed the presence of BMAA at 02.1 m/z for both the Sigma standard compound and a bat sample (MVZ 114607)."(?)	"BMAA was dependent on concentration, and quantification was accomplished with comparison of equal amounts of BMAA and a norleucine internal standard (representing a single midrange concentration), resulting in a mean response of 51.2%".	LOD : 0.00013 µmol/injection and LOQ : 0.013 µmol/injection		NON	NON	pas de chromatogramme ni de données (tr)
Banack et al., 2006	Chauve souris, ragout de chauve souris, tortillas de cycad	Echantillon (mg?) + 0.1N TCA (V?) (1 nuit, 4 °C), centrifugation, reextraction de la fraction protéique (TCA). Ultracentrifugation. Hydrolyse du culot 6.0 M HCl (24 h, 110 °C). Extrait sec hydrolysé repris dans 20mM HCl .	Aucune	AQC	Nova-Pak C18 column, 300mm×3.9 mm) at 37 °C. Gradient	Fluo(250/395nm), UV	norleucine	tr en LC/Fluo, LC/MS (SQ) m/z? pour confirmation sur une autre colonne et un autre gradient	95% (pas de CV ni d'explication/calcul)	0.0001 and 0.013 µmol (?)		NON	NON	"average response factor for derivatized BMAA as compared to a norleucine internal standard was 51%.";aucun chromatogramme, spectre de ms? m/z? Tr?

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Bannack et al., 2007	marine cyanobacterium	BMAA libre: lyophilisat de cyanobactéries + 0.4 mg/mL 0.1N TCA, (12h 4°C), centrifugation, reextraction de la fraction protéique (TCA, 50µl), vortex, re-extraction (1 h, Tambiante) . BMAA totale : cyano (63 mg/mL WW) +6 N HCl (400 µL) (16 h, 110°C). Hydrolysat (200 µL) filtré, séché, repris par 20 mM HCl.	Aucune	AQC	Nova-Pak C18 column (300mm×3.9 mm) at 37 °C en isocratique (52% ACN) puis en gradient pour séparer les acides aminés et UHPLC/UV sur AccQTag Ultra column (gradient) pour BMAA totale, LC/MSMS en isocratique	Fluo (250/395nm), UV (UPLC), LCMS, LCMSMS sur une fraction de LC/fluo (x3), Aminoacid analyzer avec derivation post colonne	aucun	voir pres power point	aucun	HPLC ???LOD 0.1 pmol and LOQ 1.1 pmol (pur) en UHPLC qui n'est en fait que la méthode de confirmation	dit utiliser une méthode "validée" ref Cox PNAS 2005 mais il ne s'agit pas d'une méthode validée.ils n'utilisent pas le même gradient pour les analyses que celui qui leur garantit la séparation des autres acides aminés!	NON	NON	suivi à m/z 459.2 en MS simple et MS MS (suivi des ions fils)
Banack et al., 2011	Etalons	Toxines dans 20 mM HCl, analysées en l'état ou après hydrolyse acide (6.0 M HCl pdt 16h à 110°C)	Aucune	AQC EZFaast	Cond. 1 : AccQTag Ultra (2.1 × 100 mm) Cond. 2 : Phenomenex AAA-MS (250 × 2.0 mm, 4 µm) Cond. 3 et 4 : AccQTag Ultra (2.1 × 100 mm) Cond. 5 : Nova-Pak C18 (3.9 × 300 mm)	Cond. 1 : LC-MS/MS (AQC) Cond. 2 : LC-MS (EZFaast) Cond. 3 : LC-UV Cond. 4 : LC-MS (AQC) Cond. 5 : LC-FLD	Aucun	tr Cond. 1 : BMAA, DAB, AEG MH+ m/z 459 ; ions fils m/z 119, 171, 289, 188 (DAB), 214 (AEG), 258 (BMAA) Cond. 2 : BMAA, DAB, AEG MH+ m/z 333 Cond. 3 : 260 nm Cond. 4 : BMAA, DAB, AEG MH+ m/z 459 Cond. 5 : λ exc	n/a		OUI Séparation des isomères et des autres acides aminés. Ions spécifiques BMAA, DAB et AEG recherchés en UPLC-MS/MS après dériv AQC	NON		

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
								250, λ em 395						
Banack et al., 2014	Queues de homard	TCA 0,1 N (pdt la nuit, 4°C) puis ré-extraction avec TCA 0,1 N (libres) ou 6 M HCl (6h, 110°C) (liées) 2 éch bouillis dans l'eau. Phase aqueuse hydrolysée avec vol équivalent de HCl 12 M (16h, 110°C) ; résidu hydrolysé avec HCl 6 M (16h, 110°C)	Aucune	AQC	AccQTag Ultra (2.1 x 100 mm)	LC-MS/MS	Aucun	tr BMAA MH+ m/z 459 lons fils m/z 119, 171, 188, 214, 258, 289		LD : BMAA 48 fmoles, DAB 26 fmoles LQ : BMAA 0.48 pmoles, DAB 0.26 pmoles	Fidélité (répétabilité, reproductibilité) déterminée à partir de l'aire et RT de la BMAA et du DAB (CV %)	OUI	Non Données de fidélité déterminées pour aire et RT	
Banack et al., 2015	Carpes (cerveau, foie, muscles) Filtres à air (aérosols)	Cerveau : TCA 0,1 N (pdt la nuit, 4°C) puis ré-extraction avec TCA 0,1 N (libres) ou 6 M HCl (16h, 110°C) (liées) Foie, muscles : sonication dans l'eau puis hydrolyse acide (6 M HCl), évaporation à sec et reprise dans TCA 0,1 N. Partition chloroforme (1:1), évaporation TCA et reprise dans 20 mM HCl Filtres : 6 M HCl (24h, 110°C)	SPE filtres à air : Isolute C18 (1 g) et Phenomenex StrataX X-C (500 mg) couplées	AQC	Phenomenex Kinetex C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 μ m)	LC-MS/MS	Aucun	tr BMAA MH+ m/z 459, M2H+ m/z 230 lons fils m/z 459 : m/z 119, 171, 188, 214, 258, 289 lons fils m/z 230 : m/z 171		LD : BMAA 48 fmoles, DAB 26 fmoles LQ : BMAA 0.48 pmoles, DAB 0.26 pmoles		OUI	NON	
Baptista, 2011	cyanobactéries	Cf banack 2007 Marine Drugs - 10 mg +2 ml TCA	Aucune	Aucune	CZE : 50 cm x 5 mm I.D. fused-silica	UV direct 192 nm	aucun	tm	taux de récupération sur BMAA soumis à TCA ou HCl proche de 100%	linearité : 10 - 700 mg/l, LOD : 0,5 mg/l LOQ 2 mg/l	pas de corrélation libre/liée, aléatoire, libre sans tous les échantillons, liés dans 3 sur 8 échantillons	NON	NON	lien mg/l et mg/g impossible

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Beach et al., 2015	Moules (dont des MRC NRCC) Echantillon homogène de cycas (<i>Cycas debaensis</i>)	50 mg lyophilisat extrait dans 1 mL HCl 6 M (110°C, tte la nuit), évaporé à sec, dopé avec étalon interne et repris dans 2,5 mL HCl 2 mM	Aucune	Non	TSKgel Amide-80 (25 cm × 2 mm, 5 µm)	HILIC-DMS-MS/MS	BMAA-d3 (dilution isotopique)	tr BMAA : m/z 119 -> m/z 102, 44 BMAAd3 : m/z 122 -> m/z 105, 47 BAMA : m/z 119 -> m/z 102, 56 2,4-DAB : m/z 119 -> m/z 101, 56 3,4-DAB : m/z 119 -> m/z 101, 84 AEG : m/z 119 -> m/z 102, 56		BMAA LD = 0,4 pg sur colonne (S/N = 3) et 20 ng/g en matrice		OUI Séparation des composés sauf BMAA et BAMA (RT 18,2 et 18,1 respectivement) mais ion fils m/z 44 spécifique BMAA pour différenciation	NON Pas de rendement d'extraction	
Berntzon et al., 2015	CSF, sang total, plasma	CSF. 3-ml sonication (2 min), centrifugation, 2XV acetone (12h), centrifugation, séchage et hydrolyse du surnageant car protéine soluble (6 M HCl, 22 h, 110 °C). Procédure d'hydrolyse identique sur le culot Sang/plasma. 100-µl sang (23.3 mg DW, 18,2 mg DW culot)/plasma (9.3 mg DW, 7.3 mg DW culot) mélangé à 400-µl dH2O, lyse par congélation, décongélation, centrifugation (30 min), supernageant +acetone (1ml),	Aucune	resuspension dans 100-µl tampon borate, derivatization with AccQ-Tag (adjustment par dilution de la teneur en protéine et ajustement du pH)	Acquity UPLC BEH C18 (1.7-µm, 2.1 100-mm); 10 µl pour CSF; 20 µl sang et plasma (?), gradient	tr, AEG, BMAA and DAB : 459.18>119.1; BMAA : 459.18>258.1; DAB: 459.18>188.1; AEG: 459.18>214.1; D3-BMAA; 462.2>122.1	D3-BMAA (43 pmol) pour CSF "to compensate sample loss"	tr ions 459 > 119, 258, 188 et 214 S/N > 4, w: 2s, Tr 5% control ratio 119,1/258.1 (20%)	?	BMAA:3.6 fmol (0,42g on column); BMAA liée CSF: 0,12 pm (14,3 pg); sang : LOD/LOQ BMAA libre 0.75 pmol/7.5 pmol (89/892 pg) on-column; (171 ng/ml / 1.7µg/ml BMAA dans sang) pour BMAA liée, 7.5/18.9 pmol (892 pg/2.2 ng) BMAA on-column (53 ng/ml /134 ng/ml)	sur 12 CSF ALS patient, 1 positif à 78 pg/ml (libre) et 96.6 pg/ml (liée) soit LOQ et 2 positifs chez CSF patient sain à 234 et 540 pg/ml BMAA liée (sans correction avec étalon interne!)	OUI	OUI pour BMAA totale, NON pour BMAA libre d'où au final un doute	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
		centrifugation (30 min), séchage du surnageant et du culot pour hydrolyse, reconstitution par 500 µl 20% méthanol, spinfiltration, lyophilisation et reprise par 20mM HCl								BMAA dans le sang) for free BMAA hydrolyzed fraction. Linéarité entre 0.75 and 43 pmol on-column (r2=0.99) BMAA liée. "For free BMAA only two concentrations of the standard curve reached the criteria for BMAA detection, hence no curve was established".				

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Brand et al., 2010	Crustacées, mollusques, poissons	Cond. 1 : tissus lyophilisés hydrolysés tte la nuit avec 6 M HCl (1:10 w/v) à 110°C. Extraits ensuite lyophilisés, repris dans 200 µL 0,1 N TCA et rincés avec 100 µL chloroforme. Phase aqueuse conservée Cond. 2 : tissus lyophilisés hydrolysés avec 6N HCl (18 h, 110°C), évaporés à sec et repris dans 20 mM HCl	Aucune	AQC	Cond. 1 : Nova-Pak C18 (3.9 × 300 mm) Cond. 2 : Thermo Hypersil GOLD (100 × 2.1 mm, 3 µm)	Cond. 1 : LC-FLD (AQC) Cond. 2 : LC-MS/MS (AQC)	Aucun	tr Cond. 1 : FLD : λ exc 250 nm, λ em 395 nm Cond. 2 : BMAA MH+ m/z 459, ions fils m/z 119, 171, 289 Comparaison ratios ions fils en matrice et étalon (tolérance 5%)	98 % solvant 94-97 % (ajouts dosés en matrice) Procédure utilisée pas très claire	Solvant : LD = 0,1 ng ; LQ = 2,0 Matrice : LD = 2,0 - 9,1 ng ; LQ = 8,8 - 40,7 ng unité matrice pas précisée	Linéarité de 1 à 250 ng/mg en matrice, avec R2 = 0.998 (P < 0.0001)	NON	NON	
Caller et al., 2009	Cyanobactéries	Echantillons lyophilisés puis hydrolysés avec HCl 6M (16h à 110°C) avant d'être évaporés à sec et repris dans 20mM HCl		AQC	Colonne AccQTag Ultra (100 mm × 2.1 mm)	LC-MS/MS		tr 3 transitions : m/z 459 > 119, 171, 289 Ratios d'ions				NON Transitions suivies pas spécifiques	NON	
Chatziefthimiou Toxicon 2016	Cyanobactéries (ech. Sol et eau)	filtrat d'échantillon d'eau et sol directement hydrolysés par 1ml 6M HCl Cf Richer et al. (2015).	Aucune	Extracts rehydrated with 20 mM HCl and subsequently diluted before derivatization with AQC (Richer 2015)	Waters AccQTag Ultra column (2.1 x 100 mm)	Ions m/z 459 (M+ H)+ and m/z 230 (M+2H)+ d'après (Richer 2015)	aucun			LDD AEG 0.018 ng/ml, BMAA is 0.018 ng/ml; DAB is 0.070 ng/ml. (explanation ?)	"Isomer retention time and ion ratios were also used in ion identification." (d'après Richer)	NON (ref cité pour décrire la méthode)	NON	most of analytical data are extracted from Richer 2015

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Christensen et al., 2012	Feuilles de cycas Lièvres des mers (<i>Stylocheilus striatus</i>) Huitres (<i>Crassostrea virginica</i>) Crabes bleus (<i>Callinectes sapidus</i>)	10–20 mg lyophilisat repris dans 1 mL de HCl 6N (18 h à 110°C)	Aucune	AQC	Waters Xbridge C18 (150 × 4,6 mm, 3,5 µm)	LC-MS/MS	Aucun	tr BMAA m/z 459 > 289, 459 > 258, 459 > 119	92% (± 8%)	LD = 0,5 µg/g LQ = 1,7 µg/g	Réponse linéaire de 0,4 à 153,2 µg/µL (r2 = 0.997) Fidélité (???): 2.4% Justesse : 92% (± 8%) Fidélité et justesse évaluées pour la matrice lièvre des mers	OUI	OUI	
Cianca, 2012	Cyanobactéries	extraction de la BMAA libre au TCA (Banack et al. Marine Drugs 2007) ou par MeOH/Acetone (Eriksson et al. Aminoacids 2009). Hydrolyse du culot par HCl (Banack et al. Marine drugs 2007)	Aucune	AQC (Cohen 2001)	Nova Pack C18 (5µl), 2 gradients selon libre ou total!	Fluo (250/395 nm)	aucun	tr	?	LOD/LOQ: BMAA libre : 0,13 pmol et 0,42 pmol , BMAA total : 0,06 et 0,19 pmol (on column)	gradient différents pour libre et liée, pb de coelution évoqué si on utilise de l'acetonitrile au lieu du méthanol en phase mobile.	NON	NON	comparaison: TCA > Methanol/Acetone
Combès et al., 2014	Cerveau	0.5 g + TCA 0.1 M (3ml) + 0.5 g of glass beads (1 mm) vortex (5 min), sonication (10 min), centrifugation (10 min).	Phase aqueuse purifiée sur Oasis MCX (60 mg): c : 2 ml of MeOH, 1 ml eau acidifiée FA (pH=3), percolation échantillon acidifié (pH=3), L1: 1 ml of cyclohexane, L2 1 ml of HCl 0.1	Aucune	ZIC-HILIC column (3.5 µm, 150× 2.1 mm), 5µL, gradient		D3-DAB	tr BMAA, DAB, et D3-DAB, suivi de 119>102, 119>101, and 122>104; asparagine 133>74, glutamine and lysine147>84, histidine156 >110, arginine 175>70 to arginine	>97,8 pour BMAA et DAB	LOQ dans le cerveau: BMAA20 ng/g; DAB : 100 ng/g	Validation par la méthode de l'erreur totale (tracé des profils d'exactitude) sur différentes matrices (eau pure, eau de rivière, cyanobactéries, biofilm) en utilisant un dopage BMAA et D3-DAB (solution dopante : 0,1 µg/ml) (eau pure, eau de la Seine,	NON	NON	Malgré la qualité de l'approche quantitative, le non suivi des transitions spécifiques invalide de fait les aspects quantitatifs

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
			M, L3: 2 ml MeOH, E: 3 ml MeOH + 5 % of NH4OH.								cyanobac, Biofilm) : 4 niveaux concentrations : 0,5 à 13 ng/ml. Répéta, repro sur les 4 matrices			
Combès et al., 2013	Eau, biofilms	25 mg biofilm ou 10 mg cellules repris dans TCA 0,1M (vol final 3 mL). Agitation vortex, sonication et centrifugation	Oasis-MCX (3 cc, 60 mg)	Aucune	ZIC-HILIC (150 × 2.1 mm ; 3.5 µm)	LC-MS/MS	d3-DAB	tr BMAA : 119 > 102 DAB : 119 > 102, 119 > 101 d3-DAB : 122 > 104	SPE eau pure 88 ± 3% (n = 3) pour BMAA et 87 ± 3% (n = 3) pour DAB	LD (S/N = 3) = 1 ng/mL LQ (S/N = 10) = 3 ng/mL	Bonne linéarité de BMAA, DAB et d3-DAB de 0,003 à 5 µg/mL Effets matrices de 30% (eau de la Seine) à 40% (cyanobactéries)	NON	NON Malgré la qualité de l'approche quantitative, le non suivi des transitions spécifiques invalide de fait les aspects quantitatifs	
Cox et al., 2003	cyanobactéries, cycads, cerveaux, chauve souris	200-mg échantillon X2 0.1 M TCA (V?), centrifugation, récupération du surnageant	Aucune	AQC	SymetryShield RP-18, linear gradient elution of CH3CN (10–40%) in water. Tr?	LC DAD (254nm) et LC SQMS (m/z?)	aucun	?	?	?		NON	NON	aucune comparaison chromatogramme/reel, spectre de ms? m/z? données MS?
Cox et al., 2005	Cyanobactéries	5–20µg DW / 0.1 M TCA (V?), centrifugation (3 min) to precipitate proteins. Hydrolyse des protéines (6 M HCl at 110°C for 24 h). Ultrafiltration avant derivatization (solvant de reprise?)	Aucune	AQC	Nova-Pak C18 column at 37°C. Isocratique à 60 ou 52% ACN pour confirmer	Fluo (250 /395 nm)	norleucine	tr en LC/Fluo, LC/MS(SQ) (m/z?) pour confirmation	"Detection of the BMAA depended on concentration and comparison of equal amounts of BMAA and a norleucine internal standard, resulting in a mean response of 51.2%"	LDD 65 µmol mol, LDD 6,5 mmol (on column)		NON	NON	aucun chromatogramme, spectre de ms? m/z? Tr?

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Cox et al 2016	LCS, cerveau, sang	Cf Glover 2015	Aucune	Cf Glover 2015	Cf Glover 2015	CL-MS/MS	D ₃ ¹⁵ N ₂ -BMAA	BMAA: m/z 459 > 119, 459 > 258, 2,4DB 459 > 188 (= spécifique)	-	-	-	OUI	NON	BMAA totale, aucune données-juste la ref à Glover et la mention des transitions suivies
Craighead et al., 2009	Cyanobactéries	Echantillons d'eau lyophilisés puis hydrolysés avec HCl 6M (16h à 110°C) avant d'être évaporés à sec et repris dans 20mM HCl		AQC	Colonne AccQTag Ultra (2.1 × 100 mm)	LC-MS/MS		tr 3 transitions : m/z 459 > 119, 171, 289 Ratios d'ions				NON Transitions suivies pas spécifiques et ratios d'ions pas précisés	NON Aucune info	
Downing et al., 2014	Moules	Homogénat de moules extrait avec 0,1 N TCA pdt 30 min à température ambiante. Culot extrait une 2nde fois et les 2 fractions sont poolées Masses et volumes ??? Culot extrait avec HCl 6 M (24h, 110°C), évaporé à ces puis repris dans 20 mM HCl Masses et volumes ???	Aucune	EZFaast	Phenomenex EZ:faast AAA-MS (250 × 2.0 mm)	LC-MS/MS (EZFaast)	L-BMAA-4,4-d ₃ ¹⁵ N ₂	tr (pas mentionné) BMAA marquée MH+ m/z 338, ions fils m/z 235, 250, 278		BMAA marquée dans 20 mM HCl LD = 1 ng/mL	Linéarité de 5 à 300 ng/mL avec R2 = 0.999 (20 mM HCl)	OUI RT pas mentionné mais BMAA marquée administrée aux moules	NON	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Duncan et al., 1989	Cycad seeds	agitation 20 mg farine + 0.1M HCl (1 ml), 48h	Aucune	transesterification du surnageant (2 nuit), reprise au CH ₂ Cl ₂ puis lavage à l'eau puis traitement au PFPA (2h)	GC (fused-silica capillary column (12 m x 0.22 mm id.))with a cross-linked methyl silicone stationary phase (HPI,0.33 µm)	MS	D3 BMMA (Synthétisé)	M/z 190 et 365 (+3 car suivi de H3BMAA)	none	LOQ 5 pg on column milieu pur	aucuns rendements de derivation, les auteurs précisent trouver plus que d'autres sans comprendre pourquoi, seconde transition non exploitable en milieu réel	NON	NON	la 2,4 DB donnerai les mêmes transitionS
Duncan et al., 1992	urine de singe	Cf Duncan 1989	-	Cf Duncan 1989	GC	MS	15N BMAA, D-BMAA	M/z 190 et 365	-	-	-	OUI	NON	pas de suivi de la 2,4 DB qui donnerai les mêmes transitions, quantification par ajout de 15N BMAA (etalonnage en mileu pur!)
Eriksson, 2009	cyanobactéries	cyano. + 70/30 MeOH/eau, lyse par congelation:décongelation, récupération du surnageant, évaporation. Séchage des protéines + 90%MeOH puis hydrolyse (6 M HCl, 24 h,110°C), reprise par 120 µl 20 mM HCl (Murch et al. 2004). "All TCA (???) extractions were performed according to Cox et al. (2003)."	Aucune	AccQTag	Chromolith Performance RP-18e 3 mm X 2 en série, gradient	fluo (250/395 nm)	aucun	tr	taux de derivation optimal 96%	LOD120 fmol, LOQ 12 nmol (colonne); 40 nmol (LOD) in the cyanobacterial matrix. Linearite 8.5 nmol-84 pmol (milieu?)	mise en évidence de l'influence négative des teneurs en protéines sur les taux de dérivaison de la BMAA: teneur optimale en proteine = 0.12 µg protein/µl	NON	NON	extraction sans acide?; gamme basse de linéarité < LOQ!; rapport LOD/LOQ?

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Esterhuisen., 2011	cyanobactéries soumises à la BMAA	C. demersum lyophilisé+ 0.5ml 0.1M TCA, centrifugation, lavage du culot de protéines par 0.1M TCA = BMAA libre puis hydrolyse de la fraction protéique par 6M HCl + 2% thioglycolic acid (110 °C, 24h), filtration de l'hydrolysate et ajustement du pH entre 1 et 2.	Aucune	EZ:faastTM Cf Esterhuisen and Downing (2008)	Phenomenex AAA-MS 250mm x 2.0 mm amino acid analysis column	QtrapMS/MS	aucun	tr?, m/z?	?	?	?	NON	NON	
Esterhuisen., 2008	cyanobacteries	Centrifugation des cultures, lyophilization(1 nuit). BMAA extraite (20–500mg DW) par sonication avec 0.1M TCA(V?)X2. Hydrolyse du culot par 6M HCl and 2% thioglycolic acid (110 °C, 24h).	"derivatization requires a concentration step on a proprietary sorbent medium"	Phenomenex EZ:faastTM (chloroformate derivative)	GC (ZB-AAA 10m_0.25mm amino acid analysis GC column)	MS	norvaline	tr (3.95 min) et m/z 130.2	?	LOD 0.0042 nmol and LOD 0.084 nmol on column LOD 0.0252 nmol en presence des 20 aa.		NON (spectre en matrice different de spectre étalon)	NON	cf diapo. Identif MS?!?

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Faassen et al., 2012	Graines de cycas Cyanobactéries	5 mg échantillon (0,5 mg graines cycas) extrait 2 fois dans 300 µl TCA 0,1N. Extraits regroupés et lyophilisés avant analyse (avec ou sans dérivation) 1 mg lyophilisat (0.5 mg graines cycas) hydrolysé avec HCl 6N (20 h à 105°C)	Aucune	AQC	Cond. 1 : Nova-Pak C18 (300 × 3,9 mm, 4 µm) Cond. 2 : Zorbax Eclipse AAA (75 × 4,6 mm, 3,5 µm) Cond. 3 : ZIC-HILIC 150 × 2,1 mm, 5 µm) avec pré-colonne (Direct connect filter)	Cond. 1 : LC-FLD Cond. 2 : LC-MS/MS (avec dérivation) Cond. 3 : LC-MS/MS (sans dérivation)	Aucun	tr Cond. 1 (FLD) : λ exc 250 nm, λ em 395 nm Cond. 2 : BMAA m/z 459, ions fils m/z 171, 145, 119 DAB m/z 459, ions fils m/z 315, 171, 145 d3-BMAA m/z 462, ions fils 171, 145, 122 Cond. 3 : BMAA m/z 119.1, ions fils 102.1, 88, 76 DAB m/z 119.1, ions fils 101.1, 74 d3-BMAA m/z 122.1, ions fils 105.1, 88, 76		Cond. 1 : après hydrolyse LD = 40 µg/g, LQ = 120 µg/g Cond. 2 : sans hydrolyse LD = LQ = 1,0 µg/g après hydrolyse LD = LQ = 10,0 µg/g Cond. 3 : sans hydrolyse LD = LQ = 0,4 µg/g après hydrolyse LD = LQ = 1,6 µg/g	Cond. 1 : réponse linéaire jusqu'à 1000 µg/L (R2=0,999) Fidélité : répéta 2,8 %, repro 4,6 % Cond. 2 : réponse linéaire jusqu'à 500 µg/L (R2=0,999) Fidélité : répéta 3,0 %, repro 5,0 % Cond. 3 : réponse linéaire jusqu'à 500 µg/L (R2=0,999) Fidélité : répéta 0,7 %, repro 1,9 %	OUI Cond. 3 (ZIC-HILIC)	OUI	
Faassen, 2013	Cyanobactéries	BMAA libre : 5 mg + 300 µl 0.1 N TCA, centrifugation X2. surnageant lyophilisé puis repris par 600 ml eau (ajustée à pH 7, NaOH). BMAA totale : 1 mg + 6 N HCl (20 hours, 105°C), séchage, reprise par 500 ml	Aucune	Aucune	ELISA		comparaison avec LC/MS (ZIC HILIC); D3BMAA, m/z 119.1; 102.1, m/z 88, 76				mise en évidence de beaucoup d'effets de matrice et de faux positifs par l'étude d'échantillons dopés	NON	NON	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires	
		eau (ajustée à pH 7, NaOH). Deux extraits redilué X5 ou X10 eau.													
Fan et al., 2014	Cyanobactéries, cycas	<p>Cyanobactéries : BMAA libre : cellules extraites une 1ère fois avec 6 mL de MeOH aqueux 75 % puis avec 3 mL de la même solution. Surnageants combinés évaporés à sec et repris dans 1 mL de sol HCl 20mM</p> <p>BMAA liée : extraite du culot de cellules avec HCl 6M (24h à 110°C)</p> <p>Cycas : BMAA libre : 1g de tissus (racine, tige, feuille) extrait avec 5 mL de MeOH aqueux 75 %, évaporé à sec et repris dans 1 mL HCl 20mM</p> <p>BMAA liée : culot extrait avec 3mL HCl 6M (24h à 110°C)</p>	Cartouche Oasis MCX (3 cc, 60 mg)		Colonne HILIC TSKgel Amide-80® (250 mm x 2 mm ; 5 µm)	LC-MS/MS	aucun	<p>tr</p> <p>5 transitions : m/z 119>102, 101 (DAB), 88 (BMAA), 56 et 44</p> <p>Quantification BMAA (m/z 119>102) et DAB (119>101)</p> <p>Ratio ions</p>		LD matrice (dopage) : BMAA 2 pg et DAB 5 pg		OUI	Distinction des différents isomères sur la base du tr et des ions spécifiques (y compris pour l'AEG évoqué dans les résultats)	NON	Seule la LD a été évaluée. Aucune info sur les rendements d'extraction
Field et al., 2013	Crabe bleu	Tissus lyophilisés reconstitués avec de l'eau DirectQ . Concentration 120 mg tissu/mL pour la chair des pinces et 74 mg/mL pour les autres organes. Mélanges chauffés à 100°C pdt 16h,						(Banack et al., 2011)				OUI	NON		

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
		puis refroidis et centrifugés. 1 vol surnageant hydrolysé avec 1 vol HCl 12M et culot avec HCl 6M à 110°C pdt 16h. Evaporation à sec d'un volume donné de chacun des hydrolysats et resuspension dans HCl 20 mM												
Hammerschlag et al., 2016	Sharks	<p>Cond. 1: 50 mg éch de nageoire de requin hydrolysés avec HCl 6M (ratio 1:8, w/v ; 18h à 110°C). Hydrolysats centrifugés puis évaporés à sec et repris dans TCA 0,1M. Partition CHCL3 pour éliminer les lipides, évaporation à sec et reprise dans 1 mL HCl 20 mM</p> <p>Cond. 2: 50 mg éch de nageoire de requin hydrolysés avec 1 mL HCl 6M (18h à 110°C) dans une ampoule remplie N2 et scellée. 100 µL évaporés et repris dans 1.0 mL 20 mM HCl</p>		<p>Cond.1 : AccQ-Fluor</p> <p>Cond.2 : AccQ-Taq</p>	<p>Cond.1 : colonne Nova-Pak C18 (3.9 x 300 mm)</p> <p>Cond.2 : colonne BEH (150 x 2.1 mm 1.7 µm)</p>	<p>Cond.1 : LC-FLD</p> <p>Cond. 2: UPLC-MS/MS</p>	aucun	<p>tr</p> <p>Cond.1: λ exc = 250 nm et λ em = 395 nm</p> <p>Cond.2 : Transitions communes BMAA, DAB et AEG : 459>119, 171 et 289</p> <p>Suivi transitions spécifiques : BMAA 459>258, DAB 459>188 et AEG 459>214</p>	<p>Cond.1 : 88% (BMAA)</p> <p>Cond.2 : ?</p>	<p>Cond.1 : LD=2,7 et LQ=7,0 ng (BMAA)</p> <p>Cond.2 : ?</p>	OUI confirmati on LC-MS/MS avec suivi des transitions spécifiques	NON pas d'info concernant les performances de la méthode UPLC-MS/MS (cond. 2)		
Glover et al, 2015	Produits alimentaire naturels contenant cyanobactéries	HCl 6N	Aucune	AccQ-Fluor		CL-MS/MS	D ₃ ¹⁵ N ₂ -BMAA	tr, ions 3 ions : 459>119 & 459>171 lons	BMAA 105- 107% en fonction de la concentration	LD : 0,187 ng/ml LQ : 0,746	Validation intra-laboratoire BMAA, DAB et AEG	OUI pour BMAA, DAB & AEG	OUI (rend BMAA, DAB & AEG), LD & LQ colonne, étal	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
	(comme additifs).							spécifiques BMAA 459>258.1 ; DAB 459>188 ; AEG 459>214.1 D ₃ ¹⁵ N ₂ - BMAA (IS) 469>124 et 469>171	DAB 98- 129% AEG : 102- 116%	ng/ml			int BMAA	
Jiang et al, 2014a, b	Diatomées Dinoflagellés	HCl 6N	Aucune	AccQ-Tag	Ultra C18	CL-SM/SM	D ₃ BMAA	tr, ions (459 > 119, <u>258, 188 et 214</u>) et ratios (<u>119/258 ±10%</u>)	63,3% (via dopage à 3 niveaux avec BMAA avec D3BMAA (selon Jiang et al, 2013))	LD = LQ - cyanobac : 0,1 µg/g (selon Jiang et al, 2013)		OUI pour BMAA, DAB & AEG	OUI (rend, LD , LQ), étal int BMAA	
Jiang et al., 2013	Comprimés de spiruline Cyanobactéries	2 mg lyophilisat cyanobactérie (ou comprimé) dans 500 µl de 80 % (v/v) méthanol aqueux. Evaporation à sec puis reprise dans 600 µl HCl 6M (110°C pdt 20 h). Evaporation à sec et reprise dans 550 µl eau Milli-Q. Partition liquide-liquide avec 1 ml chloroforme. Récupération de 500 µl de la phase aqueuse et ajout de 500 µl acide formique 0,2 % (v/v)	Isolute HXC-3, 100 mg	Précolonne : AQC Post-colonne : acide acétique 0,3% dans ACN	ACCQ-TAG ULTRA C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 µm)	LC-MS/MS	d3-BMAA	tr Identification: Tous 459.18>119.08 BMAA/BAMA A 459.18> <u>258.09</u> AEG 459.18> <u>214.10</u> DAB 459.18> <u>188.08</u> Quantification: BMAA 459.18>119.08 D3-BMAA 462.20>122.		LD=LQ= 0,1 µg BMAA/g (comprimé de spiruline)	Justesse : 103-105% Fidélité : répéta 3-6%, repro 1-6% Rendement récupération 63,3 % (pour 1.25 µg BMAA/g comprimé) Augmentation du signal de 18 % pour la BMAA en comprimé	OUI	OUI	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
								10						
Jiang et al., 2013	Cyanobactérie (Leptolyngbya)	80% MeOH Puis HCl 6M (total) et LLE	HXC-3	AQC	Ultra C18	CL-SM/MS	D ₃ BMAA	tr, ions (459 > 119, 258, 188 et 214) et ratios (119/258 ±10%)	63,3% (via dopage à 3 niveaux avec BMAA avec D3BMAA)	LD colonne : 4,2 fmol (0,5 pg) LD = LQ - cyanobac : 0,1 µg/g	Stratégie pour quantifier BMAA à l'état de traces. Addition post-colonne de l'acide acétique 0,3% dans acétonitrile à 600 µL/min combiné avec le débit de l'UPLC, résulte un débit de 800 µl/min vers la SM	OUI pour BMAA, DAB & AEG	OUI (rend, LD, LQ), étal int BMAA. Validation interne (linéarité, précision, justesse).	
Jiao et al., 2014	Mollusques, crustacés, poissons	15 mg lyophilisat extrait avec 2 mL TCA 0,1M, centrifugation puis évaporation sous N ₂ et repris dans HCl 20 mM (--> BMAA libre) Culot hydrolysé avec HCl 6M (24h à 110°C). Hydrolysat filtré puis évaporé à sec et repris dans HCl 20 mM (--> BMAA liée)		AQC (kit AccQ-Tag)	Colonne XDB-C18 (4.6 × 100 mm, 5.0-µm)	LC-MS/MS	Aucun	tr ion parent BMAA m/z 459,1 ions fils m/z 119,1 ; 171,1 ; 188,0 ; 258,0 ; 289,1	Ech lyophilisés spikés puis extraits Poissons : 81.5% (78.2% à 85.6%),		fidélité "run-to-run" (répéta ? Repro ?) BMAA : CV 5,3%	NON Aucun chromatogramme (temps de rétention) ni info concernant le fait que l'ion fils spécifique de la BMAA (m/z 258) a été monitoré en priorité	NON	
Johnson et al, 2008	Cyanobactéries (Nostoc)	HCl 6N	Aucune	AQC	1. Nova-Pack C18 / CL/FLD 2. Water Acquity UPLC/MS & UPLC/UV	CL-MS/MS CL-MS CL- FLD	Aucun	459 > 289 > 171 > 119, 258, 188		0,065 nmol 0,65 nmol	Etant donné qu'on prend pas en compte le rendement d'extraction dans les données occurrences,	OUI BMAA & DAB	NON (juste LD et LQ ds colonne)	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
											pourquoi l'absence de ce paramètre est éliminatoire!!!			
Jonasson et al., 2010	Cyanobacteries, zooplancton, poissons et mollusques	MeOH 80% HCl 6M (totale)	Isolute HXC-3	AQC	Hypersil Gold C18	CL-SM/SM	Aucun	tr et ions (459>119, 258, 188)		LD : 70 fmol BMAA standard (S/N : 9,2) ; 700 fmol (DAB) (S/N : 8) (8.3 pg) /	Méthode utilisée selon Spacil Z, et al. (2010) Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples . Analyst (Lond) 135:127–132 (même labo qua Jonasson S.). Spacil a validé la méthode (répéta, repro, n = 6 , seulement avec les standards BMAA & DAB), En fait, pas de validation dans la matrice (c'est pourquoi, on n'a pas rendement extraction, ni LD & LQ matrice) En plus du papier, données supplémentaires fournies (Chromato MBAA & DAB)	OUI pour BMAA & DAB	NON (seulement LD ds colonne, ni rend ni LD/LQ matrice)	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Karlsson et al, 2014 (Toxic letters)	Tissues	10 mg of tissue + 400 µl water + 10 µl of d3-BMAA (100 ng/ml) + ultrasonication (3 min), freezing/thawing twice, precipitation with 1.6 ml cold acetone at (-20°C overnight), centrifugation (4°C, 5 min), the protein pellet was immediately separated from the supernatant. The pellet was first rinsed with 200 µl cold acetone and precipitation with 1.8 ml 10% TCA (30 min on ice) for two cycles. The pellet was then dissolved in 750 µl 6 M HCl solution and incubated in an oven (110°C, 20 h) to release the protein-associated BMAA by hydrolysis. The hydrolysate was filtered using a centrifugal filter for 1 min and then dried at 70°C.	<u>Only for hydrolyzed extract:</u> the dried samples were cleaned by liquid-liquid extraction using Milli-Q water and chloroform and by solid phase extraction (SPE) as previously described (Jiang et al., 2013) before derivatization with the AQC reagent.	The supernatant was evaporated overnight, dried at 70°C in a Speedvactor and derivatized with 6-AQC to determine free BMAA in the samples.	ACCQ-TAGTMULTRA C18 column (100 mm x 2.1 mm, 1.7-µm particle)	MS		SRM transition (459.18 > 119.08) and three diagnostic SRM transitions (459.18 > 258.09 for BMAA and BAMA, 459.18 > 188.08 for DAB, and 459.18 > 214.10 for AEG)		rats The LOD and LOQ for the analytical method was estimated to be below 0.02 ng BMAA/mg wet weight of brain tissue (S/N = 40 for the transition 459.18 > 258.09 from BMAA derivatives) - après ou avant dérivatation?? ??	BMAA at 459.18 > 258.09 was used to determine the LOD and LOQ (BMAA spiked in real samples at 20 ppb)	OUI	NON	quantification of BMAA using d3-BMAA as an internal standard, two SRM transitions (459.18 > 119.08 for BMAA and 462.20 > 122.10 for d3-BMAA) -

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Karlsson 2015 (Scientif report)	Tissues	cf Karlsson 2014	cf Karlsson 2014	cf Karlsson 2014	cf Karlsson 2014	cf Karlsson 2014		The identification of BMAA was ensured by four criteria, namely 1) the chromatographic retention time; 2) precursor ion isolated in Q1 at 459.18 (m/z) for BMAA and its isomer AQC derivatives; 3) diagnostic product ions isolated in Q3 at 258.09 (m/z) for BMAA and BAMA, 188.08 (m/z) for DAB, and 214.10 (m/z) for AEG; and 4) peak area ratio between general product ion at 119.08 (m/z) for BMAA and its three isomers, and their diagnostic product ions. The		The LOD and LOQ for the analytical method were estimated to be below 0.01 ng BMAA/mg wet weight of brain tissue (based on S/N > 3 for transition 459.18 > 258.09 and S/N > 10 for transition 459.18 > 119.08, respectively)		OUI	NON	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
								quantification of BMAA was monitored simultaneously by using the peak area ratio of the transition 459.18 > 119.08 (m/z) from BMAA and 462.20 > 122.10 (m/z) from d3-BMAA, and then comparing this ratio generated from a sample and from a standard solution (100 ng/ml BMAA and d3-BMAA) as one-point calibration						
Kisby et al 1988	cycas, LCS, serum	TCA 10%	ELL pour éliminer l'excès de FMOC	FMOC	LC/Fluo Novapack C18	Fluo (254 nm, 315 nm)	-	tr	-	-	injection d'autres acides aminés	NON	NON	BMAA libre, rien ne peut dire que ce n'est pas de la DAB ou un autre AA

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Krüger et al., 2010	Cyanobactéries et compléments alimentaires	TCA 0.1M HCl 6 M poolés	Aucune	Aucune	Luna C18 HILIC	HILIC-SM/SM	Aucun	tr et ions (119 > 102, <u>88, 76, 101, 74, 56, 44</u>)	BMAA 80 - 94 % (libre) 71 - 88 % (liée) DAB 90 - 93 % (libre) 79 - 98 % (liée)	LD - BMAA ds cyano : 1 µg/g LD BMAA ds semences Angiosperms : 0,14 µg/g LD - DAB dans cyanobac : 0,06 µg/g. LD - DAB ds semences angiospermes : 0,008 µg/g. Toutes LD avec S/N : 3	Absence de BMAA dans 62 souches de cyanobactéries de différentes origines. Sauf <i>Cycas revoluta</i> (6,69 µg/g BMAA libre Reproductibilité et stabilité du temps de rétention BMAA & DAB dans différentes matrices	OUI pour BMAA, DAB & AEG	OUI (rend pour BMAA et DAB sous les formes libres et liées), LQ pour BMAA et DAB	
Kubo et al., 2008	Cyanobactéries	HCl 0,1 M	MCX	Aucune	TSK-gel Amide-80	HILIC-SM	Aucun	tr et ion 119,1	80 - 90 % (via dopage)	/ 0,5 ng (S/N = 5)	Méthode LC/SIM linéaire	NON : détection en mode SIM, pas de transition	NON à défaut de critères qualitatifs	
Lage et al., 2014	Coques (<i>Cerastoderma edule</i>) Dinoflagellé (<i>Gymnodinium catenatum</i>) Poudre de spiruline	2 mg dans 1 mL 20% methanol aqueux, sonication, centrifugation. Surnageant transféré dans un tube contenant 2 fois le vol d'acétone froid. Précipitation tte la nuit à -20°C puis centrifugation Culot lyophilisé puis hydrolysé avec 600 µL de HCl 6M (20 h à 110°C), Elimination de l'acide à froid et résidu sec repris dans HCl 20 mM	Aucune	AQC	AccQ-Tag Ultra C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 µm)	LC-MS/MS	Aucun	tr BMAA m/z 459.1, ions fils m/z 119.1, <u>258.1</u> DAB m/z 459.1, ions fils m/z 119.1, <u>188.1</u> AEG m/z 459.1, ions fils m/z 119.1, <u>214.1</u>		LD = LQ = 0,05 ng pour les coques et la spiruline	Effets matrices plus importants observés pour les coques mais pas évalués	OUI	NON	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Lage et al., 2015	Eau, poissons	Extraction selon Spacil et al. (2010) avec modifications mineures	Isolute HXC-3, 100 mg	AQC (kit AccQ-Tag)	Colonne AccQ-Tag Ultra C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 µm)	LC-MS/MS	D3-BMAA	tr (BMAA : 2.85 ± 0.12 min) BMAA : m/z 459,1 ; ions fils m/z 119,1 ; <u>258,1</u> Ratios d'ions (119,1/258,1) : 5.5 ± 1.0 D3-BMAA : m/z 462,2 > 122,1 DAB : m/z 459,1 ; ions fils m/z 119,1 ; <u>188,1</u> AEG : m/z 459,1 ; ions fils m/z 119,1 ; <u>214,1</u>	D3-BMAA (SPE+AQC) : 54.9 ± 2.0% (cerveau) et 14.3 ± 3.5% (muscle) après dopage échantillons non contaminés D3-BMAA dans éch. environnements : 34.3 ± 6.2% pour le cerveau et 10.7 ± 7.5% pour les muscles	LD BMAA (m/z 258,1) et LQ (m/z 119,1) déterminées sur la base du rapport S/N Poissons (muscles et cerveau) : LD=LQ=0,8 ng/mL (car pas même ions fils suivi)	Effets matrices observés mais pas rapportés	OUI	NON Rendements faibles dans les échantillons environnements et pas de mentions d'une éventuelle correction des résultats ou non	
Lage et al, 2016	Mise au point méthode Cyanobactérie et diatomée	1. MeOH 80% HCl 6N 2. MeOH 20% & acétone extraction (précipitation protéines) Avec et sans hydrolyse HCl 3. TCA avec et sans hydrolyse HCl 6N	1. Avec et sans SPE (HCX3)	AccQ-TagUPL	Ultra C18	CL-MS/MS	Aucun	tr, ions 3 ions : 459.1 > 119.08 Ions spécifiques BMAA 459.1 > 258.09 ; DAB 459.1 > 188.1 ; AEG 459.1 > 214.1 Ration 119.08/258.09 contrôlé	80 – 140 % (méthode 3 (en fonction de la concentration))	LD = LQ : 0.8 ng/ml	Test de 3 méthodes d'extraction puis validation avec la méthode 3. TCA avec et sans hydrolyse HCl 6N (meilleure)	OUI pour BMAA, DAB & AEG	OUI (rend LD & LQ dans colonne : standard)	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Li, 2012	Cyanobactéries	Adapté de Spacil et al. (Analyst 2010): cyanobacteries + 6 mL 75/25 MeOH/H2O= ultrasons (15 min), x2. Fraction protéique hydrolysée par 0.8 mL of 6 M HCl (110 °C, 24 h) avec un traitement supplémentaire du solide par 75%MeOH pour bien récupérer la BMAA	Oasis-MCX (60 mg,) and Strata-X-C (200 mg). Procédure optimisée amélioration/ Kubo et al (Toxicon 2008) par ajout d'un lavage à HCl	Aucune	HILIC TSK Gel c250 x 2 mm, 5 µl injecté	Qtrap MS	etalonnage en matrice	tr et m/z : 119>102, 119>101, 119>88 pour BMAA, 119>102, 119>101,119 >74 pour DAB, 88>72 pour BMAA et inverse pour DAB	> 66 % DAB, >69%BMAA en matrice hydrolysée ou non	LOD ; 0,38 and 1,9 µg/L respectivement (soit 1.9 et 9.5 pg) sur colonne	presence d'un épaulement sur le pic de la BMAA qui laisse penser aux risques de faux positifs en LC/Fluo en dépit d'un clean-up. Mise en évidence de pb de suppression d'ions liés à la présence de lysine, histidine arginine dans les échantillons. Presence dans strata X d'un composé avec tr > DAB et m/z 119>102, 119>101 avec des ratios différents	OUI	OUI car étalonnage en matrice	
Li et al, 2012	Cyanobactéries	HCl 12M	SPE	AQC	ZIC-HILIC	CL/SM CL-SM/SM	Aucun	tr, ions 459>119 ; 459>171 459>289 119>102	80 – 90%	LD : 2 pg LQ : 10 pg LQ : 2,5 ng/g poids frais (50 en poids sec)		NON : transitions non spécifiques	NON (rend, LD & LQ mais qualitatif négatif)	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Li et al., 2016	Mollusques (29 espèces et 28 genres différents)	1 g homogénat extrait 3 fois avec TCA 0,1 M (-> toxines libres) Culot extrait avec HCl 6M (24h à 110°C) pour les formes liées des toxines. Extrait dilué 20 fois avec de l'eau	Cartouche Oasis MCX (3 cc, 60 mg)		Colonne HILIC TSK Gel Amide-80 (250 x 2 mm; 5 µm)	LC-MS/MS	Aucun	tr (variations observées entre étalons et échantillons dopés ou naturellement contaminés) 5 transitions : m/z 119 > 102, 101, 88, 56 et 44 Quantification BMAA (119 > 44), DAB (119 > 101) et AEG (119 > 102)		LD colonne : BMAA (154 pg), DAB (6,7 pg) et AEG (52 pg) LD matrice : BMAA (0,31 µg/g), DAB (0,013 µg/g) et AEG (0,10 µg/g)		OUI Toutes les transitions suivies ne sont pas spécifiques de la BMAA et de ses 2 isomères mais ajouts dosés réalisés pour suivre la variation des temps de rétentions selon les matrices	NON Uniquement détermination de la LD, pas d'info sur les rendements d'extraction et pertes rapportées lors de la SPE	
Masseret et al., 2013	Moules, huitres	Hydrolyse avec HCl 6M (16h à 110°C), Evaporation à sec puis reprise dans 20 mM HCl		AQC (kit AccQ-Tag)	Colonne AccQTag Ultra (100 x 2.1 mm)	LC-MS/MS	Aucun	tr ion parent BMAA & DAB m/z 459 ions fils m/z 119, 171, 188, 214, 258, 289 Ratios ions 289/171 et 119/171		BMAA : LD=0,0065 et LQ=0,013 pmoles/inj DAB : LD=0,0013 et LQ=0,013 pmoles/inj	Linéarité BMAA et DAB testée sur la gamme 0,015 - 10,5 µg/L Répéta BMAA (459>171) CV 6,3% à 1,5 µg/L Répéta DAB (459>171) CV 6,4% à 1,5 µg/L	NON (bien que les ions fils spécifiques de la BMAA et du DAB soient dans la liste, les auteurs ne semblent pas leur avoir accordé une importance particulière)	NON (quantifiée basée sur les ions non spécifiques de la BMAA et du DAB)	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
McCarron et al., 2014	Comprimés de spiruline, cyas	10 mg (+ 20 µL d3-BMAA) dans 1 mL HCl 6M (110°C pdt 18 h).Evaporation à sec et reprise dans 1 mL HCl 2 mM	Aucune	AQC (Cond. 1)	<p>Cond. 1 : Thermo Hypersil Gold C18 (50 × 2 mm, 1.9 µm)</p> <p>Cond. 2 : TosohBioscience TSK-gel Amide-80 (250 × 2 mm, 5 µm)</p>	<p>Cond. 1 : RPLC-MS/MS</p> <p>Cond. 2 : HILIC-MS/MS</p>	d3-BMAA	<p>tr</p> <p>Cond. 1 : BMAA m/z 459.1, ions fils m/z 119.1, 171.1, 289.1, <u>258.1</u> DAB m/z 459.1, ions fils m/z 119.1, 171.1, 289.1, <u>188.1</u> AEG m/z 459.1, ions fils m/z 119.1, 171.1, 289.1, <u>214.1</u> d3-BMAA m/z 462.2, ions fils m/z 122.1, 292.2</p> <p>Cond. 2 : BMAA m/z 119.1, ions fils m/z 102.1, 101.1, <u>88.1</u> DAB m/z 119.1, ions fils m/z 102.1, 101.1, <u>74.1</u> AEG m/z 119.1, ions fils m/z 102.1, 101.1 d3-BMAA m/z 122.1, ions fils m/z 105.1, 88.1</p>		<p>Cond. 1 : LD = 80, 36 et 211 ng/g (dw) pour BMAA, AEG et DAB</p> <p>Cond. 2 : LD = 93, 44 et 205 ng/g (dw) pour BMAA, AEG et DAB</p>		OUI (ions spécifiques suivis)	NON	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Meneely et al, 2016 (scientific report)	Cerveau	25 mg of lyophilised tissue was spiked with 25 µ L of (D3-BMAA (4 µ g/mL). 400 µ L Milli-Q water was added and the sample sonicated for 15 min in an ice water bath. The homogenate was mixed with 1.6 mL of ice-cold acetone, kept on ice for 30 min for precipitation, centrifuged for 5 minutes and the protein pellet separated from the supernatant. The supernatant was evaporated under nitrogen at 80 °C and the residue derivatized to determine free BMAA in the samples. For protein-bound BMAA, the pellet was rinsed with 200 µL of cold acetone to and protein precipitation was performed with 1.8 ml 10% TCA (30 minutes on ice) for two cycles. The sample was spiked with 25 µ L of the internal standard (D3-BMAA, 4 µ g/mL). Release of protein-bound	Sample clean-up (for hydrolyzed samples) was based on the method described by Jiang <i>et al.</i> ABC 2013 The residue was reconstituted in 550 µL of Milli-Q water and liquid-liquid extraction performed using 1 mL of chloroform. The sample was mixed for 5 min, centrifuged 3 min. 500 µL of the aqueous layer was transferred to 500 µL of 0.2% (v/v) formic acid in water added prior SPE (Isolute HCX).	dry residue + 250 µ L of 0.2 M borate buffer (pH 9.5) + 250 µ L dansyl chloride (DNS) (10 mg/mL in acetone) added = vortexed in a water bath (60 °C, 1 h).	Aquity UPLC BEH C18 column	MS	D3-BMAA	Tr et transition 585>170	environ 100%		The parameters assessed were linearity, specificity, intra- and inter-day precision, recovery, absolute recovery, the decision limit (cc α) (limit of detection, LOD) and the detection capability (cc β) (limit of quantification, LOQ)	NON	NON	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
		BMAA was achieved by the addition of 600 µL 6 M HCl (110 °C, 17 hours). The hydrolysate was centrifuged for 5 min and dried under nitrogen at 80 °C.	The eluate was dried under nitrogen at 50 °C, and derivatized.											
Metcalfe et al., 2008	cyanobacteries	Cyanobactéries (20 mg DW) extraites selon Banack and Cox (neurobiology 2003). Hydrolyzed (HCl 6 M 110°C 16h)	Aucune	AQC	LC/fluor: Luna C18, gradient; LC/MS (TQ) Hypersil gold en gradient (different)	Fluo (250/395 nm), m/z 459>119, 459>171, 459>289	aucun	tr ajout dosé (+ 50 ng), m/z 459 sur plusieurs injections HPLC et analyse LC MS mais sans comparaison avec étalon ou ajout dosé (tr?)		LDD: 0.065 mmol (7.7 ng) on column	étude les rapport des intensités des ions en milieu réel mais pas de comparaison avec le milieu pur, ion choisi non spec de la BMAA: risque isobarique	NON	NON	
Mondo et al, 2012	Ailerons de requin	HCl 6N	Pour FLD : partage liquid/liquid de TCA / Chloroforme	AQC	Nova-Pack C18	CL/FLD CL-MS/MS	Aucun	tr, ions (459 > 289 > 171 > 119, <u>258</u> , <u>188</u> et <u>214</u>)	FLD : 88%	FLD : LD = 2,7 ng ; LQ = 7 ng		OUI BMAA, DAB & AEG	NON (aucun critère relatif à la LC/MS/MS)	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Mondo et al, 2014	Cartilage de requin	HCL 6N	Aucune	AQC	FLD / Nova Pack C18 LC-MS/MS - BEH C18	CL/FLD UPLC-MS/MS	Aucun	tr(0,23%), ions (459 > 289 > 171 > 119, <u>258</u> , <u>188</u> et <u>214</u> ratio BMAA (119/258 ± 7,8%)	96±6 % / FLD (Dopage)	LD / LQ LC-FLD: 2,8 ng / 8,4 ng LD LC-MS/MS: BMAA 1,1 pg/µL DAB 0,8 pg/µL AEG 1,2 pg/µL Lower-upper LQ: BMAA 0,2-600 pg/µL DAB0,2-200 pg/µL AEG 0,2-600 pg/µL	Les 2 méthodes ne sont pas caractérisées de la même manière, mais confirmation des résultats FLD par LC-MS/MS	OUI pour BMAA, DAB et AEG	OUI (linéarité, précision, ratio d'ions)	
Murch et al, PNAS 2004	cerveau (alzheimer), farine de cycad	Echantillon (mg?) 2x 0.1M TCA (volume?), centrifugation, récupération du surnageant et hydrolyse des protéines 6 M HCl (110°C, 24h)	C18 sur extrait hydrolisé à 20mM HCl par lavage séquentiel '(?)	AQC	Nova-Pak C18 column at 37°C. isocratique ACN/eau	Fluo (250/395 nm), DAD (254 nm), MS (m/z?)	Aucun	Aucun	?	?		NON	NON	
Murch, Acta Neur, 2004	frontal gyrus tissue of patient (guam, canada)	150 µg tissue x2 0.1 M TCA (V?), centrifugation, récupération du surnageant et hydrolyse des protéines 6 M HCl (110°C, 24h)	C18 sur extrait hydrolisé à 20mM HCl "par lavage séquentiel "(?)	AQC	Nova-Pak C18 column at 37°C., isocratique ACN/eau	DAD (254 nm) et MS (m/z?)	Aucun		>96% (calcul?)	0.0001 and 0.013 µmol		NON	NON	aucune comparaison chromatographique standard/reel, spectre de ms? m/z? données MS?

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Niedzwiadek et al., 2012	Crevettes, poissons	1,0 g d'échantillon extrait avec 6 ml de TCA 0,3 M. Après centrifugation, le culot est extrait de nouveau avec 3 mL TCA puis centrifugé. Mélange des 2 surnageants, volume complété à 10 mL avec de l'eau. Purif SCX Culot de poisson hydrolysé avec 5 mL HCl 6M pdt 20 h. Transfert de la solution dans un autre tube rincé avec 2 x 2,5 mL d'eau. Eaux de rinçages ajoutées à l'hydrolysat. Purif sur C18 puis SCX	C18 SPE (500 mg/3 ml) Strata SCX (500 mg/3 ml)	FMOC	Pré-colonne Zorbax C18 (12.5 x 4.6 mm, 5 µm) Supelcosil LC-18, (150 x 4.6 mm, 5 µm)	LC-FLD	Aucun	tr λ exc = 254 nm et λ em = 315 nm	70,6 à 113% BMAA libre dans les crevettes 66,9 à 72,7% BMAA liée dans les crevettes 68,2 à 84,1% BMAA liée dans le poisson	LD BMAA libre matrice crevettes = 0,3 µg/g LQ BMAA libre matrice crevettes = 1,0 µg/g LQ BMAA liée matrice crevettes = 5,0 µg/g LQ BMAA libre et liée matrice poissons = 2,0 µg/g		NON	NON	
Pablo et al, 2009	Cerveau / autopsie de malades confirmés (alzheimer, ALS, Huntington)	TCA 0,1 M (élimination acides aminés (BMAA libre??). Hydrolyse du pellet avec HCL 6M à 110°C	Ultrafiltration 15800 g	AQC	Nova-Pak C18 (3,9x300 mm). Hypersil 100x2,1 mm	LC/FLD & LC-MSMS	Aucun	tr exc = 254 nm et em = 395 nm. BMAA m/z 459, ions fils m/z 119, 171, 289	95% ± 3,6	LD = 2 ng sur colonne. LQ = 10 ng dans matrice cerveau	linéarité	NON	NON	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires	
Perry et al., 1989	Foies et cerveaux de rats	Foies et cerveaux homogénéisés puis déprotéinés avec 0,4 M HClO4	Analyse selon la méthode de Perry et al. (1968)										NON Analyse des acides aminés par méthode peu spécifique	NON	
Pip et al., 2016	Eau, cyanobactéries	Toxines extraites après 4 cycles de congélation/décongélation				ELISA	Aucun	Réaction antigène/anticorps Anticorps dirigé contre la BMAA (100% réactivité; 0,02% réaction croisée avec le dihydrochlorure de DAB; pas d'info concernant l'AEG). Données Abraxis				NON Aucune info concernant la réaction croisée avec l'AEG	NON		

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Reveillon et al, 2014 ; 2015 ; 2016a, b	Cyanobactéries, diatomées, dinoflagellés, mollusques bivalves	TCA 0,1M HCl 6M (total)	PCX	Aucune	ZIC-HILC	UPLC-SM/SM	D ₃ BMAA D5DAB	tr et ions 119 > 102, <u>88</u> , <u>76</u> ; <u>101</u> , <u>74</u>	BMAA 64 – 71% DAB 63 - 67%	15 pg (LOD/LOQ) 0,22 µg/g DW (microalgues) et 0,15 µg/g DW (mollusques)	Méthode caractérisée : linéarité, répétabilité, effet matrice, standard interne, LD, LQ dans microalgues & mollusques, ratio ions, Interférent BAMA (seul papier qui prend en compte la BAMA, épaulement du BMAA, sur-estimation avec transition 119>102, d'où ration d'ions 76/88 pour identifier forme BMAA, et quantifier avec m/z 88 ou 76)	OUI pour BMAA & DAB	OUI (rend, LQ & LD), étal int BMAA & DAB	
Rosen et al., 2008	Compléments alimentaires (CA), graines de cycas, cyanobactéries	10 mg (dw) dopés avec d3-BMAA. Extraction avec TCA 0,1M (2 × 300 µL) ou 70% (v/v) ACN aqueux (2 × 300 µl) ou 50% (v/v) EtOH aqueux. Hydrolyse acide avec 300 µL HCl 6M pour la BMAA liée (17 h à 110 °C). Evaporation HCl et reprise dans 600 µL eau	Aucune	Aucune	ZIC - HILIC (50 × 2.1 mm ou 150 × 2.1 mm, 5 µm)	LC-MS/MS	d3-BMAA	tr MH+ m/z 119, ions fils m/z 102, <u>88</u> , <u>76</u> , 73, 44		LD <1 mg/g pour BMAA libre et <4 mg/g for BMAA liée dans les CA	Justesse (cyanobactéries) - BMAA libre : 95-104% - BMAA liée : 99 - 109% Fidélité (cyanobactéries) - BMAA libre : 2-6% - BMAA liée : 1-6%	OUI	OUI	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Rosén et al., 2016	Moules	100 mg homogénat de moules dopé avec BMAA-d3 extrait avec 500 µL 0,1 N TCA, congelé sous N2-décongelé 3 fois. Ajout de 500 µL 0,1 N TCA, vortex 2h, centrifugation puis évaporation surnageant avant reprise dans HCl 20mM	Aucune	Non	Colonne Amide BEH (2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm) et précolonne (2.1mm × 5 mm) de même nature	LC-MS/MS	BMAA-d3	tr BMAA-d3 MH+ m/z 122, ions fils m/z 47, 76, 88 et 105 BMAA MH+ m/z 119, ions fils m/z 44, 73, 76, 88 et 102		LD en matrice = 0,025 µg/g (S/N > 3)	Validation pour des concentrations de 0,15 à 4,4 µg/g (ajouts dosés) Répétabilité (n=6) : CV 1,7 à 8,2% Justesse : 99 - 105% (cond. répéta)	OUI	OUI	
Rosen et Hellenas 2008	Cyanobactéries et graines de cycas	TCA 0,1 M HCl 6 M	Aucune	Aucune	HILIC	HILIC-SM/SM	D ₃ BMAA	tr, ions (119>102, 88, 76, 73, 44) et ratios	95 – 109% (dopage avec BMAA 10 à 1000 µg/g, dévia stand : 1% à 6%)	< 1 µg/g (libre) < 4 µg/g (liée)	Méthode validée par dopage de cyanobactéries et tissu muscucaire	OUI pour BMAA, DAB & AEG	OUI (rend, LD, étal interne BMAA)	
Roy-Lachapelle et al., 2015	Eau, cyanobactéries	Toxines extraites après 3 cycles de congélation/décongélation à partir de 100 ml d'échantillon d'eau. pH ajusté à 4 au moyen d'acide citrique	Cartouche Strata-X-C (200 mg, 6 mL)	Dansyl chlorure (DNS)	Colonne C18 Hypersil GOLD™ (100 × 2.1 mm, 1.9 µm) et colonne de garde (5 × 2.1 mm, 3 µm)	LC-MS/MS	DAB-D3	tr BMAA : 585,1836 > 277,1007 et 71,0131 DAB : 585,1836 > 277,1006 et 88,0395 AEG : 585,1835 > 289,1005 et 88,0394 DAB-D3 3: 588,2024 > 279,1130 et 88,0396 Ratios d'ions (ion quanti / ion confirmation) Ion confirmation : 2ème ion le	SPE : 93 - 102% (pour BMAA, DAB et AEG)	BMAA : LD=0,008 et LQ=0,02 µg/L DAB : LD=0,009 et LQ=0,03 µg/L AEG : LD=0,007 et LQ=0,02 µg/L	Effets matrices 79 - 90 % (pour BMAA, DAB et AEG) Erreur justesse : 2-9% Répéta : CV 2-6% Repro : CV 5-12%	OUI (ions diagnostics parfois identiques mais tr différents)	OUI	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
								plus abondant du massif isotopique						
Salomonsson et al., 2013	Moule	TCA 0.1M HCl 6M (total)	Aucune	DNS	Acquity BEH C18	UPLC-SM/SM	D ₃ BMAA	tr et ions (585 > 277, 170, <u>88</u> , <u>71</u>)	83,50%	LQ : 4 fmols colonne LD : 16 ng/g (4 fmol) & LQ : 0,15 µg/g (33 fmol injectés) (poids frais moules)	Validation interne pour quantifier BMAA dans les moules via dérivation avec Dansyl Chloride en UPLC-MS/MS. Application sur moules Sweden mussels : 0,27 - 1,6 µg/g Wet mussels	OUI pour BMAA & DAB	OUI (rend, LQ), étal int BMAA. Linéarité, précision, justesse, spécificité, répét et repro	
Salomonsson et al., 2015	Moules, coquilles St Jacques, crevettes, écrevisses, crabes, poissons	Total BMAA selon Salomonsson et al. (2013) : HCl 6M BMAA libre : 100 mg homogénéat dopé avec BMAA-d3 extrait avec 500 µL 0,1N TCA, congelé sous N2-décongelé 3 fois. Ajout de 500 µL 0,1N TCA, vortex 2h, centrifugation puis évaporation surnageant avant reprise dans 1,5 mL HCl 20mM	Aucune	DNS (Procédure détaillée)	Acquity BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 µm)	UPLC-MS/MS	² H ₃ -BMAA	tr (± 0,02 min par rapport étalon) BMAA : MH+ m/z 585 ; ions fils m/z <u>277</u> , 170, <u>71</u> ² H ₃ -BMAA : MH+ m/z 588 ; ions fils m/z 280 DAB et AEG : MH+ m/z 585 ; ions fils m/z 170, <u>88</u> pour BMAA ratio ions m/z 71 et 277	94 - 109%	Gamme étalon en matrice (moules) : 0,15–15 µg BMAA/g LD = 0,10 µg/g moule (ww) pour S/N>3 LQ = 0,15 µg/g moule (ww)	Méthode précédemment validée sur matrice moules concentrations de 0,15 à 4,4 µg/g (ajouts dosés moules) Fidélité et justesse évaluées pour 4 niveaux sur 3 jours Répéta : 1,3 - 7,8% Repro : 3,3 - 7,6% Justesse : 94 - 109%	OUI	OUI critères quantitatifs évalués pour matrice moule	

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Scott et al., 2009	Compléments alimentaires (CA), poissons	1,0 g d'échantillon extrait avec 6 ml de TCA 0,3 M. Après centrifugation, le culot est extrait de nouveau avec 4 mL TCA pour les CA et 4 mL pour les poissons puis centrifugé . Mélange des 2 surnageants, volume complété à 10 mL avec de l'eau. Purif SCX Culot de poisson hydrolysé avec 5 mL HCl 6M pdt 20 h. Transfert de la solution dans un autre tube rincé avec 2 × 2,5 mL d'eau. Eaux de rinçages ajoutées à l'hydrolysat. Purif sur C18 puis SCX	C18 SPE (500 mg/3 ml) Strata SCX (500 mg/3 ml)	FMOC	Pré-colonne Zorbax C18 (12.5 × 4.6 mm, 5 µm) Supelcosil LC-18, (150 × 4.6 mm, 5 µm)	LC-FLD	Aucun	tr λ exc = 254 nm et λ em = 315 nm	67 à 89% pour BMAA libre dans les CA et poissons 66 à 83% BMAA liée dans les CA et poissons	LD : 0,004 ng BMAA en colonne 0,21 mg/g dans les CA LQ : 0,013 ng of BMAA en colonne 0,69 mg/g dans les CA 0,22 mg/g dans le poisson		NON	NON	
Scott et al., 2014	Cyanobactéries	BMAA libre extraite avec solution TCA 0,1M et sonication BMAA liée extraite du culot de cellules avec HCl 6M (18h à 110°C). Extraits filtrés, lyophilisés puis repris dans HCl 20mM		EZ:faast	Colonne AAA-MS (250 × 2 mm)	LC-MS/MS		Renvoi vers Downing et al. (2014)				NON Mention des transitions suivies mais pas de leur spécificité vis-à-vis des différents isomères	NON Uniquement mention de la LD sans précision du fait que ce soit en matrice ou pas	
Smith et al 1992	cerveau	Cf Duncan 1989 et 1991	-	-	GC	MS		M/z 190 et 365	-	-		NON	NON	pas de suivi de la 2,4 DB qui donnerai les mêmes transitions

Référence	Matrices	Extraction	Purification (SPE, autre)	Dérivation	Séparation	Détection	Etalon interne	Critères d'identification	Rendements d'extraction	LOD/LOQ (colonne, matrice)	Autres données de caractérisation / validation	Qualitatif	Quantitatif	Commentaires
Snyder et al, 2009	Foie et cerveau de souris nourrie au BMAA Cerveau humain	HCl 6N	Partage liqu/liq avec Chloroforme	Ethyl chloroformate	Colonne capillaire Rtx-5MS de 60 m	GC/MS	D ₃ BMAA H3BMAA	Mode SIM, ions 116 (H ₃ BMAA), 119 (D ₃ BMAA) (quantification) 245, 248 (qualification)	95%	0,1 µg/g tissu 0,2 µg/g tissu		OUI pour BMAA	OUI (rend, LD ou LQ), étal inter D3 & H3BMAA	
Snyder et al, 2010	Tissu de cerveau humain et de souris	HCl 6N	partage liquid/liquide avec Chloroforme	Methoxamine hydrochloride-	Colonne 1 : Rtx-5 colonne capillaire de 20 m Colonne 2 : Rtx-200 de 2 m	GCxGC-TOFMS	Aucun	tr, Chaîne de masse spécifique m/z : 100, 101, 102, 103, 114, 115, 116, 117, 118, 129, 131, 132, 133, 291, 292.		LD : 0,7 ppb (calculé via dopage matrice blanche)	Utilisation de la chromatographie multidimensionnelle (éliminer l'effet matrice biologique), combinée à un logiciel de traitement de données en SMHR - TOF.	OUI, transition spécifiques en GC/MSHR-TOF	OUI : dopage, Linéarité, SMHR-TOF. Pas de rendement. Cependant résultats négatifs avec cette méthode pointue	
Spacil et al., 2010	Cyanobactéries (<i>Leptolyngbya</i> et mélange de <i>Nodularia spumigena</i> et <i>Aphanizomenon</i> sp.) Graines de <i>Cycas revoluta</i> Poissons, huitres	Cellules extraites par sonication dans 600 µL 80% MeOH. Evaporation du surnageant, hydrolyse avec 600 µL HCl 6M (24 h à 110°C), évaporation et reprise dans HCl 20mM (conc. Finale 12,5 g protéine/L)	Isolute HCX-3, 100 mg	AQC (Procédure détaillée)	Hypersil GOLD C18 (100 × 2.1 mm, 3 µm)	LC-MS/MS	Aucun	tr BMAA et DAB m/z 459.1 Ions fils m/z 119,1; 188.0 (DAB), 258.0 (BMAA) Ratios d'ions (119,1/188,1 et 119,1/258,1)		LQ BMAA 70 fmol (S/N = 9,2) et environ 700 fmol (S/N = 8,0) pour DAB injecté sur colonne	Données de fidélité (répéta, repro) déterminées sur 1 niveau de conc. d'étalon en solvant (n=6, nb jours non précisé)	OUI	NON	

Légende

	Critères qualitatifs <u>et</u> quantitatifs non satisfaisants	48%
	Critères qualitatifs satisfaisants et quantitatifs non satisfaisants	27%
	Critères qualitatifs <u>et</u> quantitatifs satisfaisants	25%

Annexe 3 : Les critères des Hill

Temporalité de l'association

Ce critère se réfère au fait que la cause, c'est-à-dire l'exposition, doit précéder l'effet, c'est-à-dire l'apparition de la maladie. L'établissement de cette relation temporelle étant indispensable pour envisager une relation causale, ce critère est le critère nécessaire à la causalité mais pas suffisant.

Force de l'association

La force de l'association est quantifiée par les mesures d'association que constituent le risque relatif et l'odds ratio par exemple. Elle est d'autant plus élevée que ces mesures prennent des valeurs estimées importantes dans les études épidémiologiques. La force de l'association est considérée comme un critère fort de causalité.

Relation dose-effet

Ce critère consiste en la présence d'une relation monotone entre le niveau d'exposition au facteur considéré et le risque de développer la maladie étudiée. Ce critère est considéré comme un critère fort de causalité dans la mesure où l'on s'attend à ce qu'une exposition croissante expose à des lésions plus importantes favorisant d'autant plus le processus pathologique.

Reproductibilité des résultats de l'association

Ce critère se réfère à la réplication dans plusieurs études de l'observation de l'association considérée entre facteur d'exposition et maladie. Ce critère est d'autant plus fort que ces études ont été réalisées dans des populations ou contextes différents. Ce critère est considéré comme un critère fort de causalité.

Plausibilité biologique de l'association

Ce critère détermine si l'association considérée est cohérente par rapport aux connaissances biologiques. Ce critère est considéré comme un critère fort de causalité car une association de nature causale doit reposer sur des mécanismes biologiques. Toutefois, il ne s'agit pas d'un critère nécessaire de causalité car l'absence de connaissance biologique peut refléter seulement l'état présent des connaissances scientifiques. À l'inverse, la plausibilité biologique n'est pas un critère suffisant de causalité car l'élucidation de mécanismes biologiques à partir d'études *in vitro* ou d'études animales par exemple n'est pas nécessairement transposable *in vivo* chez l'homme.

Cohérence biologique

Ce critère est vérifié quand l'interprétation causale de l'association considérée est en cohérence avec l'histoire naturelle et la biologie de la maladie. Il est très proche du critère précédent et n'en est parfois pas distingué.

Présence de données expérimentales

Ce critère apparaît mal défini par Hill en 1965. Il peut recouvrir l'existence de données expérimentales biologiques ou animales mais aussi des données concernant les effets de l'élimination d'une exposition délétère dans une population. Ce critère n'est ni nécessaire ni suffisant pour affirmer la causalité. Il est parfois omis de la liste des critères de causalité. Dans le cadre de notre analyse, nous le prendrons en compte pour évaluer si la suppression de l'exposition a un impact sur l'apparition de la maladie.

Spécificité de l'association

Ce critère signifie qu'une cause doit conduire à un seul effet, c'est-à-dire qu'à une exposition de nature causale ne doit être associée qu'une seule maladie causée par l'exposition. La justification de son inclusion comme critère de causalité serait qu'il suggère l'existence d'un mécanisme propre à la maladie étudiée, ce qui est en faveur d'une relation causale. Ce critère n'est pas toujours un critère approprié de causalité.

Analogie

Il s'agit de l'analogie par rapport à d'autres relations causales et à leurs mécanismes. Ce critère n'est ni nécessaire ni suffisant. Il est considéré comme un critère faible de causalité du fait de sa subjectivité importante.

Annexe 4 : Grilles de lecture des 8 publications retenues

Référence	Christensen et al., 2012. Detection and quantification of β -N-Méthylamino-L-alanine in aquatic invertebrates
Objectifs	Développement d'une méthode de dosage de la BMAA totale dans des matrices biologiques et applications sur des échantillons environnementaux.
Type d'étude	Environnementale
Pays	USA
Espèce(s) étudiée (s)	Huitres (<i>Crassostrea virginica</i>), crabe bleu (<i>Callinectes sapidus</i>), limace de mer (<i>Aplysia californica</i>) comme témoin négatif.
Variants étudiés, fraction	BMAA fraction totale
Protocole expérimental	Prélèvement des invertébrés en milieux saumâtres et marins : huitres (Louisiane n = 12 et Mississipi n = 3) et crabe bleu (Floride n = 5).
Tissus/organes étudiés	Huitre : muscle adducteur, muscle adducteur + glande digestive, branchies, reste du corps. Crabe : muscle. Limace de mer : corps entier
Voie d'exposition	Trophique
Méthode d'analyse	LC-MS/MS (QTRAP, ESI MRM), avec dérivation AQC
Niveau de confiance de la méthode d'analyse	Score 1. Quatre critères d'identification (temps de rétention, ion parent, ion produits par collision et ratios d'ion). Chromatogrammes reportés. Effet matrice ($\approx 10\%$). Quantification avec courbe étalon 5 points et dopage de matrice saine (limace de mer) avec standard L-BMAA. Facteur de correction sur la base de 92% de détection par la méthode (= recovery). LD = 0.5 mg/kg, LQ = 1.7 mg/kg.
Résultats	Les teneurs en BMAA totale oscillent entre 9 et 47 mg/kg poids sec dans les huitres de Louisiane, entre 7 et 10 mg/kg poids sec dans les huitres du Mississipi, et entre 5 et 14 mg/kg poids sec dans les crabes bleus de Floride.
Conclusion	Les huitres et les crabes bleus prélevés en milieu naturel dans trois sites différents contiennent tous de la BMAA (de 5 à 47 mg/kg poids sec), y compris dans les parties consommables par l'homme (muscle).
Qualité de l'étude	Bonne
Commentaires	Les auteurs mentionnent avoir effectué, chez l'huitre, des dosages de BMAA dans le muscle adducteur seul ou dans le corps entier. Cependant, les résultats présentés ne mentionnent pas quelle partie du corps est concerné (une seule fourchette de valeurs reportée).
Informations complémentaires	Le DAB et l'AEG ont été utilisés dans le développement méthodologique afin d'assurer une détection non ambiguë entre la BMAA et ces deux isomères mais n'ont pas été quantifiés dans les matrices biologiques.

Référence	Jiang et al., 2012. Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. <i>Anal Bioanal Chem</i> , 403, 1719-1730.
Objectifs	Développement d'une méthode d'analyse de la BMAA et de ses isomères dans des matrices biologiques et application sur des échantillons environnementaux.
Type d'étude	Environnementale
Pays	Suède
Espèce(s) étudiée (s)	Moules (<i>Mytilus edulis</i>) et huîtres (<i>Ostrea edulis</i>)
Variants étudiés, fraction	BMAA, BAMA, AEG, DAB, fraction libre
Protocole expérimental	Prélèvement d'individus en Atlantique (côte ouest suédoise).
Tissus/organes étudiés	Corps entier
Voie d'exposition	Trophique (filtration)
Méthode d'analyse	LC- et UPLC-MS/MS (QTRAP, ESI, SRM), avec dérivation AQC.
Niveau de confiance de la méthode d'analyse	Score 2. Quatre critères d'identification (temps de rétention, ion parent, ion produits par collision et ratios d'ion). Chromatogrammes reportés. Pourcentage d'extraction non mentionné. Quantification avec courbe étalon et dopage de matrice de cyanobactéries avec standard de BMAA, BAMA et DAB.
Résultats	Les moules et les huîtres présentent une accumulation de BMAA et de BAMA mais les valeurs ne sont pas reportées dans l'article.
Conclusion	Accumulation de BMAA et de BAMA libres chez des individus de <i>Mytilus edulis</i> et <i>Ostrea edulis</i> prélevés en Atlantique.
Qualité de l'étude	Bonne
Commentaires	Aucune précision n'est apportée concernant le nombre d'échantillons prélevés, la saison ou le nombre de prélèvements. La BMAA et ses isomères ont été détectés chez les bivalves mais non quantifiés.
Informations complémentaires	La méthode sépare efficacement les isomères DAB, AEG, BAMA et BMAA, ce qui permet une identification et une quantification de BMAA non ambiguë. Cependant, la méthode d'extraction utilisée ne permet pas de mettre en évidence la BMAA totale (pas d'hydrolyse acide HCl).

Référence	Jiang et al., 2014. Quantification of neurotoxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in seafood from Swedish markets. Scientific reports 4, 6931.
Objectifs	Déterminer les concentrations en BMAA totale dans des fruits de mer et poissons du commerce
Type d'étude	Laboratoire et environnementale
Pays	Suède
Espèce(s) étudiée (s)	Moule (<i>Mytilus edulis</i> , n = 6), huîtres (<i>Ostrea edulis</i> , <i>Crassostrea gigas</i> , n = 4), plie (<i>Pleuronectes platessa</i> , n = 3), hareng (<i>Clupea harengus</i> , n = 3), saumon (<i>Salmo salar</i> , n = 4), omble chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i> , n = 4), morue (<i>Gadus morhua</i> , n = 4), perche (<i>Perca fluviatilis</i> , n = 4), crevette (<i>Caridea sp.</i> , n = 6), écrevisse (<i>Astacus leptodactylus</i> , n = 6)
Variants étudiés et fraction	BMAA fraction totale (libre et liée). BAMA, AEG et DAB séparés de BMAA mais non quantifiés.
Protocole expérimental	Achats et dosages de mollusques frais (moules et huître), de crustacés cuits (crevettes et écrevisses) et de poissons frais (saumons, hareng, morue, omble chevalier, perche) dans cinq marchés de Stockholm. Extraction de la BMAA totale.
Tissus/organes étudiés	Parties consommables (muscle des poissons, crevettes et écrevisses), corps entier pour les moules et les huîtres.
Voie d'exposition	Trophique
Méthode d'analyse	UHPLC-MS/MS (QTRAP, ESI, MRM), avec dérivation AQC.
Niveau de confiance de la méthode d'analyse	Score 1. Quatre critères d'identification (temps de rétention, ion parent, ion produits par collision et ratios d'ion). Chromatogrammes reportés. Dopage avec standard interne D3-BMAA de muscle d'écrevisse sain. Accuracy 108-119%. LQ et LD = < 0.01 mg/kg poids frais.
Résultats	La BMAA totale est détectée à des concentrations allant de 0.08 à 0.9 mg/kg poids frais (= de 0.4 à 4.5 mg/kg poids sec) dans les moules et les huîtres, et de 0,11 à 0,46 mg/kg poids frais (= 0,55- 2,3 mg/kg poids sec) dans les crevettes. Elle est également détectée dans certains poissons (la plie et le hareng) mais à des concentrations beaucoup plus faibles (de ND à 0.02 mg/kg poids frais = ND à 0.1 mg/kg poids sec). Par contre, les chairs de saumon, morue, perche et écrevisse ne contiennent pas de BMAA totale.
Conclusion	La moitié des échantillons contiennent de la BMAA (= de 0.4 à 4.5 mg/kg poids sec) et les plus fortes concentrations concernent les moules, suivies des huîtres et des crevettes. Les poissons (plie et hareng) sont faiblement contaminés et les autres poissons ne contiennent pas de BMAA.
Qualité de l'étude	Très bonne
Commentaires	Les teneurs en BMAA restent modérées (< 1 mg/kg poids frais) par rapport à d'autres études. Les moules contiennent les plus fortes teneurs en BMAA totale : 0.9 mg/kg poids frais contre environ 3 fois moins chez les crevettes.
Informations complémentaires	

Référence	Li et al., 2016. New typical vector of neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in the marine benthic ecosystem. <i>Marine Drugs</i> 14, 202.
Objectifs	Détermination des teneurs en BMAA, DAB et AEG dans des produits de la mer consommés dans plusieurs villes de Chine.
Type d'étude	Environnementale
Pays	Chine
Espèce(s) étudiée (s)	<i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Mytilus coruscus</i> , <i>Crassostrea sp.</i> , <i>Atrina pectinata</i> , <i>Perna viridis</i> , <i>Antigona lamellaris</i> , <i>Meretrix lusoria</i> , <i>Periglypta petechialis</i> , <i>Chlamys farreri</i> , <i>Solen strictus</i> , <i>Macra chinensis</i> , <i>Ruditapes philippinarum</i> , <i>Neverita didyma</i> , <i>Sinonovacula constricta</i> , <i>Tegillarca granosa</i> , <i>Haliotis discus hannai</i> , <i>Turritella bacillum</i> , <i>Natica maculosa</i> , <i>Batillaria zonalis</i> , <i>Moerella iridescens</i> , <i>Scapharca subcrenata</i> , <i>Macra chinensis</i> , <i>Volutharpa ampullacea</i> , <i>Neptunea cumingii</i> , <i>Arca inflata</i> , <i>Merceneria merceneria</i> , <i>Rapana venosa</i>
Variants étudiés, fraction	BMAA, DAB, AEG, fraction totale et libre
Protocole expérimental	Prélèvements de mollusques dans des aquacultures et achats dans les marchés de plusieurs villes chinoises (68 échantillons, 29 espèces) + prélèvements de 2 individus d'une espèce de gastéropode en milieu naturel.
Tissus/organes étudiés	Corps entier
Voie d'exposition	Trophique (filtration)
Méthode d'analyse	LC-MS/MS (colonne HILIC, ESI), sans dérivation
Niveau de confiance de la méthode d'analyse	Score 2 (satisfaisant pour la détection mais non satisfaisant pour la quantification)
Résultats	<p>La BMAA libre est détectée dans 5 échantillons sur 68, appartenant à 3 espèces marines, une moule (1 échantillon positif/9), un couteau (1/1) et un gastéropode (3/3) (respectivement <i>Mytilus coruscus</i> 0.45 mg/kg poids frais, <i>Solen strictus</i> 0.66 mg/kg poids frais, <i>Neverita didyma</i> 0.99, 2,15 et 3,97 mg/kg poids frais). Huit autres échantillons de moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) et 10 d'huîtres (<i>Crassostrea sp</i>) collectés sur les côtes chinoises ne contiennent pas de BMAA.</p> <p>Le DAB libre est détecté dans 53 échantillons sur 68, appartenant à 23 espèces marines, à des concentrations allant de 0.05 à 2.65 mg/kg poids frais (par exemple 0.23, 0.31, 0.45, 0.53, 0.61, 0.70 et 0.83 mg/kg poids frais chez les huîtres <i>Crassostrea</i>, et 0.29, 0.41, 0.50, 0.58, 0.60, 0.63, 0.71, 0.74, 1.61 mg/kg poids frais chez les moules <i>Mytilus galloprovincialis</i> et <i>Mytilus coruscus</i>). Les concentrations de DAB sont constantes entre les espèces et les régions prospectées.</p> <p>Les auteurs reportent une absence de BMAA ou de DAB liées aux protéines, ainsi qu'une absence d'AEG quelle que soit la forme (libre ou totale). Ils reportent que la quantité d'acides aminés (Arg, Asp, Glu, Leu, Lys, Ser, Thr, Île et Met) mesurée dans les muscles d'un gastéropode marin diminue avec l'augmentation de l'accumulation de BMAA libre dans ces mêmes tissus, et suggèrent que la BMAA ne s'incorpore pas dans les protéines mais affecte leur synthèse.</p>
Conclusion	La BMAA est détectée dans 5 échantillons sur 68, appartenant à 3 espèces marines, une moule, un couteau et un gastéropode carnivore, ce dernier étant suspecté d'être un vecteur de BMAA au sein du réseau trophique marin benthique. Le DAB est détecté beaucoup plus fréquemment, dans 53 échantillons sur 68. Les deux isomères ne sont retrouvés que sous forme libre dans les tissus et non sous forme liée aux protéines, bien que les auteurs suggèrent d'après leurs résultats que la BMAA affecte la synthèse des protéines.
Qualité de l'étude	Bonne
Commentaires	L'ensemble des échantillons du gastéropode marin <i>Neverita didyma</i> contiennent de la BMAA. Ce gastéropode, consommé par la population chinoise, est un prédateur consommant des mollusques comme les palourdes ou les couteaux, ces derniers accumulant 0.66 mg BMAA libre/kg poids frais. Les auteurs le reportent comme un vecteur potentiellement important de BMAA dans l'écosystème marin benthique. Le gastéropode accumule plus de BMAA dans le complexe glande digestive-glande génitale (0.95 mg BMAA libre /kg poids frais) que dans le muscle (0.36 mg BMAA libre /kg poids frais).
Informations complémentaires	Les auteurs reportent que l'utilisation de cartouches SPE induit une perte importante (5 à 6 fois moins) de détection de BMAA dans la fraction protéique des tissus (essai par dopage).

Référence	Reveillon et al., 2014, Beta-N-Methylamino-L-Alanine: LC-MS/MS Optimization, Screening of Cyanobacterial Strains and Occurrence in Shellfish from Thau, a French Mediterranean Lagoon. Marine Drugs, 5441-5467.																																																																										
Objectifs	Optimisation d'une méthode d'analyse de BMAA et de ses isomères dans des souches de cyanobactérie dans des mollusques de l'étang de Thau.																																																																										
Type d'étude	Environnementale																																																																										
Pays	France																																																																										
Espèce(s) étudiée (s)	<i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Crassostrea gigas</i>																																																																										
Variants étudiés, fraction	BMAA, DAB, AEG, fraction totale et libre																																																																										
Protocole expérimental	Prélèvements de moules (n = 19) et d'huitres (n = 14) entre juin et septembre 2009 sur les sites de Bouziques et Marseillan.																																																																										
Tissus/organes étudiés	Corps entier																																																																										
Voie d'exposition	Trophique (filtration)																																																																										
Méthode d'analyse	LC-MS/MS (UFLC QTRAP, colonne HILIC, MRM), sans dérivation																																																																										
Niveau de confiance de la méthode d'analyse	<p>Score 1. Evaluation de la linéarité, LD, LQ, et répétabilité. Quatre critères d'identification (temps de rétention parent, ion produits par collision et ratios d'ion). Chromatogrammes repro. Rendement d'extraction (>60%) et effet matrice (<16%) :</p> <p>Table 1. Recoveries (n = 3) of the solid phase extraction (SPE) clean-up (spiked solutions at 30 ng/mL) and remaining matrix suppression of the three matrices after the extraction of free and total BMAA and isomers. Matrix effects were evaluated as explained in Section 3.5.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Extraction</th> <th rowspan="2">Matrix</th> <th colspan="4">Recoveries of SPE Clean-Up (mean% ± SD)</th> <th colspan="4">Matrix Effect (%)</th> </tr> <tr> <th>BMAA</th> <th>DAB</th> <th>D5DAB</th> <th>AEG</th> <th>BMAA</th> <th>DAB</th> <th>D5DAB</th> <th>AEG</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="3">Free analytes</td> <td>Cyanobacteria</td> <td>61.1 ± 4.9</td> <td>51.0 ± 5.6</td> <td>61.0 ± 1.6</td> <td>48.1 ± 5.5</td> <td>8.8</td> <td>5.6</td> <td>4.7</td> <td>9.3</td> </tr> <tr> <td>Oyster</td> <td>56.1 ± 4.5</td> <td>64.5 ± 4.5</td> <td>65.4 ± 4.5</td> <td>63.1 ± 3.8</td> <td>7.3</td> <td>0.9</td> <td>-3.5</td> <td>0.2</td> </tr> <tr> <td>Mussel</td> <td>63.8 ± 3.1</td> <td>79.0 ± 6.8</td> <td>75.6 ± 5.7</td> <td>73.3 ± 2.1</td> <td>5.3</td> <td>-6.3</td> <td>1.2</td> <td>0.7</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Total analytes</td> <td>Cyanobacteria</td> <td>67.6 ± 3.3</td> <td>63.1 ± 1.9</td> <td>63.4 ± 7.5</td> <td>59.5 ± 1.0</td> <td>3.8</td> <td>1.9</td> <td>4.2</td> <td>-9</td> </tr> <tr> <td>Oyster</td> <td>71.0 ± 2.0</td> <td>76.4 ± 9.5</td> <td>81.1 ± 4.1</td> <td>74.0 ± 6.4</td> <td>7.5</td> <td>3.5</td> <td>3</td> <td>3.6</td> </tr> <tr> <td>Mussel</td> <td>64.3 ± 8.0</td> <td>65.0 ± 8.1</td> <td>77.1 ± 6.5</td> <td>64.3 ± 0.9</td> <td>8.7</td> <td>12.1</td> <td>15.7</td> <td>-5.5</td> </tr> </tbody> </table> <p>Quantification avec courbe étalon 5 points. Facteur de correction d'identification après dopage au D5DAB LQ = 0.15 mg/kg poids sec.</p>	Extraction	Matrix	Recoveries of SPE Clean-Up (mean% ± SD)				Matrix Effect (%)				BMAA	DAB	D5DAB	AEG	BMAA	DAB	D5DAB	AEG	Free analytes	Cyanobacteria	61.1 ± 4.9	51.0 ± 5.6	61.0 ± 1.6	48.1 ± 5.5	8.8	5.6	4.7	9.3	Oyster	56.1 ± 4.5	64.5 ± 4.5	65.4 ± 4.5	63.1 ± 3.8	7.3	0.9	-3.5	0.2	Mussel	63.8 ± 3.1	79.0 ± 6.8	75.6 ± 5.7	73.3 ± 2.1	5.3	-6.3	1.2	0.7	Total analytes	Cyanobacteria	67.6 ± 3.3	63.1 ± 1.9	63.4 ± 7.5	59.5 ± 1.0	3.8	1.9	4.2	-9	Oyster	71.0 ± 2.0	76.4 ± 9.5	81.1 ± 4.1	74.0 ± 6.4	7.5	3.5	3	3.6	Mussel	64.3 ± 8.0	65.0 ± 8.1	77.1 ± 6.5	64.3 ± 0.9	8.7	12.1	15.7	-5.5
Extraction	Matrix			Recoveries of SPE Clean-Up (mean% ± SD)				Matrix Effect (%)																																																																			
		BMAA	DAB	D5DAB	AEG	BMAA	DAB	D5DAB	AEG																																																																		
Free analytes	Cyanobacteria	61.1 ± 4.9	51.0 ± 5.6	61.0 ± 1.6	48.1 ± 5.5	8.8	5.6	4.7	9.3																																																																		
	Oyster	56.1 ± 4.5	64.5 ± 4.5	65.4 ± 4.5	63.1 ± 3.8	7.3	0.9	-3.5	0.2																																																																		
	Mussel	63.8 ± 3.1	79.0 ± 6.8	75.6 ± 5.7	73.3 ± 2.1	5.3	-6.3	1.2	0.7																																																																		
Total analytes	Cyanobacteria	67.6 ± 3.3	63.1 ± 1.9	63.4 ± 7.5	59.5 ± 1.0	3.8	1.9	4.2	-9																																																																		
	Oyster	71.0 ± 2.0	76.4 ± 9.5	81.1 ± 4.1	74.0 ± 6.4	7.5	3.5	3	3.6																																																																		
	Mussel	64.3 ± 8.0	65.0 ± 8.1	77.1 ± 6.5	64.3 ± 0.9	8.7	12.1	15.7	-5.5																																																																		
Résultats	Chez les moules, la BMAA libre et l'AEG libre sont retrouvés à des concentrations plus faibles (respectivement < 2 et < 0.5 mg/kg poids sec) et moins souvent (dans respectivement 4 et 3 échantillons sur 19), que la BMAA totale et l'AEG total (respectivement 3.8-14.4 et 0.6-1.4 mg/kg poids sec) retrouvés dans tous les échantillons. Il en est de même chez les huitres : BMAA libre et AEG libre à respectivement <0.5 et <0.1 mg/kg poids sec et dans respectivement 1 et 0 échantillon sur 19, contre des teneurs de respectivement 2.8-10.5 et 0.6-1.7 mg/kg poids sec de BMAA totale et AEG total retrouvées dans tous les échantillons. La BMAA libre n'est retrouvée chez les mollusques qu'en juin. La BMAA totale et l'AEG total dans les moules suivent une cinétique temporelle avec une augmentation graduelle de juin à début septembre 2009, période d'activité accrue de filtration chez les bivalves. Le DAB est présent dans tous les échantillons de moules et d'huitre de la saison, sans variation temporelle, à la fois sous forme libre (respectivement 0.5-7.2 et 0.2-3.8 mg/kg poids sec) et totale (respectivement 3.4-9.7 et 3.3-8.8 mg/kg poids sec).																																																																										
Conclusion	BMAA, DAB et AEG sont présents dans les tissus des moules et des huitres de juin à septembre. Les formes liées des trois isomères sont retrouvées dans tous les échantillons alors que les formes libres sont plus sporadiques. La consommation de ces bivalves présente donc un risque de transfert potentiel aux consommateurs.																																																																										
Qualité de l'étude	Très bonne																																																																										
Commentaires	La contamination des mollusques par la BMAA semble provenir d'une voie trophique par filtration de diatomées, avec des variations saisonnières associées. La présence constante de DAB dans les cyanobactéries ne produisant pas de BMAA et dans les mollusques soulèvent la question de son origine : contamination exogène par voie trophique ou molécule constitutive ?																																																																										
Informations complémentaires	En parallèle, deux blooms phytoplanktoniques dominés par des diatomées sont observés dans la période. La production de BMAA par ces diatomées sera confirmée dans Reveillon et al (2015). Aucune BMAA n'est retrouvée dans les cyanobactéries prélevées dans cette étude alors que du DAB est mis en évidence pendant toute la période.																																																																										

Référence	Reveillon et al., 2015, β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. Marine Environmental Research. 8-18.
Objectifs	Etude de la contamination en BMAA et ses isomères de moules, de leur biofilm et de plancton de l'étang de Thau, zone de sur-incidence de SLA.
Type d'étude	Environnementale
Pays	France
Espèce(s) étudiée (s)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
Variants étudiés et fraction	BMAA, DAB, AEG, fraction totale et libre
Protocole expérimental	Prélèvements au minimum mensuel de moules (n = 17), du biofilm de leur coquille (n = 13) et de plancton (n = 17) entre juillet 2013 et août 2014.
Tissus/organes étudiés	Glande digestive et tissus restant
Voie d'exposition	Trophique (filtration)
Méthode d'analyse	LC-MS/MS (UFLC QTRAP, colonne HILIC, MRM), sans dérivation.
Niveau de confiance de la méthode d'analyse	Score 1. Méthode présentée dans Reveillon et al (2014), cf fiche précédente. Quatre critères d'identification (temps de rétention, ion parent, ion produits par collision et ratios d'ion). Chromatogrammes reportés. Rendement d'extraction 56-66% (dopage avec standard interne DAB deutéré, D ₅ DAB). Quantification avec courbe étalon 5 points. Facteur de correction d'identification après dopage au D ₅ DAB. LQ dans Reveillon et al (2014), cf fiche précédente.
Résultats	Chez les bivalves, la BMAA libre est retrouvée moins souvent (16 échantillons/34) et toujours à des concentrations plus faibles (max 1.2 mg/kg poids sec) que la BMAA totale (max 9.7 mg/kg poids sec) retrouvée dans tous les échantillons. Cette dernière montre des variations saisonnières avec une augmentation des teneurs en été et automne 2013 et 2014. De même pour l'AEG retrouvé sous forme totale dans 31 des 34 échantillons (max 1.2 mg/kg poids sec) mais sous forme libre dans seulement 5 échantillons et à des concentrations maximales de 0.31 mg/kg poids sec. Le DAB est retrouvé dans tous les échantillons et à des teneurs constantes entre organes et pendant l'année (moy 7.2 mg/kg poids sec), à la fois sous forme libre (max 6.2 mg/kg poids sec) et totale (max 10.7 mg/kg poids sec).
Conclusion	BMAA, DAB et AEG sont présents dans les tissus des moules toute l'année avec des teneurs plus importantes en BMAA et AEG pendant l'été, saison de plus importante prolifération phytoplanctonique, comparé aux autres saisons. La consommation de moules présente donc un risque de transfert potentiel aux consommateurs.
Qualité de l'étude	Très bonne
Commentaires	La BMAA et le DAB ont aussi été détectés dans des échantillons de phytoplancton, de périphyton et de zooplancton. La source potentielle de contamination des moules semble être les diatomées, sources de nourriture de ces bivalves dans l'étang de Thau, et dont la production de BMAA a été démontrée par les auteurs. La concentration en DAB, constante dans le temps et entre les organes, requiert de plus amples investigations.
Informations complémentaires	Les moules présentent des teneurs en BMAA inférieures dans la glande digestive comparée au reste du corps (respectivement 69.3 ± 17% et 59.5 ± 6%). L'inverse est observé pour les concentrations d'AEG libres et totales. Concernant le DAB, les formes liées et libres prédominent respectivement dans la glande digestive et dans le reste du corps.

Référence	Salomsson et al., 2013. Development and in-house validation of a method for quantification of BMAA in mussels using dansyl chloride derivatization and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. <i>Analytical methods</i> , 5, 4865.
Objectifs	Développement d'une méthode d'analyse de la BMAA totale dans des matrices biologiques et applications sur des échantillons environnementaux.
Type d'étude	Environnementale
Pays	Suède
Espèce(s) étudiée (s)	Moules (<i>Mytilus sp</i>)
Variants étudiés, fraction	BMAA fraction totale
Protocole expérimental	Prélèvements en Mer Baltique pour les témoins non contaminés et en Atlantique (n = 4) pour les moules dosées en BMAA.
Tissus/organes étudiés	Corps entier
Voie d'exposition	Trophique (filtration)
Méthode d'analyse	UPLC-ESI-MS/MS (SRM), avec dérivation au dansyl chloride
Niveau de confiance de la méthode d'analyse	Score 1. Quatre critères d'identification (temps de rétention, ion parent, ion produits par collision et ratios d'ion). Chromatogrammes reportés. Pourcentage d'extraction de 83%. Quantification avec courbe étalon 10 points et dopage de matrice saine avec standard de BMAA et D ₃ -BMAA. LD = 16 µg/kg poids frais, LQ basse = 0.15 mg/kg poids frais, LQ haute = 15 mg/kg poids frais
Résultats	Les teneurs en BMAA totale chez les moules prélevées en Atlantique oscillent entre 0.27 et 1.6 mg/kg poids frais, ce qui correspond à entre 1.35 et 8 mg/kg poids sec (en considérant que les tissus soient composés à 80% d'eau).
Conclusion	Accumulation de BMAA totale (de 1.35 et 8 mg/kg poids sec) chez 4 individus de <i>Mytilus sp</i> prélevés en Atlantique.
Qualité de l'étude	Très Bonne d'un point de vue analytique
Commentaires	Seulement 4 échantillons de moules ont été analysés, dans un seul site et lors d'un prélèvement unique.
Informations complémentaires	Aucune des moules prélevées en Mer Baltique ne contient de la BMAA ou de l'AEG, elles ont donc été utilisées dans le processus de calibration de la méthode.

Référence	Salomonsson et al. 2015. Seafood sold in Sweden contains BMAA: A study of free and total concentrations with UHPLC-MS/MS and dansyl chloride derivatization. Toxicology reports 2, 1473-1481.																																																																																																																				
Objectifs	Déterminer la concentration en BMAA libre et totale dans des fruits de mer du commerce en Suède, sous divers conditionnements (frais, cuisinés et en conserve) et de diverses provenances géographiques (de 4 continents), ainsi que dans différents tissus (cerveau, foie, muscles et reins) de poissons importés ou en provenance de Suède.																																																																																																																				
Type d'étude	Laboratoire et dosage échantillons environnementaux																																																																																																																				
Pays	Suède																																																																																																																				
Espèce(s) étudiée (s)	Moule (<i>Mytilus edulis</i> , <i>Mytilus edulis platensis</i> , <i>Perna Canaliculus</i>), crevette (<i>Pandalus borealis</i>), crabe (<i>Cancer pagarus</i> , <i>Portunus haani</i>), écrevisse (<i>Procambrus clarki</i>), coquille St Jacques (<i>Placopecten magellanicus</i>), poissons : saumon Atlantique (<i>Salmo salar</i>), loup de mer (<i>Dicentrarchus labrax</i>), brème (<i>Sparus aurata</i>), corégone (<i>Coregonus sp.</i>), sandre (<i>Sander lucioperca</i>), truite de mer (<i>Salmo truttae</i>).																																																																																																																				
Variants étudiés et fraction	BMAA, fraction totale et fraction libre analysées séparément. DAB et AEG détectés séparément de la BMAA mais non quantifiés.																																																																																																																				
Protocole expérimental	Achats de fruits de mer (cuits et stockés en conserve dans eau salée ou non, cuits et congelés), et de poissons dans un commerce, et don de 3 espèces de poissons prélevés par l'Institut Vétérinaire de Suède. Analyse de chaque espèce en triplicat ou en duplicat.																																																																																																																				
Tissus/organes étudiés	Parties consommables des fruits de mer : corps entier moule, queue de crevette, pince de crabe. Poissons : cerveau, foie, muscles et reins																																																																																																																				
Voie d'exposition	Trophique																																																																																																																				
Méthode d'analyse	Extraction de la BMAA libre (TCA) et totale (hydrolyse HCl) des tissus des fruits de mer. Analyses en UPLC-ESI-MS/MS (SRM), avec dérivation au dansyl chloride.																																																																																																																				
Niveau de confiance de la méthode d'analyse	Score 1. Méthode validée. Quatre critères d'identification (temps de rétention, ion parent, ion produits par collision et ratios d'ion). Chromatogrammes reportés. Pourcentage d'extraction de 83%. Quantification avec courbe étalon 10 points et dopage de matrice saine avec standard de BMAA. LD = 0.1 mg/kg poids frais, LQ basse = 0.15 mg/kg poids frais.																																																																																																																				
Résultats	<p>Aucune BMAA, libre ou totale, n'a été détectée dans les crevettes, les écrevisses ou dans les poissons, quel que soit l'organe étudié. Seule une espèce de crabe originaire d'Atlantique Nord-Est présente de la BMAA dans les tissus musculaires des pinces (cf Table ci-dessous).</p> <p>Table 1 Results from the analysis of total concentration of BMAA in seafood and fish.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Species</th> <th>Number of containers or animals/numbers of replicates of each animal</th> <th>Process and preservation method</th> <th>Storage</th> <th>Area of origin</th> <th>BMAA m/585 > 277 and m/z 585 > 71</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Crab <i>Cancer pagarus</i></td> <td>1</td> <td rowspan="2">Cooked</td> <td rowspan="2">F</td> <td rowspan="2">Ireland, North East Atlantic</td> <td rowspan="2">D.</td> </tr> <tr> <td>Muscle from claw</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Crab <i>Portunus haant</i></td> <td>1</td> <td rowspan="2">Cooked</td> <td rowspan="2">RTS</td> <td rowspan="2">Vietnam</td> <td rowspan="2">N.D</td> </tr> <tr> <td>Muscle from claw</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Crayfish <i>Procambarus clarkii</i></td> <td>1</td> <td rowspan="2">Cooked</td> <td rowspan="2">RS</td> <td rowspan="2">China, wild caught</td> <td rowspan="2">N.D</td> </tr> <tr> <td>Muscle tissue from tail</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Shrimps/Northern prawn <i>Pandalus borealis</i></td> <td>3</td> <td rowspan="4">Cooked</td> <td rowspan="4">F</td> <td rowspan="4">Greenland, North East Atlantic</td> <td rowspan="4">N.D</td> </tr> <tr> <td>A (tails, muscle)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>B (tails, muscle)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>C (tails, muscle)</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Atlantic Salmon <i>Salmo salar</i></td> <td>1</td> <td rowspan="3">Raw</td> <td rowspan="3">RI</td> <td rowspan="3">Norway, farmed</td> <td rowspan="3">N.D.</td> </tr> <tr> <td>Brain</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Muscle</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Sea bass <i>Dicentrarchus labrax</i></td> <td>1</td> <td rowspan="5">Raw</td> <td rowspan="5">RI</td> <td rowspan="5">Italy, farmed</td> <td rowspan="5">N.D.</td> </tr> <tr> <td>Brain</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Liver</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Muscle</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Kidney</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Sea bream <i>Sparus aurata</i></td> <td>1</td> <td rowspan="5">Raw</td> <td rowspan="5">RI</td> <td rowspan="5">Greece, farmed</td> <td rowspan="5">N.D.</td> </tr> <tr> <td>Brain</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Liver</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Muscle</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Kidney</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Whitefish <i>Coregonus spp.</i></td> <td>1</td> <td rowspan="2">Raw</td> <td rowspan="2">F</td> <td rowspan="2">Sweden, wild caught</td> <td rowspan="2">N.D</td> </tr> <tr> <td>Muscle</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Pikeperch <i>Sander lucioperca</i></td> <td>1</td> <td rowspan="5">Raw</td> <td rowspan="5">F</td> <td rowspan="5">Sweden, Baltic Sea, wild caught</td> <td rowspan="5">N.D.</td> </tr> <tr> <td>Brain</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Liver</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Muscle</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Kidney</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Sea trout <i>Salmo truttae</i></td> <td>2</td> <td rowspan="5">Raw</td> <td rowspan="5">F</td> <td rowspan="5">Sweden, Bothnain Sea, wild caught</td> <td rowspan="5">N.D.</td> </tr> <tr> <td>Brain</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Liver</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Muscle</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>Kidney</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table> <p>F - Freezer, RI - Refrigerator on ice, RS - Refrigerator in salt water, RTS - Room temperature canned in salt water, D. - Detected and N.D. - Not detectable (i.e., below the methods LOD).</p>	Species	Number of containers or animals/numbers of replicates of each animal	Process and preservation method	Storage	Area of origin	BMAA m/585 > 277 and m/z 585 > 71	Crab <i>Cancer pagarus</i>	1	Cooked	F	Ireland, North East Atlantic	D.	Muscle from claw	3	Crab <i>Portunus haant</i>	1	Cooked	RTS	Vietnam	N.D	Muscle from claw	3	Crayfish <i>Procambarus clarkii</i>	1	Cooked	RS	China, wild caught	N.D	Muscle tissue from tail	3	Shrimps/Northern prawn <i>Pandalus borealis</i>	3	Cooked	F	Greenland, North East Atlantic	N.D	A (tails, muscle)	3	B (tails, muscle)	3	C (tails, muscle)	3	Atlantic Salmon <i>Salmo salar</i>	1	Raw	RI	Norway, farmed	N.D.	Brain	2	Muscle	2	Sea bass <i>Dicentrarchus labrax</i>	1	Raw	RI	Italy, farmed	N.D.	Brain	2	Liver	2	Muscle	2	Kidney	2	Sea bream <i>Sparus aurata</i>	1	Raw	RI	Greece, farmed	N.D.	Brain	2	Liver	2	Muscle	2	Kidney	2	Whitefish <i>Coregonus spp.</i>	1	Raw	F	Sweden, wild caught	N.D	Muscle	2	Pikeperch <i>Sander lucioperca</i>	1	Raw	F	Sweden, Baltic Sea, wild caught	N.D.	Brain	2	Liver	2	Muscle	2	Kidney	2	Sea trout <i>Salmo truttae</i>	2	Raw	F	Sweden, Bothnain Sea, wild caught	N.D.	Brain	2	Liver	2	Muscle	2	Kidney	2
Species	Number of containers or animals/numbers of replicates of each animal	Process and preservation method	Storage	Area of origin	BMAA m/585 > 277 and m/z 585 > 71																																																																																																																
Crab <i>Cancer pagarus</i>	1	Cooked	F	Ireland, North East Atlantic	D.																																																																																																																
Muscle from claw	3																																																																																																																				
Crab <i>Portunus haant</i>	1	Cooked	RTS	Vietnam	N.D																																																																																																																
Muscle from claw	3																																																																																																																				
Crayfish <i>Procambarus clarkii</i>	1	Cooked	RS	China, wild caught	N.D																																																																																																																
Muscle tissue from tail	3																																																																																																																				
Shrimps/Northern prawn <i>Pandalus borealis</i>	3	Cooked	F	Greenland, North East Atlantic	N.D																																																																																																																
A (tails, muscle)	3																																																																																																																				
B (tails, muscle)	3																																																																																																																				
C (tails, muscle)	3																																																																																																																				
Atlantic Salmon <i>Salmo salar</i>	1	Raw	RI	Norway, farmed	N.D.																																																																																																																
Brain	2																																																																																																																				
Muscle	2																																																																																																																				
Sea bass <i>Dicentrarchus labrax</i>	1	Raw	RI	Italy, farmed	N.D.																																																																																																																
Brain	2																																																																																																																				
Liver	2																																																																																																																				
Muscle	2																																																																																																																				
Kidney	2																																																																																																																				
Sea bream <i>Sparus aurata</i>	1	Raw	RI	Greece, farmed	N.D.																																																																																																																
Brain	2																																																																																																																				
Liver	2																																																																																																																				
Muscle	2																																																																																																																				
Kidney	2																																																																																																																				
Whitefish <i>Coregonus spp.</i>	1	Raw	F	Sweden, wild caught	N.D																																																																																																																
Muscle	2																																																																																																																				
Pikeperch <i>Sander lucioperca</i>	1	Raw	F	Sweden, Baltic Sea, wild caught	N.D.																																																																																																																
Brain	2																																																																																																																				
Liver	2																																																																																																																				
Muscle	2																																																																																																																				
Kidney	2																																																																																																																				
Sea trout <i>Salmo truttae</i>	2	Raw	F	Sweden, Bothnain Sea, wild caught	N.D.																																																																																																																
Brain	2																																																																																																																				
Liver	2																																																																																																																				
Muscle	2																																																																																																																				
Kidney	2																																																																																																																				
	<p>Par contre, de la BMAA totale est retrouvée chez toutes les moules (3 espèces) et les noix de St Jacques à des teneurs variant entre 0.29 et 7.08 mg/kg poids frais, ce qui correspond à environ 1.45 et 35.4 mg/kg poids sec (en considérant que les tissus soient composés à 80% d'eau), alors que la BMAA libre n'est retrouvée que chez 14 des 24 échantillons et à des teneurs au maximum de 0.46 mg/kg poids frais (environ 2.3 mg/kg poids sec). L'origine des produits contaminés est variée : Amérique de Sud et Australie pour les moules, Amérique du Nord pour les noix de St Jacques, et Europe pour le crabe (Tableau ci-dessous). La plus forte concentration de BMAA totale est retrouvée chez des moules importées en conserves (déjà cuites) d'Amérique du Sud qui contiennent des teneurs en BMAA totale jusqu'à 10 fois supérieures aux moules achetées fraîches en provenance de Scandinavie puis cuites ou congelées.</p>																																																																																																																				

Résultats	Table 2								
	Results from the analysis and quantification of total concentration of BMAA in mussels and scallops. Sample ID A–G refer to different seafood containers, whereas the numbers 1–3 refers to three different individual of same species. Each individual were analyzed in triplicate samples (n = 3). BM1 = blue mussel <i>Mytilus edulis</i> , BM2 = blue mussel <i>Mytilus edulis platensis</i> , GM = green mussel <i>Perna canaliculus</i> and S = Scallop <i>Placopecten magellanicus</i> .								
	Sample ID Species (n =3)	Storage ^a	Origin	t _R (min) (peak m/z 585 > 277)	S/N peak m/z 585 > 277	S/N peak m/z 585 > 71	S/N peak m/z 588 > 280	Ion ratio (peak area m/z 71)/(peak area m/z 277) (average of n = 3)	BMAA (µg g ⁻¹ wet mussel homogenate) (average of n = 3)
A:1 BM1	CC, RT	Europe (Scandinavia)	4.17	254	9	2298	0.030	0.56	
A:2 BM1	CC, RT	Europe (Scandinavia)	4.17	230	21	1910	0.044	0.59	
A:3 BM1	CC, RT	Europe (Scandinavia)	4.17	206	21	1568	0.050	0.50	
B:1 BM1	CC, RT	Europe (Scandinavia)	4.17	66	8	1804	0.040	0.29	
B:2 BM1	CC, RT	Europe (Scandinavia)	4.17	71	7	1524	0.038	0.31	
B:3 BM1	CC, RT	Europe (Scandinavia)	4.17	100	5	2315	0.037	0.28	
C:1 BM2	CC, RT	South America	4.17	1315	74	1677	0.055	4.46	
C:2 BM2	CC, RT	South America	4.17	934	156	1854	0.057	4.85	
C:3 BM2	CC, RT	South America	4.17	876	93	1427	0.053	4.48	
D:1 BM2	CC, RT	South America	4.17	936	107	1529	0.072	6.08	
D:2 BM2	CC, RT	South America	4.17	1676	129	1112	0.064	6.98	
D:3 BM2	CC, RT	South America	4.18	961	66	1284	0.057	6.52	
E:1 BM2	CC, RT	South America	4.17	1221	77	1434	0.059	7.08	
E:2 BM2	CC, RT	South America	4.17	2073	121	847	0.062	6.89	
E:3 BM2	CC, RT	South America	4.17	1947	263	2026	0.060	6.93	
F:1 BM2	PB, F	South America	4.17	534	29	1469	0.058	1.77	
F:2 BM2	PB, F	South America	4.17	507	49	1372	0.068	2.28	
F:3 BM2	PB, F	South America	4.17	316	58	1627	0.074	1.69	
H:1 GM	PB, F	Australia	4.17	531	17	1001	0.051	0.85	
H:2 GM	PB, F	Australia	4.17	243	22	2669	0.072	0.55	
H:3 GM	PB, F	Australia	4.17	374	21	1795	0.041	1.14	
G:1 S	PB, F	North America	4.18	452	49	2554	0.074	1.12	
G:2 S	PB, F	North America	4.17	608	30	2693	0.069	1.12	
G:3 S	PB, F	North America	4.17	354	36	2334	0.050	1.46	

^a Storage: CC = Cooked and Canned, RT = Room temperature, PB = Plastic bag, F = Freezer.

Conclusion

Aucune BMAA, libre ou totale, n'a été détectée dans les crevettes, les écrevisses ou dans les poissons. D'autres fruits de mer (moules, noix de St Jacques et crabes) importés et vendus en Suède contiennent des teneurs non négligeables en BMAA totale (entre 1.45 et 35.4 mg/kg poids sec). Les moules sont les organismes présentant les plus fortes teneurs en BMAA totale.

Qualité de l'étude

Très Bonne

Commentaires**Informations complémentaires**

La BMAA libre représente une part négligeable (environ 6.5%) de la BMAA totale mesurée chez les fruits de mer.

Référence	Rosen et al 2016. BMAA detected as neither free nor protein bound amino acid in blue mussels. <i>Toxicon</i> , 109, 45-50.
Objectifs	Déterminer si la BMAA est libre ou liée aux protéines dans les matrices biologiques, ou si elle forme d'autres composés, peptidiques ou non.
Type d'étude	Laboratoire et dosage échantillons environnementaux
Pays	Suède, Mer Baltique
Espèce(s) étudiée (s)	<i>Mytilus edulis</i>
Variants étudiés et fraction	BMAA, fraction totale
Protocole expérimental	1) Extraction de la BMAA totale des tissus de moules, 2) séparation des composés obtenus entre composés de faible et de fort poids moléculaires, 3) traitements avec différentes concentrations en acides, différents temps et températures de réaction, afin de déterminer dans quelle fraction de poids moléculaire est retrouvée la BMAA.
Tissus/organes étudiés	Corps entier
Voie d'exposition	Trophique (filtration)
Méthode d'analyse	UHPLC-MS/MS (HILIC, QTRAP, ESI SRM), sans dérivation.
Niveau de confiance de la méthode d'analyse	Score 1 Méthode validée et reportée dans Rosen and Hellenäs (2008). LD de la BMAA de 0.04 mg/kg.
Résultats	La majorité de la BMAA est retrouvée dans la fraction de faible poids moléculaire et ne correspond ni à une fraction d'acide aminé libre ni à une fraction protéique. La BMAA peut éventuellement être liée à un peptide de faible poids moléculaire, ou non, et ce composé impliqué dans le relargage de la BMAA doit encore être identifié.
Conclusion	La BMAA n'est ni sous forme libre, ni sous forme liées aux protéines dans les matrices biologiques (tissus de moules) mais sous une forme non identifiée.
Qualité de l'étude	Très Bonne
Commentaires	Cette publication ne donne pas directement d'indications sur les teneurs en BMAA chez des organismes consommés par l'homme mais apporte des informations intéressantes concernant le mécanisme de bioaccumulation dans les matrices biologiques.
Informations complémentaires	La stabilité de la BMAA est dépendante du pH à forte température et les auteurs observent la disparition totale de la BMAA d'un échantillon conservé une nuit à 95°C, ce qui pourrait expliquer les différences importantes dans les teneurs de BMAA chez les moules reportées par différents auteurs selon les méthodologies d'extraction utilisées.



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr / [@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)